

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7548911号
(P7548911)

(45)発行日 令和6年9月10日(2024.9.10)

(24)登録日 令和6年9月2日(2024.9.2)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00 Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	39/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/02
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00 K
A 6 1 K	39/002 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
請求項の数 16 (全71頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-539364(P2021-539364)	(73)特許権者	504146523
(86)(22)出願日	令和2年1月6日(2020.1.6)		エンジンアイシー モレキュラー デリ
(65)公表番号	特表2022-516347(P2022-516347 A)		バリー ピーティーワイ リミテッド
(43)公表日	令和4年2月25日(2022.2.25)		オーストラリア国 2 0 6 6 エヌエスダ
(86)国際出願番号	PCT/IB2020/050063		ブリュ, シドニー, レーン コウブ ウェ
(87)国際公開番号	WO2020/141495		スト, シリウス ロード 2 5, ビルデ
(87)国際公開日	令和2年7月9日(2020.7.9)	(74)代理人	100123788
審査請求日	令和4年10月25日(2022.10.25)		弁理士 宮崎 昭夫
(31)優先権主張番号	62/788,257	(74)代理人	100127454
(32)優先日	平成31年1月4日(2019.1.4)		弁理士 緒方 雅昭
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ブランバット、 ヒマンシュ
			オーストラリア国 2 0 6 6 ニュー サ
			ウス ウェールズ シドニー レーン コー
			ブ ウェスト シリアス ロード 2 5 ビ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍性疾患の治療のためのカプセル化グリコリピド抗原

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

- (a)CD1d拘束性のインバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原をカプセル化した、そのままの細菌由来のミニ細胞の、免疫原性有効量と、
- (b)抗腫瘍剤をカプセル化した、そのままの細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞であって、前記抗腫瘍剤は、放射性核種、化学療法剤、機能性核酸、および機能性核酸を転写することができるポリヌクレオチドおよびサイトキシンからなる群から選択され、
- (c)少なくとも1つの薬学的に受容可能なキャリアとを含み、
- (i) CD1d拘束性iNKT細胞抗原を含むそのままの細菌由来のミニ細胞が、標的化剤を含まず、 (i i) 抗腫瘍剤を含むそのままの細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞が標的化剤を含み、該標的化剤が二重特異性リガンドであり、

前記CD1d拘束性iNKT細胞抗原が、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer)、C-グリコシディフィック型 α -ガラクトシルセラミド (α -C-GalCer)、12炭素アシル型ガラクトシルセラミド (β -GalCer)、 β -D-グルコピラノシルセラミド (β -GlcCer)、1, 2-ジアシル- α -ガラクトシル-sn-グリセロール (BbGL-II)、ジアシルグリセロール含有糖脂質 (Glc-DAG-s2)、ガングリオシド(CD3)、ガングリオトリアセラミド (Gg3Cer)、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI)、 α -グルクロノシルセラミド (GSL-1またはGSL-4)、イソグロボトリヘキソシルセラミド (iGb3)、リポホスホグリカン (LPG)、リポホスファチジルコリン (LPC)、 α -ガラクトシルセラミド類似体 (OCH)、スレートルセラミド、合成 α -GalCer類似体、およびそれらのいずれかの誘導体

からなる群より選択されるスフィンゴ糖脂質であるCD1d拘束性iNKT細胞抗原、を含む免疫賦活剤組成物。

【請求項2】

(a)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原は、食細胞によって取り込むことができ、および／または

(b)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原は、食細胞によって取り込むことができ、および該食細胞は樹状細胞またはマクロファージである、

請求項1に記載の免疫賦活剤組成物。

【請求項3】

前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原は、

(a)CD1dにより提示された抗原を認識するiNKT細胞により、Th1サイトカイン応答を誘導し、および／または

(b) α -GalCerであるスフィンゴ糖脂質であり、および／または

(c)合成 α -GalCer類似体であるスフィンゴ糖脂質であり、ここで該合成 α -GalCer類似体は、6'-デオキシ6'-アセトアミド α -GalCer(PBS57)、ナフチルウレア α -GalCer (NU- α -GC)、NC- α -GalCer、4ClPhC- α -GalCer、PyrC- α -GalCer、 α -カルバ-GalCer、カルバ- α -D-ガラクトース α -GalCer類似体(RCAI-56)、1-デオキシ-ネオ-イノシトール α -GalCer類似体(RCAI-59)、1-O-メチル化 α -GalCer類似体(RCAI-92)、およびHS44アミノシクリトールセラミドからなる群より選択され、および／または

(d)細菌抗原、真菌抗原、原生動物抗原に由来する、

請求項1または2に記載の免疫賦活剤組成物。

【請求項4】

前記抗腫瘍剤が、

(a)放射性核種、化学療法剤、機能性核酸、および機能性核酸を転写することができるポリヌクレオチドからなる群から選択される、および／または

(b)サイトトキシンである、および／または

(c)モルホリニルアントラサイクリン、マイタンシノイド、デュオカルマイシン、オーリスチン、DNA損傷剤であるカリケアマイシン、RNAポリメラーゼII阻害剤である α -アマニチン、センタナマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、ストレプトニグチン、窒素マスタード、ニトロソルエース、アルカンスルホネート、ピリミジン類似体、プリン類似体、代謝拮抗剤、葉酸類似体、アントラサイクリン、タキサン、ピンカアルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン剤、およびこれらの組合せからなる群より選択される、および／または

(d)ネモルピシン、PNU-159682、イダルピシン、ダウノルピシン、カミノマイシン、およびドキソルピシンからなる群より選択されるモルホリニルアントラサイクリンである、および／または

(e)siRNA、miRNA、shRNA、lincRNA、アンチセンスRNA、およびリボザイムからなる群より選択される機能性核酸であって、任意選択で、該機能性核酸が、腫瘍細胞増殖、血管新生、または化学療法に対する抵抗性を促進する、および／またはアポトーシスまたは細胞周期停止を阻害する遺伝子を阻害する、機能性核酸である、

請求項1に記載の免疫賦活剤組成物。

【請求項5】

(a)前記標的化剤は二重特異性リガンドであり、および該二重特異性リガンドはミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1のアームと、非食作用性哺乳動物細胞表面受容体に対する特異性を有する第2のアームとを含み、および／または

(b)前記標的化剤は二重特異性リガンドであり、および該二重特異性リガンドはミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1のアームと、非食作用性哺乳動物細胞表面受容体に対する特異性を有する第2のアームとを含み、ここで前記ミニ細胞表面構造は、ミニ細胞表面上のリボ多糖のO多糖成分であり、および／または

(c)[(a) または (b)]の非食作用性哺乳動物細胞表面受容体は、ミニ細胞のマクロピノサ

10

20

30

40

50

イトーシスを活性化することができる、請求項 1 に記載の免疫賦活剤組成物。

【請求項 6】

(a)前記二重特異性リガンドは、二重特異性抗体または抗体断片を含み、および／または
(b)前記二重特異性リガンドは、二重特異性抗体または抗体断片を含み、ここで該抗体または抗体断片は、細菌由来のミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1の多価アームと、癌細胞表面受容体に対する特異性を有する第2の多価アームとを含み、該癌細胞表面受容体はミニ細胞のマクロピノサイトーシスを活性化することができる、
請求項 5 に記載の免疫賦活剤組成物。

【請求項 7】

被検体中の腫瘍性疾患を治療する方法に使用するための免疫賦活剤組成物であって、該免疫賦活剤組成物が、

(a)CD1d拘束性のインバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原をカプセル化した、そのままの細菌由来のミニ細胞の、免疫原性有効量、および
(b)抗腫瘍剤を含むそのままの細菌由来のミニ細胞であって、前記抗腫瘍剤は、放射性核種、化学療法剤、機能性核酸、および機能性核酸を転写することができるポリヌクレオチドおよびサイトキシンからなる群から選択され、

CD1d拘束性iNKT細胞抗原を含むそのままの細菌由来のミニ細胞が、標的化剤を含まず

、
抗腫瘍剤を含むそのままの細菌由来のミニ細胞が標的化剤を含み、該標的化剤が二重特異性リガンドであり、

前記CD1d拘束性iNKT細胞抗原が、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer)、C-グリコシディフィック型 α -ガラクトシルセラミド (α -C-GalCer)、12炭素アシル型ガラクトシルセラミド (β -GalCer)、 β -D-グルコピラノシルセラミド (β -GlcCer)、1, 2-ジアシル-O-ガラクトシル-sn-グリセロール (BbGL-II)、ジアシルグリセロール含有糖脂質 (Glc-DAG-s2)、ガングリオシド(CD3)、ガングリオトリアセラミド (Gg3Cer)、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI)、 α -グルクロノシルセラミド (GSL-1またはGSL-4)、イソグロボトリヘキソシルセラミド (iGb3)、リポホスホグリカン (LPG)、リポホスファチジルコリン (LPC)、 α -ガラクトシルセラミド類似体 (OCH)、スレートルセラミド、合成 α -GalCer類似体、およびそれらのいずれかの誘導体からなる群より選択されるスフィンゴ糖脂質であるCD1d拘束性iNKT細胞抗原、を含む組成物。

【請求項 8】

(a)前記カプセル化されたCD1D拘束性iNKT細胞抗原は、食細胞によって取り込むことができ、および／または

(b)前記カプセル化されたCD1D拘束性iNKT細胞抗原は食細胞により取り込むことができ、前記食細胞は、樹状細胞またはマクロファージであり、および／または

(c)前記CD1D拘束性iNKT細胞抗原は、CD1Dによって提示された抗原を認識するiNKT細胞によってTh1サイトカイン応答を誘導し、および／または

(d)CD1D拘束性のiNKT細胞抗原はスフィンゴ糖脂質であり、該スフィンゴ糖脂質は α -GalCerであり、および／または

(e)前記CD1D拘束性iNKT細胞抗原は、スフィンゴ糖脂質であり、該スフィンゴ糖脂質は、合成 α -GalCer類似体であり、6'-デオキシ-6'-アセトアミド α -GalCer(PBS57)、ナフチル尿素 α -GalCer(NU- α -GC)、NC- α -GalCer、4ClPhC- α -GalCer、PyrC- α -GalCer、 α -カルバーGalCer、カルバー α -D-ガラクトース α -GalCer類似体(RCAI-56)、1-デオキシーネオイノシトール α -GalCer類似体(RCAI-59)、1-O-メチル化 α -GalCer類似体(RCAI-92)、およびHS44アミノシクリトールセラミドの中から選択される合成 α -GalCer類似体であり、および／または

(f)前記CD1D拘束性iNKT細胞抗原は、細菌抗原、真菌抗原、または原生動物抗原に由来する、

請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

- (a)腫瘍細胞の死を誘導する療法は、抗腫瘍剤の投与を含み、および／または
- (b)腫瘍細胞の死を誘導する療法は、抗腫瘍剤の投与を含み、および該抗腫瘍剤が、放射性核種、化学療法剤、機能性核酸、およびそこから機能性核酸を転写することができるポリヌクレオチドからなる群から選択され、および／または
- (c)腫瘍細胞の死を誘導する療法は、抗腫瘍剤の投与を含み、および該抗腫瘍剤は、
- (i)サイトトキシン、または
- (ii)モルホリニルアントラサイクリン、マイタンシノイド、デュオカルマイシン、オーリスチン、DNA損傷剤であるカリケアマイシン、RNAポリメラーゼII阻害剤である α -アマニチン、センタナマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、ストレプトニグチン、窒素マスタード、ニトロソルエース、アルカンスルホネート、ピリミジン類似体、プリン類似体、代謝拮抗剤、葉酸類似体、アントラサイクリン、タキサン、ピンカアルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン剤、およびこれらの組合せからなる群より選択され、または
- (iii)ネモルピシン、PNU-159682、イダルピシン、ダウノルピシン、カミノマイシン、およびドキソルピシンからなる群より選択されるモルホリニルアントラサイクリン、または
- (iv)siRNA、miRNA、shRNA、lincRNA、アンチセンスRNAおよびリボザイムからなる群より選択される機能性核酸、および任意選択で該機能性核酸が、腫瘍細胞増殖、血管新生、または化学療法に対する抵抗性を促進する遺伝子を阻害し、および／またはアポトーシスまたは細胞周期停止を阻害する、
- 請求項 7 または 8 に記載の組成物であって、患者の腫瘍細胞死を誘導する組成物。

10

20

【請求項 10】

- (a)前記標的化剤は二重特異性リガンドであり、および該二重特異性リガンドはミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1のアームと、非食作用性哺乳動物細胞表面受容体に対する特異性を有する第2のアームとを含み、および／または
- (b)前記標的化剤は二重特異性リガンドであり、該二重特異性リガンドはミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1のアームと、非食作用性哺乳動物細胞表面受容体に対する特異性を有する第2のアームとを含み、前記ミニ細胞表面構造はミニ細胞表面上のリボ多糖のO多糖成分であり、および／または
- (c)[(a) または (b)]の非貪食性哺乳動物細胞表面受容体は、ミニ細胞のマクロピノサイトーシスを活性化することができ、および／または
- (d)前記標的化剤は二重特異性リガンドであり、該二重特異性リガンドは二重特異性抗体または抗体断片を含み、および／または
- 請求項 12 に記載の組成物。
- (e)前記標的化剤は二重特異性リガンドであり、該二重特異性リガンドは二重特異性抗体または抗体断片を含み、抗体または抗体断片は細菌由来のミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1の多価アームと、癌細胞表面受容体に対する特異性を有する第2の多価アームとを含み、癌細胞表面受容体は、ミニ細胞のマクロピノサイトーシスを活性化することができる、
- 請求項 7 ～ 9 のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項 11】

腫瘍細胞の死を誘導する前記抗腫瘍剤または療法が、CAR T細胞療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、放射線療法、または手術を含む、請求項 9 または 10 に記載の組成物。

40

【請求項 12】

- (a)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原、および前記抗腫瘍剤が、同時に投与され、および／または
- (b)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原、および前記抗腫瘍剤が、連続的に投与され、および／または
- (c)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原、および前記抗腫瘍剤が、同じ組成物で投与され、
- (d)前記カプセル化されたCD1d拘束性のiNKT細胞抗原、および前記抗腫瘍剤が、別々の

50

組成物で投与される、

請求項 7～11 のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記被検体が、哺乳動物、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、ウマ、マウス、またはラットである請求項 7～12 のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 14】

(a)前記腫瘍性疾患は癌であり、および／または

(b)前記腫瘍性疾患は癌であり、該癌は、肺癌、乳癌、脳癌、肝臓癌、結腸癌、膵臓癌、および膀胱癌からなる群より選択され、および／または

(c)前記腫瘍性疾患が癌であり、該癌は、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質がん、エイズ関連のがん、エイズ関連リンパ腫、肛門がん、虫垂癌、星状細胞腫、非定型奇形腫、基底細胞癌、膀胱癌、脳幹グリオーマ、脳腫瘍、乳がん、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、原発部位不明癌、カルチノイド腫瘍、原発部位不明癌、中枢神経系非定型奇形腫様／ラブドイド腫瘍、中枢神経系胚芽腫、子宮頸がん、小児癌、脊索腫、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性疾患、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、内分泌すい臓小島細胞腫瘍、子宮体がん、上衣芽細胞腫、上衣腫、食道がん、感覚神経肉腫、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外生殖細胞腫瘍、肝外胆管がん、胆嚢がん、胃（胃）がん、胃腸カルチノイド腫瘍、消化管間質細胞腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、妊娠性絨毛腫瘍、神経膠腫、有毛細胞白血病、頭と首ガン、心臓のガン、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、眼内黒色腫、小島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎臓がん、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭ガン、唇のガン、肝臓癌、悪性繊維性組織サイトマの骨ガン、髄芽細胞腫、髄上皮腫、黒色腫、メルケル細胞癌、メルケル細胞皮膚癌、中皮腫、超自然的な予備選択による転移性扁平上皮首ガン、口ガン、複数の内分泌の腫瘍形成症候群、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫／形質細胞新生物、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非黒色腫皮膚がん、非小細胞肺癌、口腔癌、口腔がん、中咽頭がん、骨肉腫、その他の脳および脊髄腫瘍、卵巣がん、卵巣上皮ガン、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵がん、乳頭腫症、副鼻腔がん、副甲状腺ガン、骨盤がん、ペニスのがん、咽頭がん、中間的な分化を示す松果体実質細胞腫瘍、ピネオブラストマ、下垂体腫瘍、原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫、原発性肝細胞がん、前立腺がん、直腸がん、腎臓がん、腎臓細胞（腎臓）がん、腎細胞がん、気道がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、セザリー症候群、小細胞肺がん、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮がん、扁平上皮頸部がん、胃（胃）がん、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、T細胞がん、精巣がん、咽頭がん、胸腺腫、胸腺がん、甲状腺がん、移行上皮がん、腎盂および尿管の移行上皮がん、栄養芽層の腫瘍、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膣がん、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、およびウィルムス腫瘍からなる群より選択され、および／または

(d)前記腫瘍性疾患は癌であり、該癌は悪性であり、および／または

(e)前記腫瘍性疾患は癌であり、該癌は周期性または再発性癌である、

請求項 7～13 のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 15】

(a)前記カプセル化されたCD1d拘束性のiNKT細胞抗原および／または抗腫瘍剤は、複数回投与され、および／または

(b)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍剤は、少なくとも週1回、数週間にわたって投与され、および／または

(c)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍剤は、少なくとも週に1回、数週間～数ヶ月にわたって投与され、および／または

(d)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍剤は、少なくとも週に1回、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20週間またはそれ以上にわたって投与され、および／または

(e)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍剤は、毎週2回

10

20

30

40

50

投与され、および／または

(f)前記カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍剤は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20週間以上にわたって、週2回投与される、

請求項7～14のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項16】

腫瘍性疾患の治療のための、請求項1～6のいずれか1項に記載の免疫賦活剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2019年1月4日に出願された米国仮出願第62／788,257号（その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に対して、35 U. S. C § 119 (e) に基づく優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

癌のような疾患の治療のための効果的な免疫療法戦略は、先天性免疫応答および適応免疫応答の両方の活性化に依存する。自然免疫系の細胞は保存されたパターン認識受容体を介して病原体と相互作用するが、適応免疫系の細胞は体細胞DNA再編成によって生じた多様な抗原特異的受容体を介して病原体を認識する。インバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞は、自然免疫系と適応免疫系を橋渡しするリンパ球のサブセット（I式NKT）である。iNKT細胞は、非多型MHCクラスI様蛋白質、CD1dとの関連で提示されるある種の糖脂質によって特異的に活性化されるインバリアントα鎖T細胞受容体（ヒトではVα24-Jα18、マウスではVα14-Jα18）を発現する。CD1dはスフィンゴ糖脂質α-ガラクトシルセラミド（α-GalCer）などのさまざまなジアルキル脂質や糖脂質に結合する。CD1d-脂質複合体のiNKT細胞TCR認識は、Th1サイトカインであるインターフェロンγ（IFNγ）を含む炎症誘発性および調節性サイトカインの放出をもたらす。サイトカインが放出されると、次にT細胞やB細胞などの適応細胞、樹状細胞やNK細胞などの自然細胞が活性化される。

【0003】

α-GalCerはKRN7000としても知られており、化学式C₅₀H₉₉NO₉であり、海綿アゲラス・マウリチアヌスから単離したガラクトシルセラミドの構造活性相関研究から得られた合成糖脂質である。α-GalCerは強力な免疫刺激剤であり、多くのインビボモデルにおいて強力な抗腫瘍活性を示す。

【0004】

免疫療法にα-GalCerを用いることへの大きな課題は、末梢血中でB細胞など他のCD1d発現細胞によって提示できるため、iNKT細胞にアネルギーを誘導することである。α-GalCerのデリバリーはまた、肝毒性を誘導することが示されている。

【0005】

したがって、α-GalCerを食細胞に送達し、腫瘍細胞に対する有効な免疫応答を誘導するための新しい組成物および方法が必要とされている。本発明はこれらの必要性を満たすものである。

【発明の概要】

【0006】

特定の実施形態において、CD1d拘束性インバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原をカプセル化する、免疫原性有効量のそのままの細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞を含む免疫賦活剤組成物が、本明細書中に記載される。いくつかの実施形態では、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原が樹状細胞またはマクロファージなどの食細胞による取り込みが可能である。取り込みに続いて、CD1d拘束性のiNKT細胞抗原は食細胞のリソソーム内でCD1dと複合体を形成し、続いて食細胞の表面に輸送され、そこでCD1dに結合したCD1d拘束性のiNKT細胞抗原がiNKT細胞による認識のために提示される。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は貪食細胞の表面上のCD1dに結合したCD1d拘束性iNKT細胞抗原を認識するiNKT細胞により、Th1サイトカイン応答を誘導する。

【0007】

いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原がスフィンゴ糖脂質である。いくつかの実施形態では、 α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)、C-グリコシディフィック型 α -ガラクトシルセラミド(α -C-GalCer)、12炭素アシル型ガラクトシルセラミド(β -GalCer)、 β -D-グルコピラノシルセラミド(β -GlcCer)、1,2-ジアシル-0-ガラクトシル-sn-グリセロール(BbGL-II)、ジアシルグリセロール含有糖脂質(Glc-DAG-s2)、ガングリオシド(CD3)、ガングリオトリアセラミド(Gg3Cer)、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)、 α -グルクロノシルセラミド(GSL-1またはGSL-4)、イソグロボトリヘキソシルセラミド(iGb3)、リポホスホグリカン(LPG)、リポホスファチジルコリン(LPC)、 α -ガラクトシルセラミド類似体(OCH)、スレイトールセラミド、およびそれらのいずれかの誘導体の中から選択される。いくつかの実施形態では、スフィンゴ糖脂質は α -GalCerである。いくつかの実施形態では、スフィンゴ糖脂質が合成 α -GalCer類似体である。いくつかの実施形態では、合成 α -GalCer類似体が6'-デオキシ-6'-アセトアミド α -GalCer(PBS57)、ナフチルウレア α -GalCer(NU- α -GC)、NC- α -GalCer、4ClPhC- α -GalCer、PyrC- α -GalCer、 α -カルバー-GalCer、カルバー- α -D-ガラクトース α -GalCer類似体(RCAI-56)、1-デオキシ-ネオ-イノシトール α -GalCer類似体(RCAI-59)、1-O-メチル化 α -GalCer類似体(RCAI-92)、およびHS44アミノシクリトールセラミドの中から選択される。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原が細菌抗原、真菌抗原、または原生動物抗原に由来する。

【0008】

一実施形態では、免疫賦活剤組成物が(a)免疫原性有効量のカプセル化CD1d拘束性インバリエントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原、および(b)治療有効量の抗腫瘍剤を含む。

【0009】

一実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤が2つ以上のそのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞内にパッケージングされる。一実施形態では免疫賦活剤組成物がCD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤を含み、(a)CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤は同じそのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞内に含まれるか、または(b)CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、第1のそのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞内に含まれ、抗腫瘍剤は、第2のそのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞内に含まれる。

【0010】

いくつかの実施形態では、抗腫瘍剤を含むそのままの細菌由来ミニ細胞が少なくとも1つの標的化剤を含む。いくつかの実施形態ではCD1d拘束性iNKT細胞抗原を含むそのままの細菌由来ミニ細胞が標的化剤を含まず、抗腫瘍剤を含むそのままの細菌由来ミニ細胞は、標的化剤を含む。いくつかの実施形態では、標的化剤は二重特異性リガンドである。いくつかの実施形態では、二重特異性リガンドがミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1のアームと、非食作用性哺乳動物細胞表面受容体に対する特異性を有する第2のアームとを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞表面受容体が上皮成長因子受容体(EGFR)である。いくつかの実施形態では、ミニ細胞表面構造がミニ細胞表面上のリボ多糖のO-多糖成分である。いくつかの実施形態において、非貪食性哺乳動物細胞表面受容体は、ミニ細胞のマクロピノサイトーシスまたは受容体媒介エンドサイトーシスを活性化することができる。いくつかの実施形態では、二重特異性リガンドが二重特異性抗体または抗体断片を含む。いくつかの実施形態では抗体または抗体断片が細菌由来のミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1の多価アームと、癌細胞表面受容体に対する特異性を有する第2の多価アームとを含み、癌細胞表面受容体はミニ細胞のマクロピノサイトーシスマ

10

20

30

40

50

たは受容体媒介エンドサイトーシスを活性化することができる。いくつかの実施形態では、第2の多価アームがEGFRに対する特異性を有する。

【0011】

本明細書中に記載されるのは、特定の実施形態において、腫瘍性疾患を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、(a) 免疫原性に有効な量のカプセル化されたCD1d拘束性インバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原、および(b) 抗腫瘍剤または被験体における腫瘍性細胞の死を誘導する療法、を管理投与する工程を包含する方法である。いくつかの実施形態において、腫瘍性細胞の死を誘導する療法は、抗腫瘍剤の投与を含む。

【0012】

本明細書中に記載される方法および組成物のいくつかの実施形態において、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原は食細胞(例えば、樹状細胞またはマクロファージ)によって取り込まれ得る。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、CD1dによって提示された抗原を認識するiNKT細胞によってTh1サイトカイン応答を誘導する。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原がスフィンゴ糖脂質である。いくつかの実施形態では、スフィンゴ糖脂質は、 α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)、C-グリコシディフィック型 α -ガラクトシルセラミド(α -C-GalCer)、12炭素アシル型ガラクトシルセラミド(β -GalCer)、 β -D-グルコピラノシルセラミド(β -GlcCer)、1,2-ジアシル-0-ガラクトシル-sn-グリセロール(BbGL-II)、ジアシルグリセロール含有糖脂質(Glc-DAG-s2)、ガングリオシド(GD3)、ガングリオトリアセラミド(Gg3Cer)、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)、 α -グルクロノシルセラミド(GSL-1またはGSL-4)、イソグロボトリヘキソシルセラミド(iGb3)、リポホスホグリカン(LPG)、リポホスファチジルコリン(LPC) α -ガラクトシルセラミド類似体(OCH)、スレイトールセラミド、およびそれらのいずれかの誘導体の中から選択される。いくつかの実施形態では、スフィンゴ糖脂質は α -GalCerである。いくつかの実施形態では、スフィンゴ糖脂質が合成 α -GalCer類似体である。いくつかの実施形態において、合成 α -GalCer類似体は、6'-デオキシ-6'-アセトアミド α -GalCer(PBS57)、ナフチル尿素 α -GalCer(NU- α -GC)、NC- α -GalCer、4ClPhC- α -GalCer、PyrC- α -GalCer、 α -カルバーGalCer、カルバー α -D-ガラクトース α -GalCer類似体(RCAI-56)、1-デオキシ-ネオ-イノシトール α -GalCer類似体(RCAI-59)、1-O-メチル化 α -GalCer類似体(RCAI-92)、およびHS44アミノシクリトールセラミドの中から選択される。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原が細菌抗原、真菌抗原、または原生動物抗原に由来する。

【0013】

本明細書に記載の組成物および方法のいくつかの実施形態では、抗腫瘍剤が放射性核種、化学療法薬、機能性核酸、および機能性核酸を転写することができるポリヌクレオチドからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、化学療法薬は細胞毒素である。いくつかの実施形態において、化学療法薬は、モルホリニルアントラサイクリン、マイタンシノイド、デュオカルマイシン、オーリスタチン、カリケアマイシン(DNA損傷剤)、 α -アマニチン(RNAポリメラーゼII阻害剤)、センタナマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、ストレプトニグチン、窒素マスタード、ニトロソルエース、アルカンスルホネート、ピリミジン類似体、プリン類似体、代謝拮抗剤、葉酸類似体、アントラサイクリン、タキサン、ピンカアルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン剤、およびこれらの組合せからなる群より選択される。いくつかの実施形態では、モルホリニルアントラサイクリンがネモルピシン、PNU-159682、イダルピシン、ダウノルピシン、カミノマイシン、およびドキソルピシンからなる群より選択される。いくつかの実施形態では、機能性核酸がsiRNA、miRNA、shRNA、lincRNA、アンチセンスRNA、およびリボザイムからなる群より選択される。いくつかの実施形態では、機能性核酸は、腫瘍細胞増殖、血管新生、または化学療法に対する抵抗性を促進する遺伝子を阻害し、および/またはアポトーシスもしくは細胞周期停止を阻害する。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の死を誘導する療

10

20

30

40

50

法が放射線療法または手術を含む。

【0014】

一実施形態では、本方法が（a）CD1d拘束性iNKT細胞抗原を封入する免疫原性有効量のそのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞、および（b）治療有効量の抗腫瘍剤を含む免疫賦活剤組成物を投与することを含む。一実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤が2つ以上の精製されたそのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞内にパッケージングされる。一実施形態では免疫賦活剤組成物がCD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤を含み、（a）CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤は同じミニ細胞または殺された細菌細胞内に含まれるか、または（b）CD1d拘束性iNKT細胞抗原は第1のミニ細胞または殺された細菌細胞内に含まれ、抗腫瘍剤は第2のミニ細胞または殺された細菌細胞内に含まれる。いくつかの実施形態では、抗腫瘍剤を含むそのままの細菌由来ミニ細胞が標的化剤を含む。いくつかの実施形態ではCD1d拘束性iNKT細胞抗原を含むそのままの細菌由来ミニ細胞が標的化剤を含まず、抗腫瘍剤を含むそのままの細菌由来ミニ細胞は標的化剤を含む。いくつかの実施形態では、標的化剤は二重特異性リガンドである。いくつかの実施形態では、二重特異性リガンドがミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1のアームと、非食作用性哺乳動物細胞表面受容体に対する特異性を有する第2のアームとを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞表面受容体が上皮成長因子受容体（EGFR）である。いくつかの実施形態では、ミニ細胞表面構造がミニ細胞表面上のリポ多糖のO-多糖成分である。いくつかの実施形態において、非貪食哺乳動物細胞表面受容体は、ミニ細胞のマクロピノサイトーシスまたは受容体媒介エンドサイトーシスを活性化することができる。いくつかの実施形態では、二重特異性リガンドが二重特異性抗体または抗体断片を含む。いくつかの実施形態では抗体または抗体断片が細菌由来のミニ細胞表面構造に対する特異性を有する第1の多価アームと、癌細胞表面受容体に対する特異性を有する第2の多価アームとを含み、癌細胞表面受容体はミニ細胞のマクロピノサイトーシスまたは受容体媒介エンドサイトーシスを活性化することができる。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体はEGFRである。

【0015】

いくつかの実施形態において、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原（例えば、 α -GalCer）および腫瘍細胞の死を誘導する療法（例えば、抗腫瘍剤）は、同時に投与される。いくつかの実施形態ではカプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原、および新生物細胞の死を誘導する療法は連続的に投与される。いくつかの実施形態では、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または腫瘍細胞の死を誘導する療法を複数回投与する。いくつかの実施形態において、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または腫瘍細胞の死を誘導する療法は、数週間にわたって少なくとも1週間に1回投与される。いくつかの実施形態において、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または腫瘍細胞の死を誘導する療法は、数週間から数ヶ月にわたって少なくとも1週間に1回投与される。いくつかの実施形態では、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または腫瘍細胞の死を誘導する療法が週に少なくとも1回、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20週間またはそれ以上にわたって投与される。いくつかの実施形態では、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または腫瘍細胞の死を誘導する療法が週に約2回投与される。一部の実施形態では、封止型CD1拘束性型iNKT細胞抗原および／または腫瘍性細胞の死を誘発する治療法が約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20週以上実施される。

【0016】

いくつかの実施形態において、本明細書に提供される免疫賦活剤組成物で治療される被検体は、哺乳動物、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、ウマ、マウス、またはラットである。

【0017】

いくつかの実施形態では、腫瘍性疾患はがんである。いくつかの実施形態において、が

んは、肺がん、乳がん、脳がん、肝臓がん、結腸がん、膵臓がん、および膀胱がんからなる群より選択される。いくつかの実施形態において、癌は、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質がん、エイズ関連のがん、エイズ関連リンパ腫、肛門がん、虫垂癌、星状細胞腫、非定型奇形腫、基底細胞癌、膀胱癌、脳幹グリオーマ、脳腫瘍、乳がん、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、原発部位不明癌、カルチノイド腫瘍、原発部位不明癌、中枢神経系非定型奇形腫様／ラブドイド腫瘍、中枢神経系胚芽腫、子宮頸がん、小児癌、脊索腫、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性疾患、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、内分泌すい臓小島細胞腫瘍、子宮体がん、上衣芽細胞腫、上衣腫、食道がん、感覚神経肉腫、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外生殖細胞腫瘍、肝外胆管がん、胆嚢がん、胃（胃）がん、胃腸カルチノイド腫瘍、消化管間質細胞腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、妊娠性絨毛腫瘍、神経膠腫、有毛細胞白血病、頭と首ガン、心臓のガン、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、眼内黒色腫、小島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎臓がん、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭ガン、唇のガン、肝臓癌、悪性繊維性組織サイトマの骨ガン、髄芽細胞腫、髄上皮腫、黒色腫、メルケル細胞癌、メルケル細胞皮膚癌、中皮腫、超自然的な予備選択による転移性扁平上皮首ガン、口ガン、複数の内分泌の腫瘍形成症候群、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫/形質細胞新生物、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非黒色腫皮膚がん、非小細胞肺癌、口腔癌、口腔がん、中咽頭がん、骨肉腫、その他の脳および脊髄腫瘍、卵巣がん、卵巣上皮ガン、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵がん、乳頭腫症、副鼻腔がん、副甲状腺ガン、骨盤がん、ペニスのがん、咽頭がん、中間的な分化を示す松果体実質細胞腫瘍、ピネオブラストマ、下垂体腫瘍、原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫、原発性肝細胞がん、前立腺がん、直腸がん、腎臓がん、腎臓細胞（腎臓）がん、腎細胞がん、気道がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、セザリー症候群、小細胞肺癌、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮がん、扁平上皮頸部がん、胃（胃）がん、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、T細胞がん、精巣がん、咽頭がん、胸腺腫、胸腺がん、甲状腺がん、移行上皮がん、腎盂および尿管の移行上皮がん、栄養芽層の腫瘍、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膣がん、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、およびウィルムス腫瘍である。

【0018】

いくつかの実施形態では、癌は悪性である。いくつかの実施形態では、癌は周期性または再発性癌である。

【0019】

また、本明細書に記載される特定の実施形態では、本明細書に提供される免疫賦活剤組成物および少なくとも1つの薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物である。

【0020】

また、本明細書中に記載されるのは、特定の実施形態において、（a）食細胞による取り込みが可能な、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原、および（b）腫瘍性疾患の処置のための薬学的に受容可能なキャリアの免疫原的に有効な量を含む免疫賦活剤組成物の使用である。

【0021】

また、本明細書に記載されるのは、特定の実施形態において、（a）食細胞によって取り込まれることができるカプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原、および（b）腫瘍性疾患の治療のための薬剤の調製における薬学的に許容される担体の免疫原性有効量を含む免疫賦活剤組成物の使用である。

【0022】

上記の概要および図面の以下の説明ならびに詳細な説明は、例示的かつ説明的なものである。それらは本発明のさらなる詳細を提供することを意図しているが、限定として解釈されるべきではない。他の目的、利点、および新規な特徴は、本発明の以下の詳細な説明から当業者には容易に明らかになるのであろう。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】CD1d拘束性iNKT細胞抗原 α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)を負荷したEnGeneICドリームビヒクル(EDV)(例えば、細菌ミニ細胞)の図面描写である。

【図2】O-多糖およびヒト上皮増殖因子受容体抗原に対する二重特異性抗体を含み、抗癌剤PNU-159682(アントラサイクリン類似体)を負荷されたEDV(例えば、細菌ミニ細胞)の図面描写である。

【図3】同系マウスモデル(Balb/cマウスにおける^{EP}CT26大腸腫瘍)における^{EP}ミニ細胞_{Dox}およびミニ細胞 α -GCを使用する組合せ処置を示す図である。

【図4】CT26同種移植片を有するBalb/cマウスにおいて、^{EP}ミニ細胞_{Dox}とミニ細胞 α -GCとの併用治療が大きな腫瘍を減少させるのに効果的であることを示す図である。

10

【図5】CT26同種移植片を有するBalb/cマウスにおける腫瘍退縮に対する^{EP}ミニ細胞_{Dox}およびミニ細胞 α -GCの影響を示す図である。

【図6A-F】(図6Aおよび6B)^{EP}ミニ細胞_{Dox}およびミニ細胞 α -GC(図6A = ^{EP}ミニ細胞_{Dox}(1×10^9) + EDV α -GC(1×10^7))、(図6B = ^{EP}ミニ細胞_{Dox}(1×10^9) + EDV α -GC(1×10^6))、図6C = 生理食塩水、(図6Dおよび6E)ミニ細胞 α -GCのみ(図6D = ミニ細胞 α -GC(1×10^7))、(図6E = ミニ細胞 α -GC(1×10^6))、および(図6F)^{EP}ミニ細胞_{Dox}のみ(図6F = ^{EP}ミニ細胞_{Dox}(1×10^9))で処理された種々のサイズのCT26アイソグラフトを示す図である。

【図7A-B】^{EP}ミニ細胞_{Dox}およびミニ細胞 α -GCCT26(Epclone12.1)アイソグラフトで処理した種々のサイズのCT26アイソグラフトを示す図である。n=3; 腫瘍体積: 600~800mm³; 用量: 1; 犠牲期間: 24時間。図7A = ^{EP}ミニ細胞_{Dox}(1×10^9) + ミニ細胞 α -GC(1×10^7); 16時間; 図7B = ^{EP}ミニ細胞_{Dox}(1×10^9) + ミニ細胞 α -GC(1×10^7); 24時間。

20

【図8A-E】種々の時点でのミニ細胞 α -GC処理後のJAWS II細胞の α -GC-CD1D提示を示す図である(図8A~D)。図8A = 8時間; 図8B = 16時間; 図8C = 24時間; 図8D = 48時間; 図8Eは、処置過程中的 α -GC-CD1D正JAWSII細胞を示す図である。

【図9】処理後48時間にEDV α -GCで処理したJAWSII細胞によるIL-12産生を示す図である。

【図10】EDV α -GCで処理されたJAWSII細胞と共培養されたiNKT細胞によって分泌されたIFN γ の濃度を示す図である。

30

【図11】EDV α -GCで処理したJAWSII細胞と共培養したiNKT細胞によって分泌されたIL4の濃度を示す図である。

【図12】EDV α -GCで処理されたJAWSII細胞と共培養されたiNKT細胞によって分泌されたTNF α の濃度を示す。

【図13A-D】5種類のテストされた構成、すなわち、セーライン、ミニ細胞、Epcamミニ細胞_{Dox}、ミニ細胞 α -GC、およびEpcamミニ細胞_{Dox} + ミニ細胞 α -GCについて、スプリーン内の活性化DCのパーセンテージを示す図である。(図13A = 4時間; 図13B = 8時間; 図13C = 16時間; および図13D = 24時間)

【図14A-D】生理食塩水、ミニ細胞、Epcamミニ細胞_{Dox}、ミニ細胞 α -GC、およびEpcamミニ細胞_{Dox} + ミニ細胞 α -GCの5つの異なった試験された組成物のインビボ処理の過程における腫瘍内のCD45+細胞の割合を示す図である。(図14A = 4時間; 図14B = 8時間; 図14C = 16時間; および図14D = 24時間)

40

【図15A-D】腫瘍環境内における5つの異なった試験された組成物、すなわち、生理食塩水、ミニ細胞、Epcamミニ細胞_{Dox}、ミニ細胞 α -GC、およびEpcamミニ細胞_{Dox} + ミニ細胞 α -GCについて、CD3+ CD8+ 細胞毒性T細胞の割合を示す図である。(図15A = 4時間; 図15B = 8時間; 図15C = 16時間; および図15D = 24時間)

【図16A-D】腫瘍環境内における5つの異なった試験された組成物、すなわち生理食塩水、ミニ細胞、Epcamミニ細胞_{Dox}、ミニ細胞 α -GC、Epcamミニ細胞_{Dox} + ミニ細胞 α -GCについて、CD8+ とCD4+ T-cellsの比率を示す図である。(図16A = 4時間; 図16B = 8時間; 図16C = 16時間; および図16D = 24時間)

50

【図17A-D】5つの異なる試験組成物：生理食塩水、ミニ細胞、Epcam ミニ細胞_{Dox}、ミニ細胞_{αGC}、Epcam ミニ細胞_{Dox} + ミニ細胞_{αGC}についての腫瘍環境内のiNKT細胞の比率を示す図である。（図17A = 4時間；図17B = 8時間；図17C = 16時間；および図17D = 24時間）

【図18】4つの異なったマウス処置群：生理食塩水、ミニ細胞_{αGC}、Epcam ミニ細胞_{Dox} + ミニ細胞_{αGC}、およびEpcam ミニ細胞₆₈₂ + ミニ細胞_{αGC}について、注射8時間後のPBMCにおけるCD1d mRNA発現（生理食塩水と比較して倍増）を示す図である。

【図19】4つの異なったマウス処置群：生理食塩水、ミニ細胞_{αGC}、Epcam ミニ細胞_{Dox} + ミニ細胞_{αGC}、およびEpcam ミニ細胞₆₈₂ + ミニ細胞_{αGC}について、注射8時間後に胸腺から単離されたDCにおけるCD1d mRNA発現（生理食塩水と比較して倍増）を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明はCD1d拘束性インバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原（例えば、 α -ガラクトシルセラミドのようなスフィンゴ脂質）をカプセル化する、免疫原的に有効な量のそのままの細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞を含む組成物が抗腫瘍剤と共に投与された場合に、癌治療戦略を相乗的に改善するという発見に基づいている。実施例1および2に示すように、細菌由来ミニ細胞内に含まれるカプセル化 α -ガラクトシルセラミド（ α -GalCer）は、食細胞によって取り込まれ、CD1dとの複合体で細胞の表面上に発現される。カプセル化 α -GalCerは、抗腫瘍薬、ドキシソルビシンと併用投与した場合、抗腫瘍反応を有意かつ相乗的に増大させることができた。

【0025】

抗腫瘍療法のために α -GalCerを送達するための以前の試みがなされている。これらは、遊離分子としての、またはリポソームもしくはポリマー中にパッケージされた α -GalCerの投与を含む（例えば、Giacconeら、2002；Nakamuraら、2013；およびFaveeuwら、2014を参照のこと）。しかしながら、これらのアプローチは、ヒト臨床試験において毒性および限定された抗腫瘍効果をもたらした。これらのアプローチは、iNKT細胞応答のみを誘発するための免疫賦活剤として遊離またはパッケージされた α -GalCerを使用するように設計された。対照的に、本発明は、癌細胞を直接死滅させるだけでなく、先天的小および適応的な抗腫瘍応答も誘発する。この併用療法の構成要素には腫瘍細胞を殺傷し、強力なCD4⁺ およびCD8⁺抗腫瘍応答を活性化するための抗腫瘍剤（例えば、細菌由来の微小細胞に含まれる細胞傷害性薬剤）によって誘発される免疫応答の誘導、および α -GalCerを担持する細菌由来の微小細胞の使用が含まれ、これは強力なiNKT細胞ベースの抗腫瘍応答を据え付けるために抗原プロセッシングおよび提示をMHCクラス1（CD1d拘束性）に偏らせる。ミニ細胞自身は、死にゆく腫瘍細胞によって放出される損傷関連分子 パターン（DAMP）分子の抗原提示細胞（APC）による認識を介して自然免疫応答を誘発する。炎症誘発性サイトカインが関与する自然免疫応答の誘導は、骨髄由来マクロファージおよび樹状細胞の活性化および分化を誘発するため、この過程に不可欠である。この過程は抗腫瘍免疫を劇的に増強する。対照的に、リポソームまたはポリマーなどの担体は、先天性免疫応答を誘発することができない。したがって、リポソームまたはポリマー担持 α -GalCerの抗腫瘍活性はiNKT細胞活性化のみに依存し、M1マクロファージの形成および樹状細胞の活性化には依存しないので、抗腫瘍効力は、本開示の細菌由来ミニ細胞と比較して低い。

【0026】

癌免疫療法における最近の進歩は特定の癌において、前例のない耐久性のある臨床応答をもたらした（Emensら、2017；Farkonaら、2016；OisethおよびAziz、2017；Sharmaら、2017；Ventola、2017）。しかし、現在の免疫療法戦略は様々な腫瘍型にわたって限定された成功率をもたらし、最初に時間腫瘍退縮再発を促進することを実証する患者のかなりの割合をもたらした（Emensら、2017；Mellmanら、2011；OisethおよびAziz、2017；Sharmaら、2017；Ventola、2017）。

【0027】

さらに、患者の部分集合は腫瘍細胞抗原の欠如または免疫細胞浸潤の欠如から生じる腫瘍免疫原性を欠き、したがって、利用可能な現在の戦略に対して初期応答を示さない（Emensら、2017; OisethおよびAziz、2017; Sharmaら、2017）。このように、新規で頑健な免疫療法アプローチの同定は臨床転帰の有意な改善をもたらす可能性があり、依然として優先権の高い領域である。

【0028】

有効な抗腫瘍免疫応答を開始するために、特定の工程は、自発的または治療的のいずれかで達成されなければならない。第1に、腫瘍細胞死を介してインサイチュで誘導され得るか、または外因的に送達され得る腫瘍細胞抗原は樹状細胞（DC）によって取り込まれなければならない（Anguilleら、2015; Emensら、2017; Jungら、2018; Mellmanら、2011）。抗原取り込みと併せて、DCは抗原の分化および増強されたプロセッシングおよび提示を促す適切な成熟シグナルを受け取る必要があり、その結果、耐性とは反対の抗腫瘍機能が促進される（Anguilleら、2015; Emensら、2017; Jungら、2018; Mellmanら、2011; Simmonsら、2012）。これらの成熟した腫瘍抗原負荷DCはその後、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞の製造、NKおよび／またはNKT細胞応答のトリガー、およびT_H1型応答の増強を介して起こり得る抗腫瘍T細胞応答を効果的に生成しなければならない（Emensら、2017; Fangら、2017; Mellmanら、2011; Sharmaら、2017; Zitvogelら、2015）。抗腫瘍T細胞は免疫抑制シグナルが存在し得る腫瘍微小環境に最終的に入らなければならない、それらの抗腫瘍機能を有効に実施しなければならない（Emensら、2017; Mellmanら、2011）。これらの工程のいずれかで生じる問題は、免疫療法の有効性を妨げ、治療の全失敗をもたらす得る（Emensら、2017; Mellmanら、2011; Sharmaら、2017）。

【0029】

現在、臨床的に最も注目されている免疫療法戦略には、免疫学的チェックポイントインヒビターおよびキメラ抗原受容体T細胞療法（CAR-T）が含まれる（Emensら、2017; Mellmanら、2011; OisethおよびAziz、2017; Sharmaら、2017; Ventola、2017）。細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）およびプログラム細胞死1／プログラム細胞死1リガンド（PD-1／PDL-1）などのチェックポイント阻害剤は免疫抑制シグナルの伝達を遮断し、腫瘍微小環境内で細胞傷害性Tリンパ球を活性化するように刺激することによって機能する（Dineら、2017; Jenkinsら、2018; Sharpe、2017）。これらの経路の阻害剤は特定の癌において劇的な臨床結果を示しているが、異なる癌にわたる全体的な応答率は依然として低く（～15-25%）、これらの治療に関連する免疫関連毒性は高い可能性がある（Dine et al、2017; Emensら、2017; Jenkinsら、2018; Sharpe、2017; Ventola、2017）。新しいチェックポイントが潜在的免疫ターゲットとして継続的に発見されていることにより、免疫抑制経路の精巧で多様なセットを利用することができることは明らかである（Dineら、2017; Emensら、2017; Farkonaら、2016; Jenkinsら、2018; Sharpe、2017）。したがって、チェックポイント阻害剤に対する耐性の開発はハードルであり続けており、これらの問題を克服するために複数のチェックポイント阻害剤の組み合わせを利用する試みがなされているが、これはしばしば関連する毒性を悪化させる（Dineら、2017; Jenkinsら、2018; Sharmaら、2017; Ventola、2017）。

【0030】

広く注目されている第2の治療は定義された腫瘍抗原特異性を有し、標的腫瘍細胞の殺傷を開始するために強力なT細胞活性化を誘発することができる膜融合受容体を発現するために患者のT細胞の遺伝子操作を伴うCAR-T細胞治療である（D'Aloiaら、2018; Farkonaら、2016; Mellmanら、2011; Sharmaら、2017）。この治療アプローチは「液体」血液癌の治療において、前例のない臨床結果をもたらしたが、現在まで、良好な特異的抗原標的の欠如、腫瘍へのホーミング不良、腫瘍への溢出不良、および敵対的腫瘍微小環境内での持続性の欠如に関連する限界に起因して、固形悪性腫瘍を標的とする際に同等の応答をもたらさなかった（D'Aloiaら、2018; Sharmaら、2017）。重度に前処置さ

れた患者からのリンパ球の利用可能性および長い製造時間に関連する実用的な限界も存在し、急速に進行する疾患を有する患者にとって実行可能な治療選択肢ではない（OisethおよびAziz、2017; Rezvaniら、2017）。

【0031】

EnGeneIC Dream Vector (EDV)は、細菌における細胞分裂の極性部位を再活性化することによって生成される、直径約 400 ± 20 nmの非生存ナノ細胞からなる細菌由来送達系である（MacDiarmidら、2007b）。これらのナノ細胞は細胞傷害性薬物、siRNA、またはmiRNAでパッケージングされ得、ナノ細胞の表面多糖への二重特異性抗体の付着を介して腫瘍細胞表面受容体に特異的に標的化され得ることが実証されている（MacDiarmidら、2009; MacDiarmidら、2007b; Reidら、2013）。マウスおよびイヌの研究における静脈内投与後はそれらのサイズのために血管系に保持されているが、その後、腫瘍関連漏出性血管系を介して腫瘍に急速に溢出していることが実証されている（MacDiarmidら、2007b; Sagnellaら、2018）。関連する二重特異性抗体を介する腫瘍細胞-表面受容体の結合はエンドソームへのマクロピノサイトーシスおよびリソソームにおける細胞内分解を介するペイロードの放出をもたらす（MacDiarmidら、2009; MacDiarmidら、2007b; Sagnellaら、2018）。これらのナノ細胞治療薬の安全性は3件の第I相臨床試験で実証されており、種々末期癌患者に1000回以上投与されている。さらに、PNU-159682細胞傷害性薬物負荷EGFR標的EDV、ドキシソルビンパッケージEGFR標的EDV、マイクロRNA mir16aパッケージEDV、EGFR標的EDVが第I相臨床試験において患者に現在送達されており、現在までに有望な安全性プロファイルを示している（NHMRC Clinical Trials Centre、2017; Kaoら、2015; Solomonら、2015; van Zandwijkら、2017; Whittleら、2015）。

【0032】

A. 細菌のミニ細胞送達法の概要

癌細胞に化学療法剤を送達するための細菌由来ミニ細胞の使用は、以前に記載されている。癌を治療するためのこの送達方法は、毒性化学療法剤もしくは薬物、または機能性核酸を、典型的には直径約400nmである細菌由来ミニ細胞にパッケージングする。典型的には、ミニ細胞が化学療法剤を担持し、特異的癌細胞を標的とする抗体である。この抗体はがん細胞の表面に結合し、ミニ細胞はがん細胞によって細胞内に取り込まれる。このようにして、毒性化学療法剤は体に広く分布せず、したがって、毒性薬物または化合物が癌細胞内に送達されるにつれて、副作用および不耐性の機会を減少させる。毒性化学療法剤の送達ビヒクルとして抗体標的化ミニ細胞を用いると、癌細胞を死滅させるのに必要な薬物がはるかに少なくなり、したがって治療指数が改善される。

【0033】

実際に、本発明者らは、ミニ細胞（またはEnGeneIC Dream Vehicles、EDV）がパクリタキセルまたはドキシソルビンなどの化学療法薬を、マウス、イヌ、およびサルにおける異種移植腫瘍に送達し得ることを示した。標的送達は癌細胞が化学療法剤の大部分を受け取り、低レベルの毒性を生じることを確実にする。MacDiarmidら、2007b; MacDiarmidら、2007a; MacDiarmidら、2009; およびMacDiarmidら、2016を参照のこと。さらに、ミニ細胞は、異種移植モデルにおいて有意な免疫応答を誘導せず、ミニ細胞は十分に耐容性である。したがって、そのままの細菌由来ミニ細胞は、進行固形腫瘍を標的としたドキシソルビン、膠芽腫を標的としたドキシソルビン、および中皮腫を標的としたMicroRNA-16aを含む例を有する、患者に抗癌剤を送達するための十分に耐容性のあるビヒクルである。しかしながら、これらの治療戦略は、全ての患者において、全てのがんの完全寛解または治癒をもたらさなかった。したがって、癌治療法の改善が必要とされている。

【0034】

本発明者らは、CD1d拘束性インバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原および抗腫瘍剤を含む細菌由来ミニ細胞の組み合わせを使用すると、驚くほど劇的かつ有効な臨床効力がもたらされることを発見した。特定の実施形態において、CD1d拘束性インバリ

アントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原を含む細菌由来ミニ細胞は標的化剤を含まず、抗腫瘍剤を含む細菌由来ミニ細胞は標的化剤を含むことを発見した。

【0035】

具体的には本発明者らが α -GalCerなどのCD1d拘束性インバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原を含むミニ細胞と、抗腫瘍剤（例えば、ドキソルビシン）を含むミニ細胞とを組み合わせたものが、相乗的な抗腫瘍効果をもたらすことを発見した。これらのデータについては、以下に詳述する。

【0036】

データから、自然免疫応答および適応免疫応答に基づく抗腫瘍免疫のユニークな経路が明らかになる。理論に束縛されるものではないが、 α -GalCerを含むミニ細胞および抗腫瘍剤を含むミニ細胞は固形腫瘍に関連する漏出性血管系を介して腫瘍微小環境に溢出したと仮定される。抗腫瘍剤および抗EGFR標的化剤を含む標的化ミニ細胞は、マクロピノサイトーシスを介して腫瘍細胞によって細胞内に取り込まれる。腫瘍細胞内に入ると、ミニ細胞が分解され、抗腫瘍薬が放出され、腫瘍細胞のアポトーシスが誘導される。アポトーシスを起こした腫瘍細胞はその表面にカルレチクリンを急速に露出させ、続いてホスファチジルセリン（アポトーシスのマーカー）が露出し、ATP（アポトーシス時）やHMGB1などの損傷関連分子パターン（DAMP）分子が二次壊死時に放出される。

【0037】

腫瘍微小環境にはそれを作らないミニ細胞は、肝臓、脾臓、リンパ節に関連する血管系にみられる免疫系の細胞（マクロファージや樹状細胞など）に飲み込まれる。ミニ細胞はリソソームで分解され、放出されたLPSはリソソーム膜から逃れ、CARD（カスパーゼ動員ドメイン）ドメインを介してカスパーゼ4およびカスパーゼ5に結合する。このLPS結合はカスパーゼ4/5の迅速なオリゴマー化を促進し、マクロファージまたは樹状細胞のピロトーシスと炎症誘発性サイトカインIL-1 β およびIL-18の分泌をもたらす。ピロトーシスの過程は、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10などの多量の炎症誘発性サイトカインの放出も引き起こす。これらの炎症誘発性シグナルは骨髄中の単球に取り込まれ、これらの細胞は活性化マクロファージや樹状細胞に分化し、骨髄から溢出して全身循環に入る。

【0038】

死につつある腫瘍細胞から放出されたDAMP（ATPとHMGB1）は、標的細胞の表面に発現しているP2Y2受容体に結合すると、樹状細胞やマクロファージに強い「find-me」シグナルを発生させる。細胞外ATPは免疫細胞を腫瘍微小環境に引き寄せるだけでなく、その活性を調節する。例えば、ATPは骨髄由来DCの成熟を誘導することができる。骨髄由来DCがCD40、CD80、CD83、CD86の発現増加を伴い、葉状仮足膜突起の形成を介してマクロファージの拡大も促進する。これらの新たに分化した活性マクロファージや樹状細胞は「find-me」シグナルに従い、腫瘍微小環境に入り込む。

【0039】

アポトーシスを起こした腫瘍細胞表面のカルレチクリンは、免疫系への「eat-me」シグナルとして機能的に考えられている。その表面にカルレチクリンの発現が認められた細胞はCD91+細胞（樹状細胞やマクロファージなど）に認識され貪食される。カルレチクリンがその表面に発現しているCD91を介して標的樹状細胞に作用し、TNF- α やIL-6などの炎症誘発性サイトカインの放出を促進し、免疫抑制腫瘍床の17型ヘルパーT(Th17)細胞の活性を調節する。カルレチクリンのCD91への結合はまた、抗原提示細胞、例えば樹状細胞の腫瘍微小環境への動員、樹状細胞による腫瘍細胞の飲み込み、およびT細胞への最適な抗原提示を容易にし、最終的に免疫系の活性化を導く。

【0040】

HMGB1は強い炎症反応を誘発する。HMGB1は樹状細胞を活性化し、TLR4に結合すると腫瘍関連抗原のT細胞への至適提示を刺激する。

【0041】

RAGE（終末糖化産物の受容体）は、HMGB1のもう一つの重要な受容体である。HMGB1のRAGEへの結合は、MAPK（p38およびERK1/2）およびNF- κ Bの活性化を介して樹

10

20

30

40

50

状細胞の成熟および遊走を促進する。

【0042】

これらのDAMPは、腫瘍微小環境への樹状細胞の動員、腫瘍抗原の取り込みおよび工程、ならびにT細胞への最適な抗原提示を刺激する。CD8+細胞傷害性T細胞のクロスプライミングは、IL-1 β およびIL-17依存的に成熟樹状細胞および $\gamma\delta$ T細胞によって誘発される。プライムされたCD8+細胞傷害性T細胞は、次いで、IFN- γ 、パーフォリン-1およびグランザイムBの生成を介して、残存する腫瘍細胞を殺傷するための直接的な細胞傷害性応答を誘発する。

【0043】

α -GalCerを含む循環ミニ細胞の多くは、肝臓、脾臓およびリンパ節に関連する脈管構造内に存在するマクロファージおよび樹状細胞によって飲み込まれる。ミニ細胞はリソソーム内で分解され、 α -ガラクトシルセラミドが放出される。酸性リソソーム内では脂質交換タンパク質（例えば、サポシン）の助けを借りて、 α -ガラクトシルセラミドはCD1dと複合体を形成する。これらの複合体は、細胞表面に輸送され、原形質膜中のコレステロールに富むミクロドメイン、脂質ラフトに主に局在する。胸腺由来インバリアントナチュラルキラーT細胞（iNKT）はCD1dにより提示された脂質抗原をそのユニークなT細胞受容体（TCR）レパートリーV α 24J α 18を介して認識する。iNKT細胞はIFN γ に対する既存のmRNAを運び、従ってIFN γ 後TCR/Cd1d/ α -GalCer結合を迅速に分泌する。iNKT細胞はまた、免疫系の様々な細胞のCD1d拘束性細胞傷害能の増加を伴うTCR誘発時に複数のサイトカインを迅速に分泌する。iNKTによって放出されるサイトカインには、調節性サイトカイン（例、IL-4、IL-10、IL-13）のほか、IL-2、IL-17、IFN γ などの炎症性サイトカインも含まれる。活性化後のiNKT細胞は、古典的顆粒を介した機序によって媒介される腫瘍細胞を直接死滅させることができる。樹状細胞表面のCD1d：脂質複合体および共刺激分子CD80/86を認識すると、iNKT細胞はIL-12RおよびCD40L分子をアップレギュレートする。その後、CD40Lを介して、iNKTは樹状細胞の成熟とIL-12の放出を誘導する。このIL-12リリースは次にiNKTによるIFN γ 産生を強力に増加させ、その後、iNKT誘導成熟後のDCの交差提示の増強とともに、抗腫瘍形成性細胞傷害性CD8+ Tリンパ球（CTL）の活性化を増大させる。したがって、iNKT細胞は免疫応答をジャンプスタートさせる能力をもち、樹状細胞とともに、自然免疫系と適応免疫系を橋渡しする。IFN γ の放出は、特有の糖脂質腫瘍抗原の提示のためにMHC1分子を発現することによって、専門的な貪食細胞をTh1型の免疫応答に偏らせる。したがって、腫瘍剤を含むミニ細胞は腫瘍殺傷方法を開始し、 α -GalCerを含むミニ細胞および腫瘍剤を含むミニ細胞は先天性免疫応答を誘発し、 α -GalCerを含むミニ細胞は適応免疫応答を活性化し、その結果、免疫系が腫瘍特異的殺傷方法を引き継ぐ。

【0044】

上記および本明細書に提示する実施例に記載するように、本開示の発明者らは、抗腫瘍剤と組み合わせた細菌由来ミニ細胞内にカプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原 α -GalCerが驚くべきことに、相乗的な抗腫瘍効果を生じることを見出した。相乗効果は抗腫瘍剤の細胞死誘導活性に部分的に依存するようことを考慮すると、癌細胞の細胞死を誘導することができる任意の抗腫瘍剤は封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原との組合せでの使用に適している。1つの実施形態において、抗腫瘍剤はまた、細菌由来のミニ細胞内に含まれる。別の実施形態において、抗腫瘍剤は、細菌由来のミニ細胞内に含まれない。さらに、以下にさらに詳細に記載されるように、 α -GalCerに加えてCD1d拘束性iNKT細胞抗原は公知であり、iNKT細胞活性化をもたらすことが示されており、本明細書中に提供される組成物および方法において α -GalCerの代わりに、または α -GalCerと組み合わせて使用され得る。

【0045】

以下の記載は、記載される特定の実施形態、方法論、プロトコル、または試薬に本発明を限定することなく、これらの発見に関連する本発明を概説する。同様に、本明細書で使用される用語は特定の実施形態のみを記載し、本発明の範囲を限定しない。

10

20

30

40

50

【0046】

B. 実験結果の概要

1つの実施形態において、本発明はミニ細胞パッケージ化抗腫瘍剤とミニ細胞パッケージ化II型インターフェロニアゴニスト（例えば、 α -ガラクトシルセラミド（ α -GC））との組み合わせを含み、I型インターフェロニアゴニストの非存在下で含む組成物が、驚くべき抗癌効力を実証するという驚くべき発見に関する。

【0047】

特に、実施例1は腫瘍に対する、ミニ細胞含有抗腫瘍治療薬およびミニ細胞含有CD1d拘束性iNKT細胞抗原（例えば、 α -GalCer）の二重組合せの効力を示すデータを記載する。図3～6を参照されたい。実験結果は、生理食塩水および^{EP}ミニ細胞_{Dox}処置と比較して、^{EP}ミニ細胞_{Dox} + ミニ細胞 α -GC（ α -GalCer）を受けた併用処置群について、腫瘍進行の顕著な停止を示した。この結果は^{EP}ミニ細胞_{Dox}にミニ細胞 α -GC処理を追加することにより、非補助的効果の理論を支持する。

【0048】

さらなるデータは生理食塩水処置対照腫瘍が薬物および α -GalCer EDV媒介二重併用療法（図6）；例えば、ミニ細胞パッケージング抗腫瘍剤およびミニ細胞パッケージングII型インターフェロニアゴニスト（例えば、 α -GalCerのようなCD1d拘束性iNKT細胞抗原）の組み合わせに対する処置変更後に劇的な腫瘍退行を実証したことを示した。特に、800mm³に達した腫瘍は3日後に600mm³以下に低下し、短期間できわだって劇的な腫瘍の大きさの減少（～25%）を示した。二重組合せ組成物が短期間で大きな腫瘍を劇的に減少させる能力は、本発明以前には知られていなかった。

【0049】

本発明の一実施形態では二重組合せ組成物（例えば、 α -GalCerなどのミニ細胞パッケージングされたCD1d拘束性iNKT細胞抗原と組み合わせたミニ細胞パッケージングされた抗腫瘍剤）は、大きい腫瘍のサイズを含む腫瘍のサイズを、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約105%、約110%、約115%、約120%、約125%、約130%、約135%、約140%、約145%、約150%、約175%、約200%、約225%、約250%、約275%、約275%、約300%、約325%、約350%、約375%、約400%、約425%、約450%、約475%、または約500%減らすことができる。約3日、約5日、約1週間、約2週間、約3週間、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12ヶ月、約1.5年、約2年以上のような、任意の適切な時間にわたって、腫瘍サイズの減少を測定することができる。

【0050】

細菌ミニ細胞治療は腫瘍部位に直接従来のおよび新規の薬物療法を送達し、続いて抗腫瘍免疫応答を誘発することが可能な独特の癌治療戦略を表す。腫瘍に対する二重の強襲が起こり、まず、送達された治療に応答して細胞死を経て、続いて適応免疫応答を導く自然免疫細胞活性化が起こる。この種の治療法には、免疫細胞の活性化がインビボでも主に腫瘍部位で起こるという点で、現在の免疫療法戦略よりも一定の利点があり、これは急速に変化する動的環境である。さらに、免疫原性腫瘍環境を作り出し、それらの腫瘍に対する免疫応答または単一の免疫細胞サブセットのみを標的とする治療への適応をほとんど示さない患者に関連する問題を回避して、複数の免疫細胞サブセットに対する効果を誘発する。以下に記載する研究は新規な癌免疫治療薬としての細菌ミニ細胞の可能性を強調し、将来の細菌ミニ細胞製剤は、ペイロードおよび標的化能力の両方に関してこの技術の汎用性を考慮して、固有の免疫原性をさらに活用することができる(MacDiarmidら、2007a)。

【0051】

II. 構成成分

上記のように、本発明の組成物は被験体において腫瘍細胞の死を誘導する抗腫瘍剤と組み合わせ投与される、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原（例えば、 α -GalCer）を含む。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は本明細書中に記

載されるように、細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞中にカプセル化される。

【0052】

いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原が細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞中の抗腫瘍剤でカプセル化される。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤が別々の細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞にカプセル化される。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤は、同じ組成物中に含まれる。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤が別々の組成物に含まれる。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞中にカプセル化され、抗腫瘍剤は細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞中にカプセル化される。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞中にカプセル化され、抗腫瘍剤は細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞中にカプセル化されない。

10

【0053】

A. CD1d拘束性iNKT抗原

II型IFNは細胞傷害性T細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫に重要な役割を果たす。例えば、Chikumaら、2017を参照のこと。IFN γ サイトカインは自然抗原の結合によりナチュラルキラー細胞から放出されるが、スフィンゴ糖脂質化合物は自然免疫応答と獲得免疫応答の両方の強力な活性化因子として機能する。本発明者らは、スフィンゴ糖脂質 α -GalCerなどの、被包化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原がマクロファージや樹状細胞などの食細胞に飲み込まれ、次いで、表面糖タンパク質CD1dに結合した細胞の表面に発現されることを発見した。CD1dに結合した発現スフィンゴ糖脂質の認識は、II型インターフェロン、IFN- γ 、および多くのインターロイキン (Th1-、Th2-、および/またはTh17-型サイトカイン) を含む自然ナチュラルキラーT(iNKT)細胞による強力なサイトカイン応答を誘導する。例えば、Carrenoら、2016を参照のこと。次いで、iNKT細胞はDC成熟を誘導し、細胞傷害性T細胞応答の発生をもたらすT細胞ヘルパー様機能を示す。

20

【0054】

本明細書に記載の組成物に有用なCD1D拘束性iNKT細胞抗原の例には、特に限定されないが、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer)、C-グリコシディフィック型 α -ガラクトシルセラミド (α -C-GalCer)、12炭素アシル型ガラクトシルセラミド (β -GalCer)、 β -D-グルコピラノシルセラミド (β -GlcCer)、1,2-ジアシル-0-ガラクトシル-sn-グリセロール (BbGL-II)、ジアシルグリセロール含有糖脂質 (Glc-DAG-s2)、ガングリオシド (CD3)、ガングリオトリアセラミド (Gg3Cer)、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI)、 α -グルクロノシルセラミド (GSL-1またはGSL-4)、イソグロボトリヘキソシルセラミド (iGb3)、リポホスホグリカン (LPG)、リポホスファチジルコリン (LPC)、 α -ガラクトシルセラミド類似体 (OCH) およびトレイトルセラミドなどのグリコスフィンゴ脂質が含まれる。特定の実施形態では、本明細書に開示される組成物はカプセル化され α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) を含む。

30

【0055】

いくつかの実施形態では、スフィンゴ糖脂質が合成 α -GalCer類似体である。いくつかの実施形態において、合成 α -GalCer類似体は、6'-デオキシ-6'-アセトアミド α -GalCer(PBS57)、ナフチル尿素 α -GalCer(NU- α -GC)、NC- α -GalCer、4ClPhC- α -GalCer、PyrC- α -GalCer、 α -カルバ- α -GalCer、カルバ- α -D-ガラクトース α -GalCer類似体 (RCAI-56)、1-デオキシ-ネオ-イノシトール α -GalCer類似体 (RCAI-59)、1-O-メチル化 α -GalCer類似体 (RCAI-92)、およびHS44アミノシクリトールセラミドの中から選択される。

40

【0056】

いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原が細菌抗原、真菌抗原、または原生動物抗原に由来する。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、細菌種スフィンノモダカエ種由来のスフィンゴ糖脂質である。いくつかの実施形態では、スフ

50

インゴ糖脂質がスフィンゴモダカエ種スフィンゴ糖脂質-1 (GSL-1)、GSL-1'、GSL-2、GSL-3、またはGSL-4である。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、細菌種連鎖球菌種由来の糖脂質である。いくつかの実施形態において、糖脂質は、肺炎球菌Glc-ジアシルグリセロール (DAG) またはGal-Glc-DAGである。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、細菌種ボレリア種由来の糖脂質である。いくつかの実施形態では、糖脂質がライム病ボレリアBbGAL-IIcである。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原が細菌種ヘリコバクター模式種由来の糖脂質である。いくつかの実施形態において、糖脂質は、ピロリ菌PI57である。本明細書中に提供される組成物および方法において有用な他のCD1d拘束性iNKT細胞細菌抗原としてはスポンジモナス由来のモノグリコシルセラミド、ヒト結核菌由来のホスホチジリノシトルマンノシド、およびリュウシャマニアドノビ由来のリポホスホグリカンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0057】

いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、アスペルギルス種(例えば、A.フミガスタスまたはA.ニジェール) 由来の真菌糖脂質である。いくつかの実施形態において、糖脂質はA.フミガスタスアベラミドB.であり、いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、原生動物赤痢アメーバ由来の糖脂質である。いくつかの実施形態において、糖脂質は、赤痢アメーバEhP1bである。

【0058】

本明細書に提供される組成物に有用な追加の α -GalCer誘導体を含む追加の例示的なCD1d拘束性iNKT細胞抗原には、米国特許出願公開第2017/0368002号、BirkholzおよびKronenberg、2015年、およびAnderson、2013年に記載されているものが含まれ、これらはそれぞれ、参照によりその全体が組み込まれる。

20

【0059】

実施例1に示されるように、本出願人は、化学療法剤ドキソルビシン (E^P ミニ細胞 D_{ox}) を含有するそのままの細菌由来ミニ細胞を投与された腫瘍含有マウス、およびCD1d拘束性iNKT細胞抗原 α -GalCer(ミニ細胞 α -GC) を含有するミニ細胞が E^P ミニ細胞 D_{ox} のみを投与されたマウスよりも、腫瘍進行において顕著な停止を示すことを発見した。これらの観察は、CD1d拘束性iNKT細胞抗原を組み込んだミニ細胞組成物がマウスにおける腫瘍の治療に効果的であることを示した。ミニ細胞はインビボでiNKT細胞活性化およびII型インターフェロンIFN- γ 産生を増強するために、免疫系の細胞に直接、CD1d拘束性iNKT細胞抗原などのII型IFNアゴニストを送達することができる。あるいは、非標的封入型のCD1d拘束性iNKT細胞抗原が免疫系の貪食細胞に取り込まれ、そこでエンドソームで分解され、 α GCが免疫活性化のためにiNKT細胞に提示される。

30

【0060】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物がCD1d拘束性iNKT細胞抗原などのII型インターフェロンアゴニストの標的送達を提供する。他の実施形態では、本明細書に開示される組成物がCD1d拘束性iNKT細胞抗原の非標的送達を含む。

【0061】

IFN- γ 産生は、抗原提示細胞 (APC) によって分泌されるサイトカインによって制御され、最も顕著なのはインターロイキン (IL) -12およびIL-18である。これらのサイトカインは、自然免疫応答におけるIFN- γ 産生と感染を結びつける橋渡しとして働く。多くの病原体のマクロファージ認識はIL-12とケモカインの分泌を誘導する。これらのケモカインはNK細胞を炎症部位に引き寄せ、IL-12はこれらの細胞のIFN- γ 合成を促進する。マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、T細胞では、IL-12とIL-18の刺激が組み合わせるとIFN- γ 産生がさらに増加する。したがって、これらのタンパク質のいずれかまたはそれらの組み合わせは、本明細書に提供される組成物および方法と組み合わせて使用するのに適した薬剤である。

40

【0062】

データは腫瘍細胞に対する宿主免疫応答を有効に活性化するために必要とされるIFN-

50

γ の血清濃度が患者がまた、本明細書中に記載されるように、抗腫瘍治療（例えば、化学療法薬または薬物負荷二重特異性抗体標的ミニ細胞）の投与を受ける場合、低いことを示す。従って、1つの側面において、本発明の方法は、約30,000pg/mL以下の血清IFN- γ 濃度の増加を生じる。別の側面において、血清IFN- γ 濃度は、約5000pg/mL、1000pg/mL、900pg/mL、800pg/mL、700pg/mL、600pg/mL、500pg/mL、400pg/mL、300pg/mL、200pg/mL、または100pg/mLより高くない値まで増加する。さらなる態様では、得られる血清IFN- γ 濃度が少なくとも約10pg/mL、または少なくとも約20pg/mL、約30pg/mL、約40pg/mL、約50pg/mL、約60pg/mL、約70pg/mL、約80pg/mL、約90pg/mL、約100pg/mL、約150pg/mL、約200pg/mL、約300pg/mL、約400pg/mLまたは約500pg/mLである。

10

【0063】

B. がんの治療に有用な抗腫瘍活性剤または細胞傷害活性剤

「抗悪性腫瘍剤」とは、腫瘍細胞の増殖、発達、成熟または拡散を阻止または阻害する、化学的、生物学的にかかわらず、医薬品をいう。「抗悪性腫瘍剤」とは「抗悪性腫瘍剤」および「化学療法剤」と互換的に使用される用語である。

【0064】

本開示の文脈において、所定の腫瘍を治療するための抗腫瘍剤を選択することは、いくつかの因子に依存する。これらの因子には、患者の年齢、腫瘍の病期、および患者が受けた可能性のある過去の治療法が何であれ含まれるが、これらに限定されない。

【0065】

組成物は、多くとも約1mgの抗腫瘍薬または化学療法薬を含むことができる。あるいは、化学療法薬の量が多くとも約750 μ g、約500 μ g、約250 μ g、約100 μ g、約50 μ g、約10 μ g、約5 μ g、約1 μ g、約0.5 μ g、または約0.1 μ gであり得る。別の態様では、組成物がミニ細胞にパッケージ化されずに使用される場合、薬物の治療有効量の約1/1,000未満、あるいは約1/2,000、1/5,000、1/10,000、1/20,000、1/50,000、1/100,000、1/200,000または1/500,000未満の量を有する化学療法薬物を含む。本開示のさらに別の態様によれば、組成物は、少なくとも約1nmolの化学療法薬を含むことができる。したがって、本開示はまた、化学療法薬の量が、少なくとも約2nmol、約3nmol、約4nmol、約5nmol、約10nmol、約20nmol、約50nmol、約100nmol、または約800nmolである実施形態を包含する。

20

【0066】

本開示によれば、化学療法薬は本明細書中に提供されるカプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原と共に投与するために、以下に詳述されるクラスのうちの1つから選択され得る。いくつかの実施形態において、化学療法薬は本明細書中に記載されるように、そのままの細菌由来のミニ細胞に充填される。これらの薬物はまた、薬物設計および発見努力から設計された合成類似体であり得る。任意の公知の化学療法剤が、本発明の組成物において利用され得る。公知の化学療法剤の例は、これらに限定されないが、以下が含まれる：

(1)アルキル化剤、例えばマスタードガス誘導体（メクロレタミン、シクロホスファミド（シトキサン）、クロラムブシル（ロイケラン）、メルファラン、イホスファミドなど）、エチレンイミン（チオテパ（チオプレックス）、ヘキサメチルメラミン）、アルキルスルホネート（ブスルファン（ミレラン））、ヒドラジンとトリアジン（アルトレタミン（ヘキサレン）、プロカルバジン（マチュラン）、ダカルバジン（DTIC）とテモゾロミド）、ニトロソ尿素（カルムスチン、ロムスチンとストレプトゾシン）、金属塩（カルボプラチン、シスプラチン（プラチノール）、オキサリプラチン）、メクロレタミン、メルファラン（アルケラン）；

40

(2)植物アルカロイド、テルペノイドおよびトポイソメラーゼ阻害薬、例えばビンカアルカロイド（ビンクリスチン（オンコビン）、ビンブラスチン（ヴェルバン）、ビンデシン、およびビノレルビン）、タキサン（パクリタキセル（タキソール）およびドセタキセル（タキソテル））、ポドフィロトキシン（エトポシドおよびテニソピド）、およびカンプトテカン類似体（イリノテカンおよびトポテカン）；

50

(3)抗腫瘍薬、例えばアントラサイクリン系（ドキソルビシン（アドリアマイシン、ルベックス、ドキシル）、ダウノルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、イダルビシン、デュオカルマイシンおよびダクチノマイシン（コスメゲン））、クロモマイシン（ダクチノマイシンおよびプリカマイシン（ミトラマイシン））、およびその他（ミトマイシンおよびブレオマイシン（ブレノキサン））；

(4)代謝拮抗薬、例えば葉酸拮抗薬（メトトレキサート）、ピリミジン拮抗薬（メトトレキサート）、ピリミジン拮抗薬（5-フルオロウラシル、フォクスウリジン、シタラビン、フルロウラシル（5-FU）、カペシタビン、ゲムシタビン）、プリン拮抗薬（6-メルカプトプリン（プリンエトール）および6-チオグアニン）、6-チオプリン、およびアデノシンデアミナーゼ阻害薬（クラドリビン（ロイスタチン）、フルダラビン、ネララビンおよびペントスタチン）、アザシチジン、チオグアニン、およびシタラビン（ara-C）；

(5)トポイソメラーゼ阻害薬、例えばトポイソメラーゼI阻害薬（イロノテカン、トポテカン）、トポイソメラーゼII阻害薬（アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド）；

(6)ホルモン剤、例えばエストロゲンおよびアンドロゲン阻害薬（タモキシフェンおよびフルタミド）、ゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト（リュープロリドおよびゴセレリン（ゾラデックス））、アロマターゼ阻害薬（アミノグルテチミドおよびアナストロゾール（アリミデックス））；

(7)DNA低メチル化剤、例えばアザシチジン、デシタビン；

(8)ポリ（アデノシンニリン酸 [ADP] -リボース）ポリメラーゼ（PARP）経路阻害薬、例えばイニパリブ、オラパリブ、ベリパリブ；

(9)PI3K/Akt/mTOR経路阻害薬、例えばエベロリムス；

(10)ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害薬、例えばボリノスタット、エンチノスタット（SNDX-275）、モセチノスタット（MGCD103）、パノビノスタット（LBH589）、ロミデプシン、バルプロ酸；

(11)サイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害剤、例えば、Flavopiridol、Olomoucine、Roscovitine、Kenpaullone、AG-024322（Pfizer）、Fascaplysin、Ryuvidine、Purvalanol A、NU2058、BML-259、SU 9516、PD-0332991、P276-00、

(12)熱ショックタンパク質（HSP90）阻害剤、例えばゲルダナマイシン、タネスピマイシン、アルベスピマイシン、ラジシコール、デグリノ、およびBIIB021；

(13)マウス二重微小染色体2（MDM2）阻害剤、例えば、Cis-イミダゾリン、ベンゾジアゼピンジオン、スピロ-オキシインドール、イソキノリノン、チオフエン、5-デアザフラビン、トリプタミン；

(14)未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）阻害薬、例えば、アミノピリジン、ジアミノピリミジン、ピリドイソキノリン、ピロロピラゾール、インドロカルバゾール、ピロロピリミジン、ジアニリノピリミジン；

(15)ポリ [ADPribose] ポリメラーゼ（PARP）阻害薬、例えばベンズアミド、フタラジノン、トリサイクリックインドール、ベンズイミダゾール、インダゾール、ピロロカルバゾール、フタラジノン、イソインドリノン；および

(16)その他の抗癌剤、例えばアンサクリン、アスパラギナーゼ（Elspar）、ヒドロキシ尿素、ミトキサントロン（ノバントロン）、ミトタン（ライタントロン）、メイタンシノイド、レチノイン酸誘導体、骨髄増殖因子（サルグラモスチムおよびフィルグラスチム）、アミホスチン、葉酸代謝を破壊する薬剤、例えばペメトレキセド、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤（ヒドロキシ尿素）、副腎皮質ステロイド阻害剤（ミトタン）、酵素（アスパラギナーゼおよびベグアスパラガーゼ）、抗微小管剤（エストラムスチン）、およびレチノイド（ベキサロテン、イソトレチノイン、トレチノイン（ATRA））。

【0067】

低分子薬物サブカテゴリーの例示である化学療法薬は、アクチノマイシン-D、アルケラン、アラ-C、アナストロゾール、BiCNU、ビカルタミド、ブレオマイシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルボプラチナム、カルボムスチン、CCNU、クロラムブシル、シ

10

20

30

40

50

スプラチン、クラドリビン、CPT-11、シクロホスファミド、シタラビン、シトシンアラビノシド、シトキサン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デクストラゾキサン、ドセタキセル、ドキソルビシン、DTIC、エピルビシン、エチレンイミン、エトポシド、フロウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルタミド、ホテムスチン、ゲムシタビン、ヘキサメチルアミン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトキサントロン、オキサリパラチン、パシリパキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、プロカルバジン、ステロイド、ストレプトゾシン、STI-571、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テトラジン、チオグアニン、チオテパ、トムデックス、トポテカン、トレオスルファン、トリメトレキサート、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、VP-16、およびキセローダである。

【0068】

メイタンシノイド（分子量：～738ダルトン）はメイタンシンの化学誘導体の一群であり、強力な細胞毒性を有する。毒性の懸念のために、ヒト患者の使用には安全でないと考えられるが、メイタンシノイドは本発明に従って、ミニ細胞を介した脳腫瘍患者への送達に適している。

【0069】

デュオカルマイシン（分子量：～588ダルトン）は、ストレプトマイセス細菌から最初に単離された一連の関連する天然産物である。これらもまた、強力な細胞毒性を有するが、ヒトでの使用には安全でないと考えられる。メイタンシノイドと同様に、デュオカルマイシンは、本発明における使用のための適切な化学療法薬である。

【0070】

生物学的化学療法薬のサブカテゴリーには限定されるものではないが、アスパラギナーゼ、AI-457、バピネオズマブ、ベリムマブ、ブレンツキシマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、セツキシマブ、ダロツズマブ、デノスマブ、エブラツズマブ、エスタフェナトクス、ファルレツズマブ、フィギツムマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブ、ギレンツキシマブ（WX-G250）、ハーセプチン、イブリツモマブ、イノツズマブ、イピリズマブ、メボリズマブ、ムロモナブ-CD3、ナブツモマブ、ネシツムマブ、ニモツムマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オテリキシズマブ、オゾガマイシン、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、REGN88、ソラネズマブ、タネツマブ、テプリズマブ、チウキセタン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレメリムマブ、ベドリズマブ、ザルツムマブ、ザノリムマブが含まれる。

【0071】

いくつかの実施形態において、抗腫瘍薬は、アクチノマイシン-D、アルケラン、アラ-C、アナストロゾール、BiCNU、ピカルタミド、ブレオマイシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルボプラチナム、カルボムスチン、CCNU、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、CPT-11、シクロホスファミド、シタラビン、シトシンアラビノシド、シトキサン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デクストラゾキサン、ドセタキセル、ドキソルビシン、DTIC、エピルビシン、エチレンイミン、エトポシド、フロウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルタミド、ホテムスチン、ゲムシタビン、ヘキサメチルアミン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトキサントロン、オキサリパラチン、パシリパキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、プロカルバジン、ステロイド、ストレプトゾシン、ストレプトゾシン、STI-571、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テトラジン、チオグアニン、チオテパ、トムデックス、トポテカン、トレオスルファン、トリメトレキサート、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、VP-16、キセローダ、アスパラギナーゼ、AI-457、バピネオズマブ、ベリムマブ、ブレンツキシマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、セツキシマブ、ダロツズマブ

10

20

30

40

50

、デノスマブ、エブラツズマブ、エスタフェナトクス、ファルレツズマブ、フィギツムマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブ、ギレンツキシマブ（WX-G250）、ハーセプチン、イブリツモマブ、イノツズマブ、イピリズマブ、メボリズマブ、ムロモナブーCD3、ナブツモマブ、ネシツムマブ、ニモツムマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オテリキシズマブ、オゾガマイシン、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、REGN88、ソラネズマブ、タネツマブ、テプリズマブ、チウキセタン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレメリムマブ、ベドリズマブ、ザルツムマブ、ザノリムマブ、5FC、アキュタンホフマンラロシェ、AEE788ノバルティス、AMG-102、抗ネオブラストン、AQ4N(バノンクサントロン)、AVANDIA（ロシグリタゾンマレイン酸塩）、アバスチン（ベバシズマブ）、ゲネテック、BCNU、カルムスチン、CCI-779、CCNUロムスチン、セレコキシブ（システミック）、クロロキン、シレンギチド（EMD 121974）、CPT-11（CAMPTOSAR、イリノテカン）、ダサチニブ（BMS-354825、スプリセル）、樹状細胞療法、エトポシド（エポシン、エトポホス、ベベシド）、GDC-0449、グリーベック(イマチニブメシレート)、ガリアデルウエファ、ヒドロキシクロロキン、IL-13、IMC-3G3、免疫療法、イレッサ(ZD-1839)、ラパチニブ（GW572016）、癌用メトトレキサート（システミック）、ノボクレ、OSI-774、RAD001ノバーティス(mTOR阻害剤)、ラパマイシン（ラパムネ、シロリムス）、RMP-7、RTA744、シンバスタチン、シロリムス、ソラフェニブ、SU-101、SU5416スゲン、スルファサラジン（アツルフディン）、スーテント（ファイザー）、TARCEVA(アーロチニブHCl)、タキソール、TEMODARシェーリングブロー、TGF-Bアンチセンス、サロミド(サリドマイド)、トポテカン（システミック）、VEGFトラップ、VEGF-trap、ボリノスタット（SAHA）、X765、XL184、XL765、ザルネストラ（ティピファニブ）、ZOCOR(シムバスタチン)、シクロホスファミド(シトキサン)、（アルケラン）、クロラムブシル（ロイケラン）、チオペタ（チオプレックス）、プスルファン（マイレラン）、プロカルバジン（マツラン）、ダカルバジン(DTIC)、アルトレタミン（ヘキサレン）、クロラムブシル、シスプラチン（プラチノール）、イホスファミド、メトトレキサート（MTX）、6-チオプリネス(メルカプトプリン[6-MP]、チオグアニン[6-TG]）、メルカプトプリン（プリントール）、リン酸フルダラビン(ロイスタチン)、フルオウラシル（5-FU）、シタラビン（アラ-C）、アザシチジン（ベルバン）、ピンクリスチン（オンコビン）、ポドフィロトキシシン（エトポシド {VP-16} およびテニポシド{VM-26} ）、カンプトテシン(トポテカンおよびイリノテカン)、パクリタキセル（タキソール）およびドセタクセル(タキソテレ)のようなタキサン、（アドリアマイシン、ルベックス、ドキシル）、ダクチノマイシン（コスメゲン）、プリカマイシン(ミツラマイシン)、マイトマイシン（ムタマイシン）、ブレオマイシン（ブレノキサン）、エストロゲンおよびアンドロゲン阻害薬（タモキシフェン）、ゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト（リュープロリドおよびゴセレリン（ゾラデックス））、アナストロマターゼ阻害薬（アミノグルテチミドおよびアナストロゾール（アリミデックス））、アムサクリン（El-spar）、ミトキサントロン（ノバントロン）、ミトタン(リソドレン)、レチノイン酸誘導体、骨髄増殖因子（サルグラムスチンおよびフィルグラスチム）、アミホスチン、ペメトレキシド、デシタピン、イニパリブ、オラパリブ、ベリパリブ、エベロリムス、ボリノスタット（SNDX-275）、モセチノスタット（MGCD103）、パノビノスタット（LBH589）、ロミデプシン、バルプロ酸、フラボピリドール、オロモウシン、ロスコビチン、ケンパウロン、AG-024322（ファイザー）、ファスカブリジン、ユビチン、パーパノールA、NU2058、BML-259、SU 516、PD-0332991、P 272-00、ゲルダナマイシン、タネスピマイシン、アルベスピマイシン、ラディシコール、デグエリン、BIIB021、cis-イミダゾリン、ベンゾジアゼピンジオン、スピローオキシインドール、イソキノリノン、チオフエン、5-デアザフラビン、トリプタミン、アミノピリミジン、ジアミノピリミジン、ピリドイソキノリン、ピロロピラゾール、インドロカルバゾール、ピロロピリミジン、ジアニリノピリミジン、ベンズアミド、フタラジノン、トリサイクリックインドール、ベンズイミダゾール、インダゾール、ピロロカルバゾール、イソインドリノン、モルホリニルアントラサイクリン、マイタンシノイド、デュサル

10

20

30

40

50

マイシン、アウリスタチン、カリケアマイシン（DNA損傷剤）、 α -アマニチン（RNAポリメラーゼII阻害剤）、センタナマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、ストレプトニグチン、ニトロゲンマスタード、ニトロ尿素、アルカンスルホネート、ピリミジン類似体、代謝拮抗剤、葉酸類似体、アントラサイクリン、タキサン、ビンカアルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン剤、およびこれらの任意の組合せである。

【0072】

本開示に従って使用可能な活性薬剤は、上記に列挙した薬物クラスまたは特定の薬剤に限定されない。異なる発見プラットフォームは癌細胞のユニークな分子状シグネチャーに向けられる新しい薬剤を産生し続ける。実際、数千のそのような化学的および生物学的薬剤が発見されており、そのうちのいくつかのみをここに列挙する。しかし、親水性または疎水性の多様な活性薬剤のパッケージングに適応する、そのままの細菌由来ミニ細胞および殺された細菌細胞の驚くべき能力は本開示の発見に従って、ミニ細胞にパッケージングされた場合に、本質的に任意のそのような薬剤が癌を治療する可能性を有することを意味する。

10

【0073】

抗腫瘍薬のクラスの例示は放射性核種、化学療法薬、および調節RNAを含むが、これらに限定されない機能性核酸である。クラスのメンバーは、以下でさらに議論される。

【0074】

1. 放射性核種

いくつかの実施形態では、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原が放射性核種である抗腫瘍剤と組み合わせて投与される。「放射性核種」とは不安定な核をもつ原子、すなわち、核内で新たに生成された放射線粒子または原子電子のいずれかに付与されるのに利用可能な過剰なエネルギーを特徴とする原子である。本明細書では放射性核種を「放射性同位元素」、「放射性イメージング剤」、または「放射性標識」と呼ぶこともある。放射性核種はイメージングおよび／または治療目的で使用するができる。いくつかの実施形態では、放射性核種がそのままの細菌由来ミニ細胞を使用して投与される。それらは、ミニ細胞内に含まれるか、または本明細書中に記載されるミニ細胞の外表面上のリガンド、ペプチド、または糖脂質に付着され得る。結合は、直接またはリンカーを介して、メルカプトアセチルトリグリシン（MAG3）、DOTA、EDTA、HYNIC、DTPAまたはクラウンエーテルなどのキレート剤を含むキレート化部分を含有するリンカーを使用することができる。キレート剤は、ミニ細胞表面成分に直接付着させるか、またはリンカーを介してミニ細胞に付着させることができる。多くの放射性核種が当技術分野で知られており、イットリウム-90、テクネチウム-99m、ヨウ素-123、ヨウ素-124、ヨウ素-125、ヨウ素-131、ルビジウム-82、タリウム-201、ガリウム-67、フッ素-18、キセノン-133、およびインジウム-111など、多くの放射性核種が医療用途に適していることが知られている。

20

30

【0075】

したがって、いくつかの実施形態では、放射性同位体がイットリウム-90、イットリウム-86、テルビウム-152、テルビウム-155、テルビウム-149、テルビウム-161、テクネチウム-99m、ヨウ素-123、ヨウ素-131、ルビジウム-82、タリウム-201、ガリウム-67、フッ素-18、銅-64、ガリウム-68、キセノン-133、インジウム-111、ルテチウム-177、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される放射性同位体を含む。

40

【0076】

イメージングおよび治療の両方の目的でミニ細胞に付着させるのに有用な放射性同位元素には、例えば、ガンマおよびベータ放射体であるヨウ素-131およびルテチウム-177が含まれる。従って、これらの薬剤は、画像化および治療の両方のために使用され得る。

【0077】

同じ元素の異なる同位体、例えば、ヨウ素-123（ガンマエミッター）およびヨウ素-131（ガンマおよびベータエミッター）もまた、画像化および治療目的の両方のために使用さ

50

れ得る (GerardおよびCavalieri、2002; Alzahraniら、2012)。

【0078】

新しい例は、イットリウム-86/イットリウム-90またはテルビウム同位体 (Tb) : ^{152}Tb (ベータプラスエミッター)、 ^{155}Tb (ガンマエミッター)、 ^{149}Tb (アルファエミッター)、および ^{161}Tb (ベータ粒子) (Mullerら、2012; Walrandら、2015) である。

【0079】

核イメージングは、ガンマおよび陽電子エミッター (β^+) を利用する。テクネチウム-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) またはヨウ素-123 (^{123}I) などのガンマエミッターは、ガンマカメラ (平面イメージング) またはSPECT (単一光子放出コンピュータ断層撮影) (Holman and Tume, 1990) を用いて配置することができる。

10

【0080】

これらの粒子の組織浸透は、放射性同位体のエネルギーに比例する (Kramer-MarekおよびCapala、2012)。 β 粒子は潜在的な殺細胞効果を有するが、ほんの数ミリメートルの組織浸透を有するため、周囲の健康な組織を残す。日常的な核腫瘍学の実施において一般に使用される β エミッターはルテチウム-177 (^{177}Lu 、組織浸透: 0.5~0.6mm、最大: 2mm、497 keV、半減期: 6.7日) およびイットリウム-90 (^{90}Y 、組織浸透: 平均2.5mm、最大: 11mm、935 keV、半減期: 64時間) を含む (Teunissenら、2005; Kwekkeboomら、2008; Ahmadzadehfarら、2010; Pillaiら、2013; Ahmadzadehfarら、2016)。

【0081】

放射性核種は、核医学において、特に腫瘍細胞を損傷するためのベータ線エミッターとして、広範な使用を見出している。いくつかの実施形態において、放射性核種は、抗腫瘍剤として適切に使用される。

20

【0082】

放射性核種は、任意の公知の技術によって、そのままの細菌由来のミニ細胞と会合され得る。したがって、タンパク質または他のミニ細胞表面部分は、Pierce Biotechnology Inc (Rockford, Ill.) の製品であるPierce Iodination試薬 (Rice ら、Semin. Nucl. Med., 41, 265-282 (2011) に詳述されている) の使用などの市販の標識手段を使用して、放射性核種で標識することができる。あるいは、放射性核種をミニ細胞内のタンパク質に組み込むことができる。

30

【0083】

後者の状況では、ミニ細胞をつくる細菌株を外来タンパク質をコードするプラスミドDNAで形質転換する。非対称的な細胞分裂の際にミニ細胞が形成されると、プラスミドDNAのいくつかのコピーがミニ細胞の細胞質に分離する。得られた組換えミニ細胞を、プラスミドDNAからミニ細胞内で発現された外来タンパク質が放射性核種運搬アミノ酸に組み込まれるような条件下で、放射性標識アミノ酸の存在下でインキュベートする。例えば、Clark-Curtiss and Curtiss、Methods Enzymol、101: 347-362 (1983) のプロトコールに従って、組換えミニ細胞を、 ^{35}S メチオニンを含む最小増殖培地中でインキュベートし、それにより、新たに発現されたプラスミドコードタンパク質が ^{35}S メチオニンを組み込む。同様の手法を用いて、組換えミニ細胞を所望に応じて他の放射性標識でパッケージングすることができる。

40

【0084】

ミニ細胞表面上のオリゴ糖はまた、例えば、Fukudaによって説明されている十分に確立されたプロトコール (Fukuda, Curr. Protocols Molec. Biol. (Suppl. 26), 17.5.1-17.5.8 (1994)) を使用して放射性標識され得る。ミニ細胞に固有のこのようなオリゴ糖の例として、グラム陰性菌由来のミニ細胞の表面に見られるリポ多糖 (LPS) のO-多糖成分が挙げられる (後述)。

【0085】

この点に関する好ましい方法は、ミニ細胞を特定の腫瘍に標的化するために使用される腫瘍標的化リガンドとして使用される二重特異性抗体を放射性標識することである。米国

50

特許出願公開第2007/0237744号（その内容は、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。すなわち、ミニ細胞上に「コーティングされた」二重特異性抗体は、放射性標識のためかなりの量のさらなる表面タンパク質を露出する。したがって、抗体でコーティングされたミニ細胞に関連する放射標識のより高い比活性を達成することが可能である。対照的に、コーティングされていないミニ細胞の放射性標識、すなわち、放射性核種が風土病部分のみを標識する場合、より弱い標識（より低い比活性）を生じ得る。一実施形態では、このより弱い標識がグラム陰性細菌に由来するミニ細胞の外膜関連タンパク質が以下でさらに論じるように、ミニ細胞表面を覆うO-多糖の長鎖を含むLPSによってマスクされるために起こると考えられる。

【0086】

腫瘍を処置するために、本開示の組成物は、腫瘍を完全に排除しないとしても、腫瘍塊を少なくとも減少させるのに十分な腫瘍内照射のレベルを与える用量または複数回の用量で送達される。治療の進行は、この線に沿って、ケースバイケースで監視することができる。しかしながら、一般的には組成物中に包装される放射能の量が典型的には約30～約50Gyのオーダーであるが、本発明はまた、約30Gy～約200Gyの全範囲を与える、例えば約50～約200Gyのような、より多量の放射能を意図する。

【0087】

いくつかの例において、組成物中にパッケージされる放射能の量は、腫瘍へのミニ細胞媒介放射性核種の非常に効率的かつ特異的な送達を考慮すると、上記よりさらに低くあり得る。したがって、一態様では、組成物が約20～約40Gy、または約10～約30Gy、または約1～約20Gy、または約10Gy未満を含む。

【0088】

いくつかの腫瘍標的化リガンドは、リガンドが腫瘍細胞に結合する間に腫瘍に放射線を送達する機能を有する放射性同位元素を含み得る。いくつかの実施形態では、リガンドがArg-Gly-Asp (RGD) ペプチド、ボンベシン (BBN) / ガストリン放出ペプチド (GRP)、コレシストキニン (CCK) / ガストリンペプチド、 α -メラノサイト刺激ホルモン (α MSH)、ニューロペプチドY (NPY)、ニュートロテンシン (NT)、 $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-PSMA-HBED-CC}$ ($[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-PSMA-11}$ [PET])、 $[^{177}\text{Lu}] \text{Lu-}$ $[^{90}\text{Y}] \text{Y-J591}$ 、 $[^{123}\text{I}] \text{I-MIP-1072}$ 、 $[^{131}\text{I}] \text{I-MIP-1095}$ 、 ^{68}Ga または ^{177}Lu 標識PSMA-I&T、 ^{68}Ga または ^{177}Lu 標識DKFZ-PSMA-617 (PSMA-617)、ソマトスタチン (SST) ペプチド、サブスタンスP、T140、腫瘍分子標的化ペプチド1 (TMTP1)、血管作用性腸ペプチド (VIP)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、放射性同位体は、腫瘍標的化リガンドに結合される。いくつかの実施形態では、結合はリンカーを介する。いくつかの実施形態では、腫瘍標的化リガンドが放射性同位体または放射性同位体をキレート化するキレート剤部分の結合のための官能基を含むペプチドを含む。結合に利用可能なペプチドの官能基にはリジン側鎖上の ϵ -アミノ基、アルギニン側鎖上のグアニジニウム基、アスパラギン酸またはグルタミン酸上のカルボキシル基、システインチオール、およびチロシン上のフェノールが含まれるが、これらに限定されない。最も一般的な共役反応は、カルボジイミド/N-ヒドロキシスクシンイミジル (EDC/NHS) 媒介カルボキシルおよびアミンカップリング、チオール基へのマレイミド共役、およびチロシン上のフェノールのジアゾニウム修飾である。ペプチドを画像化部分と結合させるための代表的な化学は多くの総説において見出すことができる (ErathodiyilおよびYing, 2011; Takahashiら、2008)。

【0090】

いくつかの実施形態では、放射性同位元素が放射性造影剤として機能する。いくつかの放射性同位元素はSPECT画像化のための $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I 、および ^{111}In 、ならびにPET画像化のための ^{18}F 、 ^{64}Cu 、および ^{68}Ga を含むペプチド標識のために使用されている (chatalicら、2015)。一般に、これらの放射性同位体は、キレート剤を介してペプチドに結合される。いくつかの広く使用されているキレート剤は、(Sun ら、2017) に記載されて

10

20

30

40

50

いる。ほとんどの治療用放射性医薬品は、 β 放出同位体 (β^-) で標識されている。

【0091】

腫瘍細胞を標的とする本発明のミニ細胞はまた、ミニ細胞が結合している腫瘍細胞に放射性同位元素から標的放射線を送達する。いくつかの実施形態では放射性同位元素が治療用放射線放出剤として機能し、放射性同位元素によって提供される放射線の量は腫瘍に対する治療効果を提供するのに十分である。いくつかの実施形態において、治療効果は、腫瘍サイズの減少である。腫瘍は、約100%、約90%、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、または約5%だけサイズが縮小され得る。

【0092】

放射性標識ホスホネートは高い骨親和性を有し、疼痛性骨転移の画像化および緩和のために使用され得る。骨代謝の程度に応じて、トレーサーは、骨、好ましくは骨芽細胞性骨転移への接着を介して蓄積する。治療計画には、テクネチウム-99m-ヒドロキシエチリデンジホスホネート (HEDP) による骨シンチグラフィーを必要とし、代謝および転移病変の程度を推定する。ビスホスホネートHEDPは、レニウム-186 (β^- エミッター、半減期: 89時間、1.1MeV最大エネルギー、最大範囲: 4.6mm) またはレニウム-188 (β^- エミッター [85%、2.1MeV] および γ -エミッター [15%、155 keV]、半減期: 16.8時間、軟組織における最大範囲: 10mm) のいずれかでの治療のために標識することができる (Palmedo, 2007)。骨緩和療法のための新しい有望な放射性医薬品には、ゾレドロン酸の放射性標識複合体がある。ゾレドロン酸は環状側鎖をもつ新しい、最も強力なビスホスホネートの世代に属する。スカンジウム-46またはルテチウム-177で標識したゾレドロン酸の骨親和性は優れた吸収 ([^{177}Lu] Lu-ゾレドロン酸に対して98%、[^{46}Sc] Sc-ゾレドロン酸に対して82%) を示し、これは、サマリウム-153で標識したビスホスホネートよりもはるかに高い (最大: 67%) (Majkowska ら、2009)。これらのビスホスホネートは骨転移の診断または治療として使用するために、無傷のミニ細胞に結合させることができる。

【0093】

2. 化学療法薬

いくつかの実施形態では、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原が化学療法薬である抗腫瘍剤と組み合わせて投与される。本明細書において、「化学療法剤」、「化学療法剤」、および「化学療法」は、腫瘍細胞を殺すかまたは破壊する能力を有する薬物を意味するために互換的に使用される。化学療法剤は以下にさらに詳述されるように、小分子薬物または生物学的薬物であり得る。いくつかの実施形態では、化学療法薬がそのままの細菌由来ミニ細胞を使用して投与される。

【0094】

「小分子薬物」サブカテゴリーは (i) 生物学的プロセスに対する効果、および (ii) タンパク質またはポリマー高分子と比較して低分子量を有することを特徴とする化合物を包含する。小分子薬物は典型的には約800ダルトン以下であり、Temodar (登録商標) (テモゾロミド) によって例示されるように、約194ダルトンで、約150ダルトンの下限を有し、これは神経膠芽腫および他のタイプの脳癌を処置するために使用される。この文脈において、「約」は、適格な分子量値が測定精度の変動および数ダルトンまたは数十ダルトンのオーダーの実験誤差を受けることを示す。したがって、小分子薬物は、約900ダルトン以下、約800ダルトン以下、約700ダルトン以下、約600ダルトン以下、約500ダルトン以下、または約400ダルトン以下、例えば約150~約400ダルトンの範囲の分子量を有することができる。より具体的には、小分子薬物が約400ダルトン以上、約450ダルトン以上、約500ダルトン以上、約550ダルトン以上、約600ダルトン以上、約650ダルトン以上、約700ダルトン以上、または約750ダルトン以上の分子量を有することができる。別の実施形態では、ミニ細胞にパッケージされた小分子薬物が約400~約900ダルトン、約450~約900ダルトン、約450~約850ダルトン、約450~約800ダルトン、約500~約800ダルトン、または約550~約750ダルトンの分子量を有する。

【0095】

具体的には適切な小分子薬物には特に、窒素マスタード、ニトロソウレア、エチレンイミン、アルカンスルホネート、テトラジン、白金化合物、ピリミジン類似体、プリン類似体、代謝拮抗物質、葉酸類似体、アントラサイクリン、タキサン、ビンカアルカロイド、およびトポイソメラーゼ阻害剤などの上記に列挙したものが含まれるが、これらに限定されない。従って、本発明において使用するための小分子薬物は特に、以下のいずれかの中から選択され得る：エネジイン（例えば、ダインマイシンA、ユニラマイシン、カリケアマイシンγ1およびカリケアマイシン-シーター-1）；メアマイシン（FR901464の合成類似体）；ベンゾスベレン誘導体（例えば、Tanpureら、Bioorg. Med. Chem., 21: 8019-32 (2013) に記載される）；オーリスタチン（auristatins）、例えば、オーリスタチンE、モノメチルオーリスタチンE(MMAE))およびオーリスタチンF（これらは、ドラスタチンの合成類似体である）；デュオカルマイシン(例えばデュオカルマイシンSAおよびCC-1065)；メイタンシンおよびその誘導体（メイタンシノイド）（例えば、DM1およびDM4）；イリノテカン（カンプトサル（登録商標））ならびに他のトポイソメラーゼ阻害剤（例えば、トポテカン、エトポシド、ミトキサントロンおよびテニポシド）；ならびにヤタケマイシン（これらの合成はOkanoら、2006によって詳述される）。

【0096】

より詳細には、本明細書に詳述される特異的小分子薬物のいずれか1以上が本発明での使用に適したものの例証である：アクチノマイシン-D、アルケラン、アラ-C、アナストロゾール、BiCNU、ビカルタミド、ピサントレン、プレオマイシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルボプラチナム、カルボムスチン、CCNU、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、CPT-11、シクロホスファミド、シタラビン、シトシンアラビノシド、シトキサン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デクストラゾキサン、ドセタキセル、ドキシソルビシン、DTIC、エピルビシン、エチレンイミン、エトポシド、フロウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルタミド、ホテムスチン、ゲムシタビン、ヘキサメチルアミン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトキサントロン、オキサリパラチン、パシリパキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、プロカルバジン、ストストレプトゾシン、STI-571、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テトラジン、チオグアニン、チオテパ、トムデックス、トポテカン、トレオスルファン、トリメトトレキサート、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビンおよびVP-16。

【0097】

本明細書の目的のために、「生物学的薬物」とは対照的に、以下に論じる「機能性核酸」を除く生物学的プロセスによって作製することができる任意の生物学的に活性な高分子を意味すると定義され、サイズによってそのポリペプチドは上記に定義されるように小分子薬物として適格である。したがって、「生物学的薬物」サブカテゴリーは小分子薬物および機能性核酸サブカテゴリーを除外し、それらと重複しない。生物学的薬物の例は例えば、医薬化学および薬物設計のツールを使用して、天然であろうと組換えであろうと合成であろうと、治療用タンパク質および抗体である。

【0098】

3. 超毒性化学療法薬

化学療法を目的として設計されたある種の分子は、許容できない毒性のために前臨床または臨床試験中に失敗する。本発明者らは高毒性または「超毒性」の化学療法薬をミニ細胞にパッケージングし、続いて腫瘍患者に全身的に送達すると、薬剤が腫瘍細胞に送達されることを示した。さらに、腫瘍細胞が破壊され、薬剤含有細胞質が近傍の正常組織に放出された後でも、結果は正常組織に対する毒性ではない。これは薬剤が既にDNAなどの腫瘍細胞構造に結合しており、もはや正常細胞を攻撃できないためである。したがって、本発明は癌患者への高毒性（「超毒性」）化学療法薬の送達に特に有用である。したがって、いくつかの実施形態では、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原が超毒性化学療法薬である抗腫瘍剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、超毒性化学療法薬が

本明細書に記載のそのままの細菌由来ミニ細胞を使用して投与される。

【0099】

癌患者が全ての治療選択肢を使い果たした場合、腫瘍は従来の細胞毒性薬に対する高度の耐性を伴うかなりの不均一性の段階に達した可能性が高い。本記述の「毒性の強い化学療法剤」または「超毒性の化学療法剤」とは、がん細胞に対する有効用量と比較して、正常細胞に対する致死量が比較的低いため、従来の薬剤に対する耐性を克服できる化学療法剤を指す。

【0100】

したがって、一態様では、高毒性化学療法薬が標的癌に対する有効用量中央値 (ED_{50}) よりも低い致死量中央値 (LD_{50}) を有する。例えば、高毒性または超毒性化学療法薬物は、標的癌に対する薬物の ED_{50} の約500%、約400%、約300%、約250%、約200%、約150%、約120%、または約100%未満の LD_{50} を有することができる。別の態様では、高毒性または超毒性化学療法薬物がその最小有効用量、例えば、最小有効用量の約500%、約400%、約300%、約250%、約200%、約150%、約120%、約100%、約90%、約80%、約70%、約60%、または約50%より低い最大亜致死量（すなわち、重篤または不可逆的毒性を引き起こさない最高用量）を有する。一実施形態において、標的癌は例えば、（1）薬物が設計される癌型、（2）その薬物について前臨床または臨床試験が行われる最初の癌型、または（3）薬物が試験された全ての癌の中で最も高い有効性を示す癌型であり得る。

【0101】

超毒性化学療法薬物の例示的な非限定的な例にはメイタンシノイド、デュオカルミシン、モルホリニルアントラサイクリン、およびそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。メイタンシノイド（分子量：約738ダルトン）はメイタンシンの化学誘導体の群であり、強力な細胞毒性を有する。ヒト患者の使用には安全ではないと考えられるが、毒性の懸念のために、メイタンシノイドは本発明に従って、ミニ細胞を介した腫瘍患者への送達に適している。デュオカルマイシン（分子量：約588ダルトン）は、ストレプトマイセス細菌から最初に単離された一連の関連する天然産物である。それらはまた、強力な細胞毒性を有するが、ヒトでの使用には安全でないと考えられる。メイタンシノイドと同様に、デュオカルマイシンは、本発明における使用のための適切な化学療法薬である。

【0102】

同様に、国際特許出願 WO 1998/002446 に記載されているモルホリニルアントラサイクリン誘導体のクラスの化合物が例示されている。そのような誘導体の中には、ネモルビシン (3'-デアミノ-3'-[2(S)-メトキシ-4-モルホリニル]ドキシソルビシン)(MMDX)、およびその主要代謝産物である PNU-159682 (3'-デアミノ-3',4'-アンヒドロ-2',5'-メトキシ-3',4'-ヒドロキシ-4'-モルホリニル]ドキシソルビシン)、ならびに米国特許第8,470,984号に記載されている他の4つのそのような誘導体がある（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）：3'-デアミノ-3',4'-アンヒドロ-2',5'(S)-メトキシ-3',4'(R)-ヒドロキシ-4'-モルホリニル]イダルビシン；3'-デアミノ-3',4'-アンヒドロ-2',5'(S)-メトキシ-3',4'(R)-ヒドロキシ-4'-モルホリニル]ダウノルビシン；3'-デアミノ-3',4'-アンヒドロ-2',5'(S)-メトキシ-3',4'(R)-ヒドロキシ-4'-モルホリニル]カミノマイシン；および3'-デアミノ-3',4'-アンヒドロ-2',5'(S)-エトキシ-3',4'(R)-ヒドロキシ-4'-モルホリニル]d-オキシソルビシン。

【0103】

本開示の例示的な実施形態では、ミニ細胞が超毒性化学療法薬3'-デアミノ-3',4'-アンヒドロ-2',5'(S)-メトキシ-3',4'(R)-オキシ-4'-モルホリニル]ドキシソルビシン (PNU-159682) を含む。本発明者らは、PNU-159682が多くの異なる腫瘍細胞株における薬物耐性を克服すると思われる強力な薬物であり、多くの異なる腫瘍細胞株に対する細胞毒性評価において、ある範囲の従来の化学療法薬よりもはるかに強力であることを発見した。実施例8および9を参照されたい。さらに、ドキシソルビシンに耐性のヒト腫

10

20

30

50

瘍異種移植片が、EGFR標的およびPNU-159682負荷EDVのIV投与によって効果的に治療され得ることが、インビボマウス異種移植実験において示された。実施例11を参照。注目すべきことに、PNU-159682負荷EDVとI型インターフェロンアゴニストを併用すると、忍容性が良好であり、後期肺癌患者において相乗的かつ抗癌効果の改善が得られることがわかった。実施例12を参照されたい。したがって、本発明の一実施形態では、組成物が活性抗癌剤としてPNU-159682を含むEGFR標的ミニ細胞を含む。

【0104】

超毒性化学療法特性を示す可能性のある他の適切な癌化学療法薬には、オーリスタチン、カリケアマイシン（DNA損傷剤）、 α -アマニチン（RNAポリメラーゼII阻害剤）、センタナマイシン、ゲルダナマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、ストレプトニグチン、窒素マスタード、ニトロソルエース、エチレンイミン、アルカンスルホネート、テトラジン、白金化合物、ピリミジン類似体、プリン類似体、代謝拮抗剤、葉酸類似体、アントラサイクリン、タキサン、ピンカアルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、およびホルモン剤が含まれる。

【0105】

4. 生物学的化学療法薬

いくつかの実施形態では、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原が生物学的化学療法薬である抗腫瘍剤と組み合わせて投与される。このような薬物の例としてはアスパラギナーゼ、AIN-457、バピネオズマブ、ベリムマブ、ブレンツキシマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、セツキシマブ、ダロツズマブ、デノスマブ、エブラツズマブ、エストラフェナトクス、ファレツズマブ、フィギツムマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブ、ギレンツキシマブ（WX-G250）、イブリツモマブ、イノツマブ、イビリズマブ、メポリツマブ、ムロモナブ-CD3、ナプツモマブ、ネシツムマブ、ニモツムマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オテリズマブ、オゾガミシン、パジバキシマブ、パニツムマブ、ペルツツマブ、ラムシルマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、REGN88、ソラネズマブ、タネズマブ、テプリズマブ、チウキセタントシツモマブ、トラスツズマブ（ハーセプチン(登録商標)、トレメリムマブ、ベドリズマブ、ザルツムマブ、およびザノリムマブが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、生物学的化学療法薬がそのままの細菌由来ミニ細胞を使用して投与される。

【0106】

5. 機能性核酸

いくつかの実施形態において、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、機能性核酸と組み合わせて投与される。「機能性核酸」とは、宿主細胞に導入されると、タンパク質の発現を特異的に妨害する核酸分子をいう。いくつかの実施形態では、機能性核酸がそのままの細菌由来ミニ細胞を使用して投与される。癌を治療することに関して、そのままの細菌由来のミニ細胞を介して癌細胞に送達される機能性核酸負荷量が、腫瘍細胞増殖、血管新生または化学療法に対する抵抗性を促進する遺伝子、および／またはアポトーシスもしくは細胞周期停止を阻害する遺伝子、すなわち「癌促進遺伝子」を阻害することが好ましい。

【0107】

一般に、本開示で使用される機能性核酸分子は、タンパク質の転写物と相互作用することによってタンパク質の発現を減少させる能力を有する。本開示のためのミニ細胞ペイロードのこのカテゴリーには、とりわけ、siRNA、shRNA、短いRNA（典型的には400塩基長未満）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイムおよびデコイRNA、アンチセンス核酸、およびLincRNAなどの調節RNAが含まれる。「リボザイム」とは他のRNA分子を塩基配列特異的に繰り返し切断できる酵素活性を有するRNA分子をいい、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは特定の遺伝子転写産物の一部に相補的な核酸分子であって、転写産物とかけ合わせて翻訳を阻害することができるものをいい、アンチセンスオリゴヌクレオチドはRNAまたはDNAを含むことができ、「LincRNA」または「長鎖遺伝子間非コードRNA」とは200ヌクレオチドより長い非タンパク質コード転写産物を包含する。Khalilら、2

10

20

30

40

50

009によって論じられているように、LincRNAは遺伝子の転写、スプライシング、および／または翻訳を調節することができる。

【0108】

調節RNAのタイプのそれぞれは、上記のように腫瘍促進遺伝子を阻害し、したがって、本開示による使用に適した機能性核酸分子の供給源であり得る。したがって、本開示の一実施形態では、無傷のミニ細胞が腫瘍促進遺伝子を標的とするために利用され後転写後遺伝子サイレンシングRNA干渉 (RNAi) 機構を媒介するsiRNA分子を保有する。例えば、MacDiarmidら、2009 (抗体提示ミニ細胞は、化学療法薬と共に、薬剤に対する耐性を発現するのに対抗するsiRNAを送達する)、およびOhおよびPark、Advanced Drug Delivery Rev. 61: 850-62 (2009) (乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、肝臓癌、肺癌、および前立腺癌をそれぞれ治療する治療的siRNAを送達する) を参照。

10

【0109】

「siRNA」は一般に、タンパク質発現を特異的に妨害するその能力のために命名された約10～約30ヌクレオチド長の二本鎖RNA分子を指す。好ましくは、siRNA分子は約12～約28ヌクレオチド長であり、より好ましくは約15～約25ヌクレオチド長であり、さらに好ましくは約19～約23ヌクレオチド長であり、最も好ましくは約21～約23ヌクレオチド長である。したがって、siRNA分子は例えば、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、または約29ヌクレオチドの長さであり得る。

【0110】

1つの鎖の長さは、siRNA分子の長さを示す。例えば、21リボヌクレオチド長 (21量体) とよばれるsiRNAは、19個の連続した塩基対合のためにアニーリングする2本の対向するRNA鎖を含むことができる。各鎖上の残りの2つのリボヌクレオチドは「オーバーハング」を形成し、siRNAが異なる長さの2本の鎖を含む場合、鎖の長い方がsiRNAの長さを示す。たとえば、21ヌクレオチド長の1本鎖と20ヌクレオチド長の2本鎖をもつdsRNAは21量体を構成する。

20

【0111】

siRNA特異的および調節RNAの設計を補助するためのツールは一般に、容易に入手可能である。例えば、コンピュータベースのsiRNA設計ツールは、www.dharmacon.comのインターネット上で利用可能である。

30

【0112】

別の好ましい実施形態では、本開示の無傷のミニ細胞がsiRNAと同様に、転写後の遺伝子サイレンシングRNA干渉 (RNAi) 機構を媒介することができるmiRNAを保有する。また、siRNAと同様に、miRNAによって媒介される遺伝子サイレンシング効果を利用して、腫瘍促進遺伝子を標的とすることができる。例えば、Kotaら、2009 (トランスフェクションを介するmiRNAの送達はマウス肝臓癌モデルにおいて、癌細胞増殖の阻害、腫瘍特異的アポトーシスおよび疾患進行からの劇的な防御をもたらす)、およびTakeshitaら、2010 (一過性トランスフェクションを介する合成miRNAの送達は、骨組織上の転移性前立腺腫瘍細胞の増殖を阻害した) を参照のこと。

【0113】

どちらもRNA干渉を媒介するが、miRNAとsiRNAには差がある。この点において、「miRNA」は一般に、(siRNAの場合のように二本鎖ではなく) 約17～約27ヌクレオチド一本鎖RNA分子のクラスを意味する。したがって、miRNA分子は例えば、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、または約27ヌクレオチドの長さであり得る。好ましくは、miRNA分子が約21～約25ヌクレオチド長である。

40

【0114】

miRNAとsiRNAのもう一つの違いは、前者は一般にmRNAの標的を完全には補完しないことである。対照的に、siRNAはmRNA標的に対して完全に相補的でなければならない。したがって、siRNAは一般的に単一の、特異的な標的のサイレンシングをもたらすが、miRNAは乱雑である。

50

【0115】

さらに、両方がRISC(RNA誘導サイレンシング複合体)に集合するが、siRNAとmiRNAはRISC集合前のそれぞれの初期工程が異なる。これらの違いは、Chuら、2006；およびGregoryら、2006に詳細に記載されている。多数のデータベースがmiRNA保管場所として働く。例えば、miRBase (www.mirbase.org)およびtarbase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaToolsNew/index.php?r=tarbase/index>))を参照されたい。従来の用法ではmiRNAは通常、接頭辞「-mir」を連続番号と組み合わせて命名される。例えば、マウスmir-352の後に発見された新しいmiRNAはマウス「mir-353」と命名される。再び、miRNAを含む調節RNAの設計を補助するためのツールは、容易に入手可能である。この点に関して、コンピュータベースのmiRNA設計ツールは、wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.plでインターネット上で利用可能である。

10

【0116】

miRNA16aが、中皮腫および副腎皮質癌細胞への標的化されたミニ細胞媒介送達によって投与され得ることが、本発明者らの発見である。実施例7を参照。癌細胞によって一旦細胞内に取り込まれると、miRNA16aは癌細胞増殖を強力に阻害することがわかった。従って、いくつかの実施形態において、本開示のミニ細胞は、miRNA16aを含む。腫瘍細胞の増殖を阻害するのに有用な他のマイクロRNAには、mir-34ファミリーおよびlet-7ファミリーが含まれる。

【0117】

上記のように、本発明の組成物に用いられる機能性核酸は、腫瘍細胞の増殖、血管新生または化学療法に対する抵抗性を促進する遺伝子を阻害することができる。阻害された遺伝子自身も、アポトーシスや細胞周期停止を阻害することができる。機能性核酸によって標的化され得る遺伝子の例は、以下に提供される。

20

【0118】

本開示の機能性核酸は好ましくは薬物耐性を促進し、アポトーシスを阻害し、または腫瘍表現型を促進するタンパク質の遺伝子または転写物を標的とする。これらの文脈における機能性核酸戦略の成功裏の適用は当該技術分野において達成されているが、ミニ細胞ベクターの利点はない。例えば、Sioud, Trends Pharmacol.Sci., 2004；Caplen, Expert Opin. Biol. Ther., 2003；Niethら., 2003；Caplen and Mousses, 2003；Duxburyら, 2004；Yagueら, 2004；およびDuanら, 2004を参照のこと。

30

【0119】

薬剤耐性に寄与するタンパク質は、機能性核酸の好ましい標的を構成する。これらの蛋白質は、獲得薬物耐性または内因性薬物耐性に寄与する可能性がある。腫瘍細胞などの罹患細胞が、最初は薬物に反応するが、その後の治療サイクルで不応性となると、耐性表現型が獲得される。獲得薬物耐性に関与する有用な標的には、P-糖タンパク質 (P-gp、P-170、PGY1、MDR1、ABCB1、MDR関連タンパク質、多剤耐性タンパク質1)、MDR-2およびMDR-3、MRP2 (多剤耐性関連タンパク質)、BCR-ABL (切断点クラスター領域 - Abelsonプロトオンコジーン)、STI-571耐性関連タンパク質、肺耐性関連タンパク質、シクロオキシゲナーゼ-2、核因子κ、XRCC1 (X線交差相補性群1)、ERCC1 (切り出し交差相補性遺伝子)、GSTP1 (グルタチオンS-トランスフェラーゼ)、変異β-チューブリンなどのATP結合カセットトランスポーターが含まれ、およびIL-6などの増殖因子は、獲得薬物耐性に関与するさらなる標的である。

40

【0120】

薬剤耐性に寄与する特に有用な標的には、P-糖タンパク質、MDR-2、MDR-3、BCRP、APT11a、およびLRPなどのATP結合カセットトランスポーターが含まれる。有用な標的には、アポトーシス抵抗性を促進するタンパク質も含まれる。これらには、Bcl-2 (B細胞白血病/リンパ腫)、Bcl-X_L、A1/Bfl 1、局所接着キナーゼ、ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ、およびp53変異蛋白質が含まれる。

【0121】

有用な標的には、さらに、発癌性および変異性腫瘍抑制タンパク質が含まれる。これら

50

の実例は、 β -カテニン、PKC- α （プロテインキナーゼC）、C-RAF、K-Ras (V12)、DP97 Dead box RNAヘリカーゼ、DNMT1（DNAメチルトランスフェラーゼ1）、FLIP（Flice様抑制タンパク質）、C-Sfc、53BP1、ポリコム群タンパク質EZH2（zesteホモログのエンハンサー）、ErbB1、HPV-16 E5およびE7（ヒトパピローマウイルスアーリー-5およびアーリー-7）、Fortilin & MCL1P(Myeloid cell leukemia 1 protein)、DIP13 α （DDC相互作用タンパク質13a）、MBD2(Methyl CpG結合ドメイン)、p21、KLF4(Kruppel様因子4)、tpt/TCTP(翻訳制御された腫瘍タンパク質、SPK1およびSPK2 (Sスフィンゴシンキナーゼ)、P300、PLK1(ポロ様キナーゼ-1)、Trp53、Ras、ErbB1、VEGF(血管内皮増殖因子)、BAG-1 (BCL2関連athanogene 1)、MRP2、BCR-ABL、STI-571耐性関連タンパク質、シクロオキシゲナーゼ-2、核因子 κ 、XRCC1、ERCC1、GSTP1、突然変異体- β チューブリン、成長因子がある。

10

【0122】

また、標的として有用なのは、細胞質ポリアデニル化エレメント結合タンパク質（CEPB）によって例示されるグローバル調節エレメントである。例えば、CEPB4は膠芽腫および膵臓癌において過剰発現され、そこでは、このタンパク質が腫瘍増殖に関連する数百の遺伝子を活性化し、健康な細胞においては検出されない（Oritz-Zapaterら、2011年）。したがって、本明細書に従って、神経膠芽腫の処置はCEPB4の過剰発現に対抗する薬剤（例えば、siRNAまたは腫瘍細胞によるCEPB4発現を破壊する他の機能性核酸分子）を含む、そのままの細菌由来のミニ細胞を含む組成物の投与を介して達成され得る。

【0123】

機能性核酸の有用な標的のさらなる例には、複製タンパク質A(RPA)、70kDa(RPA1)、32kDa(RPA2)、および14kDa(RPA3) サブユニットから構成される三量体複合体が含まれ、これはすべての生物におけるDNA複製に必須である。Iftodeら、1999。

20

【0124】

他の有用な標的は、有糸分裂およびゲノム安定性の維持に重要なものである。例としては、広範囲の癌細胞で過剰発現されるポロ様キナーゼ（PLK1）が挙げられる。本開示の発明者らは、またPlk1 (siPlk1) 発現を阻害するsiRNAが、中皮腫および副腎皮質癌細胞の増殖を阻害することを見出した。したがって、いくつかの実施形態では、本開示のミニ細胞はPlk1を含む。

【0125】

他の有用な標的は、DNA複製および修復に関与するものである。例えば、リボヌクレオシド5'-ニリン酸から、DNAの複製や修復に必要な対応する2'-デオキシリボヌクレオシド5'-三リン酸への転化を触媒するので、がんの治療標的となりうるリボヌクレオチドレダクターゼ（RR）などがある。D'Angiolellaら、2012を参照のこと。ヒトRRは2つのサブユニット、RRM1およびRRM2を含み、両方のサブユニットを標的とする機能性核酸は、本発明において有用である。本開示の発明者らは、RRM1 (siRRM1) を標的とするsiRNAがミニ細胞を送達すると、中皮腫および副腎皮質癌細胞増殖を強力に阻害することを示した。実施例10を参照。したがって、いくつかの実施形態では、ミニ細胞がリボヌクレオチドレダクターゼM1 (RRM1) 発現を阻害するsiRNAを含む。

30

【0126】

6. その他の抗腫瘍療法

本開示のCD1d拘束性iNKT抗原を含む、そのままの細菌由来の最小限の細胞または殺された細菌細胞による投与に有用な抗腫瘍療法には、放射線療法、外科的方法、養子細胞療法、酵素-プロドラッグ療法および微生物ベースの抗腫瘍療法のような、癌細胞死を誘導する非薬物療法も含まれる。

【0127】

例えば、いくつかの実施形態では、本開示のカプセル化CD1d拘束性iNKT抗原が標的放射線療法、定位放射線、光力学療法、マイクロ波熱アブレーション、冷凍アブレーション、高強度超音波、高周波アブレーション、レーザビーム照射、サイバーナイフ、および温熱腫瘍治療を含むがこれらに限定されない抗腫瘍療法と組み合わせて投与される。

50

【0128】

いくつかの実施形態において、本開示のカプセル化CD1d拘束性iNKT抗原は限定されるわけではないが、抗腫瘍プロドラッグ療法と組み合わせて投与され、これには指向酵素プロドラッグ療法（DEPT）、抗体指向酵素プロドラッグ療法（ADEPT）、遺伝子指向酵素プロドラッグ療法（GDEPT）、ウイルス指向酵素プロドラッグ療法（VDEPT）、ポリマー指向酵素プロドラッグ療法（PDEPT）、およびクロストリジウム指向酵素プロドラッグ療法（CDEPT）が含まれる。

【0129】

いくつかの実施形態では、本開示のカプセル化CD1d拘束性iNKT抗原がキメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法などの癌細胞死を誘導する養子細胞療法と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、CAR T細胞が腫瘍抗原に対するキメラ抗原受容体を含む。いくつかの実施形態において、CAR T細胞は、 α -葉酸受容体、B-細胞成熟抗原（BCMA）、カルボキシアニヒドラーゼ-IX（CEA）、癌胎児性抗原（CEA）、CD22、CD19、CD30、CD133、CLL-1、ジシアロガングリオシド（GD2）、EPH受容体A2、(EphA2)、上皮細胞接着分子、(EpCAM)、グリピカン-3（GPC3）、上皮成長因子受容体(EGFR)、EGFRvIII、線維芽細胞活性化タンパク質 α （FAP）、肝細胞成長因子受容体(c-Met)、ヒト上皮細胞増殖因子受容体-2（HER2）、IL13R α 2、L1細胞接着分子（L1-CAM）、メソテリン、ムチン（MUC-1）、PSCA、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、受容体型チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）、または血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）に対するキメラ抗原受容体を含む。いくつかの実施形態では、本開示のカプセル化CD1d拘束性iNKT抗原が、抗PD-1/PD-L1または抗CTLA-4抗体療法などの免疫チェックポイント療法と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態において、CAR T細胞は、抗PD-1/PD-L1または抗CTLA-4抗体を含む。

【0130】

いくつかの実施形態において、非薬物抗腫瘍療法は、上記の1つ以上の抗腫瘍剤に加えて投与される。抗腫瘍剤および治療法の任意の組み合わせは、抗腫瘍剤および／または治療法が癌細胞の死をもたらすことを条件として、開示された被包性CD1d拘束性iNKT抗原との投与に適している。

【0131】

III. CD1d拘束性iNKT細胞抗原の封入と抗腫瘍剤

本開示のCD1d拘束性iNKT抗原は、マクロファージおよび／または樹状細胞によって取り込まれ得る、そのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞を用いて抗原を封入することによって、食細胞に効果的に送達することができる。

【0132】

いくつかの実施形態では、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT抗原が、例えば、そのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞を用いて、同様にカプセル化された抗腫瘍剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT抗原は、抗腫瘍剤と組み合わせて投与され、ここで、CD1d拘束性抗原および抗腫瘍剤の両方は、そのままの細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞中にカプセル化される。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性抗原および抗腫瘍剤は、同じミニ細胞または殺された細菌細胞中にカプセル化される。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性抗原および抗腫瘍剤は、別々のミニ細胞または殺された細菌細胞中にカプセル化される。いくつかの実施形態では、カプセル化されたCD1d拘束性抗原がカプセル化されていない抗腫瘍剤とともに投与される。

【0133】

A. そのままの細菌由来ミニ細胞

「ミニ細胞」という用語はここでは染色体を欠き（「無染色体」）、二分裂の際に、細胞分裂とDNA分離との協調の乱れによって生じた細菌細胞の誘導体を意味するために用いられる。ミニ細胞はいわゆる「膜ブレブ」（大きさが約0.2 μ m以下）のような他の小さな小胞とは異なっている。この小胞が特定の状況下で自然に生成・放出されるが、特定の

遺伝子再編成やエピソーム遺伝子発現によるものではない。同じ理由によって、そのまま(無傷)のミニ細胞は細菌ゴーストとは区別される。細菌ゴーストは特異的な遺伝子再編成やエピソーム遺伝子発現のために生成されない。本開示で使用される細菌由来のミニ細胞は完全に無傷であり、したがって、破壊または分解され、除去さえされる外膜または画定膜によって特徴付けられる、他の無染色体形態の細菌細胞誘導体とは区別される。米国特許第7,183,105号、第111欄、第54行以降を参照されたい。本開示のミニ細胞を特徴付ける無傷の膜は、ペイロードが食細胞または腫瘍細胞内で取り込み後に放出されるまで、ミニ細胞内での治療用ペイロードの保持を可能にする。

【0134】

ミニ細胞またはEDVは正常な細菌細胞分裂を制御する遺伝子を不活性化し、それによって細胞の極性部位を脱抑制する結果として産生される無核の非生存ナノ粒子である。Maら、2004。脱抑制とは、細菌が中心および極で分裂することを意味し、本開示の発明者らが示したミニ細胞をもたらす極性分裂は様々な化学療法薬の効率的なパッケージングを可能にする漏出耐性のマイクロリザーバ担体として機能することができる。さらに、例えば、粒子当たり約14,000分子しかパッケージングできないDOXIL(リポソームドキソルビシン)のような現在のステルスリポソーム薬担体(Parkら、2002)、または5つ未満の薬物分子を運ぶことができる「武装抗体」とは対照的に、EDVは、100万までの薬物分子のペイロードを容易に収容することができる。さらに、EDVは二重特異性抗体を使用して癌細胞の表面上の過剰発現受容体を標的とすることができ(下記の部Dを参照)、これはインビトロおよびインビボの両方で、非常に有意な腫瘍増殖阻害および/または退行を可能にする。

【0135】

本発明で使用されるミニ細胞は、大腸菌およびネズミチフス菌などの細菌細胞から調製することができる。原核生物の染色体複製は、中細胞隔形成を含む、正常な二分裂に連結されている。たとえば大腸菌では、minCDのような最小遺伝子の変異によって、細胞分裂の際に細胞極での隔壁形成の阻害を取り除くことができ、その結果、正常な娘細胞と染色体のないミニ細胞が製造される。de Boerら、1992; Raskin & de Boer、1999; Hu & Lutkenhaus、1999; Harry、2001を参照されたい。

【0136】

ミニオペロン突然変異に加えて、例えば枯草菌のdivIVB1において、隔壁形成に影響を及ぼす他の一連の遺伝子再編成または突然変異に続いて、染色体のないミニ細胞も生成される。ReeveおよびCornett、1975を参照されたい。ミニ細胞はまた、細胞分裂/染色体分離に関与するタンパク質の遺伝子発現レベルの攪乱に続いて形成され得る。例えば、minEの過剰発現は、極性分裂およびミニ細胞の産生を導く。同様に、染色体のないミニ細胞は染色体分離の欠陥、例えば、枯草菌におけるsmc突然変異(*Bacillus subtilis*)(Brittonら、1998)、枯草菌におけるspo0J欠失(Iretonら、1994)、大腸菌におけるmukB突然変異(Hiragaら、1989)、および大腸菌におけるparC突然変異(StewartおよびD'Ari、199)に起因し得る。さらに、CafAは細胞分裂の速度を増強し得、そして/または複製後の染色体分配を阻害し得(Okadaら、1994)、連鎖細胞および染色体不含ミニ細胞の形成を生じる。

【0137】

したがって、ミニ細胞は任意の細菌細胞から本開示のために調製することができ、これらの細菌における細菌細胞分裂の保存された性質のため、グラム陽性またはグラム陰性起源である。さらに、本開示において使用されるミニ細胞は上記のように、無傷の細胞壁(すなわち、「そのままのミニ細胞」)を有するべきであり、そして特定の遺伝的再配置またはエピソーム遺伝子発現に起因しない、他の小胞(例えば、膜ブレブ)と区別され、そしてそれらから分離されるべきである。

【0138】

所与の実施形態において、ミニ細胞の親(供給源)細菌は、グラム陽性であり得るか、またはグラム陰性であり得る。一態様では、親細菌がテッラ-/グリドバクテリア(BV1)、

プロテオバクテリア(BV2)、スピロヘータ、スフィンゴバクテリアおよびプランクとバクテリアを含むBV4から1つ以上選択される。別の側面に追及すると、細菌は、桿菌、クロストリジウムまたはテネリクテス／モリキュートなどのファーミキューテス(BV3)、または放線菌またはビフィドバクテリウムなどの放線菌類(BV5)から選択される1つ以上である。

【0139】

本発明によれば、殺された細菌細胞は、Bergey's Manual Of Systematic Biologyの第2版に定義されているような、細菌、シアノバテリア、真正細菌および古細菌の非生存原核細胞である。このような細胞はそれらが無傷の細胞壁および／または細胞膜を有し、細菌種に内因性である遺伝物質（核酸）を含む場合、「無傷」と見なされる。殺された細菌細胞を調製する方法は、例えば米国特許出願公開第2008／0038296号に記載されている。

【0140】

さらに別の側面において、該細菌は、エオバクテリア（クロロフレキシ、デイノコッカスーサームス）、シアノバクテリア、サーモデスルフォバクテリア、サーモフルバクテリア（アキフィカ、サーモトガエ）、アルファ、ベータ、ガンマ（腸内細菌科）、デルタまたはエプシロンプロテオバクテリア、スピロヘータ、フィプロバクター、クロロビ／バクテロイデス、クラミジア／ベルコメクロビア、プランクトマイセス、アシドバクテリア、クリオゲネス、デフェリバクテリア、フソバクテリア、ゲムアチモナデテス、ニトロスピラ、シネルギステス、ディクチオグロミ、レンチスファエラ、バチルス、バシラス、リステリア、スタフィロエッカス、ラクトバシラレス、エンテロコッカス、ラクトバチルス、ロイコノストック、連鎖球菌、クロストリジウム、ハラナエロピアレス、サーモアナエロバクテラレス、マイコプラズマ、エントモプラズマ、アナエロプラズマテイルス、アコレプラズマテイルス、ハロプラズマテイルス、アクチノマイシネア、放線菌、コリネバクテリアセア、ノカルジア、コリネバクテリウム、フランキネア、フランキア、マイクロコンシネア、プレビバクテリウムおよびビフィドバクテリアセアである。

【0141】

薬学的使用のために、本開示の組成物は、免疫原性成分および他の毒性汚染物質から可能な限り完全に単離されたミニ細胞または殺された細菌細胞を含むべきである。遊離エンドトキシンおよび親細菌細胞を除去するために細菌由来のミニ細胞を精製するための方法論は、例えばWO 2004／113507に記載されている。精製プロセスは、(a) 一般に0.2 μmより小さい膜ブレブなどのより小さい小胞、(b) 細胞膜から放出される遊離エンドトキシン、および(c) 生きているか死んでいるかにかかわらず親細菌、および遊離エンドトキシンの供給源でもあるそれらの破片の除去を達成する。このような除去は、とりわけ、より小さい小胞および細胞残屑を除去するための0.2 μmフィルター、親細胞を誘導してフィラメントを形成した後に親細胞を除去するための0.45 μmフィルター、生きた細菌細胞を殺すための抗生物質、および遊離エンドトキシンに対する抗体を用いて実施することができる。

【0142】

精製手順の基礎はそれらの細菌供給源の差異にもかかわらず、全ての無傷のミニ細胞は約400nmのサイズであり、すなわち、膜小胞および他のより小さい小胞より大きく、そして親細菌より小さいという本発明者らによる発見である。ミニ細胞のサイズ決定は、電子顕微鏡法などの固体状態を使用することによって、または液体ベースの技術、例えば動的光散乱によって達成することができる。そのような各技法によってもたらされるサイズ値は誤差範囲を有する可能性があり、その値は、技法間でいくらか異なる可能性がある。したがって、乾燥状態のミニ細胞のサイズは、電子顕微鏡法によって約400nm ± 50nmと測定することができる。動的光散乱は、同じミニ細胞を約500nm ± 50nmのサイズであると測定することができる。また、薬物パッケージングされたりガンド標的ミニ細胞は、やはり動的光散乱を使用して、約400nm～600nm ± 50nmであると測定することができる。

【0143】

この散乱のサイズ値は、例えば上記のように、免疫原性成分および他の毒性汚染物質からミニ細胞を単離する目的のために、実際に容易に適応される。すなわち、そのままの細菌由来ミニ細胞は、ミニ細胞に堅い球状構造を与える堅い膜によって囲まれた細胞質を特徴とする。この構造は透過型電子顕微鏡写真で明らかであり、ミニ細胞の直径は硬い膜の外側の境界の間でミニ細胞を横切って測定される。この測定により、上述した $400\text{nm} \pm 50\text{nm}$ のサイズ値が得られた。

【0144】

殺された細菌細胞またはグラム陰性細菌に由来するミニ細胞のもう一つの構造要素はリポ多糖（LPS）のO-多糖成分であり、これはリポDアンカーを介して外膜に埋め込まれている。この成分は、鎖の反復単位当たり4〜5個の糖の70〜100個もの反復単位を有する反復炭水化物残基単位の鎖である。これらの鎖はインピボのように液体環境では剛性ではないので、サンゴ海環境で海藻の一般的な外観を与える波状の柔軟な構造をとることができる；すなわち、鎖は、ミニ細胞膜に固定されたままで液体と共に移動する。

10

【0145】

O-多糖成分の影響を受けて、動的光散乱は上記のように、約 500nm 〜約 600nm のミニ細胞サイズの値を与えることができる。それにもかかわらず、グラム陰性およびグラム陽性細菌由来のミニ細胞は同様に、 $0.45\mu\text{m}$ フィルターを容易に通過し、これは、 $400\text{nm} \pm 50\text{nm}$ の有効ミニ細胞サイズを実証する。上記の大きさのばらつきは、本発明に包含され、特に、「約 400nm の大きさ」などの語句における修飾語句「約」によって示される。

20

【0146】

毒性汚染物質に関して、本開示の組成物は、好ましくは約350 EU未満の遊離エンドトキシンを含む。これに関しての例示は、約250 EU以下、約200 EU以下、約150 EU以下、約100 EU以下、約90 EU以下、約80 EU以下、約70 EU以下、約60 EU以下、約50 EU以下、約40 EU以下、約30 EU以下、約20 EU以下、約15 EU以下、約10 EU以下、約9 EU以下、約8 EU以下、約7 EU以下、約6 EU以下、約5 EU以下、約4 EU以下、約3 EU以下、約2 EU以下、約1 EU以下、約0.9 EU以下、約0.8 EU以下、約0.7 EU以下、約0.6 EU以下、約0.5 EU以下、約0.4 EU以下、約0.3 EU以下、約0.2 EU以下、約0.1 EU以下、約0.05 EU以下、または約0.01 EU以下である。

30

【0147】

本発明の組成物はまた、少なくとも約 10^9 のミニ細胞または殺された細菌細胞を、例えば、少なくとも約 1×10^9 、少なくとも約 2×10^9 、少なくとも約 5×10^9 、または少なくとも約 8×10^9 含むことができる。いくつかの実施形態において、組成物は約 10^{11} 個以下のミニ細胞または殺された細菌細胞を、例えば約 1×10^{11} 以下、または約 9×10^{10} 以下、または約 8×10^{10} 以下含む。

【0148】

1. ミニ細胞または殺された細菌細胞への活性剤の装填

CD1d拘束性iNKT細胞抗原のような活性剤、または小分子薬物、タンパク質および機能性核酸のような抗腫瘍剤は、緩衝液中で複数の無傷のミニ細胞を活性剤と共にインキュベートすることによって、ミニ細胞に直接パッケージングすることができる。緩衝液組成は無傷のミニ細胞における活性物質の負荷を最適化するために、この分野で周知の条件の関数として変化させることができる。ローディングに適した例示的な緩衝液にはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれるが、これに限定されない。一旦包装されると、活性剤はミニ細胞内に残り、分解から保護される。

40

【0149】

核酸によってコードされ得る機能性核酸やタンパク質などの活性剤は、活性剤をコードするプラスミドなどのベクターを親細菌細胞に形質転換することによってミニ細胞に導入することができる。ミニ細胞が親細菌細胞から形成される場合、ミニ細胞は、プラスミドおよび／または発現産物、抗腫瘍剤の特定のコピーを保持する。ミニ細胞へのパッケージ

50

ングおよび発現産物のさらなる詳細は国際公開第2003/033519号パンフレットに提示され、その内容は参照によりその全体が本発明に組み込まれる。

【0150】

WO 2003/033519に提示されるデータは例えば、哺乳動物遺伝子発現プラスミドを保有する組換えミニ細胞が、食細胞および非食細胞に送達され得ることを実証した。国際公開第2003/033519号パンフレットはまた、エピソーム複製プラスミドDNA上に担持された異種核酸によるミニ細胞産生親細菌株の遺伝的形質転換を記載した。親生物とミニ細胞を分離すると、エピソームDNAの一部はミニ細胞に分離される。得られた組換えミニ細胞は哺乳類食細胞に容易に飲み込まれ、細胞内ファゴリソソーム内で分解されるようになった。さらに、組換えDNAの一部はファゴリソソーム膜を逃れ、哺乳類細胞核に輸送され、そこで組換え遺伝子が発現した。

10

【0151】

他の実施形態では、異なるmRNA標的に向けられた複数の核酸を、同じミニ細胞にパッケージングすることができる。このようなアプローチは、薬物耐性およびアポトーシス耐性と戦うために使用され得る。例えば、癌患者は日常的に化学療法薬に対する耐性を示す。このような耐性は、とりわけ、多剤耐性(MDR)ポンプおよび抗アポトーシス遺伝子のような遺伝子の過剰発現によって媒介され得る。この耐性に対抗するために、ミニ細胞は、MDR関連遺伝子に対する治療的に有意な濃度の機能性核酸と共にパッケージされることができ、そして化学療法の前患者に投与され得る。さらに、異なるmRNA標的に向けられた同じミニ細胞複数の機能性核酸へのパッケージングは、ほとんどの分子標的が突然変異を受け、複数の対立遺伝子を有するため、治療成功を高めることができる。ミニ細胞への核酸の直接パッケージングのさらなる詳細は国際公開第2009/027830号パンフレットに提供されており、その内容は、参照によりその全体が本発明に組み込まれる。

20

【0152】

小分子薬物は、親水性であろうと疎水性であろうと、ミニ細胞を含む細胞外培地とミニ細胞細胞質との間に薬物の濃度勾配を作り出すことによってミニ細胞中にパッケージングすることができる。細胞外培地がミニ細胞の細胞質よりも高い薬物濃度を含む場合、薬物は、この濃度勾配を下ってミニ細胞の細胞質に自然に移動する。しかし、濃度勾配が逆になると、薬物はミニ細胞から外に移動しない。例えば、米国特許出願公開第2008/0051469号(その内容は参照により特に援用される)に、薬物ローディングプロセスおよびその驚くべき性質のさらなる詳細が見出される。

30

【0153】

ミニ細胞に、通常は水溶性ではない薬物を装填するために、薬物は最初に、適切な溶媒に溶解され得る。例えば、パクリタキセルはエタノールとクレモフォアEL(ポリエトキシ化ヒマシ油)との1:1ブレンドに溶解し、続いてPBS中で希釈して、水性媒体中で部分的に希釈され、薬物が溶液中に残ることを確実にするために最小量の有機溶媒を担持するパクリタキセルの溶液を達成することができる。ミニ細胞は、薬物負荷のためにこの最終培地中でインキュベートすることができる。従って、本発明者らは疎水性薬物でさえ、ミニ細胞の細胞質または膜中に拡散して、高い、そして治療的に有意な細胞質薬物負荷を達成し得ることを発見した。これは、ミニ細胞膜が疎水性リン脂質二重層から構成されており、疎水性分子の細胞質への拡散を防止することが期待されるため、予想外である。代表的な低分子薬物の多様性のミニ細胞へのローディングが示されており、様々なサイズおよび化学的特性が示されている: ドキソルビシン、パクリタキセル、フルオロ-パクリタキセル、シスプラチン、ビンブラスチン、モンサトロール、チミジル酸シンターゼ(TS)阻害剤OSI-7904、イリノテカン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、およびカルボプラチン。さらに、ボードを横切って、得られた小分子薬物パッケージ化ミニ細胞は、インビトロおよびインビボで、有意な抗腫瘍効力を示す。

40

【0154】

2. 特定の哺乳類細胞および腫瘍へのミニ細胞の標的化

本発明者らは腫瘍細胞周囲の血管が完全性の喪失を示すことを発見した。すなわち、血

50

管は血液脳関門（BBB）環境においても、大きな開窓を有し、「漏れやすい」状態である。癌細胞が定着すると、新たな血管の形成を促進する物質（血管新生と呼ばれる過程）を分泌する。これらの血管は速やかに成長し、正常な血管とは異なり、50nmから1.2 μ m（透過性亢進血管系）の「穴」（開窓部）で漏れやすい。リポソームなどの薬物送達粒子は、現在、腫瘍微小環境を支持する漏出性血管系からの血管外遊出を含む受動的方法によって腫瘍標的化をもたらすと考えられている。Hobbsら、1998。異常な腫瘍微小環境は間質性高血圧を特徴とし、この現象が抗癌抗体治療薬のアクセスを制限し得ることが示されているが、これは免疫リポソーム（Nielsenら、2002）およびQuantum Dotsに結合体化された抗体（Gaoら、2004）によって例示されるように、絶対的な障壁であるとは思われない。この現象は、特異的に指向された腫瘍抗体を保有するという追加の利点を有するEDVにも当てはまる。静注後、EDVは腫瘍の微小環境に漏出し、その後、癌細胞表面受容体との結合およびエンドサイトーシスを介して能動的な標的化が行われる。したがって、従来の理解とは対照的に、ミニ細胞と同じ大きさ、すなわち、BBBの上記のコンセンサス孔径限界よりもはるかに大きい粒子は、それにもかかわらず、漏出性血管壁の開窓よりも小さく、したがって、これらの開窓を通して腫瘍微小環境に受動的に溢出することができる。

10

【0155】

ミニ細胞は腫瘍微小環境に入ると、マクロピノサイトーシスまたは宿主腫瘍細胞によるレセプター媒介内部移行を誘発し、それらに取り込まれることができる。したがって、抗腫瘍剤で包装されたミニ細胞は腫瘍細胞の細胞質中に薬剤を放出し、それを殺す。

20

【0156】

本開示のさらなる側面に従うと、抗腫瘍剤および／またはCD1d拘束性iNKT細胞抗原を含有するミニ細胞または殺された細菌細胞を、リガンドを介して標的哺乳動物腫瘍細胞に向けることができる。すなわち、リガンドは所与の小胞を標的細胞に結合させ、それによって後者が前者を飲み込むように、ミニ細胞および哺乳動物（腫瘍）細胞成分の両方に対して特異性を示す。ミニ細胞を腫瘍細胞に標的化するための二重特異性リガンドの使用は国際公開第2005/056749号パンフレットおよび国際公開第2005/079854号パンフレットにさらに記載されており、殺された細菌細胞を腫瘍細胞に標的化するための二重特異性リガンドの使用は、米国特許No. 8,591,862にさらに記載されている。このようなリガンドが小胞に付着すると、リガンドの非占有特異性（「単一特異性」）は、それが標的（腫瘍）哺乳動物細胞と相互作用するまで関係する。多数の腫瘍標的化リガンドが当該分野で公知である（Hongら、2011; Hoelderら、2012; Galluzziら、2013）。ソマトスタチン（SST）ペプチド、血管作動性腸ペプチド（VIP）、Arg-Gly-Asp（RGD）ペプチド、およびボンベシン／ガストリン放出ペプチド（BBN／GRP）などのいくつかのペプチドは腫瘍受容体イメージングについて首尾よく特徴付けられている（De Jongら、2009; Tweedle、2009; SchotteliusおよびWester、2009; Igarashiら、2011; Lavermanら、2012）。

30

【0157】

腫瘍標的化ペプチド配列は主に3つの異なる方法で選択され得る：（1）天然タンパク質からの誘導体化（Nagpalら、2011）；（2）化学合成および構造に基づく合理的工学（Anderssonら、2000; Merrifield、2006）；ならびに（3）ペプチドライブラリーのスクリーニング（GrayおよびBrown 2013）。これらの方法の中で、ファージディスプレイ技術は従来の方法であるが、最も広く使用されている方法であり、多くの利点（例えば、取り扱いの容易さ、および多数の異なるペプチドが効果的にスクリーニングされ得る（Deutscher、2010））。

40

【0158】

正常細胞ではなく腫瘍細胞に過剰発現している受容体は、インビボ腫瘍イメージングの優れた候補である。今日まで、多くの腫瘍標的化ペプチドおよびそれらの類似体が、以下に記載されるように同定されている。

【0159】

50

Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチド : RGDは、インテグリン受容体に特異的に結合する(Ruoslahti, 1996)。インテグリンは2つのサブユニット(α と β サブユニット)を構成する。インテグリンファミリー、特に $\alpha V \beta 3$ は、腫瘍の血管新生および転移と関連している。これらは血管新生時に内皮細胞上に過剰発現するが、ほとんどの正常器官ではほとんど検出できない。そのため、画像診断に広く用いられている。

【0160】

ボンベシン(BBN)／ガストリン放出ペプチド(GRP) : 二面性のBBNおよびそれらの関連ペプチドは外分泌および内分泌分泌、体温調節、ショ糖調節、ならびに細胞増殖などの様々な生理学的効果を示す神経ペプチドのファミリーからなる(Ohki-Hamazakiら、2005)。ボンベシン様ペプチド受容体には、ニューロメジンB受容体、ボンベシン3受容体、GRP受容体、ボンベシン4受容体の4つのサブタイプがある。これらの受容体は、乳癌、卵巣癌および消化管間質腫瘍などの多くの腫瘍において過剰発現される。

【0161】

コレシストキニン(CCK)／ガストリンペプチド : CCKおよびガストリンは構造的および機能的に類似したペプチドであり、胃腸管ならびに中枢神経系において様々な生理学的作用を発揮する(Matsunoら、1997)。CCKに対する3種類の受容体(CCK1、CCK2、CCK2i4sv)が同定されており、いずれもGPCRのスーパーファミリーに属している。中でもCCK2／ガストリン受容体は、間質性卵巣癌および星状細胞腫などのヒト癌において頻繁に見出されている。

【0162】

α -メラニン細胞刺激ホルモン(α -MSH) : α -MSHは直鎖状トリデカペプチドであり、主に皮膚色素沈着調節を担っている(Singh and Mukhopadhyay, 2014)。 α -MSHとその類似体はヒトメラノーマ転移の80%以上に発現するメラノコルチン-1受容体(MC-1r)に結合親和性を示し、メラノーマ標的イメージングと放射線療法の媒体として広く使用されている。

【0163】

ニューロペプチドY(NPY) : NPYは36アミノ酸ペプチドであり、膵臓ポリペプチドファミリーに属する(Tatemoto, 2004)。NPY受容体は、神経芽細胞腫、肉腫、および乳癌を含む様々な腫瘍において過剰発現される。

【0164】

ニューロテンシン(NT) : NTは13アミノ酸ペプチドで、膵管腺癌、小細胞肺癌、甲状腺髄様癌など様々な腫瘍で同定されているNT受容体を標的としている(Tyler-McMahonら、2000)。したがって、それは癌イメージングのための魅力的な候補である。

【0165】

前立腺特異的膜抗原(PSMA) : 前立腺癌細胞は、細胞表面上でPSMAを過剰発現する(Silverら、2007; Ghosh and Heston, 2004; Mhawech-Faucegliaら、2007; Santoni et al, 2014)。 $[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-PSMA-HBED-CC}$ ($[^{68}\text{Ga}] \text{Ga-PSMA-11}$ [PET]としても知られている)、モノクローナル抗体(mAb) $[^{177}\text{Lu}] \text{Lu} / [^{90}\text{Y}] \text{Y-J591}$ (治療)、 $[^{123}\text{I}] \text{I-MIP-1072}$ (平面/SPECT)、 $[^{131}\text{I}] \text{I-MIP-1095}$ (治療)、ならびに治療のために ^{68}Ga で標識された、PETまたは ^{177}Lu で標識されたセラノスティック剤PSMA-I&TおよびDKFZ-PSMA-617 (PSMA-617)を含む、PSMAを標的とするいくつかの利用可能な放射性医薬品がある。

【0166】

ソマトスタチン(SST)ペプチド : SSTは14または28アミノ酸のいずれかを有する天然に存在するシクロペプチドホルモンである(Weckbeckerら、2003)。インスリン、グルカゴン、その他のホルモンの分泌を阻害することができる。ソマトスタチン受容体(SSTR; 5つのサブタイプSSTR1~SSTR5)は、神経膠腫、神経内分泌腫瘍および乳房腫瘍を含む多くの腫瘍において過剰発現される。GEP系の神経内分泌腫瘍(NEN)は、膵臓、空腸、回腸、盲腸、直腸、虫垂、結腸に由来することが最も多い。すべてのGEP-NENに共通する特徴は、内分泌細胞と神経細胞の複合的な特徴である。高分化型NENはソマト

10

20

30

40

50

スタチン受容体（SSTR）、特にSSTR - 2サブタイプを過剰発現する。

【0167】

サブスタンスP：サブスタンスPは、タキキニン（Strand、1999）として知られる神経ペプチドファミリーに属するウンデカペプチドである。サブスタンスPはニューロキニン1受容体（NK1R）に知られる特異的な内因性リガンドであり、様々な癌細胞に発現していることがわかっている。

【0168】

T140：T140は1つのジスルフィド架橋を有する14アミノ酸ペプチドであり、ケモカイン受容体4型（CXCR4）の逆アゴニストである（Burgerら、2005）。その誘導体はCXCR4造影剤として広く使用されている。

【0169】

腫瘍分子標的ペプチド1（TMTP1）：TMTP1は高転移性癌細胞、特に典型的な肝微小転移由来の癌細胞に特異的に結合することが見出されている5アミノ酸ペプチドである（Yangら、2008）。

【0170】

血管作動性腸ペプチド（VIP）：VIPは28アミノ酸を有する神経ペプチドである（Igarashiら、2011）。血管拡張、細胞増殖を促進する。その作用は主に2つの受容体サブタイプ（VPAC1とVPAC2）によって制御されている。多量のVIP受容体がすい臓の腺癌や神経内分泌腫瘍を含む多くの腫瘍に発現している。

【0171】

リガンドは、リガンドと、多糖類、糖タンパク質、またはポリペプチドなどの細胞膜上の成分との間の相互作用によって小胞の細胞膜に付着させることができる。発現されたリガンドは、リガンドの腫瘍表面成分結合部分が露出されるように小胞の表面上に固定され、その結果、小胞と哺乳動物腫瘍細胞とが接触すると、その部分が標的哺乳動物細胞表面受容体に結合することができる。

【0172】

あるいは、リガンドが細菌由来の小胞の生きた対応物、例えばミニ細胞の親細胞によって、あるいは殺された細胞になる前に細菌細胞によって発現され、提示される。この場合、このリガンドは、小胞に対する特異性を必要とせず、哺乳動物細胞に特徴的な成分に対してのみ特異性を提示する。すなわち、このような成分は腫瘍細胞がその表面に存在する限り、腫瘍細胞自体に、または治療中の特定の種類の腫瘍細胞にさえも特異的である必要はない。

【0173】

静脈内投与すると、小胞は腫瘍微小環境に急速に蓄積する。上記の漏出性腫瘍血管系の関数として生じるこの蓄積は小胞パッケージング治療ペイロードの腫瘍細胞への送達をもたらす、次いで、これはパッケージング小胞を内在化する。

【0174】

本発明者らは、この送達アプローチが通常、ミニ細胞の特異的接着およびエンドサイトーシスに対して抵抗性である細胞を含む、一連の哺乳動物腫瘍細胞に適用可能であることを見出した。例えば、抗HER2レセプターまたは抗EGFレセプターに向けられる抗体を含むリガンドは、肺、卵巣、脳、乳房、前立腺、および皮膚癌細胞のような一連の標的非貪食細胞上のそれぞれのレセプターにミニ細胞を結合することができる。

【0175】

こうして達成された結合は、それぞれのタイプの非貪食細胞による小胞の取り込みに先行する。すなわち、本発明の文脈において、適切な標的細胞は細胞表面受容体を提示し、その結合は、小胞上のリガンドによって、その小胞のエンドサイトーシスを誘発する。

【0176】

より具体的には、本発明者らが（a）ミニ細胞または殺された細菌細胞上のリガンドと、（b）哺乳動物細胞表面レセプターとの間の相互作用が本明細書において「レセプター媒介エンドサイトーシス」（rME）経路と呼ばれる、腫瘍細胞などの標的宿主細胞の後期工

10

20

30

40

50

ンドソーム／リソソーム区画への取り込み経路を活性化することができることを発見した。このrME経路によって、本発明者らは、細菌由来の小胞が初期エンドソーム、後期エンドソームおよびリソソームを通して処理され、哺乳動物宿主細胞の細胞質へのそれらのペイロードの放出を生じることを見出した。さらに、核酸であるペイロードは、後期エンドソーム／リソソームコンパートメントにおいて完全な分解を逃れるだけでなく、宿主細胞によっても発現される。

【0177】

この送達アプローチのための腫瘍標的リガンドはペイロード運搬小胞上の表面成分および標的細胞上の表面成分にそれぞれ結合し、後者の成分とのその相互作用がrME経路への小胞の取り込みを導くので、上記のように「二重特異性」であり得る。いずれにしても、本発明によれば、成分との相互作用が標的細胞表面からの細胞質内在化を伴うエンドサイトーシス経路に実質的にアクセスする場合、所与の標的細胞表面レセプターは、リガンドによる結合の候補であり得る。このような候補は候補成分をその表面上に提示する細胞型が候補を結合するリガンドを担持するミニ細胞とインビトロで共インキュベートされ、そしてまた、例えば、共焦点顕微鏡を介して視覚的に、検出に従う蛍光色素または他のマーカーに結合される評価を介して、本発明における適合性について容易に評価される。この種のインビトロ評価はMacDiarmidら、2007bにより、436頁の図3の凡例に記載されている。したがって、マーカーの観察された内部移行は、試験された標的細胞表面受容体が本発明に適しているような評価による陽性指標を構成する。

【0178】

本発明によれば、リガンドは、所望の特異性または特異性を示す任意のポリペプチドまたは多糖であり得る。好ましいリガンドは抗体である。本使用において、用語「抗体」は免疫原性応答のインビトロまたはインビボ生成によって得られる免疫グロブリン分子を包含し、従って、「抗体」カテゴリーはモノクローナル抗体およびヒト化抗体（例えば、一本鎖抗体フラグメント（scFv）、二重特異性抗体など）を包含する。Caravella and Lugovskoy、2010の総説記事によって証明されるように、多数の異なる二重特異性タンパク質および抗体ベースのリガンドが知られている。本開示に従って有用な抗体は、公知の組換えDNA技術によって得ることができる。

【0179】

したがって、非限定的な例として、腫瘍抗原などの表面成分に対する特異性を有する抗体を使用して、治療される腫瘍中の細胞にミニ細胞を標的化することができる。この点における例示的な細胞表面受容体にはRTKである上皮成長因子受容体（EGFR）、血管内皮成長因子受容体（VEGFR）、血小板由来成長因子受容体（PDGFR）およびインスリン様成長因子受容体（IGFR）のいずれかが含まれ、これらのそれぞれは脳腫瘍を含むいくつかの固形腫瘍において高度に発現され、葉酸受容体はいくつかの下垂体腺腫において過剰発現される。このような二重特異性リガンドは突然変異型または変異型受容体、例えば、ヒト神経膠芽腫多形腫瘍の50%～80%において発現されるIL-13R α 2受容体を標的とすることができる（Wykoskyら、2008; Jarboeら、2007; Debinskiら、2000; およびOkadaら、1994を参照のこと）が、正常組織において発現されるその生理学的対応物IL4R／IL13Rとは異なる。Hershey、2003を参照されたい。したがって、IL13R α 2は正常な脳細胞には実質的に存在しない。Debinski and Gibo、2000を参照。さらに、脳に転移する腫瘍はある種の受容体を過剰発現する可能性があり、これもまた適切な標的となり得る。例えば、Da Silvaら、2010は、乳癌の脳転移がRTKのHERファミリーの全てのメンバーを発現することを示した。脳転移の20%でHER2が増幅・過剰発現、脳転移の21%でEGFRが過剰発現、脳転移の60%でHER3が過剰発現、脳転移巣の22%でHER4が過剰発現していた。興味深いことに、HER3発現は脳に存在する乳癌細胞で増加していた。

【0180】

標的細胞表面レセプター候補の例示はレセプター型チロシンキナーゼまたは「RKT」のメンバーである。RKTは膜貫通タンパク質のファミリーであり、他の膜内在性タンパク質と同様の速度で構成的内部移行（エンドサイトーシス）を行う。Goh and Sorkin、2013

を参照のこと。RKTのファミリーは、Lemmon and Schlessinger、Cell、141 (7) : 1117-134 (2010) に記載されている。例示的なRTKは、ErbB EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 Ins InsR、IGF1R、InsRR PDGF PDGFR α 、PDGFR β 、CSF1R/Fms、Kit /SCFR、Fit3/Flk2 VEGF VEGFR1/Fit1、VEGFR2/KDR、VEGFR3/Fit4 FGF FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4 PTK7 PTK7/CCK4 Trk TrkA、TrkB、TrkC Ror Ror1、Ror2 MuSK Met、Ron Axl、Mer、Tyro3 Tie Tie1、Tie2 Eph EphA1-8、EphA10、EphB1-4、EphB6 Ret Ryk DDR DDR1、DDR2 Ros LMR LMR1、LMR2、LMR3 ALK、LTK STYK1 SuRTK106/STYK1である。

【0181】

適切な標的細胞表面受容体に適した別の候補は膜関連、高い親和性葉酸結合タンパク質（葉酸受容体）のファミリーであり、これは葉酸および還元型葉酸誘導体と結合し、テトラヒドロ葉酸の細胞内部への送達を媒介する；IL13などの同族サイトカインの内部移行に役割を果たす膜結合サイトカイン受容体のファミリー；特定の癌細胞上に発現し、同族モノクローナル抗体、例えばCD20の例でリツキシマブの内部移行を媒介するCD20、CD33、メソテリンおよびHM1.24などの表面抗原；およびエンドソーム経路を通して輸送され、癌細胞接着の主要メディエーターである接着受容体ファミリー（インテグリン）である。本発明の1つの実施形態において、腫瘍細胞表面受容体は、インテグリン、ニューロメジンB受容体、ボンベシン3受容体、GRP受容体、ボンベシン4受容体、CCK2／ガストリン、メラノコルチン-1受容体（MC-1r）、ニューロペプチドY(NPY)受容体、ニューロテンシン（NT）受容体、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、ソマトスタチン（SST）受容体、ニューロキニン1受容体（NK1R）、ケモカイン受容体式4（CXCR4）、血管作動性腸ペプチド（VIP）、上皮成長因子受容体（EGFR）、血管内皮成長因子受容体（VEGFR）、血小板由来成長因子受容体（PDGFR）、インスリン様成長因子受容体(IGFR)またはそれらの組み合わせである。

【0182】

本発明の別の実施形態によれば、細胞表面レセプターは疾患状態において標的細胞上で独特に発現されるが、発現されないままであるか、低いレベルで発現されるか、または健康な状態において接近不可のいずれかである抗原である。本発明の標的リガンドによって特異的に結合され得るこのような標的抗原の例は、有利にはEpCAM、CCR5、CD19、HER-2 neu、HER-3、HER-4、EGFR、PSMA、CEA、MUC-1（ムチン）、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC5、MUC7、Bhcg、Lewis-Y、CD20、CD33、CD30、ガングリオシドGD3、9-O-アセチルGD3、GM2、グロボH、フコシルGM1、ポリSA、GD2、カルボアンヒドラーゼIX(MN/CA IX)、CD44v6、ソニックヘッジホッグ（Shh）、Wue-1、形質細胞抗原、（膜結合）IgE、メラノマ、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（MCSP）、CCR8、TNF- α 前駆体、STEAP、メソセリン、A33抗原、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、Ly-6、デスモグレイン4、E-カドヘリンネオエピトープ、胎児アセチルコリン受容体、CD25、CA19-9マーカーおよびミューラー管障害物質（MIS）受容体タイプII、sTn（シアリル化Tn抗原；TAG-72）、FAP（線維芽細胞活性化抗原）、エンドシアリン、EGFRVIII、LG、SASおよびCD63から選択され得る。

【0183】

3. 純度

本発明のミニ細胞は、汚染親細菌細胞を実質的に含まない。したがって、ミニ細胞含有製剤は、好ましくは 10^7 ミニ細胞当たり約1未満の汚染親細菌細胞、 10^8 ミニ細胞当たり約1未満の汚染親細菌細胞、 10^9 ミニ細胞当たり約1未満の汚染親細菌細胞、 10^{10} ミニ細胞当たり約1未満の汚染親細菌細胞、または 10^{11} ミニ細胞当たり約1未満の汚染親細菌細胞を含む。

【0184】

ミニ細胞を精製する方法は当該分野で公知であり、そしてPCT/IB02/04632に記載される。1つのこのような方法は、クロスフロー濾過（供給流は膜表面に平行である；Forbes, 1987）およびデッドエンド濾過（供給流は膜表面に垂直である）を組み合わせる。

必要に応じて、濾過の組み合わせの前に、細菌細胞のいくつかの部分除去し、それによってミニ細胞について上清を濃縮するために、低遠心力での差動遠心分離を行うことができる。

【0185】

別の精製方法は、生物学的に適合性の媒体中で密度勾配遠心分離を用いる。遠心分離後、ミニ細胞バンドを勾配から収集し、任意に、ミニ細胞をさらなるラウンドの密度勾配遠心分離に供して、純度を最大にする。本方法は、ミニ細胞含有試料に対して分画遠心分離を実施する予備工程をさらに含むことができる。低遠心力で実施される場合、示差遠心分離は親細菌細胞のいくつかの部分除去し、それによって、ミニ細胞について上清を濃縮する。

10

【0186】

特に有効な精製方法は、ミニ細胞純度を増加させるために細菌フィラメント化を利用する。従って、ミニ細胞精製方法は (a) ミニ細胞を含む試料を、親細菌細胞が糸状形態をとるように誘導する条件に供し、続いて (b) 試料を濾過して精製ミニ細胞調製物を得る工程を包含し得る。

【0187】

公知のミニ細胞精製方法を組み合わせることもできる。方法の1つの非常に有効な例示的な組み合わせは、以下の通りである：

工程A：ミニ細胞産生細菌細胞培養物の分化遠心分離。この工程は2,000gで約20分間行うことができ、上清中にミニ細胞を残しながら、ほとんどの親細菌細胞を除去する；

20

工程B：等張および非毒性密度勾配媒体を使用する密度勾配遠心分離。この工程はミニ細胞の損失を最小限に抑えながら、親細菌細胞を含む多くの汚染物質からミニ細胞を分離する。好ましくは、この工程は精製方法内で繰り返される；

工程C：親細菌細胞汚染をさらに減少させるために、0.45 μm フィルターを通したクロスフロー濾過；

工程D：残存親細菌細胞のストレス誘導性フィラメント形成。これは、ミニ細胞懸濁液をいくつかのストレス誘導環境条件のいずれかに曝すことによって達成され得る；

工程E：親細菌細胞を死滅させるための抗生物質処理；

工程F：膜プレブ、膜断片、細菌残屑、核酸、培地成分などの小さな汚染物質を除去し、ミニ細胞を濃縮するためのクロスフロー濾過。ミニ細胞を小さな汚染物質から分離するために、0.2 μm フィルターを使用することができ、ミニ細胞を濃縮するために、0.1 μm フィルターを使用することができる；

30

工程G：糸状の死んだ細菌細胞を除去するためのデッドエンド濾過。この工程のために0.45 μm フィルターを使用することができる；および

工程H：ミニ細胞調製物からのエンドトキシンの除去。抗脂質A被覆磁性ビーズをこの工程に用いることができる。

【0188】

IV. 製剤

本発明はその範囲内に、CD1d拘束性iNKT細胞抗原（例えば、 α -GalCer）をカプセル化するそのまの細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞を含む組成物または製剤を含む。いくつかの実施形態では、製剤がCD1d拘束性iNKT細胞抗原を単独で、または抗腫瘍剤と組み合わせて含む、細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞を含む。いくつかの実施形態では、製剤がCD1d拘束性インバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞抗原を含むそのまの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞、および抗腫瘍剤を含む細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞を含む。例えば、(a) CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤は同じミニ細胞または殺された細菌細胞内で構成され得る；または (b) CD1d拘束性iNKT細胞抗原が第1のミニ細胞または殺された細菌細胞内で構成され得るし、抗腫瘍剤は、第2のミニ細胞または殺された細菌細胞内で構成され得る。

40

【0189】

例示的な実施形態では本明細書に開示される組成物がCD1d拘束性iNKT細胞抗原 α -ガ

50

ラクトシルセラミド (α -GalCer) および抗腫瘍剤を含み、 α -GalCerおよび抗腫瘍剤は1つ以上のそのままの細菌由来ミニ細胞内に含まれる。例示的な実施形態では本明細書に開示される組成物がCD1d拘束性iNKT細胞抗原 α -GalCerおよび抗腫瘍剤ドキシルビシンを含み、 α -GalCerおよびドキシルビシンは1つ以上のそのままの細菌由来ミニ細胞内に含まれる。

【0190】

いくつかの実施形態では、製剤はまた、任意選択で、ミニ細胞を標的細胞に標的化するための少なくとも1つの二重特異性リガンドを含む。ミニ細胞およびリガンドは、本明細書に記載されるもののいずれであってもよい。したがって、本発明の二重特異性リガンドは、そのままの細菌由来ミニ細胞の表面成分および標的哺乳動物細胞の表面成分に結合することができる。

10

【0191】

ミニ細胞、または殺された細菌細胞、薬物（例えば、少なくとも1つの抗腫瘍剤）および場合により本発明の二重特異性リガンド（すなわち、このようなミニ細胞、または殺された細菌細胞、薬物、および組成物の薬物または薬物送達品質を過度に妨害しない他の成分を有するリガンドを含む製剤）を含む製剤は、1つ以上の薬学的に許容される担体または賦形剤を使用して、従来の様式で製剤化することができる。

【0192】

本開示の製剤または組成物は単位投薬形態で、例えば、アンプルまたはバイアルで、または複数用量容器で、添加された防腐剤の有無にかかわらず、提示することができる。処方物は油性または水性ビヒクル中の溶液、懸濁液、またはエマルジョンであり得、そして処方剤（例えば、懸濁剤、安定剤および／または分散剤）を含み得る。適切な溶液はレシipientの血液と等張であり、生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロース溶液によって例示される。あるいは、製剤が適切なビヒクル、例えば、無菌の発熱物質を含まない水または生理食塩水で再構成するために、凍結乾燥粉末形態であり得る。製剤はまた、デポー製剤の形態であってもよい。このような長時間作用性処方物は移植（例えば、皮下または筋肉内）によって、または筋肉内注射によって投与され得る。いくつかの実施形態では、投与することは経腸または非経口投与を含む。いくつかの実施形態では、投与することは経口、頬側、舌下、鼻腔内、直腸、膺、静脈内、筋肉内、および皮下注射から選択される投与を含む。

20

30

【0193】

いくつかの態様において、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原の免疫原性有効量を含む組成物が準備される。本明細書において使用される場合、「免疫原性有効量」とは免疫応答を誘発するのに十分な抗原の量を指す。CD1d拘束性のiNKT細胞抗原との関連において、免疫原学的に有効な量は、iNKT細胞応答を十分に活性化する抗原の量である。免疫原としてのCD1d拘束性iNKT細胞抗原の有効性は例えば、投与後のサイトカイン（例えば、IFN γ ）産生の増加を測定することによって評価され得る。

【0194】

いくつかの側面において、治療有効量の抗腫瘍剤を含む組成物が提供される。抗腫瘍剤の「治療有効」量は本開示に従って、被検体に投与された場合に薬理的応答を引き起こす、問題の薬剤、例えば、siRNAまたは超細胞傷害性薬剤の投薬量である。

40

【0195】

従って、本開示の文脈において、治療有効量は以下にさらに記載されるように、動物モデルまたはヒト被験体のいずれかにおいて、治療ペイロードを有する細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞が投与される場合に、腫瘍または腫瘍の症状の予防または改善を参照することによって測定され得る。所与の例（例えば、特定の被験体）における「治療有効量」を証明する量は、たとえそのような投薬量が熟練した実施者によって「治療有効量」と見なされても、腫瘍について同様に処置される被験体の100%に対して有効ではないかもしれない。この点に関する適切な用量はまた、例えば、腫瘍の型、段階、および重症度の関数として変化する。

50

【0196】

医薬組成物中のミニ細胞または殺された細菌細胞の数を指すために「治療的に有効」が使用される場合、その数は、どの抗腫瘍剤がミニ細胞または殺された細菌細胞中にパッケージングされるか、および腫瘍を処置する際のその薬剤の効力に基づいて確認され得る。この点において、治療効果は、腫瘍塊などの臨床的または病理学的パラメーターを用いて測定することができる。従って、腫瘍質量の減少または減少した増加は、治療効果を測定するために使用され得る。

【0197】

V. 管理ルート

本発明の製剤は局所的または全身的のいずれかで、所望の治療効果を達成するために、種々の経路を介して、および哺乳動物体内の種々の部位に投与され得る。送達例えば、経口投与によって、体腔への製剤の適用によって、吸入または通気によって、または非経口、筋肉内、静脈内、門脈内、肝臓内、腹腔内、皮下、腫瘍内、または皮内投与によって達成され得る。カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤は、同じ経路によって、または異なる投与経路によって投与することができる。例えば、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原は全身的に投与され得、そして抗腫瘍剤は局所的に投与され得る。いくつかの実施形態において、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤の両方が、全身的に投与される。

【0198】

投与の様式および部位は、標的細胞の位置に依存する。例えば、封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原を取り込む標的食細胞は、腫瘍微小環境および肝臓脾臓およびリンパ節に関連する脈管構造の両方で見出すことができる。従って、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、標的化および／または非標的化細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞を介して送達され得る。

【0199】

抗腫瘍剤はまた、標的化および／または非標的化方法を介して投与され得る。例えば、腫瘍転移は標的化された組成物の静脈内または腹腔内送達（例えば、標的化された細菌由来ミニ細胞の静脈内または腹腔内送達）を介して、より効率的に処置され得る。経路の組み合わせもまた、使用され得る。例えば、細胞傷害性薬物負荷および受容体標的ミニ細胞を静脈内と同様に局所投与し、封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原（受容体標的または非標的）ミニ細胞を静脈内投与することができる。標的化された、薬物パッケージングされたミニ細胞の投与は表面露出腫瘍を標的とし得るが、静脈内投与されたミニ細胞の完全な組合せは組織局在腫瘍を標的とし得、また抗腫瘍免疫応答を誘発し得る。

【0200】

VI. 管理スケジュール

一般に、本明細書に開示される製剤は任意の潜在的な毒性を最小限にしながら、最適な生理学的効果を得るために、日常的な試験によって規定される適切な用量で使用され得る。用法は、患者の年齢、体重、性別、医学的状态；治療される状態の重症度、投与経路、および患者の腎機能および肝機能を含む様々な因子に応じて選択され得る。

【0201】

封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および薬物の濃度を、最小の副作用で最大の有効性をもたらす範囲内で達成する際の最適な精度は、封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原の動態および標的部位および標的細胞に対する抗腫瘍薬の利用可能性に基づくレジメンを必要とし得る。封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍薬の分布、平衡、および排除は、治療レジメンのための最適濃度を決定する際に考慮され得る。カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍薬の用量は、組み合わせて使用される場合、所望の効果を達成するために調節され得る。

【0202】

さらに、製剤の用量投与は、薬物動態学的／薬力学的モデリングシステムを用いて最適化することができる。例えば、1つ以上の投薬レジメンが選択され得、そして薬物動態学

的／薬力学的モデルが、1つ以上の投薬レジメンの薬物動態学的／薬力学的プロフィールを決定するために使用され得る。次に、特定の薬物動態学的／薬力学的プロフィールに基づいて所望の薬物動態学的／薬力学的応答を達成する投与のための投薬レジメンの1つが選択され得る。例えば、WO 00/67776を参照のこと。

【0203】

具体的には、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍薬の製剤が数週間にわたって週に少なくとも1回投与することができる。一実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍薬をカプセル化した製剤が週に少なくとも1回、数週間～数ヶ月にわたって投与される。カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原および1つ以上の抗腫瘍薬を、同時に、連続的に、または断続的に、規定された間隔で投与することができる。

10

【0204】

より具体的には、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍薬の製剤が1日に少なくとも1回；約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、または約31日にわたって投与することができる。あるいは、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍薬の製剤が毎日約1回；約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30日または約31日以上にわたって1回投与され得る。

20

【0205】

カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍薬の製剤は代わりに、毎週約1回；約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20週間以上にわたって、約1回投与され得る。あるいは、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍薬の製剤が週に少なくとも1回；約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20週間以上にわたって投与され得る。

【0206】

カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍薬の製剤は代わりに、毎週約2回；約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20週間またはそれ以上にわたって約2回投与され得る。あるいは、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍薬の製剤が週に少なくとも1回；約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20週間以上にわたって投与され得る。

30

【0207】

あるいは、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原および／または抗腫瘍薬の製剤が約1ヶ月に1回、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月または約12ヶ月またはそれ以上毎に約1回投与され得る。

40

【0208】

なお、1日1回投与とするか、1日の総投与量を1日2回、3回または4回に分けて投与する。

【0209】

抗悪性腫瘍剤投与後に封入型CD1d拘束性iNKT細胞抗原を投与する方法では、封入型CD1d拘束性iNKT細胞抗原投与後数分から数時間のいずれの時期にも抗悪性腫瘍剤の投与が行われる可能性がある。抗腫瘍薬は、封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原の数時間から数日、おそらくは数週間から数ヶ月後までの任意の時期に投与され得る。

【0210】

50

より具体的には、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原が、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23または約24時間、抗腫瘍剤の後に投与され得る。さらに、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30または約31日抗腫瘍剤の投与の後に投与され得る。さらに別の実施形態において、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20週間以上、抗腫瘍剤の後に投与され得る。さらなる実施形態において、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11または約12ヶ月、抗腫瘍剤の後に投与され得る。

【0211】

抗腫瘍剤の投与前に封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原を投与する方法において、封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原の投与は、封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原の投与の数分から数時間前まで、いつでも起こり得る。抗腫瘍薬は、封入されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原の数時間から数日、おそらくは数週間から数カ月前までの任意の時期に投与され得る。

【0212】

より具体的には、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原が、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23または約24時間、抗腫瘍剤の前に投与され得る。さらに、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、抗腫瘍剤の投与の少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30または約31日、前に投与され得る。さらに別の実施形態において、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20週間またはそれ以上、抗腫瘍剤の前に投与され得る。さらなる実施形態において、カプセル化CD1d拘束性iNKT細胞抗原は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11または約12ヶ月、抗腫瘍剤の前に投与され得る。

【0213】

VII. 癌を治療する方法

本明細書中に記載される組成物は、癌に罹患している被検体を治療するために使用され得る。本明細書に開示される方法は、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤または治療法をカプセル化する、そのままの細菌由来のミニ細胞または殺された細菌細胞を含む組成物の免疫原性有効量を被験体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原がそのままの細菌由来ミニ細胞に含まれる。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤が1つ以上のそのままの細菌由来ミニ細胞に含まれる。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤が別々のそのままの細菌由来ミニ細胞に含まれる。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤が同じそのままの細菌由来ミニ細胞に含まれる。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原がカプセル化されたそのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞は、抗腫瘍剤または治療とは別に投与される。いくつかの実施形態では、CD1d拘束性iNKT細胞抗原および抗腫瘍剤が同じそのままの細菌由来ミニ細胞に含まれる。いくつかの実施形態において、CD1d拘束性iNKT細胞抗原をカプセル化したそのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞は、抗腫瘍剤または治療と同時に投与される。いくつかの実施形態では、抗腫瘍剤と同じ組成で、CD1d拘束性iNKT細胞抗原を封入したそのままの細菌由来ミニ細胞または殺された細菌細胞を投与する。いくつかの実

施形態ではCD1d拘束性iNKT細胞抗原をカプセル化したそのまの細菌由来のミニ細胞、または殺された細菌細胞は抗腫瘍剤と別々の組成物として投与される。別の側面において、癌に罹患している被験体を処置するために使用される、カプセル化されたCD1d拘束性iNKT細胞抗原または抗腫瘍剤を含む組成物は、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む。

【0214】

別の側面において、本明細書中に開示される方法は癌に罹患している被験体を処置するために有用であり、ここで、被験体は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ウサギ、マウス、またはラットである。

【0215】

別の側面において、本明細書中に開示される方法は、癌疾患を治療するために有用である。いくつかの実施形態では癌は肺癌、乳癌、脳癌、肝臓癌、結腸癌、膵臓癌、または膀胱癌を含む。

【0216】

いくつかの実施形態において、がんは、急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；副腎皮質がん、エイズ関連のがん、エイズ関連リンパ腫；肛門がん、虫垂がん、星細胞腫；非定型奇形腫瘍／ラブドイド腫瘍、基底細胞癌、膀胱がん；脳腫瘍（脳幹グリオーマ、中枢神経系非定型奇形腫瘍／ラブドイド腫瘍、中枢神経系胚芽腫、星細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽細胞腫、上衣腫、髄芽腫、髄上皮腫、松果体実質腫瘍を含む）、上原始神経外胚葉性腫瘍および松果体芽腫、乳癌、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、部位不明の癌、カルチノイド腫瘍、部位不明の癌腫、中枢神経系非定型奇形腫／ラブドイド腫瘍、中枢神経系胚芽腫、子宮頸癌、小児がん、脊索腫、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脊髄増殖性障害、大腸がん、結腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、内分泌膵島細胞腫瘍、子宮内膜癌、上衣芽細胞腫、上衣腫、食道癌、感覚神経芽腫、ユーイング肉腫、頭蓋外生殖細胞腫瘍、性腺外生殖細胞腫瘍、肝外胆管がん、胃（胃）がん、消化管カルチノイド腫瘍、胃腸間質細胞腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、妊娠栄養芽層の腫瘍、グリオーマ、有毛細胞白血病、頭頸部がん、心臓のがん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、眼内黒色腫、小島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎臓がん、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭がん、唇のがん、肝臓がん、悪性線維性組織球腫骨がん、髄芽細胞腫、髄上皮腫、黒色腫；髄芽腫、メルケル細胞がん、メルケル細胞がん、原発不明の転移性扁平上皮性頸部がん、多発性内分泌腫瘍症候群、口がん、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、脊髄増殖性新生物、鼻腔がん、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非黒色腫皮膚がん、非小細胞肺がん、口腔癌、口腔がん、中咽頭がん、骨肉腫、その他の脳腫瘍および脊髄腫瘍、卵巣がん、卵巣上皮がん、卵巣の生殖細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵臓癌、乳頭腫症、副鼻腔がん、副甲状腺癌、骨盤部癌、ペニスのがん、咽頭がん、中間分化の松果体実質性腫瘍、松果体腫瘍、下垂体性腫瘍、形質細胞新生物／多発性骨髄腫、胸膜肺芽腫、一次性中枢神経系（CNS）、一次性肝細胞性肝がん、前立腺癌、直腸がん、腎臓がん、腎細胞（腎臓）癌、腎細胞癌、気道癌、網膜芽腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、セザリー症候群、小細胞肺がん、小腸癌、軟部組織肉腫、扁平上皮細胞癌、胃（胃）癌、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、T細胞癌、精巣癌、咽頭癌、胸腺癌、甲状腺癌、移行性細胞がん、腎盂と尿管の移行上皮がん、栄養芽層の腫瘍、尿管がん、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膣がん、外陰がん、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、またはウィルムス腫瘍である。

【0217】

いくつかの実施形態において、脳癌または脳腫瘍は、脳幹グリオーマ、中枢神経系非定型奇形腫瘍／ラブドイド腫瘍、中枢神経系胚芽腫、星細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽腫、上衣腫、髄芽腫、髄上皮腫、中間的分化の松果体実質腫瘍、テント上原始神経外胚葉性腫瘍および松果体芽腫からなる群より選択される。

【0218】

定義

本明細書で使用される技術用語および科学用語は別段の定義がない限り、本発明が関係する当業者によって一般に理解される意味を有する。以下の説明および実施例において参照される材料、試薬などは、特に断らない限り、商業的供給源から入手可能である。

【0219】

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用される特定の用語および語句の意味は、以下に提供される。他の用語および語句は、本明細書全体を通して定義される。

【0220】

単数形「a」、「an」、および「the」は文脈が明らかにそわないと指示しない限り、複数の参照を含む。

【0221】

用語「約」は理解される数が本明細書に記載される正確な数に限定されないことを意味し、本発明の範囲から逸脱せずに、列挙された数の実質的に周囲の数を指すことが意図される。本明細書で使用される場合、「約」は当業者によって理解され、それが使用される文脈である程度変化する。それが使用される文脈で与えられる当業者に明らかでない用語の使用がある場合、「約」は特定の用語のプラスまたはマイナス10%までを意味する。

【0222】

本明細書中で互換的に使用される「個体」、「被検体」、「宿主」および「患者」は、診断、治療または療法が所望される任意の哺乳動物対象をいう。1つの好ましい実施形態において、個体、被検体、宿主、または患者はヒトである。他の被検体としてはウシ、ウマ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、霊長類、およびマウスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0223】

「癌」、「新生物」、「腫瘍」、「悪性腫瘍」および「癌腫」は、互換的に本明細書中で使用され、細胞増殖の制御の重大な喪失によって特徴付けられる異常な成長表現型を示す細胞または組織を指す。がんには主にいくつかの種類がある。がんとは、皮膚内または内臓を覆っている組織から発生するがんのことである。肉腫は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管、その他の結合組織や支持組織から発生するがんである。白血病は、骨髄などの造血組織から発生するがんで、異常な血液細胞が大量に産生されて血液中に入るようになる。リンパ腫と多発性骨髄腫は、免疫系の細胞から発生するがんである。中枢神経系がんは、脳と脊髄の組織から発生するがんである。本発明の方法および組成物は特に、前癌性、悪性、前転移性、転移性、および非転移性細胞に適用される。

【0224】

用語「治療」、「治療する」、「治療する」などは、腫瘍患者において所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを指す。この効果は、腫瘍またはその症状を完全にまたは部分的に予防するという点で予防的であり得、および／または腫瘍および／または腫瘍に起因する有害な効果について部分的または完全な安定化または治癒という点で治療的であり得る。治療は、哺乳動物、特にヒトにおける腫瘍の任意の治療を包含する。所望の効果は特に、腫瘍塊の減少または腫瘍塊増加の阻害として測定され得る腫瘍応答である。腫瘍応答に加えて、全生存の増加、無増悪生存、または腫瘍再発までの時間、または有害作用の減少もまた、所望の治療効果として臨床的に使用され得る。

【0225】

本明細書中で使用される場合、用語「投与する」は、別のものに直接投与すること、自己投与すること、および本明細書中に開示されるような薬剤の投与を処方または指示することを含む。

【0226】

語句「有効量」および「治療有効量」は、それぞれ、そのような治療を必要とする被験体において活性薬剤が投与される特定の薬理学的効果を提供する、被験体における活性薬剤投薬量または血漿濃度を意味する。有効量の活性剤は、たとえそのような投薬量が当業者によって有効量であると見なされるとしても、本明細書中に記載される状態／疾患を治

10

20

30

40

50

療する際に常に有効であるとは限らないことが強調される。

【0227】

本明細書中で使用される場合、用語「活性剤」は、被験体を治療するために有用で機能性核酸をエンコードする任意の小分子薬物、タンパク質、機能性核酸、または多核酸である。活性剤は、本明細書に記載される抗腫瘍薬、機能性酸、インターフェロンI型アゴニストまたはII型アゴニストのいずれかであり得る。

【0228】

語句「薬学的に許容される」は、本明細書において、健全な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴わずに、妥当な利益／リスク比に相応して、インビボでの使用に適切である化合物、材料、組成物、および／または投薬形態を指すために使用される。

【0229】

「エンドサイトーシス」という用語は（1）食作用並びに（2）ピノサイトーシス、これ自体で、（2a）受容体結合を必要としないマクロピノサイトーシス、および（2b）クラスリン介在性エンドサイトーシス、（2c）カベオラ介在性エンドサイトーシスおよび（2d）クラスリン／カベオラ非依存性エンドサイトーシスを含むカテゴリーを包含し、これらは全て後期エンドソーム／リソソーム経路にアクセスする傾向がある。本発明者らはミニ細胞上のリガンドと哺乳類細胞表面受容体との相互作用により、特定のエンドサイトーシス経路が活性化され、後期エンドソーム／リソソームコンパートメントへの受容体媒介エンドサイトーシス（rME）が関与することを発見した。このようなエンドサイトーシス経路のおかげで、本発明者らはさらに、ミニ細胞が標的哺乳動物細胞の細胞質中にそれらのペイロードを放出することができることを発見した。ペイロードがエンコード核酸である場合、この核酸は、後期エンドソーム／リソソーム区画において完全に分解されるだけでなく、標的哺乳動物細胞においても発現される。

【0230】

以下の実施例は限定するものではなく、単に例示的なものであり、本発明のより完全な理解を提供するものである。実施例は、（1）薬剤耐性をコードする遺伝子の発現を減少または排除するように設計されたRNAi配列を担持する標的組換えミニ細胞の投与、および（2）癌細胞が感受性にされる薬剤を担持する標的化された、薬剤パッケージ化ミニ細胞の投与によって、インビボで薬剤耐性腫瘍細胞を効果的に治療することができることを実証する。

【0231】

以下の実施例は、本発明を例示するために提供される。しかし、本発明は、これらの実施例に記載された特定の条件または詳細に限定されるべきではないことを理解されたい。本明細書全体を通して、米国特許および／または国際特許または特許出願公開を含む、公に利用可能な文書へのあらゆる参照は、特に参照により組み込まれる。

【実施例】

【0232】

実施例1 JAWSII細胞のEDV α GC処理およびCD1dリガンドを介する α GCのその後の表面発現

この実施例は、癌細胞に対する、そのままの細菌ミニ細胞を介しての α GCのカプセル化送達と遊離 α GCとを対比する。

【0233】

使用細胞：マウス未成熟単球JAWSII(登録商標)CRL-11904(商標)

Perfecta3D 96ウェルのハンギングドロッププレートの調製：3Dハンギングドロッププレートの上側および下側トレイリザーバを、P1000ピペットを使用して溶融1%アガロースで満たした（1gのアガロースを100mlの水に溶解し、マイクロ波に溶解し、 $\sim 50^{\circ}\text{C}$ に冷却させた）。このプレートを乾燥させ、室温で少なくとも30分間沈降させた。次いで、ハンギングドロッププレートの外側ウェルを、50 μl の無菌細胞培養培地（細胞なし）／ウェルで満たした。

【0234】

EDV α GCのJAWSIIスフェロイドの処理：JAWSII細胞を1000ng/mlの α GC(陽性対照)で処理した；空のミニ細胞およびミニ細胞 α GC、を未処理細胞と比較し、処理後、8時間、16時間、24時間および48時間に収集した(図8A~8D)。

【0235】

JAWSII細胞の単細胞懸濁液への解離：JAWSII細胞を半懸濁培養物としてT25またはT75フラスコ中で増殖させた。ピペット補助具を用いてピペッティングすることにより、培養培地を滅菌50ml管に注意深く収集し、フラスコの培養表面を5mlの滅菌PBSで2回洗浄し、各洗浄後と同じ滅菌50ml管に収集した。接着細胞を、5mlの0.25%トリプシン/EDTAの添加によって収集し、そして37°Cで3分間、または全ての細胞がフラスコの表面から持ち上げられるまでインキュベートした。持ち上げた細胞を、ピペット補助具を用いて穏やかにピペッティングすることによって、注意深く単一細胞に分け、前の工程で使用した試料無菌50ml管に移した。次いで、細胞懸濁液を300gで7分間遠心分離し、上清を注意深くデカンターに移した。細胞ペレットを、チューブの底を指でフリックすることによって解離させ、5mlの予め温めたJAWSII培養培地に再懸濁した。細胞懸濁液を、ピペット補助具を用いて注意深くピペッティングすることによって、単一細胞にさらに解離させた。細胞数を決定するために、10 μ lの細胞懸濁液を10 μ lのトリパンブルー溶液と混合し、EVE自動細胞カウンターを用いて分析した。

【0236】

初期処理調製：6つの懸滴懸濁液サンプルを、各処理群について、時点ごとに使用した。処理試料ごとに5 $\times$ 10⁴JAWSII細胞および5 $\times$ 10⁸ミニ細胞(1:1000ミニ細胞対細胞比)を用い、JAWSII細胞培養媒体で総容量50 μ lで培養した。アイソタイプ対照のために、余分な未処理試料を調製した。適量のミニ細胞を7分で12,000gで遠心法によりペレット化し、ピペットで上澄みを注意深く除去した。適切な量の生きたJAWS細胞(前のセクションからの細胞数に基づく)を、ペレット化されたミニ細胞に添加した。次いで、穏やかなピペッティングによって、ミニ細胞をシングルミニ細胞-細胞懸濁液に解離させた。次いで、滅菌培養培地を添加することによって、各サンプルの最終容量を作製した。未処理試料および α GC処理試料については、5 $\times$ 10⁴のJAWSII細胞を各サンプル使用し、総容量50 μ lのJAWSII細胞培養培地中で培養した。適切な量の生きたJAWSII細胞をエッペンドルフ管に移した。次いで、滅菌培養培地を添加することによって、各サンプルの最終容量を作製した。1000ng/mLの α GCを、1000ng/mLの α GC(陽性対照)処理群で処理したJAWSII細胞のための細胞懸濁液に直接添加した。次いで、試料を、50 μ lの処理懸濁液/ウェルで懸滴プレートの各々のウェルに注意深く播種し、そして収集まで5%CO₂で37°Cでインキュベートした。

【0237】

処理したJAWSII細胞を抗 α GalCer：mCD1d複合体モノクローナル抗体で染色する：各懸滴ウェルの全内容物を、P200ピペットを用いて注意深く収集し、エッペンドルフ管に移した。合計6個のサンプルを、各処置群について1つの管に収集した。1:1000 PE結合抗マウス α GalCer：mCD1d複合体モノクローナル抗体および1:1000 PE結合マウスIgG1アイソタイプコントロールを適切なサンプルに添加し、穏やかにボルテックスすることによって混合した。GalCer：mCD1dモノクローナル抗体は、GalCer：CD1d複合体の細胞表面露出部分に結合する。次に、試料を暗所で室温で20分間インキュベートした。次いで、試料を350gで5分間遠心分離することによってペレット化した。注意深くピペッティングすることによって上清を除去し、ペレットを再懸濁し、500 μ LのFACS緩衝液中で1回洗浄した。次いで、細胞を350gで5分間の遠心分離によって収集し、250 μ LのFACS緩衝液に再懸濁し、FACS管に移した。1 μ LのDAPIを各サンプルに添加し、チューブを穏やかに旋回させることによって混合した。次いで、試料を、ガリオスフローサイトメーターを使用して分析した。

【0238】

結果：フローサイトメトリデータ(図8)はミニ細胞 α -GCで処理したJAWSII細胞お

10

20

30

40

50

よび遊離 α -GCで処理したJAWSII細胞について、抗GalCer:mCD1dで染色した後に、ミニ細胞単独で処理したJAWSII細胞および未処理のJAWSII細胞と比較して、明らかな変化を示した。この陽性染色は、ミニ細胞によるJAWSII細胞への α -GCの送達の成功、およびその後の細胞表面上の糖脂質を提示するCD1d分子による細胞表面上の抗原提示を確認する。 α -GCの提示は、抗腫瘍活性に不可欠なII型IFNカスケードを引き起こすインバリアントNKT細胞による受容体認識を導く重要なステップである。

【0239】

実施例2：同種マウスモデル (Balb/cマウスにおける^{EP}CT26ネズミ大腸がん)における^{EP}ミニ細胞_{Dox}とミニ細胞 α -GCの組合せ処理を用いたインビボ研究

この実施例は腫瘍に対するミニ細胞含有治療薬およびミニ細胞含有CD1d拘束性iNKT細胞抗原（例えば、 α -GalCer）の有効性を示す。この結果は、抗腫瘍薬とCD1d拘束性iNKT細胞抗原との組合せおよび封入されたiNKT細胞抗原が腫瘍を効果的に治療するために使用され得ることを実証する。

【0240】

マウスおよび処置（実験1～3）: Balb/cマウス、雌、6～7週齢を、Animal Resources Company(西オーストラリア)から入手した。実験を開始する前に、マウスを1週間順応させた。CT26細胞（マウス結腸癌）をEpCAM抗原を発現するプラスミドで安定に形質転換し、安定なクローン（Epclone 12.1）を樹立した。このクローンは、細胞の表面上にEpCAMを発現した。すべての動物実験は、全米保健医療研究審議会、実験動物の飼養および使用に関するオーストラリアのガイドライン、およびEnGeneIC動物倫理委員会の認可に従って実施した。

【0241】

CT26（Epclone 12.1）同種移植片を、各マウスの左側腹部に100 μ lのPBS当たり 2×10^5 細胞を皮下注射することによって確立した。腫瘍は移植後8日以内に約125mm³に成長した。マウスを各投与群につき8匹のマウスで無作為に群分けした。腫瘍を、生理食塩水処置単独と比較して、^{EP}ミニ細胞_{Dox}、ミニ細胞 α -GCおよび^{EP}ミニ細胞_{Dox}+ミニ細胞 α -GC（組み合わせ）で処置した。

【0242】

投与は週3回、2週間行った。^{EP}ミニ細胞_{Dox}は、単独および併用治療において、1回あたり 1×10^9 ミニ細胞で投与された。ミニ細胞 α -GCを実験1（図3）および3（図5）では 1×10^7 で、実験2（図3）では 1×10^8 で投与し、腫瘍体積が800mm³に達したときに生理食塩水群もチャレンジした。

【0243】

結果：全3実験は、生理食塩水および^{EP}ミニ細胞_{Dox}治療と比較して、^{EP}ミニ細胞_{Dox}+ミニ細胞 α -GCを受けた併用治療群に対して腫瘍進行の顕著な停止を示した。この結果は、^{EP}ミニ細胞_{Dox}へのミニ細胞 α -GC治療の追加による免疫免疫賦活剤効果の理論を指示する。ミニ細胞 α -GC単独によるOB治療はまた、実験2で最もよく見られるように、併用治療の程度までではないが、3つの実験全てについて腫瘍進行の停止を示した。

【0244】

実験2では、生理食塩水で処置した対照腫瘍が薬物および α -GC EDV媒介併用療法への処置変更後に劇的な腫瘍退縮を示した（図4）。800mm³に達したガンは、試験終了の3日前に600mm³以下に低下した。

【0245】

マウスおよび処置（実験4）：6～7週齢のBalb/cマウスの左側腹部に 2×10^5 細胞/100 μ lのPBSを皮下注射することにより、CT26（Epクローン12.1）同種移植片を確立した。腫瘍は～200～250mm³または600～800mm³まで増殖させた後、治療を開始した。マウスを6群、1群3匹に無作為に割り付けた。マウスには1回のみ投与した。処置群には、生理食塩水（図6C）、^{EP}ミニ細胞_{Dox}（ 1×10^9 ）（図6F）、ミニ細胞 α -GC（ 1×10^6 ）（図6E）、ミニ細胞 α -GC（ 1×10^7 ）（図6D）、^{EP}ミニ細胞_{Dox} 1×10^9 +ミニ細胞 α -GC（ 1×10^6 ）（図6B）、^{EP}ミニ細胞_{Dox}（ 1×10^9 ）+ミニ細胞 α -GC（ 1×10^7 ）（図6A）が

含まれる

マウスを、 $200\sim 250\text{mm}^3$ (図6) 腫瘍については処置の24時間後に、 $600\sim 800\text{mm}^3$ 腫瘍については16時間および24時間後に 殺した (図7)。

【0246】

結果：CT26同系腫瘍担持Balb/cマウスにおけるミニ細胞 $\alpha\text{-GC}$ 投与の単独および併用の影響を、上記のような単回投与で種々のサイズの腫瘍を処置することによってさらに調査した。興味深いことに、 $200\sim 250\text{mm}^3$ および $400\sim 600\text{mm}^3$ の腫瘍を保有するマウスの両方において、腫瘍は投与の24時間以内に顕著な壊死 (黒色) を発症することが見出された。この効果はより大きな腫瘍でより顕著であり、対照群では見られなかった。

【0247】

要約すると、これらのデータは、 $\alpha\text{-GalCer}$ などのカプセル封じCD1d拘束性iNKT細胞抗原と抗腫瘍薬との併用が腫瘍に対する有効性を示すことを示している。この結果はこの組み合わせが、腫瘍を効果的に処置するために使用され得ることを実証する。

【0248】

実施例3

本実施例は、ミニ細胞 $\alpha\text{-GC}$ で処理された樹状細胞/単球からのサイトカインIL-12、およびこれらの処理された樹状細胞に曝露されたiNKT細胞からのサイトカインIFN γ 、TNF α およびIL-4の分泌を記載する。

【0249】

抗原提示細胞 (APC) がCD1dを介してその表面に $\alpha\text{-ガラクトシルセレミド}$ を提示すると、IL-12を分泌することが知られている。さらに、これらの細胞が抗原をiNKT細胞レセプターに提示すると、iNKT細胞は、特にIFN γ 、TNF α およびIL-4などの多量のサイトカインを分泌する。本試験の目的は、JAWSII細胞 (マウスデンドライト細胞株) をミニ細胞 $\alpha\text{-GC}$ と共インキュベートした後、iNKT細胞と共インキュベートすると、これらのサイトカインが分泌されるかどうかを決定することであった。

【0250】

方法

C57マウスからのiNKT細胞の単離

インビトロ共培養試験では、NK1.1+iNKT細胞単離キット、マウス (Miltenyi Biotec 社) を用いて、製造業者の指示に従い、C57マウスの脾臓および胸腺からiNKT細胞を単離した。単離されたiNKT細胞の純度を、CD3およびNK1.1の発現について細胞をさらに染色することによって決定し、FACSを使用して分析した。

【0251】

JAWSII細胞を、96ウェルPerfecta3Dハンギングドロッププレート (シグマ) 中のミニ細胞 $\alpha\text{-GC}$ で処理した。次いで、培養物を5% CO_2 と共に 37°C で48時間インキュベートし、上清を遠心分離によって回収した。次いで、上清を、IL-12分泌についてのELISA分析のために使用した。

【0252】

ミニ細胞 $\alpha\text{-GC}$ での最初の処理によって送達された $\alpha\text{-GC}$ を提示するJAWSII細胞を、96ウェル丸底プレートに播種し、AIM V無血清培地 (Thermo Fisher Scientific) 中で1:2のiNKT対JAWSII比率でC57マウスから単離されたiNKT細胞と共培養した。次いで、上清を、IFN γ 、TNF α およびIL-4についてのELISA分析のために収集した。

【0253】

培養上清中のIL-12p40、IFN- γ 、TNF α 、およびIL-4のレベルを、R&D Systemsからの標準的なサンドイッチ酵素結合免疫吸着評価 (ELISA) によって、製造業者の説明書に従って測定した。

【0254】

結果は、ミニ細胞 $\alpha\text{-GC}$ で処理したJAWSII細胞が48時間以内にIL-12の非常に有意な分泌をもたらすことを示した (図9)。ミニ細胞 $\alpha\text{-GC}$ で処理されたJAWSII細胞のiNKT細胞との共インキュベーションは3つのサイトカイン、IFN γ 、TNF α およびIL-4 (図10、1

10

20

30

40

50

1および12)すべての高度に有意な分泌をもたらし、ミニ細胞がJAWSII細胞に α GCを首尾よく送達したこと、および α GCがCD1dを介して細胞表面上に提示されたこと、およびiNKT細胞表面受容体がJAWSII細胞の表面上のCD1d/ α GC複合体を認識したことを示唆した。

【0255】

実施例4

この実施例では、EpCAMミニ細胞_{Dox}+ミニ細胞 α -GCで処理したマウスの脾臓における活性化樹状細胞の増大について述べる。

【0256】

方法：

脾臓と胸腺の解離

安楽死の直後に、切開した脾臓および胸腺を、内容物をガラスホモジナイザーのチューブに直接空にすることによって、新たに調製した培地（滅菌RPMI-1640培地中の10% FBS）中のダウンス型ホモジナイザーに移した。次いで、器官を、3~4回の通過でガラス繊維プランジャーを使用することによって穏やかに破壊した。次いで、ホモジナイズした器官を、培地中の70 μ Mメッシュストレーナーを通して50mL遠心管に移した。次いで、ガラスホモジナイザーを4mLのRPMI-1640培地（無血清）で洗浄し、次いで内容物を再び同じ70 μ Mメッシュストレーナーに通して遠心管に入れた。次いで、チューブを330gで10分間遠心分離した後、細胞ペレットを4mLのRPMI-1640培地（無血清）に再懸濁した。赤血球細胞を、赤血球細胞溶解緩衝液Hybri-Max(Merk R7757-100mL)を使用して、製造者の指示に従って溶解した。次いで、細胞を5mLの冷滅菌オートMACSランニング緩衝液(Miltenyi)に再懸濁し、70 μ Mメッシュストレーナーを介して50mL遠心管に通した後、細胞計数に進んだ。

【0257】

FACS分析

単離した器官の単細胞調製物を 1×10^6 細胞/100mL FACS緩衝液で希釈した。次いで、以下の表1に示すように、細胞を適切な抗体で株化した。未染色および単一抗体で染色した細胞を陰性対照として使用した。すべてのサンプルおよび試薬を氷上で冷たく保ち、DAPIを使用して生/死細胞を分化させた。

【0258】

【表1】

表1

細胞型	マーカー
CD8+/CD4+T細胞	CD4, CD3, CD8, CD45
活性化 DC	CD45, CD370, CD86, CD40
iNKT細胞	CD45, CD3, CD49b

調製した試料をGalliosフローサイトメーター(Beckman)で流し、Kaluza分析ソフトウェア(Beckman)を用いて分析を行った。Kaluza分析ソフトウェアに組み込まれた補償関数を使用して単一抗体染色を分析することによって、チャンネル間のスペクトルの溢れを最小限に抑え/除去した。

【0259】

6~7週齢の雌性Balb/cマウスを、Animal Resources Company(西オーストラリア)から入手した。実験を開始する前に、マウスを1週間順応させた。CT26細胞(マウス結腸癌)をEpCAM抗原を発現するプラスミドで安定に形質転換し、安定クローン(Epクロ

ーン12. 1) を樹立した。このクローンは、細胞の表面上にEpCAMを発現した。すべての動物実験は、全米保健医療研究審議会、実験動物の飼養および使用に関するオーストラリアのガイドライン、およびEnGeneIC動物倫理委員会の認可に従い実施した。

【0260】

CT26 (Epクローン12. 1) 同種移植片を、それぞれのマウスの左側腹部に100 μ LのPBS当たり 2×10^5 細胞を皮下注射することによって確立した。腫瘍は移植後8日以内に約125mm³の開始体積まで増殖した。マウスを各投与群につき8匹のマウスで無作為に群分けした。EpCAMミニ細胞Dox、ミニ細胞 α -GC、およびEpCAMミニ細胞+ミニ細胞 α -GC(組合せ)を用いて、生理食塩水処理のみと比較して、マウスをイントラペノウス(テールセーブ注入)で処理した。

10

【0261】

マウスには実験開始時に単回投与を行った。EpCAMミニ細胞Doxは、一回および組合せ処理で一回当たり 1×10^9 ミニ細胞で与えた。ミニ細胞 α -GCを 1×10^7 で注入した。

【0262】

免疫細胞分析のために、マウスを殺し、全脾細胞を初回投与の4時間後、8時間後、16時間後および24時間後に単離した。細胞を活性化樹状細胞(CD86+ CD40+)の存在について染色し、集団をFACSを用いて分析した。

【0263】

結果

結果は(図13A-D)、EpCAMミニ細胞Dox+ミニ細胞 α -GCを用いた処理の4時間、8時間、16時間、24時間後に、ネズミのスプリーンにおける活性化デンドリティックセル(CD86+CD40+)母集団に著しい増大があったことを示した。

20

【0264】

実施例5

マウス異種移植片をEpCAMミニ細胞Dox+ミニ細胞 α -GCで処理した後、免疫細胞の腫瘍微小環境への浸潤を評価した。

【0265】

本実施例はミニ細胞含有治療薬およびミニ細胞含有CD1d拘束性iNKT細胞抗原(例えば、 α -GalCer)の腫瘍に対する有効性を示す。この結果はミニ細胞封入CD1d拘束性iNKT細胞抗原と腫瘍細胞表面標的化抗腫瘍剤封入ミニ細胞との組合せが、免疫系の活性化細胞の腫瘍への有意な浸潤を効果的に誘発するために使用され得ることを実証する。

30

【0266】

実施例4からのCT26異種移植マウスを殺し、腫瘍塊を除去し、下記のように腫瘍解離後に全ての細胞を抽出した。

【0267】

安楽死の直後に、異種移植片を切除し、無血清培地(RPMI 1640またはDMEM)に入れた。マウスのための腫瘍解離キット(Miltenyi Biotec)を使用して、腫瘍組織を単細胞懸濁液に解離した。最初に、無菌翼を用いて腫瘍組織を細かく切断した。組織を、酵素ミックスを含有するゲントルMACS C管(Miltenyi Biotec)に入れ、これを製造者のプロトコールに従って調製した。CT26異種移植片については、軟/中腫瘍のためのgentleMACSプログラムを、Octo Dissociator with Heaters(Miltenyi Biotec)で選択した。解離器上でのインキュベーションに続いて、細胞懸濁液をMACS SmartStrainer(Miltenyi Biotec)を通して適用し、解離した細胞を収集した。

40

【0268】

この細胞は、免疫系のすべての細胞、例えばマクロファージ、樹状細胞およびT細胞を同定するCD45+細胞について染色された。試料をFACSによって分析した。

【0269】

結果

結果は、16時間(図14C)および24時間(図14D)で、腫瘍はマウスがEpCAMミニ細胞Dox+ミニ細胞 α -GCでの併用療法で処置された場合にのみ、腫瘍への免疫系の細胞の有

50

意な浸潤を有したことを示した（図14A～D）。

【0270】

実施例6

EpCAMミニ細胞_{Dox}+ミニ細胞 α -GCによるマウス異種移植片の処理後の腫瘍微小環境への細胞傷害性T細胞の浸潤を評価した。

【0271】

実施例4および5に記載のマウス異種移植片から腫瘍を切除し、実施例4に記載のように細胞を単離した。細胞傷害性T細胞を同定するCD45+ CD3+ CD8+ 細胞について細胞を染色した。

【0272】

結果

結果はEpCAMミニ細胞_{Dox}+ミニ細胞 α -GCでの処置の24時間後に、マウスの腫瘍微小環境においてCD8+細胞傷害性T細胞の非常に有意な増大があったことを示した（図15D）。

【0273】

CD8+対CD4+ T細胞の比も計算し、その結果はEpCAMミニ細胞_{Dox}+ミニ細胞 α -GCでの処理の24時間後に、CD8+ : CD4+ 比の非常に有意な増大があったことを示した（図16D）。

【0274】

実施例7

EpCAMミニ細胞_{Dox}+ミニ細胞 α -GCによるマウス異種移植片の処理後の腫瘍微小環境へのiNKT細胞の浸潤を評価した。

【0275】

実施例4および5に記載のマウス異種移植片から腫瘍を切除し、実施例5に記載のように細胞を単離した。この細胞を、iNKT細胞を同定するCD45+ CD3+ CD49B+ 細胞について染色した。

【0276】

結果

結果はEpCAMミニ細胞_{Dox}+ミニ細胞 α -GCでの処置の24時間後に、マウスの腫瘍微小環境においてiNKT細胞の非常に有意な増大があったことを示した（図17D）。

【0277】

実施例8

EpCAMミニ細胞_{Dox}+ミニ細胞 α -GCを用いたマウス異種移植片の処理後のPBMCおよび樹状細胞におけるCD1d発現の有意な増大を評価することを目的とした。

【0278】

マウス異種移植研究を、実施例4および5に記載のように実施した。この実験では、別のグループのマウスが追加され、このグループはEpCAMミニ細胞₆₈₂+ミニ細胞 α -GCを受けた。薬剤PNU159682（本試験では682と命名）は、ドキソルビシンの2,000倍以上の毒性を有するネモルビシン誘導体である。種々の処置の投与の8時間後、末梢血単核細胞（PBMC）を、実施例4および5に記載のマウス異種移植片から収集した。RNAは、RNeasyミニキット（Qiagen）を使用して、製造者の指示に従って、収集した標本から単離した。RNAの質および量を、260nmおよび280nmでの吸光度を測定することによって決定した。1.8以上の260/280比が許容可能であると考えられた。

【0279】

cDNA合成は、製造者のプロトコールに従ってSuperscript Vilo(Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。10ngのcDNAを各qPCR反応に使用した。

【0280】

qPCRは、SYBR緑色染料を用いた7500 Fast Real-Time PCRシステム(Applied Biosystems)を用いて行った。結果は、2つのハウスキーピング遺伝子 β -2-ミクログロブリン（B2M）およびグルクロニダーゼ、 β （GUSB）に対するデルタデルタCT方法を用いて算出した。

10

20

30

40

50

【0281】

Pan Dendritic Cell Isolation Kit、マウス(Miltenyi Biotec社)を用いて、製造業者の指示に従って腫瘍異種移植片および内臓(脾臓、胸腺)の単細胞懸濁液から組織パン樹状細胞を単離した。次いで、血球計を用いて細胞を計数し、下流プロセスに使用した。活性化DCと非活性化DCを分離する。

【0282】

結果

結果は(図18)、両方の治療群、 E_pCAM ミニ細胞 $D_{ox} +$ ミニ細胞 $\alpha-GC$ および E_pCAM ミニ細胞 $682 +$ ミニ細胞 $\alpha-GC$ がCD1d mRNAにおいて著しい増加を示し、後者の群は E_pCAM ミニ細胞 $D_{ox} +$ ミニ細胞 $\alpha-GC$ 処理と比較してさらに著しい増加を示すことを示した。

10

【0283】

同じ時点で、CD1d mRNA発現は、 E_pCAM ミニ細胞 $682 +$ ミニ細胞 $\alpha-GC$ で処理した群においてのみ樹状細胞において有意に増加した(図19)。

【0284】

当業者には、本発明の精神または範囲から逸脱することなく、本発明の方法および組成物に様々な修正および変形を行うことができることが明らかであろう。したがって、本発明は添付の特許請求の範囲およびその均等物の範囲内に入る限り、本発明の改変および変形を包含することが意図される。

引用文献

- Ablasser et al., Nat. Immunol., 10 (10):1065-72 (2009).
 Ablasser et al., Nature, 498:380-384 (2013a).
 Ablasser et al., Nature, 503:530-534 (2013b).
 Adamus et al., Contemp. Oncol (Ponzn), 22(1A):56-60 (2018).
 Aduro Biotech Inc. (2016), Novartis Pharmaceuticals. 進行／転移性固形腫瘍またはリンパ腫患者におけるMIW815 (ADU-S100) の安全性および有効性の研究2020. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 識別子:NCT02675439. :<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02675439>. (cited 01 July 2016)より入手可能。
 Ahmadzadehfar et al., Semin Nucl Med. 40(2):105-121 (2010).
 Ahmadzadehfar et al., Oncotarget 7(11):12477-12488 (2016).
 Alexopoulou et al., Nature, 413: 732-738 (2001).
 Alzahrani et al., Clin Nucl Med. 37(3):229-234 (2012).
 Anderson et al., Molecules 18:15662-15688 (2013).
 Andersson et al., Pept Sci. 55:227-250 (2000).
 Anguille et al., Pharmacological Reviews 67, 731-753 (2015).
 Barber et al., Curr. Opin. Immunol., 23(1): 10-20 (2011).
 Belardelli et al., TRENDS in Immunology 23, 201-208 (2002).
 Bernardini et al., Frontiers in immunology 7, 402 (2016).
 Birkholz et al., J Biol Chem. 290(25):15365-70 (2015).
 Birkholz and Kronenberg, Biomedical Journal 38:470-482 (2015).
 Bobanga et al., Oncoimmunology 7(3): e1393598 (2017).
 Bredel, Brain Res. Rev. 35:161 (2001).
 Britton et al., Genes Dev. 12:1254-9 (1998).
 Brody et al., J. Clin. Oncol., 28:4324-4332 (2010).
 Burckstummer et al., Nat. Immunol., 10:266-272 (2009).
 Burger et al. Blood 106:1824-1830 (2005).
 Caplen, N.J., Expert Opin. Biol. Ther. 3:575-86 (2003).
 Caplen and Mousses, Ann. NY Acad. Sci. 1002:56-62 (2003).
 Caravella and Lugovskoy, Curr. Opin. Chem. Biol. 14:520-28 (2010).
 Carreno et al., Clin Transl. Immunology 5(4): e69 (2016).

20

30

40

50

- Caskey et al., *J. Exp. Med.* 208:2357- 2366 (2011)。
- Cauwels et al. *Cancer Research* 78, 463-474 (2018)。
- Chatalic et al. *J Nucl Med.* 56:1809-1812 (2015)。
- Chen et al., *Int. J. Cancer* 93: 107 (2001)。
- Chikuma et al., *Cancer Sci.* 108: 574-580 (2017)。
- Chiu et al., *Cell* 138:576-591 (2009)。
- Chu et al., *PLoS Biology* 4:1122-36 (2006)。
- Civril et al., *Nature* 498:332-337 (2013)。
- Clark-Curtiss and Curtiss, *Methods Enzymol.* 101:347-362 (1983)。
- Colonna et al., *Nat. Immunol.* 5:1219-1226 (2004)。
- Corrales et al., *Cell Rep.* 11:1018-1030 (2015)。
- Cory et al., *Cancer Commun.* 3(7): 207-12 (1991)。
- D ' Aloia et al., *Cell Death & Disease* 9, 282 (2018)。
- D ' Angiolella et al., *Cell*, 149:1023-34 (2012)。
- Da Silva et al., *Breast Cancer Res.*, 12: R46 (1-13) (2010)。
- Debinski et al., *J. Neurooncol.*, 48: 103-11 (2000)。
- Debinski and Gibo, *Mol. Med.*, 6: 440-49 (2000)。
- de Boer et al., *J. Bacteriol.*, 174(1): 63-70 (1992)。
- Deutscher SL. *Chem Rev.* 110:3196-3211 (2010)。
- Dine et al., *Asia-Pacific journal of oncology nursing* 4, 127-135 (2017)。
- Dobbs et al., *Cell Host Microbe*, 18(2): 15-24 (2015)。
- Dong et al., *International journal of molecular sciences* 17, 320 (2016)。
- Dowling et al., *PLoS One*, 8:e58164 (2013)。
- Dredge et al., *Cancer immunology, immunotherapy: CII* 51, 521-531 (2002)。
- Duan et al., *Mol. Cancer Ther.*, 3: 833-8 (2004)。
- Duxbury et al., *Ann. Surg.*, 240: 667-74 (2004)。
- Dynavax Technologies Corporation (2016). 未治療の低悪性度B細胞リンパ腫患者を対象とした限局性低線量放射線療法との併用におけるSD-101の研究2016. *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 識別子: NCT02266147. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02266147>. (cited 01 Jul 2016) より入手可能。
- Emens et al., *European journal of cancer* 81, 116-129 (2017)。
- Erathodiyil and Ying, *Acc Chem Res.* 44:925-935 (2011)。
- Fang et al., *Seminars in immunology* 31, 37-54 (2017)。
- Farkona, et al., *BMC medicine* 14, 73 (2016)。
- Faveeuw et al., *Cancer Res.* 74(6): 1632-1638 (2014)。
- Ferlazzo et al. *The Journal of Immunology* 172, 1333-1339 (2004)。
- Fernandes-Alnemri et al., *Nature*, 458:509-513 (2009)。
- Field et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 58: 1004-1010 (1967)。
- Fitzgerald-Bocarsly et al., *Biochimie* 89, 843-855 (2007)。
- Fu et al., *Sci. Transl. Med.*, 7(283):283ra252 (2015)。
- Fukuda, *Curr. Protocols Molec. Biol. (Suppl. 26)*, 17.5.1-17.5.8 (1994)。
- Gao et al., *Nat Biotechnol.*, 22(8): 969-976 (2004)。
- Gao et al., *Science*, 341:903-906 (2013a)。
- Gao et al., *Cell*, 153:1094-1107 (2013b)。
- Gerard and Cavalieri, *Clin Nucl Med.* 27(1):1-8 (2002)。
- Ghosh and Heston, *J Cell Biochem.* 91(3):528-539 (2004)。
- Giaccone et al., *Clin. Cancer Res.* 8:3702-3709 (2002)。
- Gitlin et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103: 8459-8464 (2006)。
- Goh and Sorkin, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5: a017459 (2013)。

- Graversen and Moestrup, *Membranes* 5: 228-52 (2015).
- Gray and Brown, *Chem Rev.* 114:1020-1081 (2013)。
- Gregory et al., *Methods in Molecular Biology*, 342: 33-47 (2006)。
- Gupta et al., “Abstract CT091: 固形癌患者にTLR 7／8アゴニストであるMEDI9197を腫瘍内投与したときの安全性及び薬力学活性” *Cancer Research*, AACR Annual Meeting 2017; April 1-5, 2017 (Published July 2017))。
- Hansen et al., *EMBO J.*, 33(15): 1654-66 (2014)。
- Harry, E.J., *Mol. Microbiol.*, 40(4): 795-803 (2001)。
- He et al., *Materials Today Chemistry* 4: 106-16 (2017)。
- Hershey, J. *Allergy Clin. Immunol.*, 111: 677-90 (2003)。
- Hiraga et al., *J. Bacteriol.*, 171: 1496-1505 (1989)。
- Hobbs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(8): 4607-4612 (1998)。
- Holman and Tumeh, *JAMA* 263(4):561-564 (1990)。
- Hornung et al., *Nature*, 458:514-518 (2009)。
- Hu & Lutkenhaus, *Mol. Microbio.*, 34(1): 82-90 (1999)。
- Iftode et al., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 34: 141-80 (1999)。
- Igarashi et al., *Int J Clin Med.* 2:500-508 (2011)。
- Immune Design (2016), Merck Sharp & Dohme Corp. 濾胞性非ホジキンリンパ腫患者におけるペムブロリズマブ併用または非併用の腫瘍内G100の研究2017. *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 識別子: NCT02501473.:// *ClinicalTrials.gov/show/NCT02501473*. (cited 01 July 2016)。より入手可能。
- Ireton et al., *J. Bacteriol.*, 176: 5320-29 (1994)。
- Jarboe et al., *Cancer Res.*, 67: 7983-86 (2007)。
- Jenkins et al., *British journal of cancer* 118, 9-16 (2018)。
- Jung et al., *Translational oncology* 11, 686-690 (2018)。
- Kao et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 191(12): 1467-1469 (2015)。
- Kao et al., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191, 1467-1469 (2015)。
- Kawai and Akira, *Nat. Immunol.*, 11:373-384 (2010)。
- Kelly et al., *J. Drug Delivery* (2011)。
- Khalil et al., *Proc Nat’l Acad. USA*, 106: 11667-72 (2009)。
- Kim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107:15181-15186 (2010)。
- Kota et al., *Cell*, 137: 1005-17 (2009)。
- Kramer-Marek et al., *Tumour Biol.* 33(3):629-640 (2012)。
- Kranzusch et al., *Cell Rep.*, 3:1362-1368 (2013)。
- Krieg et al., *Nature*, 374: 546-549 (1995)。
- Kwekkeboom et al., *J Clin Oncol.* 26(13):2124-2130 (2008)。
- Landskron et al., *Journal of immunology research* 2014, 149185 (2014)。
- Lee et al., *Cancers* 3, 3856-3893 (2011)。
- Lemmon and Schlessinger, *Cell*, 141(7): 1117-134 (2010)。
- Leung and Amarasinghe, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 36:133-141 (2016)。
- Li et al., *Acta Biomater.* 73: 412-23 (2018)。
- Li et al., *Science*, 341:1390-1394 (2013b)。
- Liu et al., *Science*, 347(6227): aaa2630 (2015)。
- Lu et al., *Structure*, 18:1032-1043 (2010)。
- Ma et al., *Mol. Microbiol.*, 54: 99-108 (2004)。
- MacDiarmid et al., *PLoS One*, 11(4) (2016)。
- MacDiarmid et al. *Nature biotechnology* 27, 643-651 (2009)。
- MacDiarmid et al., *Cell cycle* 6, 2099-2105 (2007a)。

- MacDiarmid et al., *Cancer cell* 11, 431-445 (2007b)。
- Majkowska et al., *Appl Radiat Isot.* 67(1):11-13 (2009)。
- Mankan et al., *EMBO J.*, 33:2937-2946 (2014)。
- McWhirter et al., *J. Exp. Med.*, 206:1899- 1911 (2009)。
- Marq et al., *J. Biol. Chem.*, 286:6108-6116 (2011)。
- Matsuno et al. *J Gastroenterol.* 32:579-586 (1997)。
- MedImmune LLC (2016). 固形癌患者に投与したMEDI9197の検討018. *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 識別子: NCT02556463. : <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02556463>. (cited 01 Jul 2016).より入手可能。
- Mellman et al., *Nature* 480, 480-489 (2011)。
- Merrifield, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 32:221-296 (2006)。
- Meulen and Brady, *Hum. Vaccin. Immunother.*, 13(1):15-16 (2017)。
- Mhawech-Fauceglia et al., *Histopathology* 50(4):472-483 (2007)。
- Morvan et al., *Nature reviews Cancer* 16, 7-19 (2016)。
- Muller et al., *Frontiers in immunology* 8, 304 (2017)。
- M・ler et al., *J Nucl Med.* 53(12):1951-1959 (2012)。
- Nakamura et al., *J. of Controlled Release* 171:216-224 (2013)。
- NHMRC Clinical Trials Centre, University of Sydney Australian New Zealand Clinical Trials Registry: Sydney (NSW): (2017)- 識別子ACTRN12617000037303 細胞毒性薬PNU-159682 (EGFR (V) -EDV-PNU) を有する標的EDVと免疫調節アジュバント (EDV-40mer) を有する同時非標的EDVを有する抗ヒトEGFR (Vectibix Sequence)のフェーズ1試験2017 January 10; <https://www.anzctr.org.au/ACTRN12617000037303.aspx>。
- Nielsen et al, *Biochim. Biophys. Acta*, 1591(1-3), 109-118 (2002)。
- Nieth et al., *FEBS Lett.*, 545: 144-50 (2003)。
- Oh and Park, *Advanced Drug Delivery Rev.*, 61: 850-62 (2009)。
- Ohki-Hamazaki et al. *Int J Dev Biol.* 49:293-300 (2005)。
- Oiseth et al., *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 3, 250 (2017)。
- Okada et al., *J. Bacteriol.*, 176: 917-22 (1994)。
- Okano et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 7136-37 (2006)。
- Oncovir Inc. (2016), National Institutes of Health, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Bay Hematology Oncology, Emory University, University of Pittsburgh, National Cancer Institute. 腫瘍内ヒルトノール(登録商標)による固形癌に対するインシテュ自家治療ワクチン接種 2018. *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 識別子: NCT02423863.: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02423863>. (cited 01 Jul 2016)より入手可能。
- Ortiz-Zapater et al., *Nature Medicine*, 18(1):83-90 (2011)。
- Orzalli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: E3008-E3017 (2012)。
- Park et al., *Breast Cancer Res.*, 4(3): 95-99 (2002)。
- Palmedo H. 骨転移の放射性核種治療. In: Biersack HJ, Freeman LM, editors. *Clinical Nuclear Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007:433-442. Pillai et al., *Appl Radiat Isot.* 59(2-3):109-118 (2003)。
- Quintieri et al., *Clinical Cancer Research* 11, 1608-1617 (2005)。
- Raskin & de Boer, *J. Bacteriol.*, 181: 6419-6424 (1999)。
- Reeve and Cornett, *J. Virol.*, 15: 1308-16 (1975)。
- Reid et al., *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 24, 3128-3135 (2013)。
- Rezvani et al., *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 25, 1769-1781 (2017)。

10

20

30

40

50

- Rice et al., *Semin. Nucl. Med.*, 41: 265-282 (2011)。
- Ruoslahti, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:697-715 (1996)。
- Sagnella et al., *Molecular cancer therapeutics* 17, 1012-1023 (2018)。
- Santoni et al., *J Biol Regul Homeost Agents.*28(4):555-563 (2013)。
- Sawa-Wejksza et al., *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 66, 97-111 (2018)。
- Sazar, “自然宿主防御の活性化; Hiltonol (Poly-ICLC) and Malignant Brain Tumors, Oncovir, Inc., www.oncovir.com/id2 (accessed July 11, 2018)。
- Sharma et al. *Cell* 168, 707-723 (2017)。
- Sharpe, *Immunological reviews* 276, 5-8 (2017)。
- Showalter, *Cytokine* 97, 123-132 (2017)。
- Silver et al., *Clin Cancer Res.* 3(1):81-85 (197)。
- Simmons et al. *The Journal of Immunology* 188, 3116-3126 (2012)。
- Singh, *Biomed Res Int.* 2014:874610 (2014)。
- Sioud, M., *Trends Pharmacol. Sci.*, 25: 22-8 (2004)。
- Schoggins et al., *Nature*, 505:691-695 (2014)。
- Solomon et al., *PLos One*, 10: 1-17 (2015)。
- Staudacher et al., *British journal of cancer* 117, 1736-1742 (2017)。
- Strand, FL. *Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes.* MIT press; 1999.
- Stewart and D 'Ari, J. *Bacteriol.*, 174: 4513-6 (1992)。
- Sun et al., *Science*, 339(6121):786-791 (2013)。
- Sun et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280: 788 (2001)。
- Sun et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 110-111: 38-51 (2017)。
- Szkandera et al., *British journal of cancer* 110, 183-188 (2014)。
- Takahashi et al., *Adv Funct Mater.* 18:2079-2088 (2008)。
- Takaoka et al., *Nature*, 448:501-505 (2007)。
- Takeshita et al., *Molec. Ther.*, 18: 181-87 (2010)。
- Tanpure et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 21: 8019-32 (2013)。
- Tatemoto, K. *Neuropeptide Y: history and overview, Neuropeptide Y and Related Peptides.* Springer; 2004. p. 1-21。
- Teunissen et al., *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 19(4):595-616 (2005)。
- Tyler-McMahon et al. *Regul Pept.* 93:125-136 (2000)。
- Unterholzner et al., *Nat. Immunol.*, 11:997-1004 (2010)。
- Unterholzner et al., *Immunobiology*, 128(11): 1312-21 (2013)。
- van Zandwijk et al., *Lancet Oncol.*, 18(10): 1386-1396 (2017)。
- van Zandwijk et al., *The Lancet Oncology* 18, 1386-1396 (2017)。
- Ventola, *Pharmacy and Therapeutics* 42, 452-463 (2017)。
- Wallace et al., *Springer seminars in immunopathology* 27, 49-64 (2005)。
- Walrand et al., *J Nucl Med.* 56(3):494-495 (2015)。
- Wang et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17:781-787 (2010)。
- Wang et al., *Immunity*, 41(6): 919-33 (2014)。
- Weckbecker et al., *Nat Rev Drug Discov.* 2:999-1017 (2003)。
- White & McCubrey, *Leukemia*, 15: 1011-1021 (2001)。
- Whittle et al., *J. Clin. Neurosci.*, 22(12): 1889-1894 (2015)。
- Whittle et al., *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 22, 1889-1894 (2015)。
- Wu et al., *Science*, 339:826-830 (2013)。
- Wykosky et al., *Clin Cancer Res.*, 14: 199-208 (2008)。
- Xia et al., *Nat. Immunol.*, 16:366-375 (2015)。
- Yague et al., *Gene Ther.*, 11: 1170-74 (2004)。

Yang et al., Clin Cancer Res. 14:5494-5502 (2008). Yang et al., Nat. Immunol., 11:487-494 (2010)。

Yi et al., PLoS One, 8(10):e77846 (2013)。

Yuan et al., Scientific reports 5, 14273 (2015)。

Zhang et al., J. Immunol., 186:4541-4545 (2011a)。

Zhang et al., Nat. Immunol., 12:959-965 (2011b)。

Zhang et al., Cell Rep., 6:421-430 (2014)。

Zibert et al., Human Gene Therapy 15, 21-34 (2004)。

Ziegler-Heitbrock et al., Frontiers in immunology 4, 23 (2013)。

Zitvogel et al., Nature reviews Immunology 15, 405-414 (2015)。

米国特許番号 8,591,862。

米国特許番号 7,183,105。

米国特許公開2008/0051469。

米国特許公開2008/0038296。

米国特許公開2015/0283235。

米国特許公開2017/0368002。

国際公開 2000/067776。

国際公開 2003/033519。

国際公開 2004/113507。

国際公開 2005/056749。

国際公開 2005/079854。

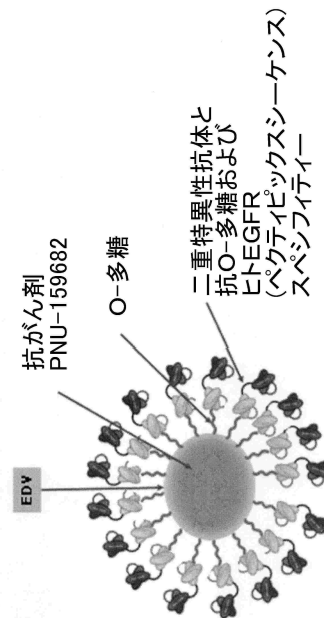
国際公開 2009/027830。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

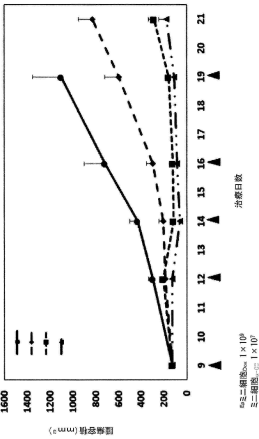
20

30

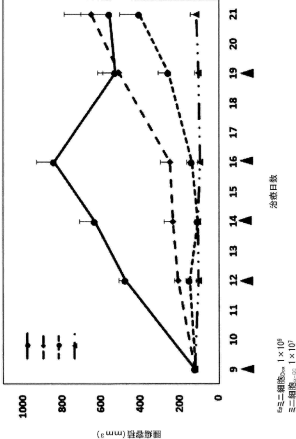
40

50

【図 3】



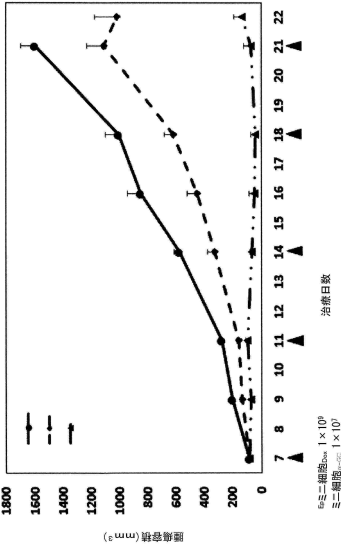
【図 4】



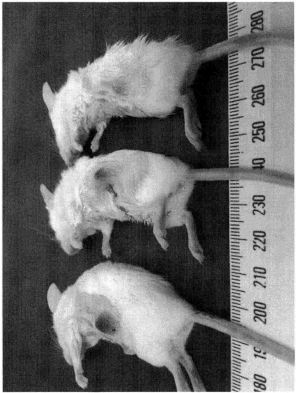
10

20

【図 5】



【図 6 A】



30

40

50

【図 6 B】



【図 6 C】



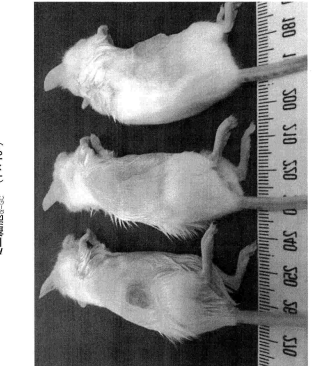
10

20

【図 6 D】



【図 6 E】

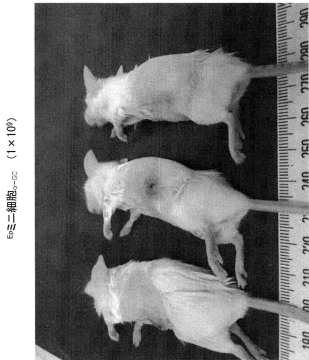


30

40

50

【図 6 F】



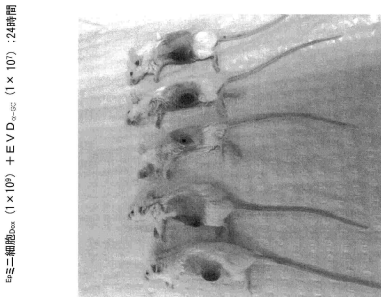
【図 7 A】



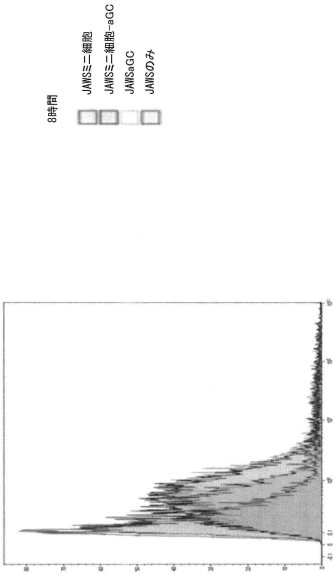
10

20

【図 7 B】



【図 8 A】

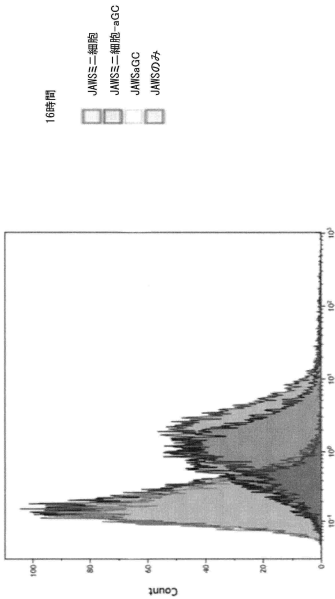


30

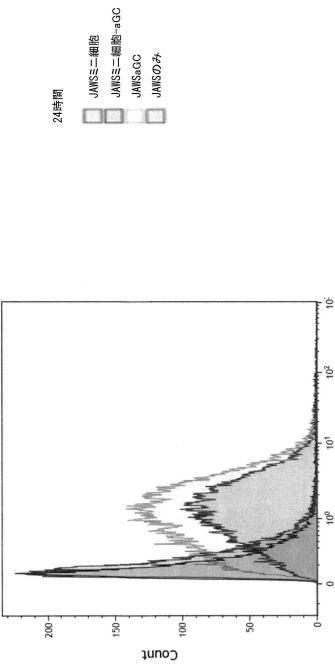
40

50

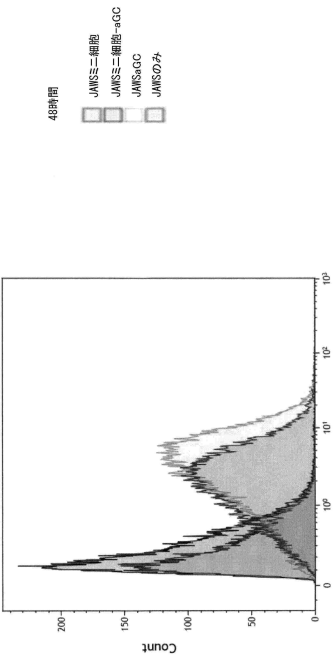
【図 8 B】



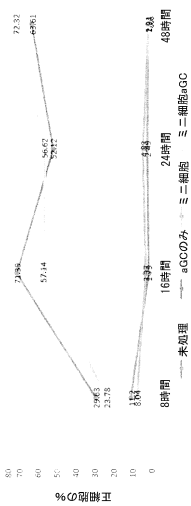
【図 8 C】



【図 8 D】



【図 8 E】



10

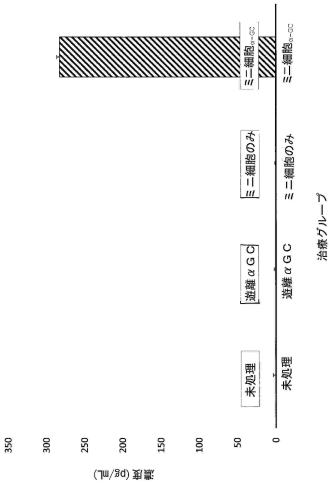
20

30

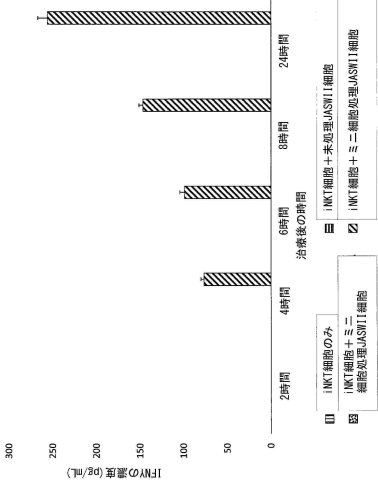
40

50

【図 9】



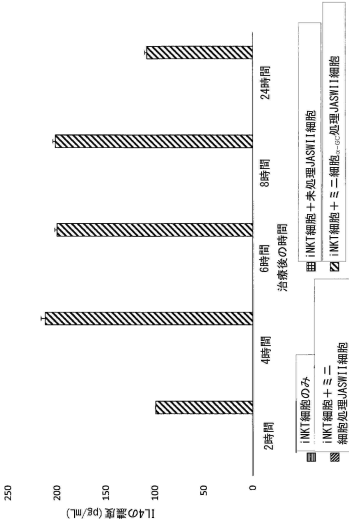
【図 10】



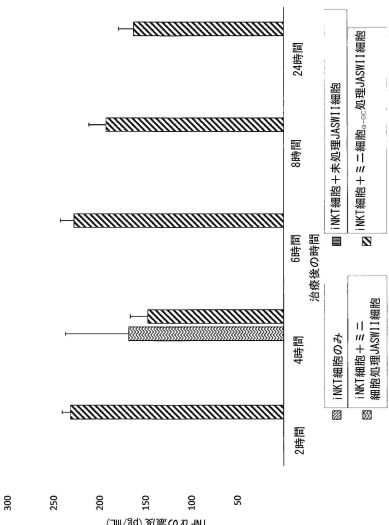
10

20

【図 11】



【図 12】

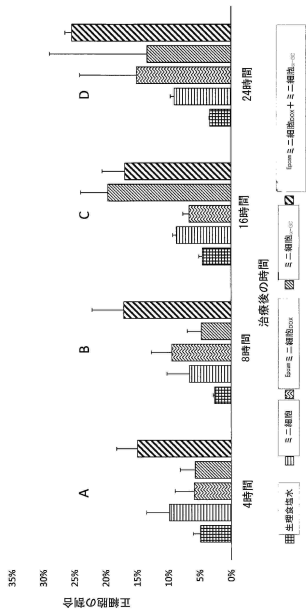


30

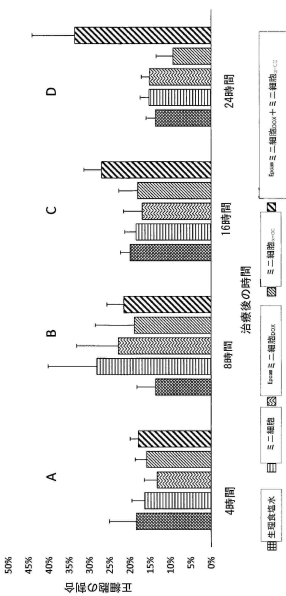
40

50

【図 1 3 A - D】



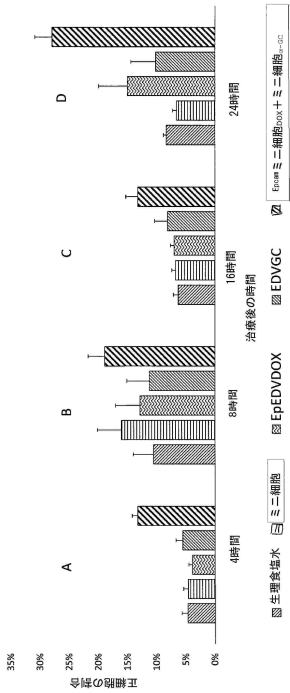
【図 1 4 A - D】



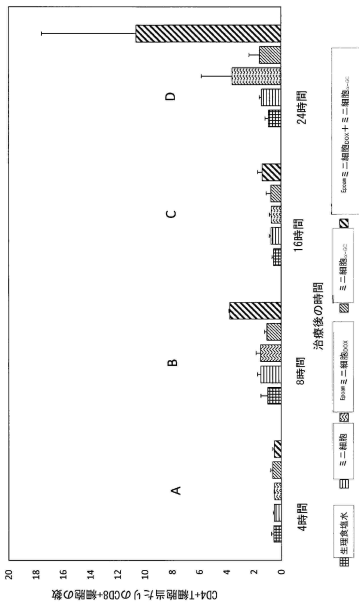
10

20

【図 1 5 A - D】



【図 1 6 A - D】

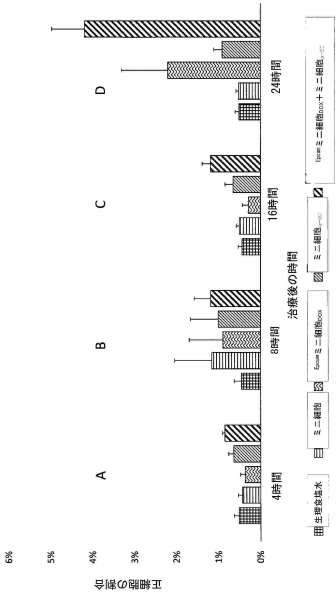


30

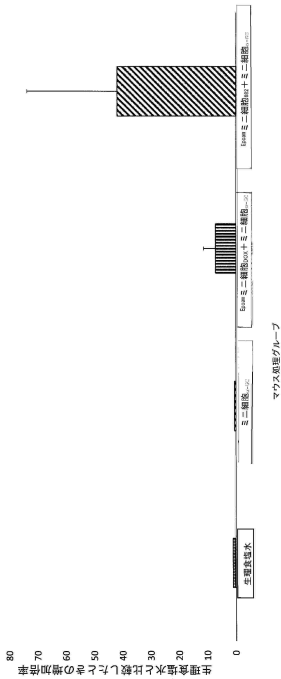
40

50

【図 17 A - D】



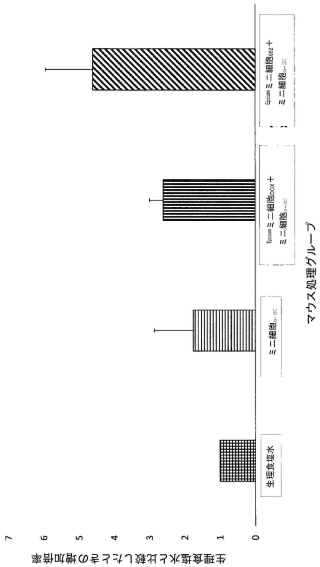
【図 18】



10

20

【図 19】



30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/002
A 6 1 K	9/50 (2006.01)	A 6 1 K	39/39
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 K	9/50
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
		A 6 1 P	43/00 1 2 1

(72)発明者 ルディング 2 エンジンアイシー モレキュラー デリバリー ピーティーワイ リミテッド内
マックディアミド、 ジェニファー
オーストラリア国 2 0 6 6 ニュー サウス ウェールズ シドニー レーン コーブ ウェスト シリ
アス ロード 2 5 ビルディング 2 エンジンアイシー モレキュラー デリバリー ピーティー
ワイ リミテッド内

審査官 長部 喜幸
(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 1 4 0 6 6 5 (US, A 1)
 米国特許第 0 8 6 9 1 9 6 3 (US, B 1)
 米国特許第 0 8 7 7 2 0 1 3 (US, B 1)
 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 0 7 7 5 4 (US, A 1)
 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 1 6 5 3 4 5 (US, A 1)
 Front. Immunol., 2018年, Vol.9, Article 1519, pp.1-7

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)
A 6 1 K 3 9 / 0 0
A 6 1 P 3 5 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 0 2
A 6 1 K 4 5 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 0 0 2
A 6 1 K 3 9 / 3 9
A 6 1 K 9 / 5 0
A 6 1 P 3 7 / 0 2
A 6 1 P 4 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)