

(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2013-515731
(P2013-515731A)

(43) 公表日 平成25年5月9日(2013.5.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-546121 (P2012-546121)
 (86) (22) 出願日 平成22年12月20日 (2010.12.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年8月14日 (2012.8.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/061344
 (87) 国際公開番号 W02011/079077
 (87) 国際公開日 平成23年6月30日 (2011.6.30)
 (31) 優先権主張番号 61/289,681
 (32) 優先日 平成21年12月23日 (2009.12.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/309,777
 (32) 優先日 平成22年3月2日 (2010.3.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

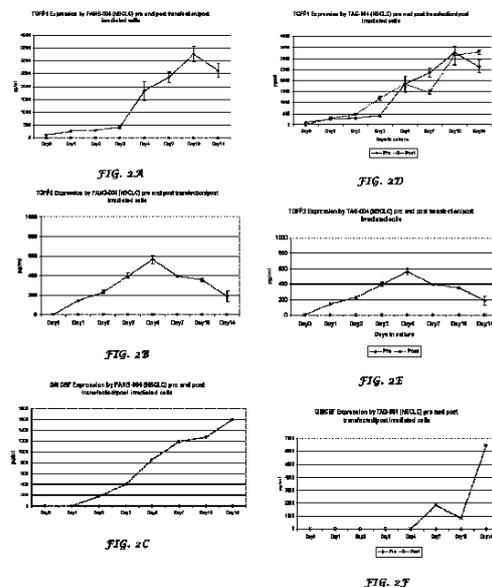
(71) 出願人 510285779
 グラダリス インク.
 GRADALIS, INC.
 アメリカ国 テキサス75006 キャロ
 ルトン スイート110 ゴールデンベア
 ードライブ2545
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (74) 代理人 100102255
 弁理士 小澤 誠次
 (74) 代理人 100096482
 弁理士 東海 裕作
 (74) 代理人 100123168
 弁理士 大▲高▼ とし子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フェーリンノックダウン及びGM-CSF増強 (FANG) 癌ワクチン

(57) 【要約】

本発明は、癌治療のための組成物及び方法を包含する。より具体的には、本発明は、フェーリンノックダウン及びGM-CSF発現のために遺伝的に改変された自家癌ワクチンについて記載する。本明細書に記載されているワクチンは、二機能性 shRNA の使用により TGF- β の免疫抑制活性を減衰させて、癌細胞におけるフェーリンの発現をノックダウンし、GM-CSF 導入遺伝子の発現によって腫瘍抗原発現、提示及びプロセッシングを増強させる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) cDNA をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸挿入及び

フューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸挿入

を含む bisshRNA フューリン / GMCSF 発現ベクタープラスミドと、

1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントと

を含むワクチン組成物。

10

【請求項 2】

GM-CSF がヒトのものである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

shRNA が、siRNA (切断依存的) 及び miRNA (切断非依存的) モチーフを組み入れている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

shRNA が、切断依存的及び切断非依存的の両方であるフューリン発現阻害因子である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

shRNA が、二機能性 shRNA としてさらに定義される、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 6】

ピコルナウイルス 2A リボソームスキップペプチドが、第一及び第二の核酸挿入間にインターカレートしている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

プロモーターが CMV 哺乳類プロモーターである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

CMV 哺乳類プロモーターが、CMV IE 5' UTR エンハンサー配列及び CMV IE イントロン A を含有する、請求項 7 に記載の組成物。

30

【請求項 9】

shRNA の標的となる領域が、フューリン mRNA 転写産物の 3' UTR 領域配列である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

shRNA の標的となる領域が、フューリン mRNA 転写産物のコード領域である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

癌の症状の予防、治療及び / 又は寛解を必要とする患者を同定するステップと、

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) cDNA をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸挿入及びフューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸挿入を含む bisshRNA フューリン / GMCSF 発現ベクタープラスミド、並びに 1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントを含む自家細胞ワクチンを投与するステップと

40

を含むことにより、患者における癌の症状を予防、治療及び / 又は寛解させる方法。

【請求項 12】

1 又は 2 以上の癌細胞におけるトランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF-β) 又は TGF-β 及び GM-CSF のレベルを測定することにより療法の進行をモニターするステップであって、TGF-β レベルの低下及び GM-CSF レベルの上昇が療法の

50

成功を示すステップと、

前記 TGF- β 及び GM-CSF のレベルに基づき自家細胞ワクチンの投与を変更するステップと

をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

TGF- β が、TGF- β 1、TGF- β 2 及び TGF- β 3 のうち少なくとも 1 種類から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

癌が、メラノーマ、非小細胞肺癌、胆嚢癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、肝癌、肝癌転移及びユーイング肉腫からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 15】

shRNA が、siRNA (切断依存的) 及び miRNA (切断非依存的) モチーフを組み入れている、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

shRNA が、切断依存的及び切断非依存的両方のフェーリン発現阻害因子である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 17】

shRNA が、二機能性 shRNA としてさらに定義される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 18】

GM-CSF cDNA をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート及び

20

フェーリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフェーリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサート

を含む bisshRNA フェーリン / GM-CSF 発現ベクタープラスミドと、

1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントと

を含む、自家フェーリンノックダウン及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 増強 (FANG) 癌ワクチン組成物。

30

【請求項 19】

組成物が、癌の症状の予防、治療及び / 又は寛解に用いられ、前記癌が、メラノーマ、非小細胞肺癌、胆嚢癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、肝癌、肝癌転移及びユーイング肉腫からなる群から選択される、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

NSCLC の症状の予防、治療及び / 又は寛解を必要とする患者を同定するステップと、

GM-CSF cDNA をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、及びフェーリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフェーリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含む bisshRNA フェーリン / GM-CSF 発現ベクタープラスミド、並びに 1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントを含む FANG ワクチンを投与するステップと

40

を含む、フェーリンノックダウン及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 増強 (FANG) 癌ワクチンの投与により、患者における非小細胞肺癌 (NSCLC) の症状を治療、予防及び / 又は寛解させる方法。

【請求項 21】

1 又は 2 以上の NSCLC 細胞におけるトランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β ベータ又は TGF- β) 及び GM-CSF のレベルを測定することにより療法の進行を

50

モニターするステップであって、TGF- β レベルの低下及びGM-CSFレベルの上昇が療法の成功を示すステップと、

前記TGF- β 及びGM-CSFのレベルに基づき自家細胞ワクチンの投与を変更するステップと

をさらに含む、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

TGF- β が、ヒトTGF- β 1、TGF- β 2及びTGF- β 3のうち少なくとも1種類から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

1又は2以上の癌細胞を患者から無菌的に収集するステップと、

前記収集した細胞を無菌容器内の抗生物質溶液中に置くステップと、

前記収集した溶液から細胞懸濁液を生成するステップであって、前記細胞懸濁液の生成が酵素による解体、機械的脱凝集又は両者によって達成されるステップと、

前記細胞懸濁液を電気穿孔することによって前記細胞を遺伝的に改変し、GM-CSFcDNAをコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、及びフューリンをコードするmRNA転写産物の領域とハイブリダイズして、これによりRNA干渉を介してフューリン発現を阻害できる1又は2以上の低分子ヘアピン型RNA(sHsRNA)をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含むbisHsRNA^{フューリン}/GMCSF発現ベクタープラスミドを有するワクチンを作製するステップと、

前記ワクチンを収集するステップと、

前記ワクチンに放射線照射するステップと、

前記ワクチンを凍結するステップと

を含む、フューリンノックダウン及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)増強(FANG)癌ワクチンを作製する方法。

【請求項24】

1又は2以上の癌細胞が、メラノーマ、非小細胞肺癌、胆嚢癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、肝癌、肝癌転移及びユーイング肉腫からなる群から選択される癌を患う患者から収集される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

遺伝的に改変された細胞が、放射線照射によって増殖能力のない状態にされている、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

遺伝的に改変された細胞が自家細胞である、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

遺伝的に改変された細胞が異種移植片増幅細胞である、請求項23に記載の方法。

【請求項28】

遺伝的に改変された細胞が同種異系細胞である、請求項23に記載の方法。

【請求項29】

同種異系細胞が樹立細胞系である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

遺伝的に改変された細胞が、月に1回を最大12用量まで対象に投与される、請求項23に記載の方法。

【請求項31】

対象に投与される遺伝的に改変された細胞の用量が、 1×10^7 細胞/注射 $\sim 5 \times 10^7$ 細胞/注射である、請求項23に記載の方法。

【請求項32】

遺伝的に改変された細胞の投与が、追加的な治療薬との併用療法の一部である、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

10

20

30

40

50

併用療法に用いられる追加的な治療薬が I F Nである、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

併用療法において対象に投与される I F Nの用量が、5 0又は1 0 0 μ g / m²である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

トランスフェクション後に、遺伝的に改変された細胞を I F Nとインキュベートするさらなるステップを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

トランスフェクション後に、遺伝的に改変された細胞に適用される I F Nの用量が、約 2 5 0 U / m lである、請求項 3 5 に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

標的細胞を選択するステップと、

前記標的細胞に、プロモーター及び前記プロモーターに作動可能に連結した核酸インサートを含む発現ベクターをトランスフェクトするステップであって、前記インサートが、フューリンをコードする m R N A 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより R N A 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 R N A (s h R N A) をコードする、ステップと

を含む、フューリンノックダウンを介してトランスフォーミング増殖因子ベータ (T G F - ベータ又は T G F -) 発現を阻害するための s i R N A を介在した方法。

【請求項 3 8】

20

s h R N A が、s i R N A (切断依存的) 及び m i R N A (切断非依存的) モチーフを組み入れている、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

s h R N A が、切断依存的及び切断非依存的の両方であるフューリン発現阻害因子である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

s h R N A が、二機能性 s h R N A としてさらに定義される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 1】

s h R N A の標的となる領域が、フューリン m R N A 転写産物の 3 ' U T R 領域配列である、請求項 3 7 に記載の方法。

30

【請求項 4 2】

s h R N A の標的となる領域が、フューリン m R N A 転写産物のコード領域である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 3】

標的細胞を選択するステップと、

前記標的細胞に、G M - C S F をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、及びフューリンをコードする m R N A 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより R N A 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 R N A (s h R N A) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含む発現ベクターをトランスフェクトするステップと

40

を含む、標的細胞における抗原の発現、提示及びプロセッシングを増強するため並びにトランスフォーミング増殖因子ベータ (T G F - ベータ又は T G F -) の分泌性免疫抑制活性を減衰するための方法。

【請求項 4 4】

標的細胞が自家細胞である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

標的細胞が同種異系細胞である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

同種異系細胞が樹立ヒト細胞系である、請求項 4 5 に記載の方法。

50

【請求項 47】

標的細胞が、プラスミドベクター電気穿孔によりトランスフェクトされる、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 48】

TGF- β が、TGF- β 1、TGF- β 2 及び TGF- β 3 のうち少なくとも 1 種類から選択される、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 49】

治療を必要とする対象を同定するステップと、
前記対象から癌組織試料を収集するステップと、

前記収集された癌試料における癌細胞を、GM-CSF をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、及びフューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含む発現ベクターを前記細胞にトランスフェクトすることによって、遺伝的に改変するステップと、

癌の症状の治療又は寛解に十分な量で、前記対象に治療上有効用量の前記遺伝的に改変された細胞を投与するステップと

を含む、癌を治療する方法。

【請求項 50】

癌が、メラノーマ、非小細胞肺癌、胆嚢癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、肝癌、肝癌転移及びユーイング肉腫からなる癌の群から選ばれる、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

遺伝的に改変された細胞が、放射線照射により増殖能力のない状態にされている、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 52】

遺伝的に改変された細胞が自家細胞である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 53】

遺伝的に改変された細胞が同種異系細胞である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 54】

同種異系細胞が樹立細胞系である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

遺伝的に改変された細胞が異種移植片増幅細胞である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 56】

遺伝的に改変された細胞が、月に 1 回を最大 12 用量まで対象に投与される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 57】

対象に投与される遺伝的に改変された細胞の用量が、 1×10^7 細胞 / 注射 ~ 5×10^7 細胞 / 注射である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 58】

遺伝的に改変された細胞の投与が、追加的な治療薬との併用療法の一部である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 59】

併用療法に用いられる追加的な治療薬が IFN である、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

併用療法において対象に投与される IFN の用量が、50 又は $100 \mu\text{g} / \text{m}^2$ である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

トランスフェクション後に、遺伝的に改変された細胞を IFN とインキュベートするさらなるステップを含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 62】

10

20

30

40

50

トランスフェクション後に、遺伝的に改変された細胞に適用される I F N の用量が、約 2 5 0 U / m l である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) c D N A をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、並びに

R N A 干渉の切断及び隔離機構両方のための単一の標的部位を提供する 1 又は 2 以上の二機能性低分子ヘアピン型 R N A (s h R N A フューリン) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートであって、二機能性 s h R N A フューリンが、フューリンをコードする m R N A 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより R N A 干渉を介してフューリン発現を阻害できる、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む第一のステム - ループ構造並びに前記パッセンジャー鎖の 1 又は 2 以上の塩基対ミスマッチを含む第二のステム - ループ構造を含む第二の核酸インサート

を含む b i s h R N A フューリン / G M C S F 発現ベクタープラスミドと、
1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントと
を含む、 R N A 干渉を介したフューリン発現の阻害による癌治療のための自家細胞ワクチン組成物。

【請求項 6 4】

第二のステム - ループ構造が、 3 塩基対ミスマッチを含む、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 6 5】

塩基対ミスマッチが、パッセンジャー鎖のポジション 9 ~ 1 1 に位置する、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 6 6】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) c D N A をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、並びに

R N A 干渉の切断及び隔離機構両方のための単一の標的部位を提供する 1 又は 2 以上の二機能性低分子ヘアピン型 R N A (s h R N A フューリン) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートであって、二機能性 s h R N A フューリンが、フューリンをコードする m R N A 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより R N A 干渉を介してフューリン発現を阻害できる、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む第一のステム - ループ構造並びに前記ガイド鎖の 1 又は 2 以上の塩基対ミスマッチを含む第二のステム - ループ構造を含む第二の核酸インサート

を含む b i s h R N A フューリン / G M C S F 発現ベクタープラスミドと、
1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントと
を含む、 R N A 干渉を介したフューリン発現の阻害による癌治療のための自家細胞ワクチン組成物。

【請求項 6 7】

第二のステム - ループ構造が、 3 塩基対ミスマッチを含む、請求項 6 6 に記載の組成物。

【請求項 6 8】

塩基対ミスマッチが、ガイド鎖のポジション 9 ~ 1 1 に位置する、請求項 6 6 に記載の組成物。

【請求項 6 9】

標的細胞を選択するステップと、
前記標的細胞に、 1 又は 2 以上の G M - C S F と、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む第一のステム - ループ構造並びに前記パッセンジャー鎖の 1 又は 2 以上の塩基対ミスマッチを含む第二のステム - ループ構造を含み、フューリンをコードする m R N A 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより R N A 干渉を介してフューリン発現を阻害する二機能性低分子ヘアピン (s h R N A) フューリンとを含むコンストラクトをトランスフェクトするステップと

10

20

30

40

50

を含む、標的細胞においてRNA干渉を介してフューリン発現を阻害する方法。

【請求項70】

第二のステム-ループ構造が、3塩基対ミスマッチを含む、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

塩基対ミスマッチが、パッセンジャー鎖のポジション9~11に位置する、請求項69に記載の方法。

【請求項72】

塩基対ミスマッチが、Ago2介在性の切断を妨げることによってパッセンジャー鎖離脱を促す、請求項69に記載の方法。

【請求項73】

塩基対ミスマッチがガイド鎖のポジションを占める、請求項69に記載の方法。

【請求項74】

標的細胞を選択するステップと、

前記標的細胞に、1又は2以上のGM-CSFと、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む第一のステム-ループ構造並びに前記ガイド鎖の1又は2以上の塩基対ミスマッチを含む第二のステム-ループ構造を含み、フューリンをコードするmRNA転写産物の領域とハイブリダイズして、これによりRNA干渉を介してフューリン発現を阻害する二機能性低分子ヘアピン(shRNA)フューリンとを含むコンストラクトをトランスフェクトするステップと

を含む、標的細胞におけるRNA干渉を介してフューリン発現を阻害する方法。

【請求項75】

第二のステム-ループ構造が、3塩基対ミスマッチを含む、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

塩基対ミスマッチが、ガイド鎖のポジション9~11に位置する、請求項74に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、ワクチン開発の分野に関し、特に、フューリンノックダウン及びGM-CSF発現のために、遺伝的に改変された自家癌ワクチンを作製及び使用するための組成物及び方法の開発に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明の範囲を限定することなく、その背景を、遺伝的に改変されたホールセル癌ワクチンの開発に関連して説明する。より具体的には、本発明は、GM-CSF導入遺伝子の発現により腫瘍抗原発現、提示及びプロセッシングを増強し、フューリン二機能性shRNA導入遺伝子誘導性ノックダウンを介してTGF- β の分泌性免疫抑制活性を減衰することができるワクチンに関する。

【0003】

癌ワクチンに対する免疫寛容に関して広く知られた仮説として、腫瘍細胞の免疫原性の低さ、プロフェッショナル抗原提示細胞による適切な提示の欠如、抗原欠損バリエーションの免疫選択、腫瘍誘導性免疫抑制及び腫瘍誘導性免疫特権部位が挙げられる。ホール癌細胞ワクチンは、定義済み及び未定義両方の腫瘍抗原に対する広範囲の多価免疫応答を潜在的に引き起こすことができ、これにより下方制御及び/又は抗原欠損バリエーションの選択による腫瘍抵抗性の可能性に取り組むことができる。

【0004】

多くの場合GM-CSFと省略される顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)は、マクロファージ、T細胞、マスト細胞、内皮細胞及び線維芽細胞によって分泌されるタンパク質である。サイトカイン導入遺伝子として組み込まれると、GM-CSFは、自家患者腫瘍細胞又は樹立同種異系腫瘍細胞

10

20

30

40

50

胞系いずれかに由来する癌ワクチンペプチド、腫瘍細胞ライセート又はホール腫瘍細胞の提示を強化する。GM-CSFは、造血前駆細胞の分化を誘導し、これをワクチン接種部位へと誘引する。GM-CSFはまた、樹状細胞成熟化及び活性化プロセスのアジュバントとして機能する。しかし、GM-CSF介在性免疫感作は、腫瘍細胞によって産生及び/又は分泌されるトランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF- β , transforming growth factor beta)の様々なアイソフォームによって抑制され得る。多機能タンパク質のTGF- β ファミリーは、よく知られた免疫抑制活性を保持する。3種の公知のTGF- β リガンド(TGF- β 1、2及び3)は、ヒトの癌において偏在性である。TGF- β 過剰発現は、腫瘍進行及び予後不良と相関する。腫瘍微小環境内におけるTGF- β レベルの上昇は、反応不顕性腫瘍応答とリンクする。TGF- β は、GM-CSF誘導性樹状細胞成熟化並びにそのMHCクラスII及び共刺激分子の発現を直接的及び間接的に阻害する。GM-CSF介在性免疫活性化におけるTGF- β のこのような負の影響は、GM-CSFに基づく癌細胞ワクチンにおけるTGF- β 分泌を欠乏させることの理論的根拠を支持する。

10

【0005】

TGF- β の全成熟型アイソフォームは、適正な活性のためにフューリン介在性のタンパク質限定切断を必要とする。カルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼであるフューリンは、スプチリシン様プロプロテイン変換酵素ファミリーのメンバーである。フューリンは、対応する免疫調節性波及効果を有するTGF- β の機能活性化のために最もよく知られている。以前に記載された腫瘍分泌性TGF- β の免疫抑制活性とは別に、Tリンパ球における内在性発現フューリンのコンディショナルな欠失は、正常T細胞の発生には許容されるが、調節性及びエフェクターT細胞の機能を損ない、これらはTGF- β 1の産生が少なかったことが見出された。T細胞によるフューリン発現は、末梢性免疫寛容の維持に不可欠であると考えられ、これは、少なくとも一部には、TGF- β 1産生調節におけるその非重複性必須機能によるものである。

20

【0006】

事実上あらゆる癌株において、高レベルのフューリンが立証された。本発明者ら及び他の発明者らは、ヒト結腸直腸癌、肺癌及びメラノーマ細胞により最大10倍高レベルのTGF- β 1が産生され得ること、より大規模に免疫寛容状態に影響を与える可能性があることを見出した。腫瘍細胞におけるフューリンの存在は、腫瘍指向型TGF- β 介在性末梢性免疫寛容の維持に有意に貢献する可能性がある。そのためフューリンノックダウンは、GM-CSF介在性免疫感作を最適化するための新規の興味を引くアプローチを表す。

30

【0007】

インターフェロン-ガンマ(IFN, interferon-gamma)は、宿主の自然及び獲得免疫応答並びに腫瘍管理において決定的な役割を果たす主要な免疫調節性サイトカインである。II型インターフェロンとしても知られるIFNは、その発現が複数のレベルで調節されるシングルコピー遺伝子である。IFNは、免疫学的関連遺伝子の転写調節によって、多様な一連の細胞プログラムを協調させる。当初、CD4+Tヘルパー細胞1型(Th1, T helper cell type 1)リンパ球、CD8+細胞傷害性リンパ球及びNK細胞が、IFNを独占的に産生すると考えられていた。しかし、現在、B細胞、NK細胞及びプロフェッショナル抗原提示細胞(APC, antigen-presenting cell)等、他の細胞が、IFNを分泌するとの証拠がある。局所的に作用するプロフェッショナルAPC[単球/マクロファージ、樹状細胞(DC, dendritic cell)]によるIFN産生は、細胞の自己活性化及び近隣の細胞の活性化において重要となり得る。NK細胞と、場合によりプロフェッショナルAPCによるIFN分泌は、感染症に対する初期の宿主防御において重要となる可能性があり、一方、Tリンパ球は、獲得免疫応答における主たるIFN源となる。さらに、原発性及び移植腫瘍の発達の予防におけるIFNの役割が同定された。IFN産生は、APCによって分泌されるサイトカイン、中でも注目すべきはインターロイキン(IL)-12及びIL-18により制御される。IFN産生の負の調節因子として、IL-4、IL-10、グルココルチコイド及びTGF- β が挙げられる。

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明はまた、shRNAフューリン/GM-CSF発現ベクターを有する細胞を治療上有効量含む、自家（即ち、患者特異的）癌ワクチン組成物（FANGワクチン）を提供する。このベクターは、ヒトGM-CSFであってよいGM-CSFをコードする第一の核酸と、フューリンをコードするmRNA転写産物の領域とハイブリダイズして、これによりRNA干渉を介してフューリン発現を阻害できる1又は2以上の低分子ヘアピン型RNA（shRNA）をコードする第二の核酸インサートとを含む。どちらの核酸インサートも、プロモーターに作動可能に連結する。shRNAは、（切断依存的）RNA誘導サイレンシング複合体（RISC, RNA induced silencing complex）フォーマット型）siRNA（切断依存的）及び（切断非依存的RISCフォーマット型）miRNA又はmiRNA様いずれかのモチーフの両方を同時に組み入れた、二機能性となり得る。本発明の一実施形態において、shRNAは、RISC切断依存的及びRISC切断非依存的両方のフューリン発現阻害因子である。さらに、発現ベクターは、第一及び第二の核酸インサート間にインターカレートしたピコルナウイルス2Aリボソームスキップペプチドを含有することができ、プロモーターは、エンハンサー配列及びイントロンを含有し得るCMV哺乳類プロモーターとなることができる。二機能性shRNAの標的となるmRNA配列は、コード配列に限定されない。一実施形態において、shRNAは、フューリンmRNA転写産物の3'非翻訳領域（3'-UTR）配列を標的とすることができ、一実施形態において、フューリンmRNA転写産物のコード配列及び3'UTR配列の両方を同時に標的とすることができる。ワクチン作製に用いた細胞は、自家腫瘍細胞となることができるが、異種移植片増幅（expanded）自家腫瘍細胞、同種異系腫瘍細胞、異種移植片増幅同種異系腫瘍細胞又はそれらの組合せを用いてもよい。患者に投与したワクチン投薬量は、 1×10^7 細胞～ 2.5×10^7 細胞を含有する。FANGワクチンは、治療上有効量のIFN（ガンマイインターフェロン）と併せて与えることができる。IFNの投薬量範囲は、50又は100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ となり得る。

10

20

【0009】

本発明は、bishRNAフューリン/GMCSF発現ベクタープラスミドと、1又は2以上の必要に応じたワクチンとを含む自家細胞ワクチン組成物について記載する。ベクタープラスミドは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）cDNAをコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサートと、フューリンをコードするmRNA転写産物の領域とハイブリダイズして、これによりRNA干渉を介してフューリン発現を阻害できる1又は2以上の低分子ヘアピン型RNA（shRNA）をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートとを含む。一態様において、GM-CSFはヒトのものである。別の一態様において、shRNAは、siRNA（切断依存的RISCフォーマット型）及びmiRNA又はmiRNA様のいずれか（切断非依存的RISCフォーマット型）のモチーフを組み込んでいる。本明細書に記載されているshRNAは、切断依存的RISCフォーマット型及び切断非依存的RISCフォーマット型両方のフューリン発現阻害因子であり、二機能性shRNAとしてさらに定義される。

30

40

【0010】

別の一態様において、ピコルナウイルス2Aリボソームスキップペプチドは、第一及び第二の核酸インサート間にインターカレートされている。さらにまた別の一態様において、プロモーターは、CMV IE 5'UTRエンハンサー配列及びCMV IEイントロンAを含有するCMV哺乳類プロモーターである。関係する一態様において、CMV哺乳類プロモーター。他の態様において、shRNAの標的となる領域は、フューリンmRNA転写産物の3'UTR領域配列であり、shRNAの標的となる領域は、フューリンmRNA転写産物のコード領域である。

【0011】

50

本発明は、癌の症状の予防、治療及び/又は寛解を必要とする患者を同定するステップと、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) cDNA をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート及びフューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートとを含む bisshRNA フューリン/GMCSF 発現ベクタープラスミド並びに 1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントを含む自家細胞ワクチンを投与するステップとを含むことにより、患者における癌の症状を予防、治療及び/又は寛解させる方法を提供する。

【0012】

本方法は、1 又は 2 以上の癌細胞におけるトランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF-β) 及び GM-CSF のレベルを測定することによって、療法の進行をモニターするステップであって、TGF-β レベルの低下及び GM-CSF レベルの上昇が療法の成功を示すステップと、前記 TGF-β 及び GM-CSF のレベルに基づき自家細胞ワクチンの投与を変更するステップとをさらに含む。本発明の方法により、TGF-β は、TGF-β₁、TGF-β₂ 又は TGF-β₃ のうち少なくとも 1 種類から選択される。一態様において、癌は、メラノーマ、非小細胞肺癌、胆嚢癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、肝癌、肝癌転移及びユーイング肉腫並びに他の患者由来の TGF-β 産生癌からなる群から選択される。別の態様において、shRNA は、siRNA (切断依存性 RISC フォーマット型) 及び miRNA 又は miRNA 様のいずれか (切断非依存性 RISC フォーマット型) のモチーフを組み入れ、shRNA は、切断依存性 RISC フォーマット型及び切断非依存性 RISC フォーマット型両方のフューリン発現の阻害因子である。さらにまた別の態様において、shRNA は、二機能性 shRNA としてさらに定義される。

【0013】

別の実施形態において、本発明は、GM-CSF cDNA をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート及びフューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含む bisshRNA フューリン/GMCSF 発現ベクタープラスミドと、1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントとを含む、自家フューリンノックダウン及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 増強 (FANG, furin-knockdown and Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) augmented) 癌ワクチン組成物を開示する。本発明の組成物は、メラノーマ、非小細胞肺癌、胆嚢癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、肝癌、肝癌転移及びユーイング肉腫並びに他の患者由来の TGF-β 産生癌からなる群から選択される癌の症状の予防、治療及び/又は寛解に用いられる。

【0014】

さらにまた別の実施形態において、本発明は、非小細胞肺癌 (NSCLC, non small cell lung cancer) の症状の予防、治療及び/又は寛解を必要とする患者を同定するステップと、GM-CSF cDNA をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート及びフューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含む bisshRNA フューリン/GMCSF 発現ベクタープラスミド並びに 1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントを含む FANG ワクチンを投与するステップとを含む、フューリンノックダウン及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 増強 (FANG) 癌ワクチンの投与により患者における NSCLC の症状を治療、予防及び/又は寛解させる方法である。本発明の方法は、1 又は 2 以上の NSCLC 細胞におけるトランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF-β) 又

10

20

30

40

50

は TGF- β) 及び GM-CSF のレベルを測定することによって療法の進行をモニターするステップであって、TGF- β レベルの低下及び GM-CSF レベルの上昇が療法の成功を示すステップと、前記 TGF- β 及び GM-CSF のレベルに基づき自家細胞ワクチンの投与を変更するステップとをさらに含む。本発明の一態様において、TGF- β は、TGF- β 1、TGF- β 2 又は TGF- β 3 のうち少なくとも 1 種類から選択される。

【0015】

さらなる一実施形態において、本発明は、(i) 1 又は 2 以上の癌細胞を患者から無菌的に収集するステップと、(ii) 前記収集した細胞を無菌容器内の抗生物質溶液中に置くステップと、(iii) 前記収集した溶液から細胞懸濁液を生成するステップであって、前記細胞 (iv) 懸濁液の生成が酵素による解体 (enzymatic dissection)、機械的脱凝集又は両者によって達成されるステップと、(v) 前記細胞懸濁液を電気穿孔することによって前記細胞を遺伝的に改変し、GM-CSF cDNA をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート及びフューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含む、bisshRNA^{フューリン}/GM-CSF 発現ベクタープラスミドを有するワクチンを作製するステップと、(vi) 前記ワクチンを収集するステップと、(vii) 前記ワクチンに放射線照射するステップと、(viii) 前記ワクチンを凍結するステップとを含む、フューリンノックダウン及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 増強 (FANG) 癌ワクチンを作製する方法について記載する。

10

20

【0016】

本方法の一態様において、1 又は 2 以上の癌細胞は、メラノーマ、非小細胞肺癌、胆嚢癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、肝癌、肝癌転移及びユーイング肉腫並びに他の患者由来の TGF- β 産生癌からなる群から選択される癌を患う患者から収集される。別の一態様において、遺伝的に改変された細胞は、放射線照射によって増殖能力のない状態にされている。さらにまた別の一態様において、遺伝的に改変された細胞は、自家、同種異系又は異種移植片増幅細胞である。

【0017】

一態様において、同種異系細胞は樹立細胞系である。別の一態様において、遺伝的に改変された細胞は、月に 1 回を最大 12 用量まで対象に投与され、対象に投与される遺伝的に改変された細胞の用量は、 1×10^7 細胞 / 注射 ~ 5×10^7 細胞 / 注射であり、遺伝的に改変された細胞の投与は、追加的な治療薬との併用療法の一部である。さらにまた別の一態様において、併用療法に用いられる追加的な治療薬は IFN であり、併用療法において対象に投与される IFN の用量は 50 又は 100 $\mu\text{g} / \text{m}^2$ である。本発明の方法は、トランスフェクション後に、遺伝的に改変された細胞を IFN とインキュベートするステップをさらに含み、トランスフェクション後に、遺伝的に改変された細胞に適用される IFN の用量は、約 250 U / ml (24 時間に亘り 500 U / ml ~ 48 時間に亘り 100 U / ml) である。

30

40

【0018】

本発明の別の一実施形態は、フューリンノックダウンを介してトランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β) の発現を阻害するための siRNA を介在した方法である。本方法は、標的細胞を選択するステップと、前記標的細胞に、プロモーター及び前記プロモーターに作動可能に連結した核酸インサートを含む発現ベクターをトランスフェクトするステップとを含む。インサートは、フューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、その結果 RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする。shRNA は二機能性となることができ、即ち、siRNA (切断依存的 RISC フォーマット型) 及び miRNA 又は miRNA 様のいずれか (切断非依存的 RISC フォーマット型) のモチーフを同時

50

に組み入れることができ、切断依存的 R I S C フォーマット型及び切断非依存的 R I S C フォーマット型様式の両方でフューリン発現を阻害することができる。その上、発現ベクターは、フューリン mRNA 転写産物のコード領域を標的としても、フューリン mRNA 転写産物の 3' UTR 領域配列を標的としてもよく、或いは、フューリン mRNA 転写産物のコード配列及び 3' UTR 配列の両方を同時に標的としてもよい。

【0019】

本発明はまた、標的細胞における抗原発現、提示及びプロセッシングを増強するため並びにトランスフォーミング増殖因子ベータ (T G F - ベータ又は T G F -) の分泌性免疫抑制活性を減衰させるための方法を提供する。本方法は、標的細胞を選択するステップと、前記標的細胞に、2種のインサートを含む発現ベクターをトランスフェクトするステップとを含む。標的細胞のトランスフェクトに用いた技法は、プラスミドベクター電気穿孔となることができる。第一の核酸インサートは、GM-CSFをコードし、一方、第二のインサートは、フューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (s h RNA) をコードする。どちらのインサートも、プロモーターに作動可能に連結する。フューリン発現をロックダウンすることによってその活性化が防止され得る T G F - アイソフォームは、T G F - - 1、T G F - - 2 及び T G F - - 3 を包含する。標的細胞は、樹立ヒト細胞系であってよい自家又は同種異系細胞を包含することができる。

10

【0020】

本発明はまた、FANG ワクチンを患者に投与することにより癌の症状を予防、治療及び/又は寛解させる方法を包含する。本方法は、(i) 治療を必要とする対象を同定するステップと、(ii) 前記対象から癌組織試料を収集するステップと、(iii) 前記収集した癌試料における癌細胞を遺伝的に改変するステップと、(iv) 治療上有効用量の遺伝的に改変された細胞を前記対象に投与するステップとを含む。細胞のトランスフェクトに用いた発現ベクターは、2種の核酸インサートを含む。第一の核酸インサートは、GM-CSFをコードし、プロモーターに作動可能に連結する。第二の核酸インサートも該プロモーターに作動可能に連結し、フューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (s h RNA) をコードする。本発明の一実施形態において、治療の標的となる癌は、ヒトメラノーマ又は非小細胞肺癌である。遺伝的に改変された細胞を増殖能力のない状態にするため、放射線照射してよい。FANG ワクチンにおける遺伝的に改変された細胞は、自家細胞、同種異系細胞、異種移植片増幅細胞、樹立ヒト細胞系又はこれらの細胞型の組合せとなることができる。ワクチン接種のため、細胞は、月に 1 回を最大 1 2 用量、各回 1×10^7 細胞 ~ 2.5×10^7 細胞含有で対象に投与される。 5×10^7 までの用量増加は、安全であることが示された。

20

30

【0021】

遺伝的に改変された細胞は、独立型療法として投与することができるが、併用療法の一部として投与してもよい。本発明のこの実施形態において、FANG ワクチンは、IL-12、IL-15 及び/又は IFN 等、別の治療薬 [複数可] と組み合わせることができるが、これらに限定されない。FANG ワクチンによる治療に IFN を包含する場合、方法は、トランスフェクション後に、遺伝的に改変された細胞をそれぞれ約 100 U / ml の IFN と 48 時間、或いは 500 U / ml と 24 時間インキュベートするさらに別のステップを含む。併用療法のため、細胞は、月に 1 回を最大 1 2 用量、各回通常 1×10^7 細胞 ~ 2.5×10^7 細胞 (最大 5×10^7 の用量が安全であると示されたが) 含有で、50 又は 100 $\mu\text{g} / \text{m}^2$ の IFN 用量と共に対象に投与される。方法は、トランスフェクション後に、遺伝的に改変された細胞を IFN とインキュベートするステップをさらに含み、トランスフェクション後に、遺伝的に改変された細胞に適用される IFN の用量は、約 250 U / ml である。

40

【0022】

50

本発明は、全 TGF - アイソフォームの機能的プロセッシングに決定的に關与するプロ
 テイン変換酵素であるフューリンを用いた RNA 干渉により、TGF - を阻害する
 独自の方法を包含する。FANG ベクターは、フューリンのノックダウンに特異的な二機
 能性低分子ヘアピンコンストラクト (shRNA フューリン) を独自に組み入れる。本発
 明の二機能性 shRNA フューリンは、miR - 30a 骨格を有する 2 種のステム - ルー
 プ構造を含む。第一のステム - ループ構造は siRNA 前駆体成分であるが、第二のステ
 ム - ループ構造は miRNA 様前駆体成分である。この実施形態において、戦略として、
 RNA 干渉の切断及び隔離機構両方のための単一の標的部位を用いる。一実施形態におい
 て、戦略として、それぞれ一方が mRNA 転写産物のコード領域及び mRNA 転写産物の
 3' UTR 領域からなるがこれらに限定されない成分の切断のため、もう一方が隔離のため
 の 2 種の異なる標的部位を用いる。この実施形態において、二機能性 shRNA フュー
 リンは、miR - 30a 骨格を有する 2 種のステム - ループ構造からなる。第一のステ
 ム - ループ構造は、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を有するが、第二のステ
 ム - ループ構造は、パッセンジャー鎖のポジション 9 ~ 11 に 3 塩基対 (bp) ミスマッ
 チを有する。一実施形態において、二機能性 shRNA フューリンは、miR - 30a 骨
 格を有する 2 種のステム - ループ構造からなる。第一のステム - ループ構造は、完全に相
 補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を有するが、第二のステム - ループ構造は、ガイド
 鎖のポジション 9 ~ 11 に 3 塩基対 (bp) ミスマッチを有する。他の実施形態において
 、塩基対 (bp) ミスマッチは、Ago2 介在性切断を防ぐポジションを占め、パッセ
 ンジャー鎖離脱に熱力学的に有利となるであろう。他の実施形態において、塩基対ミスマッ
 チは、ガイド鎖のポジションを占めるであろう。FANG コンストラクトは、カセット全
 体を駆動する哺乳類プロモーター (CMV) 制御下の GM - CSF 及び二機能性 shRN
 A フューリン転写産物を含む。このコンストラクトは、フューリンノックダウン及び
 GM - CSF 発現のために遺伝的に改変された自家 (即ち、患者特異的) 癌ワクチンの作
 製に用いられる。

10

20

30

40

50

【0023】

本発明における FANG ワクチンの作製に用いたコンストラクトは、2 種の核酸インサ
 ートを含む二機能性 shRNA フューリン / GMCSF 発現ベクタープラスミドを包含す
 る。第一の核酸インサートは、プロモーターに作動可能に連結し、顆粒球マクロファージ
 コロニー刺激因子 (GM - CSF) cDNA をコードする。第二の核酸インサートも該プ
 ロモーターに作動可能に連結し、フューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイ
 ブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以
 上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする。本発明の二機能性 shRNA
 は、siRNA 及び miRNA の 2 種の作用機構経路を有する。よって、本発明の二機能
 性 shRNA は、従来の shRNA、即ち、siRNA 作用機構によって作用する DNA
 転写由来の RNA と同、或いはそれぞれ 2 種の異なる遺伝子の発現に対し作用するが従来
 の siRNA モードである 2 種の shRNA を意味する「ダブルット (doublet) shRN
 A」とも異なる。本発明の一実施形態において、GM - CSF は、ヒトのものである。
 shRNA は、siRNA (切断依存的 RISC フォーマット型) 及び miRNA 又は m
 iRNA 様のいずれか (切断非依存的 RISC フォーマット型) のモチーフ両方を同時に
 組み入れた二機能性である。本発明の一実施形態において、shRNA は、切断依存的 R
 ISC フォーマット型及び切断非依存的 RISC フォーマット型両方のフューリン発現の
 阻害因子である。発現ベクターは、第一及び第二の核酸インサート間にインターカレート
 したピコルナウイルス 2A リボソームスキップペプチドを含有することができ、プロモ
 ーターは、CMV IE 5' UTR エンハンサー配列及び CMV IE イントロン A を含
 有し得る CMV 哺乳類プロモーターとなることができる。二機能性 shRNA の標的とな
 る mRNA 配列は、コード配列に限定されない。一実施形態において、shRNA は、フ
 ューリン mRNA 転写産物の 3' 非翻訳領域 (UTR) 配列を標的とすることができ、一
 実施形態において、フューリン mRNA 転写産物のコード配列及び 3' UTR 配列の両方
 を同時に標的とする。

【0024】

本発明はまた、標的細胞におけるフューリン発現の特異的なノックダウンに用いることのできるベクターを包含する。このshRNAフューリン発現ベクターは、プロモーターに作動可能に連結した核酸挿入を含む。このような挿入は、フューリンをコードするmRNA転写産物の領域とハイブリダイズして、これによりRNA干渉を介してフューリン発現を阻害できる1又は2以上の低分子ヘアピン型RNA (shRNA) をコードする。二機能性shRNAは、siRNA (切断依存的RISCフォーマット型) 及びmiRNA又はmi-RNA様のいずれか (切断非依存的RISCフォーマット型) のモチーフを同時に組み入れることができ、切断依存的RISCフォーマット型及び切断非依存的RISCフォーマット型様式の両方でフューリン発現を阻害することができる。その上、発現ベクターは、フューリンmRNA転写産物のコード領域を標的としても、フューリンmRNA転写産物の3'UTR領域配列を標的としてもよく、或いはフューリンmRNA転写産物のコード配列及び3'UTR配列の両方を同時に標的としてもよい。

10

【0025】

次に、本発明の特色及び利点をより完全に理解するために、本発明の詳細な説明について次の添付の図面と共に記述する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1A - 1C】FANGプラスミドトランスフェクション前及び後の(1A)TGF-1、(1B)-2及び(1C)GMCSFタンパク質産生の概要を示すプロットである。製造された自家癌細胞におけるサイトカイン産生の14日間の定量の4日目から得られたELISA値である。データは、FANGプロセッシングを経た10名の患者から非依存的に作製された自家ワクチンを表す(FANG001~010)。

20

【図2A - 2F】FANGcGMPプラスミドトランスフェクション前及び後のFANG-004腫瘍細胞における(2A)TGF-1、(2B)TGF-2及び(2C)GMCSF発現並びにTAGcGMPプラスミドトランスフェクション前及び後のTAG-004腫瘍細胞における(2D)TGF-1、(2E)TGF-2及び(2F)GMCSF発現を示すプロットである。比較発現プロファイルの立証として、FANG-004及びTAG-004は、同一の腫瘍から得られ、順次同じ2日間に処理される。

【図3A - 3C】患者腫瘍細胞におけるFANGプラスミド(cGMPワクチン製造プロセス)対TAGプラスミドの電気穿孔の並列対照(side-by-side)比較により、(3C)GMCSFタンパク質産生と、それに付随した(3A)FANGによるTGF-1発現ノックダウン、TAGによるノックダウンなし、(3B)FANG及びTAG両方によるTGF-2ノックダウン(線が一致)が立証されたことを示すプロットである。

30

【図4A】miR-30a骨格を有する2種のステム-ループ構造(配列番号1)を含むbi-shRNAフューリンを示す模式図であり、第一のステム-ループ構造は、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を有するが、第二のステム-ループ構造は、パッセンジャー鎖のポジション9~11に3塩基対(bp)ミスマッチを有する。

【図4B】フューリンmRNAのsiRNA標的領域を示す図である。フューリンmRNAの3'-UTR及びコード化領域において予想されるsiRNA標的領域並びに各siRNAによって標的とされる配列。

40

【図5】有意な応答を立証する、TAG後の患者におけるPETCT11サイクルを示す画像である。MRI走査及び生検によりL2における残渣取込みを経過観察したところ、悪性度がないことが明らかとなった。

【図6A - 6C】GMCSF発現並びにTGF-1及び-2ノックダウンの評価を示す図である。概要：FANG又はTAG(TAG004)プラスミドトランスフェクション前後の(6A)TGF-1、(6B)TGF-2及び(6C)GM-CSFタンパク質産生である。数値は、FANGをトランスフェクトした収集自家癌細胞におけるサイトカイン産生のELISA決定を表す。データは、FANGプロセッシングを経た9名の患者から非依存的に作製された自家ワクチン(FANG001~009)を表す。1名の患

50

者は、FANG（青）及びTAGワクチン（赤）の両方の構築に十分な組織を有していた（FANG004/TAG004）。

【図7】FANGトランスフェクト前及び後/放射線照射の腫瘍細胞における、RT-qPCRによるGMCSF mRNAを示す図である。一部のレーンにバンドがないのは、RNA分解によるものである（FANG-009における余分のバンドは、0日目の試料を2回ローディングした）。

【図8】トランスフェクション前及びトランスフェクション後/放射線照射の、患者から得られたFANGワクチン細胞のmRNAをPCRにより示す図である。前及び後の試料においてTGF- β 2のシグナルは検出されなかった。

【図9】トランスフェクション前及びトランスフェクション後/放射線照射のFANG-009ワクチン細胞のmRNAをPCRにより示す図である。

【図10】進行期患者に対するコホート1対コホート2及び3の全生存を示す図である（ $n = 61$; $P = .0186$ ）。

【図11】GM-CSF-TGF- β 2アンチセンス（TAG）プラスミドの模式図を示す図である。

【図12】pUMVC3-GM-CSF-2A-TGF- β 2アンチセンスベクターを含有するNCI-H-460扁平細胞及びNCI-H-520、大細胞（NSCLC）におけるGM-CSFのインビトロでの発現を示す図である。

【図13】TGF- β 2レベルが、pUMVC3-GM-CSF-2A-TGF- β 2アンチセンス（TAG）ベクターを有するNCI-H-460扁平細胞及びNCI-H-520、大細胞（NSCLC）において低下することを示す図である。

【図14】251塩基対プローブが、NCI-H-460及びNCI-H-520細胞（レーン6及び10）においてインビトロで発現するGM-CSF-2A-TGF- β 2（TAG）転写産物を特異的に検出することを示す図である。

【図15】TAGワクチンにおけるGM-CSF発現を示す図である。

【図16】TAGワクチンにおけるTGF- β 1発現を示す図である。

【図17】TAGワクチンにおけるTGF- β 2発現を示す図である。

【図18A-18B】siRNAフューリンノックダウン後のヒト癌株における（14A）TGF- β 1及び（14B）TGF- β 2の発現を示す図である。

【図19】FANGのプラスミドコンストラクトを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明の様々な実施形態の実施及び使用を詳細に後述するが、本発明が、多種多様な特定の文脈において具体化され得る多くの適用可能な発明思想を提供することを理解されたい。本明細書に記されている特定の実施形態は、単に本発明を実施及び使用するための特定の仕方を説明するものであり、本発明の範囲の限界を定めるものではない。

【0028】

本発明の理解を容易にするため、多くの用語を下に定義する。本明細書に定義されている用語は、本発明の関連分野の当業者によって通常理解されている通りの意義を有する。

「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」などの語は、単数の実体のみを意味することを目的とせず、特定の具体例を説明に用いることのできるその一般のクラスを包含する。本明細書における用語法は、本発明の特定の実施形態の記載に用いられるが、その使用は、特許請求の範囲に概要が述べられている場合を除き、本発明の限界を定めるものではない。

【0029】

本明細書に記されているいかなる実施形態も、本発明のいかなる方法、キット、試薬又は組成物に対しても実行できることが企図されており、その逆もまた同様である。さらに、本発明の組成物を用いて、本発明の方法を達成することができる。

【0030】

10

20

30

40

【表1】

表1:略語表

略語	用語	
AE	有害事象	
ALT	アラニントランスアミナーゼ(SGPTとも称される)	
ANC	好中球絶対数	
APC	抗原提示細胞	
AST	アスパラギン酸トランスアミナーゼ(SGOTとも称される)	
BUN	血中尿素窒素	10
CBC	全血球数	
CD	表面抗原分類	
CMV	サイトメガロウイルス	
CO ₂	全二酸化炭素	
CR	完全寛解	
CRF	症例報告書	
CTCAE	有害事象の共通毒性基準	
CTL	細胞傷害性Tリンパ球	
DC	樹状細胞(複数可)	20
DTH	遅延型過敏症	
ECOG PS	米国東海岸癌臨床試験グループパフォーマンススコア(Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score)	
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法	
ELISPOT	酵素結合免疫スポット(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Spot)	
ER	小胞体	
FANG	bishRNA ^{フェーリン} 及びGMCSF増強自家腫瘍細胞ワクチン	
FL	Flt-3-リガンド	
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(受託番号NM_000758)	
GMP	医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則(Good Manufacturing practice)	30
GVAX	GMCSF分泌自家又は同種異系腫瘍細胞	
HLA	ヒト白血球抗原	
IBC	施設内バイオセイフティ委員会(Institutional Biosafety Committee)	
IEC	医療機関内倫理委員会(Independent Ethics Committee)	
IL	浸潤リンパ球	
IRB	施設内審査委員会	
LAK	リンホカイン活性化キラー	
LD	最長径	
LLC	大分子潜在型複合体(Large latent complex)	40
MHC	主要組織適合抗原複合体(Major histocompatibility complex)	
MLR	混合リンパ球反応	
MR	マンノース受容体	
NK	ナチュラルキラー	
NKT	ナチュラルキラーT細胞(複数可)	
NSCLC	非小細胞肺癌	

略語	用語
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
PD	進行性疾患
PR	部分応答
PS	活動状態
RECIST	固形腫瘍の治療効果判定のためのガイドライン
SCLC	小細胞肺癌
SD	安定的な疾患
SLC	小分子潜在型複合体(Small latent complex)
STMN1	スタスミン1
TAP	Agプロセッシング関連トランスポーター
TGF- β	トランスフォーミング増殖因子- β
TIL	腫瘍浸潤リンパ球
TNF	腫瘍壊死因子
ULN	正常上限値
WNL	正常範囲内

10

【0031】

フューリンは、スプチリシン様プロプロテイン変換酵素ファミリーのメンバーである（ヒトフューリン受託番号NM__002569）。このファミリーのメンバーは、潜在型前駆体タンパク質をその生物活性産物へとプロセッシングするプロプロテイン変換酵素（PC）である。カルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼであるフューリンは、前駆体タンパク質をその対となる塩基性アミノ酸プロセッシング部位において、-RXXR-が最小切断部位を構成するコンセンサス配列-Arg-X-K/Arg-Arg(RXK/RR)により効率的に切断する。多くの他のプロテアーゼと同様に、PCは、N末端プロセグメント（prosegment）が伸長した不活性型酵素原として合成され、この末端は小胞体において自己触媒的に除去されて機能性が得られる。

20

【0032】

事実上全癌株において高レベルのフューリンが立証された。ヒト結腸直腸、肺癌及びメラノーマ細胞によって10倍高レベルのTGF- β 1が産生され、より大規模に免疫寛容状態に影響を与える可能性がある。トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF- β ）は、よく知られた免疫抑制活性を有する多機能タンパク質のファミリーである。3種の公知のTGF- β リガンド（TGF- β 1~3、それぞれ受託番号NM__000660、NM__003238、NM__003239.2）は、ヒト癌において偏在性である。TGF- β 過剰発現は、腫瘍進行及び予後不良と相関する。腫瘍微小環境内のTGF- β レベル上昇は、反応不顕性抗腫瘍応答とリンクする。腫瘍細胞におけるフューリンの存在は、腫瘍指向型TGF- β 1介在性末梢性免疫寛容の維持に有意に貢献する可能性がある。そのため、フューリンノックダウンは、免疫感作を最適化するための新規の興味を引くアプローチを表す。

30

40

【0033】

ヒトメラノーマ及び肺癌のためのフューリンノックダウン及びGM-CSF増強（FANG）自家癌ワクチン：FANGは、全TGF- β アイソフォームの機能的プロセッシングに決定的に関与するプロプロテイン変換酵素であるフューリンのノックダウンに特異的な、二機能性低分子ヘアピン型RNA（shRNA）コンストラクトを独自に組み入れる。本発明者らによる以前の研究は、ヒト癌株におけるGM-CSF発現並びにTGF- β 1及びTGF- β 2欠乏の達成におけるFANGの有効性を立証した。hGM-CSFと組み合わせた二機能性shRNAフューリンの自家細胞ワクチンへの組み入れは、免疫応答の感作誘導経路（afferent limb）におけるその効果に基づき免疫応答を促進及び強化することが本明細書において立証されている。

50

【 0 0 3 4 】

本明細書において、用語「二機能性」は、s i R N A 及びm i R N A (m R N A 転写産物と非相補的なガイド鎖) 又はm i R N A 様 (m R N A 転写産物と相補的なガイド鎖) の2種の作用機構経路を有するs h R N A を意味する。用語「従来の」s h R N A は、s i R N A 作用機構によって作用するD N A 転写由来のR N A を意味する。用語「ダブルット」s h R N A は、それぞれ2種の異なる遺伝子の発現に対するが「従来の」s i R N A モードで作用する、2種のs h R N A を意味する。

【 0 0 3 5 】

男女共に関連する最も多く見られる癌である進行N S C L C 患者の生存は、第二次化学療法による治療後に7カ月以下である。通例、限られた生存利益並びに癌及び治療に関する毒性のため、患者は更なる治療法を断念する。本明細書に記載されている本発明の新規成熟技術を用いた「標的化」免疫刺激及び内在性免疫阻害の抑制に関する劇的な応答の例等、安全性及び広範な臨床妥当性の立証は、安全且つ潜在的に有効な臨床評価の機会を提供する。本発明のR N A 干渉技術及びワクチン製造の商業的な拡大は、N S C L C 並びに恐らく他の固形腫瘍、とりわけ、メラノーマ、卵巣、前立腺癌、結腸癌及び乳癌の管理への入り口となる機会を提供するであろう。

10

【 0 0 3 6 】

癌ワクチンによる免疫寛容の克服は、有望だが困難な探求である。主として動物試験に基づく免疫寛容に関する広く知られた仮説として、腫瘍細胞の免疫原性の低さ、プロフェッショナル抗原提示細胞による適切な提示の欠如、抗原欠損腫瘍バリエーションの免疫選択、腫瘍誘導性免疫抑制及び腫瘍誘導性免疫特権部位が挙げられる (Murphy, K., Travers, P., Walport, M., ed. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. 2008, Garland Science: New York. 674-687)。そうであるにもかかわらず、導入遺伝子発現ホール癌細胞ワクチンに基づく近年の臨床試験は、有望な結果をもたらした (Fakhrai, H., et al., Phase I clinical trial of a TGF-beta antisense-modified tumor cell vaccine in patients with advanced glioma. *Cancer Gene Ther*, 2006. 13(12): p. 1052-60、Nemunaitis, J., GVAX (GM-CSF gene modified tumor vaccine) in advanced stage non small cell lung cancer. *J Control Release*, 2003. 91(1-2): p. 225-31、Nemunaitis, J., et al., Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther*, 2006. 13(6): p. 555-62、Nemunaitis, J. and J. Nemunaitis, A review of vaccine clinical trials for non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2007. 7(1): p. 89-102)。ホール癌細胞ワクチンは、定義済み及び未定義両方の腫瘍抗原に対し広範囲の多価免疫応答を潜在的に誘発し、これにより下方制御及び/又は抗原欠損バリエーションの選択による腫瘍抵抗性の可能性に取り組むことができる (Ahmad, M., R.C. Rees, and S.A. Ali, Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. 53(10): p. 844-54、Hege, K.M., K. Jooss, and D. Pardo II, GM-CSF gene-modified cancer cell immunotherapies: of mice and men. *Int Rev Immunol*, 2006. 25(5-6): p. 321-52)。

20

30

【 0 0 3 7 】

Dranoff及びJaffeeは、動物モデルにおいて、G M - C S F を分泌するように遺伝的に改変された腫瘍細胞が、他のサイトカインと比較して最も強力な抗腫瘍免疫の誘導を一貫して立証したことを示した (Dranoff, G., et al., Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(8): p. 3539-43)。サイトカイン導入遺伝子として組み込まれると、G M - C S F は、自家又は樹立同種異系腫瘍細胞系のいずれかから得られた癌ワクチンペプチド、腫瘍細胞ライセート又はホール腫瘍細胞の提示を強化する (Hege, K. M. and D.P. Carbone, Lung cancer vaccines and gene therapy. *Lung Cancer*, 2003. 41 Suppl 1: p. S103-13)。G M - C S F は、造血前駆細胞のプロフェッショナル抗原提

40

50

示 (A P C) 樹状細胞 (D C) への分化を誘導し、それをワクチン接種部位へと誘引する (Dranoff, G., et al., Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(8): p. 3539-43; Huang, A.Y., et al., Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. Science, 1994. 264(5161): p. 961-5)。GM-CSFは、DC成熟化並びに腫瘍抗原捕捉、プロセッシング及び提示の活性化プロセスのアジュバントとしても機能し、それらの共刺激分子の発現並びにCD4+、CD8+T細胞、CD1d制限インパリアントナチュラルキラーT (NK T) 細胞及び抗体産生B細胞の活性化のための二次リンパ組織への遊走能を上方調節する (Banchereau, J., et al., Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 767-811)。

10

【0038】

近年、Hodi (Hodi, F.S., et al., Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(8): p. 3005-10) は、エフェクター及びT調節性細胞機能を変調するためのGVAXワクチン接種とそれに続く抗CTLA-4抗体の定期的な注入が、大多数の転移性メラノーマ患者において臨床上有意義な抗腫瘍免疫を生じ得ることを報告した。これらの知見は、GM-CSF増強自家癌ワクチンのワクチン接種が、特にFoxP3+Tregs活性を欠乏させ、腫瘍のMHCクラスII鎖 (MICA) 発現を強化してこれによりナチュラルキラー (NK) 及びT細胞を活性化し、セントラルメモリーT細胞CD4+及びCD8+応答を強化するアジュバント治療と併せた場合、免疫介在性腫瘍破壊の生成に成功したとの論文と一貫した。

20

【0039】

本発明のFANGアプローチは、10名の患者の自家ワクチンにおける本発明者らの知見によって支持され、これは、TGF- β 1及びTGF- β 2低下並びにGM-CSFレベルの上昇を一貫して立証する (図1A~1C及び図2A~2F)。フューリン欠乏アプローチの健全性は、原理的証拠文献の証拠である、癌細胞系 (CC-247結腸直腸、CRL-1585メラノーマ系統) におけるフューリン阻害因子デカノイル-Arg-Val-Lys-Arg-CMK (Dec-RVKR-CMK) によって確認された。Dec-RVKR-CMKは、フューリンの触媒部位に不可逆的に結合して、その活性を遮断するペプチジルクロロメチルケトンである (Henrich, S., et al., The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. Nat Struct Biol, 2003. 10(7): p. 520-6)。Dec-RVKR-CMKは、フューリン基質BASE (-部位APP切断酵素)、MT5-MMP及びBoc-RVRR-AMCの活性を完全に又は部分的にのいずれかで低下させる (Pearson, D.J., et al., Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. Exp Dermatol, 2001. 10(3): p. 193-203)。本発明者らは、TGF- β 1及びTGF- β 2両方の活性が、CC-247及びCRL-1585癌株において有意に低下することを特異的イムノアッセイによって見出し、TGF- β アイソフォーム発現におけるフューリン遮断の有効性を確認した。

30

40

【0040】

自家細胞のトランスフェクトに用いたFANGプラスミド (図19) は、そのヒトTGF- β 2アンチセンス配列をbisshRNAフューリンDNA配列に置き換えたTAGプラスミド (Kumar, P.J., C. Oxendine, I Nemunaitis, J. Maples, P., TAG Xenograft Vaccine: Xenograft-Expanded Autologous Tumor Vaccine Genetically Modified to Express GM-CSF and Block Production of TGF- β 2. BioProcessing Journal, 2009(Spring 2009): p. 30-36) に由来する。それ以外の点において、これら2種のプラスミドは同一である (DNA配列決定により確認)。miR-30a骨格を有する2種のステム-ループ構造からなるbisshRNAフューリン; 第一のステム-ループ構造は、完全に相補的

50

なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を有するが、第二のステム-ループ構造は、パッセンジャー鎖のポジション9~11に3bp mismatchesを有する(図4A)。本発明者らは、切断及び隔離両方のために単一の標的部を用いる戦略を採用した。コードするshRNAは、成熟shRNAを2種類以上のRISCへと積み込むことができる(Azuma-Mukai, A., et al., Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(23): p. 7964-9)。単一部位に焦点を置くことの理論的根拠は、多部位標的化が、「シード(seed)配列」誘導オファターゲット効果の確率を増加させ得ることである(Jackson, S.A., S. Koduvayur, and S.A. Woodson, Self-splicing of a group I intron reveals partitioning of native and misfolded RNA populations in yeast. RNA, 2006. 12(12): p. 2149-59)。2種の

ステム-ループ二本鎖DNA配列を、DNAライゲーションにより10ピースの合成補完及び相互接続オリゴヌクレオチドと組み合わせて構築した。両端にBam HI部位を有する完成した241塩基対のDNAを、TAG発現ベクターのBam HI部位に、TGF 2アンチセンス配列に代わって挿入した。shRNAインサート及び配向性のスクリーニング用に設計したPCRプライマー対により、挿入DNAの配向性をスクリーニングした。FANGコンストラクトは、カセット全体を駆動する単一の哺乳類プロモーター(CMV)を有し、GM-CSF及びフューリン二機能性shRNA転写産物の間に2Aリボソームスキップペプチドが介入し、ウサギポリAテールが続く。GM-CSF転写産物の終端に終止コドンが配置される。mRNAへのピコルナウイルス2A配列の挿入により、リボソームは、2A及び下流配列の接合部においてペプチド結合の形成をスキップし、単一のオープンリーディングフレームから2種のタンパク質を産生させる(Funston, G.M., et al., Expression of heterologous genes in oncolytic adenoviruses using picornaviral 2A sequences that trigger ribosome skipping. J Gen Virol, 2008. 89(Pt 2): p. 389-96)。

しかし、shRNA又はアンチセンスが(具体例として)第二の転写産物として発現している場合、第一の転写産物のみ翻訳される。本発明者らは、2Aリンカーが、TAGワクチンによるほぼ等レベルのGM-CSF及び抗TGF- β 2転写産物の作製に有効であることを見出し、これを選出してFANGの同一設計を用いた。

【0041】

本発明者らは、ヒトTGF- β 1アイソフォーム発現の阻害に対するsiRNA介在性フューリンノックダウンの適用性を検証した。発表されたTuschl及び同僚らの推奨するところ並びにヒト及びマウスゲノムデータベースのBLAST検索を統合する追加的な選択パラメータにより、フューリンmRNA配列における予想されるsiRNA標的部(図4B)を決定した(<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext>)。適格なコード及び3'UTR部位を標的とするsiRNA(図4B)を検査した。CCL-247、CRL-1585 U87及びH460細胞のリポフェクションに続き、6種のsiRNAフューリンコンストラクトのそれぞれは、細胞生存に悪影響を及ぼすことなく培養上清におけるTGF- β 1及びTGF- β 2レベルを著しく低下させることを示した。よって、siRNA介在性フューリンノックダウンは、TGF- β 1及び- β 2アイソフォームを欠乏させるのに有効である。

【0042】

本発明者らは、細胞系における内在性フューリンタンパク質のウエスタンブロット及びフローサイトメトリーによる検出を試みた。5種類の異なる商業用抗体をウエスタンブロットのためにスクリーニングし、1種類の前標識抗体をフローサイトメトリーのためにスクリーニングした。全試験は陰性結果を生じた。市販の抗体のさらに別の試験において、フューリンタンパク質の断片(又はペプチド)に対し全イディオタイプを開発した。ウエスタンブロット試験は、スクリーニングした5抗体のうち4抗体において60kDaバリアントが優先的に検出されたことを立証した。最後の抗体は、検査したウエスタンブロット条件下ではフューリンタンパク質を検出しなかった。民間のベンダーによって提供された対照ライセートは、自社内(in-house)細胞系試料と同様の結果を生じた。フローサイトメトリー用の前標識抗体は、フューリン染色における有意な変化を立証しなかった(即

10

20

30

40

50

ち、陽性フューリン集団は同定されず)。従って、フローサイトメトリーは、フューリンノックダウンの立証に用いることはできなかった。

【0043】

フューリタンパク質検出の代替法として、本発明者らは、試料のフューリン酵素活性もスクリーニングした。蛍光定量に基づくアッセイを用いて、フューリンによる基質 (Pyr - Arg - Thr - Lys - Arg - AMC) の変換とそれによるフルオロフォア (AMC) の放出に関して細胞系をスクリーニングした。しかし、検出された放出 AMC シグナルは、フューリン酵素活性の有意なノックダウンを正確に立証するには弱過ぎた。アッセイの第二の障壁は、スプチリシン様プロホルモン変換酵素 (PC) ファミリーの全セリンプロテアーゼによって基質が切断されてしまうことである。従って、本出願人らの FANG shRNA 産物の標的とならない類似のプロテアーゼは、依然として活性を保持し続け、アッセイにおいて蛍光発生基質を切断し、よってフューリンノックダウン検出能力を低下させることになるであろう。

10

【0044】

二機能性 shRNA フューリンの他の適用として、次のものが挙げられる。(1) 免疫応答の効果発現経路 (efferent limb) を強化するための、腫瘍 (± 腫瘍細胞外マトリックス (ECM)) 選択的装飾 (標的) ステルス 2 層陥入りリポソーム (stealthed bilamellar invaginated liposome) (BIV) を介した全身送達、(2) ヒト TGF-1、TGF-2、TGF-3、IGF-II、IGF-1R、PDGFA 及び一部の腫瘍型の場合は MT1-MMP を包含するが、これらに限定されないフューリン標的分子の腫瘍促進 / 維持効果を直接的に壊滅させるための、腫瘍選択的装飾 (標的) ステルス型 2 層陥入りリポソーム (BIV) を介した全身送達、(3) 推定癌幹細胞における NOTCH / p300 経路を直接的に壊滅させるための、腫瘍選択的装飾 (標的) ステルス型 2 層陥入りリポソーム (BIV) を介した全身送達、(4) 炭疽、志賀 (Shiga)、ジフテリア、破傷風、ボツリヌス症並びにエボラ及びマールブルグウイルスに関連する毒素の活性化を阻害するための、腫瘍選択的装飾 (標的) ステルス型 2 層陥入りリポソーム (BIV) を介した全身送達及び / 又は (5) シュードモナス (Pseudomonas) 介在性罹患率及び死亡率のリスクが高まった疾患、例えば嚢胞性線維症の患者における抗生物質療法の補助としてのシュードモナス外毒素 A 産生を阻害するための、2 層陥入りリポソーム (BIV) (± 装飾及び可逆的マスキング / ステルス化) の全身性及び / 又は吸入送達。

20

30

【0045】

TGF-ノックダウン: トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF-) は、よく知られた免疫抑制活性を有する多機能タンパク質のファミリーである (Wick, W., U. Naumann, and M. Weller, Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des*, 2006. 12(3): p. 341-9)。3種の公知の TGF-リガンド (TGF-1、2 及び 3) は、ヒト癌において偏在性である。TGF-過剰発現は、腫瘍進行及び予後不良と相関する (Bierie, B. and H.L. Moses, Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(7): p. 506-20、Levy, L. and C.S. Hill, Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. 17(1-2): p. 41-58)。腫瘍微小環境内における TGF-レベルの上昇は、反応不顕性抗腫瘍応答とリンクしている (Bierie, B. and H.L. Moses, Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(7): p. 506-20、Sporn, M.B., et al., Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science*, 1986. 233(4763): p. 532-4、Massague, J., The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell*, 1987. 49(4): p. 437-8、Bodmer, S., et al., Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol*, 1989. 143(10): p. 3222-9、Border, W.A. and E. Ruoslahti, Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tis

40

50

sue repair. *J Clin Invest*, 1992. 90(1): p. 1-7、Chen, T.C., et al., TGF-B2 and soluble p55 TNFR modulate VCAM-1 expression in glioma cells and brain derived endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 1997. 73(1-2): p. 155-61、Li, M.O., et al., Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 99-146)。TGF- β は、GM-CSFの誘導するDC成熟化 (Yamaguchi, Y., et al., Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells*, 1997. 15(2): p. 144-53) 並びにそれらのMHCクラスII及び共刺激分子発現 (Geissmann, F., et al., TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol*, 1999. 162(8): p. 4567-75) を阻害する。Ardeshtna (Ardeshtna, K.M., et al., The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2000. 96(3): p. 1039-46) は、リポ多糖 (LPS, lipopolysaccharide) の誘導する単球由来DCの成熟化が、p38ストレス活性化プロテインキナーゼ (p38 SAPK, p38 stress-activated protein kinase)、細胞外シグナル調節プロテインキナーゼ (ERK, extracellular signal-regulated protein kinase)、ホスホイノシチド3-OH-キナーゼ (PI3キナーゼ, phosphoinositide 3-OH-kinase) / Akt及び核内因子 (NF, nuclear factor) - B経路の活性化に關与することを示した。GM-CSFは、MAPキナーゼ1/2及びERK1/2の迅速な一過性リン酸化により骨髓性造血細胞及び白血病細胞系増殖を刺激する平行活性を發揮することができ、一方、TGF- β は、PI3-キナーゼ-Akt経路阻害を介してGM-CSFの誘導するERKシグナル伝達をオフにする (Montenegro, D.E., et al., TGFbeta inhibits GM-CSF-induced phosphorylation of ERK and MEK in human myeloid leukaemia cell lines via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k). *Cell Prolif*, 2009. 42(1): p. 1-9)。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

効果発現 (efferent) レベルにおいて、未熟DCによる抗原提示は、T細胞免疫反応不顕性に寄与する (Steinman, R.M., et al., Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. 987: p. 15-25)。TGF- β も同様に、マクロファージ活性化 (Ashcroft, G.S., Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect*, 1999. 1(15): p. 1275-82) 及びその抗原提示機能 (Du, C. and S. Sriram, Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. *J Leukoc Biol*, 1998. 64(1): p. 92-7、Takeuchi, M., P. Alard, and J.W. Streilein, TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol*, 1998. 160(4): p. 1589-97) を阻害する。TGF- β は、高親和性のIL-2受容体発現及び機能を損なうことにより、細胞傷害性T細胞の活性化を阻害する (Ruffini, P.A., et al., Factors, including transforming growth factor beta, released in the glioblastoma residual cavity, impair activity of adherent lymphokine-activated killer cells. *Cancer Immunol Immunother*, 1993. 36(6): p. 409-16、Fakhrai, H., et al., Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(7): p. 2909-14)。TGF- β 2はまた、転写因子FOX P3の誘導によりナイーブT細胞を調節性T細胞 (Treg cell) へと変換し (Fantini, M.C., et al., Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*, 2004. 172(9): p. 5149-53)、Tregの出現は免疫活性化シャットダウンをもたらす (Thomas, D.A. and J. Massague, TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 2005. 8(5): p. 369-80)。Polak (Polak, M.E., et al., Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer*, 2007

. 96(12): p. 1879-87)によると、メラノーマの全ステージにおいて免疫寛容誘発DC及び抑制因子Tリンパ球が存在する。これらの免疫細胞型は、TGF- β 受容体Iを発現し、免疫寛容誘発活性は、TGF- β 1又は-2結合依存的であった。

【0047】

自然免疫応答レベルにおいて、TGF- β は、NK細胞においてアンタゴニスト的であり、リンホカイン活性化キラー(LAK)細胞誘導及び増殖を下方制御する(Ruffini, P.A., et al., Factors, including transforming growth factor beta, released in the glioblastoma residual cavity, impair activity of adherent lymphokine-activated killer cells. *Cancer Immunol Immunother*, 1993. 36(6): p. 409-16、Rook, A.H., et al., Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol*, 1986. 136(10): p. 3916-20、Kasid, A., G.I. Bell, and E.P. Director, Effects of transforming growth factor-beta on human lymphokine-activated killer cell precursors. Autocrine inhibition of cellular proliferation and differentiation to immune killer cells. *J Immunol*, 1988. 141(2): p. 690-8、Tsunawaki, S., et al., Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature*, 1988. 334(6179): p. 260-2、Hirte, H. and D.A. Clark, Generation of lymphokine-activated killer cells in human ovarian carcinoma ascitic fluid: identification of transforming growth factor-beta as a suppressive factor. *Cancer Immunol Immunother*, 1991. 32(5): p. 296-302、Naganuma, H., et al., Transforming growth factor-beta inhibits interferon-gamma secretion by lymphokine-activated killer cells stimulated with tumor cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1996. 36(11): p. 789-95)。Penafuerte (Penafuerte, C. and J. Galipeau, TGF beta secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. 57(8): p. 1197-206)は、近年、腫瘍分泌TGF- β が、免疫担当性B16メラノーマモデルにおいてNK細胞のGM-CSF+IL2(GIFT2)介在性免疫感作を抑制したことを示した。TGF- β のB16産生のインビボ遮断は、遮断しなければ非GIFT2発現パイスタンダー腫瘍の成長によって危険にさらされる生存を改善した。これらの知見は、TGF- β のGM-CSF介在性免疫活性化における負の影響をインビボでさらに検証し、拡大解釈すれば、GM-CSFに基づく癌細胞ワクチンにおいてTGF- β 分泌を欠乏させることの理論的根拠を支持する。

【0048】

本発明者らによって、非小細胞肺癌患者においてTGF- β 2ノックダウン活性を有する腫瘍細胞ワクチン(ベラゲンブマツセル-L)を利用しつつ行われた治験は、無作為化した対照患者及び病歴経験(historical experience)に応じた許容される安全性及び用量関連生存改善を立証した。後期(III B / IV)患者の2年間の生存は、 2.5×10^7 細胞/注射を超える投与を受けた患者に対し52%であり、これは、2年間で10%未満の生存である類似の患者病歴データと有利に比較される。試験患者はまた、サイトカイン産生(IFN- γ 、 $p = 0.006$; IL-6、 $p = 0.004$; IL4、 $p = 0.007$)及びワクチンHLA抗原に対する抗体価($p = 0.014$)の有意な上昇を提示し、この結果は免疫活性化治療成績を示唆した(Nemunaitis, J., et al., Phase II trial of Belagenpumatulcel-L, a TGF-beta2 antisense gene modified allogeneic tumor vaccine in advanced non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancer Gene Ther*, 2009. 16(8): p. 620-4)。

【0049】

TGF- β ノックダウン及びGM-CSF発現癌細胞ワクチン(TAG): TAGワクチンのため、36名の患者を収集した。GM-CSF発現及びTGF- β 2ノックダウンは、産物放出判定基準を満たした。3名(全員、管腔アクセスした胃腸腫瘍)は、汚染細菌を有し、放出することができなかった。1名は、細胞が不十分であった。19名の進行性不応性癌患者を治療した(Maples PB, K.P., Oxendine I, Jay C, Yu Y, Kuhn J, Nemu

10

20

30

40

50

naitis J, TAG Vaccine: Autologous Tumor Vaccine Genetically Modified to Express GM-CSF and Block Production of TGFβ2. *BioProcessing Journal*, 2009. 8(2)、Nemunaitis, J., Kumar, P., Senzer, N., Yu, Y., Oxendine, I., Tong, A.W., Maples, P.B., A phase I trial of GM-CSF gene-TGFβ antisense gene autologous tumor cell (TAG) vaccine in advanced cancer. *Mol Therapy*, 2009. 17 (Suppl 1): p. S206、Maples, P.B., et al. Autologous Tumor Cell Vaccine Genetically Modified To Express GM-CSF and Block Expression of TGFβ2 (Abstract # 553). in *The Twelfth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy*. 2009. San Diego, California)。療法に關しグレード3毒性効果は觀察されなかつた。17名評定可能な患者のうち11名(65%)は、安定的な疾患を少なくとも3カ月間維持した。1名の患者は、イメージング判定基準によりCRを達成した(図4;メラノーマ)。よつて、TAGワクチンは安全であると思われ、臨床有効性の証拠を有する。

10

【0050】

しかし、TGF-リガンドの全3種の公知のアイソフォーム(TGF-1、-2及び-3)が、ヒト癌において偏在的に產生されるのであれば、TAGワクチンの潜在的な限界は、TGF-2に対する特異性の制限である。特に、ヒト結腸直腸、肺癌及びメラノーマ細胞によつて、最大10倍高レベルのTGF-1が產生され得る。抗原提示樹状細胞(DC)及び調節性T細胞(Treg)におけるTGF-1の免疫寛容誘発の役割は十分に確立されており、この活性は、TGF-2アンチセンス処置によつて影響されない。

20

【0051】

フューリン: TGF-の全成熟型アイソフォームは、適正な活性のためにタンパク質限定切断を必要とする。TGF-のタンパク質分解による活性化の必須機能は、フューリンによつて介在される。フューリンは、スプチリシン様プロプロテイン変換酵素ファミリーのメンバーである。このファミリーのメンバーは、潜在型前駆体タンパク質をその生物活性産物へとプロセッシングするプロプロテイン変換酵素(PC)である。カルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼであるフューリンは、前駆体タンパク質をその対となる塩基性アミノ酸プロセッシング部位において、-RXXR-が最小切断部位を構成するコンセンサス配列-Arg-X-K/Arg-Arg(RXK/RR)により効率的に切断する(Thomas, G., *Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(10): p. 753-66)。多くの他のプロテアーゼと同様に、PCは、N末端プロセグメントが伸長した不活性型酵素原として合成され、このセグメントは小胞体において自己触媒的に除去されて機能性を得る(Khatib, A.M., et al., *Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy*. *Am J Pathol*, 2002. 160(6): p. 1921-35)。

30

【0052】

フューリンは、対応する免疫調節性波及効果を有するTGF-の機能活性化に關して最もよく知られている(Pesu, M., et al., *T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance*. *Nature*, 2008. 455(7210): p. 246-50、Pesu, M., et al., *Proprotein convertase furin is preferentially expressed in T helper 1 cells and regulates interferon gamma*. *Blood*, 2006. 108(3): p. 983-5)。以前に記載された腫瘍分泌性TGF-の免疫抑制活性とは別に、Tリンパ球における内在性発現フューリンのコンディショナルな欠失は、正常なT細胞を發達させるが、調節性及びエフェクターT細胞の機能を損ない、これらはTGF-1の產生が少なかつたことが見出された。フューリン欠損Tregは、T細胞伝達結腸炎モデルにおいて保護性が低く、正常なT細胞においてFoxp3を誘導できない。その上、フューリン欠損エフェクター細胞は、本質的に過活動(over-active)であり、野生型調節性T細胞(Treg cell)の抑制活性に対し抵抗性である。APCにおいて、トランスゴルジ区画における細胞傷害性Tリンパ球感受性エピトープは、フューリン及び頻度が低いTAP非依存的経路によつてプロセッシングされる(Lu, J., et al., *TAP-independent pr*

40

50

resentation of CTL epitopes by Trojan antigens. *J Immunol*, 2001. 166(12): p. 7063-71)。よって、T細胞によるフューリン発現は、末梢性免疫寛容の維持に不可欠であると思われ、これは、少なくとも一部には、TGF- β 1産生調節におけるその非重複性必須機能のためである。

【0053】

事実上全癌株において高レベルのフューリンが立証された (Page, R.E., et al., Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer. *Cell Oncol*, 2007. 29(4): p. 289-99、Schalken, J.A., et al., fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J Clin Invest*, 1987. 80(6): p. 1545-9、Mbikay, M., et al., Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br J Cancer*, 1997. 75(10): p. 1509-14、Cheng, M., et al., Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer*, 1997. 71(6): p. 966-71、Bassi, D.E., H. Mahloogi, and A.J. Klein-Szanto, The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog*, 2000. 28(2): p. 63-9、Bassi, D.E., et al., Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog*, 2001. 31(4): p. 224-32、Lopez de Cicco, R., et al., Human carcinoma cell growth and invasiveness is impaired by the propeptide of the ubiquitous proprotein convertase furin. *Cancer Res*, 2005. 65(10): p. 4162-71、Khatib, A.M., et al., Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol*, 2002. 160(6): p. 1921-35)。本発明者ら及び他の発明者らは、最大10倍高レベルのTGF- β 1が、ヒト結腸直腸、肺癌及びメラノーマ細胞によって産生され得ること、より大規模に免疫寛容状態に影響を与える可能性があることを見出した (Polak, M.E., et al., Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer*, 2007. 96(12): p. 1879-87、Fogel-Petrovic, M., et al., Physiological concentrations of transforming growth factor beta1 selectively inhibit human dendritic cell function. *Int Immunopharmacol*, 2007. 7(14): p. 1924-33、Bommireddy, R. and T. Doetschman, TGFbeta1 and Treg cells: alliance for tolerance. *Trends Mol Med*, 2007. 13(11): p. 492-501)。腫瘍細胞におけるフューリンの存在は、腫瘍指向型TGF- β 1介在性末梢性免疫寛容の維持に有意に貢献する可能性がある (Pesu, M., et al., T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. *Nature*, 2008. 455(7210): p. 246-50)。そのためフューリンロックダウンは、免疫感作を最適化するための新規の興味を引くアプローチを表す。

【0054】

FANG (フューリン shRNA 及び GM-CSF) ワクチン: 本発明者らは、FANG と命名した次世代ワクチンを構築した。FANG ワクチンの新規性は、自家腫瘍抗原感作において組み入れた GM-CSF 導入遺伝子の免疫強化効果を最大限に高めるための、フューリンロックダウンによる複数の免疫抑制 TGF- β 1 アイソフォーム欠乏のアプローチの組合せにある。

【0055】

TGF- β 1 の全成熟型アイソフォームは、フューリンによるタンパク質分解による活性化を必要とする。数種類の癌細胞系 (H460、CC-247、CRL-1585、U87) における付随する複数の TGF- β 1 アイソフォーム活性の欠乏の達成の実現可能性を、フューリンロックダウンを用いて決定し、本発明者らは、9名の癌患者 (乳-1; 結腸-2; メラノーマ-4; 胆嚢-1; NSCLC-1) における FANG ワクチンの GM-CSF 製造の完成に成功した。GM-CSF 発現並びに TGF- β 1 及び TGF- β 2 のロックダウンの評価を図1A~1C及び図2A~2Fに示す。

【0056】

10

20

30

40

50

F A N G プラスミドの患者腫瘍細胞への電気穿孔は、予測通り G M C S F タンパク質産生並びに付随する T G F - 1 及び - 2 ノックダウンを立証した。図 3 A ~ 3 C は、F A N G トランスフェクトした N S C L C 腫瘍の発現プロファイル (F A N G - 0 0 4) 対、c G M P T A G ワクチン法で処理した同一腫瘍由来の組織 (T A G - 0 0 4 と表記) の 7 日目のアッセイデータを表示する。T G F - 2 (図 3 B ; 同時発生的データのため線 1 本が示されている) において同様の低下が見られ、G M C S F (図 3 C) 発現において同様の増加が見られる。しかし、T G F - 1 発現は F A N G によって完全に阻害されたが、T G F - 2 アンチセンスは T G F - 1 発現を遮断できないため、これは T A G による影響を受けない (図 3 A) 。

【 0 0 5 7 】

図 5 は、有意な臨床反応を立証する、1 1 T A G ワクチン治療後の進行メラノーマ患者の P E T C T 画像である。M R I 走査及び生検により L 2 における残渣取込みを経過観察したところ、悪性度がなかったことが明らかとなった。その結果患者は、7 カ月を超える間完全寛解 (疾患の証拠なし) となった。T G F - 1 及び - 2 両方をノックダウンする F A N G の能力は、ワクチン構築を行った最初の 9 名の患者における知見によって支持される (図 6 A ~ 6 C) 。全 9 種のワクチン標本は、G M - C S F レベルの有意な上昇を立証した (培養 4 日目に 8 0 ~ 1 8 7 0 p g / m l 、中央値 7 3 9 p g / m l) 。全 9 名の患者は、T G F - 2 の 5 0 % を超える低下を立証し、1 0 0 p g を超える内在性 T G F - 1 を産生する 7 名の患者のうち 6 名も、このサイトカインの 5 0 % を超える低下を立証した。F A N G の標的有効性拡大は、自家ワクチンの T A G (T A G - 0 0 4 A) 及び F A N G (F A N G - 0 0 4) バージョンの両方の作製に妥当な腫瘍組織を有する 1 名の患者 (N S C L C) において最も良く立証され、F A N G 標本 (F A N G - 0 0 4) を用いて初濃度 1 8 4 0 p g / m l から検出可能レベルを下回るように T G F - 1 (と T G F - 2) を欠乏させ、一方、T G F - 2 欠乏が予想されたにもかかわらず、T A G 標本 (T A G - 0 0 4) によりこの高レベルの T G F - 1 は変化しなかった。これらの知見は、F A N G ワクチン標本の潜在的な利点を支持する。

【 0 0 5 8 】

個別化 c G M P F A N G ワクチンの生物活性の検証：遺伝子改変は、G M - C S F 及びフェーリンノックダウンに最適化した二機能性低分子ヘアピン (b i - s h) R N A をコードするプラスミドベクターの使用によって達成されるであろう。癌患者自家 F A N G ワクチンは、進行固形癌患者の臨床試験のための c G M P 条件下にて既に作製されている。品質保証プロセスの一部として、G M - C S F 、T G F - 1 、 - 2 及び - 3 m R N A 並びにタンパク質発現を測定した。以前の研究において本発明者らに利用された G M - C S F 及び T G F - 1 依存性細胞系における成長治療成績により、F A N G 改変後のサイトカイン生物活性を決定した。処理したワクチンは、F A N G 改変後の抗原完全性を証明するため、プロテオゲノミクススクリーニングが行われるであろう。

【 0 0 5 9 】

C T L A - 4 遮断の増強効果の特性評価：F A N G 免疫化のみが感作誘導 (a f f e r e n t) 免疫感作プロセスに影響を与えるのであれば、腫瘍特異的免疫エフェクター応答を促進する追加的なアプローチは、抗腫瘍治療成績をさらに促進することができる。細胞傷害性 T リンパ球 - 4 (C T L A - 4) 機能の遮断による T r e g 抑制の崩壊及び / 又は T エフェクター (T e f f) の強化は、F A N G ワクチンの臨床成功の尤度を強化することができる。

【 0 0 6 0 】

1 0 種の F A N G ワクチン試料 (F A N G - 0 0 3 は解析に妥当な m R N A を持たない) において R T - q P C R 解析を行った。電気穿孔前及び電気穿孔後、放射線照射後の試料を最大 1 4 日間培養した。様々な時点の各試料から全 R N A を抽出し、逆転写 (R T) により c D N A に変換した。各時点の各試料に存在する鋳型の量を評価するため、定量的 P C R (q P C R) を行った。フェーリン、T G F - 1 及び T G F - 2 q P C R 試料を内在性 G a p D H に対し正規化して、相対的なサイクル数の閾値 (C t) を得た。G M C

10

20

30

40

50

S F を外部標準曲線に対し定量化して、標準曲線と比べて絶対 C t 値を得た。G M C S F m R N A 検出を図 7 に示す。トランスフェクション後、全ワクチンにおいて G M C S F m R N A を検出したが、数値は持続的な問題である m R N A 品質に応じて可変的である。表 1 は、2 種の F A N G ワクチンから得られた代表的なデータを例示する (図 8 及び 9)。全試料を、正規化電気穿孔前 C t 値マイナス正規化電気穿孔後放射線照射後 C t 値として算出して (前 - 後)、デルタ C t ($\Delta C t$) を算出した。算出された 0 . 0 0 未満の C t は鋳型 D N A の減少を表し、算出された 0 . 0 0 を超える C t は鋳型 D N A の増加を表す。C t 値を用いて、発現のパーセント変化を推算する (% 発現)。1 0 0 % 未満の数値は D N A の (前から後の) 減少を表し、1 0 0 % を超える数値は D N A の (前から後の) 増加を表す。s h R N A / s i R N A サイレンシングの性質は、鋳型 D N A を最適に 9 0 % 低下させることができ、これは $\Delta C t = - 3 . 3$ に相当する。 ($\Delta C t = - 1 . 0$ は、5 0 % ノックダウンに相当する。) 従って、下のデータは、F A N G プラスミド D N A が、内在性フューリンを 8 0 ~ 2 6 % (平均 = 4 8 %) 下に低下させることができ、下流標的の T G F β 1 及び T G F β 2 が、9 8 ~ 3 0 % (平均 = 7 5 %) 下に低下されることを立証する。フューリン二機能性 s h R N A の作用機構は、転写後及び翻訳レベルでフューリンタンパク質産生を遮断することである。フューリンタンパク質のレベル低下も、T G F β 1 及び T G F β 2 m R N A の発現、T G F β 1 及び T G F β 2 タンパク質プロ型 (proform) のそれらそれぞれのタンパク質の成熟 (活性) 型への変換に影響を与え (フィードバック調節により) (Burghardt, I., et al., Pirfenidone inhibits TGF-beta expression in malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 354 (2): p. 542-7)、T G F β フューリン増幅ループに干渉することにより、フューリン自体の発現をさらに鈍らせる (McMahon, S., M.H. Laprise, and C.M. Dubois, Alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion process. *Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFbeta*. *Exp Cell Res*, 2003. 291(2): p. 326-39)。T G F タンパク質プロ型の蓄積が、その T G F 遺伝子の転写をフィードバック阻害し得る可能性もある。

10

20

【 0 0 6 1 】

【表 2】

表 1:FANG ワクチンの RT-qPCR 解析(電気穿孔前対後)

FANG-008

時点	Δ Ct	%発現
0 日目	-1.52	35%
1 日目	-1.50	35%
2 日目	-1.48	36%
4 日目	-1.50	35%
7 日目	-1.22	43%
10 日目	-1.41	38%

時点	Δ Ct	%発現
0 日目	-0.09	94%
1 日目	-0.10	93%
2 日目	-0.08	95%
4 日目	-0.05	97%
7 日目	-0.08	95%
10 日目	-0.11	93%

時点	Δ Ct	%発現
0 日目	0.00	n/a *
1 日目	0.00	n/a *
2 日目	0.00	n/a *
4 日目	0.00	n/a *
7 日目	0.00	n/a *
10 日目	0.00	n/a *

ΔCt ベースライン=0.00

%発現ベースライン=100%

*n/a=鑄型が検出限界を下回るため適用不可能

FANG-009

内容	Δ Ct	%発現
0 日目	-0.66	63%
1 日目	-0.69	62%
2 日目	-0.34	79%
4 日目	-0.31	80%
7 日目	-1.93	26%
10 日目	0.00	n/a *

内容	Δ Ct	%発現
0 日目	-0.54	69%
1 日目	-0.49	71%
2 日目	-0.42	75%
4 日目	-0.31	81%
7 日目	-0.04	98%
10 日目	-1.29	41%

内容	Δ Ct	%発現
0 日目	-0.53	69%
1 日目	-0.47	72%
2 日目	-0.45	73%
4 日目	-0.52	70%
7 日目	-1.70	31%
10 日目	-1.74	30%

【 0 0 6 2 】

9名の患者の自家ワクチンでFANGシステムを用いたところ、TGF- β 1及びTGF- β 2低下並びにGM-CSFレベル上昇を一貫して立証した(図6A~6C)。特異的イムノアッセイにより、TGF- β 1及びTGF- β 2両方の活性も、これらの癌株において有意に低下したことが立証され、TGF- β アイソフォーム発現におけるフェーリン遮断効果を確認した。本発明者らは、TGF- β アイソフォーム発現を阻害するためのsiRNA介在性フェーリン-ノックダウンの適用性を検証した。発表されたTuschl及び同僚らの推奨するところ並びにヒト及びマウスゲノムデータベース(jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext)のBLAST検索を統合した追加的な選択パラメータにより、フェーリンmRNA配列において予想されるsiRNA標的部位(図4B)を決定した。適格な翻訳及び3'UTR部位を標的とするsiRNA(図4B)を検査した。フェーリンmRNAのFANGプラスミドDNAノックダウンの立証を図8及び9に示す。これはワクチンのうち2種しか検出できないが、その理由としては、容易に検出可能なフェーリンmRNAはトランスフェクション前のこれら2種の腫瘍のみに存在したためである。bi-shRNAフェーリンの作用機構は、転写後及び翻訳レベルにおけるフェーリンタンパク質産生の遮断である。フェーリンタンパク質のレベル低下も、TGF- β 1及びTGF- β 2 mRNAの発現、プロ型TGF- β 1及びTGF- β 2タンパク質のそれぞれそれぞれのタンパク質の成熟(活性)型への変換に影響を与え(フィードバック調節により)(Burghardt, I., et al., Pirfenidone inhibits TGF-beta expression in malignant glioma cells. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 354(2): p. 542-7)、TGF- β フェーリンループに干渉することにより、フェーリン自体の発現をさらに鈍らせる(McMahon, S., M.H. Laprise, and C.M. Dubois, Alternative pathway for the role of furin in tum

10

20

30

40

50

or cell invasion process. Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFbeta. *Exp Cell Res*, 2003. 291(2): p. 326-39)。TGFタンパク質のプロ型の蓄積がそのTGF遺伝子の転写をフィードバック及び阻害し得る可能性は、決して本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。FANGの標的有効性の拡大は、自家ワクチンのTAG (TAG-004) 及びFANG (FANG-004) 両方のバージョンの作製に妥当な腫瘍組織を有する1名の患者(NSCLC)において最もよく立証される。FANG標本(FANG-004)を用いて、初濃度1840 pg/mlから検出可能レベルを下回るようにTGF-1 (とTGF-2)を欠乏させた。TGF-2欠乏が予想されるにもかかわらず、この高レベルのTGF-1は、TAG標本(TAG-004)によって変化しなかった(図1A~1C及び図2A~2F)。これらの知見は、FANGワクチン標本の機構的利点を支持する。

10

【0063】

CCL-247、CRL-1585 U87及びH460細胞のリポフェクション後に、6種のsiRNAフューリンコンストラクトのそれぞれは、細胞生存に悪影響を及ぼすことなく培養上清においてTGF-1及びTGF-2レベルを著しく低下させることを示した。よって、siRNA介在性フューリンノックダウンは、TGF-1及び-2アイソフォームの欠乏に有効である。

【0064】

FANGの設計及び構築：遺伝子ノックダウンを最適化するためのsiRNA及びmiRNA様機能的成分両方を組み入れる「二機能性」ベクターを用いた(Rao, D., Maples, P.B., Senzer, N., Kumar, P., Wang, Z., Papper, B.O., Yu, Y., Haddock, C., Tong, A., Nemunaitis, J., Bi-functional shRNA: A novel approach of RNA interference. (submitted), 2009)。siRNA成分は、ヘアピンとしてコードされ、パッセンジャー及びガイド鎖の完全にマッチする配列を網羅する。RNase H様活性を有するエンドヌクレアーゼであるRNA誘導サイレンシング複合体(RISC)のアルゴノート-2(Ago2)によるパッセンジャー鎖の切断後、ガイド鎖は、相補的標的mRNA配列と結合し、切断する。区別すると、「二機能性」ベクターのmiRNA様成分は、より低い熱力学的安定性を達成するため、コードshRNAヘアピン内のパッセンジャー及びガイド鎖間にミスマッチが組み入れられている。この立体配置は、Ago2非依存的に切断なし(切断非依存的プロセス)でRISCからパッセンジャー鎖を解離させ(Matranga, C., et al., Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 2005. 123(4): p. 607-20、Leuschner, P.J., et al., Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep*, 2006. 7(3): p. 314-20)、翻訳阻止、mRNA分解及び部分的に相補的な標的mRNAの細胞質プロセシングボディ(P-ボディ)における隔離により、miRNAガイド成分にその標的を下方制御させる。

20

30

【0065】

本発明者らは、以前に、細胞骨格の迅速な微小管リモデリングを調節するタンパク質であり、高比率の固形癌患者において上方調節されることが見出されたスタスミン(STMN1; オンコプロテイン18)をノックダウンするための二機能性shRNAの有効性強化を立証した(Rana, S., et al., Stathmin 1: a novel therapeutic target for anticancer activity. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008. 8(9): p. 1461-70)。STMN-1に対し有効なノックダウンを達成した二機能性shRNAコンストラクトは、同一遺伝子標的に対するsiRNAオリゴヌクレオチドと比較して5-10log用量強化された腫瘍細胞殺傷効力をもたらした。

40

【0066】

同様に設計された二機能性shRNAを用いてフューリンノックダウンを達成した。miR-30a骨格を有する2種のステム-ループ構造からなるbi-sh-フューリン; 第一のステム-ループ構造は、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を有するが、第二のステム-ループ構造は、パッセンジャー鎖のポジション9~11に3bpミス

50

ッチを有する。本発明者らは、切断及び隔離両プロセスのために単一標的部を用いる戦略を採用した。コード s h R N A は、s h R N A を成熟させて、2種類以上の R I S C に積み込むことが提案されている (Azuma-Mukai, A., et al., Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(23): p. 7964-9)。多部位標的化は、「シード配列」誘導オフターゲット効果の確率を増加させ得るため、本発明者らは単一部位に焦点を置く (Jackson, S.A., S. Koduvayur, and S.A. Woodson, Self-splicing of a group I intron reveals partitioning of native and misfolded RNA populations in yeast. RNA, 2006. 12(12): p. 2149-59)。

【0067】

D N A ライゲーションにより、2種のステム-ループ構造を10ピースの補完的及び相互接続的オリゴヌクレオチドと組み立てる。s h R N A インサート及び配向性をスクリーニングするように設計された P C R プライマー対により、挿入 D N A の配向性をスクリーニングした。陽性クローンを選択し、SeqWright社 (テキサス州ヒューストン) にて配列を確認した。s i R N A の知見に基づき、3種の二機能性 s h R N A を構築した。最適な標的配列を同定した。

【0068】

F A N G コンストラクトは、カセット全体を駆動する単一の哺乳類プロモーター (C M V) を有し、2 A リボソームスキップペプチドが G M - C S F 及びフューリン二機能性 s h R N A 転写産物間に介入し、ウサギポリ A テールが続く。G M - C S F 転写産物終端に終止コドンが置かれる。

【0069】

ピコルナウイルス 2 A 配列を m R N A へと挿入すると、リボソームは 2 A 及び下流配列の接合部のペプチド結合のスキップ形成を生じ、単一のオープンリーディングフレームから2種のタンパク質の産生をもたらす (Funston, G.M., et al., Expression of heterologous genes in oncolytic adenoviruses using picornaviral 2A sequences that trigger ribosome skipping. J Gen Virol, 2008. 89(Pt 2): p. 389-96)。本発明者らは、2 A リンカーが、T A G ワクチンによるほぼ等レベルの G M - C S F 及び抗 T G F - 転写産物の作製に有効となることを見出し、F A N G に同じ設計を用いるために選出した。

【0070】

F A N G ワクチン製造：患者の腫瘍を手術分野において無菌的に捕集し、無菌検体容器内のゲンタマイシン生理食塩水溶液中に置き、c G M P 製造施設への配送のために湿氷 (wet ice) 上に梱包した。検体を製造一式に投入し、酵素的に解体し、機械的に脱凝集させて細胞懸濁液を生成し、次に洗浄してデブリを除去した。腫瘍細胞を計数した後、Q C アリコートを採取して残りの細胞に F A N G プラスミドを電気穿孔し、一晚インキュベートしてベクター導入遺伝子を発現させる。細胞を収集し、ガンマ線照射して細胞成長を停止させ、次に最後の Q C アリコートの除去及びワクチン管理率凍結前に計数した。2日間の製造プロセスに続き、ほぼ3週間の Q C 検査フェーズを行い、その後、患者治療のためにワクチンを解禁する前に全ワクチンアッセイデータを評定する。F A N G 製造を行った9名の最初の患者は全員、全 Q C 検査判定基準を満たした。

【0071】

c G M P F A N G ワクチン：臨床試験における使用のため、c G M P 条件下で癌患者自家 F A N G ワクチンを作製した。F A N G 改変前後に G M - C S F、T G F - 1、- 2 及び - 3 m R N A 並びにタンパク質発現を測定し、本出願人らが以前に特徴づけた G M - C S F 及び T G F - 依存的ヒト細胞系における成長治療成績によりサイトカイン生物活性を決定した。各患者の処理ワクチンは、F A N G 改変後に抗原完全性を証明するため、プロテオゲノミクススクリーニングを行うことになる。

【0072】

F A N G の c G M P 産生：樹立ヒト細胞系のプラスミドベクター電気穿孔により F A N G ワクチンを作製した。選択された F A N G プラスミドベクターは、最適な T G F - 下

10

20

30

40

50

方制御のために前検証 (prevalidate) したフューリン s h R N A を含有するコンストラクトを表す。

【 0 0 7 3 】

患者に注射する前に、凍結バイアル (用量) を室温で解凍し、バイオセーフティフード内で処理した。細胞懸濁液は、蓋をした 1 mL シリンジにおいて送達されるであろう。調製したワクチンは、注射当たり 1×10^7 又は 2.5×10^7 細胞の用量で患者に皮内注射されるであろう。

【 0 0 7 4 】

2 種のフルスケール前臨床製造プロセス及び 8 種の臨床製造プロセスを用意し、本発明者らにより試験した。表 2 は、処理した腫瘍の種類を表示する (腫瘍 3 ~ 10 は臨床ワクチンである)。

10

【 0 0 7 5 】

【表 3】

表 2: 腫瘍質量対細胞収量

処理した腫瘍	ワクチン ID	組織重量(グラム)	細胞#/用量	バイアル数
1	FANG-001	12.72	1.0×10^7	40
2	FANG-002	27.41	1.0×10^7	28
3	FANG-003	6.04	2.5×10^7	9
4	FANG-004	41.08	2.5×10^7	11
5	FANG-005	6.96	2.5×10^7	8
6	FANG-006	12.48	1.0×10^7	8
7	FANG-007	10.90	2.5×10^7	15
8	FANG-008	9.80	2.5×10^7	13
9	FANG-009	6.80	1.0×10^7	6
10	FANG-010	13.00	2.5×10^7	12

20

【 0 0 7 6 】

処理した腫瘍のサイズ範囲及び種類並びにその結果生じた生細胞収量は、表 3 に示す通り大きく変動する。全ワクチンは、製造 2 日目の総生細胞数に応じて 1.0×10^7 細胞 (用量コホート 1) 又は 2.5×10^7 細胞 (用量コホート 2) のいずれかをバイアルに入れた。複数の腫瘍を収集した患者は、バイアルを組み合わせる最小臨床用量要件を認定させた。コホート 2 用量レベルの最大 12 用量は、患者治療に利用できるようになるであろう。腫瘍細胞収量は、腫瘍質量、細胞充実性及びプロセッシング適合性により非常に可変的なため、最小用量数及び低用量コホート (コホート 1) が包含される。

30

【 0 0 7 7 】

【表 4】

表 3:最終産物生存率(2日目、放射線照射前)

処理した腫瘍	ワクチンID	%生存率
1	FANG-001	78
2	FANG-002	90
3	FANG-003	94
4	FANG-004	89
5	FANG-005	94
6	FANG-006	91
7	FANG-007	96
8	FANG-008	95
9	FANG-009	95
10	FANG-010	93

10

【0078】

処理した10種の腫瘍の4日目の発現プロファイルを図1A~1Cに表示する。y軸目盛りが、全3種のサイトカイン毎に異なることに留意されたし。これらのデータは、14日間アッセイの代表である(残りのデータは図示せず)。平均トランスフェクション前TGF β 1は、 1251 ± 1544 pg / 1×10^6 細胞 / ml、中央値778 pgである。平均トランスフェクション後TGF β 1は、 191 ± 455 pg / 1×10^6 細胞 / ml、中央値13 pgである。TGF β 1の平均パーセントノックダウンは85%であった。平均トランスフェクション前TGF β 2は、 232 ± 164 pg / 1×10^6 細胞 / ml、中央値225 pgである。平均トランスフェクション後TGF β 2は、 1319 pg / 1×10^6 細胞 / ml、中央値5 pgである。TGF β 2の平均パーセントノックダウンは、94%であった。トランスフェクション後の平均GM-CSF発現は、 543 ± 540 pg / 1×10^6 細胞 / ml、中央値400 pgである。これらのデータは、GM-CSF発現が、TGF β 2ノックダウンのようにTAGワクチンと一致することを示す。対照的に、FANGワクチンは、5倍を超えてTGF β 1発現を低下させた。TGF β 1の最小検出可能含量は、約4.6 pg / mlである(R&D Systems社製、QuantikineヒトTGF β 1)。TGF β 2の最小検出可能含量は、約7 pg / mlである(R&D Systems社製、QuantikineヒトTGF β 2)。GM-CSFの最小検出可能含量は、約3 pg / mlである(R&D Systems社製、QuantikineヒトGM-CSF)。

20

30

【0079】

GM-CSF、TGF β 1及びTGF β 2発現を検査するための自家腫瘍細胞ワクチンのトランスフェクション前及び後の培養物を設定するためのプロトコールは、以前に記載されている(Maples, P.B., et al. Autologous Tumor Cell Vaccine Genetically Modified To Express GM-CSF and Block Expression of TGF β 2 (Abstract # 553). in The Twelfth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2009. San Diego, California)。簡潔に言うと、GM-CSF、TGF β 1及びTGF β 2発現を市販のELISAキット(R&D Systems社)により決定した。メーカーの説明書に従ってELISAアッセイを行った。トランスフェクション前試料(4×10^6 細胞)を1日目に採取した。製造が完成した後、細胞培養物をELISA用試料の作製に設定できるように製造施設から試料を移動した。2日目に、トランスフェクション後、放射線照射後、凍結前試料(4×10^6 細胞)を採取した。製造が完成した後、細胞培養物をELISA用試料の作製に設定できるように製造施設から試料を移動した。

40

【0080】

前臨床認定プロセスの一部として10種のワクチン(FANG-001から-010)

50

を製造した。これらのワクチンは、トランスフェクション前、放射線照射前試料と比較したトランスフェクション後、放射線照射後試料を用いて、GM-CSF、TGF-1及びTGFβ2 mRNA並びにタンパク質発現に関して評定した(FDAレビューによる、TAGワクチン、BB-IND13650)。加えて、数通りの方法によりフェーリンタンパク質検出を試みた。qRT-PCRによりフェーリンmRNAを検出した。

【0081】

本発明者らは、ウエスタンブロット及びフローサイトメトリーにより細胞系における内在性フェーリンタンパク質を検出した。5種類の異なる抗体(3社の異なるベンダーから入手)をウエスタンブロットのためにスクリーニングし、1種類の前標識抗体をフローサイトメトリーのためにスクリーニングした。全実験は陰性結果を生じた(データは図示せず)。

10

【0082】

全製造プロセスの全ELISAデータの概要(表4)は、GM-CSF発現の中央値レベルがおよそ400ピコグラム/mlであり、平均が543ピコグラム/mlであることを示す。さらに、GM-CSFレベルは、経時的に増加する傾向がある。発現レベルは製造プロセス(腫瘍種類)間で可変性であるが、全製品においてGM-CSF発現が観察される。

1) ウイルスベクターではなくプラスミドの使用は、誘発された抗ウイルス中和抗体の不明瞭化(obfuscating)効果を取り除き、2) プラスミドの使用は同様に、長期遺伝子発現に干渉する誘発された抗体の発達を予防し、3) 同時に発生するフェーリン、TGF-1及びTGFβ2の抑制は、GM-CSF誘導樹状細胞成熟化の腫瘍関連障害を最小化し得るため、記述されている製造プロセス間のGM-CSF発現レベルの可変性に加えて、FANGワクチンにより達成された発現レベルは、臨床的に関連性があると判断される(Montenegro, D.E., et al., TGFbeta inhibits GM-CSF-induced phosphorylation of ERK and MEK in human myeloid leukaemia cell lines via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k). Cell Prolif, 2009. 42(1): p. 1-9)。

20

【0083】

【表5】

表4:製造発現アッセイ後14日間のFANG ワクチン1~10の TGFβ1、TGFβ2 及び GM-CSF 発現

	TGFβ1 pg/ml 前			TGFβ1 pg/ml 後			TGFβ2 pg/ml 前			TGFβ2 pg/ml 後			GMCSF pg/ml 前			GMCSF pg/ml 後		
	平均	SD	中央値	平均	SD	中央値	平均	SD	中央値	平均	SD	中央値	平均	SD	中央値	平均	SD	中央値
0日目	625	678	416	105	202	7	70	116	25	9	22	0	2	2	2	197	277	29
1日目	1154	1265	760	93	187	11	138	139	113	9	19	0	3	4	3	359	489	281
2日目	956	1014	620	180	446	0	195	107	197	42	21	4	3	3	3	407	418	310
3日目	1832	2221	879	173	394	4	247	156	229	12	16	8	3	4	2	580	531	475
4日目	1241	1115	1039	211	421	20	293	189	257	9	12	4	4	6	3	657	550	602
7日目	1729	1735	778	264	723	3	292	150	235	14	16	8	5	9	3	683	681	471
10日目	1367	894	1629	243	530	21	335	135	310	23	21	28	5	8	4	745	546	673
14日目	1108	852	887	281	681	19	308	158	229	17	23	12	18	24	4	821	631	645
全体	1251	1544	778	191	455	13	232	164	225	15	19	5	5	10	3	543	548	400

30

【0084】

GM-CSF及びTGF-発現の定量化: サイトカイン特異的比色分析アッセイによりGM-CSF並びにTGF-1及び-2発現を決定した(Tong, A.W., et al., Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL24): biologic outcome in advanced cancer patients. Mol Ther, 2005. 11(1): p. 160-72)。

40

【0085】

生物活性の検証: 骨髄性造血細胞と同様に、MAPキナーゼ1/2及びERK1/2の迅速な一過性リン酸化によって介在されるように、骨髄性白血病細胞系においてGM-CSF誘導性増殖活性が観察された。それに対し、TGF-は、PI3-キナーゼ-Akt経路の阻害によるGM-CSF介在性ERKシグナル伝達をオフにする(Montenegro,

50

D.E., et al., TGFbeta inhibits GM-CSF-induced phosphorylation of ERK and MEK in human myeloid leukaemia cell lines via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k). *Cell Prolif*, 2009. 42(1): p. 1-9)。骨髄性白血病性細胞における GM-CSF 及び TGF- β の成長調節効果をインビトロ代用モデルとして用いて、FANG ワクチン培養上清の調製におけるサイトカイン生物活性を検証した。

【 0 0 8 6 】

赤白血病 CD34 + TF-1 α 細胞による共培養試験により、FANG (又は対照トランスフェクト) ワクチン培養上清におけるサイトカイン活性を検証し (Hu, X., et al., Characterization of a unique factor-independent variant derived from human factor-dependent TF-1 cells: a transformed event. *Leuk Res*, 1998. 22(9): p. 817-26)、必要であれば、混合型 (biphenotypic) B 骨髄単球性白血病性 CD10 + CD15 + MV4-11 細胞により確認した (Santoli, D., et al., Synergistic and antagonistic effects of recombinant human interleukin (IL) 3, IL-1 alpha, granulocyte and macrophage colony-stimulating factors (G-CSF and M-CSF) on the growth of GM-CSF-dependent leukemic cell lines. *J Immunol*, 1987. 139(10): p. 3348-54) (ATCC、メリーランド州ロックビル)。これらの細胞系は両者共に、ng/ml 量における GM-CSF の正の増殖効果及び TGF- β の負の阻害活性に対する応答を示した (Montenegro, D.E., et al., TGFbeta inhibits GM-CSF-induced phosphorylation of ERK and MEK in human myeloid leukaemia cell lines via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k). *Cell Prolif*, 2009. 42(1): p. 1-9)。増殖活性は、Easycount Viasure アッセイ (Immunicon社) 及び MTT アッセイにより決定されるであろう (Tong, A.W., et al., Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL24): biologic outcome in advanced cancer patients. *Mol Ther*, 2005. 11(1): p. 160-72)。

【 0 0 8 7 】

FANG 変換の表現型プロファイル解析：フューリンノックダウンは、TGF- β 下方制御と共に、標的配列を有する他のタンパク質基質の発現に影響を与える可能性がある (Lopez de Cicco, R., et al., Human carcinoma cell growth and invasiveness is impaired by the propeptide of the ubiquitous proprotein convertase furin. *Cancer Res*, 2005. 65(10): p. 4162-71)。この情報が、ワクチン接種患者におけるいかなるディファレンシャル臨床治療成績の理解に対し有用となり得る場合には、FANG 処理した自家ワクチンの抗原プロファイルを癌患者から決定した。

【 0 0 8 8 】

ハイスループット遺伝子プロファイリングを用いて、癌患者の個別化療法を開発した。FANG トランスフェクト vs 対照ベクタートランスフェクト癌細胞のディファレンシャル遺伝子発現プロファイルを比較するため、ハイスループット遺伝子発現アレイ解析を行った。

【 0 0 8 9 】

ディファレンシャルに標識した FANG 及び対照標本を組み合わせ、強い陽イオン交換カラム (SCX) 及び 2 次元 RP ナノカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (Dionex社) によって分画した。Applied Biosystems 4800 MALDI TOF/TOF (商標) 分析器を用いた質量分析解析のための調製において、Opti-TOF (商標) LC/MALDI 挿入 (123 x 81 mm) プレート (Applied Biosystems社) 上に画分をスポットした。次に、GeneGo、MetaCore ソフトウェア一式によりタンパク質及び遺伝子発現データの両方を評定した。

【 0 0 9 0 】

FANG プロセス前後の自家癌ワクチンの抗原レパートリーを決定するため、プロテオゲノミクス解析を行った。フューリンノックダウンの検証に加えて、1) フューリン基質タンパク質のベースライン及びディファレンシャル発現、2) ランドマーク腫瘍関連抗原 (TAA; メラノーマのための gp100、Mart1、MAGE-1、チロシナーゼ、非小細胞肺癌のための MAGE-3、MUC-1 等) (Romero, P., Current state of v

10

20

30

40

50

accine therapies in non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer, 2008. 9 Suppl 1: p. S28-36、Robinson, J., et al., The European searchable tumour line database. Cancer Immunol Immunother, 2009) 及び他の報告された T A A の発現、3) H L A 抗原及び共刺激分子 (C D 8 0 / 8 6) 発現、4) F A N G トランスフェクション後に 2 倍以上ディファレンシャルに発現する上述のカテゴリーとは無関係のタンパク質に特に注意を払った。

【 0 0 9 1 】

図 1 0 は、進行期患者のコホート 1 対コホート 2 及び 3 に対する全生存を示す (n = 6 1 ; P = . 0 1 8 6) 。 G M - C S F - T G F - 2 アンチセンスプラスミドの模式図を図 1 1 に示す。 p U M V C 3 - G M - C S F - 2 A - T G F - 2 アンチセンスベクターを含有する N C I - H - 4 6 0 扁平細胞及び N C I - H - 5 2 0 大細胞 (N S C L C) における G M - C S F のインビトロでの発現を図 1 2 に表示する。 p U M V C 3 - G M - C S F - 2 A - T G F - 2 アンチセンスベクターを有する N C I - H - 4 6 0 扁平細胞及び N C I - H - 5 2 0 大細胞 (N S C L C) において T G F - 2 レベルは低下する。この低下は、図 1 3 に提示されているデータにおいて観察される。図 1 4 は、2 5 1 塩基対プローブが、N C I - H - 4 6 0 及び N C I - H - 5 2 0 細胞 (レーン 6 及び 1 0) においてインビトロで発現する G M - C S F - 2 A - T G F - 2 転写産物を特異的に検出することを示す。T A G ワクチンにおける G M - C S F 及び T G F - 2 発現をそれぞれ図 1 2 及び 1 3 に示す。s i R N A フューリンノックダウン後のヒト癌株における T G F - 1 及び T G F - 2 の発現を図 1 8 A 及び 1 8 B に示す。最後に、図 1 9 は、F A N G のプラスミドコンストラクトの模式図である。

【 0 0 9 2 】

T A G ワクチン製造データ (n = 3 3 ワクチン ; 7 日目の数値、ワクチン製造後の T G F 1 アッセイ) から得られた T G F 1 発現データ (図 1 6) は、T A G が T G F 1 発現に干渉しないことを明らかに立証する。T G F 1 及び T G F 2 (図 1 7) 並びに T G F 3 (データ図示せず) 遮断の臨床意義は、これらが、腫瘍により発現する有意な負の免疫調節物質であると仮定されていることである。T A G ワクチンにおける G M - C S F 発現を図 1 5 に示す。これらの T G F アイソフォームは偏在性であり、大多数の腫瘍において発現する (Arteaga, C.L., Inhibition of TGFbeta signaling in cancer therapy. Curr Opin Genet Dev, 2006. 16(1): p. 30-7) 。乳、結腸、食道、胃、肝細胞、膵臓、S C L C 及び N S C L C 等、多くの腫瘍は、高レベルの 1 又は 2 以上の活性 T G F アイソフォームを産生する (Constam, D.B., et al., Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. J Immunol, 1992. 148(5): p. 1404-10、Bierie, B. and H.L. Moses, Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nat Rev Cancer, 2006. 6(7): p. 506-20、Levy, L. and C.S. Hill, Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. 17(1-2): p. 41-58、Eastham, J.A., et al., Transforming growth factor-beta 1: comparative immunohistochemical localization in human primary and metastatic prostate cancer. Lab Invest, 1995. 73(5): p. 628-35、Friedman, E., et al., High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. 4(5): p. 549-54、Jakowlew, S.B., et al., Expression of transforming growth factor beta ligand and receptor messenger RNAs in lung cancer cell lines. Cell Growth Differ, 1995. 6(4): p. 465-76、Kong, F.M., et al., Elevated plasma transforming growth factor-beta 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. Ann Surg, 1995. 222(2): p. 155-62、Yamada, N., et al., Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma. Int J Cancer, 1995. 62(4): p. 386-92、Eder, I.E., et al., Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 in serum and urine

from patients with bladder carcinoma. *J Urol*, 1996. 156(3): p. 953-7)。さらに、TGF の過剰発現は、腫瘍進行及び予後不良と相関してきた (Bierie, B. and H.L. Moses, Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(7): p. 506-20、Levy, L. and C.S. Hill, Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. 17(1-2): p. 41-58)。TGF レベルの上昇もまた、感誘導及び効果発現経路の両方における免疫抑制とリンクしてきた (Bierie, B. and H.L. Moses, Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(7): p. 506-20、Sporn, M.B., et al., Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science*, 1986. 233(4763): p. 532-4、Massague, J., The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell*, 1987. 49(4): p. 437-8、Bodmer, S., et al., Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol*, 1989. 143(10): p. 3222-9、Border, W.A. and E. Ruoslahti, Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest*, 1992. 90(1): p. 1-7、Chen, T.C., et al., TGF-B2 and soluble p55 TNFR modulate VCAM-1 expression in glioma cells and brain derived endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 1997. 73(1-2): p. 155-61、Li, M.O., et al., Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 99-146)。その上、TGF は、ナチュラルキラー (NK) 細胞におけるアンタゴニスト効果を有し、リンホカイン活性化キラー (LAK) 細胞を誘導及び増殖する (Ruffini, P.A., et al., Factors, including transforming growth factor beta, released in the glioblastoma residual cavity, impair activity of adherent lymphokine-activated killer cells. *Cancer Immunol Immunother*, 1993. 36(6): p. 409-16、Rook, A.H., et al., Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol*, 1986. 136(10): p. 3916-20、Kasid, A., G.I. Bell, and E.P. Director, Effects of transforming growth factor-beta on human lymphokine-activated killer cell precursors. Autocrine inhibition of cellular proliferation and differentiation to immune killer cells. *J Immunol*, 1988. 141(2): p. 690-8、Tsunawaki, S., et al., Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature*, 1988. 334(6179): p. 260-2、Hirte, H. and D.A. Clark, Generation of lymphokine-activated killer cells in human ovarian carcinoma ascitic fluid: identification of transforming growth factor-beta as a suppressive factor. *Cancer Immunol Immunother*, 1991. 32(5): p. 296-302、Naganuma, H., et al., Transforming growth factor-beta inhibits interferon-gamma secretion by lymphokine-activated killer cells stimulated with tumor cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1996. 36(11): p. 789-95)。

10

20

30

【 0 0 9 3 】

従って、TGF の免疫抑制因子機能は、癌細胞ワクチンの有効性の変調において主要な役割を果たす可能性がある。TGF は、GMCSF の誘導する骨髄由来樹状細胞 (DC) 成熟化 (Yamaguchi, Y., et al., Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells*, 1997. 15(2): p. 144-53) 並びに MHC クラス II 及び共刺激分子の発現 (Geissmann, F., et al., TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol*, 1999. 162(8): p. 4567-75) を阻害する。未熟 DC による抗原提示が、T 細胞無応答性をもたらすことが示された (Steinman, R.M., et al., Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. 987: p. 15-25)。TGF もまた、その抗原提示機能 (Du, C. and S. Sriram, Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 p

40

50

roduction by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. J Leukoc Biol, 1998. 64(1): p. 92-7、Takeuchi, M., P. Alard, and J.W. Streilein, TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. J Immunol, 1998. 160(4): p. 1589-97) 等、マクロファージ活性化 (Ashcroft, G.S., Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. Microbes Infect, 1999. 1(15): p. 1275-82) を阻害する。そのため、発現遍在性及び T G F の G M C S F 免疫調節性機能における阻害効果の両方が、本発明の自家癌ワクチン治療アプローチにおける全腫瘍 T G F 発現のノックダウンを支持する。

【 0 0 9 4 】

従って、T G F の免疫抑制因子機能は、癌細胞ワクチンの有効性の変調において主要な役割を果たす可能性がある。T G F は、G M C S F の誘導する骨髄由来樹状細胞 (D C) の成熟化 (Montenegro, D.E., et al., TGFbeta inhibits GM-CSF-induced phosphorylation of ERK and MEK in human myeloid leukaemia cell lines via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k). Cell Prolif, 2009. 42(1): p. 1-9) 並びに M H C クラス II 及び共刺激分子の発現 (Steinman, R.M., et al., Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. Ann N Y Acad Sci, 2003. 987: p. 15-25) を阻害する。未熟 D C による抗原提示が、T 細胞無応答性をもたらすことが示された (Ashcroft, G.S., Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. Microbes Infect, 1999. 1(15): p. 1275-82) 。T G F もまた、その抗原提示機能 (Takeuchi, M., P. Alard, and J.W. Streilein, TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. J Immunol, 1998. 160(4): p. 1589-97、Ruffini, P.A., et al., Factors, including transforming growth factor beta, released in the glioblastoma residual cavity, impair activity of adherent lymphokine-activated killer cells. Cancer Immunol Immunother, 1993. 36(6): p. 409-16) 等、マクロファージ活性化 (Du, C. and S. Sriram, Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. J Leukoc Biol, 1998. 64(1): p. 92-7) を阻害する。そのため、発現の遍在性及び G M C S F 免疫調節性機能における T G F の阻害効果の両方が、この自家癌ワクチン治療アプローチにおける全腫瘍 T G F 発現のノックダウンを支持する。

【 0 0 9 5 】

本明細書に記載されている特定の実施形態は、説明のために示されており、本発明を限定するものではないことが理解されるであろう。本発明の主要な特色は、本発明の範囲から逸脱することなく様々な実施形態において用いることができる。当業者であれば、本明細書に記載されている特定の手順の多数の均等物を認識するであろう、或いは単なるルーチン実験法を用いて解明することができる。このような均等物は、本発明の範囲内と考えられ、特許請求の範囲により保護されている。

【 0 0 9 6 】

本明細書において言及されているあらゆる刊行物及び特許出願は、本発明に属す当業者の技能レベルを示す。あらゆる刊行物及び特許出願は、あたかも各刊行物又は特許出願それぞれが、それぞれ特に参照により援用されていることが示されているのと同じ程度まで本明細書に参照により援用する。

【 0 0 9 7 】

単数形の単語の使用は、特許請求の範囲及び / 又は本明細書において用語「含む」と併せて用いた場合、「1」を指すことができるが、これは、「1又は2以上の」、「少なくとも1」及び「1又は1を超える」の意義とも一致する。特許請求の範囲における用語「又は」の使用は、他の事柄のみを意味することが明示されている、或いは他の事柄が相互に排他的でない限り、「及び / 又は」を指すよう用いられる。なお、本開示は、他の事柄のみ及び「及び / 又は」を意味する定義を支持する。本出願を通じて、用語「およそ」は、数値がデバイスの固有の誤差変動を包含すること、方法が数値又は試験対象間に存在する変動の決定に用いられることを指し示すよう用いられる。

【0098】

本明細書及び請求項（複数化）において用いられている通り、単語「含む」（及び含んでいるや「含んだ」等、「含む」のあらゆる形態）、「有する」（及び有しているや「有した」等、「有する」のあらゆる形態）、「包含する」（及び包含しているや「包含する」等、「包含する」のあらゆる形態）又は「含有する」（及び含有しているや「含有した」等、「含有する」のあらゆる形態）は、包括的又はオープンエンドであり、追加的な列挙されていない要素又は方法ステップを排除しない。

【0099】

本明細書における用語「又はそれらの組合せ」は、該用語に先行する羅列した物品のあらゆる並べ替え及び組合せを意味する。例えば、「A、B、C又はそれらの組合せ」は、A、B、C、AB、AC、BC又はABC、特定の文脈において順序が重要な場合は、さらにBA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC又はCABのうち少なくとも1種を包含することを目的とする。この例を続けると、BB、AAA、MB、BBC、AABCCCC、CBBAAA、CABABBBその他等、1又は2以上の物品又は用語の繰り返しを含有する組合せが明らかに包含される。当業者であれば、通常、文脈からそうでないことが明らかでない限り、いかなる組合せにおいても物品又は用語の数には限界がないことを理解するであろう。

10

【0100】

本明細書において、「およそ」、「実質的」又は「実質的に」等、これらに限定されない近似の単語は、このように修飾された場合、必ずしも絶対的又は完璧ではないが、提示されている通りの条件の指定を保證するのに当業者にとって十分に近いものであると考えられると理解される条件を意味する。記述が変動し得る範囲は、設定することのできる変化の大きさに依存し、依然として、修飾された特色を依然として修飾されていない特色に要求された特徴及び能力を有するものとして当業者に認識させる。一般に、だが先行する記述に鑑み、「およそ」等、近似の単語によって修飾された本明細書における数値は、記載の数値から少なくとも±1、2、3、4、5、6、7、10、12又は15%変動し得る。

20

【0101】

本明細書において開示及び請求されているあらゆる組成物及び/又は方法は、本開示を踏まえて必要以上の実験法なしで作製及び実施することができる。好ましい実施形態に関して本発明の組成物及び方法を記載してきたが、当業者であれば、本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、組成物及び/又は方法及び本明細書に記載されている方法のステップ又はステップの並び方を変化させてよいことが明らかであろう。当業者にとって明らかなこのような類似の代用物及び修正は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲及び概念の内にあると判断される。

30

【0102】

（参考文献）

1. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., ed. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. 2008, Garland Science: New York. 674-687
2. Fakhrai, H., et al., Phase I clinical trial of a TGF-beta antisense-modified tumor cell vaccine in patients with advanced glioma. *Cancer Gene Ther*, 2006. 13(12): p. 1052-60
3. Nemunaitis, J., GVAX (GMCSF gene modified tumor vaccine) in advanced stage non small cell lung cancer. *J Control Release*, 2003. 91(1-2): p. 225-31
4. Nemunaitis, J., et al., Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther*, 2006. 13(6): p. 555-62
5. Nemunaitis, J. and J. Nemunaitis, A review of vaccine clinical trials for non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2007. 7(1): p. 89-102
6. Ahmad, M., R.C. Rees, and S.A. Ali, Escape from immunotherapy: possible

40

50

- mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. 53(10): p. 844-54
7. Hege, K.M., K. Jooss, and D. Pardoll, GM-CSF gene-modified cancer cell immunotherapies: of mice and men. *Int Rev Immunol*, 2006. 25(5-6): p. 321-52
 8. Dranoff, G., et al., Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(8): p. 3539-43
 9. Hege, K.M. and D.P. Carbone, Lung cancer vaccines and gene therapy. *Lung Cancer*, 2003. 41 Suppl 1: p. S103-13
 10. Huang, A.Y., et al., Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science*, 1994. 264(5161): p. 961-5
 11. Banchereau, J., et al., Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2000. 18: p. 767-811
 12. Hodi, F.S., et al., Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(8): p. 3005-10
 13. Wick, W., U. Naumann, and M. Weller, Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des*, 2006. 12(3): p. 341-9
 14. Bierie, B. and H.L. Moses, Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(7): p. 506-20
 15. Levy, L. and C.S. Hill, Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. 17(1-2): p. 41-58
 16. Sporn, M.B., et al., Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science*, 1986. 233(4763): p. 532-4
 17. Massague, J., The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell*, 1987. 49(4): p. 437-8
 18. Bodmer, S., et al., Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol*, 1989. 143(10): p. 3222-9
 19. Border, W.A. and E. Ruoslahti, Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest*, 1992. 90(1): p. 1-7
 20. Chen, T.C., et al., TGF-B2 and soluble p55 TNFR modulate VCAM-1 expression in glioma cells and brain derived endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 1997. 73(1-2): p. 155-61
 21. Li, M.O., et al., Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 99-146
 22. Yamaguchi, Y., et al., Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells*, 1997. 15(2): p. 144-53
 23. Geissmann, F., et al., TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol*, 1999. 162(8): p. 4567-75
 24. Ardesna, K.M., et al., The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2000. 96(3): p. 1039-46
 25. Montenegro, D.E., et al., TGFbeta inhibits GM-CSF-induced phosphorylation of ERK and MEK in human myeloid leukaemia cell lines via inhibition of phosphatase

- tidylinositol 3-kinase (PI3-k). *Cell Prolif*, 2009. 42(1): p. 1-9
26. Steinman, R.M., et al., Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. 987: p. 15-25
27. Ashcroft, G.S., Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect*, 1999. 1(15): p. 1275-82
28. Du, C. and S. Sriram, Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. *J Leukoc Biol*, 1998. 64(1): p. 92-7
29. Takeuchi, M., P. Alard, and J.W. Streilein, TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol*, 1998. 160(4): p. 1589-97
30. Ruffini, P.A., et al., Factors, including transforming growth factor beta, released in the glioblastoma residual cavity, impair activity of adherent lymphokine-activated killer cells. *Cancer Immunol Immunother*, 1993. 36(6): p. 409-16
31. Fakhrai, H., et al., Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(7): p. 2909-14
32. Fantini, M.C., et al., Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*, 2004. 172(9): p. 5149-53
33. Thomas, D.A. and J. Massague, TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 2005. 8(5): p. 369-80
34. Polak, M.E., et al., Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer*, 2007. 96(12): p. 1879-87
35. Rook, A.H., et al., Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol*, 1986. 136(10): p. 3916-20
36. Kasid, A., G.I. Bell, and E.P. Director, Effects of transforming growth factor-beta on human lymphokine-activated killer cell precursors. Autocrine inhibition of cellular proliferation and differentiation to immune killer cells. *J Immunol*, 1988. 141(2): p. 690-8
37. Tsunawaki, S., et al., Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature*, 1988. 334(6179): p. 260-2
38. Hirte, H. and D.A. Clark, Generation of lymphokine-activated killer cells in human ovarian carcinoma ascitic fluid: identification of transforming growth factor-beta as a suppressive factor. *Cancer Immunol Immunother*, 1991. 32(5): p. 296-302
39. Naganuma, H., et al., Transforming growth factor-beta inhibits interferon-gamma secretion by lymphokine-activated killer cells stimulated with tumor cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1996. 36(11): p. 789-95
40. Penafuerte, C. and J. Galipeau, TGF beta secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. 57(8): p. 1197-206
41. Nemunaitis, J., et al., Phase II trial of Belagenpumatucel-L, a TGF-beta 2 antisense gene modified allogeneic tumor vaccine in advanced non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancer Gene Ther*, 2009. 16(8): p. 620-4
42. Maples PB, K.P., Oxendine I, Jay C, Yu Y, Kuhn J, Nemunaitis J, TAG Vaccine: Autologous Tumor Vaccine Genetically Modified to Express GM-CSF and Block P

- roduction of TGFβ2. *BioProcessing Journal*, 2009. 8(2)
43. Nemunaitis, J., Kumar, P., Senzer, N., Yu, Y., Oxendine, I., Tong, A.W., Maples, P.B., A phase I trial of GM-CSF gene-TGFβ antisense gene autologous tumor cell (TAG) vaccine in advanced cancer. *Mol Therapy*, 2009. 17 (Suppl 1): p. S206
44. Maples, P.B., et al. Autologous Tumor Cell Vaccine Genetically Modified To Express GM-CSF and Block Expression of TGFβ2 (Abstract # 553). in *The Twelfth Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy*. 2009. San Diego, California
45. Page, R.E., et al., Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer. *Cell Oncol*, 2007. 29(4): p. 289-99 10
46. Schalken, J.A., et al., fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J Clin Invest*, 1987. 80(6): p. 1545-9
47. Mbikay, M., et al., Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br J Cancer*, 1997. 75(10): p. 1509-14
48. Cheng, M., et al., Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer*, 1997. 71(6): p. 966-71 20
49. Bassi, D.E., H. Mahloogi, and A.J. Klein-Szanto, The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog*, 2000. 28(2): p. 63-9
50. Bassi, D.E., et al., Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog*, 2001. 31(4): p. 224-32
51. Lopez de Cicco, R., et al., Human carcinoma cell growth and invasiveness is impaired by the propeptide of the ubiquitous proprotein convertase furin. *Cancer Res*, 2005. 65(10): p. 4162-71
52. Khatib, A.M., et al., Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol*, 2002. 160(6): p. 1921-35 30
53. Thomas, G., Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(10): p. 753-66
54. Pesu, M., et al., T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. *Nature*, 2008. 455(7210): p. 246-50
55. Pesu, M., et al., Proprotein convertase furin is preferentially expressed in T helper 1 cells and regulates interferon gamma. *Blood*, 2006. 108(3): p. 983-5
56. Lu, J., et al., TAP-independent presentation of CTL epitopes by Trojan antigens. *J Immunol*, 2001. 166(12): p. 7063-71 40
57. Fogel-Petrovic, M., et al., Physiological concentrations of transforming growth factor beta1 selectively inhibit human dendritic cell function. *Int Immunopharmacol*, 2007. 7(14): p. 1924-33
58. Bommireddy, R. and T. Doetschman, TGFβ1 and Treg cells: alliance for tolerance. *Trends Mol Med*, 2007. 13(11): p. 492-501
59. Henrich, S., et al., The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol*, 2003. 10(7): p. 520-6
60. Pearton, D.J., et al., Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Exp Dermatol*, 2001. 1 50

0(3): p. 193-203

61. Rao, D., Maples, P.B., Senzer, N., Kumar, P., Wang, Z., Papper, B.O., Yu, Y., Haddock, C., Tong, A., Nemunaitis, J., Bi-functional shRNA: A novel approach of RNA interference. (submitted), 2009
62. Matranga, C., et al., Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 2005. 123(4): p. 607-20
63. Leuschner, P.J., et al., Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep*, 2006. 7(3): p. 314-20
64. Rana, S., et al., Stathmin 1: a novel therapeutic target for anticancer activity. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008. 8(9): p. 1461-70 10
65. Azuma-Mukai, A., et al., Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(23): p. 7964-9
66. Jackson, S.A., S. Koduvayur, and S.A. Woodson, Self-splicing of a group I intron reveals partitioning of native and misfolded RNA populations in yeast. *RNA*, 2006. 12(12): p. 2149-59
67. Funston, G.M., et al., Expression of heterologous genes in oncolytic adenoviruses using picornaviral 2A sequences that trigger ribosome skipping. *J Gen Virol*, 2008. 89(Pt 2): p. 389-96
68. Tong, A.W., et al., Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL 24): biologic outcome in advanced cancer patients. *Mol Ther*, 2005. 11(1): p. 160-72 20
69. Hu, X., et al., Characterization of a unique factor-independent variant derived from human factor-dependent TF-1 cells: a transformed event. *Leuk Res*, 1998. 22(9): p. 817-26
70. Santoli, D., et al., Synergistic and antagonistic effects of recombinant human interleukin (IL) 3, IL-1 alpha, granulocyte and macrophage colony-stimulating factors (G-CSF and M-CSF) on the growth of GM-CSF-dependent leukemic cell lines. *J Immunol*, 1987. 139(10): p. 3348-54 30
71. Romero, P., Current state of vaccine therapies in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 2008. 9 Suppl 1: p. S28-36
72. Robinson, J., et al., The European searchable tumour line database. *Cancer Immunol Immunother*, 2009
73. <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext>
74. Kumar, P.J., C. Oxendine, I Nemunaitis, J. Maples, P., TAG Xenograft Vaccine: Xenograft-Expanded Autologous Tumor Vaccine Genetically Modified to Express GM-CSF and Block Production of TGF-2. *BioProcessing Journal*, 2009(Spring 2009): p. 30-36
75. Burghardt, I., et al., Pirfenidone inhibits TGF-beta expression in malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 354(2): p. 542-7 40
76. McMahon, S., M.H. Laprise, and C.M. Dubois, Alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion process. Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFbeta. *Exp Cell Res*, 2003. 291(2): p. 326-39
77. Arteaga, C.L., Inhibition of TGFbeta signaling in cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev*, 2006. 16(1): p. 30-7
78. Constam, D.B., et al., Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol*, 1992. 148(5): p. 1404-10
79. Eastham, J.A., et al., Transforming growth factor-beta 1: comparative im 50

munohistochemical localization in human primary and metastatic prostate cancer. Lab Invest, 1995. 73(5): p. 628-35

80. Friedman, E., et al., High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. 4(5): p. 549-54

81. Jakowlew, S.B., et al., Expression of transforming growth factor beta ligand and receptor messenger RNAs in lung cancer cell lines. Cell Growth Differ, 1995. 6(4): p. 465-76

82. Kong, F.M., et al., Elevated plasma transforming growth factor-beta 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. Ann Surg, 1995. 222(2): p. 155-62

83. Yamada, N., et al., Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma. Int J Cancer, 1995. 62(4): p. 386-92

84. Eder, I.E., et al., Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 in serum and urine from patients with bladder carcinoma. J Urol, 1996. 156(3): p. 953-7

10

【 図 1 A 】

FANG プラスミドトランスフェクト前&後の
自家腫瘍細胞における TGFβ1 発現(4日目)

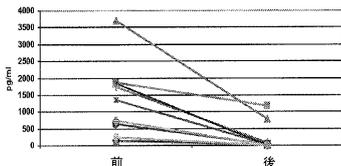


FIG. 1A

【 図 2 A 】

FANG-004(NSCLC)トランスフェクション前及び後/
放射線照射後の細胞による TGFβ1 発現

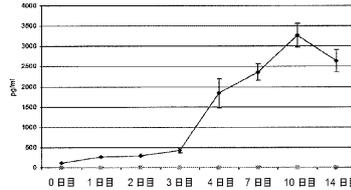


FIG. 2A

【 図 1 B 】

FANG プラスミドトランスフェクト前&後の
自家腫瘍細胞における TGFβ2 発現(4日目)

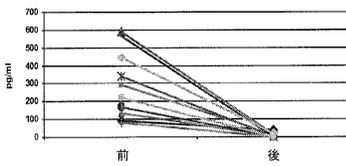


FIG. 1B

【 図 2 B 】

FANG-004(NSCLC)トランスフェクション前及び後/
放射線照射後の細胞による TGFβ2 発現

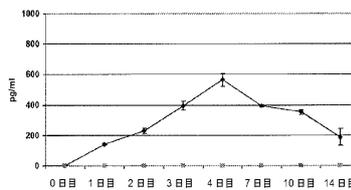


FIG. 2B

【 図 1 C 】

FANG プラスミドトランスフェクト前&後の
自家腫瘍細胞における GM-CSF 発現(4日目)

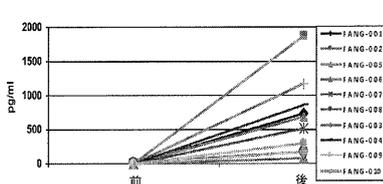


FIG. 1C

【 図 2 C 】

FANG-004(NSCLC)トランスフェクト前及び後/
放射線照射後の細胞による GMCSF 発現

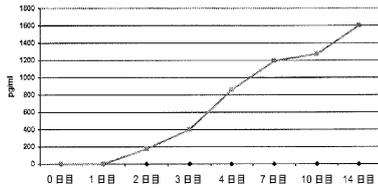


FIG. 2C

【 図 2 E 】

TAG-004(NSCLC)トランスフェクション前及び後/
放射線照射後の細胞による TGFβ2 発現

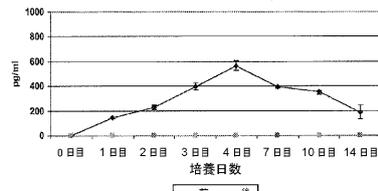


FIG. 2E

【 図 2 D 】

TAG-004(NSCLC)トランスフェクション前及び後/
放射線照射後の細胞による TGFβ1 発現

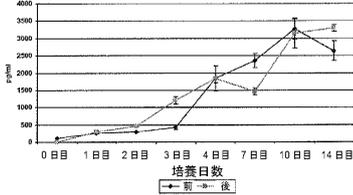


FIG. 2D

【 図 2 F 】

TAG-004(NSCLC)トランスフェクト前及び後/
放射線照射後の細胞による GMCSF 発現

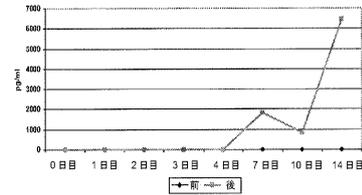


FIG. 2F

【 図 3 A 】

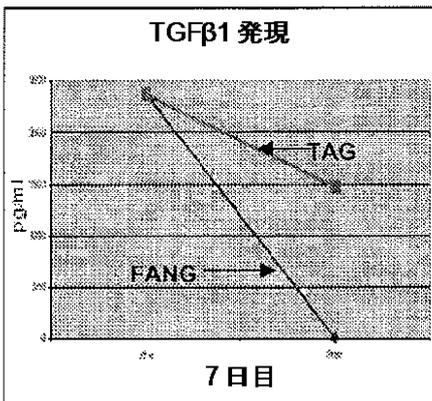


FIG. 3A

【 図 3 B 】

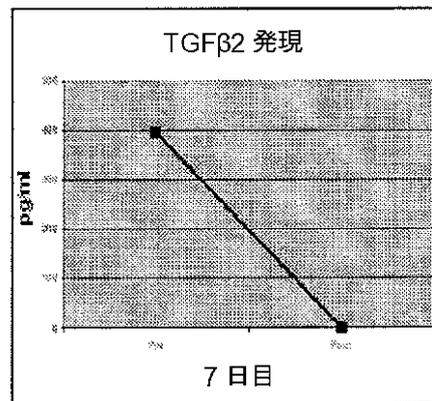


FIG. 3B

【 図 3 C 】

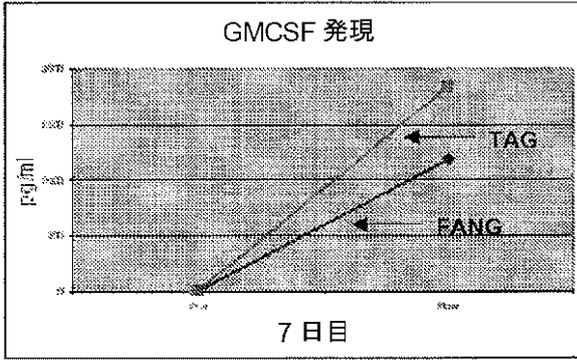
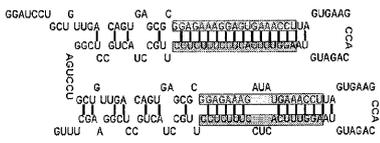


FIG. 3C

【 図 4 A 】



==== =センス(パッセンジャー)鎖
 ===== =アンチセンス(ガイド)鎖

FIG. 4A

【 図 4 B 】

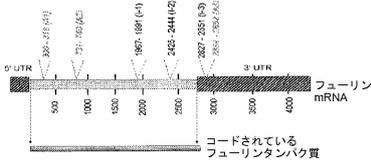


FIG. 4B

【 図 5 】

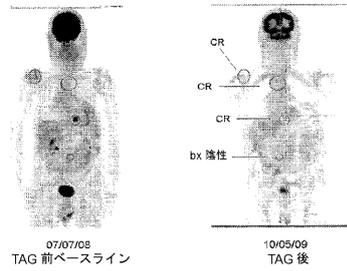


FIG. 5

【 図 6 A 】

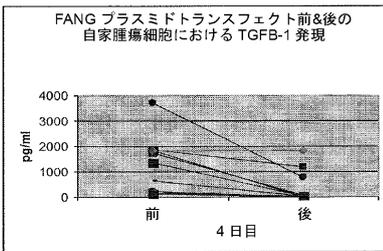


FIG. 6A

【 図 6 C 】

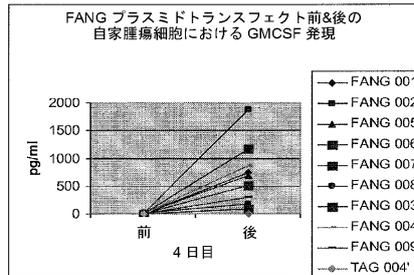


FIG. 6C

【 図 6 B 】

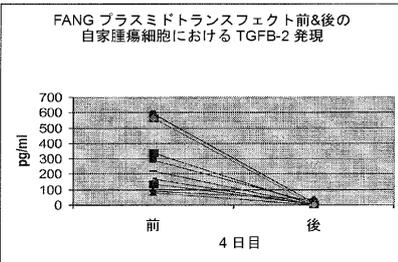


FIG. 6B

【 図 7 】

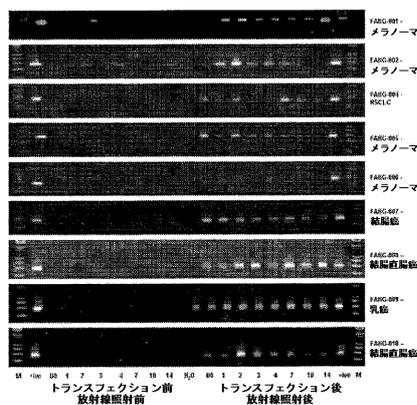


FIG. 7

【 図 16 】

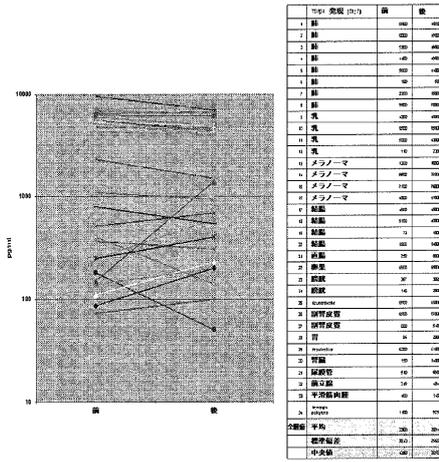


FIG. 16

【 図 17 】

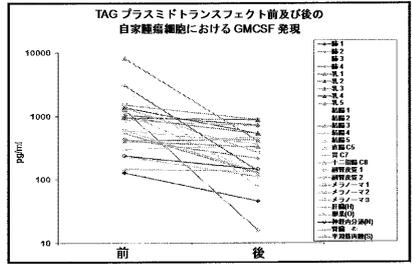


FIG. 17

【 図 19 】

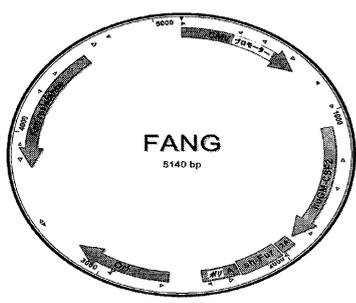


FIG. 19

【 図 18 A 】

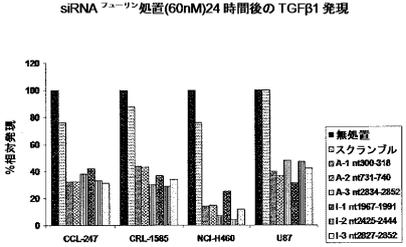


FIG. 18A

【 図 18 B 】

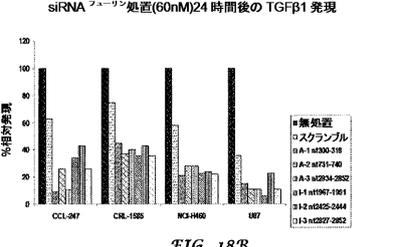


FIG. 18B

【手続補正書】

【提出日】平成24年9月4日(2012.9.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) cDNAをコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート及び

フューリンをコードするmRNA転写産物の領域とハイブリダイズして、これによりRNA干渉を介してフューリン発現を阻害できる1又は2以上の低分子ヘアピン型RNA(shRNA)をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサート

を含むbisshRNAフューリン/GMCSF発現ベクタープラスミドと、

1又は2以上の必要に応じたワクチンアジュバントと

を含むワクチン組成物。

【請求項2】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) cDNAをコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、及びフューリンをコードするmRNA転写産物の領域とハイブリダイズして、これによりRNA干渉を介してフューリン発現を阻害できる1又は2以上の低分子ヘアピン型RNA(shRNA)をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含むbisshRNAフューリン/GMCSF発現ベクタープラスミド、並びに1又は2以上の必要に応じたワクチンアジュバントを含む、癌の症状を予防、治療及び/又は寛解するための自家細胞ワクチン

°

【請求項3】

1又は2以上の癌細胞におけるトランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF-ベータ又はTGF-)及びGM-CSFのレベルを測定することにより療法の進行をモニターするステップであって、TGF-レベルの低下及びGM-CSFレベルの上昇が療法の成功を示すステップと、

前記TGF-及びGM-CSFのレベルに基づき自家細胞ワクチンの投与を変更するステップと

を含む方法に用いる、請求項2に記載のワクチン。

【請求項4】

癌が、メラノーマ、非小細胞肺癌、胆嚢癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、肝癌、肝癌転移及びユーイング肉腫からなる群から選択される、請求項2又は3に記載のワクチン。

【請求項5】

患者から無菌的に収集した1又は2以上の癌細胞を無菌容器内の抗生物質溶液中に置くステップと、

前記収集した溶液から細胞懸濁液を生成するステップであって、前記細胞懸濁液の生成が酵素による解体、機械的脱凝集又は両者によって達成されるステップと、

前記細胞懸濁液を電気穿孔することによって前記細胞を遺伝的に改変し、GM-CSF cDNAをコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、及びフューリンをコードするmRNA転写産物の領域とハイブリダイズして、これによりRNA干渉を介してフューリン発現を阻害できる1又は2以上の低分子ヘアピン型RNA(shRNA)をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含むbisshRNAフューリン/GMCSF発現ベクタープラスミドを有するワクチンを作製するステップと、

前記ワクチンを収集するステップと、
 前記ワクチンに放射線照射するステップと、
 前記ワクチンを凍結するステップと
 を含む、フューリンノックダウン及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 増強 (FANG) 癌ワクチンを作製する方法。

【請求項 6】

遺伝的に改変された細胞が、放射線照射によって増殖能力のない状態にされている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

遺伝的に改変された細胞が自家細胞、異種移植片増幅細胞、同種異系細胞、又は樹立細胞系である同種異系細胞である、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

遺伝的に改変された細胞が、月に 1 回を最大 12 用量まで対象に投与される、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

遺伝的に改変された細胞の投与が、追加的な治療薬との併用療法の一部であり、前記併用療法に用いられる追加的な治療薬が IFN である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

治療を必要とする対象を同定するステップと、
 前記対象から癌組織試料を収集するステップと、
 前記収集された癌試料における癌細胞を、GM-CSF をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、及びフューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる 1 又は 2 以上の低分子ヘアピン型 RNA (shRNA) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートを含む発現ベクターを前記細胞にトランスフェクトすることによって、遺伝的に改変するステップと、
 癌の症状の治療又は寛解に十分な量で、前記対象に治療上有効用量の前記遺伝的に改変された細胞を投与するステップと

を含む、癌を治療する方法に用いるための bisshRNA。

【請求項 11】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) cDNA をコードする、プロモーターに作動可能に連結した第一の核酸インサート、並びに

RNA 干渉の切断及び隔離機構両方のための単一の標的部位を提供する 1 又は 2 以上の二機能性低分子ヘアピン型 RNA (shRNA フューリン) をコードする、前記プロモーターに作動可能に連結した第二の核酸インサートであって、二機能性 shRNA フューリン が、フューリンをコードする mRNA 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより RNA 干渉を介してフューリン発現を阻害できる、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む第一のステム-ループ構造並びに前記ガイド鎖の 1 又は 2 以上の塩基対 mismatches を含む第二のステム-ループ構造を含む第二の核酸インサート

を含む bisshRNA フューリン / GM-CSF 発現ベクタープラスミドと、

1 又は 2 以上の必要に応じたワクチンアジュバントと

を含む、RNA 干渉を介したフューリン発現の阻害による癌治療のための自家細胞ワクチン組成物。

【請求項 12】

第二のステム-ループ構造が、3 塩基対 mismatches を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

標的細胞を選択するステップと、

前記標的細胞に、1 又は 2 以上の GM-CSF と、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む第一のステム-ループ構造並びに前記パッセンジャー鎖の 1 又は 2 以上

の塩基対ミスマッチを含む第二のステム - ループ構造を含み、フューリンをコードする m R N A 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより R N A 干渉を介してフューリン発現を阻害する二機能性低分子ヘアピン (s h R N A) フューリンとを含むコンストラクトをトランスフェクトするステップと

を含む、標的細胞において R N A 干渉を介してフューリン発現を阻害する方法に用いる、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

標的細胞を選択するステップと、

前記標的細胞に、1又は2以上の G M - C S F と、完全に相補的なガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む第一のステム - ループ構造並びに前記ガイド鎖の 1 又は 2 以上の塩基対ミスマッチを含む第二のステム - ループ構造を含み、フューリンをコードする m R N A 転写産物の領域とハイブリダイズして、これにより R N A 干渉を介してフューリン発現を阻害する二機能性低分子ヘアピン (s h R N A) フューリンとを含むコンストラクトをトランスフェクトするステップと

を含む、標的細胞において R N A 干渉を介してフューリン発現を阻害する方法に用いる G M - C S F 及び二機能性低分子ヘアピン (s h R N A) フューリン。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2010/061344
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
<i>A61K 31/7105</i> (2006.01) <i>A61K 31/711</i> (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, WPI, EPODOC (GM-CSF, furin, siRNA and similar terms)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Maples, P. B. et al, "FANG Vaccine: Autologous Tumor Cell Vaccine Genetically Modified to Express GM-CSF and Block Production of Furin." BioProcess J, (Winter 2009/2010, 23 March 2010) Vol 8, No 4 pages 4-14. (See whole document)	1-76
X	US 2007/0224194 A1 (McCOLL et al) 27 September 2007 (Example 6 and 7)	37-42
Y	PESU, M. et al "T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance", Nature, 2008, vol. 455, pages 246-250 See whole document	37-42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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	
Date of the actual completion of the international search 25 January 2011		Date of mailing of the international search report 28 FEB 2011
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer ANITA PREMKUMAR AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. : +61 2 6283 2572

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/061344

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RAO, D. et al "siRNA vs shRNA: Similarities and differences" Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, vol. 61, pages 746-799 (Abstract, pages 751-752)	37-42
Y	SCAMUFFA, N. et al, "Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells." (2008), The Journal of Clinical Investigation, Vol 118, pages 352-363. (Abstract, page 360 col 2 para 3)	37-42.
A	KUMAR, P. et al "TAG Xenograft Vaccine: Xenograft-Expanded Autologous Tumor Vaccine Genetically Modified to Express GM-CSF and Block Production of TGFβ2", 2009, BioProcessing Journal, vol. 8 no. 1 (Spring 2009, Published online 24 February 2009) pages 30-36 (See whole document)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/061344

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
US	2007224194	AU	2005244958	EP	1765375	US	2005272664
		WO	2005112971				
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.							
END OF ANNEX							

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 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100120086

弁理士 高 津 一也

(74) 代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(72) 発明者 ネムナイティス ジョン ジェイ .

アメリカ国 テキサス 7 5 1 0 4 - 6 9 1 1 セダーヒル マラードポイントドライブ 1 1 3 6

(72) 発明者 センツァー ニール

アメリカ国 テキサス 7 5 2 3 0 ダラス ミルフォードブレイス 8

(72) 発明者 メイブルズ フィリップ ビー .

アメリカ国 テキサス 7 6 2 5 8 パイロットポイント セントチャールズアヴェニュー 1 8 5 0

(72) 発明者 ラオ ドナルド

アメリカ国 テキサス 7 5 2 0 4 ダラス ブラックバーンストリート 3 3 5 5

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA13 BA44 DA19 NA14 ZA591 ZA661 ZA751 ZA891 ZA941

ZB261

4C085 AA03 CC03 DD62 DD86 EE01 EE06