

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-506884

(P2017-506884A)

(43) 公表日 平成29年3月16日 (2017.3.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-546946 (P2016-546946)
 (86) (22) 出願日 平成27年1月13日 (2015.1.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年9月15日 (2016.9.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/011171
 (87) 国際公開番号 W02015/108856
 (87) 国際公開日 平成27年7月23日 (2015.7.23)
 (31) 優先権主張番号 61/928,526
 (32) 優先日 平成26年1月17日 (2014.1.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507189574
 ウェイク・フォレスト・ユニヴァーシティ
 ・ヘルス・サイエンス
 アメリカ合衆国ノースカロライナ州271
 01, ウィンストン-セラム, テクノロ
 ジー・ウェイ 391, スウィート 19
 9
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男
 (74) 代理人 100114591
 弁理士 河村 英文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性薬の送達を増強するための方法

(57) 【要約】

その必要がある対象において選択した脳組織の血液脳関門透過性を増大させる方法は、(a) 温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された関門開放タンパク質またはペプチドをコードする核酸を含む組換え核酸を含む、脳組織に遊走する幹細胞を対象に非経口投与するステップと、次いで、(b) 選択した脳組織において血液脳関門の透過性を増大させるために有効な量の関門開放タンパク質またはペプチドの発現を誘導するのに十分な程度に、選択した脳組織を選択的に加温するステップにより実施される。このような方法の実施に有用な核酸、ベクター、幹細胞、および組成物もまた記載する。

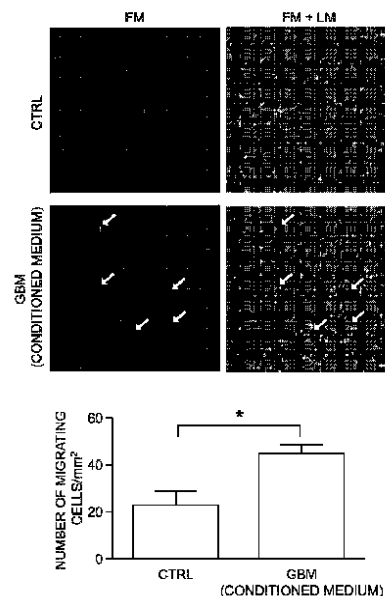


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) (b) に操作可能に結合された温熱誘導性プロモーターと、

(b) (i) 幹細胞誘引ケモカインまたは (i i) 血液脳関門開放タンパク質もしくはペプチドである活性薬をコードする核酸とを含む組換え核酸。

【請求項 2】

前記プロモーターが温熱誘導性タンパク質プロモーターである、請求項 1 に記載の組換え核酸。

【請求項 3】

前記温熱誘導性プロモーターが、H S P 7 0 プロモーター、H S P 9 0 プロモーター、H S P 6 0 プロモーター、H S P 2 7 プロモーター、H S P 2 5 プロモーター、ユビキチンプロモーター、増殖停止遺伝子プロモーター、および D N A 損傷遺伝子プロモーターからなる群から選択される、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 4】

前記活性薬が、T N F - アルファ、ストロマ細胞由来因子 1 アルファ、腫瘍関連増殖因子、形質転換増殖因子アルファ、線維芽細胞増殖因子、内皮細胞由来化学誘引物質、血管内皮増殖因子 (V E G F)、および幹細胞因子 (S C F) からなる群から選択される幹細胞誘引ケモカインであり、ただし、前記組換え核酸が形質転換した幹細胞中にない場合は V E G F を除く、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 5】

前記活性薬が、ブラジキニン、トロンビン、エンドセリン 1、サブスタンス P、血小板活性化因子、サイトカイン、マクロファージ炎症性タンパク質、および補体由来ポリペプチド C 3 a - d e s A r g からなる群から選択される血液脳関門開放タンパク質またはペプチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸を含むベクター。

【請求項 7】

ウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の異種組換え核酸または請求項 6 または 7 に記載のベクターで形質転換された幹細胞。

【請求項 9】

前記幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、または人工多能性幹細胞である、請求項 8 に記載の幹細胞。

【請求項 10】

薬学的に許容される担体中にある、請求項 8 または 9 に記載の幹細胞を含む組成物。

【請求項 11】

その必要がある対象における治療的処置のために組織を準備する方法であって、

(a) 前記組織へ遊走する事前調整された幹細胞を、対象に非経口投与するステップと、ここで、前記事前調整された幹細胞が組換え核酸を含み、前記組換え核酸が、温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された幹細胞誘引ケモカインをコードする核酸を含み、次いで、

(b) 前記対象に非経口投与された治療用幹細胞の遊走を増強させるために有効な量の前記幹細胞誘引ケモカインの発現を前記治療用幹細胞において誘導するために十分な程度に、前記組織を選択的に加温するステップとを含む方法。

【請求項 12】

前記組織が脳、乳房、皮膚、前立腺、肺、網膜、筋肉、肝臓、脾臓、骨格、または軟骨組織である、請求項 11 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記組織が新生物組織である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記新生物組織が脳腫瘍、乳がん、皮膚がん、前立腺がん、または肺がん組織である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、または人工多能性幹細胞である、請求項 11～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記プロモーターが温熱誘導性タンパク質プロモーターである、請求項 11～15 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 17】

前記温熱誘導性プロモーターが、HSP70 プロモーター、HSP90 プロモーター、HSP60 プロモーター、HSP27 プロモーター、HSP25 プロモーター、ユビキチンプロモーター、増殖停止遺伝子プロモーター、および DNA 損傷遺伝子プロモーターからなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記幹細胞誘引ケモカインが、TNF-α、ストロマ細胞由来因子 1α、腫瘍関連増殖因子、形質転換増殖因子α、線維芽細胞増殖因子、内皮細胞由来化学誘引物質、血管内皮増殖因子 (VEGF)、および幹細胞因子 (SCF) からなる群から選択される、請求項 11～17 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 19】

前記選択的に加温するステップが、超音波、レーザー、高周波、マイクロ波、またはウォーターバスにより実施される、請求項 11～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記選択的に加温するステップが、高密度焦点式超音波により実施される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記非経口投与するステップが全身的に投与するステップである、請求項 11～20 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 22】

その必要がある対象における組織を処置する方法であって、

(a) 前記組織へ遊走する治療用幹細胞を、対象に非経口投与するステップと、ここで、前記治療用幹細胞が組換え核酸を含み、前記組換え核酸が、温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された治療薬をコードする核酸を含み、次いで、

(b) 治療に有効な量の前記治療薬の発現を誘導するために十分な程度に前記組織を選択的に加温するステップとを含む方法。

【請求項 23】

前記治療薬が、毒素、毒素の断片、薬物代謝酵素、およびアポトーシスの誘導因子からなる群から選択される、請求項 22 に記載の方法。 40

【請求項 24】

前記治療薬が、(a) 細菌毒素、植物毒素、真菌毒素およびこれらの組合せからなる群から選択される毒素、(b) キナーゼを含む薬物代謝酵素、または (c) PUMA、BAX、BAK、Bcl-XS、BAD、BIM、BIK、BID、HRK、AdelB、ICE-CD3 プロテアーゼ、TRAIL、SARP-2、およびアポプチンからなる群から選択されるアポトーシスの誘導因子である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記組織が脳、乳房、皮膚、前立腺、肺、網膜、筋肉、肝臓、脾臓、骨格、または軟骨組織である、請求項 22～24 のいずれか 1 項に記載の方法。 50

【請求項 26】

前記組織が新生物組織である、請求項 22～25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記新生物組織が脳腫瘍、乳がん、皮膚がん、前立腺がん、または肺がん組織である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、または人工多能性幹細胞である、請求項 22～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記プロモーターが温熱誘導性タンパク質プロモーターである、請求項 22～28 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 30】

前記温熱誘導性プロモーターが、HSP70 プロモーター、HSP90 プロモーター、HSP60 プロモーター、HSP27 プロモーター、HSP25 プロモーター、ユビキチンプロモーター、増殖停止遺伝子プロモーター、および DNA 損傷遺伝子プロモーターからなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記選択的に加温するステップが、超音波、レーザー、高周波、マイクロ波、またはウォーターバスにより実施される、請求項 22～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

前記選択的に加温するステップが、高密度焦点式超音波により実施される、請求項 19 に記載の方法。 20

【請求項 33】

前記非経口投与するステップが全身的に投与するステップである、請求項 22～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

その必要がある対象における組織の処置の準備をする方法およびそれを処置する方法であって、

(a) 前記組織へ遊走する事前調整された幹細胞を、対象に非経口投与するステップと、ここで、前記事前調整された幹細胞が組換え核酸を含み、前記組換え核酸が、温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された幹細胞誘引ケモカインをコードする核酸を含み、次いで、 30

(b) 前記対象に非経口投与された治療用幹細胞の遊走を増強させるために有効な量の前記幹細胞誘引ケモカインの発現を誘導するために十分な加温を前記組織について選択的に行うステップと、次いで、

(c) 前記組織へ遊走する治療用幹細胞を、対象に非経口投与するステップと、ここで、前記治療用幹細胞が組換え核酸を含み、前記組換え核酸が、温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された治療薬をコードする核酸を含み、次いで、

(d) 治療に有効な量の前記治療薬の発現を誘導するのに十分な加温を前記組織について選択的に行うステップと 40
を含む方法。

【請求項 35】

前記幹細胞誘引ケモカインが、TNF-α、ストロマ細胞由来因子 1 α、腫瘍関連増殖因子、形質転換増殖因子 α、線維芽細胞増殖因子、内皮細胞由来化学誘引物質、血管内皮増殖因子 (VEGF)、および幹細胞因子 (SCF) からなる群から選択される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記治療薬が、毒素、毒素の断片、薬物代謝酵素、およびアポトーシスの誘導因子からなる群から選択される、請求項 34 または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記治療薬が、(a)細菌毒素、植物毒素、真菌毒素およびこれらの組合せからなる群から選択される毒素、(b)キナーゼを含む薬物代謝酵素、または(c)PUMA、BAX、BAK、Bcl-XS、BAD、BIM、BIK、BID、HRK、AdE1B、ICE-CD3プロテアーゼ、TRAIL、SARP-2、およびアポプチンからなる群から選択されるアポトーシスの誘導因子である、請求項34～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】

前記組織が脳、乳房、皮膚、前立腺、肺、網膜、筋肉、肝臓、膵臓、骨格、または軟骨組織である、請求項34～37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】

前記組織が新生物組織である、請求項34～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】

前記新生物組織が脳腫瘍、乳がん、皮膚がん、前立腺がん、または肺がん組織である、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

いずれかのまたは両方の前記幹細胞が、胚性幹細胞、成体幹細胞、または人工多能性幹細胞である、請求項34～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

前記プロモーターが温熱誘導性タンパク質プロモーターである、請求項34～41のいずれか1項に記載の方法。

【請求項43】

いずれか一方のまたは両方の前記温熱誘導性プロモーターが、HSP70プロモーター、HSP90プロモーター、HSP60プロモーター、HSP27プロモーター、HSP25プロモーター、ユビキチンプロモーター、増殖停止遺伝子プロモーター、およびDNA損傷遺伝子プロモーターからなる群から選択される、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

いずれか一方のまたは両方の前記選択的に加温するステップが、超音波、レーザー、高周波、マイクロ波、またはウォーターバスにより実施される、請求項34～43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項45】

いずれか一方のまたは両方の前記選択的に加温するステップが、高密度焦点式超音波により実施される、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

いずれか一方のまたは両方の前記非経口投与するステップが全身的に投与するステップである、請求項34～45のいずれか1項に記載の方法。

【請求項47】

その必要がある対象において選択した脳組織の血液脳関門透過性を増大させる方法であって、

(a)脳組織に遊走する幹細胞を対象に非経口投与するステップと、ここで、前記幹細胞は組換え核酸を含み、前記組換え核酸は、温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された関門開放タンパク質またはペプチドをコードする核酸を含み、次いで、

(b)前記選択した脳組織における血液脳関門の透過性を増大させるために有効な量の前記関門開放タンパク質またはペプチドの発現を誘導するのに十分な加温を、前記選択した脳組織について選択的に行うステップとを含む方法。

【請求項48】

前記選択した組織が新生物組織である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記幹細胞誘引ケモカインが、TNF-アルファ、ストロマ細胞由来因子1アルファ、腫瘍関連増殖因子、形質転換増殖因子アルファ、線維芽細胞増殖因子、内皮細胞由来化学

10

20

30

40

50

誘引物質、血管内皮増殖因子（VEGF）、および幹細胞因子（SCF）からなる群から選択される、請求項４７に記載の方法。

【請求項５０】

前記血液脳関門開放タンパク質またはペプチドが、ブラジキニン、トロンビン、エンドセリンー１、サブスタンスP、血小板活性化因子、サイトカイン、マクロファージ炎症性タンパク質、および補体由来ポリペプチドC3a-desArgからなる群から選択される、請求項４７～４９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５１】

前記幹細胞が、胚性幹細胞、成体幹細胞、または人工多能性幹細胞である、請求項４７～５０のいずれか１項に記載の方法。

10

【請求項５２】

前記プロモーターが温熱誘導性タンパク質プロモーターである、請求項４７～５１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５３】

前記温熱誘導性プロモーターが、HSP70プロモーター、HSP90プロモーター、HSP60プロモーター、HSP27プロモーター、HSP25プロモーター、ユビキチンプロモーター、増殖停止遺伝子プロモーター、およびDNA損傷遺伝子プロモーターからなる群から選択される、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

前記幹細胞が前記対象における治療薬の細胞毒性効果を増大させるのに有効な量で投与され、前記対象に前記治療薬を投与するステップをさらに含む、請求項４７～５３のいずれか１項に記載の方法。

20

【請求項５５】

前記治療薬が、テモゾロミド（「Tmz」）、VP-16、パクリタキセル、カルボプラチン、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド（「TRAIL」）、トログリタゾン（「TGZ」）、ピオグリタゾン（「PGZ」）、ロシグリタゾン（「RGZ」）およびシグリタゾン（「CGZ」）、プロカルバジン、ビンクリスチン、BCNU、CCNU、サリドマイド、イリノテカン、イソトレチノイン、イマチニブ、エトポシド、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、メトトレキセート、メルカプトプリン、フルオロウラシル、ヒドロキシ尿素、ビンブラスチン、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項５４に記載の方法。

30

【請求項５６】

それ自体、前記請求項のいずれか１項に記載の方法において使用するための、または前記請求項のいずれか１項に記載の方法を実施する際に使用するための医薬の調製において使用するための、前記請求項のいずれか１項に記載される核酸、ベクター、または幹細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

【関連出願】

40

本出願は、２０１４年１月１７日に出願された米国仮特許出願第６１／９２８，５２６号の利益を主張するものであり、この開示は、その全体が参照により本明細書の一部をなすものとする。

【０００２】

本発明は、幹細胞などの活性剤または治療剤を、脳における新生物組織などの、対象とする組織に送達するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【０００３】

多形神経膠芽腫（GBM）は、最も一般的な高悪性度の原発性脳腫瘍であり、極めて予後不良である（P. Wenら、N Engl J Med.、359（５）：492－5

50

07 (2008))。この予後不良は、正常な脳組織に近接して存在するもしくは正常な脳組織に浸潤する残存細胞または浸潤性細胞を、標準的治療では根絶できないという現実が直接的な原因である。幹細胞は、腫瘍指向性の遊走能を有することから、治療上の標的である原発性および浸潤性腫瘍細胞への実行可能な送達担体として頭角を現している。実際に、我々や他の者により、インビボにおいて、原発性GBM腫瘍、ならびに正常な脳組織と混ざり合う浸潤性腫瘍細胞に向かう幹細胞の遊走能が実証されている (I. Germanoら、J Neurosurg. 105、88-95 (2006) ; J. Dorseyら、Mol Cancer Ther. 8、3285-3295 (2009) ; A. Ashkenaziら、J Clin Invest. 104、155-162 (1999) ; D. Lawrenceら、Nat Med. 7、383-385 (2001) ; H. Walczakら、Nat Med. 5、157-163 (1999) ; A. Pannierら、Mol Cell Biol. 25、8809-8823 (2005) ; S. Kiddら、Stem Cells. 2009 ; 27 (10) : 2614-2623 (2009))。

【0004】

治療用媒体としての幹細胞を制限する主な問題として、(1) 腫瘍への遊走に加え、幹細胞が高い毒性治療効果を非選択的に発現すると、損傷を受け得る体内の正常領域へさらに誘引されること (S. Kiddら、Stem Cells、27 (10) : 2614-2623 (2009))、および(2) 臨床状況において治療的反応を誘導するには、大量かつ非現実的な数の遺伝子操作された幹細胞を注射する必要があると考えられるため、腫瘍へ遊走する治療用に遺伝子操作された幹細胞の注入分画が少量であると、それらが有する治療能力が制限されることの2つが挙げられる。したがって、多形神経膠芽腫などの脳腫瘍、および幹細胞治療により治療可能なこの他の状態の両方に対し、幹細胞治療薬の送達を増強する新規の方法の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、本明細書において、多形神経膠芽腫の治療に関係する一実施形態に関して記載されることがあるが、当業者であれば、本発明ががんおよび非がん組織の両者を含む多種多様なタイプの組織の治療に適用しうることを理解するであろう。したがって、本明細書における多形神経膠芽腫に特異的な考察は、本発明を限定するものではなく、本発明の多様な態様の例証として扱われるものとする。

【0006】

よって、下記で考察するように、本発明は、処置を必要とする対象における組織の処置の準備をする方法、およびそれを処置する方法を提供する。まとめると、この方法は、
(a) 前記組織へ遊走する事前調整された幹細胞を、対象に非経口投与するステップと、ここで、前記事前調整された幹細胞は組換え核酸を含み、前記組換え核酸は、温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された幹細胞誘引ケモカインをコードする核酸を含み、次いで、
(b) 前記対象に非経口投与された治療用幹細胞の遊走を増強させるために有効な量の前記幹細胞誘引ケモカインの発現を誘導するために十分な加温を前記組織について選択的に行うステップと、次いで、
(c) 前記組織へ遊走する治療用幹細胞を、対象に非経口投与するステップと、ここで、前記治療用幹細胞は、場合により(好ましくは幾つかの実施形態において)組換え核酸を含み、前記組換え核酸は、温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された治療薬をコードする核酸を含み、次いで、場合により(好ましくは幾つかの実施形態において)、
(d) 治療に有効な量の前記治療薬の発現を誘導するのに十分な加温を前記組織について選択的に行うステップとを含む。

【0007】

本発明のさらなる態様は、その必要がある対象において、選択した脳組織の血液脳関門

透過性を増大させる方法であって、

(a) 脳組織に遊走する幹細胞を対象に非経口投与するステップと、ここで、前記幹細胞は組換え核酸を含み、前記組換え核酸は、温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された関門開放タンパク質またはペプチドをコードする核酸を含み、次いで、

(b) 前記選択した脳組織における血液脳関門の透過性を増大させるために有効な量の前記関門開放タンパク質またはペプチドの発現を誘導するのに十分な加温を、前記選択した脳組織について選択的に行うステップと

を含む方法である。

【0008】

また本明細書では、上述のような幹細胞を含む医薬製剤について、さらに下記では、本明細書に記載の方法の実施の際に使用する薬学的に許容される担体中の医薬製剤について説明する。

【0009】

また本明細書では、本明細書に記載したような医薬製剤の調製において使用するための、および本明細書に記載したような方法において使用するための幹細胞についても記載する。

【0010】

本発明を、本明細書における図面および後述の具体例において、より詳細に説明する。本明細書において引用したすべての米国特許文献の開示は、その全体が参照により本明細書の一部をなすこととする。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】インビトロにおける、腫瘍細胞が分泌した化学誘引物質に反応にした神経幹細胞(NSC)の遊走能を示す図である。蛍光顕微鏡(FM)および光学顕微鏡(LM)によるフィルターの代表的な顕微鏡写真は、遊走したNSCを示しており、細胞がTRANSWELLからプレートへ遊走したことを示している。蛍光顕微鏡下での写真撮影、およびTRANSWELLからプレート表面(矢印)へ遊走した細胞をカウントすることにより、遊走を定量した。GBMが存在する条件培地における遊走を、コントロール(CTRL、無血清培地)と比較したヒストグラムは、GBM存在条件培地において遊走が有意に増加したことを示している。データは平均±SEM(n=3)として表し、*はP=0.0432、スチューデントのt検定である。

【図1B】インビボにおいてGFP発現NSCが神経膠芽腫に向かって遊走することを示す図である。様々な断面画像より、GFP発現NSC(矢印)が原発性腫瘍(破線)および(DsRedを発現する)浸潤性突起と共存することが明らかとなったが、これは正常細胞では見られず、これはインビボにおけるNCSCのGBM指向性を示している。

【図2A】比例的に発現するように配列内リボソーム進入部位(IRES)で隔てられているレポーター遺伝子である緑色蛍光タンパク質(GFP)およびホタルルシフェラーゼ(F-Luc)の発現を促進するHSP70プロモーター(P_{HSP70})を含むレンチウイルスベクターpLenti-pHSP70:FLuc/GFP-pRSV:RFPの概略図である。HSP70で促進される発現に加え、プラスミドはまた、赤色蛍光タンパク質(RFP)をRSVプロモーター(P_{RSV})を介して構成的に発現して、形質導入が成功した細胞を可視化して選択する。

【図2B】様々な温度で加温した後のHSP70促進レポーター遺伝子の発現を示す図である。ジャーカット細胞をpLenti-pHSP70:FLuc/GFP-pRSV:RFPで形質導入して、PCRサーマルサイクラーの中で表記の温度で30分間加温した。細胞を96ウェルプレートに再播種し、通常の培養条件で18時間培養した。細胞をルシフェリンに曝露させて、IVIS100イメージングシステムを用いて画像化した。ウェル周辺の対象領域(ROI)を描出、および光強度をヒストグラムにプロットすることにより、光シグナルを定量化した。

【図3A】ジャーカット細胞における、HSP70促進F-Luc/GFPおよび構成的

10

20

30

40

50

RFP (Const.) の二重レポーターの発現を示す図である。ジャーカット細胞にウイルスを感染させ、RFP発現によりいったん形質導入を確認した後、細胞をPCRサーマルサイクラーの中で表記の時間、43℃に加温した。加温後、細胞を再播種し、通常の培養条件で24時間培養した。ルシフェリンに曝露させた後、生物発光および多色蛍光 (GFPとRFP) 画像を記録した (RFPは左上、位相コントラストは右上、GFPは左下、混色は右下)。光シグナルを定量化して、ヒストグラムにプロットした。

【図3B】B16F10黒色腫細胞におけるHSP70促進F-Luc/GFPおよび構成的RFP (Const.) の二重レポーターの発現を示す図である。黒色腫細胞にウイルスを感染させ、RFP発現によりいったん形質導入を確認した後、PCRサーマルサイクラーの中で表記の時間、43℃に細胞を加温した。加温後、細胞を再播種し、通常の培養条件で24時間培養した。ルシフェリンに曝露させた後、生物発光および多色蛍光 (GFPとRFP) 画像を記録した (RFPは左上、位相コントラストは右上、GFPは左下、混色は右下)。光シグナルを定量化し、ヒストグラムにプロットした。

【図4】NSCにおけるHSP70促進レポーター遺伝子発現を示す図である。NSCにpLenti-pHSP70:FLuc/GFP-pRSV:RFPウイルスに感染させて形質導入し、24時間後、プラスミドの発現をRFPの構成的発現により確認した。その後、NSCは、PCRサーマルサイクラーの中で30分間、43℃に加温した後、再播種し、通常の細胞培養条件で24時間培養した。多色蛍光画像化により、加温がHSP70プロモーターを誘導し、その結果、GFPが発現したことが示された。RFPは左上、位相コントラストは右上、GFPは左下、混色は右下。

【図5】インビボにおける、高密度焦点式超音波 (HIFU) 調節下で加温した後の移植細胞におけるHSP70促進ホタルルシフェラーゼ発現を示す図である。pLenti-pHSP70:FLuc/GFP-pRSV:RFPベクターを安定的に発現したB16F10黒色腫細胞 (8×10^5) を、C57BL/6マウスの右下腿部に皮下移植した。細胞移植から7日後、注入部位を磁気共鳴温度測定 (MRT) ガイド下HIFUで30分間、43℃に加温した。HIFU誘導から8時間後、マウスを麻酔し、150mg/kgのD-ルシフェリン (キセノゲン) を腹腔内注入した後、生物発光で画像化した。生物発光は、IVIS100インビボイメージングシステム (PerkinElmer) で検出した (上の枠)。B16注入部位全面にわたり対象領域 (ROI) を描出した後、ROI全体について、光子束を定量してグラフ化した (下の枠)。

【図6A】インビボにおけるMRTガイド下HIFUを示す図である。選択した焦点スポット (矢印) に連続的な超音波曝露を行い、ラット死骸の脳組織を加温した。周囲温度: 37℃、TE/TR: 8.7/30ms、5スライス、10cmFOV、128×128マトリックス、0.78×0.78mm²平面内解像度、5mmスライス厚、18秒時間分解能のMRTを用いて、温度をリアルタイムでモニターした。

【図6B】MRTガイド下HIFUのフィードバックループを示すグラフである。HIFUシーケンスを適用した (上の枠)。リアルタイムMRTを用いて、15分間のHIFU実験中の標的スポット内における温度 (破線) および熱照射量 (実線) の変化を厳密にモニターした (下の枠)。グラフにおける熱照射量は、43℃での累積等価分を表す。

【図7A】リアルタイムMRTを示す図である。T2強調画像 (TE/TR 5.7/17ms、88スライス、10cmFOV、256×256マトリックスおよび0.4mm等方性空間分解能) を用いて腫瘍位置の特定 (矢印) を行い、MRT (TE/TR 8.7/30ms、5スライス、10cmFOV、128×128マトリックス、0.78×0.78mm²平面内解像度、5mmスライス厚、および18秒時間分解能) を用いて頭蓋内温度をリアルタイムでモニターした。HIFU実験中の腫瘍コア (9ボクセル) 内の温度変化を示す (右枠)。

【図7B】HIFU後のpHSP70促進レポーター発現を示す図である。HIFU誘導から8および48時間後に、ラットを麻酔し、150mg/kgのD-ルシフェリン (キセノゲン) を腹腔内注入した後、生物発光で画像化した。シグナルから、レポーター構築物を有するがHIFUで加温していない腫瘍細胞を同数持つ対照と比較して、HIFU処

10

20

30

40

50

置したラットでは強い F-Luc 発現 (円) を示した。

【図 7 C】生物発光シグナルの定量を示すグラフである。脳部位全面にわたり対象領域を描出した後、HIFU 治療から 8 および 48 時間後に、光子束を定量してグラフ化した。

【図 8】標的を定めた HIFU 活性化治療薬送達ストラテジーの概略図である。ステップ 1：休止期の組換え幹細胞を静脈注射する。ステップ 2：幹細胞が原発性腫瘍 (T)、浸潤性突起、およびマイクロサテライト腫瘍に向かって一方向的に遊走する。ステップ 3：MRT による継続的なモニタリングのもと、HIFU 波で腫瘍および周辺組織を 43℃ に非侵襲的に加温する。ステップ 4：HIFU 誘導加温により、熱ショックプロモーターを介して幹細胞の強力な治療薬の発現が活性化される。NB は正常脳、TZ は浸潤性腫瘍域、HZ は HIFU 誘導処置域。

【図 9】画像誘導 HIFU と併用した治療薬構築物の概略図である。レンチウイルスベクターは、比例的に発現するように配列内リボソーム進入部位 (IRES) で隔てられている sTRAIL および F-Luc の発現を促進する、HSP70 プロモーター (P_{HSP70}) を含む。さらに、ベクターはまた、形質導入が成功した細胞を可視化して選択するための赤色蛍光タンパク質を構成的に発現する。

【図 10 A】CMV プロモーター制御下の sTRAIL および mCherry 導入遺伝子をコードするベクターでトランスフェクトした GFP 発現 NSC が、トランスフェクトから 72 時間後、NSC の死細胞または円形化細胞を伴わず sTRAIL、GFP および mCherry 導入遺伝子を発現することを示す図である。

【図 10 B】sTRAIL によりトランスフェクトされた NSC の培養物由来の培地が GBM 細胞を殺滅することを示すグラフである。CMV プロモーターの制御下、sTRAIL および mCherry 導入遺伝子をコードするベクターによりトランスフェクトされた NSC を培養培地中で増殖させ、その培地を GBM 細胞を含むウェルに分注し、その後、細胞死を観察した。この分析により、濃縮していない培地中に存在する極めて低量の sTRAIL でも、GBM 細胞を殺滅しうることが示された。これに比べ、mCherry のみ発現する空ベクターで模擬的にトランスフェクトした NSC からの対照培地 (CTRL) では、GBM 細胞に対する影響は何もなかった。データは平均 ± SEM (n = 16) として表す。*** は P = 0.0008、スチューデントの t 検定。

【図 10 C】sTRAIL を安定的に発現する NSC は GBM 細胞を殺滅することを示す図である。F-Luc を構成的に発現する U251MG GBM 細胞 (1 × 10³) を、sTRAIL を安定的に発現する NC S (1 × 10³) と共にインキュベートした。48 時間後、GBM の生細胞率を生物発光を用いて測定した。結果より、sTRAIL を発現しない対照細胞と共にインキュベートした GBM 細胞と比べ、sTRAIL 分泌細胞に曝露させた GBM 細胞は完全に消滅したことが示された。

【図 11】ラット脳内の頭蓋内ヒト GBM 腫瘍の磁気共鳴画像である。

【図 12 A】比例的に発現するように配列内リボソーム進入部位で隔てられているホタルルシフェラーゼおよびサイトカインである腫瘍壊死因子 α (TNFα)、形質転換増殖因子 β 1 (TGFβ 1) または血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を促進する HSP70 プロモーターを含む、レンチウイルスベクター、pLenti-HSP70 (F-Luc-2A-サイトカイン) の概略図である。HSP70 で促進される発現に加え、プラスミドはまた、形質導入が成功した細胞を可視化して選択するための赤色蛍光タンパク質 (RFP) およびプラスミドサイジン S デアミナーゼ (BSD) も構成的に発現する。5'LTR: 5'末端反復配列、Ψ: パッケージングシグナル、RRE: Rev 応答エレメント、cPP: 中央ポリプリン管、WPRE: ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント、3'LTR (SIN): SIN 変異を有する 3'末端反復配列。

【図 12 B】ヒト間葉系幹細胞 (上の枠)、ならびに GFP、サイトカイン、および RFP を発現するレンチウイルスベクターで形質導入した NSC 細胞の図である (下の枠)。

【図 13】幹細胞遊走の分析を説明する図である。pLenti-HSP70 (F-Luc-2A-サイトカイン) により形質導入した後、無血清 DMEM に懸濁した幹細胞を、ヒートブロック、超音波、または赤外光により 20 分間、43℃ に穏やかに加温し、TR

10

20

30

40

50

ANSWELLプレートの上側のウェルの下側コンパートメントに播種した。無血清DMEMにおいてGFPを発現する幹細胞を上側コンパートメントに播種した。このTRANSWELLシステムをCO₂インキュベーター内でインキュベートし、蛍光顕微鏡下で下側コンパートメントに遊走した細胞数をカウントした。対照として、温熱誘導していない幹細胞を下側コンパートメントに播種した。

【図14】インビトロにおける、ヒートブロック(HB)、超音波(US)および赤外光(IR)による穏やかな加温で誘導されたhMSCが分泌したサイトカインに反応した、hMSCの遊走を示す図である。1mm²あたりの細胞総数を示す。

【図15】インビトロにおける、ヒートブロック(HB)、超音波(US)および赤外光(IR)による穏やかな加温で誘導されたNSCが分泌したサイトカインに反応した、NSCの遊走を示す図である。1mm²あたりの細胞総数を示す。

【図16A】HSP70プロモーター制御下TNF α をコードするレンチウイルスベクターで形質導入したSF767ヒトグリア腫瘍細胞からの培地中のTNF α の存在を示すグラフである。加温1回(第1回)の細胞は、高レベルのTNF α を示した。初回加温から24時間後に追加した加温過程(第2回)により亢進された細胞は、より一層高いレベルのTNF α 発現を示した。各回の加温から16時間後に、ELISAアッセイを用いて培地中のTNF α を測定した。非誘導細胞を対照(CTRL)として用いた。

【図16B】形質転換されてHSP70プロモーター制御下でTNF α を発現するSF767細胞からの条件培地に反応したNSCの遊走を示す図である。NSCのTNF α への遊走反応を評価するために、TRANSWELLプレート(8 μ m孔)の中で、RFP発現NSCをSF767細胞と共に24時間インキュベートした。蛍光顕微鏡下での写真撮影により遊走を定量化して、TRANSWELLからプレート表面に遊走した細胞数をカウントした。アッセイは3通り行った。表示したフィルターの顕微鏡写真(上の枠)から、(矢印で示した)NSCがTRANSWELLからSF767細胞を含むプレートに遊走したことが分かった。データより、対照(CTRL)の非加温細胞(下の枠)からの培地と比べ、温熱誘導したSF767細胞からの条件培地はNSC遊走を誘導することが実証された。

【図17A】レポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)、サイトカイン(TNF α)の発現を促進するHSP70プロモーター、ならびにRFPおよび選択マーカープラストサイジン遺伝子の発現を促進するRSVプロモーターを含むレンチウイルスプラスミドの概略図である。

【図17B】pLenti-HSP70(TNF α -Luc)-RSV(RFP-BSD)で形質導入したMSC(赤)の図である。

【図17C】加温活性化ルシフェラーゼ発現およびTNF α 発現を示すグラフである。

【図18A】ラット脳内に移植したMSCと組み合わせて、MRIガイド下HIFUにより活性化したF-Luc発現を示す図である。HIFU誘導から18時間後、ラットを麻酔し、150mg/kgのd-ルシフェリンを腹腔内注入した後、生物発光で画像化した。

【図18B】ラット脳内に移植したMSCと組み合わせて、MRIガイド下HIFUにより活性化したBBB開放を示す図である。HIFU誘導後、コントラストを強調したT1画像を得るには2日かかった。造影剤は静注投与する。

【図19】ラット脳内に移植したMSCと組み合わせて、MRIガイド下HIFUで活性化したBBB開放の定量化分析のグラフである。A)MSC-HSP70(Luc-2A-TNF α)を有し、HIFU処置したラット(N=6)、B)MSC-HSP70(Luc-2A-TNF α)を移植されて、HIFU処置していないラット(N=4)、およびC)MSC-HSP70(Luc-2A-GFP)を移植されて、HIFU処置したラット(N=4)である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、主にヒトを対象とした治療に関するが、本発明はまた、獣医学的目的で動物

10

20

30

40

50

の対象、特に、イヌ、ネコ、家畜およびウマなどの哺乳動物を対象に実施してもよい。対象は任意の好適な年齢であってもよいが、対象は、幾つかの実施形態において、新生児、乳児、若年、青年、成人、老人の対象である。

【0013】

本明細書において使用される場合、「処置する」とは、患者に利益を付与する任意のタイプの治療、特に、疾患の進行の遅延もしくは阻止、またはその疾患の症状の改善を指す。

【0014】

本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される」とは、化合物または組成物が、疾患の重症度および治療の必要度に照らし、過度に有害な副作用なく、対象に投与して本明細書に記載の治療を達成するために好適であることを意味する。

10

【0015】

本明細書において使用される場合、「並行して」とは、併用効果を産するに十分な時間的近接を意味する（すなわち、並行しては、同時にであってもよく、または互いの事象の前または後の短時間内に生じる2つ以上の事象であってもよい）。

【0016】

「核酸」とは、一本鎖型または二本鎖型のいずれかのデオキシリボ核酸またはリボ核酸およびそれらのポリマーを指す。特段の限定がない限り、この用語は、参照核酸として類似の結合特性を有し、天然に生じる核酸に類似の方法で代謝される、天然核酸の既知のアナログを含む核酸を包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列には、保存的に改変されたそれらの変異体（例えば縮重コドン置換）、および相補的配列、ならびに明示された配列も無条件に包含される。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、および遺伝子によってコードされmRNAと同義で用いる。

20

【0017】

「異種核酸」は、一般的に、単離されてクローン化され、本来組み合わせられることのない核酸と連結され、および／または、前記核酸またはタンパク質が、本来、通常見られるであろう細胞または細胞外環境以外の細胞または細胞外環境へ導入、および／またはそこで発現された核酸を表す。この用語は、異なる生物からまたはその核酸が発現される細胞のタイプとは異なるタイプの細胞から独自に得られる核酸、および核酸が発現される細胞株と同じ細胞株から得られる核酸のいずれも包含する。

30

【0018】

「コードする核酸」とは、rRNAなどの構造的RNA、tRNA、または特定のタンパク質もしくはペプチドの一次アミノ酸配列の配列情報、またはトランス作動性調節因子の結合部位を含む核酸を指す。この句は、具体的には、天然配列の縮重コドン（すなわち、1つのアミノ酸をコードする多様なコドン）、または特定の宿主細胞に導入され好ましいコドンに順応しうると考えられる配列を包含する。

【0019】

核酸に関して使用される場合、「組換え体」とは、一般的に、組成物、または前記核酸もしくはタンパク質の一次配列が、当業者に周知である実験操作法を用いて、天然に生じる配列から改変されていることを表す。組換え体はまた、核酸またはタンパク質が、単離されてベクター内へクローン化されていること、または、前記核酸またはタンパク質が本来見られるであろう細胞または細胞外環境以外の細胞または細胞外環境へ導入、および／またはそこで発現された核酸を表してもよい。

40

【0020】

細胞に関して使用される場合、「組換え体」とは、細胞が、その細胞外に起源をもつ核酸を複製または発現すること、またはその細胞外に起源をもつ核酸にコードされるペプチドまたはタンパク質を産生することを示す細胞を指す。組換え細胞は、天然型（非組換え体）の細胞内では見られない核酸を発現することができる。組換え細胞はまた、天然型の細胞で見られる核酸を発現することができ、核酸は、人為的手段により細胞内へ再導入される。このような細胞は、このような外来核酸が細胞膜の内側に導入された場合、外来核

50

酸により「形質転換され」る。外来DNAは、細胞のゲノムを構築している染色体DNA内に組み込まれて（共有結合されて）いてもいなくてもよい。外来DNAは、プラスミドなどのエピソード因子上に保持されてもよい。真核細胞においては、安定的に形質転換された細胞は、一般的には、外来DNAが染色体に組み込まれて、染色体複製を通して娘細胞に遺伝するような細胞、または、安定的に保持された染色体外プラスミドを有する細胞である。真核細胞で外来DNAを含む娘細胞集団からなる細胞株またはクローンを樹立できることから、この安定性は実証される。

【0021】

<温熱誘導性プロモーター>

任意の好適な温熱誘導性プロモーターを本発明の実施のために使用してもよく、例えば、HSP70プロモーター、HSP90プロモーター、HSP60プロモーター、HSP27プロモーター、HSP25プロモーター、ユビキチンプロモーター、増殖停止またはDNA損傷遺伝子プロモーターなどが挙げられるが、それだけに限定されない。例えば、米国特許第7,186,698号、第7,183,262号および第7,285,542号を参照されたい。I. Bouhonら、Cytotechnology 33:131-137(2000)(gad153プロモーター)も参照されたい。

10

【0022】

<遊走促進性サイトカイン>

様々な遊走促進性サイトカイン（「幹細胞誘引ケモカイン」としても言及されることもある）およびこれらをコードする核酸は既知であり、本発明の実施のために使用することができる。例えば、TNF-α、ストロマ細胞由来因子1α（SDF-1α）、腫瘍関連増殖因子、形質転換増殖因子α、線維芽細胞増殖因子、内皮細胞由来化学誘引物質、血管内皮増殖因子（VEGF）、幹細胞因子（SCF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、およびインテグリンが挙げられるが、それだけに限定されない。例えば、米国特許第8,569,471号（すべてヒトなどの哺乳動物と思われる）を参照されたい。

20

【0023】

<血液脳関門開放薬>

様々な薬が、血中投与した治療薬または診断薬の脳組織への送達の増強に有益な方法で、血液脳関門を開くことが知られている。例えば、参照にされたい。このような薬の例として、ブラジキニン、トロンビン、エンドセリン-1、サブスタンスP、血小板活性化因子、サイトカイン（例えば、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-6、TNFα）、マクロファージ炎症性タンパク質（例えば、MIP-1、MIP-2）、および補体由来ポリペプチドC3a-desArgからなる群から選択された開放タンパク質またはペプチドが挙げられるが、それだけに限定されない。

30

【0024】

<治療薬>

様々な種類の治療薬（一般的にはタンパク質またはペプチド治療薬）およびそれらをコードする核酸が、本発明を実施するために使用されることが知られている。一般的に、このような薬は、毒素、毒素の断片、薬物代謝酵素、アポトーシスの誘導因子などである。具体的な例として、細菌毒素、植物毒素、真菌毒素およびこれらの組合せ、キナーゼ、ならびにPUMA、BAX、BAK、Bcl-Xs、BAD、BIM、BIK、BID、HRK、AdelB、ICE-CD3プロテアーゼ、TNF関連アポトーシス誘発リガンド（TRAIL）、SARP-2、およびアポプチンなどのアポトーシス誘導因子が（それらの活性断片を含み）挙げられるが、それだけに限定されない。一般的には、米国特許出願公開第20130310446号を参照され、また米国特許第8,450,460号、第7,972,812号、第7,736,637号、および第5,763,233号も参照されたい。

40

【0025】

<組換え核酸およびベクター>

50

上述のようなプロモーターを上述のような遊走促進性サイトカイン、血液脳関門開放薬または治療薬をコードする核酸と操作可能に結合した組換え核酸の作製技術は公知である。例としては、Moonenへの米国特許第7,186,698号およびLiらへの米国特許第7,183,262号に記載の例が挙げられるが、それだけに限定されない。

【0026】

このような組換え核酸が挿入、連結、または別な方法により結合した、かつ本発明の実施に有用であるベクターは、同様に既知である。例として、DNAウイルスベクター、RNAウイルスベクター、プラスミド、弾道的粒子などが挙げられるが、それだけに限定されない。

【0027】

＜幹細胞および形質転換した幹細胞＞

幹細胞は、上述のようなベクターを使用したまたは使用しない、任意の好適な手段により、組換え核酸で安定的にまたは一過性に形質転換してもよい。好適な幹細胞、ならびにそれらの形質転換、増殖、製剤および投与のための方法およびベクターは既知である。例として、米国特許第6,368,636号、第6,387,367号、第7,022,321号、第8,034,329号、第8,057,789号、第8,216,566号、および第8,518,390号に記載の例が挙げられるが、それだけに限定されない。幹細胞は、任意の好適な組織、または胎盤、羊水、血液、臍帯血などの生物学的液体から捕集してもよい。一般的に、幹細胞は、目的にあった特定の条件および／または組織に応じて、特定の幹細胞を選択してもよく、胚性幹細胞、成体幹細胞または、人工多能性幹細胞であってもよい。

【0028】

＜医薬製剤、用量および投与＞

本発明の実施において使用する（上述のような幹細胞を含むがそれだけに限定されない）幹細胞は、公知技術に従い薬学的に許容される担体中で投与するように製剤化してもよい。例えば、Remington、The Science And Practice of Pharmacy（第9版、1995）を参照されたい。非経口投与に好適な本発明の製剤は、活性化化合物の無菌の水性および非水性注入溶液を含み、調製物は、好ましくは対象のレシピエントの血液と等張である。これらの調製は、場合によって、抗酸化物質、緩衝液、静菌剤、および製剤を対象のレシピエントの血液と等張にする溶質を含んでもよい。水性および非水性の無菌懸濁液は、懸濁剤および増粘剤を含んでいてもよい。

【0029】

幹細胞含有医薬製剤の非経口投与は、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内および腹腔内注入を含む任意の好適な経路を介してもよいが、それだけに限定されない。任意の特定の投与において送達される幹細胞の数は、例えば、投与される幹細胞の種類、対象の年齢、体重および状態、組織、ならびに治療状況などの様々な因子に依存することとなるが、一般的には、100万、500万または1000万個の細胞から10億、50億、100億もしくは500億個の細胞まで、もしくはそれ以上となる。

【0030】

＜治療対象組織＞

新生物および非新生物組織を含む多種多様な種類の組織が、幹細胞治療の標的として既知である。例えば、V. SegersおよびR. Lee、Stem-cell therapy for cardiac disease Nature 451、937-942（2008）；S. KimおよびJ. de Vellis、Stem cell-based cell therapy in neurological diseases：A review、J. Neurosci. Res. 87、2183（2009）；A. Caplan、Review：Mesenchymal Stem Cells：Cell-Based Reconstructive Therapy、in Orthopedics、Tissue Engineering、11、1198-1211（2005）などを参照されたい。

【0031】

したがって、上注のように、幾つかの実施形態において、治療対象の組織は、新生物またはがん組織であり、例えば、脳がん組織または腫瘍（例えば、多形神経膠芽腫などの神経膠腫、髄膜腫、下垂体腺腫、神経鞘腫など）、乳がん組織または腫瘍、皮膚がん組織または腫瘍（例えば、黒色腫、基底細胞の皮膚がん、扁平細胞の皮膚がんなど）、前立腺がん組織または腫瘍、肺がん組織または腫瘍、卵巣がん組織または腫瘍、大腸および結腸直腸がん組織または腫瘍、膵臓がん組織または腫瘍などが挙げられるが、それだけに限定されない。

【0032】

他の実施形態において、治療対象の組織は、非新生物または非がん性組織であるが、幹細胞治療に好適である損傷組織または罹患組織である。このような組織には、例えば、中枢神経、末梢神経、網膜、骨格筋、心筋、上皮、肝臓、膵臓、骨格、内分泌、および外分泌組織（例えば、前記組織が急性傷害、無酸素性傷害、代謝疾患、または自己免疫疾患に侵されている場合）が挙げられるが、それだけに限定されない。具体的な例として、急性または慢性の脳損傷、急性の脊髄損傷、心臓障害、造血発生、脱毛症、喪失歯、難聴、失明および視覚不全、運動ニューロン疾患、移植片対宿主病、クローン病、神経行動先天性欠損、糖尿病などを治療することが挙げられるが、それだけに限定されない。

【0033】

<選択した組織の加温>

選択した組織を（温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された遺伝子の発現を誘導するのに十分に）加温する具体的な方法は、加温される特定の組織または標的組織に依存することとなる。一般的には、選択的に加温するステップは、超音波、レーザー、高周波、マイクロ波、またはウォーターバスを用いて実施してもよい。Moonenへの米国特許第7,186,698号およびLiraへの米国特許第7,183,262号を参照されたい。したがって、（例えば、脳内または他の内臓内に位置する）深部組織については、位置設定したまたは選択した加温を、侵襲的または非侵襲的に実施することができる。好適な別の方法には、熱先端付きカテーテル、光線またはレーザー光線（例えば赤外光）誘導による光導波型カテーテル、および焦点式超音波（様々な異なる種類の装置のいずれかにより導出する、例えば、米国特許第5,928,169号、第5,938,608号、第6,315,741号、第6,685,639号、第7,377,900号、第7,510,536号、第7,520,856号、第8,343,050号を参照されたい。）による方法が含まれるが、それだけに限定されない。選択した組織の加温の程度は、特定のプロモーターの選択、加温時間、加温のために選択された組織などの因子に依存することとなるが、一般的には、1、5、10もしくは15分間またはそれ以上の時間で、約1または2摂氏度から5または6摂氏度までとしてもよい。

【0034】

<血液脳関門透過性の増強>

血液脳関門透過性の増強は、目下の目標であり（例えば、米国特許第8,349,822号を参照されたい）、本明細書に記載の材料および方法を、血液脳関門透過性の増強の方法に使用または適応させることができる。必要とする対象において、選択した脳組織の血液脳関門透過性を増大させるこのような方法は、一般的には、（a）温熱誘導性プロモーターに操作可能に結合された関門開放タンパク質またはペプチドをコードする核酸を含む組換え核酸を含む、脳組織に遊走する幹細胞を対象に非経口投与するステップと、次いで、（b）前記選択した脳組織において血液脳関門の透過性を増大させるために有効な量の前記関門開放タンパク質またはペプチドの発現を誘導するのに十分な程度に、前記選択した脳組織を選択的に加温するステップとを含む方法である（例えば、選択した組織に、活性治療薬または診断薬を並行してまたは続けて送達することを増強するような、本明細書に記載のような事前調整もしくは治療用幹細胞、または治療用抗体もしくは化学治療薬などのその他の活性薬を含むが、それだけに限定されない）。

【0035】

例えば、幹細胞（および選択的加温）は、前記対象における治療薬の細胞毒性効果を増大させるために有効な量で投与することができ、前記方法には、対象に治療薬を投与することもさらに含まれる。BBB透過性の増強に有利であると考えられる任意の好適な治療薬を用いてもよく、例えば、治療用幹細胞（上述のものを含むが、それだけに限定されない）、タンパク質およびペプチドの治療薬または診断薬（例えば、診断用および治療用モノクローナル抗体（それらの活性のある結合断片を含む））、または化学治療薬が挙げられるが、それだけに限定されない。具体的な例としては、テモゾロミド（「TmZ」）、VP-16、パクリタキセル、カルボプラチン、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド（「TRAIL」）、トログリタゾン（「TGZ」）、ピオグリタゾン（「PGZ」）、ロシグリタゾン（「RGZ」）およびシグリタゾン（「CGZ」）、プロカルバジン、ビンクリスチン、BCNU、CCNU、サリドマイド、イリノテカン、イソトレチノイン、イマチニブ、エトポシド、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、メトトレキセート、メルカプトプリン、フルオロウラシル、ヒドロキシ尿素、ビンブラスチン、およびそれらの組合せが挙げられるが、それだけに限定されない。幹細胞の組成物、用量および投与、ならびに加温は上述の通りでもよく、他の治療用または診断用活性薬の幹細胞の組成物、用量および投与を、特定の薬剤に対する公知技術に従い、あるいは当業者においても明らかになるであろうこれらの変形形態に従い実施してもよい。例えば、米国特許第8,450,460号を参照され、また米国特許第8,628,778号、第8,580,258号、第8,449,882号、第8,445,216号、第8,409,573号、第5,624,659号および第5,558,852号も参照されたい。

【0036】

本発明を、以下の非限定的な実施例において、より詳細に説明する。

【実施例1】

【0037】

<材料および方法>

ジャーカット細胞およびB16F10黒色腫細胞の形質導入。ウイルス粒子は、Gentarget, Inc (San Diego, CA) に特注して作製した。24ウェルプレート中で、粒子20マイクロリットル (1×10^7 IFU/ml) (1:1比でポリブレンと混合) を細胞に接触させ、60分間、遠心分離 (32°Cで1200RPM) した。続いて、細胞は通常の細胞培養条件下 (37°C/5%CO₂) で一晩インキュベートした。構成的RSVプロモーターにより促進されるRFP発現により、ウイルス形質導入が成功したことを確認した。ウイルス感染を確認した後、細胞は、適正時間（例えば、5～50分）、PCRサーマルサイクラー (T-gradient, Biometra) を用いて適正温度 (37°C～45°C) に正確に加温した。pHSP70促進F-Luc/GFPによる生物発光およびGFPシグナルは、標準方法で測定した。例えば、J. Dorseyら、Mol. Cancer Ther. 8(12):3285-3295 (2009)、S. Wangら、Cancer Biol. Ther. 6(10):1649-53 (2007) を参照されたい。

【0038】

組換え幹細胞。(a) ホタルルシフェラーゼ (F-Luc) の発現を促進する温熱誘導性プロモーターHSP70プロモーター、および幹細胞の遊走を誘引しうる様々なサイトカイン、ならびに (b) 赤色蛍光タンパク質 (RFP)、および場合によってブラストサイジン選択マーカー (BSD) の発現を促進するRSVプロモーターを含む、レンチウイルス発現プラスミド、pLenti-Hsp70 (F-Luc-2A-サイトカイン)-PSV (RFP-BSD) を構築した。本研究において使用される誘引サイトカインは、腫瘍壊死因子アルファ (TNF α)、血管内皮増殖因子 (VEGF) および形質転換増殖因子ベータ1 (TGF β 1) を含む。RFPレポーターおよびBSDを用いて、定型のRSVプロモーターの制御の下で、フローサイトメトリーまたはブラストサイジン (BSD) 抗生物質を使用する中で長期発現する形質導入細胞を選別および/または選択した。ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) またはラット神経幹細胞 (rNSC) を、レンチウイルスベ

クター (GenTarget、San Diego、CA) を用いた本構築物で形質転換した。簡潔に説明すると、24 ウェルプレートに幹細胞をウェルあたり 1×10^4 個細胞を播種し、一晩増殖させた。培地は新鮮で温かい完全培地 (0.5 ml) と交換し、その後、適量のレンチウイルス溶液を加えて所望の感染多重度 (MOI) を得た。次に、細胞は、 $800 \times g$ で 34°C で1時間遠心分離した後、 37°C 、5% CO_2 を含む加湿環境にさらに72時間置いた。細胞の蛍光を蛍光顕微鏡下でチェックした。さらに、適量のブラストサイジンを加えて、形質導入された細胞をスクリーニングした。NSCまたはhMSCはまた、緑色蛍光タンパク質を発現させるためにpLenti (GFP) で形質導入した。

【0039】

幹細胞の遊走。BD FALCON FLUOROBLOCK TRANSWELLチャンバーシステムを用いて、インビトロにおける細胞遊走の分析を行い、幹細胞の遊走に対する様々なサイトカインの影響を比較した。pLenti-Hsp70 (F-Luc-2A-サイトカイン)-RSV (RFP-BSD) で形質導入したhMSCを、T-75フラスコ内で60~80%コンフルエントになるまで増殖させた。この細胞をトリプシン処理して無血清DMEMに懸濁した後、一定分量で2分割した。一方の一定分量の幹細胞は、ヒートブロック (HB)、超音波 (US) または赤外光ランプ (IR) により、20分間、 43°C に穏やかに加温したのに対し、もう一方の一定分量は、対照として 37°C でインキュベートした。温熱誘導したhMSCは、無血清DMEM $700 \mu\text{l}$ 中に希釈して、総計20,000個を24ウェルチャンバーの下側コンパートメントのウェルに播種し、またGFP発現hMSC (約 5×10^3) を上側コンパートメントに、3通り播種した。陰性対照として、温熱誘導せずに無血清DMEMに懸濁した幹細胞を下側コンパートメントのウェルに播種した。このTRANSWELLシステムを CO_2 インキュベーターでインキュベートし、48時間インキュベートした後、下側コンパートメントに遊走した細胞を蛍光顕微鏡下でカウントした。

【実施例2】

【0040】

<神経幹細胞の腫瘍指向性>

GBM細胞株からの条件培地に反応したGFP発現神経幹細胞 (NSC、(Stemcell Technologies Inc、Vancouver、Canada) の遊走能 (24時間) を、TRANSWELLプレート ($8 \mu\text{m}$ 孔) を用いて測定した。この分析より、NSCがインビトロにおいてGBM指向性を示すことが明らかとなった (図1A)。この反応がインビボにおいても起こるのかどうかを明らかにするために、胸腺欠損ヌードマウスにDsRedを発現するヒトGBM腫瘍細胞を注入した。腫瘍移植から7日後、腫瘍から2mmの位置に 5×10^5 個のGFP発現NSCを移植した。腫瘍注入後15日目に動物を屠殺し、脳をPFA (4%) に固定して分析した。この分析より、NSCがインビボにおいてもGBM指向性を示すことが明らかとなった (図1B)。これらの分析結果は、間葉系幹細胞 (MSC) およびNSCを含む幹細胞がインビボにおいてGBM指向性を示すことを実証した先行結果と一致する (I. Germanoら、J. Neurosurg. 105 (1): 88-95 (2006); J. Dorseyら、Mol. Cancer Ther. 8 (12): 3285-3295 (2009); A. Ashkenaziら、J. Clin. Invest. 104 (2): 155-162 (1999); D. Lawrenceら、Nat. Med. 7 (4): 383-385 (2001); H. Walczakら、Nat. Med. 5 (2): 157-163 (1999); A. Pannerら、Mol. Cell Biol. 25 (20): 8809-8823 (2005); K. Aboodyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (23): 12846-12851 (2000); S. Benedettiら、Nat. Med. 6 (4): 447-450 (2000); F. Davisら、J. Neurosurg. 88 (1): 1-10 (1998); L. Sasportasら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (12): 4822-4827 (2009)

10

20

30

40

50

); M. Ehteshamら、Expert Rev. Neurother. 3 (6) : 883-895 (2003); P. Kabosら、Expert Opin. Biol. Ther. 3 (5) : 759-770 (2003); M. Ehteshamら、Cancer Res. 62 (24) : 7170-7174 (2002); A. Birbrairら、PLoS One. 6 (2) : e16816 (2011); A. Birbrairら、Stem Cell Res. 10 (1) : 67-84 (2013); A. Birbrairら、Exp. Cell Res. 319 (1) : 45-63)。

【実施例3】

【0041】

<インビトロにおけるpHSP70発現の制御>

HSP70発現は、高度に調節されており、非毒性の穏やかな加温により誘導することができる (G. LiおよびJ. Mak、Cancer Res. 45 (8) : 3816-3824 (1985); J. Landryら、Cancer Res. 42 (6) : 2457-2461 (1982); J. Landryら、Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 8 (1) : 59-62 (1982); J. SubjectおよびT. Shyy、Am. J. Physiol. 250 (1 Pt 1) : C1-17 (1986); S. Flanaganら、Am. J. Physiol. 268 (1 Pt 2) : R28-32 (1995); K. Kregelら、J. Appl. Physiol. 79 (5) : 1673-1678 (1995); K. Diller、Annu. Rev. Biomed. Eng. 8 : 403-424 (2006))。したがって、HSP70を使用して、インビボにおける治療用遺伝子発現を、空間的かつ時間的に制御された様式に、非侵襲的に、人為的に変えることができると仮定された。このように、構築上の組み込みを確認する、構成的に発現する赤色蛍光タンパク質 (RFP) レポーターと併せて、pHSP70で制御されるホタルルシフェラーゼ (F-Luc) および緑色蛍光タンパク質 (GFP) レポーター遺伝子を並行して発現するように設計したウイルス構築物を調製した (図2A)。このベクターを用いて、pLenti-pHSP70:FLuc/GFP-pRSV:RFPと名付けたウイルス粒子をGentarget, Inc (San Diego, CA) に特注して作製し、ジャーカット細胞に感染させた。細胞をPCRサーマルサイクラー (T gradient, Biometra) 内で30分間、様々な温度で加温し、96ウェルプレートに再播種して、通常の細胞培養条件で18時間置いた。続いて、細胞をルシフェリンに曝露させて、レポータータンパク質の発現を分析した。その結果、HSP70で促進されるルシフェラーゼの発現は、温度に密接に依存しており、ジャーカット細胞では43~44℃が最大であることが実証された (図2B)。HSP70促進遺伝子発現のタイミングを明らかにするために、pLenti-pHSP70:FLuc/GFP-pRSV:RFPをジャーカット細胞 (図3A) およびB16F10黒色腫細胞 (図3B) に形質導入し、43℃で、時間の長さを変えて加温した。この分析結果より、温熱曝露時間の増加に伴い生物発光シグナルの増大が得られることが明らかとなった。シグナルは30~40分で最大となり、その後は減少したが、おそらく加温時間の長さが50分を超えると生細胞率が低下するためであろう。

【0042】

幹細胞におけるpLenti-pHSP70:FLuc/GFP-pRSV:RFPの使用を実証するために、NSCをこのウイルスベクターで形質導入して、穏やかな加温 (43℃、30分間) に反応したpHSP70促進のルシフェラーゼ発現を測定した (図4) この分析により、二重のプロモーターの設計は、幹細胞において使用可能であり、したがって、腫瘍指向性の治療用担体として有用であることが確認された。

【実施例4】

【0043】

<被移植細胞における、インビボでのHSP70促進ホタルルシフェラーゼ発現>

高密度焦点式超音波 (HIFU) は、腫瘍および/または周辺の正常組織を非毒性温度 (約43℃) に穏やかに加温する、非侵襲的なトランスレーショナルな方法である。幾つ

10

20

30

40

50

かのモデルシステムを用いて、正常脳組織を含む組織を非毒性温度に正確に加温するHIFUの能力が実証されている(B. O'Neilら、J. Magn. Reson. Imaging 35(5):1169-1178(2012); B. O'Neilら、Ultrason. Med. Biol. 35(3):416-424(2009); K. Hynynenら、J. Acoust. Soc. Am. 132(3):1927(2012); K. HynynenおよびJ. Sun、IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control. 46(3):752-755(1999))。したがって、インビボにおいて磁気共鳴温度測定(MRT)ガイド下HIFUを安全に使用して、組換え幹細胞を非侵襲的に加温することができ、pHSP70で促進される導入遺伝子の発現を誘導できるかを検討した。この分析のために、B16黒色腫細胞をpLenti-pHSP70:FLuc/GFP-pRSV:RFPに安定的に感染させて、マウスの皮下に移植した。HIFUを用いて腫瘍組織を穏やかに加温し、生物発光シグナルを測定した。この分析により、HIFU誘導8時間後に、非常に特異的かつ強力な生物発光シグナルの誘導が見られたことが分かった(図5)。対照的に、非加熱の腫瘍では、有意なルシフェラーゼシグナルは示されず、これは、本アプローチの特異性を示すものである。

10

【0044】

皮下実験に加えて、形質導入したB16細胞をラットの脳内に頭蓋内移植し、移植後7日後に、MR温度測定でガイドしながらHIFUを用いて移植細胞を加温した。ラット死骸の分析により、生物発光シグナルが示したように(図6Aおよび6B)、MR温度測定ガイド下HIFU治療のプロトコルにより、頭蓋内細胞の加温が成功してF-Lucレポーターの発現が誘導されたことが明らかとなった。これらのデータは、MRTがHIFUの調整についてフィードバックとしての役目を果たし、目標温度をほぼ一定に維持していることを実証している。

20

【0045】

インビボでMRTガイド下HIFUが使用できることは定着しているため、レポーター構築物、pLenti-pHSP70:FLuc/GFP-pRSV:RFPを安定的に発現する移植されたB16F10黒色腫細胞における、HIFU誘導によるHSP70促進ルシフェラーゼ遺伝子発現を分析した。形質導入したB16F10細胞(5×10^5 細胞)を、胸腺欠損ヌードラットの右前頭葉に定位移植し、移植から7日後、MRTガイド下HIFUを用いて、腫瘍を30分間、43℃に加温した。HIFU誘導後8および48時間後、ラットを生物発光について画像化した(図7Aおよび7B)。生物発光の定量化(図7C)から、頭蓋内環境における画像ガイド下HIFUを用いたレポーター遺伝子誘導の実行性および特異性が明らかとなった。

30

【実施例5】

【0046】

<HSP70で促進されるsTRASL発現およびインビボにおける有効性>

GBMは、高悪性度の性質を有する上に、有力な治療薬が提供される利便性もほとんどないため、例外なく致命的な悪性腫瘍である。全身的に投与された治療薬は、通常、血液脳関門(BBB)を有意に透過する能力が制限され、その結果、中枢神経系(CNS)内で治療レベルに到達する前に、全身性毒性度の尤度が高くなっていた。局所送達などの他のアプローチは、一貫性のない送達や、腫瘍に近接する正常脳組織が一樣に高濃度に達することによる高い局所毒性に悩まされることがよくある(S. Kunwarら、Neuro. Oncol. 12(8):871-881(2010); J. Sampsonら、J. Neurosurg. 113(2):301-309(2010))。対照的に、腫瘍指向性細胞ベースの治療は、治療薬が原発腫瘍内または浸潤腫瘍細胞に近接して集まる傾向があるため、高濃度の治療薬を腫瘍の微小環境まで送達することができる(S. Kiddら、Stem Cells 27(10):2614-2623(2009); A. Nakamizoraら、Cancer Res. 65(8):3307-3318(2005))。しかし、治療薬の構成的発現に頼る細胞ベースのストラテジーでは、非腫瘍細胞を

40

50

毒性を有する可能性がある治療薬に曝露させる可能性がある。このことは、治療薬を全身的に送達した場合は特に言えることであり、それは、大量の細胞が正常組織を通過することが実証されているからである (S. Kiddら、Stem Cells 27 (10) : 2614-2623 (2009))。比較すると、本発明は、画像でガイドする一時的に標的とした腫瘍および腫瘍周囲領域においてのみ組換え幹細胞を活性化して、(例えば HSP70 プロモーターを介して) 強力な抗がん治療薬を発現させる、画像ガイド下 HIFU の使用を包含する。図 8 を参照されたい。有利なことには、ヒト頭蓋を通過して操作者が選択する深さに HIFU を送達する技術は、別の適用のために病院で用いられている (R. Medelら、Neurosurgery 71 (4) : 755-763 (2012))。

10

【0047】

HIFU 遠隔活性化プラットフォームを使用して治療薬を送達することを実証するために、可溶性 TRAIL (sTRAIL) を、GBM の治療のためのプロトタイプ治療薬として用いる。sTRAIL をコードするオープンリーディングフレームをレンチウイルス構築物に挿入して、(a) HSP70 プロモーターの制御下にある sTRAIL、および (b) 画像化レポーターとしての F-Luc を並行して発現する、pLenti-pHSP70:sTRAIL/F-Luc-pRSV:RFP (図 9) を作製した。さらに、構築物は RFP を構成的に発現するため、蛍光活性化細胞分取 (FACS) を用いて sTRAIL 発現細胞を濃縮することが可能となる。この構築物を使用して、様々なタイプの幹細胞 (例えば、MSC および NSC) を治療用ウイルス構築物に感染させる。pHSP70 制御発現および生細胞率を最大化するために、細胞を様々な温度で誘導する。(加温後 8 および 24 時間後の) 幹細胞における治療的誘導を評価するために、分泌された sTRAIL の発現を、誘導された F-Luc 発現に起因する生物発光シグナルだけでなく、ウェスタンブロット解析でも測定する。さらに、MTS/PMS 標準比色アッセイ (Promega) を用いて、pLenti-pHSP70:sTRAIL/F-Luc-pRSV:RFP で形質導入した幹細胞から得た sTRAIL 含有培地の、インビトロにおける抗腫瘍活性を決定する (A. Mintzら、J. Neurooncol. 64 (1-2) : 117-123 (2003); A. Mintzら、Neoplasia 4 (5) : 388-399 (2002); V. Nguyenら、Translational Oncology 4 (6) : 390-400 (2011); V. Nguyenら、Neuro-Oncology 14 : 1239)。加温した sTRAIL 発現幹細胞は GBM 細胞を殺滅することとなると予測される。実際に、NSC は、形質導入された後、sTRAIL を発現して培地中に分泌し、GBM 細胞を殺滅することができることが分かった (図 10A ~ 10C)。sTRAIL 発現により GBM に向かう腫瘍指向的遊走が変わらないことを確認するために、本明細書に記載の TRANSWELL 法を用いて、樹立 GBM 細胞株 (例えば、U251、U87、G48a) を用いて、形質導入した NSC および MSC の条件培地における遊走を試験する。

20

30

【0048】

インビボの分析については、浸潤同所性 GBM 腫瘍を産するラットを使用する (G. Kitangeら、J. Neurooncol. 92 (1) : 23-31 (2009); J. Sarkariaら、Mol. Cancer Ther. 6 (3) : 1167-1174 (2007); J. Sarkariaら、Clin. Cancer Res. 12 (7 Pt 1) : 2264-2271 (2006))。この臨床的に意義のあるモデルは、ヌードマウスまたはラットの側腹部へ患者の腫瘍試料を直接生着させることを含む。これらの腫瘍は、取り出して、げっ歯類の側腹部において引き続き連続継代することにより増殖/維持する。説明図のように、10 μ の LPBS 中の 1×10^6 個のヒト GBM 細胞を胸腺欠損ラットに頭蓋内移植した。定位注入は、30 ゲージ針の 10 μ L シリンジ (Hamilton Co., Reno, NV) を用いて行い、穿頭孔を通して 3.5 mm の深さに挿入し、デジタル定位装置 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) に載せた。外科用ドリル (Harvard Apparatus、

40

50

H o l l i s t o n、M A) を使って、頭皮切開全体の冠状縫合の正中線の左1.5～2 mmおよび後方1～1.5 mmに、5 mmの穿頭孔を開けた。注入速度は2 μ L/分で、注入完了から6秒後に針を抜いて、切開を縫合した。頭蓋内腫瘍移植から約25日後、各動物を7テスラ小動物用MRIシステム(Bruker BioSpin、Ettlinger、Germany)で画像化した(図11)。コントラスト強調のために、Gd-DTPAを5～7秒を超える時間をかけて尾静脈注射(0.05～2.5 mmol/kg)により投与した後、T1強調画像を得た。この分析により、ヒトGBM腫瘍をラット脳内で発生させることが明らかとなった。

【0049】

モニタリングを容易にするために、ウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼを発現するGBM細胞(GenTarget、San Diego、CA、から購入したウイルス粒子)を用いて、生物発光により非侵襲的に頭蓋内腫瘍形成を測定する。ウミシイタケルシフェラーゼ(RLuc)は、F-LucレポーターのpHSP70誘導を画像化するのに用いるルシフェリン基質とは異なり、セレンテラジンを触媒する。これらの違うルシフェラーゼは、異なる基質を使用するため、2つの別々のプロセス(幹細胞でのpHSP70活性化に対するF-Lucと、腫瘍細胞増殖に対するR-Luc)で評価する。浸潤同所性GBM腫瘍を産するラットに、腫瘍移植から約20日後、sTRAILを発現するように形質転換した幹細胞を注入し、腫瘍の増殖を画像化して確認する(生物発光および/またはMRI)。sTRAILを分泌する幹細胞の抗腫瘍効果は、移植腫瘍に対して様々な場所で、様々な量の組換え幹細胞(1～10 $\times$ 10⁶)を注入することにより決定する。例えば、sTRAILまたは対照(レポーター構築物で形質導入した)を発現するようにFACSで濃縮した組換え幹細胞を、同じ注入部位を用いて直接腫瘍に注入し、腫瘍移植として同等にする。これによって、抗腫瘍効力、および腫瘍部位で治療効果が見られる必要最少細胞数を実証する。さらに、別々のラット群に、腫瘍部位から3 mm、腫瘍部位の対側、および全身的に、組換え幹細胞(または対照)を注入する。幹細胞移植から48時間後、HIFUを用いて標的部位を約43℃に加温する。HIFU加温を厳密に制御して実行するために、MRI/MR温度測定ガイド下HIFUシステム(RK100、FUS Instruments Inc.、Toronto、CA)を用いて、強力な超音波エネルギーをラット脳へ送達して、pHSP70を誘導する。このシステムは、経頭蓋の治療、薬物送達および活性化などの適用に対し、強力な連続超音波処理(熱凝固)からパルス超音波処理までの範囲の超音波曝露を送達することができる。このシステムのプローブは、中心周波数が1 MHzで、焦点スポットのサイズが直径約1～2 mmおよび長さ5～6 mmの、球状に収束する超音波トランスデューサーである。処置の間、SiemensのSkyra 3Tスキャナーの寝台上で、焦点スポットをラット右上頭蓋(腫瘍部位)に対して設定した。焦点スポット周囲の音響強度およびHIFU誘導温熱療法は、MR温度測定を用いて制御し、リアルタイムでモニターする。MR温度測定により、5秒毎の1.88 $\times$ 1.88 $\times$ 5 mm³の空間分解能で、リアルタイム温度マッピングができる。MR温度測定で非侵襲的に得たリアルタイム温度マッピングを、さらに、MR両立式光ファイバー温度計でキャリブレーションする。

【0050】

pHSP70活性化は生物発光を画像化して確認し、またsTRAIL発現は免疫組織化学法を用いて確認する。生物発光の画像化については、F-Luc基質であるD-ルシフェリン150 mg/kgをラットに静注した後、すぐにIVIS生物発光スキャナー(PerkinElmer)上で加温後の画像化を行う。加温および非加温の腫瘍全体でROIを描出して、定量化する。生物発光に加え、HIFU処置後の一定時点(0、12、24および48時間後)にラットの垂集団を屠殺した後、注入された幹細胞がpHSP70誘導GFPの発現に加えてRFPを構成的に発現するので、多色蛍光顕微鏡を用いて、腫瘍に対する注入幹細胞の位置を特定する。誘導の測定は、非活性化幹細胞によっても構成的に発現されるRFPを発現する幹細胞と比較した、誘導されたGFP発現細胞の比を算出することにより行った。ラットの正常脳組織および腫瘍において、43℃の温度を

10

20

30

40

50

正確に調節できることが予想される。

【0051】

活性化幹細胞による治療的発現の確認後、s T R A I Lを発現する幹細胞の腫瘍増殖への効果を（レポーターだけで形質導入された、または非加温の対照と比較して）評価する。抗腫瘍効果は、M R Iによる腫瘍体積（週毎）、生物発光（週毎）、および生存率（カプランマイヤー法）を測定して、注入後最大200日間モニターする。さらに、動物は、治療後、幹細胞注入またはH I F U処置により生じる予期せぬ臨床的帰結がないことを確認するために、3回／週、モニターする。レポーター遺伝子で感染させた幹細胞または非加温幹細胞と比べて、H S P 7 0プロモーター制御下でs T R A I Lを発現する幹細胞のみが抗腫瘍活性を示すことが予想される。

10

【実施例6】

【0052】

<組換え幹細胞のサイトカイン産生および遊走の温熱制御>

腫瘍指向性遊走の特性により、幹細胞は、単離した腫瘍に対する、および転移性疾患に対する有効な標的治療を送達する担体として働くことができる。例えば、ヒト間葉系幹細胞は、インターフェロン β 、S-T R A I Lおよび腫瘍退縮ウイルスを含む生物学的抗グリオーマ剤を、生存優位性を示しつつ、グリオーマに送達するよう形質転換されている。腫瘍に対する幹細胞療法の治療的効果は、送達部位から移行して腫瘍領域に到達する幹細胞の数に依存する。さらに、幹細胞の遊走は、サイトカインの分泌に大きく影響をされる。例えば、間葉系幹細胞の遊走は、様々なサイトカイン／受容体のペア、S D F - 1 / C X C R 4、S C F / c - K i t、H G F / c - M e t、V E G F / V E G F R、P D G F / P D G F R、M C P - 1 / C C R 2、およびH M G B 1 / R A G Eに依存する。ストロマ細胞由来因子1（S D F - 1）およびその受容体であるC X C ケモカイン受容体-4（C X C R 4）は、腫瘍へ神経幹細胞を動員する重要な仲介物質である。遺伝子操作によるストラテジーを用いることにより、腫瘍組織におけるサイトカイン発現を制御して、幹細胞遊走を誘引することができる。腫瘍組織への幹細胞送達を増強することができると、治療効果の達成に必要な幹細胞数はかなり減ると考えられ、おそらく患者により良好な転帰をもたらすであろう。これに関しては、本組成物および方法は、標的部位に集まった幹細胞内での特定のサイトカインの産生の誘導を、空間的かつ時間的に制御することができる。産生されたサイトカインにより、より多くの組換え幹細胞が標的部位に誘引されて効果の増幅を導くことを意図している。

20

30

【0053】

サイトカイン産生の制御を実証するために、N S CおよびM S Cをp L e n t i - H S P 7 0（F-L u c - 2 A - サイトカイン）- R S V（R F P - B S D）で形質導入して（図12A）、プラストサイジン抵抗性についてスクリーニングした。プラストサイジン抵抗性N S CおよびM S Cは、持続的に赤色蛍光を示した（図12B）。H S P 7 0促進サイトカインをコードする組換え細胞を、ヒートブロック、超音波または赤外光により20分間、43℃に加温して、サイトカイン（T N F α 、V E G FまたはT G F β 1）の発現を誘導した（図13）。その後、組換え細胞をT R A N S W E L Lチャンバーの下側コンパートメントのウェルに播種し、G F P発現N S CおよびM S Cを上側コンパートメントに播種した。下側コンパートメントへ遊走した細胞を、蛍光顕微鏡下でカウントした。図14に示したように、温熱誘導したh M S C（すなわち、サイトカイン発現細胞）は、非誘導の対照h M S Cに比べて、幹細胞のT R A N S W E L Lの上側コンパートメントからプレートへの遊走を有意に誘引した。同様に、温熱誘導したN S C（すなわち、サイトカイン発現細胞）は、誘導していない対照のN S Cに比べて、T R A N S W E L Lの上側コンパートメントからプレートへのN S Cの遊走を有意に誘引した（図15）。

40

【実施例7】

【0054】

<治療用幹細胞の第二増幅波を誘引するサイトカインの使用>

幹細胞の腫瘍指向性遊走は、腫瘍が分泌する可溶因子により仲介される（A. B e l m

50

adaniら、J. Neurosci. 26 (12) : 3182-3191 (2006))。したがって、これら遊走促進性因子を分泌する組換え幹細胞は、組換え幹細胞の第二波の腫瘍への遊走を誘導することができる。したがって、幹細胞の第一波は、HIFU制御下で幹細胞を誘引するケモカイン／サイトカインを選択的に発現するように作製する。いったんこの第一波が腫瘍に到達すると、HIFUを使用して、遊走促進性可溶性因子を腫瘍内および腫瘍周辺で発現させるように、幹細胞を一時的に誘導する。この誘導された可溶因子は、その結果、腫瘍単独の場合に考えられるよりも効果的に、治療用に遺伝子操作された幹細胞の第二波を腫瘍近傍に有意に誘引し、よって、幹細胞の第二波が有する治療能力を増幅させる。例証として、幹細胞遊走を誘引するサイトカインとしてTNF α を使用するが、なぜならば、(i) TNF α は、周知の炎症性因子であり、幹細胞を効果的に誘引することが知られている (G. Kitangeら、J. Neurooncol. 92 (1) : 23-31 (2009) ; J. Sarkariaら、Mol. Cancer Ther. 6 (3) : 1167-1174 (2007) ; J. Sarkariaら、Clin. Cancer Res. 12 (7 Pt 1) : 2264-2271 (2006))、(ii) TNF α は、BBBを開放する可能性を有する (N. Tsaoら、J. Med. Microbiol. 50 (9) : 812-821 (2001) ; R. Reyesら、J. Neurosurg. 110 (6) : 1218-1226 (2009) ; J. Mullinら、Cancer Res. 50 (7) : 2172-2176 (1990) ; M. Lopez-Ramirezら、J. Immunol. 189 (6) : 3130-3139 (2012))、そして(iii) pHSP70で制御される構築物は、インビトロにおいてNSCを殺滅することなくNSC遊走を効率的に増大させるからである (図15)。したがって、TNF α をコードする幹細胞の第一波は、腫瘍に向かう幹細胞遊走の第二波を誘引して増幅させることができる。TNF α に加えて、他の炎症性因子、例えばSDF-1 (K. Carbajalら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 (24) : 11068-11073 (2010) ; J. Imitolaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (52) : 18117-18122 (2004)) ; 腫瘍関連増殖因子、例えば散乱因子／肝細胞増殖因子 (SF/HGF) 、TGF α および線維芽細胞増殖因子 (FGF) (O. Heeseら、Neuro-Oncol. 7 (4) : 476-484 (2005)) ; ならびにPDGF-BB、RANTES、I-TAC、NAP-2、GRO α 、Ang-2およびM-CSFなどの内皮細胞由来化学誘引物質 (N. Schmidtら、Brain Res. 1268 : 24-37 (2009)) を、インビボにおける治療用幹細胞の第二波の誘引に用いることができる。

【0055】

サイトカインが組換え幹細胞の第二波の遊走能を増幅する効果を、TNF α を発現するウイルスで感染させた細胞からの条件培地を用いてインビトロにおいて実証した。HSP70プロモーターの制御下TNF α をコードするレンチウイルスを作製した。pLenti-pHSP70:TNF α /FLuc-pRSV:RFPと名付けたこのベクターを (図12Aを参照されたい) 、SF767ヒト膠腫瘍細胞に形質導入した。組換えSF767細胞を43℃で30分間穏やかに加温してTNF α 発現を誘導した後、培地中へのTNF α の分泌が認められた。 (図16A) 。さらに、pLenti-pHSP70:TNF α /FLuc-pRSV:RFPベクターに感染させたこれらの温熱活性化細胞から調製した条件培地は、温熱誘導していない細胞からの対照条件培地と比較して、一方向性のNSC遊走を有意に増大させたことが実証された (図16B) 。

【実施例8】

【0056】

<追加的な全身的治療に対してBBBを限局的に透過化するためのHIFU誘導サイトカイン産生の使用>

GBMの治療に対する障害の一つは、治療薬が腫瘍BBBをほとんど通過できないことである。サイトカインおよびケモカインは、腫瘍が関連したBBB通過に重大な影響を及

ばしうること、また、BBBに排除されることを理由に、現在はGBM治療に使用されていない有効な抗がん療法の利用を可能にすることが分かっている(N. Tsa oら、J. Med. Microbiol. 50(9):812-821(2001); R. Reyesら、J. Neurosurg. 110(6):1218-1226(2009); J. Mullinら、Cancer Res. 50(7):2172-2176(1990); M. Lopez-Ramirezら、J. Immunol. 189(6):3130-3139(2012))。したがって、GBM腫瘍領域において、組換え幹細胞によるHIFU活性化促進性炎症性因子産生を用いることにより、BBB透過性、および全身的に投与した薬剤の腫瘍内濃度を有意に増大させることができる。重要なことには、組換え幹細胞からのサイトカイン発現を制御する、厳密に制御されたHIFU誘導は、短時間かつ制御可能な誘導により、意図しない有害作用または腫瘍増殖の助長が生じる可能性をより低く抑えるため、このアプローチを可能とする。

【0057】

ホタルルシフェラーゼ(F-Luc)および腫瘍壊死因子アルファ(TNF α)の発現を促進する温熱誘導性HSP70プロモーター、ならびに赤色蛍光タンパク質(RFP)およびプラストサイジン選択マーカー(BSD)の発現を促進するRSVプロモーターを含む、レンチウイルス発現プラスミド、pLenti-Hsp70(F-Luc-2A-TNF α)-RSV(RFP-BSD)(図17A)を構築した。間葉系幹細胞(MSC)を、レンチウイルスベクター(GenTarget, San Diego, CA)を用いて、このプラスミド構築物で形質導入して遺伝子操作した。インビトロにおいて、ウォーターバスを用いて、TNF α の温熱活性化遺伝子発現を確かめ、温度および継続時間について最適化した。インビボの研究について、Hsp70(F-Luc-2A-TNF α)-RSV(RFP-BSD)で形質導入したMSCを胸腺欠損ヌードラットの脳内に定位置移植した(ラット1匹あたり 1×10^6 細胞)。細胞移植から2日後、注入部位の領域を、MRIガイド下HIFUによって、30分間、43℃に加温し、TNF α 発現を誘導した。ルシフェラーゼ発現は、ルシフェリン注入後、生物発光によりモニターした。48時間後、MRI造影剤(Magnevist, 0.125mmol/kg)を尾静脈より静注した後、T1強調画像上でBBBの開放を確認した。HIFU処置していないMSCs-HSP70(Luc-2A-TNF α)を移植したラット、およびHIFU処置したMSCs-HSP70(Luc-2A-GFP)を移植したラットを、対照として用いた。

【0058】

MSCは、pLenti-Hsp70(F-Luc-2A-TNF α)-RSV(RFP-BSD)による形質導入を成功させた後、プラストサイジンでスクリーニングした。遺伝子操作されたMSC細胞は、定常的に赤色蛍光を示した(図17B)。HSP70で促進される導入遺伝子発現は、温度および継続時間に強く依存した。43℃、15分間の活性化で、TNF α およびF-Lucの発現は最大となった(図17C)。次に、遺伝子操作されたMSCをラット脳内に定位置移植した後、MRIガイド下HIFUで活性化した。図18Aに示したように、43℃、20分間のHIFU処置したHSP70(Luc-2A-GFP)移植ラットまたはMSCs-HSP70(Luc-2A-TNF α)移植ラットは、HIFU処置しなかったMSCs-HSP70(Luc-2A-TNF α)移植ラットに比べて、脳内で有意により強い生物発光シグナルを示した。対象領域の定量化より、HIFU活性化後、ラット脳内のF-Luc発現は10倍高いことが分かった。生物発光画像化に続き、MR造影剤を尾静脈注入して、コントラストを強調したT1強調画像でBBB透過性の変化をモニターした。HIFU処置したMSCs-HSP70(Luc-2A-TNF α)移植ラットの脳の標的領域で、対照と比べて、MRIシグナルの有意な増強が観察された(図18B)。対象領域の定量化より、対照と比べて、MRIシグナル強度が3倍高いことが実証され、これは、HIFU処置したMSCs-HSP70(Luc-2A-TNF α)移植ラットの脳におけるMRI造影剤に対するBBB透過性が増大したこと($P < 0.01$)を示している(図19)。

【0059】

前述は、本発明を例証するものであって、それらを限定するものとして解釈されるものではない。本発明は、特許請求の範囲に含まれるその同等物と共に、以下の特許請求の範囲により定義される。

【図1A】

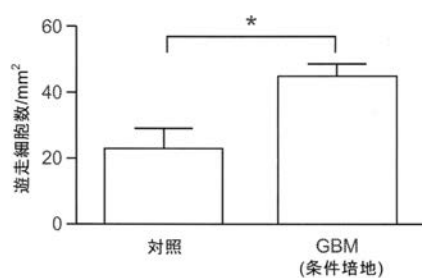
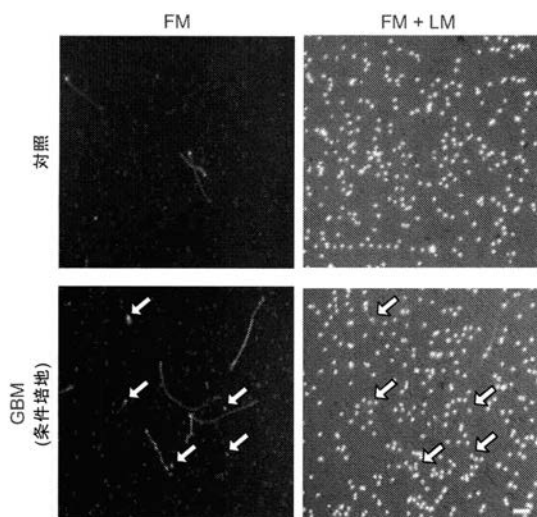


FIG. 1A

【図1B】

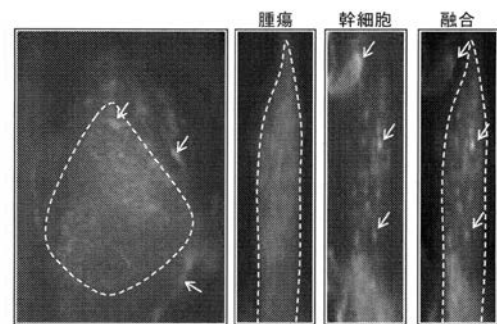


FIG. 1B

【図2A】



FIG. 2A

【図 2 B】

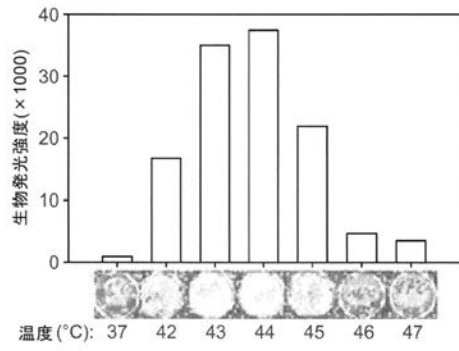


FIG. 2B

【図 3 A】

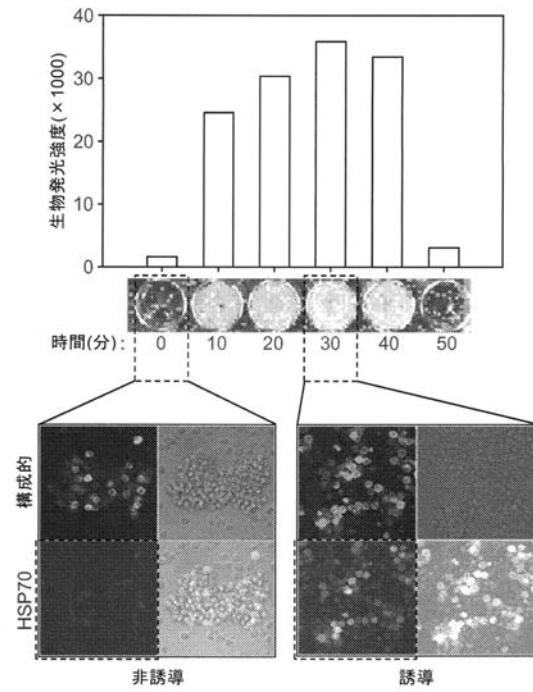


FIG. 3A

【図 3 B】

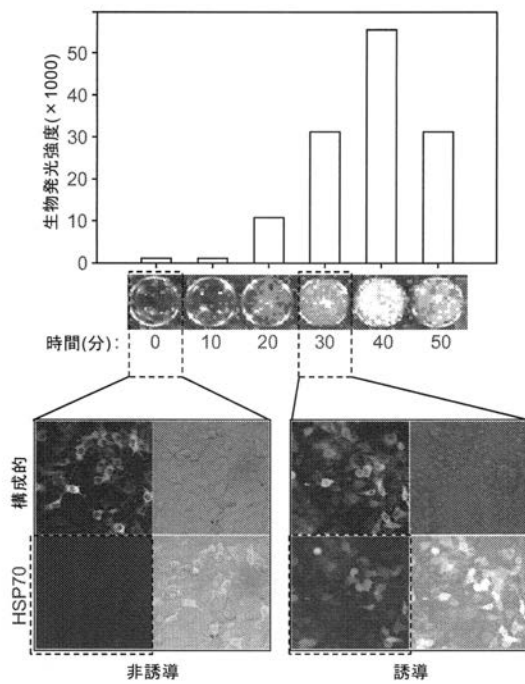


FIG. 3B

【図 4】

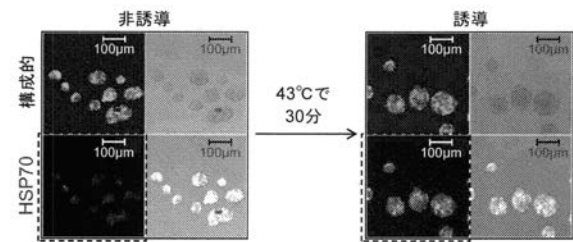
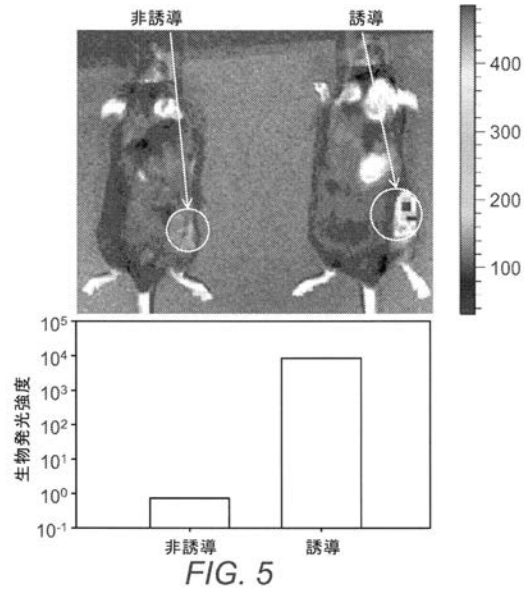
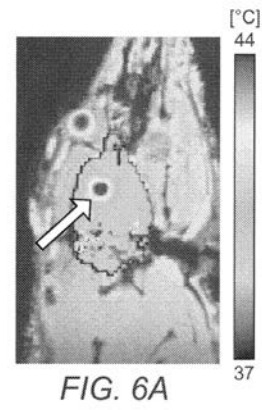


FIG. 4

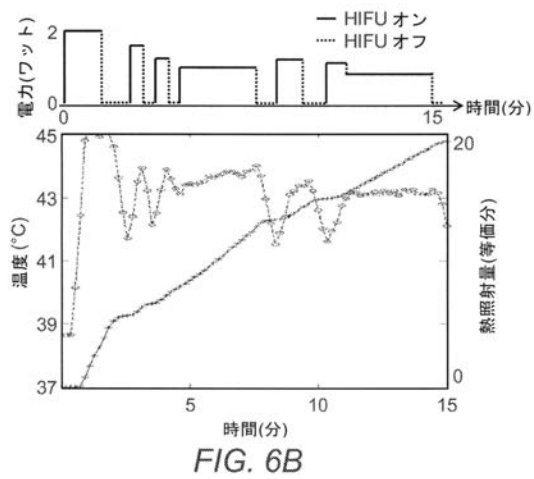
【図 5】



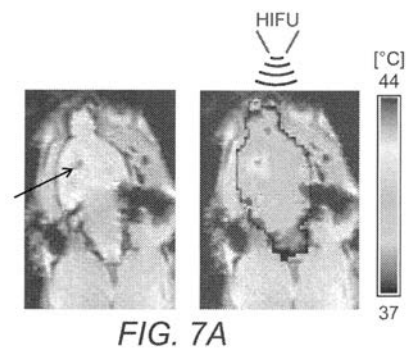
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 7 A】



【図 7 B】

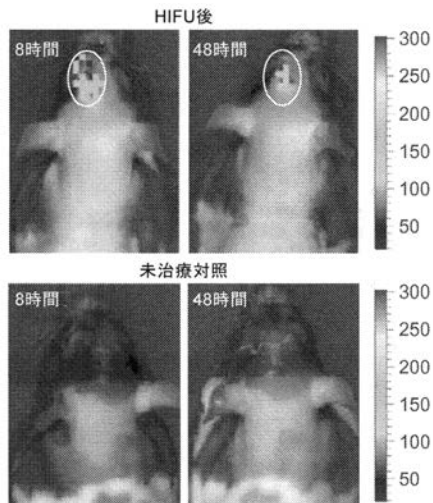


FIG. 7B

【図 7 C】

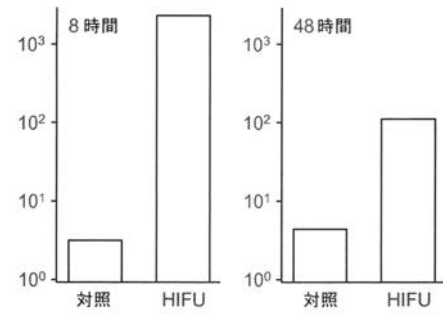


FIG. 7C

【図 8】

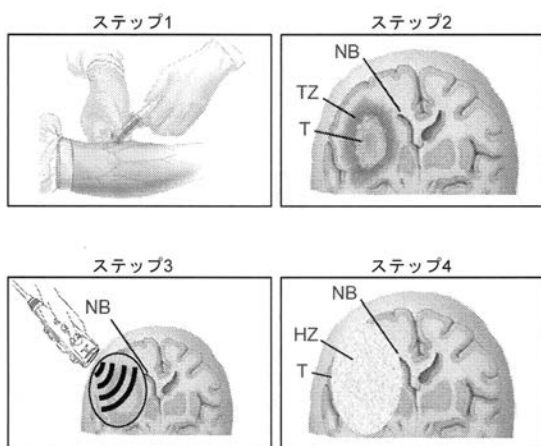


FIG. 8

【図 10 A. 10 B. 10 C】

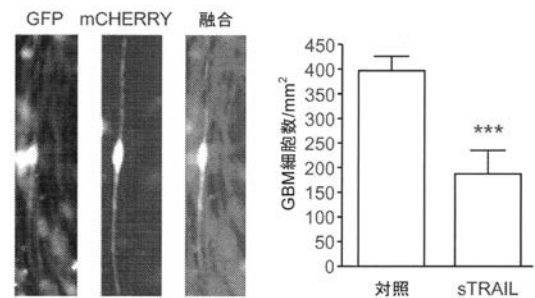


FIG. 10A

FIG. 10B

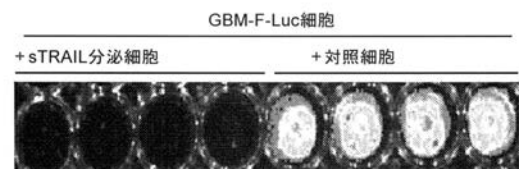


FIG. 10C

【図 9】



FIG. 9

【図 1 1】

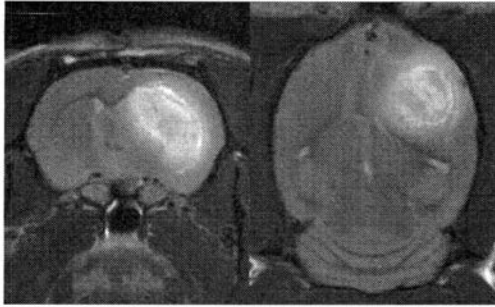


FIG. 11

【図 1 2 A】



FIG. 12A

【図 1 2 B】

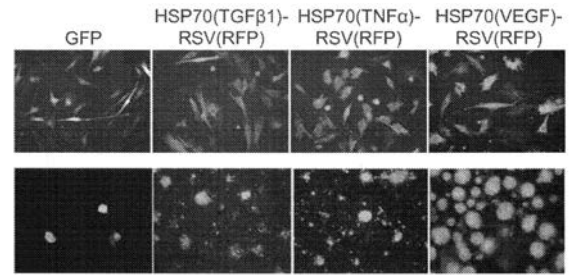


FIG. 12B

【図 1 3】

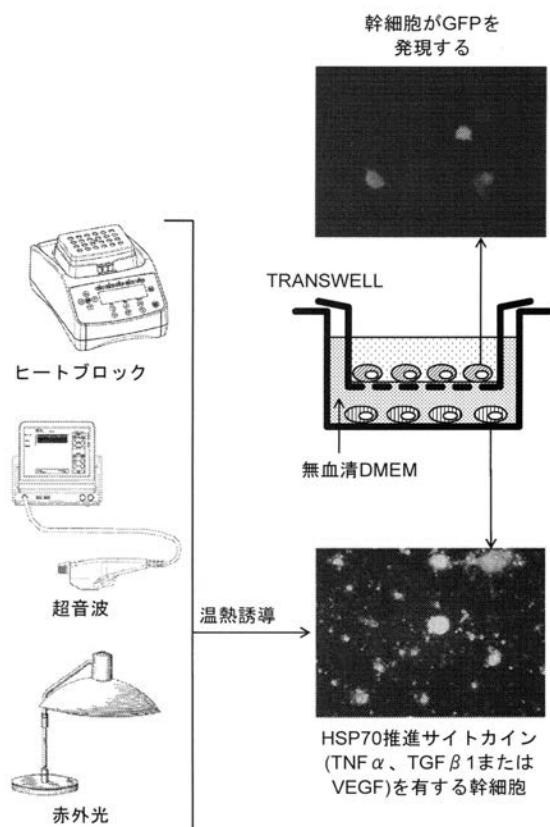


FIG. 13

【図 1 4】

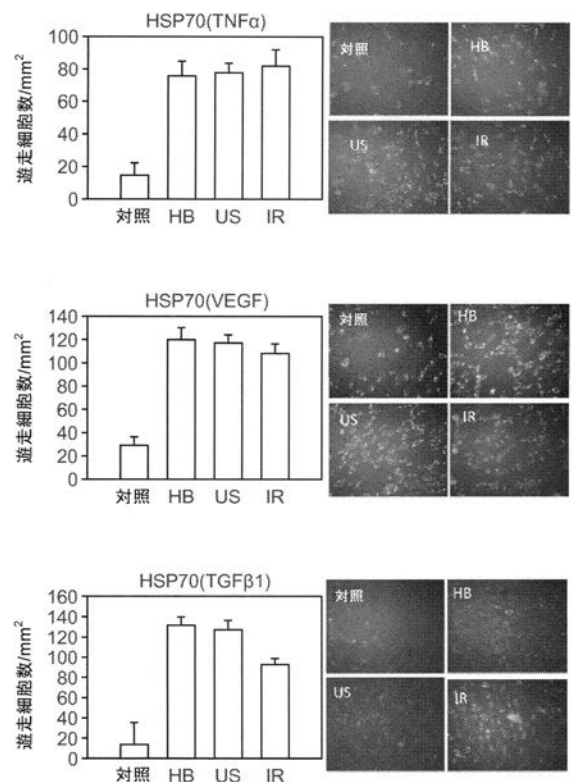


FIG. 14

【図 15】

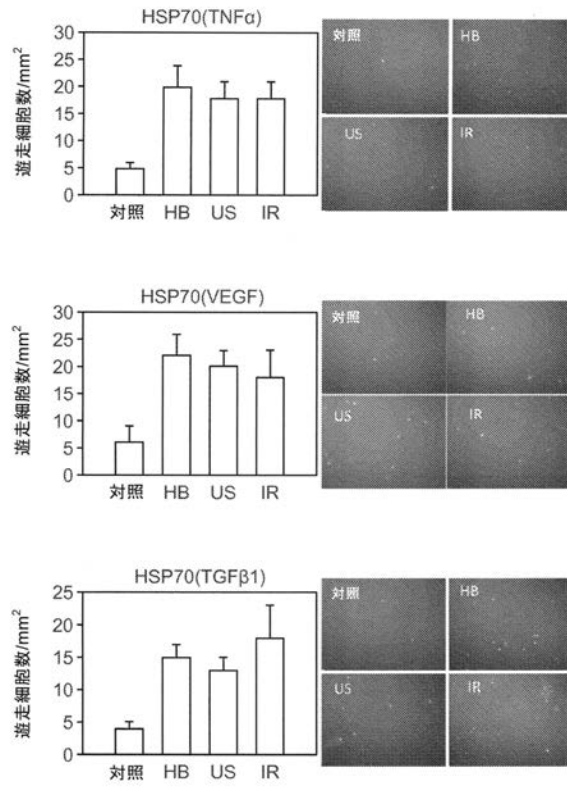


FIG. 15

【図 17 A】

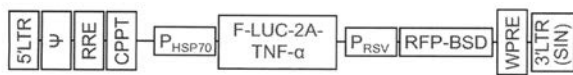


FIG. 17A

【図 17 B】



FIG. 17B

【図 16 A】

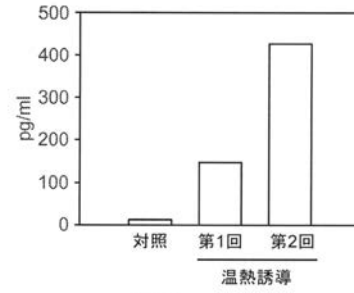


FIG. 16A

【図 16 B】

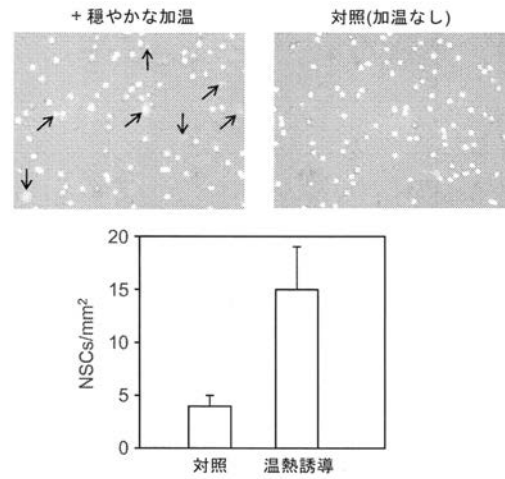


FIG. 16B

【図 17 C】

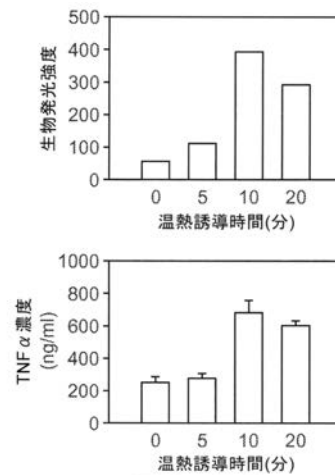


FIG. 17C

【図 18 A】

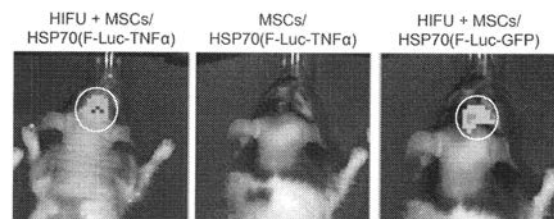


FIG. 18A

【図 18 B】

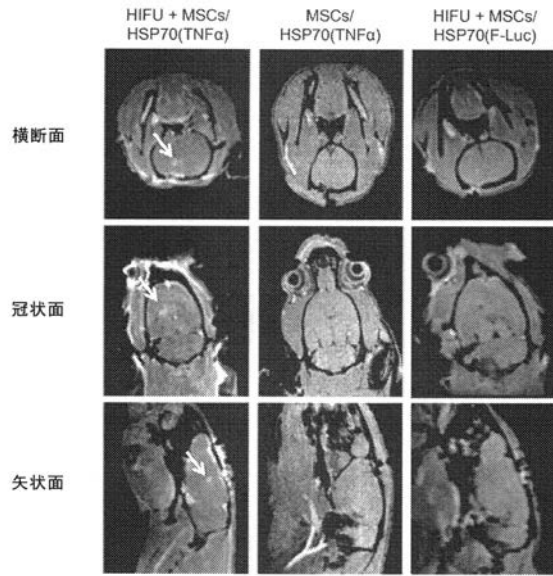


FIG. 18B

【図 19】

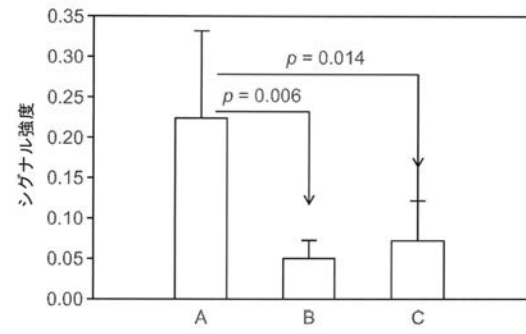


FIG. 19

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/11171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00, A61K 48/00, C07H 21/04 (2015.01) CPC - A61K 38/00, A61K 48/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 39/00, A61K 48/00, C07H 21/04 (2015.01) CPC: A61K 38/00, A61K 48/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/185.1, 514/44R, 536/23.5 (text search, terms limited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, PubWEST, Google Scholar, Google Patents: Heat, promoter, HSP70, HSP90, HSP60, HSP27, HSP25, ubiquitin promoter, growth arrest gene promoter, DNA damage gene promoter, bradykinin, thrombin, endothelin-1, substance P, platelet activating factor, macrophage inflammatory protein, complement-derived polypeptide C3a-desArg, blood brain barr		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/0213185 A1 (HONG et al.) 4 September 2008 (04.09.2008); para [0147], [0078], [0084]	1-2
Y		3-5
Y	US 2003/0045495 A1 (LI et al.) 6 March 2003 (06.03.2003); [0012]	3, 4/3, 5/3
Y	WO 2005/017165 A1 (PHILLIPS et al.) 24 February 2005 (24.02.2005); abstract	4
Y	US 5,112,596 A (MALFROY-CAMINE) 12 May 1992 (12.05.1992); abstract	5
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 May 2015 (05.05.2015)		Date of mailing of the international search report 24 JUN 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/1171

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-10, 16-21, 26-33, 37-47, 52-57
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-5, directed to a recombinant nucleic acid comprising a heat inducible promoter operatively associated with a chemokine or a blood-brain barrier opening protein.

Group II, claims 11-15, 22-25, 34-36 and 48-51, directed to a method of treating a tissue or increasing blood-brain barrier permeability in a subject in need thereof, comprising (a) administering to the subject preconditioned stem cells that migrate to said tissue.

- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-5

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/11171

Continuation of:

The inventions listed in Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I includes the special technical feature of a composition comprising a recombinant nucleic acid, not required by Group II.

Group II comprises a special technical feature of preconditioned stem cells that migrate to injured tissue, not required by Group I.

Common Technical Features

Groups I and II are related to each other as a composition (Group I) and a method of using the composition (Group II) and share the technical feature of a nucleic acid encoding a stem-cell attracting chemokine operably associated with a heat-inducible promoter, and a nucleic acid encoding a barrier-opening protein or peptide operably associated with a heat-inducible promoter. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are being obvious by US 2008/0213185 A1 to Hong et al. (hereinafter 'Hong') in view of WO 2005/017165 to Phillips et. al. (hereinafter 'Phillips').

Hong teaches a recombinant nucleic acid, said recombinant nucleic acid comprising:

(a) a heat-inducible promoter operatively associated with

(b) a nucleic acid encoding an active agent, wherein said active agent is (i) a blood-brain barrier opening protein or peptide (para [0147] 'In expression vectors, the introduced DNA is operably-linked to elements such as promoters that signal to the host cell to transcribe the inserted DNA. Some promoters are exceptionally useful, such as inducible promoters that control gene transcription in response to specific factors. Operably-linking a composition polynucleotide to an inducible promoter can control the expression of the Neisseria/AAEAP transit peptide composition polypeptide or fragments. Examples of classic inducible promoters include those that are responsive to alpha-interferon, heat shock, heavy metal ions, and steroids such as glucocorticoids (Kaufman, Methods Enzymol. 185:487-511 (1990)) and tetracycline.'; [0078] 'The present invention relates to methods and materials for delivering a cargo compound across the blood-brain barrier (BBB) and/or into brain cancer cells, and materials and methods for the treatment of cancer of the mammalian brain, as well as other conditions of the brain and central nervous system. As disclosed herein, it is now known that peptide regions composed of repeats of the motif AAEAP (SEQ ID NO: 25) will allow associated or fused peptides and other cargo compound to be transported across the blood-brain barrier and/or into mammalian brain cancer cells.'; [0084] 'The present invention relates to methods and materials for delivering a cargo compound across the blood-brain barrier into the brain and/or into brain cancer cells. Delivery of the cargo compound according to this invention is accomplished by the use of a suitable transit peptide. In one embodiment of the invention, the cargo compound is linked to a Neisseria or AAEAP transit peptide of the invention.'), however Hong fails to teach (i) a stem cell

attracting chemokine.

Phillips teaches a stem cell-attracting chemokine (abstract 'A stem cell-attracting chemokine is expressed in damaged tissue using a stimulus-responsive vector system. The stimulus can be a physiological stimulus associated with cell injury, such as hypoxia or elevated glucose levels, for example. Expression of the chemokine increases the trafficking of stem cells to the damaged tissue.'). In light of the fact that a stem cell attracting chemokine increases the trafficking of stem cells to damaged tissue, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize the heat-inducible promoter taught by Hong in order to direct and control the expression of a stem cell attracting chemokine in a damaged tissue.

As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

Therefore, the inventions of Group I-II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	38/43	(2006.01)	A 6 1 K 37/48
A 6 1 K	38/46	(2006.01)	A 6 1 K 37/54
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
C 0 7 K	14/52	(2006.01)	C 0 7 K 14/52

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

(74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100166268
弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379
弁理士 徳本 浩一

(74)代理人 100180231
弁理士 水島 亜希子

(72)発明者 リー, キン
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27104, ウィンストン-セイラム, シダー・ヒルズ・コート 5211

(72)発明者 ミンツ, アキヴァ
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27410, グリーンズボロ, フォックス・ホロウ・ロード 1525

(72)発明者 ション, シャオビン
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27023, ルイスヴィル, コヴィントン・プレイス 149

(72)発明者 チョン, ヨンギョ
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27012, クレモンズ, モントーク・コート 106

(72)発明者 スン, ヤオ
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27012, クレモンズ, グレンギャリフ・ロード 8101

Fターム(参考) 4B065 AA90X

4C084 AA02 AA13 AA19 BA44 DA32 DA33 DA34 DC01 DC02 NA05
NA14 ZB261 ZB262

4C087 AA01 AA02 BC83 NA13 ZB26

4H045 AA10 AA30 CA40 DA01 EA20 EA22 FA74