

# プラスミドベクターによる遺伝子治療の可能性

アンジェス株式会社

2022年7月15日 第28回日本遺伝子細胞治療学会学術集会



## 利益相反の開示

---

発表者は、遺伝子治療用製品コラテジェンを製造販売しているアンジェス株式会社の従業員である。

発表内容には、演者の個人的な見解が含まれている。

## コラテジェンの情報

### ■ 効能、効果又は性能

標準的な薬物治療の効果が不十分で血行再建術の施行が困難な慢性動脈閉塞症（閉塞性動脈硬化症及びバージャー病）における潰瘍の改善

### ■ 用法、用量又は使用方法

通常、成人には、投与対象肢の虚血部位に対して1カ所あたり本品0.5mgを8カ所に4週間間隔で2回筋肉内投与する（1回総計4mg）。なお、臨床症状が残存する場合には、2回目投与の4週後に3回目の投与を行うこともできる。また、投与に際しては、日局生理食塩液で希釈し、希釈後の1カ所あたりの薬液量は3mLとし、投与対象筋が小さい場合には2mLまで減じてよい。

### ■ 承認条件

重症化した慢性動脈閉塞症に関する十分な知識・治療経験を持つ医師のもとで、創傷管理を複数診療科で連携して実施している施設で本品を使用すること。

条件及び期限付承認後に改めて行う本品の製造販売承認申請までの期間中は、本品を使用する症例全例を対象として製造販売後承認条件評価を行うこと。

### ■ 期限

5年

# 遺伝子治療の歴史

---

|       |  |
|-------|--|
| 1990年 | アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症へのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入   |
| 1995年 | 国内ADA欠損症への遺伝子導入  |
| 1999年 | オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症でのアデノウイルスベクターによる全身性の過剰炎症反応  |
| 2002年 | X連鎖複合免疫不全症でのレトロウイルスベクターによる遺伝子導入細胞治療での白血病発症(がん関連遺伝子の発現活性化)<br>～ 遺伝子治療の冬の時代～           |
| 2009年 | 副腎白質ジストロフィーでの造血幹細胞への遺伝子導入  |
| 2011年 | 血友病Bでのアデノ随伴ウイルスベクターでの遺伝子導入   |
| 2012年 | リポ蛋白リパーゼ発現アデノ随伴ウイルスベクター(Glybera)の承認  |
| 2015年 | 腫瘍溶解性ヘルペスウイルス(Imlygic)承認   |
| 2016年 | ADA欠損症のレトロウイルスベクター(Stimvelis)承認  |
| 2017年 | CAR-T細胞療法(Kymriah)承認<br>CAR-T細胞療法(Yescarta)承認<br>網膜ジストロフィーのアデノ随伴ウイルスベクター(Luxturna)承認 |
| 2019年 | ベータサラセミアのレンチウイルス(Zynteglo)承認<br>脊髄性筋萎縮症のアデノ随伴ウイルスベクター(Zolgensma)承認                   |

---

# 遺伝子治療

- 遺伝子治療とは
  - 疾病の治療あるいは予防を目的とし
    1. 遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること
    2. 遺伝子を改変した細胞をヒトの体内に投与すること
    3. 特定の塩基配列を標的として人の遺伝子を改変すること
- 目的遺伝子を導入する手段
  - ウイルスベクター
  - プラスミドベクター
  - プラスミドとリポソームなどの複合体
- 目的遺伝子を導入する方法
  - 生体に直接投与する (*in vivo*法)
  - 体外で遺伝子を導入した細胞を投与する (*ex vivo*法)

# なぜHGF(肝細胞増殖因子)なのか

- 肝細胞の強力な分裂促進因子として同定される(中村、1984; Russell、1984)
- 一次構造が報告される(中村、1989; 宮沢、1989)
- HGFの生理作用
  - 細胞増殖促進作用
  - 細胞分散促進作用
  - 器官形成促進作用
  - 管腔形成作用
  - 抗アポトーシス作用
  - 抗線維化作用用
  - 腫瘍細胞障害作用
  - ...
- 肝臓のみならず、血管、リンパ管、神経など生体の様々な臓器・組織の形成・再生において主要な役割を果たす。
- 1995年に大阪大学の研究チームが、HGFに「血管を新生する」能力があることを報告した。
- 動脈硬化血管壁ではHGFの産生量が低下している(Morishita、1999)



◆ HGFの補充的投与により、虚血領域での血管再生による血流改善に利用できないか

# なぜプラスミドなのか

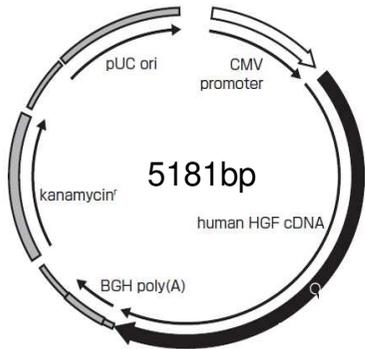
- リコンビナントHGFでの治療の課題
  - 生体内では短半減期である
  - 局所到達には全身性に大量投与が必要である
  - 局所到達にはDDS技術が必要である
  - 局所投与が可能な疾患以外は応用は難しい
- 遺伝子導入技術による治療
  - ウイルスベクター
    - ウイルスベクターの増殖、宿主細胞毒性などの制御に課題がある
  - リポソーム(リポフェクション)
    - 有望なキャリアは開発中であった
  - プラスミドベクター
    - 細胞導入効率や発現期間はウイルスベクターに劣るが、安全性の危惧は少ない



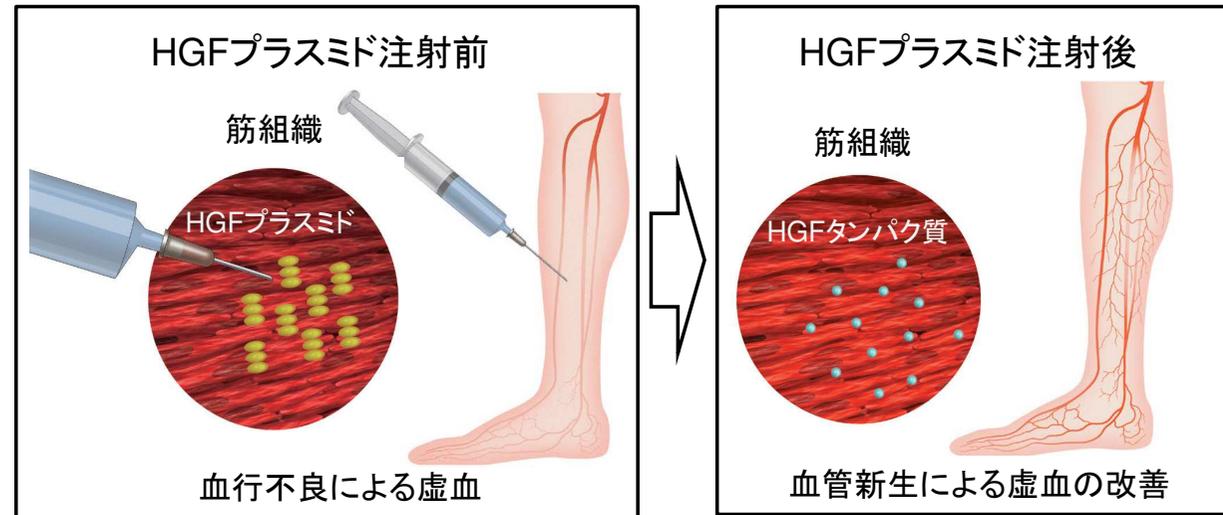
◆ HGFを搭載したプラスミドベクターを臨床応用できないか

# HGFプラスミド

## ■ コラテジェン筋注用4mg



一般名:ベペルミノゲン ペルプラスミド  
導入入遺伝子:ヒトHGF cDNA



- 2001年 重症下肢虚血における臨床評価 (first-in-human)
- 2019年 重症下肢虚血の潰瘍治療製品として条件及び期限付承認

## ■ 後押しする報告

- 裸の (naked) プラスミドDNAをマウス筋肉内に注入すると、遺伝子導入が可能 (Wolff JA、1990)
- VEGFプラスミドの筋肉内投与で重症下肢虚血の症状改善 (Baumgartner I、1989)

# HGFプラスミドベクターの実際

- 全身投与は不向き(急速に代謝される)
- 発現範囲が限定される=病巣部周辺への局所投与

- 用量と容量(ウサギ下肢筋肉投与7日後)

| 用量と容量        | HGF発現個体数 | ヒトHGF濃度                     |
|--------------|----------|-----------------------------|
| 0.5 mg/2 mL  | 20/20    | 14.824 ± 12.366 ng/g tissue |
| 0.01 mg/2 mL | 8/20     | 0.345 ± 0.492 ng/g tissue   |

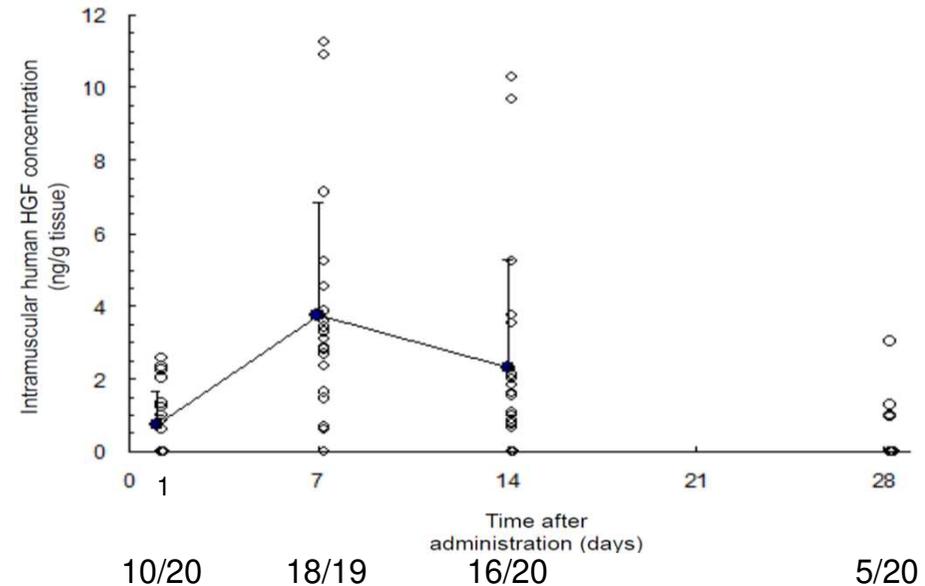
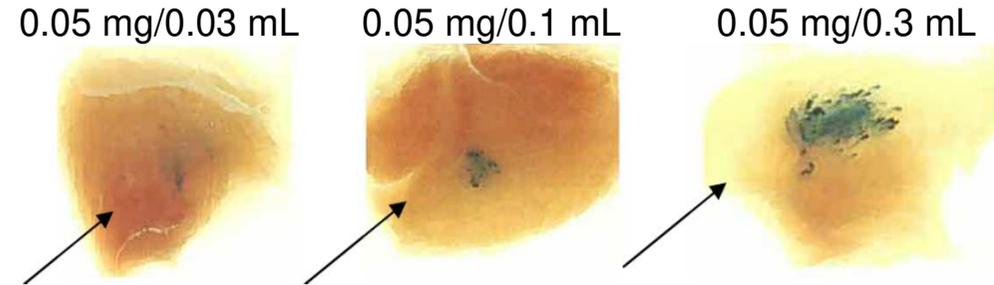
| 用量と容量         | HGF発現個体数 | ヒトHGF濃度                     |
|---------------|----------|-----------------------------|
| 0.5 mg/2 mL   | 19/20    | 15.628 ± 17.047 ng/g tissue |
| 0.5 mg/0.5 mL | 19/20    | 5.174 ± 4.662 ng/g tissue   |

- 持続時間(ウサギ下肢筋肉投与)



- ◆ 一定用量を一定容量に希釈し複数個所に繰り返し投与

LacZ遺伝子ベクターをラットの前脛骨筋投与4日後



# コラテジェンの臨床効果

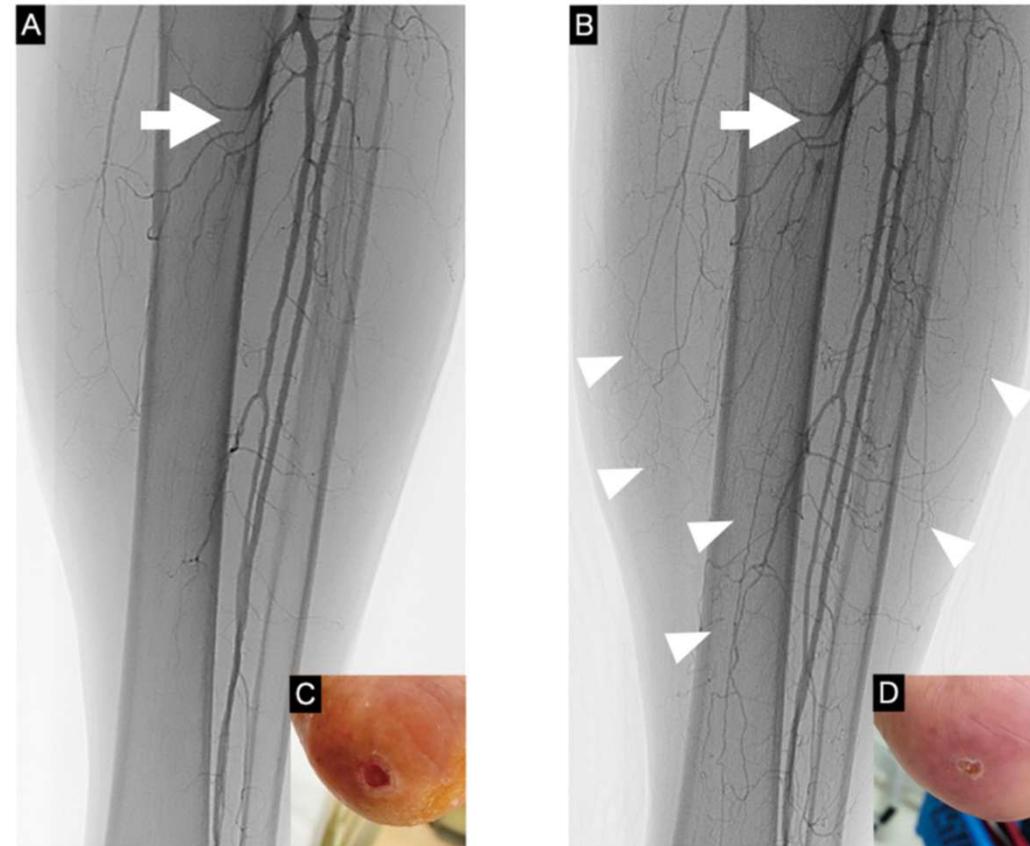
- 62歳の女性
- 血管内治療に反応しない踵の虚血性潰瘍
- コラテジェンは4週間隔で3回投与(ヒラメ筋8部位)
- 皮膚灌流圧は20から53 mmHgに改善

(A) ベペルミノゲンペルラスミド注射前の下肢血管造影で、後脛骨動脈閉塞が認められた(矢印)

(B) 注射後の下肢血管造影。脛骨動脈ら小さな枝から成長している(矢印)。いずれの血管造影ともイオジキサノール24 mLを注入した後に実施した。

(C) 踵の虚血性潰瘍。

(D) 9ヵ月後の創傷部位(治癒)。



Kakei Y, et al. Circ Rep. 2022;4:105-106.

症例提示にあたり、紹介する症例は臨床症例の一部を紹介したもので全ての症例が同様な結果を示すわけではありません

# 重要下肢虚血での各種成長因子のプラスミドでの検討

- Double VEGF/HGF Gene Therapy in Critical Limb Ischemia Complicated by Diabetes Mellitus.
- Stromal Cell-Derived Factor-1 Plasmid Treatment for Patients With Peripheral Artery Disease (STOP-PAD) Trial: Six-Month Results.
- A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Study of Hepatocyte Growth Factor in the Treatment of Critical Limb Ischemia.
- SDF-1 plasmid treatment for patients with peripheral artery disease (STOP-PAD): Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial.
- Safety and efficacy of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with critical limb ischemia.
- Gram-scale production of plasmid pUDK-HGF with current good manufacturing practices for gene therapy of critical limb ischemia.
- Safety and efficacy of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with critical limb ischemia.
- Clinical Safety and Preliminary Efficacy of Plasmid pUDK-HGF Expressing Human Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Patients with Critical Limb Ischemia.
- HIF-regulated HO-1 gene transfer improves the post-ischemic limb recovery and diminishes TLR-triggered immune responses - Effects modified by concomitant VEGF overexpression.
- Pluronic L64-mediated stable HIF-1 $\alpha$  expression in muscle for therapeutic angiogenesis in mouse hindlimb ischemia.
- Short hairpin RNA gene silencing of prolyl hydroxylase-2 with a minicircle vector improves neovascularization of hindlimb ischemia.
- Safety of a non-viral plasmid-encoding dual isoforms of hepatocyte growth factor in critical limb ischemia patients: a phase I study.
- Transfection of human HGF plasmid DNA improves limb salvage in Buerger's disease patients with critical limb ischemia.
- Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia.
- HGF-0205 Trial Investigators. Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: results of the HGF-0205 trial.
- Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia.
- Local gene transfer and expression following intramuscular administration of FGF-1 plasmid DNA in patients with critical limb ischemia.
- Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia.
- Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia: design of the hepatocyte growth factor therapeutic angiogenesis clinical trial.
- Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia.
- Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects.
- Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results.
- Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia.

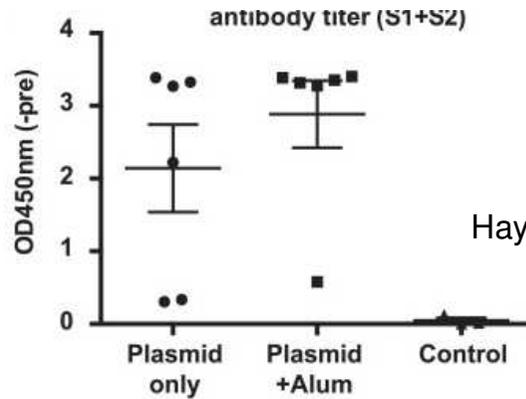
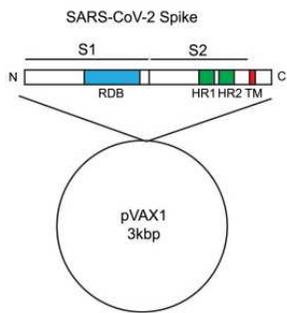


◆ VEGF DNA プラスミドのNeovasculgen(ロシア)とCollategene(日本)のみが臨床応用でれている

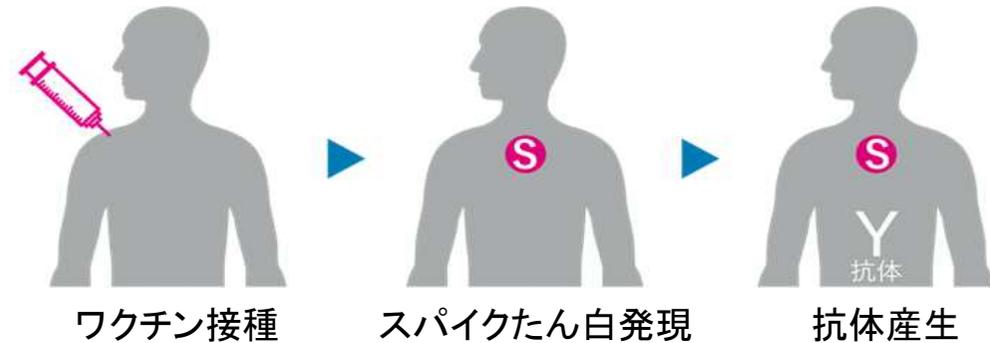
# プラスミドベクターの応用

## ■ 新型コロナウイルスに対するDNAワクチン

- スパイクタンパクの全長DNAを搭載したプラスミドベクター+アジュバント

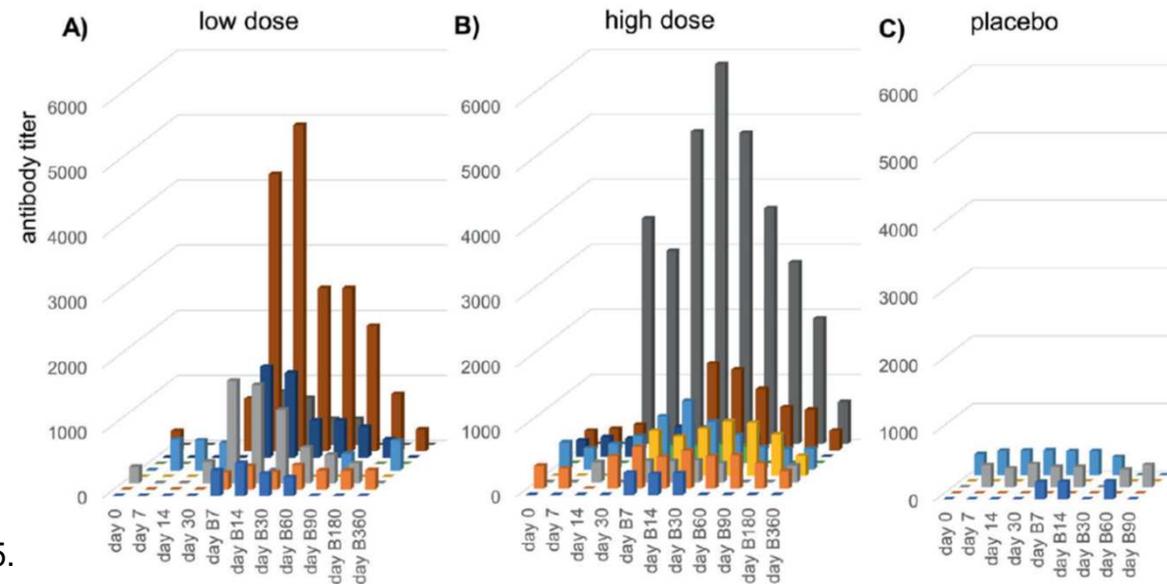


Hayashi H, et al. Curr Res Transl Med. 2022;70:103348.



## ■ 高血圧ワクチン

- Angiotensin IIのDNAを搭載したプラスミドベクター+KLH-Angiotensin II +アジュバント



Nakagami H, et al. Hypertens Res. 2022;45:61-65.

# プラスミドベクターの利点と課題

## ■ 利点

- 安全性
  - ゲノムへの挿入はない
  - 複製・転写は宿主の生理機能に依存
  - ベクターに対する抗体産生がない＝繰り返し投与が可能
  - 臨床実績がある
- 製造関連
  - 挿入DNAサイズ
  - 製造が容易、製剤の安定性に優れる
  - 製造期間が短い(6～8週間)
  - 病原ウイルスを扱う必要がない
  - 生産には一般的な培養、精製施設で製造可
  - 長期備蓄が可能
  - 特別な設備・施設が必要ない

## ■ 課題

- 細胞移行性が低い
  - プラスミド構造改良
  - DDSの利用(脂質ナノ粒子、エレクトポレーションなど)
- 目的たん白質の発現期間が限定される
  - 繰り返し投与
- 局所投与に制限される
  - 局所投与で治療可能な疾患の模索

## 最後に

---

- 課題を長所とする
  - 局所投与で遺伝子治療が可能な疾患の選択
  - 搭載遺伝子の探索
  - 細胞移行性向上(プラスミドの改良、DDSの応用)
  - 現状のツールを活かす