

(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2021-518408  
(P2021-518408A)

(43) 公表日 令和3年8月2日(2021.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 35/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/04	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/02	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00 1 0 1	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-550758 (P2020-550758)	(71) 出願人 518158868
(86) (22) 出願日 平成31年3月19日 (2019. 3. 19)	マルチピア インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日 令和2年11月13日 (2020. 11. 13)	アメリカ合衆国 テキサス 77010-
(86) 国際出願番号 PCT/US2019/022985	1028, ヒューストン, ファニン
(87) 国際公開番号 W02020/036635	ストリート 909, ヒューストン セ
(87) 国際公開日 令和2年2月20日 (2020. 2. 20)	ンター 2, スイート 2100
(31) 優先権主張番号 62/803, 887	(74) 代理人 100078282
(32) 優先日 平成31年2月11日 (2019. 2. 11)	弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(74) 代理人 100113413
(31) 優先権主張番号 62/645, 022	弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日 平成30年3月19日 (2018. 3. 19)	(74) 代理人 100181674
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	弁理士 飯田 貴敏
	(74) 代理人 100181641
	弁理士 石川 大輔
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療のための、癌抑制遺伝子治療法及びCD122/CD132アゴニストを含む、方法及び組成物

(57) 【要約】

個体における癌を治療するための方法及び組成物であって、個体に、有効量の、少なくとも1種のCD122/CD132アゴニスト、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤、並びに、癌抑制遺伝子及び/又はアデノウイルス死タンパク質を過剰発現するように改変された1種以上のウイルスを含むウイルス組成物を投与することを含む、方法及び組成物を本明細書で提供する。また、個体における癌を治療するための方法及び組成物であって、個体に、有効量の、少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルス組成物、及び少なくとも1種のCD122/CD132アゴニスト、及び少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む、方法及び組成物も、本明細書中で提供する。また、上述の作用物質を、他の癌治療法と組み合わせて投与することによる、抗腫瘍有効性の向上方法も、本明細書中で提供する。一般的に免疫療法に耐性があることが知られている、非常に侵襲性の形態の癌において、これらに治療は予期せず、完全な腫瘍の寛解及び治癒性のアウトカムをもたらした。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象における癌の治療方法であって、有効量の、(1) p 5 3 をコードする核酸及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸、並びに、(2) 少なくとも 1 種の選択性 C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストを、前記対象に投与することを含む、方法。

## 【請求項 2】

前記対象に p 5 3 をコードする核酸が投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記対象に M D A 7 をコードする核酸が投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記対象に p 5 3 をコードする核酸、及び M D A 7 をコードする核酸が投与される、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 5】

前記少なくとも 1 種の C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストが、I L - 2 / 抗 I L - 2 免疫複合体、I L - 1 5 / 抗 I L - 1 5 免疫複合体、I L - 1 5 / I L - 1 5 受容体 - I g G 1 - F c ( I L - 1 5 / I L - 1 5 R - I g G 1 - F c ) 免疫複合体、P E G 化 I L - 2、P E G 化 I L - 1 5、I L - 2 ムテイン、I L - 1 5 ムテイン、及び / 又は、I L - 1 5 受容体の / I g G 1 F c 融合タンパク質に結合する I L - 1 5 変異体からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記 I L - 1 5 が I L - 1 5 R と予め複合体化され、C D 1 2 2 / C D 1 3 2 に選択的に結合する、請求項 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

1、2、3、又は 4 種類の C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストが前記対象に投与される、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記少なくとも 1 種の C D 1 2 2 アゴニスト及び / 又は C D 1 3 2 アゴニストが F 4 2 K ではない、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記癌が転移性である、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

p 5 3 をコードする前記核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする前記核酸が発現カセット内にある、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

p 5 3 及び M D A - 7 が単一のプロモーターの制御下にある、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記プロモーターがサイトメガロウイルス ( C M V )、S V 4 0、又は P G K である、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

発現カセットがウイルスベクター内にある、請求項 10 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、小胞性口内炎ウイルスベクター、ポリオーマウイルスベクターである、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクター又はワクシニアウイルスベクターである、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 16】

50

前記ワクシニアウイルスベクターが更に、N I L 欠損ワクシニアウイルスベクターとして定義される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記アデノウイルスベクターが更に、A D P の発現が増加したアデノウイルスベクターとして定義される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記ウイルスベクターが、約  $10^3$  ~ 約  $10^{13}$  のウイルス粒子で投与される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】

p 5 3 をコードする前記核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする前記核酸が非ウイルス性アプローチにより投与される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 0】

前記方法が、遺伝子編集による p 5 3 及び / 又は M D A - 7 機能の回復及び / 又は増幅を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

遺伝子編集が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ ( Z F N )、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N )、又はクラスター化して規則的に間隔を空けて配置された短い回文配列反復 ( C R I S P R ) を用いて p 5 3 及び / 又は M D A - 7 を発現することを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

p 5 3 をコードする前記核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする前記核酸が、ウイルスベクター及び遺伝子編集を介して投与される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 3】

p 5 3 をコードする前記核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする前記核酸が前記対象に、静脈内、動脈内、血管内、胸膜内、腹腔内、気管内、腫瘍内、髄腔内、筋肉内、内視鏡、病巣内、経皮、皮下、局所、定位投与される、又は、直接注射若しくは還流により投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

p 5 3 をコードする前記核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする前記核酸が前記対象に、腫瘍内投与される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 2 5】

前記対象に p 5 3 をコードする前記核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする前記核酸が 2 回以上投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記対象に前記少なくとも 1 種の C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストが 2 回以上投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記対象に p 5 3 をコードする前記核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする前記核酸が、前記少なくとも 1 種の C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストの前、これと同時、又はこの後に投与される、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 2 8】

p 5 3 をコードする前記核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸が、リポプレックスに入れて前記対象に投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記リポプレックスが、D O T A P と、コレステロール、コレステロール誘導体またはコレステロール混合物の少なくとも 1 つとを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

投与が、局部又は局所注射を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

投与が、連続注入、腫瘍内注射、又は静脈内注射を介する、請求項 1 に記載の方法。

50

- 【請求項 3 2】  
前記対象がヒトである、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 3 3】  
前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺癌、肝細胞癌、網膜芽細胞腫、星状膠細胞腫、グリア芽腫、白血病、神経芽細胞腫、頭部癌、頸部癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎癌、骨癌、睾丸癌、卵巣癌、中皮腫、子宮頸癌、胃腸癌、泌尿生殖器癌、気道癌、造血癌、筋骨格癌、神経内分泌癌、癌腫、肉腫、中枢神経系癌、末梢神経系癌、リンパ腫、脳癌、結腸癌、又は膀胱癌である、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 3 4】  
少なくとも 1 種の追加の抗癌治療を投与することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。 10
- 【請求項 3 5】  
前記少なくとも 1 種の追加の抗癌治療が、外科療法、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、免疫療法、小分子療法、受容体キナーゼ阻害剤療法、抗血管新生療法、サイトカイン療法、凍結療法、放射線切除、又は生物学的療法である、請求項 3 4 に記載の方法。
- 【請求項 3 6】  
前記少なくとも 1 種の追加の抗癌治療が免疫チェックポイント阻害剤である、請求項 3 4 に記載の方法。
- 【請求項 3 7】  
前記少なくとも 1 種のチェックポイント阻害剤が、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR、又はA2aRの阻害剤から選択される、請求項 3 6 に記載の方法。 20
- 【請求項 3 8】  
前記少なくとも 1 種のチェックポイント阻害剤が抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA4抗体、及び/又は抗KIR抗体である、請求項 3 7 に記載の方法。
- 【請求項 3 9】  
前記抗PD-1抗体がニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピディリズマブ、AMP-514、REGN2810、CT-011、BMS 936559、MPDL3280A、又はAMP-224である、請求項 3 8 に記載の方法。
- 【請求項 4 0】  
前記抗PD-L1抗体がデュルバルマブ、アテゾリズマブ、又はアベルマブである、請求項 3 8 に記載の方法。 30
- 【請求項 4 1】  
前記抗PD-L2抗体がrHlgM12B7である、請求項 3 8 に記載の方法。
- 【請求項 4 2】  
LAG3の前記阻害剤がIMP321又はBMS-986016である、請求項 3 7 に記載の方法。
- 【請求項 4 3】  
A2aRの前記阻害剤がPBF-509である、請求項 3 7 に記載の方法。
- 【請求項 4 4】  
前記抗CTLA-4抗体がトレメリマブ又はイピリムマブである、請求項 3 8 に記載の方法。 40
- 【請求項 4 5】  
前記抗KIR抗体がリリルマブである、請求項 3 8 に記載の方法。
- 【請求項 4 6】  
2 種以上のチェックポイント阻害剤が投与される、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 4 7】  
前記免疫チェックポイント阻害剤が全身投与される、請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 4 8】  
前記少なくとも 1 種の追加の抗癌治療がヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤で 50

ある、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 H D A C 阻害剤がトラクチノスタットである、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

細胞外マトリックス分解タンパク質を提供することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記細胞外マトリックス分解タンパク質がリラキシン、ヒアルロニダーゼ、又はデコリンである、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記生物学的療法がモノクローナル抗体、s i R N A、m i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、又は遺伝子治療法である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記少なくとも 1 種の追加の抗癌治療が腫瘍崩壊ウイルスである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記腫瘍崩壊ウイルスが、p 5 3、M D A - 7、I L - 1 2、少なくとも 1 種の熱ショックタンパク質、T G F - 阻害剤、及び/又は I L - 1 0 阻害剤を発現するように改変されている、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記腫瘍崩壊ウイルスが、一本鎖若しくは二本鎖 D N A ウイルス、R N A ウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ポリオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、粘液腫ウイルス、マラバウイルス、ラブドウイルス、エナデノチュシレブ、コクサッキーウイルス、又は E 1 b 欠損アデノウイルスである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記腫瘍崩壊ウイルスが単純ヘルペスウイルスである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記腫瘍崩壊ウイルスがサイトカインを発現するように改変されている、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記サイトカインが顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F ) 又は I L 1 2 である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記腫瘍崩壊ウイルスが更に、タリモジーン・ラハーパレブベック ( T - V E C ) として定義される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記少なくとも 1 種の追加の抗癌治療がプロテインキナーゼ又は成長因子シグナル伝達経路阻害剤である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記プロテインキナーゼ、又は成長因子シグナル伝達経路阻害剤が、アフアチニブ、アキシチニブ、ベバシズマブ、ボスチニブ、セツキシマブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、フォスタマチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レンバチニブ、ムブリチニブ、ニロチニブ、パニツムマブ、パゾパニブ、ペガブタニブ、ラニビズマブ、ルキシソリチニブ、サラカチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トラスツズマブ、バンデタニブ、A P 2 3 4 5 1、ベムラフェニブ、C A L 1 0 1、P X - 8 6 6、L Y 2 9 4 0 0 2、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、リダフォロリムス、アルボシジブ、ゲニステイン、セルメチニブ、A Z D - 6 2 4 4、パタラニブ、P 1 4 4 6 A - 0 5、

10

20

30

40

50

A G - 0 2 4 3 2 2、Z D 1 8 3 9、P 2 7 6 - 0 0、又はG W 5 7 2 0 1 6である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記プロテインキナーゼ阻害剤が P I 3 K 阻害剤である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記 P I 3 K 阻害剤が P I 3 K 阻害剤である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記免疫療法がサイトカインを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記サイトカインが、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F ) 又は I L 1 2 である、請求項 6 4 に記載の方法。 10

【請求項 6 6】

前記サイトカインがインターロイキン及び / 又はインターフェロンである、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記インターロイキンが I L - 2 である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記インターフェロンが I F N である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記免疫療法が共刺激受容体アゴニスト、先天性免疫細胞の刺激因子、又は先天性免疫の活性化因子を含む、請求項 3 5 に記載の方法。 20

【請求項 7 0】

前記共刺激受容体アゴニストが、抗 O X 4 0 抗体、抗 G I T R 抗体、抗 C D 1 3 7 抗体、抗 C D 4 0 抗体、又は抗 C D 2 7 抗体である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

免疫細胞の前記刺激因子が、細胞傷害性阻害受容体の阻害剤、又は、免疫刺激トル様受容体 ( T L R ) のアゴニストである、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記細胞傷害性阻害受容体が、N K G 2 A / C D 9 4 又は C D 9 6 T A C T I L E の阻害剤である、請求項 6 9 に記載の方法。 30

【請求項 7 3】

前記 T L R アゴニストが T L R 7 アゴニスト、T L R 8 アゴニスト、又は T L R 9 アゴニストである、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記免疫療法が、P D - L 1 阻害剤、4 - 1 B B アゴニスト、及び O X 4 0 アゴニストの組み合わせを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記免疫療法が、インターフェロン遺伝子刺激因子 ( S T I N G ) アゴニストを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 7 6】

先天性免疫の前記活性化因子が、I D O 阻害剤、T G F 阻害剤、又は I L - 1 0 阻害剤である、請求項 7 5 に記載の方法。 40

【請求項 7 7】

前記化学療法が D N A 損傷剤を含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記 D N A 損傷剤が、照射、X 線、紫外線照射、マイクロ波、電子放出、アドリアマイシン、5 - フルオロウラシル ( 5 F U )、カペシタピン、エトポシド ( V P - 1 6 )、カンプトテシン、アクチノマイシン - D、マイトマイシン C、シスプラチン ( C D D P )、又は過酸化水素である、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

50

対象における癌の治療方法であって、有効量の少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルス及び少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストを、前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項80】

前記少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルスが、p53、MDA-7、サイトカイン、及び/又は免疫刺激遺伝子を発現するように改変されている、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

前記サイトカインがGM-CSF又はIL-12である、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

前記免疫刺激遺伝子がTGFβの阻害剤、IL-10の阻害剤、又は熱ショックタンパク質である、請求項80に記載の方法。

【請求項83】

前記少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルスが、一本鎖又は二本鎖DNAウイルス、RNAウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ポリオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、粘液腫ウイルス、マラバウイルス、ラブドウイルス、エナデノチュシレブ、及びコクサッキーウイルスからなる群から選択される、請求項79に記載の方法。

【請求項84】

前記少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルスが、Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12、CAVATAK(商標)、CG0070、DNX-2401、G207、HF10、IMLYGIC(商標)、JX-594、MG1-MA3、MV-NIS、OBP-301、REOLYSIN(登録商標)、Toca511、Oncorine(H101)、H102、H103、RIGVIR、アデノウイルス死タンパク質(ADP)を過剰発現するアデノウイルス、T-VEC、N1L欠損ワクシニアウイルス、E1b欠損アデノウイルス、 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)プロモーターAdE1a遺伝子調節アデノウイルス、修飾TERTプロモーター腫瘍崩壊アデノウイルス、HRE-E2F-TERTハイブリッドプロモーター腫瘍崩壊アデノウイルス、及び/又は、Pea3結合部位E1a調節配列欠失、及びE1b-19Kクローン挿入部位を有するアデノウイルスである、請求項79に記載の方法。

【請求項85】

ADPを過剰発現する前記アデノウイルスがVIRx007である、請求項84に記載の方法。

【請求項86】

前記N1L欠損ワクシニアウイルスがIL-12を発現するように改変されている、請求項84に記載の方法。

【請求項87】

前記少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストが、IL-2/抗IL-2免疫複合体、IL-15/抗IL-15免疫複合体、IL-15/IL-15受容体-IgG1-Fc(IL-15/IL-15R-IgG1-Fc)免疫複合体、PEG化IL-2、PEG化IL-15、IL-2ムテイン、IL-15ムテイン、及び/又は、IL-15受容体の/IgG1-Fc融合タンパク質に結合するIL-15変異体からなる群から選択される、請求項79に記載の方法。

【請求項88】

1、2、3、又は4種類のCD122/CD132アゴニストが前記対象に投与される、請求項79に記載の方法。

【請求項89】

前記少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストがF42Kではない、請求項79に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 90】

前記対象に前記少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストが2回以上投与される、請求項79に記載の方法。

## 【請求項 91】

前記対象に前記腫瘍崩壊ウイルスが、前記少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストの前、これと同時、又はこの後に投与される、請求項79に記載の方法。

## 【請求項 92】

投与が、局部又は局所注射を含む、請求項79に記載の方法。

## 【請求項 93】

投与が、連続注入、腫瘍内注射、又は静脈内注射を介する、請求項79に記載の方法。

10

## 【請求項 94】

投与が腫瘍内注射を介する、請求項79に記載の方法。

## 【請求項 95】

前記対象がヒトである、請求項79に記載の方法。

## 【請求項 96】

前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺癌、肝細胞癌、網膜芽細胞腫、星状膠細胞腫、グリア芽腫、白血病、神経芽細胞腫、頭部癌、頸部癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎癌、骨癌、睾丸癌、卵巣癌、中皮腫、子宮頸癌、胃腸癌、泌尿生殖器癌、気道癌、造血癌、筋骨格癌、神経内分泌癌、癌腫、肉腫、中枢神経系癌、末梢神経系癌、リンパ腫、脳癌、結腸癌、又は膀胱癌である、請求項79に記載の方法。

20

## 【請求項 97】

少なくとも1種の追加の抗癌治療を投与することを更に含む、請求項79に記載の方法。

## 【請求項 98】

前記少なくとも1種の追加の抗癌治療が、外科療法、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、免疫療法、小分子療法、受容体キナーゼ阻害剤療法、抗血管新生療法、サイトカイン療法、凍結療法、又は生物学的療法である、請求項97に記載の方法。

## 【請求項 99】

前記少なくとも1種の追加の抗癌治療が樹状細胞ワクチンである、請求項97に記載の方法。

30

## 【請求項 100】

前記樹状細胞ワクチンが、腫瘍関連抗原としてp53を発現するように改変されている、請求項99に記載の方法。

## 【請求項 101】

前記少なくとも1種の追加の抗癌治療が免疫チェックポイント阻害剤である、請求項97に記載の方法。

## 【請求項 102】

前記少なくとも1種のチェックポイント阻害剤が、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR、又はA2aRの阻害剤から選択される、請求項101に記載の方法。

40

## 【請求項 103】

前記少なくとも1種のチェックポイント阻害剤が抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA4抗体、及び/又は抗KIR抗体である、請求項102に記載の方法。

## 【請求項 104】

前記抗PD-1抗体がニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピディリズマブ、AMP-514、REGN2810、CT-011、BMS 936559、MPDL3280A、又はAMP-224である、請求項103に記載の方法。

## 【請求項 105】

前記抗PD-L1抗体がデュルバルマブ、アテゾリズマブ、又はアベルマブである、請

50

求項 103 に記載の方法。

【請求項 106】

前記抗 PD - L2 抗体が r H I g M 1 2 B 7 である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 107】

L A G 3 の前記阻害剤が I M P 3 2 1 又は B M S - 9 8 6 0 1 6 である、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 108】

A 2 a R の前記阻害剤が P B F - 5 0 9 である、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 109】

前記抗 C T L A - 4 抗体がトレメリムマブ又はイピリムマブである、請求項 103 に記載の方法。 10

【請求項 110】

前記抗 K I R 抗体がリリルマブである、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 111】

2 種以上のチェックポイント阻害剤が投与される、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 112】

前記免疫チェックポイント阻害剤が全身投与される、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 113】

前記少なくとも 1 種の追加の抗癌治療がヒストンデアセチラーゼ ( H D A C ) 阻害剤である、請求項 97 に記載の方法。 20

【請求項 114】

前記 H D A C 阻害剤がトラクチノスタットである、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

細胞外マトリックス分解タンパク質を提供することを更に含む、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 116】

前記細胞外マトリックス分解タンパク質がリラキシン、ヒアルロニダーゼ、又はデコリンである、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

( a ) p 4 3 をコードする核酸及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸 ; 並びに ( b ) 少なくとも 1 種の C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストを含む、医薬組成物。 30

【請求項 118】

( a ) 腫瘍崩壊ウイルス ; 及び ( b ) 少なくとも 1 種の C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストを含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2018年3月19日に出願された、米国仮特許出願番号第62/645,022号、及び2019年2月11日に出願された同第62/803,887号の利益を主張し、それら両方全体が、参照により本明細書に組み込まれている。 40

【0002】

背景技術

1. 分野

本発明は概して、生物学及び医学の分野に関する。より具体的には、本発明は、癌抑制機能の回復又は増幅を、選択性 C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストと組み合わせる方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

悪性細胞はしばしば、化学療法及び照射により誘導されるプログラム細胞死、即ちアポ 50

トーシスなどのDNA損傷剤に対して耐性を有する。このような耐性は一般的に、特定の癌遺伝子の異常発現、又は、アポトーシスの制御における、癌抑制遺伝子の発現喪失の結果である。欠陥のある癌抑制遺伝子を置き換え、かつ、アポトーシス誘発遺伝子を発現させる方法は、腫瘍細胞中での、この形態の細胞死の回復に見込みを与える。

【0004】

恐らく、最も研究された癌抑制遺伝子はp53であり、この遺伝子は、細胞周期調節及びアポトーシスの制御を含むいくつかのプロセスにおいて、重要な役割を果たす(Hartwell et al., 1994)。p53変異は腫瘍細胞では頻繁なものであり、癌の進行、及び、化学療法と放射線療法の両方への耐性の発達と関連している(Spitz et al., 1996)。野生型(wt)p53機能の回復により、癌細胞でのアポトーシスを誘導することができる、インビトロとインビボの両方の前臨床試験において示されている。レトロウイルス型又はアデノウイルス型wt-p53構築物の動物モデルへの腫瘍内注射により、非小細胞肺癌(NSCLC)、白血病、グリア芽腫、並びに乳癌、肝癌、卵巣癌、結腸癌、及び腎臓癌を含む、種々の異なる腫瘍組織学に関する腫瘍後退がもたらされる(Fujiwara et al., 1994)。有力な前臨床データ及び臨床データにより、卵巣癌を有する患者の第一線の治療のための、p53遺伝子治療法試験の、国際無作為化フェーズII/III試験が開始された(Buller et al., 2002)。しかし、十分な治療効果が見られなかったために、最初の暫定分析の後、この研究は閉じられた(Zeimet and Marth, 2003)。

10

【0005】

したがって、癌抑制遺伝子治療法を用いる著しい進展にもかかわらず、非特異的発現、低効率の送達及び生物学的安全性を含む、いくつかの障壁が、クリニックにおける成功を依然として制限している。更に、遺伝子の異常サイレンシングをもたらす、癌及びエピジェネティック的調節異常における、複数の遺伝子変化が存在する。したがって、単一の遺伝子治療は、癌治療のための好適な方法とはなり得ない。したがって、遺伝子治療法の向上した抗腫瘍活性及び効率的な送達のための、他の抗癌剤と組み合わせた複数の癌抑制因子を標的化する方法が、必要とされている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Hartwell et al., Science, 266:1821-1828, 1994.

30

【非特許文献2】Spitz et al., Clin Cancer Research, 2:1665-1671, 1996.

【非特許文献3】Fujiwara et al., J Natl Cancer Inst, 86:1458-1462, 1994.

【非特許文献4】Buller et al., Cancer Gene Therapy, 9:553-566, 2002.

【非特許文献5】Zeimet and Marth, The Lancet Oncology, 7:415-422, 2003.

40

【発明の概要】

【0007】

一実施形態において、本開示は、対象における、癌治療のための方法及び組成物であって、有効量の、(1)p53をコードする核酸、及び/又はMDA-7をコードする核酸と、(2)少なくとも1種のCD122アゴニスト及びCD132アゴニスト(例えば、選択性CD122/CD132アゴニスト)とを、対象に投与することを含む、方法及び組成物を提供する。

【0008】

いくつかの態様では、対象に、p53をコードする核酸が投与される。特定の態様において、対象に、MDA7をコードする核酸が投与される。いくつかの態様では、対象に、

50

p 5 3 をコードする核酸及び M D A 7 をコードする核酸が投与される。

【 0 0 0 9 】

特定の態様において、p 5 3 をコードする核酸、及び / 若しくは M D A - 7 をコードする核酸、並びに / 又は C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストは、癌抑制因子機能を回復又は増幅させるのに有効な量で送達される。特定の態様において、p 5 3 をコードする核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸は、1 つ以上の腫瘍部位に送達される。特定の態様において、2 つ以上の C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストが投与される。特定の態様において、対象はヒトである。

【 0 0 1 0 】

特定の態様において、C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストは、C D 1 2 2 / C D 1 3 2 受容体複合体に選択的に結合し、C D 1 2 2 / C D 1 3 2 受容体複合体への親和結合と比較して、C D 2 5、又は I L 1 5 受容体に対して、低い親和結合を有する。特定の態様において、1 種以上の C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストは、I L - 2 / 抗 I L - 2 免疫複合体、I L - 1 5 / 抗 I L - 1 5 免疫複合体、I L - 1 5 / I L - 1 5 受容体 - I g G 1 - F c ( I L - 1 5 / I L - 1 5 R - I g G 1 - F c ) 免疫複合体、P E G 化 I L - 2、P E G 化 I L - 1 5、I L - 2 ムテイン、及び / 又は I L - 1 5 ムテインである。C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストは、A L T - 8 0 3 などの、I L - 1 5 受容体 / I g G 1 F c 融合タンパク質に結合した I L - 1 5 変異体 (例えば、I L - 1 5 N 7 2 D) であることができる。特定の態様において、I L - 1 5 は、I L - 1 5 R と予め複合体化され、C D 1 2 2 / C D 1 3 2 に優先的に結合する。特定の態様において、I L - 2 受容体アゴニストは、F 4 2 K ではない。

いくつかの態様では、p 5 3 をコードする核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸は、ウイルス法、及び / 又は非ウイルス法により送達される。特定の態様において、p 5 3 をコードする核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸は、ウイルスベクターなどの発現カセット内に送達される。いくつかの態様では、p 5 3 及び M D A - 7 は、サイトメガロウイルス ( C M V )、S V 4 0、又は P G K などの 1 つのプロモーターの制御下にある。特定の態様において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター (例えば、A D P を過剰発現するアデノウイルスベクター)、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター (例えば、N I L 欠損ワクシニアウイルスベクター)、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、小胞性口内炎ウイルスベクター、ポリオーマウイルスベクターである。

【 0 0 1 1 】

いくつかの態様では、p 5 3 をコードする核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸は、癌抑制遺伝子の発現を回復又は増幅させるためなどの、ジンクフィンガーヌクレアーゼ ( Z F N )、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N )、又は、クラスター化して規則的に間隔を空けて配置された短い回文配列反復 ( C R I S P R ) などの、遺伝子編集法により送達される。ウイルス及び非遺伝子導入送達及び発現法、並びに / 又は、遺伝子編集法の組み合わせが、本開示にて考慮される。特定の態様において、アデノウイルス p 5 3 ( A d - p 5 3 ) 注射用量 ( m L ) は、 $1 \text{ cm}^3$  の腫瘍体積当たり、少なくとも、 $1 \times 10^{11}$  のウイルス粒子 ( v p ) の A d - p 5 3 用量を受ける各腫瘍損傷をもたらす。いくつかの態様では、p 5 3 をコードする核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸は、リポプレックスに入れて対象に投与される。いくつかの態様では、リポプレックスは、D O T A P と、コレステロール、コレステロール誘導体及びコレステロール混合物の少なくとも 1 つとを含む。

【 0 0 1 2 】

いくつかの態様では、p 5 3 をコードする核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸は対象に、静脈内、動脈内、血管内、胸膜内、腹腔内、気管内、腫瘍内、髄腔内、筋肉内、内視鏡、病巣内、経皮、皮下、局所、定位投与される、又は、直接注射若しくは還流により投与される。特定の態様において、p 5 3 をコードする核酸、及び / 又は M D A - 7 をコードする核酸は対象に、腫瘍内投与される。いくつかの態様では、投与は、局部又

10

20

30

40

50

は局所注射を含む。いくつかの態様では、投与は、連続注入、腫瘍内注射、又は静脈内注射を介する。

【0013】

いくつかの態様では、対象には、p53をコードする核酸、及び/又はMDA-7をコードする核酸が2回以上投与される。特定の態様において、対象には、少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストが2回以上投与される。いくつかの態様では、対象には、p53をコードする核酸、及び/又はMDA-7をコードする核酸が、少なくとも1種のCD122アゴニスト及びCD132アゴニストの前、これらと同時、又はこれらの後に投与される。

【0014】

いくつかの態様では、癌は、黒色腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺癌、肝細胞癌、網膜芽細胞腫、星状膠細胞腫、グリア芽腫、白血病、神経芽細胞腫、頭部癌、頸部癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎癌、骨癌、睾丸癌、卵巣癌、中皮腫、子宮頸癌、胃腸癌、泌尿生殖器癌、気道癌、造血癌、筋骨格癌、神経内分泌癌、癌腫、肉腫、中枢神経系癌、末梢神経系癌、リンパ腫、脳癌、結腸癌、又は膀胱癌である。特定の態様において、癌は転移性である。

【0015】

いくつかの態様では、方法は、少なくとも1種の追加の抗癌治療を投与することを更に含む。特定の態様において、少なくとも1種の追加の抗癌治療は、外科療法、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、免疫療法、小分子療法、受容体キナーゼ阻害剤療法、抗血管新生療法、サイトカイン療法、凍結療法、放射線切除、又は生物学的療法である。いくつかの態様では、生物学的療法は、モノクローナル抗体、siRNA、miRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、遺伝子編集、細胞療法、又は遺伝子治療である。

【0016】

いくつかの態様では、少なくとも1種の追加の抗癌治療は、免疫チェックポイント阻害剤である。特定の態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR、又はA2aRのものである。いくつかの態様では少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体である。いくつかの態様では、抗CTLA-4抗体はトレメリマブ又はイピリマブである。特定の態様において、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤は、抗キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)抗体である。いくつかの実施形態において、抗KIR抗体はリリルマブである。いくつかの態様では、PD-L1の阻害剤はデュルバルマブ、アテゾリズマブ、又はアベルマブである。いくつかの態様では、PD-L2の阻害剤はrHlgM12B7である。いくつかの態様では、LAG3阻害剤は、IMP321又はBMS-986016である。いくつかの態様では、A2aRの阻害剤はPBF-509である。いくつかの態様では、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤は、ヒトプログラム細胞死1(PD-1)軸結合アンタゴニストである。特定の態様において、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニスト、PDL1結合アンタゴニスト、及びPDL2結合アンタゴニストからなる群から選択される。いくつかの態様では、PD-1軸結合アンタゴニストはPD-1結合アンタゴニストである。特定の態様において、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1の、PDL1及び/又はPDL2への結合を阻害する。特に、PD-1結合アンタゴニストは、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストはニボルマブ、ペムプロリズマブ、ピディリズマブ、AMP-514、REGN2810、CT-011、BMS 936559、MPDL3280A、又はAMP-224である。

【0017】

いくつかの態様では、少なくとも1種の追加の治療法は、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤である。特定の態様において、HDAC阻害剤はトラクチノスタット(C

10

20

30

40

50

HR - 3996 又は VRx - 3996 ) である。特定の態様において、方法は、リラキシン、ヒアルロニダーゼ、又はデコリンなどの、細胞外マトリックス分解タンパク質を提供することを更に含む。

【0018】

いくつかの態様では、少なくとも1種の追加の抗癌治療は腫瘍崩壊ウイルスである。いくつかの態様では、腫瘍崩壊ウイルスは、p53、MDA - 7、IL - 12、TGF - 阻害剤、及び/又はIL - 10 阻害剤を発現するように改変されている。特定の態様において、腫瘍崩壊ウイルスは、一本鎖若しくは二本鎖DNAウイルス、RNAウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ポリオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、粘液腫ウイルス、マラバウイルス、ラブドウイルス、エナデノチュシレブ、又はコクサッキーウイルスである。いくつかの態様では、腫瘍崩壊ウイルスは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF) 又はIL - 12 を発現するように改変されている。いくつかの態様では、腫瘍崩壊ウイルスは更に、タリモジーン・ラハーパレベック (T - VEC) として定義される。いくつかの態様では、腫瘍崩壊アデノウイルスベクターは、E1b 欠損アデノウイルス、並びに、Ad E1a 遺伝子が、全て、修飾されて治療用遺伝子を発現することができる、-フェトプロテイン (AFP) プロモーター、修飾TERTプロモーター腫瘍崩壊アデノウイルス、HRE - E2F - TERTハイブリッドプロモーター腫瘍崩壊アデノウイルス、及び/又は、少なくとも1つのPea3結合部位、又はその機能性タンパク質が、E1b - 19Kクローン挿入部位により欠損されている、修飾E1a調節配列を有するアデノウイルスにより駆動されるアデノウイルスに由来する。

10

20

【0019】

特定の態様において、少なくとも1種の追加の抗癌治療は、プロテインキナーゼ、又は成長因子シグナル伝達経路阻害剤である。特定の態様において、プロテインキナーゼ、又は成長因子シグナル伝達経路阻害剤は、アフチニブ、アキシチニブ、ベバシズマブ、ボスチニブ、セツキシマブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、フォスタマチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レンパチニブ、ムブリチニブ、ニロチニブ、パニツムマブ、パゾパニブ、ペガブタニブ、ラニビズマブ、ルキシソリチニブ、サラカチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トラスツズマブ、バンデタニブ、AP23451、ベムラフェニブ、CAL101、PX - 866、LY294002、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、リダフォロリムス、アルボシジブ、ゲニステイン、セルメチニブ、AZD - 6244、パタラニブ、P1446A - 05、AG - 024322、ZD1839、P276 - 00、又はGW572016である。いくつかの態様では、プロテインキナーゼ阻害剤は、PI3K 阻害剤などのPI3K阻害剤である。

30

【0020】

いくつかの態様では、免疫療法は、GM - CSFなどのサイトカイン、インターロイキン (例えばIL - 2)、及び/又はインターフェロン (例えばIFN) 若しくは熱ショックタンパク質を含む。特定の態様において、免疫療法は、共刺激受容体アゴニスト、先天性免疫細胞の刺激因子、又は先天性免疫の活性化因子を含む。特定の態様において、共刺激受容体アゴニストは、抗OX40抗体、抗GITR抗体、抗CD137抗体、抗CD40抗体、又は抗CD27抗体である。いくつかの態様では、免疫細胞の刺激因子は、細胞傷害性阻害受容体の阻害剤、又は、免疫刺激トル様受容体 (TLR) のアゴニストである。いくつかの態様では、細胞傷害性阻害受容体は、NKG2A / CD94又はCD96 TACTILEの阻害剤である。いくつかの態様では、TLRアゴニストはTLR7アゴニスト、TLR8アゴニスト、又はTLR9アゴニストである。いくつかの態様では、免疫療法は、PD - L1阻害剤、4 - 1BBアゴニスト、及びOX40アゴニストの組み合わせを含む。特定の態様において、免疫療法は、インターフェロン遺伝子刺激因子 (STING) アゴニストを含む。いくつかの態様では、先天性免疫の活性化因子は、IDO

40

50

阻害剤、TGF 阻害剤、又はIL-10阻害剤である。いくつかの態様では、これらの免疫療法がタンパク質であるとき、タンパク質は、複製可能及び/又は複製不可能なウイルス及び/又は非ウイルス遺伝子療法により投与される、ポリペプチド又はそれらに対応する核酸として投与されることができる。いくつかの態様では、化学療法は、照射、X線、紫外線照射、マイクロ波、電子放出、アドリマイシン、5-フルオロウラシル(5FU)、カペシタビン、エトポシド(VP-16)、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシンC、シスプラチン(CDDP)、又は過酸化水素などの、DNA損傷剤を含む。

#### 【0021】

別の実施形態において、対象における癌の治療方法であって、有効量の、少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルス、及び少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストを対象に投与することと、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤と、を含む、方法を提供する。いくつかの態様では、少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルスは、VirRx007などのアデノウイルス死タンパク質(ADP)を過剰発現するように改変されたアデノウイルスである。いくつかの態様では、少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルスを遺伝子組み換えして、p53、MDA-7、サイトカイン、及び/又は免疫刺激遺伝子を発現する。特定の態様において、サイトカインはGM-CSF又はIL-12である。いくつかの態様では、免疫刺激遺伝子は、TGF 又はIL-10の阻害剤である。

#### 【0022】

いくつかの態様では、少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルスは、一本鎖又は二本鎖DNAウイルス、RNAウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ポリオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、粘液腫ウイルス、マラバウイルス、ラブドウイルス、エナデノチュシレブ、及びコクサッキーウイルスからなる群から選択される。

#### 【0023】

いくつかの態様では、上記実施形態にて用いられるウイルスは、複製可能及び/又は複製不能ウイルスを含む。特定の態様において、複製可能又は複製不可能なウイルスは、一本鎖若しくは二本鎖DNAウイルス、RNAウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ポリオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、粘液腫ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、マラバウイルス、ラブドウイルス、エナデノチュシレブ、又はコクサッキーウイルスである。特定の態様において、1種以上のウイルスが利用される。特定の態様において、ウイルス組成物は、複製可能及び複製不可能なウイルスの組み合わせを含む。

#### 【0024】

更なる態様において、上記実施形態における複製可能なウイルスは、1種以上の腫瘍崩壊ウイルスであることができる。これらの腫瘍崩壊ウイルスを組み換えて、p53及び/若しくはIL24を発現させる、並びに/又は、p53及び/若しくはIL24以外の遺伝子、例えばサイトカイン(例えばIL12)及び/若しくは、別の免疫刺激遺伝子(例えば、TGF-阻害剤、若しくはIL10阻害剤、若しくは熱ショックタンパク質)を発現させることができる。特定の態様において、腫瘍崩壊ウイルスは、p53及び/又はIL24癌抑制因子治療法の代わりに、又はこれらに加えて、使用することができる。腫瘍崩壊ウイルスの例としては、一本鎖若しくは二本鎖DNAウイルス、RNAウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ポリオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、インフルエンザウイルス及びレオウイルス、粘液腫ウイルス、マラバウイルス、ラブドウイルス、エナデノチュシレブ、又はコクサッキーウイルスが挙げられる。例示的な腫瘍崩壊ウイルスとしては、Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12、Cavatark(商標)、CGO

10

20

30

40

50

070、DNX-2401、G207、HF10、IMLYGIC(商標)、JX-594、MG1-MA3、MV-NIS、OBP-301、Reolysin(登録商標)、Toca 511、Oncorine(H101)、Onyx-015、H102、H103、RIGVIR、アデノウイルス死タンパク質(ADP)を過剰発現するアデノウイルス、例えば、VirRx007、N1L欠損ワクシニアウイルス、又はIL12を発現するN1L欠損ワクシニアウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0025】

いくつかの態様では、ウイルス及び非ウイルス核酸並びに遺伝子編集組成物は、局所及び/又は全身効果を誘発する。いくつかの態様では、これらの組成物は、局所及び全身効果を誘発する。

10

【0026】

特定の態様において、治療された対象は哺乳類又はヒトである。特定の態様において、治療を提供して、悪性前、又は悪性増殖過剰状態の予防又は治療をする。予防の特定の態様において、対象は健常な対象である。予防の別の態様において、対象は、例えば白板症又は形成異常損傷などの悪性前損傷を含む。予防の別の態様において、対象は、例えば、喫煙者であることにより、又は、癌の家族歴を有することなどにより、癌の進行リスクがある。特定の態様において、治療は、初期又は再発増殖過剰状態に対するものである。いくつかの態様では、治療を投与して、別の治療法への耐性を増強する、又は逆転させる。特定の態様において、治療への耐性は、増殖過剰状態患者の特定の集団に関して、病歴により知られる。特定の態様において、治療への耐性は、個々の増殖過剰状態患者にて観察される。

20

【0027】

上記実施形態の特定の態様において、方法は、細胞外マトリックス分解タンパク質を提供することを更に含む。いくつかの態様では、方法は、細胞外マトリックス分解タンパク質をコードする発現カセットを投与することを含む。いくつかの実施形態では、細胞外マトリックス分解タンパク質はリラキシン、ヒアルロニダーゼ、又はデコリンである。特定の態様において、細胞外マトリックス分解タンパク質はリラキシンである。いくつかの態様では、発現カセットはウイルスベクター内にある。特定の態様において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、小胞性口内炎ウイルスベクター、若しくはポリオーマウイルスベクター、又は別の種類の、ウイルス若しくは非遺伝子治療ベクターである。

30

【0028】

いくつかの態様では、細胞外マトリックス分解タンパク質をコードする発現カセットは、腫瘍内、動脈内、静脈内、血管内、胸膜内、腹腔内、気管内、髄腔内、筋肉内、内視鏡、病巣内、経皮、皮下、局所、定位投与される、又は直接注射若しくは還流により、投与される。特定の態様において、対象には、少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストの後に、p53をコードする核酸、及び/又はMDA-7をコードする核酸が投与される。特定の態様において、対象には、少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストの前に、p53をコードする核酸、及び/又はMDA-7をコードする核酸が投与される。特定の態様において、対象には、少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストと同時に、p53をコードする核酸、及び/又はMDA-7をコードする核酸が投与される。特定の態様において、アデノウイルスベクターは対象に腫瘍内投与される。いくつかの態様では、p53をコードする核酸、及び/又はMDA-7をコードする核酸、並びに少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストは、p53をコードする核酸、及び/又はMDA-7をコードする核酸が注射されていない、離れた腫瘍にて、アプスコパル(全身)効果を誘発する。

40

【0029】

特定の態様において、癌は、黒色腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺癌、肝細胞癌、網膜芽細胞腫、星状膠細胞腫、グリア芽腫、白血病、神経芽細胞腫、頭部癌、頸部癌、乳癌

50

、膵臓癌、前立腺癌、腎癌、骨癌、睾丸癌、卵巣癌、中皮腫、子宮頸癌、胃腸癌、泌尿生殖器癌、気道癌、造血癌、筋骨格癌、神経内分泌癌、癌腫、肉腫、中枢神経系癌、末梢神経系癌、リンパ腫、脳癌、結腸癌、又は膀胱癌である。いくつかの態様では、癌は転移性である。

【0030】

いくつかの態様では、p53をコードする核酸、及び/又はMDA-7をコードする核酸は発現カセット内にある。特定の態様において、発現カセットはウイルスベクター内にある。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、小胞性口内炎ウイルスベクター、又はポリオーマウイルスベクターである。特定の態様において、ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである。

10

【0031】

特定の態様において、ウイルスベクターは、約 $10^3$ ~約 $10^{13}$ 個のウイルス粒子にて投与される。いくつかの態様では、アデノウイルスベクターは対象に、静脈内、血管内、胸膜内、腹腔内、気管内、腫瘍内、髄腔内、筋肉内、内視鏡、病巣内、経皮、皮下、局所、定位投与される、又は、直接注射若しくは還流により投与される。特定の態様において、対象には、アデノウイルスベクターが2回以上投与される。

【0032】

いくつかの態様では、対象には、p53をコードする核酸が投与される。別の態様において、対象には、MDA-7をコードする核酸が投与される。特定の態様において、対象には、p53をコードする核酸及びMDA-7をコードする核酸が投与される。いくつかの態様では、p53及びMDA-7は、単一のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態では、プロモーターはサイトメガロウイルス(CMV)、SV40、又はPGKである。

20

【0033】

いくつかの態様では、核酸はリポプレックスに入れて対象に投与される。特定の態様において、リポプレックスは、DOTAPと、コレステロール、コレステロール誘導体及びコレステロール混合物の少なくとも1つを含む。いくつかの態様では、核酸はナノ粒子に入れて投与される。

【0034】

特定の態様において、投与は、局部又は局所注射を含む。別の態様において、投与は、連続注入、腫瘍内注射、又は静脈内注射を介する。

30

【0035】

いくつかの態様では、方法は、少なくとも1種の追加の抗癌治療を投与することを更に含む。特定の態様において、少なくとも1種の追加の抗癌治療は、外科療法、化学療法(例えば、プロテインキナーゼ阻害剤又はEGFR標的化療法の投与)、塞栓形成療法、化学塞栓形成療法、放射線療法、凍結療法、高体温治療、写真療法、放射線切除療法、ホルモン療法、免疫療法、小分子療法、受容体キナーゼ阻害剤療法、抗血管新生療法、サイトカイン療法又は生物学的療法(例えばモノクローナル抗体、siRNA、miRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、又は遺伝子治療法)である。

40

いくつかの態様では、免疫療法はサイトカインを含む。特定の態様において、サイトカインは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、IL-2などのインターロイキン、及び/又はIFN- $\gamma$ などのインターフェロンである。腫瘍を標的化する免疫応答を加速させるための追加のアプローチとしては、追加の免疫チェックポイント阻害が挙げられる。いくつかの態様では、免疫チェックポイント阻害としては、抗CTLA4、抗PD-1、抗PD-L1、抗PD-L2、抗TIM-3、抗LAG-3、抗A2aR、又は抗KIR抗体が挙げられる。いくつかの態様では、免疫療法は、抗OX40抗体、抗GITR抗体、抗CD137抗体、抗CD40抗体、及び抗CD27抗体などの共刺激受容体アゴニストを含む。特定の態様において、免疫療法は、T制御性細胞(Treg)、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、及び癌関連線維芽細胞(CAF)の抑制を含む

50

。

## 【0036】

更なる態様において、免疫療法は、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、及び樹状細胞などの先天性免疫細胞の刺激を含む。更なる免疫刺激治療としては、IDO阻害剤、TGF-阻害剤、IL-10阻害剤、インターフェロン遺伝子刺激因子（STING）アゴニスト、トル様受容体（TLR）アゴニスト（例えばTLR7、TLR8、又はTLR9）、腫瘍ワクチン（例えば、全腫瘍細胞ワクチン、ペプチド、及び組み換え腫瘍関連抗原ワクチン）、並びに養子細胞治療法（ACT）（例えばT細胞、ナチュラルキラー細胞、TIL、及びLAK細胞）、並びに、遺伝子組み換え受容体を有するACT（例えばキメラ抗原受容体（CAR）及びT細胞受容体（TCR））を挙げることができる。特定の態様において、免疫チェックポイント阻害剤、チェックポイント阻害+T細胞共刺激受容体のアゴニズム、及びチェックポイント阻害+TIL ACTの組み合わせなどの、これらの作用物質の組み合わせを使用することができる。特定の態様において、追加の抗癌治療としては、免疫チェックポイント阻害剤（例えばアベルマブ）、4-1BB（CD-137）アゴニスト（例えばウトミルマブ）、及びOX40（TNFRS4）アゴニストの組み合わせが挙げられる。

10

いくつかの態様では、化学療法はDNA損傷剤を含む。いくつかの実施形態では、DNA損傷剤は、照射、X線、紫外線照射、マイクロ波、電子放出、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル（5FU）、カペシタビン、エトポシド（VP-16）、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシンC、シスプラチン（CDDP）、又は過酸化水素である。特定の態様において、DNA損傷剤は5FU又はカペシタビンである。

20

## 【0037】

いくつかの態様では、化学療法は、シスプラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ビスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソンビシン、ブレオマイシン、プリコマイシン、マイトマイシン、エトポシド（VP16）、タモキシフェン、タキソテル、タキソール、trans-白金、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンプラスチン、メトトレキサート、HDAC阻害剤、又は、これらの任意の類似体若しくは派生多様体を含む。

30

## 【0038】

いくつかの態様では、少なくとも1種の追加の癌治療は、プロテインキナーゼ又は成長因子シグナル伝達経路に關与する受容体を阻害する、プロテインキナーゼ阻害剤又はモノクローナル抗体である。例えば、プロテインキナーゼ又は受容体阻害剤は、EGFR、VEGFR、AKT、Erb1、Erb2、ErbB、Syk、Bcr-Ab1、JAK、Src、GSK-3、PI3K、Ras、Raf、MAPK、MAPKK、mTOR、c-Kit、eph受容体、又はBRAF阻害剤であることができる。特定の態様において、プロテインキナーゼ阻害剤はPI3K阻害剤である。いくつかの実施形態では、PI3K阻害剤はPI3K阻害剤である。例えば、プロテインキナーゼ又は受容体阻害剤は、アフチニブ、アキシチニブ、ベバシズマブ、ボスチニブ、セツキシマブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、フォスタマチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レンパチニブ、ムブリチニブ、ニロチニブ、パニツムマブ、パゾパニブ、ペガブタニブ、ラニビズマブ、ルキシロチニブ、サラカチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トラスツズマブ、バンデタニブ、AP23451、ベムラフェニブ、CAL101、PX-866、LY294002、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、リダフォロリムス、アルボシジブ、ゲニステイン、セルメチニブ、AZD-6244、パタラニブ、P1446A-05、AG-024322、ZD1839、P276-00、GW572016、又はこれらの混合物であることができる。特定の態様において、プロテインキナーゼ阻害剤は、AKT阻害剤（例えばMK-2206、GSK690693、A-443654、VQD-002、ミルテフォシン、又はペリホシン）である。特定の態様において、実施形態に従い使用するためのEGFR標的療法としては、EGFR/ErbB1/HE

40

50

R、ErbB2/Neu/HER2、ErbB3/HER3、及び/又はErbB4/HER4の阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。広範囲のこのような阻害剤が知られており、受容体及びEGFR結合抗体又はアダマールに対して活性なチロシンキナーゼ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、EGFR阻害剤はゲフィチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ、マツズマブ、パニツムマブ、AEE788；CI-1033、HKI-272、HKI-357、又はEKB-569であることができる。プロテインキナーゼ阻害剤は、ダブラフェニブなどのBRAF阻害剤、又はトラメチニブなどのMEK阻害剤であることができる。

#### 【0039】

本発明の他の目的、特徴及び利点は、以下の詳細な説明から明らかになるだろう。しかし、本発明の趣旨及び範囲内での種々の変化及び変更が、この詳細の説明より当業者には明らかとなるため、詳細の説明及び特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているものの、実例としてのみ与えられることが理解されなければならない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0040】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様を更に示すために含まれている。本発明は、本明細書に提示する具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これら1つ以上の図面を参照することによって、よりよく理解されるだろう。

#### 【0041】

【図1】効果的なAd-p53投与及び腫瘍応答。  $7 \times 10^{10}$  未満のウイルス粒子/cm<sup>3</sup>のAd-p53投与量（右パネル）と比較した、  $7 \times 10^{10}$  超のウイルス粒子/cm<sup>3</sup>のAd-p53で治療した（左パネル）、好ましい腫瘍p53バイオマーカー患者サブグループに関する、腫瘍応答のウォーターフォールプロット。奏功者の大部分（7/9の患者）が、  $1 \times 10^{11}$  vp/cm<sup>3</sup>付近、又はこれを超過する（  $7.81 \sim 333.2 \times 10^{10}$  vp/cm<sup>3</sup>）のAd-p53の用量を受けたことが、Ad-p53奏功者の詳細な調査により明らかとなった。したがって、Ad-p53臨床用途のための用量は、  $1 \times 10^{11}$  vp/cm<sup>3</sup>の、注射された腫瘍体積を超える可能性がある。

#### 【0042】

【図2】Ad-p53バイオマーカー/用量最適化治療に対する、全体的な優れた生残。好ましい腫瘍p53バイオマーカープロファイルを有する、メトトレキサートで治療した患者と比較した、  $7 \times 10^{10}$  超のウイルス粒子/cm<sup>3</sup>のAd-p53用量で処理した、好ましい腫瘍p53バイオマーカープロファイルを有する患者の、1年及び全体的な、優れた生残。メトトレキサートと比較して、好ましい腫瘍p53バイオマーカー及びAd-p53用量最適化治療に関しては、全体的な生残の統計学的に有意な増加を、結果は示す（Ad-p53治療の中央生残：11.5ヶ月に対して、メトトレキサートでは4.3ヶ月；  $p < 0.016$ 、HR 1.9767）。

#### 【0043】

【図3】QUADRA-FUSE（商標）注入デバイス。QUADRA-FUSE（商標）（画像はREXMEDICAL（登録商標）から入手）は、腫瘍損傷の短い幅（W）直径に応じて、中心針軸の周りを、1～5cmの調節可能な直径で用いられるトロカールシャフト（右上の挿入物）から延びる3つの枝を有する、複数尖叉注入デバイスである。この水平拡張により、損傷を通しての薬剤の広範な分散が可能となる。各枝は、2つの送達貫通孔（4つの流体出口）を有する。これ故、各注入により、12個の送達点を得られる。

#### 【0044】

【図4】Ad-p53 + CD122/132アゴニスト + 抗PD-1の有効性：腫瘍体積。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）対照、CD122/132、抗PD-1、Ad-p53、又は、CD122/132 + 抗PD-1、Ad-p53 + CD122/132、Ad-p53 + 抗PD-1、又はAd-p53 + CD122/132 + 抗PD-1の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な原発性腫瘍の体積を示すグラフ。CD1

10

20

30

40

50

22 / 132、抗PD-1、及びCD122 / 132 + 抗PD-1治療の間には深刻な腫瘍の進行があり、これらは、Ad-p53治療法と組み合わせることにより逆転した。治療法のいずれかと比較して、Ad-p53 + CD122 / 132、Ad-p53 + 抗PD-1、及びAd-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の、向上した有効性もまた、結果は示す。21日目までに、(PBS)、CD122 / 132、抗PD-1、CD122 / 132 + 抗PD-1、及びAd-p53で治療した群の平均腫瘍体積は全て、 $2,000\text{ mm}^3$ を超えた。対照的に、組み合わせ治療のそれぞれ：Ad-p53 + CD122 / 132、Ad-p53 + 抗PD-1、及びAd-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1は、非Ad-p53治療法、又はAd-p53治療のみのいずれかと比較して、腫瘍体積の大幅な減少を誘発した。21日目における腫瘍体積の、統計学的分散分析(ANOVA)により、Ad-p53 + CD122 / 132、Ad-p53 + 抗PD-1、及びAd-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された( $p$ 値 $< 0.0001$ )。しかし、30日目までに、Ad-p53 + CD122 / 132、及びAd-p53 + 抗PD-1治療群の平均腫瘍体積もまた、 $2,000\text{ mm}^3$ を超えた。重要なことに、30日目における腫瘍体積の統計学的分散分析(ANOVA)比較により、抗腫瘍効果の相乗作用は、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の組み合わせにおいてのみ維持された( $p$ 値 $< 0.0001$ (全体)、及び、それぞれの別の治療群と個別に比較して、 $p$ 値 $< 0.0001$ )ことが測定された。

10

#### 【0045】

【図5】完全な腫瘍奏効率。治療法に対する腫瘍の完全奏効は、重要な治療効果と関連し、治癒性のアウトカムのために必要とされていると、一般に理解されている。p53治療群及びこれらの対照に関して、図5に示すように、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療のみが、原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方において、完全な腫瘍の寛解をもたらした。原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方の、腫瘍の完全奏効は、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群の60%(10匹の動物のうち6匹)にて観察され、他の治療群において、70匹の動物のいずれにおいても、腫瘍の完全奏効は存在しなかった(Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群対全ての他の治療群の動物を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によると、 $p$ 値 $< 0.0001$ ; Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によると、 $p$ 値 $< 0.011$ )。予想外なことに、腫瘍の完全奏効は持続的であり、これらの腫瘍を有するこれらの動物を恐らく治癒する、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群の50%において、40日後も維持された。

20

30

#### 【0046】

【図6A】図6A及び6B：対側腫瘍増殖における、全身性/アブスコパル治療効果。対側に移植した腫瘍の原発性腫瘍治療における全身性/アブスコパル効果を、原発性腫瘍がAd-p53腫瘍内治療法のうちの1つを受けた齧歯類にて、評価した。予想外の、原発性腫瘍増殖及び完全寛解率における、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の実質的に増加した相乗効果に一致して、我々は、他のAd-p53治療群と比較して、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の驚くべき程に強力で統計的に有意なアブスコパル効果もまた、観察した。図6Aに示すように、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1の原発性腫瘍治療を受けた動物の90%(10匹の動物のうち9匹)において、対側腫瘍増殖が消滅した。対照的に、対側腫瘍増殖は、他のAd-p53治療群の動物の62.5~100%で観察された。対側腫瘍増殖のこの差は、統計的に有意であった(全ての治療群に対するカイ二乗検定による $p$ 値 $= 0.0004$ ; Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定による $p$ 値 $< 0.0430$ )。図6Bは、Ad-p53 + CD122 / 132、Ad-p53 + 抗PD-1、又はAd-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1の組み合わせのいずれかの、3つの最も効果的な原発性腫瘍治療を受ける齧歯類における、経時的な対側腫瘍体積を示すグラフを表す。22日目における、これらの対側腫瘍体積の統計学的分散分析(ANOVA)比較により、Ad-p53 + CD122 / 1

40

50

3 2 + 抗 P D - 1 治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された ( p 値 = 全体で 0 . 0 4 3 5 )。 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 群のみが、対側腫瘍増殖対 A d - p 5 3 + 抗 P D - 1 群における、統計的に有意な減少を示した ( p 値 = 0 . 0 3 6 0 )。これらを合わせると、全ての A d - p 5 3 治療法のうち、 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の 3 つの組み合わせのみが、実質的なアブスコバル効果を媒介する強力な局所及び全身抗腫瘍免疫を誘発することにより治癒の有効性をもたらしたことを、これらの発見は示す。

【図 6 B】図 6 A 及び 6 B : 対側腫瘍増殖における、全身性 / アブスコバル治療効果。対側に移植した腫瘍の原発性腫瘍治療における全身性 / アブスコバル効果を、原発性腫瘍が A d - p 5 3 腫瘍内治療法のうちの 1 つを受けた齧歯類にて、評価した。予想外の、原発性腫瘍増殖及び完全寛解率における、 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の実質的に増加した相乗効果に一致して、我々は、他の A d - p 5 3 治療群と比較して、 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の驚くべき程に強力で統計的に有意なアブスコバル効果もまた、観察した。図 6 A に示すように、 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 の原発性腫瘍治療を受けた動物の 9 0 % ( 1 0 匹の動物のうち 9 匹 ) において、対側腫瘍増殖が消滅した。対照的に、対側腫瘍増殖は、他の A d - p 5 3 治療群の動物の 6 2 . 5 ~ 1 0 0 % で観察された。対側腫瘍増殖のこの差は、統計的に有意であった ( 全ての治療群に対するカイ二乗検定による p 値 = 0 . 0 0 0 4 ; A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療群対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定による p 値 < 0 . 0 4 3 0 )。図 6 B は、 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2、 A d - p 5 3 + 抗 P D - 1、又は A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 の組み合わせのいずれかの、 3 つの最も効果的な原発性腫瘍治療を受ける齧歯類における、経時的な対側腫瘍体積を示すグラフを表す。 2 2 日目における、これらの対側腫瘍体積の統計学的分散分析 ( A N O V A ) 比較により、 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された ( p 値 = 全体で 0 . 0 4 3 5 )。 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 群のみが、対側腫瘍増殖対 A d - p 5 3 + 抗 P D - 1 群における、統計的に有意な減少を示した ( p 値 = 0 . 0 3 6 0 )。これらを合わせると、全ての A d - p 5 3 治療法のうち、 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の 3 つの組み合わせのみが、実質的なアブスコバル効果を媒介する強力な局所及び全身抗腫瘍免疫を誘発することにより治癒の有効性をもたらしたことを、これらの発見は示す。

【 0 0 4 7 】

【図 7】 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 の有効性 : 生残の延長。 P B S、 C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1、 A d - p 5 3、又は、 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2、 A d - p 5 3 + 抗 P D - 1、及び A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 のいずれかで治療したマウスの、カプランマイヤー生残曲線。ログランク検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった ( 全体で p < 0 . 0 0 0 1 ; A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療群対任意の他の治療群の比較では p 値 < 0 . 0 0 0 3 )。これらの結果もまた、 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療法の、予想できない実質的な相乗作用を示す。 A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療法の群の中央生残は、 4 0 日後にも達せず、この治療群の 8 0 % が、残存する何らかの腫瘍の証拠を持たずに、依然として生きていた。著しく対照的に、他の治療群における動物の 9 8 % ( 4 9 匹 / 5 0 匹 ) は 3 0 日目までに死に、 1 0 ~ 2 8 日の範囲の中央生残を有した。

【 0 0 4 8 】

【図 8】 V i r R x 0 0 7 + C D 1 2 2 / 1 3 2 アゴニスト + 抗 P D - 1 の有効性 : 腫瘍体積。リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) 対照、 C D 1 2 2 / 1 3 2、抗 P D - 1、 C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1、 V i r R x 0 0 7、又は、 V i r R x 0 0 7 + C D 1 2 2 / 1 3 2、 V i r R x 0 0 7 + 抗 P D - 1、及び V i r R x 0 0 7 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な原発性腫瘍の体積

10

20

30

40

50

を示すグラフ。CD122 / 132 + 抗PD-1、及びCD122 / 132 + 抗PD-1治療法で治療した群にて、著しい腫瘍の進行があり、これらは、VirRx007治療法と組み合わせることにより逆転した。単独の治療法のいずれかと比較しての、VirRx007 + 抗PD-1及びVirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の向上した有効性もまた、結果は示す。Ad-p53を用いる発見とは対照的に、VirRx007は、CD122 / CD132治療との相乗作用を示さなかった。30日目までに、(PBS)、CD122 / 132、抗PD-1、CD122 / 132 + 抗PD-1、VirRx007、及びVirRx007 + CD122 / CD132で治療した群の平均腫瘍体積は全て、2,000 mm<sup>3</sup>を超えた。対照的に、VirRx007 + 抗PD-1及びVirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1との組み合わせ治療のそれぞれは、非VirRx007治療法、又はVirRx007治療のみのいずれかと比較して、腫瘍体積の大きな減少を誘発した。30日目における腫瘍体積の統計学的分散分析(ANOVA)比較により、VirRx007 + 抗PD-1及びVirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の、抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(全体、及び、これらの治療対VirRx007のそれぞれに関して、p値<0.0001)。VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療は、VirRx007 + 抗PD-1よりも優れていた(p値=0.0002)。驚くべきことに、VirRx007の単剤療法と比較して、VirRx007 + CD122 / 132の組み合わせ治療の明らかな利点はなかったものの、VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1を組み合わせる三重治療法に関して、相乗作用が示された。

10

20

#### 【0049】

【図9】完全な腫瘍奏効率。治療法に対する腫瘍の完全奏功は、重要な治療効果と関連し、治癒性のアウトカムのために必要とされていると、一般に理解されている。VirRx007治療群及びこれらの対照に関して、図9に示すように、VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療のみが、原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方の、完全な腫瘍寛解をもたらした。原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方の腫瘍の完全奏功が、VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群の60%で観察され、他の治療群において、70匹の動物のいずれにおいても、腫瘍の完全奏功は存在しなかった(VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群対全ての他の治療群の動物を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によると、p値<0.0001; VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によると、p値<0.011)。予想外なことに、腫瘍の完全奏功は持続的であり、これらの腫瘍を有するこれらの動物を恐らく治癒する、VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1で治療した動物の50%において、40日後に維持されていた。

30

#### 【0050】

【図10A】図10A及び10B：対側腫瘍増殖における、全身性/アブスコパル治療効果。対側に移植した腫瘍の原発性腫瘍治療における全身性/アブスコパル効果を、原発性腫瘍がVirRx007腫瘍内治療法のうちの1つを受けた齧歯類にて、評価した。予想しなかった、原発性腫瘍増殖及び完全寛解率における、VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の実質的に増加した相乗効果に一致して、我々は、他のVirRx007治療群と比較して、VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の驚くべき程に強力な、非常に統計的に有意なアブスコパル効果もまた、観察した。図10Aに示すように、原発性腫瘍がVirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療を受けた動物の80%において、対側腫瘍増殖が消滅した。対照的に、対側腫瘍増殖は、他のVirRx007治療群の動物の80~100%で観察された。対側腫瘍増殖のこの差は、統計的に有意であった(全ての治療群を比較するカイ二乗検定によるp値=0.0002; VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によるp値<0.0230)。VirRx007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の組み合わせが、強力な全身性抗腫瘍免疫を誘発し、潜在的な治癒の有効性を有する、実質的なアブスコパル効果を媒介したこと

40

50

を、これらの発見は示唆する。図10Bは、VirR x 007 + CD122 / 132、VirR x 007 + 抗PD-1、又はVirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1のいずれかの、3つの最も効果的な原発性腫瘍の組み合わせ治療を受ける齧歯類における、経時的な対側腫瘍体積を示すグラフを表す。22日目における、これらの対側腫瘍体積の統計学的分散分析(ANOVA)比較により、VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値 = 全体で0.0171)。VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1群のみが、対側腫瘍増殖対VirR x 007 + 抗PD-1群における、統計的に有意な減少を示した(p値 = 0.0115)。これらを合わせると、全てのVirR x 007治療法のうち、VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の3つの組み合わせのみが、実質的なアブスコパル効果を媒介する強力な局所及び全身抗腫瘍免疫を誘発することにより治癒の有効性をもたらしたことを、これらの発見は示す。

【図10B】図10A及び10B：対側腫瘍増殖における、全身性/アブスコパル治療効果。対側に移植した腫瘍の原発性腫瘍治療における全身性/アブスコパル効果を、原発性腫瘍がVirR x 007腫瘍内治療法のうちの1つを受けた齧歯類にて、評価した。予想しなかった、原発性腫瘍増殖及び完全寛解率における、VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の実質的に増加した相乗効果に一致して、我々は、他のVirR x 007治療群と比較して、VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の驚くべき程に強力で、非常に統計的に有意なアブスコパル効果もまた、観察した。図10Aに示すように、原発性腫瘍がVirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療を受けた動物の80%において、対側腫瘍増殖が消滅した。対照的に、対側腫瘍増殖は、他のVirR x 007治療群の動物の80~100%で観察された。対側腫瘍増殖のこの差は、統計的に有意であった(全ての治療群を比較するカイ二乗検定によるp値 = 0.0002; VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によるp値 < 0.0230)。VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の組み合わせが、強力な全身性抗腫瘍免疫を誘発し、潜在的な治癒の有効性を有する、実質的なアブスコパル効果を媒介したことを、これらの発見は示唆する。図10Bは、VirR x 007 + CD122 / 132、VirR x 007 + 抗PD-1、又はVirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1のいずれかの、3つの最も効果的な原発性腫瘍の組み合わせ治療を受ける齧歯類における、経時的な対側腫瘍体積を示すグラフを表す。22日目における、これらの対側腫瘍体積の統計学的分散分析(ANOVA)比較により、VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値 = 全体で0.0171)。VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1群のみが、対側腫瘍増殖対VirR x 007 + 抗PD-1群における、統計的に有意な減少を示した(p値 = 0.0115)。これらを合わせると、全てのVirR x 007治療法のうち、VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の3つの組み合わせのみが、実質的なアブスコパル効果を媒介する強力な局所及び全身抗腫瘍免疫を誘発することにより治癒の有効性をもたらしたことを、これらの発見は示す。

【0051】

【図11】VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1の有効性：生残の延長。PBS、CD122 / 132 + 抗PD-1、VirR x 007、又は、VirR x 007 + CD122 / 132、VirR x 007 + 抗PD-1、及びVirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1の組み合わせのいずれかで治療したマウスの、カプランマイヤー生残曲線。ログランク検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった(全体でp < 0.0001; VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群対任意の他の治療群の比較ではp値 < 0.0005)。予想できない、VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法の実質的な相乗作用もまた、この結果は示す。VirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法の群の中央生残は、40日後にも達せず、この治療群の90%が依然として生きていた。著しく対照的に、他の治療群に

10

20

30

40

50

おける動物の98% (49匹/50匹)は40日目までに死に、10~33日の範囲の中央生残を有した。驚くべきことに、VirRx007の単剤療法と比較して、VirRx007+CD122/132の組み合わせ治療の、明らかな生残の利点はなかったものの、VirRx007+CD122/132+抗PD-1を組み合わせる三重治療法に関して、相乗作用が示された。

#### 【0052】

【図12】Ad-IL24+CD122/132アゴニスト+抗PD-1の有効性：腫瘍体積。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)対照、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、Ad-IL24、又は、Ad-IL24+CD122/132及びAd-IL24+CD122/132+抗PD-1の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な原発性腫瘍の体積を示すグラフ。CD122/132、抗PD-1、及びCD122/132+抗PD-1治療法の間には深刻な腫瘍の進行があり、これらは、Ad-IL24治療法と組み合わせることにより逆転した。単独の治療法のいずれかと比較して、Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治療では有効性が向上した。16日目までに、(PBS)、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、及びAd-IL24で治療した群の平均腫瘍体積は全て、2,000mm<sup>3</sup>を超えた。対照的に、Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1との組み合わせ治療は、非Ad-IL24治療法、又はAd-IL24治療法のみのもので比較して、腫瘍体積の実質的な減少を誘発した。16日目における腫瘍体積の、統計学的分散分析(ANOVA)により、Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値<0.0001)。Ad-IL24(p=0.0025)又はCD122/132+抗PD-1治療(p値<0.0001)のいずれかと比較して、Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治療では、腫瘍体積が統計的に有意に減少した。

10

20

#### 【0053】

【図13】Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1の有効性：生残の延長。PBS、CD122/132+抗PD-1、Ad-IL24、又はAd-IL24+CD122/132+抗PD-1の組み合わせのいずれかで治療したマウスの、 Kaplan-Meier生残曲線。ロジック検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった(p<0.0001)。予想できない、Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治療法の実質的な相乗作用を、この結果は示す。Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治療法の群の中央生残は、相乗的に向上した。PBS、CD122/132+抗PD-1、及びIL24治療群の全ての動物は、16日目までに死んだが、Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治療法の群の動物の50%は、19日目にて生きていた。Ad-IL24のみ(p=0.0003)又はCD122/132+抗PD-1治療群(p<0.0001)のいずれかと比較して、統計的に有意に改善された生残を、Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治療法の群は示した。興味深いことに、CD122/132+抗PD-1の対と比較して、Ad-IL24+CD122/132の対は驚くほど優れた有効性を有した(ロジック検定によるp=0.0002、データは図示せず)。

30

40

#### 【0054】

【図14】Ad-ルシフェラーゼ(Ad-Luc)陰性対照+CD122/132アゴニスト+抗PD-1の有効性：腫瘍体積。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)対照、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、Ad-Luc対照、又は、Ad-Luc対照+CD122/132、Ad-Luc対照+抗PD-1、及びAd-Luc対照+CD122/132+抗PD-1の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な原発性腫瘍の体積を示すグラフ。Ad-p53、VirRx007、及びAd-IL24を用いる治療とは対照的に、Ad-Lucを抗PD-1、CD122/132、又はCD122/132+抗PD-1治療と組み合わせたときに、治療の有効性の有意な増加は存在しなかった。16日目までに、全ての群の平均腫瘍体積は2,000m

50

m3を超えた。16日目における腫瘍体積の、統計学的分散分析(A N O V A)は、統計的に有意ではなかった(p値=0.1212、これらのあらゆる治療群の間での平均腫瘍体積が、統計的に有意ではなかった)。

【0055】

【図15】Ad-Luc対照+CD122/132+抗PD-1と比較して、それぞれCD122/132+抗PD-1と組み合わせた、Ad-p53、VirR x 007、及びAd-IL24を用いる「三重治療法」は、生残を延長した。Ad-p53、VirR x 007、Ad-IL24、又はAd-Luc対照と組み合わせたCD122/132+抗PD-1で治療したマウスの、 Kaplan-Meier生残曲線。ロジック検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった(p<0.0001)。CD122/132+抗PD-1三重治療法と組み合わせた、Ad-p53、VirR x 007、及びAd-IL24のそれぞれは、Ad-Luc+CD122/132+抗PD-1三重治療法対照と比較して、統計的に有意な生残の増加を示した(ロジック検定によると、CD122/132+抗PD-1三重治療法と組み合わせたAd-p53及びVirR x 007は共に、p値<0.0001; CD122/132+抗PD-1と組み合わせたAd-IL24はp<0.015)。

10

【0056】

【図16】Ad-p53+CD122/132(IL15)アゴニスト+抗PD-1の有効性：腫瘍体積。癌抑制因子治療法と組み合わせた選択性CD122/CD132アゴニストは、組み換えIL15及びIL-15-R<sub>1</sub>-Fcからなる免疫複合体であった。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)対照、CD122/132+抗PD-1、Ad-p53のみ、又は、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な原発性腫瘍の体積を示すグラフ。PBS、CD122/132+抗PD-1、及びAd-p53治療の間には、深刻な腫瘍の進行があった。上述の、初期のAd-p53組み合わせ治療の結果と一致して、あらゆる治療法と比較して、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療では、実質的に有効性が向上した。30日目までに、PBS、CD122/132+抗PD-1、及びAd-p53で治療した群の平均腫瘍体積は、全て2,000mm<sup>3</sup>を超えた。対照的に、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1を用いる組み合わせ治療は、腫瘍体積の大きな減少を誘発した。腫瘍体積の統計学的分散分析(A N O V A)により、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値<0.0001(全体)、及び、それぞれの別の治療群と個別に比較したp値<0.0001)。

20

30

【図17】対側腫瘍増殖における、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1の全身性/アブスコパル治療効果。癌抑制因子治療法と組み合わせた選択性CD122/CD132アゴニストは、組み換えIL15及びIL-15-R<sub>1</sub>-Fcからなる免疫複合体であった。対側に移植した腫瘍の原発性腫瘍治療における全身性/アブスコパル効果を、原発性腫瘍がAd-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1を受けた齧歯類にて、評価した。図16に示す原発性腫瘍増殖における、予想しなかった、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療の実質的に増加した相乗効果に一致して、我々は、他のAd-p53治療群と比較して、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療の驚くべき程に強力で統計的に有意なアブスコパル効果もまた、観察した。図17は、Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1、又はAd-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1の組み合わせのいずれかの、原発性腫瘍治療を受ける齧歯類における、経時的な対側腫瘍体積を示すグラフを表す。22日目における、これらの対側腫瘍体積の統計学的分散分析(A N O V A)比較により、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値=全体で0.0433)。Ad-p53+CD122/132+抗PD-1群のみが、対側腫瘍増殖対Ad-p53+抗PD-1群における、統計的に有意な減少を示した(p値=0.0359)。これらを合わせ

40

50

ると、全ての A d - p 5 3 治療法のうち、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の3つの組み合わせのみが、実質的なアブスコパル効果を媒介する強力な局所及び全身抗腫瘍免疫を誘発することにより治癒の有効性をもたらしたことを、これらの発見は示す。

【0057】

【図18】A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 ( I L 1 5 ) + 抗 P D - 1 の有効性：生残の延長。癌抑制因子治療法と組み合わせた選択性 C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストは、組み換え I L 1 5 及び I L - 1 5 - R - F c からなる免疫複合体であった。P B S、C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1、A d - L u c + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 対照、A d - p 5 3、又は A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 ( I L 1 5 ) + 抗 P D - 1 の組み合わせのいずれかで治療したマウスの、カプランマイヤー生残曲線を、図18に示す。ロランク検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった(全体で  $p < 0.0001$ 、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 ( I L 1 5 ) + 抗 P D - 1 治療群対任意の他の治療群を比較する  $p$  値  $< 0.0001$ )。結果は、予想外の、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 ( I L 1 5 ) + 抗 P D - 1 治療法の実質的な相乗作用を更に示す。A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 ( I L 1 5 ) + 抗 P D - 1 治療法の群において、動物の50%が36日目に生きていた。著しく対照的に、他の治療群の全ての動物は、22日目までに死に、10~18日の範囲の中央生残を有した。

10

【発明を実施するための形態】

【0058】

20

腫瘍は、初期及び進行中に進化し、免疫系による破壊を免れることがよく知られている。最近では、免疫チェックポイント阻害剤を使用してこの耐性を逆転させることが、ある程度成功していることが示されている一方で、患者の大部分は、これらの治療に应答しない。したがって、特定の実施形態において、本開示は、腫瘍の微小環境を変化させて、耐性を克服し、抗腫瘍免疫応答を向上させるための方法及び組成物に関する。一実施形態において、少なくとも1種の C D 1 2 2 及び C D 1 3 2 アゴニストと組み合わせて p 5 3 及び / 又は M D A - 7 を発現することにより癌を治療する方法を提供する。具体的に、癌抑制遺伝子は複製不可能なアデノウイルスとして投与される。一方法では、p 5 3 及び / 又は M D A 7 遺伝子治療法は、C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストと組み合わせて投与される。C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストは、I L - 2 / 抗 I L - 2 免疫複合体、I L - 1 5 / 抗 I L - 1 5 免疫複合体、I L - 1 5 / I L - 1 5 受容体 - I g G 1 - F c ( I L - 1 5 / I L - 1 5 R - I g G 1 - F c ) 免疫複合体、P E G 化 I L - 2、P E G 化 I L - 1 5、I L - 2 ムテイン、及び / 又は I L - 1 5 ムテインであることができる。C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストは、A L T - 8 0 3 などの、I L - 1 5 受容体 / I g G 1 F c 融合タンパク質に結合した I L - 1 5 変異体(例えば、I L - 1 5 N 7 2 D)であることができる(R h o d e e t a l . , 2 0 1 6)。

30

【0059】

更に、抗 P D 1 抗体といった免疫チェックポイント阻害剤などの追加の治療法を投与することにより、選択性 C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストと組み合わせて p 5 3 及び / 又は M D A - 7 遺伝子治療法を投与する前、投与の間、又は投与後のいずれかに、抗腫瘍免疫が増強されることを、本発明者らは測定した。

40

【0060】

更に、追加の治療法を投与して、腫瘍細胞の細胞外マトリックスを分解することにより、併用療法で腫瘍浸透を向上することができることを、本発明者らは測定した。特に、細胞外マトリックス分解治療法は、併用療法の前に投与される。一方法では、細胞外マトリックス分解治療法は、アデノウイルスリラキシンなどの、リラキシン遺伝子治療法である。特に、アデノウイルスリラキシンは、腫瘍内投与又は動脈内投与される。

【0061】

更に、治療方法は、本明細書において提供する併用療法の抗腫瘍効果を増強するための、サイトカイン又は化学療法などの、追加の抗癌治療法を含むことができる。例えば、サ

50

イトカインは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) であることができ、化学療法は、5-フルオロウラシル (5FU)、又はカペシタビン、又はシクロホスファミド、又はPI3K阻害剤であることができる。

#### 【0062】

##### I. 定義

本明細書で使用する場合、具体的な構成成分の観点における「本質的に含まない」は、具体的な構成成分が、組成物に意図的に配合されていないか、及び/又は混入物質として、若しくは微量で存在することを意味するために、本明細書で使用される。したがって、ある組成物の意図しない混入から生じる具体的な構成要素の合計量は、0.05%より十分に低く、好ましくは、0.01%より低い。最も好ましいのは、具体的な構成成分の量が標準的な分析方法を用いて分析できない組成物である。

10

#### 【0063】

本明細書で使用される場合、「1つの(a)」又は「1つの(an)」は、1つ以上を意味していてもよい。本明細書の特許請求の範囲内で用いる場合、単語「~を含む(comprising)」と共に使用する場合、単語「a」又は「an」は、1つ、又は2つ以上を意味し得る。

#### 【0064】

特許請求の範囲における用語「又は」の使用は、代替物のみ、又は代替物が相互に排他的であることを指すように明白に示されていない限り、「及び/又は」を意味するために用いられるが、本開示は、代替物のみ、及び「及び/又は」を指す定義を支持する。本明細書で使用される場合、「別の」は、少なくとも第2の、又はそれ以上を意味していてもよい。

20

#### 【0065】

本明細書全体で、「約」の用語は、ある値が、値を決定するために使用されるデバイス、方法に関する誤差の固有の偏差、又は試験対象の中に存在する偏差を含むことを示すために用いられる。

本明細書で使用する場合、「野生型」とは、生命体のゲノム内の座位における、天然に存在する核酸の配列、及び、このような核酸から転写又は翻訳された配列を意味する。

#### 【0066】

したがって、用語「野生型」は、核酸によりコードされるアミノ酸配列もまた意味することができる。座位は、個体の集団において2つ以上の配列又は対立遺伝子を有し得るため、用語「野生型」は、このような天然に存在する全ての対立遺伝子を包含する。本明細書で使用する場合、用語「多型」とは、ある集団の個体の座位に、変化が存在する(即ち、2つ以上の対立遺伝子が存在する)ことを意味する。本明細書で使用する場合、「変異体」とは、核酸、又は、組み換えDNA技術の結果である、そのコードされたタンパク質、ポリペプチド、若しくはペプチドの配列における変化を意味する。

30

#### 【0067】

細胞又は生命体内のタンパク質、遺伝子、核酸、又はポリヌクレオチドと関係して用いられる場合、用語「外来性」とは、人工的、又は自然の方法により、その細胞又は生命体に導入されたタンパク質、遺伝子、核酸、又はポリヌクレオチドを意味する。又は、細胞との関係において、この用語は、人工、又は自然の方法により単離され、その後、他の細胞又はある生命体に導入された細胞を意味する。外来性核酸は、異なる生命体又は細胞に由来することができる。又は、外来性核酸は、その生命体又は細胞内で天然に存在する核酸の、1つ以上の追加のコピーであることができる。外来性細胞は異なる生命体に由来することができる、又は同じ生命体に由来することができる。非限定例として、外来性核酸とは、自然細胞にて存在する箇所とは異なる染色体位置にある、又は別様において自然にて発見されるものとは異なる核酸配列が隣接している、核酸である。

40

#### 【0068】

「発現構築物」又は「発現カセット」とは、転写を指示することができる核酸分子を意味する。発現構築物は最低でも、1つ以上の所望の細胞型、組織、又は臓器における遺伝

50

子発現を指示する、1つ以上の転写調節要素（例えばプロモーター、エンハンサー、又はこれらと機能が等価な構築物）を含む。転写終結シグナルなどの追加の要素もまた、含まれることができる。

【0069】

「ベクター」又は「構築物」（場合によっては、デリバリーシステム、又は遺伝子導入「ビヒクル」と呼ばれる）とは、インビトロ又はインビボのいずれかにて宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む、巨大分子、又は分子の複合体を意味する。

【0070】

一般的な種類のベクターである「プラスミド」とは、染色体DNAとは独立して複製可能な、染色体DNAとは別の染色体外DNA分子である。特定の場合において、プラスミドは環状かつ二本鎖である。

10

【0071】

「複製の起点」（「ori」）、又は「複製起点」とは、細胞内のプラスミドに存在する場合、そのプラスミド内、及び/又は、DNA合成が開始する、若しくはその付近の位置にて、結合した配列を維持可能な、例えば、リンパ増殖性ヘルペスウイルス内のDNA配列である。例として、EBVのための複製起点は、FR配列（30bp反復の、20個の不完全なコピー）、及び好ましくはDS配列を含む。しかし、EBV結合EBNA-1内の他の部位、例えばRep\*配列を、複製起点としてDSと置き換えることができる（Kirschmaier and Sugden, 1998）。したがって、EBVの複製起点は、FR、DS、若しくはRep\*配列、又は、これらに由来する核酸修飾若しくは合成の組み合わせによる、任意の機能的に等価な配列を含む。例えば、本発明は、Lindner, et al., 2008に具体的に記載されているような、個別の要素の挿入又は変異などによる、EBVの、遺伝子組み換えされた複製起点もまた使用することができる。

20

【0072】

特定のタンパク質を「コード」する、「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「コード領域」、「配列」、「セグメント」、「断片」、又は「導入遺伝子」とは、適切な調節配列の制御下に置かれたときに、インビトロ又はインビボで転写され、かつ任意に、遺伝子産物（例えばポリペプチド）に翻訳される核酸分子である。コード領域はcDNA形態、ゲノムDNA形態、又はRNA形態のいずれかで存在してよい。DNA形態で存在する場合、核酸分子は一本鎖（即ちセンス鎖）、又は二本鎖であることができる。コード領域の境界は、5'（アミノ）末端における開始コドン、及び3'（カルボキシ）末端における翻訳終止コドンにより決定される。遺伝子としては、原核細胞又は真核細胞mRNA由来のcDNA、原核細胞又は真核細胞DNA由来のゲノムDNA配列、及び合成DNA配列を挙げることができるが、これらに限定されない。転写終結配列は通常、遺伝子配列に対して3'側に位置する。

30

【0073】

用語「調節要素」とはまとめて、レシピエント細胞内のコード配列の複製、転写、翻訳後修飾プロセス、及び翻訳をまとめて提供する、プロモーター領域、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製起点、内部リボソーム侵入部位（IRES）、エンハンサー、スプライスジャンクションなどを意味する。選択したコード配列が、適切な宿主細胞内で複製、転写、及び翻訳されることが可能なのであれば、これらの調節要素の全てが存在する必要はない。

40

【0074】

用語「プロモーター」は、本明細書でその通常の意味で用いられ、DNA調節配列を含むヌクレオチド領域を意味し、ここで、調節配列は、RNAポリメラーゼを結合可能であり、かつ、下流（3'方向）コード配列の転写を開始することができる遺伝子に由来する。プロモーターは、調節タンパク質及び分子、例えばRNAポリメラーゼ及びその他の転写因子が結合し、核酸配列の特異的転写を開始することができる遺伝因子を含有することができる。語句「作用可能に位置する」、「作用可能に結合した」、「制御下にある」、

50

及び「転写制御下にある」とは、プロモーターが、核酸配列に対して正しい機能位置及び／又は方向にあり、その配列の転写開始及び／又は発現を制御することを意味する。

【0075】

「エンハンサー」とは、プロモーターに隣接して配置されたときに、エンハンサードメインがないときのプロモーターから生じる転写活性と比較して、増加した転写活性を付与する、核酸配列を意味する。

【0076】

核酸分子に関する「作用可能に結合した」又は「同時発現した」とは、2つ以上の核酸分子（例えば、転写される核酸分子、プロモーター、及びエンハンサー要素）が、核酸分子の転写を可能にするような方法で接続されていることを意味する。ペプチド及び／又はポリペプチド分子に関する「作用可能に結合した」又は「同時発現した」とは、2つ以上のペプチド及び／又はポリペプチド分子が、単一ポリペプチド鎖、即ち、融合の各ペプチド及び／又はポリペプチド構成成分の少なくとも1つの性質を有する、融合ポリペプチドを得るような方法で接続されていることを意味する。融合ポリペプチドはキメラ、即ち、異種分子で構成されるのが好ましい。

10

【0077】

「相同性」とは、2つのポリヌクレオチド間、又は2つのポリペプチド間の同一性の割合を意味する。ある配列と別の配列の一致は、当該技術分野において既知の技術により測定することができる。例えば、相同性は、配列情報をアラインし、速やかに利用可能なコンピュータプログラムを使用することにより、2つのポリペプチド分子間における配列情報を直接比較することにより測定することができる。あるいは、相同性は、相同領域間において安定したデュプレックスの形成を促進する条件下にてポリヌクレオチドをハイブリダイズし、その後、一本鎖特異的ヌクレアーゼを用いて分解し、分解した断片のサイズを測定することにより測定することができる。上述の方法を用いて測定し、ヌクレオチド、又はアミノ酸の少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、及び最も好ましくは少なくとも約95%が、確定された長さの分子にてそれぞれ一致するときに、2つのDNA配列、又は2つのポリペプチド配列は互いに、「実質的に相同」である。

20

【0078】

用語「核酸」とは一般に、例えばDNA（例えばアデニン「A」、グアニン「G」、チミン「T」、及びシトシン「C」）、又はRNA（例えばA、G、ウラシル「U」、及びC）にて見出される、天然に存在するプリン又はピリミジン塩基などの、少なくとも1つのヌクレオ塩基を含む、DNA、RNA、又はその誘導體若しくは模倣物の、少なくとも1つの分子又は鎖を意味する。用語「核酸」は、用語「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」を包含する。用語「オリゴヌクレオチド」とは、長さが約3～約100ヌクレオ塩基の、少なくとも1つの分子を意味する。用語「ポリヌクレオチド」とは、長さが約100超のヌクレオ塩基の、少なくとも1つの分子を意味する。これらの定義は一般的に、少なくとも1つの一本鎖分子を意味するものの、特定の実施形態においては、少なくとも1つの一本鎖分子に部分的に、実質的に、又は完全に相補的な、少なくとも1つの追加の鎖もまた包含する。したがって、核酸は、当該分子鎖を含む特定の配列の、1つ以上の相補鎖又は「補体」を含む、少なくとも1つの二本鎖分子、又は少なくとも1つの三本鎖分子を包含することができる。

30

40

【0079】

本出願を通して使用される用語「治療的効果」とは、患者の癌の内科治療に関して、その患者の健康を促進する、又は向上させる、あらゆるものを意味する。この非包括的な例の一覧としては、あらゆる期間での患者の寿命の延長；病気の腫瘍性進行の低下又は遅延；過剰増殖の減少；腫瘍増殖の減少；転移の遅延；癌細胞又は腫瘍細胞の増殖速度の低下；あらゆる治療済み細胞、又は、治療済み細胞により影響を受けるあらゆる細胞における、アポトーシスの誘発；及び、患者の状態に起因し得る、患者への疼痛の減少が挙げられる。

【0080】

50

「有効量」は、特定の疾患の測定可能な改善又は予防をもたらすのに必要な少なくとも最小量である。本明細書における有効量は、患者の疾患状態、年齢、性別、及び体重、並びに個体における所望の応答を誘発する抗体の能力などの要因に応じて異なり得る。有効量はまた、治療上有益な作用が治療の任意の毒性作用又は有害作用を上回るものでもある。予防的使用の場合、有益な又は所望の結果には、疾患の生化学的、組織学的、及び/又は挙動的症状、その合併症、並びに疾患の進行中に現れる中間病理学的表現型を含む、疾患のリスクの排除若しくは低減、疾患の重症度の軽減、又は疾患の発生の遅延などの結果が含まれる。治療的使用の場合、有益な又は所望の結果には、疾患に起因する1つ以上の症状の減少、疾患に罹患している者の生活の質の向上、疾患の治療に必要な他の薬剤の用量の減少、別の薬剤の効果の増強（例えば、標的による）、疾患の進行の遅延、及び/又は生存期間の延長などの臨床結果が含まれる。癌又は腫瘍の場合、有効量の薬物は、癌細胞の数を減少させ、腫瘍サイズを低下させ、癌細胞の末梢器官への浸潤を阻害し（すなわち、ある程度遅らせるか、又は望ましくは停止し）、腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度遅らせるか、又は望ましくは停止し）、腫瘍成長をある程度阻害し、及び/又は疾患に関連する症状のうちの一つ以上をある程度軽減する効果を有し得る。有効量は、1回以上の投与で投与され得る。本発明の目的に関しては、薬物、化合物、又は医薬組成物の有効量は、予防的又は治療的治療を直接又は間接的のいずれかで達成するのに十分な量である。臨床分野において理解されるように、薬物、化合物、又は医薬組成物の有効量は、別の薬物、化合物、又は医薬組成物と併せて達成されても、されなくてもよい。したがって、「有効量」は、1つ以上の治療薬の投与に関連して考慮される場合があり、単一の作用物質は、1つ以上の他の作用物質と併せると望ましい結果が達成され得るか、又は達成される場合、有効量で与えられるとみなされ得る。

#### 【0081】

本明細書で使用する場合、「担体」はあらゆる溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング剤、希釈剤、抗菌及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、コロイドなどを含む。薬学的に活性な物質用の、そのような媒体及び作用物質の使用は、当該技術分野において公知である。任意の従来の媒体又は作用物質が活性成分と非適合性である場合を除いて、従来の媒体又は作用物質を治療用組成物中で使用することが想到される。補助的活性成分も、組成物に組み込むことができる。

#### 【0082】

「薬学的製剤」という用語は、活性成分の生物学的活性が有効となるような形態であり、かつ製剤が投与され得る対象に許容できない毒性を有する追加の成分を含有しない、調製物を指す。そのような製剤は無菌である。「薬学的に許容される」賦形剤（ビヒクル、添加剤）とは、有効量の用いられる活性成分を提供するために、対象哺乳動物に合理的に投与可能な賦形剤である。

#### 【0083】

本明細書で使用する場合、用語「治療」とは、病状の経過の間、治療されている個体又は細胞の自然の経過を変更するよう設計されている臨床的介入を意味する。治療の望ましい効果としては、病気進行率の低下、病状の寛解又は緩和、及び寛解又は予後改善が挙げられる。例えば、癌性細胞の増殖の減少（又は破壊）、病気に由来する症状の低下、病気を患う個体の生活の質の増加、病気を治療するのに必要な他の投薬の投与量の減少、及び/又は、個々の生残の持続を含むがこれらに限定されない、1つ以上の、癌に関連する症状が緩和又は除去されている場合、個体は上手く「治療されている」。

#### 【0084】

「抗癌」剤は、例えば、癌細胞の殺傷の促進、癌細胞でのアポトーシスの誘発、癌細胞の増殖速度の低下、転移の発生又は回数の減少、腫瘍サイズの減少、腫瘍増殖の阻害、腫瘍又は癌細胞への血液供給の減少、癌細胞又は腫瘍に対する免疫応答の促進、癌の進行の予防又は阻害、あるいは、癌を有する対象の寿命の増加により、対象内の癌細胞/腫瘍に負の影響を及ぼすことができる。

#### 【0085】

10

20

30

40

50

用語「抗体」は本明細書で最も広い意味で用いられ、特に、所望の生物活性を示す限り、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）及び抗体断片を含む。

【0086】

用語「モノクローナル抗体」は本発明で使用する場合、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を意味する。例えば、その集団を含む個々の抗体は、可能性のある変異、例えば、少量で存在し得る、天然に存在する変異を除いて同一である。したがって、修飾語「モノクローナル」は、個々の抗体の混合物ではない抗体の形質を示す。特定の実施形態において、このようなモノクローナル抗体は典型的には、標的結合ポリペプチド配列が、複数のポリペプチド配列に由来する1つの標的ポリペプチド配列の選択を含むプロセスにより入手された、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含む。例えば、選択プロセスは、ハイブリドマクローン、ファージクローン、又は組み換えDNAクローンのプールなどの、複数のプールからの、独自のクローンの選択であることができる。選択した標的結合配列を更に変更して、例えば、標的に対する親和性を改善する、標的結合配列をヒト化する、細胞培養における産生を改善する、インビボでの免疫原性を低下させる、多重特異性抗体を作成する、といったことができ、かつ、変更された標的結合配列を含む抗体もまた、本発明のモノクローナル抗体であると理解されるべきである。異なる決定基（エピトープ）に対して異なる抗体を典型的には含むポリクローナル抗体の調製物とは対照的に、モノクローナル抗体の調製物における各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製は、典型的には、他の免疫グロブリンにより汚染されない、という点で有利である。

10

20

【0087】

用語「CD122/CD132アゴニスト」、又は「選択性CD122/CD132アゴニスト」とは、優先的にCD122/CD132受容体複合体に結合し、IL-2受容体（CD25）又はIL-15受容体に対して低い親和結合を有する作用物質を意味する。既知の選択性CD122/CD132アゴニストとしては、IL2/抗IL2モノクローナル抗体免疫複合体（例えば、その全体が本明細書に参照により組み込まれている、米国特許出願公開第20170183403A1号を参照のこと）；野生型IL-2と比較して修飾されたアミノ酸配列を有する、遺伝子組み換えされたIL-2ムテイン（例えば、その全体が本明細書に参照により組み込まれている、米国特許出願公開第2017/0044229A1号を参照のこと）；抗IL2モノクローナル抗体免疫複合体と組み合わせた野生型IL-2と比較して、修飾されたアミノ酸配列を有する、遺伝子組み換えされたIL-2ムテイン（例えば、その全体が本明細書に参照により組み込まれている、国際公開第2014100014A1号を参照のこと）；NKTR-214などの、IL-2のPEG化形態（例えば、その全体が本明細書に参照により組み込まれている、Charych et al., 2016を参照のこと）、IL-15/抗IL-15モノクローナル抗体免疫複合体；IL15/IL15受容体-IgG1-Fc（IL15/IL15R-IgG1-Fc）免疫複合体（例えば、全てが参照により本明細書に組み込まれている、米国特許出願公開第20060257361A1号、欧州特許出願公開第2724728A1号、及びDubois et al., 2008を参照のこと）；IL15R-IgG1-Fc免疫複合体と組み合わせた野生型IL-15と比較して、修飾されたアミノ酸配列を有する、遺伝子組み換えされたIL-15ムテイン（例えば、その全体が本明細書に参照により組み込まれている、米国特許出願公開第20070160578号）；又は、CD122/CD132に優先的に結合する、IL-15のPEG化形態を含む。

30

40

【0088】

用語「免疫チェックポイント」とは、免疫反応のバランスを取るために、その構成要素に障害信号を提供する、免疫系内のタンパク質などの分子を意味する。既知の免疫チェックポイントタンパク質は、CTLA-4、PD-1、並びにそのリガンドであるPD-L1及びPD-L2、並びに、加えて、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TI

50

M3、KIRを含む。LAG3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、及びKIRを伴う経路は、CTLA-4及びPD-1依存性経路に類似する免疫チェックポイント経路を構成することが、当該技術分野において認識されている（例えば、Pardoll, 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264; Mellman et al., 2011. Nature 480:480-489を参照のこと）。

【0089】

用語「PD-1軸結合アンタゴニスト」とは、T細胞機能（例えば、増殖、サイトカイン産生、標的細胞の殺傷）を回復又は向上させる結果を有しながら、PD-1シグナル伝達軸におけるシグナル伝達から生じるT細胞の機能障害を取り除くための、PD-1軸結合パートナーと、その1つ以上の結合パートナーのいずれかとの相互作用を阻害する分子を意味する。本明細書で使用する場合、PD-1軸結合アンタゴニストとしては、PD-1結合アンタゴニスト、PD-L1結合アンタゴニスト、又はPD-L2結合アンタゴニストを挙げることができる。

10

【0090】

用語「PD-1結合アンタゴニスト」とは、PD-1と、PD-L1及び/又はPD-L2などの、その1つ以上の結合パートナーとの相互作用により生じるシグナル伝達を低下させる、遮断する、阻害する、抑制する、又はこれに干渉する分子を意味する。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストとは、PD-1の、その1つ以上の結合パートナーへの結合を阻害する分子である。特定の態様では、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1のPD-L1及び/又はPD-L2への結合を阻害する。例えば、PD-1結合アンタゴニストとしては、抗PD-1抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、並びに、PD-1と、PD-L1及び/又はPD-L2との相互作用により生じるシグナル伝達を低下させる、遮断する、阻害する、抑制する、又はこれに干渉する、その他の分子が挙げられる。一実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、機能障害性T細胞の機能障害性を低下させる（例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する）ように、PD-1を介してTリンパ球媒介シグナル伝達で発現された細胞表面タンパク質によって、又はそれを介して媒介される、負の共刺激性シグナルを低減させる。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは抗PD-1抗体である。特定の態様において、PD-1結合アンタゴニストは、MDX-1106（ニボルマブ）である。特定の態様において、PD-1結合アンタゴニストは、MK-3475（ペムプロリズマブ）である。別の特定の態様において、PD-1結合アンタゴニストは、CT-011（ピディリズマブ）である。別の特定の態様において、PD-1結合アンタゴニストはAMP-224である。

20

30

【0091】

「PD-L1結合アンタゴニスト」という用語は、PD-L1とその結合パートナーのうちのいずれか1つ以上、例えば、PD-1又はB7-1との相互作用により生じるシグナル伝達を減少させる、遮断する、阻害する、抑制する、又はこれに干渉する分子を指す。いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、PD-L1の、その結合パートナーへの結合を阻害する分子である。具体的な態様では、PD-L1結合アンタゴニストは、PD-L1の、PD-1及び/又はB7-1への結合を阻害する。いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストとしては、抗PD-L1抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、及び、PD-L1の、その1つ以上の結合パートナー、例えばPD-1又はB7-1との相互作用により生じるシグナル伝達を減少させる、遮断する、阻害する、抑制する、又はそれに干渉するその他の分子が挙げられる。一実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、機能障害性T細胞の機能障害性を低下させる（例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する）ように、PD-L1を介してTリンパ球媒介シグナル伝達で発現された細胞表面タンパク質によって、又はそれを介して媒介される、負の共刺激性シグナルを低減させる。いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、抗PD-L1抗体である。特定の態様において、抗PD-L1抗体はYW243.55.S70である。別の特定の態様におい

40

50

て、抗PD-L1抗体はMDX-1105である。更に別の特定の態様において、抗PD-L1抗体はMPDL3280Aである。更に別の特定の態様において、抗PD-L1抗体はMED14736である。

【0092】

「PD-L2結合アンタゴニスト」という用語は、PD-L2とその結合パートナーのうちのいずれか1つ以上、例えば、PD-1との相互作用により生じるシグナル伝達を減少させる、遮断する、阻害する、抑制する、又はそれに干渉する分子を指す。いくつかの実施形態では、PD-L2結合アンタゴニストは、PD-L2の、その結合パートナーのうちの1つ以上への結合を阻害する分子である。具体的な一態様において、PD-L2結合アンタゴニストは、PD-L2のPD-1への結合を阻害する。いくつかの実施形態では、PD-L2アンタゴニストは、抗PD-L2抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、及びPD-L2とその結合パートナーのうちのいずれか1つ以上、例えば、PD-1との相互作用により生じるシグナル伝達を低減する、遮断する、阻害する、抑制する、又はそれに干渉するその他の分子を含む。一実施形態では、PD-L2結合アンタゴニストは、機能障害性T細胞の機能障害性を低下させる（例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する）ように、PD-L2を介してTリンパ球媒介シグナル伝達で発現された細胞表面タンパク質によって、又はそれを介して媒介される、負の共刺激性シグナルを低減させる。いくつかの実施形態では、PD-L2結合アンタゴニストは、イムノアドヘシンである。

10

【0093】

「免疫チェックポイント阻害剤」とは、免疫チェックポイントタンパク質の機能を阻害するあらゆる化合物を意味する。阻害には、機能の低下、及び完全な遮断が含まれる。具体的には、免疫チェックポイントタンパク質はヒト免疫チェックポイントタンパク質である。したがって、免疫チェックポイントタンパク質阻害剤は具体的には、ヒト免疫チェックポイントタンパク質の阻害剤である。

20

【0094】

「細胞外マトリックス分解性タンパク質」、又は「細胞外マトリックス分解タンパク質」とは、細胞マトリックスの一体性に作用する、特に、上記マトリックスの成分のうち少なくとも1つ、又は、これらの様々な成分を一体化させる結合上で、全体的又は部分的な分解又は不安定化作用を発揮する、あらゆるタンパク質を意味する。

30

【0095】

「アブスコパル効果」とは本明細書において、腫瘍の局在的治療の範囲外で、腫瘍が収縮することとして言及される。例えば、免疫チェックポイント治療法による全身治療と組み合わせ、p53及び/又はIL-24を用いる局所治療により、離れた未治療腫瘍にてアブスコパル効果をもたらすことができる。

【0096】

II. 癌抑制因子

いくつかの実施形態において、対象には、p53及び/又はMDA-7治療法などの、癌抑制治療法が投与される。p53及び/又はMDA-7をコードする核酸は、当該技術分野において既知の様々な方法で提供することができる。

40

【0097】

いくつかの態様では、p53及びMDA-7癌抑制治療法は、核酸多様体を組み込んで、その活性を増加させる。特定の態様において、多様体癌抑制核酸は、負の制御に耐性を有するp53多様体である（Yun et al., 2012; その全体が本明細書に参照により組み込まれている）。

【0098】

A. p53

特定の実施形態において、本開示は、癌治療のための併用療法を提供する。本明細書において提供する併用療法のいくつかとしては、野生型p53遺伝子を対象に投与することを含む、p53遺伝子治療法が挙げられる。野生型p53は、多くの細胞型における重要

50

な成長制御因子として認識されている。p53 遺伝子は、大型 T 抗原及び E1B などの宿主タンパク質と複合体を形成可能な、375 アミノ酸のリントタンパク質をコードする。タンパク質は通常の組織及び細胞内で見出されるが、形質転換細胞又は腫瘍組織と比較してわずかな濃度においてである。

【0099】

ミスセンス変異は p53 遺伝子にとっては一般的であり、癌遺伝子の形質転換能力のために不可欠である。点変異により促進される 1 つの遺伝子変化により、発癌性物質の p53 が作製され得る。しかし、他の癌遺伝子とは異なり、p53 点変異は、少なくとも 30 個の異なるコドンにて生じることが知られており、多くの場合、ホモ接合体に対する低減なしに、細胞表現型におけるシフトを生み出す優性対立遺伝子を作製する。更に、これらのドミナントネガティブ対立遺伝子の多くは、生命体にて耐性があり、生殖細胞系を通過するようである。様々な変異対立遺伝子が、機能障害が最小のものから、強力で貫通性のドミナントネガティブ対立遺伝子までの範囲となっているようである (Weinberg, 1991)。化学的発癌性物質、紫外線、及びいくつかのウイルスにより形質転換された多くの細胞において、多量の変異体 p53 が発見されている。

10

【0100】

いくつかの態様では、p53 バイオマーカーを用いて、p53 治療のための患者を選択する。特定の態様において、好ましい腫瘍 p53 バイオマーカープロファイルは、野生型 p53 遺伝子構成、又は、免疫組織化学により 20% 未満の p53 陽性細胞のいずれかにより定義される (米国特許第 9,746,471 号、及び Nemunaitis et al., 2009; 両方の全体が参照により組み込まれている)。

20

【0101】

B. MDA-7

本明細書において提供する併用療法はまた更に、完全長又は切断 MDA-7 遺伝子を投与することを含む MDA-7 遺伝子治療法を含むことができる。mda-7 遺伝子のタンパク質産生物であるインターロイキン (IL) - 24 は、サイトカインの IL-10 ファミリーに属するサイトカインであり、癌抑制因子でもある。MDA-7 タンパク質をコードする cDNA が、Jiang et al., 1995 (国際公開第 1995011986 号) により記載されている。MDA-7 cDNA は、23.8 kDa の予想サイズを有する 206 アミノ酸の、進化上で保存されたタンパク質をコードする。

30

【0102】

本明細書において提供する MDA-7 をコードする核酸は、完全長又は切断ヒト IL-24 タンパク質又はポリペプチドをコードすることができる。切断版の MDA-7 は、完全長配列の連続したアミノ酸領域のある部分又は複数の部分を含むが、配列全体を含有はしない。切断版は、ポリペプチドの任意の部位における、任意数の連続アミノ酸で切断することができる。例えば、切断版の MDA-7 は、ヒト野生型 MDA-7 の約 49 ~ 約 206; 約 75 ~ 約 206; 約 100 ~ 約 206; 約 125 ~ 約 206; 約 150 ~ 約 206; 約 175 ~ 約 206; 又は約 182 ~ 約 206 のアミノ酸をコードすることができる。ヒト野生型 MDA-7 の少なくとも約 85%、90%、及び 95% を含有する MDA-7 ポリペプチドは本発明の範囲内であることもまた想到される。

40

【0103】

C. その他の癌抑制因子

追加の癌抑制因子を本開示で使用することができる。その他の癌抑制遺伝子を組み込むのに本開示で使用するための遺伝子治療ベクターとしては、表 1 に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

【表 1】

表 1：癌抑制遺伝子

癌抑制因子	機能	癌	参考文献
APC	腫瘍形成、並びに、上皮及びリンパ系細胞を含むいくつかの細胞型の発達及びホメオスタシスに関する特異的転写因子の機能の調節。 APCもまた、細胞増殖、並びに、移動及び接着などの、他の細胞活動において示唆されている。	家族性腺腫様及び非遺伝性結腸癌	Aoki <i>et al.</i> , 2007
BRCA1、BRCA2	DNA損傷修復	遺伝性乳癌；卵巣癌	Greenburg <i>et al.</i> , 2008
CDKN2A	癌抑制因子であるp16及びp14ARFをコードする遺伝子座位。	脳腫瘍	Hashemi <i>et al.</i> , 2002
DCC	ネトリン-1受容体。 腸上皮の細胞増殖及びアポトーシスの制御。	結腸癌	Pierce <i>et al.</i> , 1994
DPC4 (SMAD4)	発達に関する転写因子；転移及び腫瘍侵襲性において示唆されている。	結腸腫瘍、膵臓腫瘍形成	Yachida <i>et al.</i> , 2009
MADR2/JV18 (SMAD2)	成長因子受容体からのシグナル伝達を媒介。 SMAD4の核への輸送を補助。	結腸直腸癌	Heldin <i>et al.</i> , 2009
MEN1	転写因子、DNA修復タンパク質、細胞骨格蛋白などと相互作用するメンタンパク質をコードする。 機能は明確に定義されていない。	I型多発性内分泌腺腫瘍形成	Starker <i>et al.</i> , 2009
MTS1	サイクリン依存性キナーゼの阻害剤；G1～Sの細胞周期通過を制御する。	黒色腫	Rocco <i>et al.</i> , 2001
NF1	Ras GTPase活性化タンパク質 (RAS-GAP)	I型神経線維腫症	Johannessen <i>et al.</i> , 2005
NF2	ERMタンパク質；タンパク質複合体を集め、それらをアクチンに結合させることにより、原形質膜を組織する。	II型神経線維腫症	Gladden <i>et al.</i> , 2010
p53、p63、p73	G1期における細胞周期を停止させるタンパク質であるp21に対する転写因子をコードする。 p53は、細胞のサイズ、DNAの一体性、及び染色体複製に関連するシグナルを一体化する。	膀胱癌、乳癌、結腸癌、食道癌、肝癌、肺癌、前立腺癌、及び卵巣癌；脳腫瘍、肉腫、リンパ腫、及び白血病	Giono <i>et al.</i> , 2006
PTEN	脂質ホスファターゼ。 細胞の生残を制御する	カウデン症候群；乳癌及び甲状腺癌のリスクの増加	Backman <i>et al.</i> , 2002
Rb	E2F転写因子に結合し、これを阻害する。 細胞周期の進行を一時停止する	網膜芽細胞腫、肉腫；膀胱癌、乳癌、食道癌、前立腺癌、及び肺癌	Yamasaki, 2003
VHL	細胞周期の制御。 p53の安定性及び活性を増加させる	腎細胞癌	Kaelin <i>et al.</i> , 2002
WRN	DNAヘリカーゼ及びエキソヌクラーゼ。 DNA破壊の修復に関する。	ウェルナー症候群	Bernstein <i>et al.</i> , 2002
WT1	転写因子。 発達において不可欠な役割。	ウィルムス腫瘍 (小児腎臓癌)	

10

20

30

40

## 【0104】

## III. 細胞外マトリックス分解

癌抑制遺伝子治療法、及び/又は免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果を増強させる方法もまた、本明細書において提供する。一態様において、遺伝子治療法（例えばウイルス分配）の送達及び腫瘍貫通は、腫瘍細胞の細胞外マトリックス（ECM）又はその補体を分解する、タンパク質又は作用物質により増強される。

## 【0105】

細胞外マトリックス（ECM）は、周囲の細胞の構造的及び生化学的支持を提供する細

50

胞により分泌される、細胞外分子の収集物である。多細胞性は、異なる多細胞のリネージにて独立して進化したため、ECMの組成物は、多細胞構築物間で異なる。しかし、細胞接着、細胞どうしの通信、及び分化は、ECMの共通の機能である。細胞外マトリックス分解性タンパク質により標的化され得るECMの構成成分としては、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、及びラミニンが挙げられる。

#### 【0106】

##### A. リラキシン

本明細書において提供する方法にて使用可能な、1つの細胞外マトリックス分解タンパク質は、リラキシンである。リラキシンとは、構造的にインスリン及びインスリン様成長因子に関連している、6kDaのペプチドホルモンである。リラキシンは、黄体及び子宮内膜にて主に産生され、その血清量は、妊娠中に大幅に増加する(Sherwood et al., 1984)。リラキシンは、コラーゲンが過剰発現する際の、コラーゲン発現の強力な阻害剤であるが、他のコラーゲンとは対照的に、コラーゲン発現の基底量を著しく変えることはない。リラキシンは、MMP2、MMP3、及びMMP9などの様々なMMPの発現を促進してコラーゲンを分解するため、結合組織及び基底膜が分解され、産道の細胞外マトリックスの破壊をもたらす。これに加え、リラキシンによるMMP1及びMMP3の発現の促進もまた、肺、心臓、皮膚、腸、乳腺、血管、及び精管において観察されており、これらの場所では、リラキシンは、阻害剤としての役割を果たし、コラーゲンの過剰発現を防止する(Qin, X., et al., 1997a; Qin, X., et al., 1997b)。

10

20

#### 【0107】

リラキシンタンパク質、又はリラキシンタンパク質をコードする核酸を投与することにより、腫瘍細胞の周囲にある細胞外マトリックスの主要構成成分であるコラーゲンの分解を誘発し、結合組織及び基底膜を破壊することで、細胞外マトリックスの分解をもたらすことができる。特に、結合組織によりきつく囲まれた腫瘍組織に投与されるとき、リラキシンと組み合わせての、癌抑制遺伝子治療法の投与は、改善された抗腫瘍有効性を示す。

#### 【0108】

リラキシンタンパク質は、米国特許第5,023,321号に記載されているように、生物活性を保持する、完全長リラキシン、又はリラキシン分子の一部であることができる。具体的には、リラキシンは、受容体から、結合したリラキシンを競合的に置き換える作用物質などの、組み換えヒトリラキシン(H2)、又はリラキシン様活性を有する、その他の活性剤である。リラキシンは、好ましくは米国特許第4,835,251号に記載されているように、当業者に既知の任意の方法により、作製することができる。リラキシン類似体又はその誘導体は、米国特許第5,811,395号に記載されており、ペプチド合成は、米国特許出願公開第2,011,003,977,8号に記載されている。

30

#### 【0109】

本明細書において提供する方法にて使用可能な、例示的なアデノウイルスリラキシンは、Kim et al. (2006)により説明されている。手短かに言えば、リラキシン遺伝子をE3アデノウイルス領域に挿入することにより、リラキシンを発現し、複製可能な(ADE1B-RLX)アデノウイルスが作製される。

40

#### 【0110】

##### B. ヒアルロニダーゼ

いくつかの実施形態では、通常、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックスに存在する多糖類を加水分解することができる任意の物質を、投与することができる。具体的には、本発明で使用する細胞外マトリックス分解タンパク質は、ヒアルロニダーゼであることができる。ヒアルロニン(又はヒアルロン酸)は、脊椎動物の細胞外マトリックスの広範囲に存在する構成成分である。グルクロン酸及びグルコサミン[D-グルクロン酸(1-3)N-アセチル-D-グルコサミン(1-b-4)]をベースにする、この直鎖状多糖類は、非常に粘稠な溶液を形成するというその性質により、マトリックスの物理化学的性質に影響を及ぼすことができる。ヒアルロン酸は、細胞表面に位置する、様々な受容体及

50

び結合タンパク質ともまた相互作用する。ヒアルロン酸は、受精、胚の発達、細胞移動及び分化、傷の治癒、炎症、腫瘍増殖、及び転移の形成などの、多数の生物過程に關与する。

#### 【0111】

ヒアルロン酸はヒアルロニダーゼにより加水分解され、加水分解により、細胞外マトリックスの解体がもたらされる。したがって、Kreil (Protein Sci., 1995, 4: 1666 - 1669) に記載されている、ヒアルロニダーゼなどの、ヒアルロニダーゼ活性を有する任意の物質が、本方法での使用に好適であることが想到される。ヒアルロニダーゼは、哺乳類、爬虫類、又は膜翅類のヒアルロニダーゼであるグリカノヒドロラーゼ、ヒルの唾液腺由来の、ヒアルロニダーゼであるグリカノヒドロラーゼ、又は、細菌、特に連鎖球菌、肺炎球菌、及びガス壊疽菌のヒアルロニダーゼであるリアーゼに由来するヒアルロニダーゼであることができる。ヒアルロニダーゼの酵素活性は、Hynes and Ferretti (Methods Enzymol., 1994, 235: 606 - 616) 又は Bailey and Levine (J. Pharm. Biomed. Anal., 1993, 11: 285 - 292) に記載されているような従来技術によって、評価することができる。

10

#### 【0112】

##### C. デコリン

小型のロイシンリッチなプロテオグリカンであるデコリンは、細胞外マトリックスの遍在する構成成分であり、コラーゲンフィブリルと関連して、主に発見されている。デコリンはコラーゲンフィブリルに結合し、個々の三重ヘリックスコラーゲン分子の水平アセンブリを遅らせ、フィブリル直径の減少をもたらす。更に、デコリンは、フィブロネクチン及びトロンボスポンジンなどの細胞外マトリックス構成成分の、細胞との相互作用を調節することができる。更に、デコリンは、マトリックスメタロプロテイナーゼであるコラゲナーゼの誘発により、細胞外マトリックスの再構築に影響を及ぼすことができる。Choi et al. (Gene Therapy, 17: 190 - 201, 2010) 及び Xu et al. (Gene Therapy, 22(3): 31 - 40, 2015) により説明されているように、いくつかのレベルにおいて、デコリンが細胞外マトリックスの産生及びアセンブリを制御し、故に、結合組織の再構築において主たる役割を有することを、これらの観測結果は示唆している。

20

30

#### 【0113】

本明細書において提供する方法にて使用可能な、例示的なアデノウイルス型デコリンは、Choi et al. (Gene Therapy, 17: 190 - 201, 2010) により説明されている。手短かに言えば、デコリンを発現する、複製可能な (Ad-E1B-DCNG) アデノウイルスは、デコリン遺伝子を E3 アデノウイルス領域に挿入することにより生成される。本明細書において提供する方法にて使用可能な、別のアデノウイルス型デコリンは、Xu et al. (Gene Therapy, 22(3): 31 - 40, 2015) により説明されている。同様に、デコリンを発現する複製可能な (Ad.dcn) アデノウイルスは、デコリン遺伝子を E3 アデノウイルス領域に挿入することにより生成される。

40

#### 【0114】

##### IV. 核酸

当業者に既知の任意の技術により、核酸を作製することができる。合成核酸、特に、合成オリゴヌクレオチドの非限定例としては、欧州特許第 266,032 号に記載されているような、ホスホトリエステル、ホスファイト、若しくはホスホラミダイト化学現象、及び固相技術を用いる、又は、Froehler et al., 1986、及び米国特許第 5,705,629 号に記載されているデオキシヌクレオチド H-ホスホネート中間体による、インビトロ化学合成により作製される核酸が挙げられる。酵素により作製した核酸の非限定例としては、PCR (商標) などの増幅反応における酵素 (例えば、米国特許第 4,683,202 号、及び同第 4,682,195 号を参照のこと)、又は、米国特

50

許第5, 645, 897号に記載されている、オリゴヌクレオチドの合成により、作製したものが挙げられる。生物学的に作製した核酸の非限定例としては、細菌中での組み換えDNAベクター作製などの、生細胞での組み換え核酸作製が挙げられる(例えば、Sambrook et al., 1989を参照のこと)。

#### 【0115】

核酸を、それ自体の配列の長さに関係なく、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、制限酵素部位、複数のクローニング部位、コードセグメントなどを含むがこれらに限定されない、他の核酸配列と組み合わせ、1つ以上の核酸構築物を作製することができる。全長は、核酸構築物間で大幅に異なる場合がある。したがって、ほぼあらゆる長さの核酸セグメントを用いることができるものの、全長は、調製の容易さ、又は意図される組み換え核酸プロトコールでの使用により、限定されるのが好ましい。

10

#### 【0116】

##### A. 発現ベクターによる核酸送達

本明細書において提供するベクターは主に、調節された真核細胞プロモーター(即ち、体質性、誘発性、抑制性、組織特異的)の制御下において、治療用癌抑制遺伝子(例えば、p53及び/又はMDA-7)、及び/又は細胞外マトリックス分解性遺伝子(例えば、リラキシン)を発現するために設計される。いくつかの態様では、p53及びMDA-7は、ベクター内で同時に発現することができる。別の態様において、p53及び/又はMDA-7は、細胞外マトリックス分解性遺伝子と共に同時に発現することができる。また、他の理由がない場合、ベクターは、インビトロでの操作を容易にするための選択マーカーを含有することができる。

20

#### 【0117】

当業者は、標準的な組み換え技術により、ベクターを構築するための装備を十分に有しているであろう(例えば、両方が参照により本明細書に組み込まれている、Sambrook et al., 2001及びAusubel et al., 1996を参照のこと)。ベクターとしては、レトロウイルスベクター(例えば、モロニー Maus 白血病ウイルスベクター(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNVなどに由来する)、レンチウイルスベクター(例えば、HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIVなどに由来する)、複製可能、複製不能、及びガットレス形態を含むアデノウイルス(Ad)ベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、シミアンウイルス40(SV-40)ベクター、ウシ乳頭腫ウイルス、エプスタイン・バーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、Harvey Maus 肉腫ウイルスベクター、Maus 乳癌ウイルスベクター、Rous 肉腫ウイルスベクターなどの、プラスミド、コスミド、ウイルス(バクテリオファージ、動物ウイルス、及び植物ウイルス)、並びに人工染色体(例えばYAC)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0118】

##### 1. ウイルスベクター

癌抑制因子、及び/又は細胞外マトリックス分解性遺伝子をコードするウイルスベクターを、本発明の特定の態様にて提供することができる。組み換えウイルスベクターの生成において、不可欠ではない遺伝子は典型的には、異種(又は非天然)タンパク質用の遺伝子又はコード配列で置き換えられる。ウイルスベクターとは、ウイルス配列を利用して、核酸、及び場合によりタンパク質を、細胞内に導入する、発現構築物の一種である。特定のウイルスが、受容体を媒介するエンドサイトーシスにより細胞に感染し、又は細胞に入り、宿主細胞ゲノム内に一体化してウイルス遺伝子を発現するという能力により、それらのウイルスは外来核酸を細胞(例えば哺乳類細胞)内に移動させるための魅力的な候補に、安定して、かつ効率的に仕立てられる。本発明の特定の態様の核酸を送達するために使用可能なウイルスベクターの非限定例を、以下で説明する。

40

#### 【0119】

レンチウイルスは、一般的なレトロウイルス遺伝子であるgag、pol、及びenvに加えて、制御性又は構造的機能を有する他の遺伝子を含有する、複雑なレトロウイルス

50

である。レンチウイルスベクターは当該技術分野において周知である（例えば、Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; 米国特許第6,013,516号、及び同第5,994,136号を参照のこと）。

#### 【0120】

組み換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染することができ、核酸配列の、インビボ及びエクスピボ遺伝子導入及び発現の両方に使用することができる。例えば、非分裂細胞に感染可能な組み換えレンチウイルス（ここで、好適な宿主細胞には、パッケージング機能を有する2つ以上のベクター、即ちgag、pol、及びenv、並びにrev及びtatがトランスフェクションされている）は、参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第5,994,136号に記載されている。

10

#### 【0121】

##### a. アデノウイルスベクター

癌抑制因子、及び/又は細胞外マトリックス分解性遺伝子を送達するための一方法には、アデノウイルス発現ベクターの使用を伴う。アデノウイルスベクターは、ゲノムDNAへの組み込み能力が低いことが知られているものの、この特徴は、これらのベクターにより得られる高効率の遺伝子導入により、相殺される。アデノウイルス発現ベクターとしては、(a)構築物のパッケージングを支持し、かつ、(b)その中にクロニングされた組換え遺伝子構築物を最終的に発現するのに十分なアデノウイルス配列を含有する構築物が挙げられる。

20

#### 【0122】

アデノウイルス増殖及び操作は当業者に既知であり、インビトロ及びインビボにて、広い宿主範囲を示す。このウイルスの群は高い力価、例えば、1mL当たり、 $10^9 \sim 10^{11}$ のプラーク形成単位にて得ることができ、これらは感染性が高い。アデノウイルスの生活環は、宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。アデノウイルスベクターにより送達される外来遺伝子はエピソーム性であり、それ故、宿主細胞に対して低い遺伝毒性を有する。野生型アデノウイルスをワクチン接種する研究において、副作用は報告されておらず(Couch et al., 1963; Top et al., 1971)、これは、インビボ遺伝子導入ベクターとしての安全性、及び治療上の可能性を示している。

30

#### 【0123】

36kbの直鎖状二本鎖DNAウイルスであるという、アデノウイルスの遺伝構成の知識により、大型のアデノウイルスDNAを、最大7kbの外来配列で置き換えることが可能となる(Grunhaus and Horwitz, 1992)。レトロウイルスとは対照的に、アデノウイルスDNAは、潜在的な遺伝毒性を有することなく、エピソームのように複製することができるため、宿主細胞がアデノウイルスで感染することによって、染色体の導入はもたらされない。アデノウイルスはまた、構造的に安定しており、大規模な増幅の後に、ゲノム転位は検出されていない。

#### 【0124】

アデノウイルスは、中型サイズゲノムであり、操作の容易性、高い力価、広い標的細胞の範囲、及び高い感染性によって、遺伝子導入ベクターとして使用するのが特に好適である。ウイルスゲノムの両端は、100~200塩基対の逆位反復(ITR)を含有し、これらは、ウイルスDNA複製及びパッケージングのために必要なcis要素である。ゲノムの初期(E)及び後期(L)領域は、ウイルスDNA複製の開始により分けられる、異なる転写単位を含有する。E1領域(E1A及びE1B)は、ウイルスゲノムの転写制御を担うタンパク質、及び少数の細胞遺伝子をコードする。E2領域(E2A及びE2B)の発現により、ウイルスDNA複製のためのタンパク質の合成がもたらされる。これらのタンパク質はDNA複製、後期遺伝子発現、及び宿主細胞の遮断に参与している(Renan, 1990)。ウイルス性キャプシドタンパク質の大部分を含む、後期遺伝子の生成物は、主要後期プロモーター(MLP)に由来する、単一の一次転写物の著しい処理の後

40

50

果的であり、このプロモーターに由来する mRNA は全て、5' の 3 つに分かれたリーダー ( T P L ) 配列を有し、これらにより、特定の mRNA が翻訳用となる。

【 0 1 2 5 】

本明細書において提供する組み換えアデノウイルスは、シャトルベクターとプロウイルスベクターとの相同組み換えにより、生成することができる。2つのプロウイルスベクターの、可能な組み換えにより、野生型アデノウイルスを、本プロセスから生成することができる。それ故、ウイルスの単一クローンは個々のブランクから単離され、そのゲノム構造が調査される。

【 0 1 2 6 】

アデノウイルスベクターは複製可能、複製不能、又は条件次第で不能であることができ、アデノウイルスベクターの性質は、本発明を上手く実施するのに重要であるとは考えられていない。アデノウイルスは、42個の異なる既知の血清型又は亜群 A ~ F のいずれかであることができる。亜群 C のアデノウイルス 5 型は、本発明で使用するための、条件次第で複製不能なアデノウイルスベクターを得るための、具体的な発生物質である。これは、アデノウイルス 5 型が、多くの生化学的及び遺伝子情報が知られているヒトアデノウイルスであり、アデノウイルスをベクターとして用いる最も多くの構築物に、歴史的に用いられているためである。

10

【 0 1 2 7 】

核酸はアデノウイルスベクターに、コード配列が取り除かれた位置として導入することができる。例えば、複製不能なアデノウイルスベクターでは、E1 をコードする配列が取り除かれていることができる。対象の遺伝子をコードするポリヌクレオチドはまた、K a r l s s o n e t a l . ( 1 9 8 6 ) により説明されているように、E3 置き換えベクター内に、欠失した E3 領域の代わりに、又は、ヘルパー細胞株又はヘルパーウイルスが E4 欠失を補完する、E4 領域に、挿入することができる。

20

【 0 1 2 8 】

複製不能アデノウイルスベクターの生成及び増殖を、ヘルパー細胞株を用いて実施することができる。293 と呼ばれる、ある独自のヘルパー細胞株を、Ad5 DNA 断片によりヒト胎児腎臓細胞から形質転換すると、構造的に、E1 タンパク質を発現する ( G r a h a m e t a l . , 1 9 7 7 ) 。 E 3 領域は、アデノウイルスゲノムから分配可能であるため ( J o n e s a n d S h e n k , 1 9 7 8 ) 、アデノウイルスベクターは、293 細胞の補助により、外来 DNA を E1、E3 のいずれか、又はこれら両方の領域に運搬する ( G r a h a m a n d P r e v e c , 1 9 9 1 ) 。

30

【 0 1 2 9 】

ヘルパー細胞株は、ヒト胎児腎臓細胞、筋細胞、造血細胞、又は、他のヒト胚間葉若しくは上皮細胞などの、ヒト細胞に由来することができる。あるいは、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスに対して許容的な、他の哺乳動物種の細胞に由来することができる。このような細胞としては例えば、ベロ細胞、又は、他のサル胚間葉若しくは上皮細胞が挙げられる。上述のとおり、具体的なヘルパー細胞株は、293 である。

【 0 1 3 0 】

参照により本明細書に組み込まれている米国特許第 6740320 号などの組み換えアデノウイルスの作製方法は、当技術分野において既知である。また、R a c h e r e t a l . ( 1 9 9 5 ) は、293 細胞を培養する、及び、アデノウイルスを増殖させる、改善された方法について開示している。一形態において、個別の細胞を 1 リットルの、100 ~ 200 mL の培地を含有する、シリコーン処理したスピナーフラスコ ( T e c h n e , C a m b r i d g e , U K ) に播種することにより、天然細胞のアグリゲートが増殖する。40 rpm にて攪拌した後、トリパンプルーを用いて細胞生存能を推定する。別の形態において、F i b r a - C e l マイクロキャリア ( B i b b y S t e r l i n , S t o n e , U K ) ( 5 g / L ) を、以下のとおりに用いる。5 mL の培地に再懸濁した細胞種菌を、250 mL の三角フラスコ内で担体 ( 50 mL ) に加え、適宜攪拌しながら、1 ~ 4 時間静置した。次に、培地を 50 mL の、新鮮な培地で交換し、振盪を開始した。

40

50

ウイルス作製のため、細胞を約80%のコンフルエンスまで増殖させ、その後、培地を交換し(終体積は25%)、アデノウイルスをMOI 0.05にて添加した。培養液を一晚静置し、その後、体積を100%まで増加させて、更に72時間の振盪を開始した。

#### 【0131】

##### b. レトロウイルスベクター

更に、癌抑制因子、及び/又は細胞外マトリックス分解性遺伝子を、レトロウイルスベクターによりコードすることができる。レトロウイルスは、逆転写プロセスにより、感染した細胞内で、細胞のRNAを二本鎖DNAに転換する能力を特徴とする、一本鎖RNAウイルスの群である(Coffin, 1990)。得られたDNAを次に、プロウイルスとして細胞染色体内に、安定的に組み込み、ウイルス性タンパク質の合成を指令する。組み込みにより、レシピエント細胞、及びその子孫において、遺伝子配列が保持される。レトロウイルスゲノムは、それぞれ、キャプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、及びエンペロープ構成成分に対してコードする3つの遺伝子、gag、pol、及びenvを含有する。gag遺伝子の上流に見出される配列は、ゲノムをヴィリオンにパッケージングするためのシグナルを含有する。2つの長末端反復(LTR)配列は、ウイルスゲノムの5'及び3'末端に存在する。これらは、強力なプロモーター及びエンハンサー配列を含有し、宿主細胞ゲノム内への組み込みのためにも必要である(Coffin, 1990)。

レトロウイルスベクターを構築するために、対象の遺伝子をコードする核酸を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入し、複製不能なウイルスを作製する。

#### 【0132】

ヴィリオンを作製するために、gag、pol、及びenv遺伝子を含有するが、LTR及びパッケージング構成成分を含有しない、パッケージング細胞を構築する(Mann et al., 1983)。レトロウイルスLTR及びパッケージング細胞と共に、cDNAを含有する組み換えプラスミドが、(例えばリン酸カルシウム沈殿により)この細胞株に組み込まれるとき、パッケージング配列により、組み換えプラスミドのRNA転写産物がウイルス粒子内にパッケージされることができ、これが次に、細胞培地内に分泌される(Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983)。組み換えレトロウイルスを含有する培地を次いで収集し、任意に濃縮して、遺伝子導入のために使用する。レトロウイルスベクターは、広範囲の様々な細胞型に感染することができる。しかし、導入及び安定した発現のためには、宿主細胞の分裂が必要である(Paskind et al., 1975)。

#### 【0133】

欠損性レトロウイルスベクターを使用する懸念は、パッケージング細胞内で、野生型の複製可能なウイルスが出現する可能性があることである。これは、組み換えウイルス由来のインタクトな配列が、宿主細胞ゲノムに組み込まれたgag、pol、env配列の上流に挿入される組み換え事象により生じる可能性がある。しかし、組み換えの可能性を大幅に低下させるはずである、パッケージング細胞株が利用可能である(Markowitz et al., 1988; Hersdorffer et al., 1990)。

#### 【0134】

##### c. アデノ随伴ウイルスベクター

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、高頻度の組み込みを有するために、本開示での使用に関して魅力的なベクター系であり、非分裂細胞に感染することができるため、遺伝子を哺乳類細胞に送達するのに有用となる(Muzyczka, 1992)。AAVは、広い範囲の宿主に対して感染力を持っており(Tratschin, et al., 1984; Laughlin, et al., 1986; Lebkowski, et al., 1988; McLaughlin, et al., 1988)、これは、AAVが本発明で用いるのに適していることを意味する。rAAVベクターの生成及び使用に関する詳細は、米国特許第5,139,941号、及び同第4,797,368号に記載されている。

別のウイルス(アデノウイルス、又はヘルペスウイルスファミリーの要素のいずれか)と同時感染し、培養細胞にて増殖感染を受ける必要がある(Muzyczka, 1992)

10

20

30

40

50

)という点で、AAVは依存性のパルボウイルスである。

【0135】

ヘルパーウイルスとの同時感染がないと、野生型AAVゲノムは、その末端を通して、プロウイルスとして潜在的な状態で存在する、ヒト染色体19に組み込まれる(Kotinet al., 1990; Samulski et al., 1991)。しかし、AAV Repタンパク質もまた発現しない限り、rAAVは、組み込みに関して、染色体19に限定されていない(Shelling and Smith, 1994)。AAVプロウイルスを有する細胞がヘルパーウイルスで重感染するとき、AAVゲノムは染色体から、又は組み換えプラスミドから「救出」され、通常の増殖感染が確立される(Samulski et al., 1989; McLaughlin et al., 1988; Kotinet al., 1990; Muzyczka, 1992)。

10

【0136】

典型的には、組み換えAAV(rAAV)ウイルスは、2つのAAV末端反復が隣接する対象の遺伝子を含むプラスミド(McLaughlin et al., 1988; Samulski et al., 1989; それぞれが参照により本明細書に組み込まれている)と、末端反復を有しない野生型AAVコード配列を含む発現プラスミド、例えばpIM45(McCarthy et al., 1991)同時トランスフェクションすることにより作製される。細胞はまた、AAVヘルパー機能のために必要なアデノウイルス遺伝子を有するアデノウイルス又はプラスミドで感染される、又はこれをトランスフェクションされる。このように作製されたrAAVウイルスのストックを、(例えば塩化セシウム密度勾配により)物理的にrAAV粒子から分離されていなければならないアデノウイルスで汚染させる。あるいは、AAVコード領域を含むアデノウイルスベクター、又は、AAVコード領域、及びアデノウイルスヘルパー遺伝子のいくつか若しくは全てを含む細胞株を、使用することができる(Yang et al., 1994; Clark et al., 1995)。組み込まれたプロウイルスとしてrAAV DNAを有する細胞株もまた、使用することができる(Flotte et al., 1995)。

20

【0137】

d. その他のウイルスベクター

本開示において、その他のウイルスベクターを構築物として使用することができる。ワクシニアウイルス(Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988)及びヘルペスウイルスなどのウイルスに由来するベクターを使用することができる。それらは、様々な哺乳類細胞に対していくつかの魅力的な特徴を提供する(Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990)。

30

【0138】

ベネズエラウマ脳炎(VEE)ウイルスの、分子的にクローニングした株が遺伝的に、異種ウイルス性タンパク質の発現のための複製可能なワクチンベクターとして洗練されている(Davis et al., 1996)。研究により、VEE感染が潜在的なCTL応答を刺激することが示され、VEEが、予防接種用のベクターとして非常に有用であり得ることが示唆された(Caley et al., 1997)。

40

【0139】

更なる実施形態では、キメラCD154をコードする核酸は、特異的結合リガンドを発現するように改変された感染性ウイルス内に収容されている。したがって、ウイルス粒子は標的細胞の同種の受容体に特異的に結合し、内容物を細胞に送達する。ラクトース残基をウイルスエンベロープに化学付加することによる、レトロウイルスの化学修飾に基づき、レトロウイルスベクターを特異的に標的化することができるよう設計された新規のアプローチが、近年開発された。この修飾により、シアロ糖タンパク質受容体を介して、肝細胞の特異的感染を可能にすることができる。

50

## 【0140】

例えば、レトロウイルスエンベロープタンパク質、及び特異的細胞受容体に対するピオチン化抗体を使用する、組み換えレトロウイルスの標的化が設計された。ストレプトアビジンを使用して、ピオチン構成成分を介して抗体を結合した (Roux et al., 1989)。主要組織適合性複合体クラスI及びクラスII抗原に対する抗体を使用すると、これらは、同種指向性ウイルスを有するこれらの表面抗原を有する様々なヒト細胞の、インビトロでの感染を示した (Roux et al., 1989)。

## 【0141】

## 2. 制御因子

本開示において有用なベクターに含まれる発現カセットは具体的に、(5'から3'方向に)タンパク質コード配列に作用可能に結合した真核細胞転写プロモーター、介在配列を含むスプライスシグナル、及び、転写終結/ポリアデニル化配列を含有する。真核細胞内で遺伝子をコードするタンパク質の転写を制御するプロモーター及びエンハンサーは、複数の遺伝因子で構成される。細胞の機構は、各要素により運ばれる制御情報を集めて一体化させることが可能であり、これにより、異なる遺伝因子が異なる、多くの場合は複雑な、転写制御パターンを進化させることを可能にする。本発明の文脈で使用されるプロモーターとしては、体質性、誘導性、及び組織特異的プロモーターが挙げられる。

## 【0142】

## a. プロモーター/エンハンサー

本明細書において提供する発現構築物は、癌抑制因子、及び/又は細胞外マトリックス分解性遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含む。プロモーターは一般に、RNA合成の開始部位を位置決めするように機能する配列を含む。この最も知られた例はTATAボックスであるが、例えば、哺乳動物の末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子用のプロモーター、及びSV40後期遺伝子用のプロモーターなどTATAボックスを欠くいくつかのプロモーターにおいては、それ自体の開始部位に重なっている個別の因子が、開始位置を固定するのに役立つ。追加のプロモーター因子は、転写開始の頻度を制御する。典型的には、開始部位の30-110bp上流の領域にこれらは位置するものの、多数のプロモーターが、同様に、開始部位の顆粒に、機能因子を含有することが示されている。コード配列を、プロモーター「の制御下」に置くためには、転写リーディングフレームの転写開始位置の5'末端を、選択したプロモーターの「下流」(即ち、3')に配置する。「上流」プロモーターは、DNAの転写を刺激し、コードされたRNAの発現を促進する。

プロモーター因子間の間隔は多くの場合柔軟であるため、因子が互いに反転する、又は移動する場合、プロモーター機能は保存される。

## 【0143】

tkプロモーターにおいて、プロモーター因子間の間隔は、活性が低下し始める前に増加させて、50bpまで離すことができる。プロモーターに応じて、個々の因子は共同して、又は独立してのいずれかで、転写を活性化するように機能することができるのである。プロモーターは、「エンハンサー」と共に使用してもよく、又はしなくてもよく、これは、核酸配列の転写活性化に関与する調節配列のcis作用を意味する。

## 【0144】

プロモーターは、コードするセグメント及び/又はエクソンの上流に位置する、5'非コード配列を単離することにより入手することができる、核酸配列と自然に関連しているものであってもよい。このようなプロモーターは「内在性」と呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、核酸配列と自然に関連している、その配列の上流又は下流のいずれかに位置するものであることができる。あるいは、コードする核酸セグメントを、その自然環境において、通常核酸配列と関連していないプロモーターを意味する、組み換え又は異種プロモーターの制御下に配置することにより、ある種の利点を得られる。組み換え又は異種エンハンサーとは、その自然環境において、通常核酸配列と関連していないエンハンサーもまた意味する。このようなプロモーター又はエンハンサーとしては、他の遺伝子の

プロモーター又はエンハンサー、並びに、任意の他のウイルス、又は原核細胞若しくは真核細胞から単離したプロモーター又はエンハンサー、並びに、「自然に存在」しない、即ち、異なる転写制御因子領域の異なる因子、及び/又は発現を変える変異を含有するプロモーター又はエンハンサーを挙げることができる。例えば、組み換えDNA構築物にて最も一般的に用いられるプロモーターとしては、 $\lambda$ -ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)、ラクトース、及びトリプトファン(trp)プロモーター系が挙げられる。プロモーター及びエンハンサーの核酸配列を合成により作製することに加えて、配列は、開示された組成物と共に、PCR(商標)を含む、組み換えクロニング、及び/又は核酸増幅技術を使用して、作製することができる(例えば、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第4,683,202号、及び同第5,928,906号を参照のこと)。更に、ミトコンドリア、クロロプラストなどの非核オルガネラ内での、配列の直接転写及び/又は発現を指令する調節配列も、同様に使用できると想到されている。

10

## 【0145】

本来は、発現のために選択されるオルガネラ、細胞型、組織、器官、又は生命体内でDNAセグメントの発現を効率的に指令する、プロモーター及び/又はエンハンサーを用いることが重要である。分子生物学の当業者は一般に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、及び細胞型の組み合わせの使用を理解している(例えば、参照により本明細書に組み込まれている Sambrook et al., 1989を参照のこと)。用いられるプロモーターは、導入されたDNAセグメントの高度な発現を指令するのに適切な条件下において、体質性、組織特異的、誘導性であることができる、かつ/又は、有用であることができ、例えば、大規模な組み換えタンパク質及び/又はペプチド産生にて有利である。プロモーターは異種又は内在性であることができる。

20

## 【0146】

更に、任意のプロモーター/エンハンサーの組み合わせ(例えば、ワールドワイドウェブepd.isb-sib.ch/による、Eukaryotic Promoter Data Base EPDBによる)もまた、発現を駆動するために使用することができる。T3、T7、又はSP6細胞質発現系を使用することは、可能性のある別の実施形態である。真核細胞は、適切な細菌ポリメラーゼが、送達複合体の一部として、又は追加の遺伝発現構築物としてのいずれかとして提供される場合、特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持することができる。

30

## 【0147】

プロモーターの非限定例としては、初期又は後期ウイルスプロモーター、例えば、SV40初期又は後期プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)前初期プロモーター、Rous肉腫ウイルス(RSV)初期プロモーター;真核細胞プロモーター、例えば、アクチンプロモーター(Ng, 1989; Quitsche et al., 1989)、GADPHプロモーター(Alexander et al., 1988, Ercolani et al., 1988)、メタロチオネインプロモーター(Karin et al., 1989; Richards et al., 1984)など;並びに、最小のTATAボックス付近の、連鎖応答因子プロモーター、例えば環式AMP応答因子プロモーター(cre)、血清応答因子プロモーター(sre)、ホルボールエステルプロモーター(TPA)、及び応答因子プロモーター(tre)が挙げられる。ヒト成長ホルモンプロモーター配列(例えば、Genbank寄託番号X05244,ヌクレオチド283-341に記載されている、ヒト成長ホルモン最小プロモーター)、又は、マウス乳癌プロモーター(ATCC、カタログ番号ATCC 45007から入手可能)を使用することもまた、可能である。特定の実施形態において、プロモーターはCMV IE、デクチン1、デクチン2、ヒトCD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad MLP、アクチン、MHCクラスI又はMHCクラスIIプロモーターであるが、p53、MDA-7、及び/又はリラキシン遺伝子の発現を駆動するのに有用な、任意の他のプロモーターが、本発明を実施するのに適用可能である。

40

## 【0148】

50



を含めることで、インビトロ又はインビボで同定することができる。このようなマーカーは、細胞に特定可能な変化を付与し、発現ベクターを含有する細胞の同定を容易にする。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする性質を付与するマーカーである。ポジティブ選択マーカーは、マーカーが存在することにより選択を可能にするマーカーである一方、ネガティブ選択マーカーは、マーカーが存在することで選択を防止するマーカーである。ポジティブ選択マーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

【0154】

通常、薬物選択マーカーを含めることで、形質転換細胞、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシンに対する耐性を付与する遺伝子の、クローニング及び同定が補助され、ヒスチジノールが有用な選択マーカーである。条件の導入に基づき、形質転換細胞の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、スクリーニング可能なマーカー、例えば、ベースが比色分析である、GFPなどの他の種類のマーカーもまた、想到される。あるいは、単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ(tk)、又はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)などの、ポジティブ選択マーカーとしてスクリーニング可能な酵素を、利用することができる。当業者は、場合によりFACS分析と共に、免疫性マーカーを用いるノウハウについても知っているであろう。使用するマーカーは、遺伝子産物をコードする核酸を同時に発現することが可能である限り、重要であるとは考えられない。選択及びスクリーニング可能なマーカーの更なる例は、当業者に周知である。

10

【0155】

20

B. 核酸送達の他の方法

癌抑制因子、及び/又は細胞外マトリックス分解性遺伝子をコードする核酸のウイルス送達に加えて、以下が、所与の宿主細胞に組み換え遺伝子を送達する更なる方法であり、それ故、本開示の範囲内とみなされる。

【0156】

DNA又はRNAなどの核酸の導入には、本明細書に記載されている、又は、当業者に知られているであろう、細胞を形質転換するために核酸を送達する、任意の好適な方法を用いることができる。このような方法としては、エキスピトランスフェクションなどによる、DNAの直接送達(Wilson et al., 1989, Nabel et al., 1989); マイクロインジェクション(Harland and Weintraub, 1985; 米国特許第5,789,215号、参照により本明細書に組み込まれている)を含む、注入によるもの(米国特許第5,994,624号、同第5,981,274号、同第5,945,100号、同第5,780,448号、同第5,736,524号、同第5,702,932号、同第5,656,610号、同第5,589,466号、及び同第5,580,859号、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている); 電気穿孔法によるもの(参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5,384,253号; Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984); リン酸カルシウム沈殿によるもの(Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990); DEAE-デキストランの後にポリエチレングリコールを用いることによるもの(Gopal, 1985); 直接音波装填(Fechheimer et al., 1987); リポソーム媒介トランスフェクション(Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991)及び受容体媒介トランスフェクション(Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988)によるもの; マイクロ噴出性ボンバードメント(PCT出願国際公開第94/09699号及び同第95/06128号; 米国特許第5,610,042号、同第5,322,783号、同第5,563,055号、同第5,550,318号、同第5,538,877号、及び同第5,538,880号、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている)によるも

30

40

50

の；炭化ケイ素繊維を用いる攪拌（Kaeppler et al. , 1990；米国特許第5,302,523号及び同第5,464,765号、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている）によるもの；アグロバクテリウム-媒介形質転換（米国特許第5,591,616号、及び同第5,563,055号、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている）によるもの；乾燥/阻害-媒介DNA取り込み（Potrykus et al. , 1985）によるもの、並びにこのような方法の任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。これらのような技術を応用することで、オルガネラ、細胞、組織、又は生命体を安定して、又は一過的に形質転換することができる。

#### 【0157】

##### 1. 電気穿孔法

本開示のある種の特定の実施形態において、遺伝子構築物を、電気穿孔法により標的の増殖過剰細胞に導入する。電気穿孔法は、細胞（又は組織）及びDNA（又はDNA複合体）を、高電圧放電に曝すことを伴う。

#### 【0158】

電気穿孔法を用いる真核細胞のトランスフェクションは、極めて上手くいっている。この方法で、マウスのプレBリンパ球にはヒト - 免疫グロブリン遺伝子がトランスフェクションされ（Potter et al. , 1984）、ラット肝細胞には、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子がトランスフェクションされている（Tur-Kaspa et al. , 1986）。

#### 【0159】

異なる源からの増殖過剰細胞に対する電気穿孔法条件を最適化することができることが想到されている。電圧、静電容量、時間、及び電気穿孔法用の媒体の組成などのパラメータを特に最適化したいと望むかもしれない。他の日常的な調節を実行することは、当業者に既知であろう。例えば、Hoffman, 1999；Heller et al. , 1996を参照のこと。

#### 【0160】

##### 2. 脂質媒介形質転換

更なる実施形態において、癌抑制因子、及び/又は細胞外マトリックス分解性遺伝子は、リポソーム又は脂質製剤にトラップすることができる。リポソームは、リン脂質二重層の膜、及び内部の水性媒体を特徴とする小胞構造体である。マルチメラリポソームは、水性媒体により分離された複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質が過剰な水溶液に懸濁するとき、自然に形成される。脂質成分は、閉じた構造を形成する前に自己再編成を受け、脂質二重層の間で、水と溶解した溶質をトラップする（Ghosh and Bachhawat, 1991）。リポフェクタミン（Gibco BRL）と複合体化した遺伝子構築物もまた想到される。

#### 【0161】

脂質が媒介する核酸の送達、及びインビトロでの、外来DNAの発現は、非常に上手くいっている（Nicolau and Sene, 1982；Fraleley et al. , 1979；Nicolau et al. , 1987）。培養した鶏胚、ヒーラー及び肝癌細胞での、脂質が媒介する外来DNAの送達及び発現の可能性を、Wong et al. (1980)は示した。

#### 【0162】

脂質ベースの非ウイルス製剤は、アデノウイルス遺伝子治療法に対する代替物を提供する。多くの細胞培養研究が、脂質ベースの非ウイルス遺伝子導入について記録を残しているが、脂質ベース製剤による全身性遺伝子導入は制限されている。非ウイルス性脂質ベースの遺伝子導入における主な制限は、非ウイルス性送達ビヒクルを含む陽イオン性脂質の毒性である。リポソームのインビボ毒性は特に、インビトロとインビボでの遺伝子導入結果での矛盾について説明している。この矛盾するデータの一因となる別の因子は、血清タンパク質の有無における脂質ビヒクルの安定性の差である。脂質ビヒクルと血清タンパク質との相互作用は、脂質ビヒクルの安定性の性質に劇的な影響を有する（Yang an

10

20

30

40

50

d Huang, 1997)。陽イオン性脂質は、負電荷を帯びる血清タンパク質を引きつけて結合する。血清タンパク質と会合した脂質ビヒクルは、マクロファージに溶解するか、マクロファージにより取り込まれるかのいずれかであり、これにより、血液循環から取り除かれる。現在のインビポ脂質送達法は、皮下、皮内、腫瘍内、又は頭蓋内注射を用い、血液循環中で陽イオン性脂質と関連する毒性及び安定性の問題を回避する。脂質ビヒクルと血漿タンパク質との相互作用が、インビポでの効率 (Felgner et al., 1987) と、インビポでの遺伝子導入 (Zhu et al., 1993; Philip et al., 1993; Solodin et al., 1995; Liu et al., 1995; Thierry et al., 1995; Tsukamoto et al., 1995; Akseptijevich et al., 1996) との不一致の原因である。

10

#### 【0163】

脂質製剤の進展により、インビポでの遺伝子導入の効率が改善した (Templeton et al., 1997; 国際公開第 98/07408 号)。当モル比の 1, 2 - ビス (オレオイルオキシ) - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン (DOTAP) とコレステロールで構成される新規の脂質製剤は、インビポでの全身性遺伝子導入を著しく、約 150 倍向上させる。DOTAP: コレステロール脂質製剤は、「サンドイッチリボソーム」と呼ばれる独自の構造を形成する。この製剤は、陥入した二重層、即ち「つぼ」構造の間に DNA を「サンドイッチする」と報告されている。これらの脂質構造の有益な特徴としては、正の、コレステロールによるコロイド安定化、2 次元 DNA パッキング、及び増加した血清安定性が挙げられる。特許出願第 60/135, 818 号及び同第 60/133, 116 号は、本発明と共に使用可能な製剤について論じている。

20

#### 【0164】

脂質製剤の製造は多くの場合、(I) 逆相蒸発、(II) 脱水 - 再水和、(III) 洗剤での透析、及び (IV) 薄膜水和後に、リポソーム混合物の音波処理又は連続押出形成により達成される。製造されると、脂質構造を使用して、血液循環中にあるときに、毒性のある (化学療法)、又は不安定な (核酸) 化合物を封入することができる。脂質の封入により、低い毒性、及び、そのような化合物に対する、血清の長い半減期がもたらされる (Gabizon et al., 1990)。多数の病気の治療では、脂質ベースの遺伝子導入法を用い、特に、増殖過剰病を治療するための治療法において、従来の治療法を向上させる、又は、新規の治療法を確立する。

30

#### 【0165】

##### V. 選択性 CD122 / CD132 アゴニスト

特定の態様において、対象には、CD122 / CD132 受容体複合体に選択的に結合し、CD25 又は IL15 受容体に対して低い親和結合を有する CD122 / CD132 アゴニストなどの、少なくとも 1 種の CD122 / CD132 アゴニストが投与される。CD122 / CD132 は、野生型 IL2 と比較して、修飾されたアミノ酸配列を有する遺伝子組み換えされた IL-22 ムテインから選択することができる (米国特許出願公開第 2017/0044229 号; その全体が参照により組み込まれている)。特定の態様において、選択性 CD122 / CD132 アゴニストは、IL-2 / 抗 IL-2 モノクローナル抗体免疫複合体 (米国特許出願公開第 20170183403 A1 号; その全体が参照により組み込まれている)、又は、抗 IL2 モノクローナル抗体免疫複合体と組み合わせた野生型 IL-2 と比較して、修飾されたアミノ酸配列を有する、遺伝子組み換え IL-2 ムテイン (国際公開第 2014100014 A1 号; その全体が参照により組み込まれている)、NKTR-214 などの、IL2 の PEG 化形態 (Charych et al., 2016)、IL15 / 抗 IL15 モノクローナル抗体免疫複合体、IL15 / IL15 受容体 - IgG1 - Fc (IL15 / IL15R - IgG1 - Fc) 免疫複合体 (米国特許出願公開第 20060257361 A1 号、欧州特許出願公開第 2724728 A1 号、及び Dubois et al., 2008)、IL15R - IgG1 - Fc 免疫複合体と組み合わせた野生型 IL-15 と比較して、修飾されたアミノ酸

40

50

配列を有する遺伝子組み換えIL-15ムテイン(米国特許出願公開第20070160578号;その全体が本明細書に組み込まれている)、又は、CD122/CD132に選択的に結合する、IL15のPEG化形態である。いくつかの実施形態では、2種以上のCD122/CD132アゴニストを利用する。

【0166】

VI. 腫瘍崩壊ウイルス

いくつかの態様では、本開示は、少なくとも1種の腫瘍崩壊ウイルスを投与することを含む。いくつかの態様では、腫瘍崩壊ウイルスは、p53、MDA-7、IL-12、TGF-阻害剤、ADP、及び/又はIL-10阻害剤を発現するように改変されている。特定の態様において、腫瘍崩壊ウイルスは、一本鎖若しくは二本鎖DNAウイルス、RNAウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ポリオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、粘液腫ウイルス、マラバウイルス、ラブドウイルス、エナデノチュシレブ、又はコクサッキーウイルスである。いくつかの態様では、腫瘍崩壊ウイルスは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)又はIL-12を発現するように改変されている。いくつかの態様では、腫瘍崩壊ウイルスは更に、タリモジーン・ラハーパレブベック(T-VEC)として定義される。いくつかの態様では、腫瘍崩壊アデノウイルスベクターは、改変TERTプロモーター腫瘍崩壊アデノウイルス(米国特許第8,067,567号;その全体が本明細書に参照により組み込まれている)、及び/又は、HRE-E2F-TERTハイブリッドプロモーター腫瘍崩壊アデノウイルス(PCT/KR2011/004693;その全体が本明細書に参照により組み込まれている)、及び/又は、改変E1a調節配列を有するアデノウイルスであって、少なくとも1つのPea3結合部位、又はその機能性部分が、E1b-19Kクローン挿入部位により欠損している、アデノウイルス(欧州特許出願公開第2403951A2号;その全体が本明細書に参照により組み込まれている)に由来し、これら全てを改変して、治療用遺伝子を発現することができる。いくつかの態様では、腫瘍崩壊アデノウイルスベクターは、E1b欠失腫瘍崩壊アデノウイルスに由来する(Yu and Fang, 2007; Li, 2009; これら両方の全体が参照により組み込まれている)。

【0167】

例示的な腫瘍崩壊ウイルスとしては、Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12、Cavatank(商標)、CG0070、DNX-2401、G207、HF10、IMLYGIC(商標)、JX-594、MG1-MA3、MV-NIS、OBP-301、Reolysin(登録商標)、Toca 511、Oncorine、RIGVIR、VirRx007のような、米国特許第7589069B1号(その全体が参照により組み込まれている)に記載されている、アデノウイルス死タンパク質(ADP)を過剰発現するアデノウイルス、PCT/GB2015/051023(その全体が参照により組み込まれている)に記載されている、IL12を発現するN1L欠失ワクシニアウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。他の例示的な腫瘍崩壊ウイルスは、例えば、国際公開第2015/027163号、同第2014/138314号、同第2014/047350号、及び同第2016/009017号に記載されており、全てが参照により本明細書に組み込まれている。

【0168】

特定の態様において、腫瘍崩壊ウイルス剤は、GM-CSFを発現するように遺伝子組み換えされた腫瘍崩壊単純ヘルペスウイルスである、タリモジーン・ラハーパレブベック(T-VEC)である。タリモジーン・ラハーパレブベックである、HSV-1[株JS1]ICP34.5-/ICP47-/hGM-CSF(OncovEX<sup>GM-CSF</sup>として以前は知られていた)は、充実性腫瘍にて選択的に複製する免疫増強HSV-1を含む、腫瘍内に送達される腫瘍崩壊性免疫療法である。(Lui et al., 2003; 米国特許第7,223,593号、及び同第7,537,924号;参照により本明細

10

20

30

40

50

書に組み込まれている。) 2015年10月に、アメリカのFDAは、手術不可能な腫瘍を持つ患者における黒色腫の治療のために、商品名IMLYGIC(商標)にて、T-VECを認可した。T-VECの特徴及び投与方法は例えば、IMLYGIC(商標)の添付文書(Amgen, 2015)、及び米国特許出願公開第2015/0202290号(両方が参照により本明細書に組み込まれている)に記載されている。例えば、タリモジーン・ラハーパーレブベックは典型的には、1週目の1日目に、最大4.0mLの、 $10^6$  プラーク形成ユニット/mL(PFU/mL)の用量で、続いて、4週目の1日目、及びその後隔週にて( $\pm 3$ 日)、最大4.0mLの、 $10^8$  PFU/mLの用量で、注射可能な皮膚、皮下、及び結節腫瘍への腫瘍内注射により投与される。腫瘍に注射されるタリモジーン・ラハーパーレブベックの、推奨される体積は、腫瘍サイズに左右され、注入量ガイドラインに従い決定されなければならない。T-VECは、黒色腫患者において臨床活性を示したものの、多くの癌患者は、T-VEC治療に応答しないか、又は治療への応答を終えるかのいずれかである。一実施形態では、p53及び/又はMDA-7核酸、並びに少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストを、T-VEC治療法の後、間、又は前に投与して、例えば治療耐性を逆転させることができる。

10

**【0169】**

いくつかの実施形態では、E1b欠損腫瘍崩壊アデノウイルスを、少なくとも1種の選択性CD122/CD132アゴニスト、及び少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせる。例示的なE1b欠損腫瘍崩壊アデノウイルスは、熱ショックタンパク質70(HSP70)を発現する、H101(Oncorine)、Onyx 015、若しくはH103、又は、Ad E1a遺伝子の発現が $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)プロモーターにより駆動され、通常の細胞と比較して、肝細胞癌、及びその他の、AFPを過剰発現する癌における、選択的な複製をもたらす腫瘍崩壊アデノウイルスH102である(Yu and Fang, 2007; Li, 2009; これら両方の全体が参照により組み込まれている)。

20

**【0170】**

本発明中で使用するための、更なる例示的なCD122/CD132アゴニストとしては、下表2に記載する作用物質が挙げられるが、これらに限定されない。

【表 2 - 1】

CD122/CD132 アゴニスト	会社	説明
NKTR-214	Nektar Therapeutics	CD122 (IL-2R $\beta$ ) 偏向PEG化IL-2
ALT-803	Altor Bioscience	変異IL-15/IL-15R $\alpha$ 融合タンパク質; IL-15の半減期増加を目的とする、安定したヘテロ二量体
RG7461	Roche	線維芽細胞活性化タンパク質 $\alpha$ /IL-2多様体融合タンパク質; CD25 (IL-2R $\alpha$ ) 結合の消失;
XmAb24306	Xencor-Roche/Genentech	Xencor製二重特異的Fcドメインで改変された、IL-15/IL-15R $\alpha$ サイトカイン複合体
テレウキン	Philogen	F16抗体/IL-2融合タンパク質
ALKS 4230	Alkermes	IL-2/CD25 (IL-2R $\alpha$ ) 融合タンパク質; 立体障害によりCD25 (IL-2R $\alpha$ ) 結合が消失
セルグツズマブアムナロイキン (RG7813)	Roche	CEA MA b/IL-2 $\nu$ 融合タンパク質; CD25 (IL-2R $\alpha$ ) 結合が消失;
NHS-IL2-LT/EMD 521873	Merck KGaA	IL-2/Ab融合タンパク質; 作用物質を、腫瘍壊死及びアポトーシスの領域に向けてることを意味するAb部分
NIZ985	Novartis	IL15/可溶性IL-15R $\alpha$ 二量体
Thor 707	Synthorx	IL-2ムテイン; 部位特異的PEG化により、CD25 (IL-2R $\alpha$ ) 結合が消失
IL-15 Synthorin	Synthorx	部位特異的PEG化により差異化された性質を有する、IL-15 Synthorin
MDNA109	Medicenna Therapeutics	IL-2ムテイン; IL-2の増強版
MultiPharm	Nascent Therapeutics	IL-2/mAb複合体; CD25 (IL-2R $\alpha$ ) 結合の消失;
PB101	Pivotal Biosciences	低毒性IL-2類似体; プロロイキンの血管漏出症候群毒性を無効化することを目的とする
抗IL-2プログラム	Xoma	IL-2/mAb複合体; mAbはIL-2を、効果増強のために指令する;
CT101-IL2	Courier Therapeutics	牛痘OMCPを使用して、IL-2 (ムテイン) をNKGD2受容体に再度標的化する; IL-2を、効果増強のために指令する
Neo-2/15	Neoluekin Therapeutics	IL-2の増強版; CD25 (IL-2R $\alpha$ ) 結合の消失;

10

20

30

40

【表 2 - 2】

NKTR-255	Nektar Therapeutics	IL-15R $\alpha$ 特異的アゴニスト; IL-15R $\alpha$ (CD215) / IL-2R $\gamma$ (CD132) 複合体をかみ合わせることを目的とする
P22339	Shanghai Hengrui	IL-15R $\alpha$ 特異的アゴニスト; IL-15R $\alpha$ (CD215) / IL-2R $\gamma$ (CD132) 複合体をかみ合わせることを目的とする
CYP 0150	Cytunepharm	IL-15R $\alpha$ のSushiドメインに結合したIL-15; IL-15R $\alpha$ (CD215) 切断を無効化することを目的とする
AM0015	Armo Biosciences	rhIL-15

略語: MA b =モノクローナル抗体; A b =抗体; r =組み換え; h =ヒト;  
R $\alpha$  =受容体 $\alpha$ ;

## 【0171】

## VII. 免疫チェックポイント阻害剤

特定の実施形態において、本開示は、免疫チェックポイントの遮断を、p53及び/又はMDA-7遺伝子治療法などの、癌抑制遺伝子療法と組み合わせる方法を提供する。免疫チェックポイントとは、シグナルを上げる、又はシグナルを下げるいずれかを行う、免疫系内の分子(例えば、共刺激分子)である。チェックポイント分子の遮断によって標的とされ得る阻害性免疫チェックポイントとしては、アデノシンA2A受容体(A2AR)、B7-H3(CD276としても知られる)、B及びTリンパ球アテニューエーター(BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4、CD152としても知られる)、インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)、キラー細胞免疫グロブリン(KIR)、リンパ球活性化遺伝子-3(LAG3)、プログラム死1(PD-1)、T細胞免疫グロブリンドメイン及びムチンドメイン3(TIM-3)及びT細胞活性化(VISTA)のV-ドメインIgサブレッサーが挙げられる。特に、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1軸及び/又はCTLA-4を標的とする。

## 【0172】

免疫チェックポイント阻害剤は、リガンド又は受容体の低分子組換え形態などの薬剤であってもよく、又は特に、抗体、例えば、ヒト抗体である(例えば、国際公開第2015016718号; Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4):252-64, 2012; 共に本明細書に参照により組み込まれる)。免疫チェックポイントタンパク質の既知の阻害剤、又はその類似体を使用することができ、特に、抗体のキメラ化、ヒト化、又はヒト形態を使用することができる。当業者は知っているだろうが、本開示で述べられる特定の抗体について、代替的及び/又は等価な名称が使用される場合がある。このような代替的及び/又は等価な名称は、本発明の内容において相互に置き換え可能である。例えば、ラムプロリズマブは、代替的及び等価な名称でMK-3475及びペンプロリズマブとしても知られていることが知られている。

## 【0173】

免疫応答を刺激する、当技術分野において既知の免疫チェックポイント阻害剤のいずれかを使用することができることが想到されている。これには、抗原特異的Tリンパ球を直接、又は間接的に刺激又は増強する阻害剤が含まれる。これらの免疫チェックポイント阻害剤としてはPD-L2、LAG3、BTLA、B7H4、及びTIM3に關与する免疫チェックポイントタンパク質及び経路を標的化する作用物質が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、当該技術分野において公知のLAG3阻害剤としては、可溶性LAG3(国際公開第2009044273号に開示されている、IMP321又はLAG3-Ig)、並びに、ヒトLAG3を遮断するマウス若しくはヒト化抗体(例えば、国際公

10

20

30

40

50

開第2008132601号に開示されているIMP701)、又は、ヒトLAG3を遮断する完全ヒト抗体(欧州特許第2320940号に開示されているものなど)が挙げられる。別の例は、ヒトBTLAの、そのリガンドとの相互作用を遮断する抗体(国際公開第2011014438に開示されている4C7など)が挙げられるが、これに限定されない、BTLAに対して遮断剤を用いることにより提供される。更に別の実施例は、ヒトB7H4に対する抗体(国際公開第2013025779号、及び同第2013067492号に開示されている)、又は、B7H4の可溶性組み換え形態(米国特許出願公開第20120177645に開示されているものなど)を含むがこれらに限定されない、B7H4を中和する作用物質を使用することにより、提供される。更に別の例は、ヒトB7-H3を中和する抗体(例えば、米国特許出願公開第20120294796号において、BRCA84Dとして開示されているMGA271、及び誘導體類)を含むがこれに限定されない、B7-H3を中和する作用物質により、提供される。更に別の例は、ヒトTIM3を標的化する抗体(例えば、国際公開第2013006490A2号に開示されているもの、又は、Jones et al., J Exp Med. 2008; 205(12): 2763-79により開示されている、抗ヒトTIM3遮断抗体F38~2E2)を含むがこれに限定されない、TIM3を標的化する作用物質により提供される。

#### 【0174】

更に、2種以上の免疫チェックポイント阻害剤(例えば、抗PD-1抗体及び抗CTLA-4抗体)を、癌抑制遺伝子と組み合わせて使用することができる。例えば、p53遺伝子治療及び免疫チェックポイント阻害剤(例えば、抗KIR抗体及び/又は抗PD-1抗体)を投与して、先天性抗腫瘍免疫を増強させ、その後、IL24遺伝子治療法及び免疫チェックポイント阻害剤(例えば、抗PD-1抗体)を投与して、適応性抗腫瘍免疫応答を誘発することができる。

#### 【0175】

##### A. PD-1軸アンタゴニスト

T細胞の機能障害又はアネルギーは、阻害性受容体であるプログラム細胞死1ポリペプチド(PD-1)の発現の誘発及び維持と同時に生じる。したがって、プログラム細胞死リガンド1(PD-L1)及びプログラム細胞死リガンド2(PD-L2)などの、PD-1、及び、PD-1との相互作用によりシグナル伝達をする他の分子の治療標的化を、本明細書において提供する。PD-L1は多くの癌で過剰発現し、多くの場合、予後不良と関連している(Okazaki T et al., Intern. Immun. 2007 19(7): 813)。したがって、例えば、腫瘍のCD8<sup>+</sup>T細胞が媒介する殺傷を増強するための、p53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法と組み合わせた、PD-L1/PD-1相互作用の阻害を、本明細書において提供する。

#### 【0176】

個体における、癌を治療する、又は癌の進行を遅延させる方法であって、当該個体に、有効量の、p53、ADP(VirRx007)、及び/又はMDA-7遺伝子治療法と組み合わせたPD-1軸結合アンタゴニストを投与することを含む、方法を本明細書において提供する。免疫機能の増強を必要とする個体における、免疫機能を増強する方法であって、当該個体に、有効量の、PD-1軸結合アンタゴニスト、並びに、p53、ADP(VirRx007)、及び/又はMDA-7遺伝子治療法を投与することを含む、方法もまた、本明細書において提供する。

#### 【0177】

例えば、PD-1軸結合アンタゴニストとしては、PD-1結合アンタゴニスト、PDL1結合アンタゴニスト、及びPDL2結合アンタゴニストが挙げられる。「PD-1」の代替名としては、CD279及びSLEB2が挙げられる。「PDL1」の代替名としては、B7-H1、B7-4、CD274、及びB7-Hが挙げられる。「PDL2」の代替名としては、B7-DC、Btdc、及びCD273が挙げられる。いくつかの実施形態において、PD-1、PDL1、及びPDL2は、ヒトPD-1、PDL1、及びPDL2である。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 8 】

いくつかの実施形態では、PD - 1 結合アンタゴニストは、PD - 1 のそのリガンド結合パートナーへの結合を阻害する分子である。具体的な態様では、PD - 1 リガンド結合パートナーは、PDL 1 及び / 又は PDL 2 である。別の実施形態では、PDL 1 結合アンタゴニストは、PDL 1 の、その結合パートナーへの結合を阻害する分子である。具体的な態様では、PDL 1 結合パートナーは、PD - 1 及び / 又は B7 - 1 である。別の実施形態では、PDL 2 結合アンタゴニストは、PDL 2 の、その結合パートナーへの結合を阻害する分子である。特定の態様において、PDL 2 結合パートナーは PD - 1 である。アンタゴニストは、抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、又はオリゴペプチドであることができる。例示的な抗体は、米国特許第 8735553 号、同第 8354509 号、及び同第 8008449 号に記載されており、全てが参照により本明細書に組み込まれている。米国特許出願公開第 20140294898 号、同第 2014022021 号、及び同第 20110008369 号（全てが参照により本明細書に組み込まれている）に記載されているものなどの、本明細書において提供する方法に使用するのためのその他の PD - 1 軸アンタゴニストが、当技術分野において既知である。

10

## 【 0 1 7 9 】

いくつかの実施形態では、PD - 1 結合アンタゴニストは、抗 PD - 1 抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体）である。いくつかの実施形態では、抗 PD - 1 抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ及び CT - 011 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、PD - 1 結合アンタゴニストは、イムノアドヘシン（例えば、定常領域（例えば、免疫グロブリン配列の Fc 領域）に融合した PDL 1 又は PDL 2 の細胞外又は PD - 1 結合部分を含むイムノアドヘシンである。いくつかの実施形態では、PD - 1 結合アンタゴニストは AMP - 224 である。ニボルマブは、MDX - 1106 - 04、MDX - 1106、ONO - 4538、BMS - 936558 及び OPDIVO（登録商標）としても知られており、国際公開第 2006 / 121168 号に記載されている抗 PD - 1 抗体である。ペンブロリズマブは、MK - 3475、Merck 3475、ラムブロリズマブ、KEYTRUDA（登録商標）及び SCH - 900475 としても知られており、国際公開第 2009 / 114335 号に記載されている抗 PD - 1 抗体である。CT - 011 は、hBAT 又は hBAT - 1 としても知られており、国際公開第 2009 / 101611 号に記載されている抗 PD - 1 抗体である。AMP - 224 は、B7 - DCIg としても知られており、国際公開第 2010 / 027827 号、及び同第 2011 / 066342 号に記載されている PDL 2 - Fc 融合可溶性受容体である。更なる PD - 1 結合アンタゴニストとしては、CT - 011 としても知られているビディリズマブ、AMP - 514 としても知られている MEDI 0680、及び REGN 2810 が挙げられる。

20

30

## 【 0 1 8 0 】

いくつかの態様では、免疫チェックポイント阻害剤は、MEDI 4736 としても知られているデュルバルマブ、MPDL 3280A としても知られているアテゾリズマブ、又は、MSB 00010118C としても知られているアベルマブなどの PD - L1 アンタゴニストである。特定の態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、rHlgM12 B7 などの PD - L2 アンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫チェックポイント阻害剤は、限定されるわけではないが、IMP 321 及び BMS - 986016 などの LAG - 3 アンタゴニストである。免疫チェックポイント阻害剤は、PBF - 509 などの、アデノシン A2a 受容体（A2aR）アンタゴニストであることができる。

40

## 【 0 1 8 1 】

いくつかの態様では、本明細書に記載される抗体（例えば、抗 PD - 1 抗体、抗 PDL 1 抗体、又は抗 PDL 2 抗体）は、ヒト又はマウス定常領域を更に含む。また更なる態様において、ヒト定常領域は、IgG 1、IgG 2、IgG 2、IgG 3、IgG 4 からなる群から選択される。また更なる特定の態様において、ヒト定常領域は IgG 1 である。また更なる態様において、マウス定常領域は、IgG 1、IgG 2A、IgG 2B、Ig

50

G3からなる群から選択される。また更なる特定の態様において、抗体は、低下した、又は最小のエフェクター機能を有する。また更なる特定の態様において、最小のエフェクター機能は、原核細胞での産生により生じる。また更なる特定の態様において、最小のエフェクター機能は、「エフェクター非含有のFc変異」、即ち非グリコシル化により生じる。

#### 【0182】

したがって、本明細書で使用する抗体を非グリコシル化することができる。抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合又はO結合のいずれかである。N結合とは、炭水化物部位をアスパラギン残基の側鎖に結合することを意味する。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン、及びアスパラギン-X-スレオニン(Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である)は、炭水化物部位をアスパラギン側鎖に、酵素により結合させるための認識配列である。したがって、ポリペプチド内にこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在することにより、潜在的なグリコシル化部位が作製される。O結合グリコシル化とは、糖類のN-アセチルガラクトースアミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの1つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンへの結合を意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンを使用してもよい。アミノ酸配列を、(N-結合グリコシル化部位に対する上述のトリペプチド配列の1つ)が取り除かれるように変更することにより、抗体からのグリコシル化部位の除去が便利に達成される。グリコシル化部位内のアスパラギン、セリン、又はスレオニン残基を、別のアミノ酸残基(例えば、グリシン、アラニン、又は保存的置換)で置換することにより、変更を加えることができる。

10

20

#### 【0183】

例えば、発現に適した形態の、前述した抗PD-L1、抗PD-1、若しくは抗PD-L2抗体、又は抗原結合断片のいずれかをコードする核酸を含有する宿主細胞を、そのような抗体又は断片を作製するのに好適な条件下にて培養することと、抗体又は断片を回収することと、を含むプロセスにより、当該技術分野において既知の方法を使用して、抗体又はその抗原結合断片を作製することができる。

#### 【0184】

##### B. CTLA-4

本明細書で提供される方法で標的にされ得る別の免疫チェックポイントは、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4)であり、CD152としても知られている。ヒトCTLA-4の完全なcDNA配列は、Genbank寄託番号L15006を有する。CTLA-4は、T細胞表面で見出され、抗原提示細胞の表面にあるCD80又はCD86に結合すると、「オフ」スイッチとして作用する。CTLA4は、ヘルパーT細胞の表面で発現し、T細胞に阻害性シグナルを伝える、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。CTLA4は、T細胞共刺激タンパク質、CD28に似ており、両分子は、抗原提示細胞上のCD80及びCD86(それぞれB7-1及びB7-2とも呼ばれる)に結合する。CTLA4は、T細胞に阻害シグナルを伝える一方、CD28は、刺激シグナルを伝える。細胞内CTLA4は、制御性T細胞で見出され、その機能にとって重要な場合がある。T細胞受容体及びCD28によるT細胞活性化によって、B7分子の阻害性受容体であるCTLA-4の発現が増加する。

30

40

#### 【0185】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体(例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体)、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質又はオリゴペプチドである。

#### 【0186】

本発明の方法で使用するのに適した抗ヒト-CTLA-4抗体(又はこれらに由来するVHドメイン及び/又はVLドメイン)は、当該技術分野において周知方法を用いて生成することができる。あるいは、当該技術分野で認識されている抗CTLA-4抗体を使用することができる。例えば、米国特許第8,119,129号、国際公開第01/144

50

24号、同第98/42752号；同第00/37504号（CP675，206、トレメリムマブ；以前のティチリムマブとしてもまた知られている）、米国特許第6,207,156号；Hurwitz et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(17):10067-10071；Camacho et al. (2004) J Clin Oncology 22(145)：要約番号2505（抗体CP-675206）；及びMokyr et al. (1998) Cancer Res 58:5301-5304に開示されている抗CTLA-4抗体を、本明細書で開示される方法で使用することができる。上述の刊行物それぞれの教示は、本明細書に参照により組み込まれる。CTLA-4に対する結合について、これらの当該技術分野で認識されている任意の抗体と競争する抗体も使用可能である。例えば、ヒト化CTLA-4抗体は、国際特許出願公開第2001014424号、同第2000037504号及び米国特許第8017114号に記載されており、全て本明細書に参照により組み込まれている。

10

20

30

40

50

#### 【0187】

例示的な抗CTLA-4抗体は、イピリムマブ（10D1、MDX-010、MDX-101及びYervoy（登録商標）としても知られる）又はその抗原結合フラグメント及び多様体である（例えば、国際公開第01/14424号を参照）。他の実施形態では、抗体は、イピリムマブの重鎖及び軽鎖CDR又はVRを含む。したがって、一実施形態では、抗体は、イピリムマブのVH領域のCDR1、CDR2及びCDR3ドメインと、イピリムマブのVL領域のCDR1、CDR2及びCDR3ドメインとを含む。別の実施形態では、抗体は、上述の抗体と同様に、CTLA-4上の同じエピトープとの結合について競合し、かつ/又はこれに結合する。別の実施形態では、抗体は、上述の抗体と少なくとも約90%の変領域アミノ酸配列同一性を有する（例えば、イピリムマブと少なくとも約90%、95%、又は99%の変領域同一性）。

#### 【0188】

CTLA-4を調整する他の分子としては、米国特許第5844905号、同第5885796号及び国際特許出願公開第1995001994号及び同第1998042752号（全て本明細書に参照により組み込まれる）に記載されるような、CTLA-4リガンド、及び受容体、並びに本明細書に参照により組み込まれる米国特許第8329867号に記載されるようなイムノアドヘンシが挙げられる。

#### 【0189】

#### C. キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）

本発明で使用するための別の免疫チェックポイント阻害剤は、抗KIR抗体である。本発明中で使用するのに好適な抗ヒトKIR抗体（又は、それらに由来するVH/VLドメイン）は、当該技術分野において周知の方法を使用して生成することができる。

#### 【0190】

あるいは、当該技術分野で認識されている抗KIR抗体を使用することができる。抗KIR抗体は、複数の阻害性KIR受容体と交差反応性であることができ、これらの受容体の1つ以上を有するNK細胞の細胞傷害性を増強する。例えば、抗KIR抗体は、KIR2D2DL1、KIR2DL2、及びKIR2DL3のそれぞれに結合することができ、これらのKIRのいずれかにより媒介されるNK細胞細胞傷害性の阻害を低下させる、中和する、及び/又は逆転させることにより、NK細胞活性を増強することができる。いくつかの態様では、抗KIR抗体はKIR2DS4及び/又はKIR2DS3に結合しない。例えば、国際公開第2006/003179号（その教示が参照により本明細書に組み込まれている）に記載されている、モノクローナル抗体1-7F9（IPH2101としても知られている）、14F1、1-6F1、及び1-6F5を使用することができる。KIRに対する結合について、これらの当該技術分野で認識されている任意の抗体と競争する抗体も使用可能である。当該技術分野で使用されている、使用可能な更なる抗KIR抗体としては、例えば、国際公開第2005/003168号、同第2005/009465号、同第2006/072625号、同第2006/072626号、同第2007

/ 0 4 2 5 7 3 号、同第 2 0 0 8 / 0 8 4 1 0 6 号、同第 2 0 1 0 / 0 6 5 9 3 9 号、同第 2 0 1 2 / 0 7 1 4 1 1 号、及び同第 / 2 0 1 2 / 1 6 0 4 4 8 号に記載されているものが挙げられる。

【 0 1 9 1 】

例示的な抗 K I R 抗体はリリルマブである ( B M S - 9 8 6 0 1 5、又は I P H 2 1 0 2 としても知られている ) である。別の実施形態において、抗 K I R 抗体は、リリルマブの、重鎖及び軽鎖相補性決定領域 ( C D R ) 又は可変領域 ( V R ) を含む。したがって、一実施形態において、抗体は、リリルマブの重鎖可変 ( V H ) 領域の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 ドメイン、並びに、リリルマブの軽鎖可変 ( V L ) 領域の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 ドメインを含む。別の実施形態では、抗体は、リリルマブと少なくとも

10

【 0 1 9 2 】

V I I I . 治療方法

個体における、癌を治療する、又は癌の進行を遅延させる方法であって、当該個体に、有効量の、少なくとも 1 種の C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニスト、及び少なくとも 1 種の癌抑制遺伝子治療法 ( 例えば、p 5 3 及び / 若しくは M D A - 7 遺伝子治療法、又はウイルス腫瘍崩壊性治療法 - V i r R x 0 0 7 ) を投与することを含む、方法を本明細書で提供する。治療法は、少なくとも 1 種の免疫チェックポイント阻害剤 ( 例えば、P D - 1 結合アンタゴニスト及び / 又は C T L A - 4 抗体 ) を更に含むことができる。

20

【 0 1 9 3 】

いくつかの実施形態では、治療により、治療の終了後の個体における応答の維持がもたらされる。本明細書記載の方法は、癌治療のための腫瘍免疫原性の増加といった、免疫原性の増強が望まれる治療条件での使用が見出され得る。本明細書において、癌を有する個体などにおける、免疫機能を増強する方法であって、当該個体に、有効量の、C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニスト ( 例えば、I L - 2 / 抗 I L - 2 免疫複合体、I L - 1 5 / 抗 I L - 1 5 免疫複合体、I L - 1 5 / I L - 1 5 受容体 - I g G 1 - F c ( I L - 1 5 / I L - 1 5 R - I g G 1 - F c ) 免疫複合体、P E G 化 I L - 2、P E G 化 I L - 1 5、I L - 2 ムテイン及び / 又は I L - 1 5 ムテイン )、並びに、p 5 3 及び / 若しくは M D A - 7 癌抑制遺伝子治療法、又はウイルス腫瘍崩壊性治療法である V i r R x 0 0 7 を投与することを含む、方法もまた提供される。C D 1 2 2 / C D 1 3 2 アゴニストは、A L T - 8 0 3 などの、I L - 1 5 受容体 / I g G 1 F c 融合タンパク質に結合した I L - 1 5 変異体 ( 例えば、I L - 1 5 N 7 2 D ) であることができる。いくつかの実施形態において個体はヒトである。

30

【 0 1 9 4 】

いくつかの態様では、対象には、癌抑制免疫遺伝子治療法が更に投与される ( その全体が本明細書に参照により組み込まれている、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 6 0 8 3 3 を参照のこと )。いくつかの態様では、対象には、追加のウイルス及び非ウイルス遺伝子治療法 ( その全体が本明細書に参照により組み込まれている、P C T / U S 2 0 1 7 / 0 6 5 8 6 1 ) が更に投与される。いくつかの態様では、複製可能な、及び / 又は複製不可能なウイルス及び / 又は非ウイルス遺伝子治療法は、癌抑制遺伝子又は免疫刺激遺伝子である

40

【 0 1 9 5 】

治療が想到される癌の例としては、肺癌、頭頸癌、乳癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、骨肉腫、精巣癌、子宮頸癌、胃腸癌、リンパ腫、肺における新生物発生前の損傷、大腸癌、黒色腫、及び膀胱癌が挙げられる。

【 0 1 9 6 】

いくつかの実施形態では、個体は、1 種以上の抗癌治療法に耐性を有する ( 耐性があることが示されている ) 癌を有する。いくつかの実施形態では、抗癌治療法への耐性としては、癌の再発、又は耐性癌が挙げられる。再発とは、治療後、元の位置、又は新しい位置での、癌の再出現を意味することができる。いくつかの実施形態では、抗癌治療法への耐

50

性としては、抗癌治療法での治療中に癌が進行することが挙げられる。いくつかの実施形態では、癌は初期段階、又は後期段階である。

【0197】

いくつかの実施形態では、対象は、PD-1軸結合アンタゴニスト、及び/又は抗CTLA-4抗体などの免疫チェックポイント阻害剤でもまた治療される。個体は、PD-L1バイオマーカーを発現する（例えば、診断試験にて発現することが示されている）癌、又は、高い腫瘍変異負荷を有し得る。いくつかの実施形態では、患者の癌は、不十分なPD-L1バイオマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、患者の癌は、多くのPD-L1バイオマーカーを発現する。PD-L1バイオマーカーは、FACS、ウェスタンブロット、ELISA、免疫沈降、免疫組織化学法、免疫蛍光法、ラジオイムノアッセイ、ドットプロット、免疫検出法、HPLC、表面プラズモン共鳴、光学分光法、質量分析法、HPLC、qPCR、RT-qPCR、多重qPCR又はRT-qPCR、RNA-seq、マイクロアレイ分析、SAGE、MassARRAY技術、及びFISH、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される方法を使用して、サンプル中で検出することができる。高変異の腫瘍負荷の測定は、ゲノム配列決定（例えば、FoundationOneCDxアッセイ）により決定することができる。

10

【0198】

いくつかの実施形態では、対象は、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤（例えば、以前はCHR-3996又はVRx-3996であった、経口投与されるクラス1ヒストンデアセチラーゼ選択性阻害剤である、トラクチノスタット）でもまた治療される。

20

【0199】

本明細書記載の方法のいずれかの有効性（例えば、有効量の、少なくとも1種のCD122/CD132アゴニスト、p53、ADP、並びに/又は、MDA-7、遺伝子治療法、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤、及び/若しくは少なくとも1種のHDAC阻害剤の組み合わせを投与することを含む、治療の組み合わせ）を、臨床モデル又は臨床前モデルなどの、当該技術分野において公知の様々なモデルで試験することができる。好適な臨床前モデルが本明細書で例示され、ID8卵巣癌、GEMモデル、B16黒色腫、RENCA腎細胞癌、CT26結腸直腸癌、MC38結腸直腸癌、及び、癌のクラウドマン黒色腫モデルを更に含むことができるが、これらに限定されない。

【0200】

本開示の方法のいくつかの実施形態において、癌は、少量のT細胞湿潤を有する。いくつかの実施形態では、癌は、検出可能なT細胞浸潤を有しない。いくつかの実施形態では、癌は、非免疫原性癌（例えば、非免疫原性結腸直腸癌、及び/又は卵巣癌）である。理論に束縛されるものではないが、併用治療は、組み合わせの投与前と比較して、T細胞（例えば、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、メモリーT細胞）のプライミング、活性化、及び/又は増殖を増加させることができる。

30

【0201】

本開示の方法のいくつかの実施形態において、個体における、活性化されたCD4及び/又はCD8 T細胞は、-IFN産生CD4及び/若しくはCD8 T細胞、並びに/又は、組み合わせの投与前と比較して、増強された細胞溶解活性を特徴とする。-IFNは、例えば、細胞内サイトカイン染色（ICS）を伴う細胞の固定、易透化、及び-IFNに対する抗体による染色などの、当該技術分野において公知の任意の手段により測定することができる。細胞溶解活性は当該技術分野において公知の任意の手段、例えば、混合したエフェクター細胞及び標的細胞による細胞殺傷アッセイを用いることにより、測定することができる。

40

【0202】

本開示は、免疫系に対する標的、又は、外来標的に対する免疫系の応答の一部のいずれかとしての、免疫反応に関与する任意のヒト細胞に有用である。方法は、エキスピボ法、インピボ法、及び、ポリヌクレオチド又はベクターを宿主細胞に注入することを伴う、様々な他の方法を含む。方法は、腫瘍又は腫瘍床への直接注射、及び、腫瘍への局所又は局

50

部注射もまた含む。

【0203】

A. 投与

本明細書において提供する併用療法は、選択性CD122/CD132アゴニスト（例えば、IL-2/抗IL-2免疫複合体、IL-15/抗IL-15免疫複合体、IL-15/IL-15受容体-IgG1-Fc（IL-15/IL-15R-IgG1-Fc）免疫複合体、PEG化IL-2、PEG化IL-15、IL-2ムテイン、及び/又はIL-15ムテイン）、並びに、p53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法を投与することを含む。併用療法は、当該技術分野において既知の任意の好適方法で投与されることができる。例えば、CD122/CD132アゴニスト（例えば、IL-2/抗IL-2免疫複合体、IL-15/抗IL-15免疫複合体、IL-15/IL-15受容体-IgG1-Fc（IL-15/IL-15R-IgG1-Fc）免疫複合体、PEG化IL-2、PEG化IL-15、IL-2ムテイン、及び/又はIL-15ムテイン）、並びに、p53及び/又はMDA-7遺伝子治療法は、連続して（異なる時間で）、又は同時に（同じ時間に）投与されることができる。いくつかの実施形態では、1種以上のCD122/CD132アゴニストは、p53、ADP、及び/若しくはMDA-7遺伝子治療法、又はそれらの発現構築物として、個別の組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、CD122/CD132アゴニストは、p53及び/又はMDA-7遺伝子治療法と同じ組成物中に存在する。特定の態様において、対象には、少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストの前、これと同時、又はこの後に、p53をコードする核酸、ADP、及び/又はMDA-7をコードする核酸が投与される。

10

20

【0204】

1種以上のCD122/CD132アゴニスト、並びに、p53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法は、同じ投与経路で、又は異なる投与経路で投与されることができる。いくつかの実施形態では、CD122/CD132アゴニストは静脈内に、筋肉内に、皮下に、局所的に、経口的に、経皮的に、腹腔内に、眼窩内に、移植によって、吸入によって、髄腔内に、脳室内に、又は鼻腔内に投与される。いくつかの実施形態では、p53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法は静脈内に、筋肉内に、皮下に、局所的に、経口的に、経皮的に、腹腔内に、眼窩内に、移植によって、吸入によって、髄腔内に、脳室内に、又は鼻腔内に投与される。有効量のCD122/CD132アゴニスト、並びにp53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法を、病気の予防又は治療のために投与することができる。CD122/CD132アゴニスト、並びに/又はp53、ADP、及び/若しくはMDA-7遺伝子治療法の、適切な用量は、治療される病気の種類、病気の重症度及び過程、個体の臨床状態、個体の病歴及び治療に対する応答、並びに、主治医の自由裁量に基づき決定することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1種の選択性CD122/CD132アゴニスト（例えば、IL-2/抗IL-2免疫複合体、IL-15/抗IL-15免疫複合体、IL-15/IL-15受容体-IgG1-Fc（IL-15/IL-15R-IgG1-Fc）免疫複合体、PEG化IL-2、PEG化IL-15、IL-2ムテイン、及び/又はIL-15ムテイン）、並びに、p53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法による併用治療は相乗的であり、これにより、単剤としての治療と比較して、少なくとも1種のCD122/CD132アゴニスト（例えば、IL-2/抗IL-2免疫複合体、IL-15/抗IL-15免疫複合体、IL-15/IL-15受容体-IgG1-Fc（IL-15/IL-15R-IgG1-Fc）免疫複合体、PEG化IL-2、PEG化IL-15、IL-2ムテイン、及び/又はIL-15ムテイン）と組み合わせた、個別用量のp53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法の相加効果を超える効果が存在する。

30

40

【0205】

例えば、治療的有効量のCD122/CD132アゴニスト（例えば、IL-2/抗IL-2免疫複合体、IL-15/抗IL-15免疫複合体、IL-15/IL-15受容体-IgG1-Fc（IL-15/IL-15R-IgG1-Fc）免疫複合体、P

50

EG化IL-2、PEG化IL-15、IL-2ムテイン及び/又はIL-15ムテイン)は、毎週、隔週、3週間に1回、4週間に1回の範囲の間隔で、皮下又は経静脈投与のいずれかで投与される場合、5~100 $\mu$ g/kgの範囲の用量で投与される。

#### 【0206】

例えば、治療的有効量の、1種以上のCD122/CD132アゴニスト、並びにp53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法を、抗体などの免疫チェックポイント阻害剤と更に組み合わせて投与する場合、治療的有効量は、1回以上の投与であるかないかに関係なく、患者の体重の約0.01~約50mg/kgの範囲である。いくつかの実施形態では、使用する抗体は例えば、1日当たりの投与において、約0.01~約45mg/kg、約0.01~約40mg/kg、約0.01~約35mg/kg、約0.01~約30mg/kg、約0.01~約25mg/kg、約0.01~約20mg/kg、約0.01~約15mg/kg、約0.01~約10mg/kg、約0.01~約5mg/kg、又は約0.01~約1mg/kgである。いくつかの実施形態において、抗体は15mg/kgで投与される。しかし、他の投薬レジメンが有用であり得る。一実施形態では、本明細書で記載される抗PD-L1抗体はヒトに、1~21日のサイクルにおいて、約100mg、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1000mg、約1100mg、約1200mg、約1300mg、又は約1400mgの用量で投与される。用量は、注入物などの、単回用量で、又は複数回用量(例えば、2回用量若しくは3回用量)で投与されてもよい。本治療法の進捗は、従来技術によって容易に監視することができる。

10

20

#### 【0207】

腫瘍内注射、又は、腫瘍脈管構造への注射が、併用療法のp53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法構成成分に対して具体的に想到される。局所、局部、又は全身投与もまた好適であり得る。4cmを超える腫瘍に対しては、投与される体積は約4~10mL(特に10mL)である一方で、4cm未満の腫瘍に対しては、約1~3mLの体積(特に3mL)が用いられる。単回投与として送達される複数回注射は、約0.1~約0.5mLの体積を占める。例えば、アデノウイルス粒子は、複数回の注射を腫瘍に投与することにより、有利に接触されることができる。

#### 【0208】

治療レジメンも同様に様々であり得、多くの場合、腫瘍の種類、腫瘍の位置、病気の進行、並びに、患者の健康及び年齢に左右される。明らかに、ある種の腫瘍は、より強力な治療を必要とする一方、同時に、ある種の患者は、より厄介なプロトコルに耐えることができない。臨床医は、治療用製剤の既知の有効性及び(存在する場合)毒性に基づき、このような決断を下すのに最も適しているであろう。

30

#### 【0209】

特定の実施形態において、治療されている腫瘍は、少なくとも最初は、切除可能ではない場合がある。併用治療は、周辺における収縮により、又は、ある特定の侵襲性部分を取り除くことにより、腫瘍の切除可能性を増加させることができる。併用治療の後で、切除を実施する。切除後の更なる治療は、残った病気を取り除く役割を果たすであろう。

#### 【0210】

治療は様々な「単位用量」を含むことができる。単位用量は、所定の量の治療用組成物を含有していること、と定義される。投与される量、並びに、特定の経路及び製剤は、臨床分野の当業者の技術の範囲内である。単位用量は、単回注射として投与される必要はないものの、一連の時間にまたがる連続注入を含むことができる。本発明の単位用量は便宜上、ウイルス性構築物に対するプラーク形成単位(pfu)の観点で記載されることができる。単位用量は、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$  pfu、又はそれ以上の範囲である。あるいは、ウイルスの種類、及び達成可能な力価に応じて、患者、又は患者の細胞に、1~100、10~50、100~1000、又は、最大約 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10$

40

50

$10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、又は、 $1 \times 10^5$ 、又はそれ以上の感染性ウイルス粒子 (vp) を送達する。

【0211】

B. 注射可能な組成物及び製剤

ヒト p53、ADP、及びMDA-7をコードする1種以上の発現構築物を、本発明の増殖過剰細胞に送達するための一方法は、腫瘍内注射によるものである一方で、CD122/CD132アゴニスト、免疫チェックポイント阻害剤、及びHDAC阻害剤は、全身投与される。しかし、本明細書にて開示した医薬組成物は、全てが参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第5,543,158号、同第5,641,515号、及び同第5,399,363号に記載されているように、腫瘍内、非経口、静脈内、皮内、動脈内、筋肉内、経皮的、又は更に、腹腔内投与されることができる。

10

【0212】

核酸構築物の注射は、発現構築物が、注射に必要な特定のゲージの針を通過することができるのであれば、シリンジ、又は、溶液の注射に用いられる任意の他の方法により送達することができる。溶液を保持するためのアンプルチャンバーを画定するノズルと、溶液を、ノズルから送達部位に押すためのエネルギーデバイスと、を有する、新規の無針注射システムが説明されている(米国特許第5,846,233号)。任意の深さにて、所定量の溶液を複数回、正確に注射することを可能にする、遺伝子治療法で使用するためのシリンジシステムもまた、記載されている(米国特許第5,846,225号)。使用可能な別の注射システムは、取り付けられたシリンジにより、異なる深さまで調節可能な分岐式針を備える、QuadraFuseデバイスである。

20

【0213】

遊離塩基、又は薬理学的に許容される塩としての活性化化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と好適に混合された水の中で調製することができる。分散液もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びこれらの混合物中、並びに油中で調製することができる。通常の保管及び使用条件では、これら調製物は、微生物の増殖を防ぐための保存剤を含む。注射可能な使用に好適な薬剤形態としては、滅菌水溶液又は分散液、及び、無菌注射可能な溶液又は分散液を即時調製するための、滅菌粉末が挙げられる(米国特許第5,466,468号)。いずれの場合も、形態は滅菌されなければならない。形態は、製造及び保管の条件下で安定している必要があり、細菌や真菌などの微生物による汚染作用から保護されなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど)、これらの好適な混合物、並びに/又は植物油を含有する、溶媒又は分散媒であることができる。例えば、レシチンなどのコーティング剤を使用することにより、分散液の場合は必要な粒径を維持することにより、そして、界面活性剤を使用することにより、適切な流動性を維持することができる。微生物の活動は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどにより防止できる。多くの場合、等張剤、例えば糖累又は塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、組成物に吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを使用することで実現できる。

30

40

【0214】

水溶液中での非経口的投与のためには、例えば、溶液は、必要に応じて好適に緩衝化されなければならない。液体希釈剤はまず、十分な生理食塩水又はグルコースで等張性が付与される。これらの特定の水溶液は特に、静脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内、及び腹腔内投与に好適である。これに関連して、使用可能な滅菌水性媒体は、本開示の観点から、当業者に既知であろう。例えば、一用量は、1 mLの等張性NaCl溶液に溶解し、1000 mLの皮下注入用流体に添加される、又は、注入予定の位置に注射されるかのいずれかであることができる(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd Editionを参照のこと)。治療される対象の状態に

50

じて、いくらかの用量変化が必要に応じて生じるであろう。投与を担う人はいずれにせよ、個々の対象に対して適切な用量を決定するのである。更に、ヒトへの投与のためには、調製物は、FDA オフィスの生物学的製剤規格により必要とされる滅菌性、発熱原性、一般的な安全性、及び純度規格を満たさなければならない。

#### 【0215】

無菌注射液は、必要な量の活性化化合物を適切な溶媒中に、必要に応じて上述のその他各種成分と共に組み入れ、続いてフィルタにかけて滅菌することにより調製される。一般的に、分散液は、各種滅菌済みの活性成分を、塩基性分散媒及び上述の他の成分のうち必要なものを含有する無菌ビヒクルに混ぜ合わせるにより調製される。無菌注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め滅菌してフィルタにかけたその溶液から、活性成分の粉末に加えて任意の追加の所望の成分を得る、真空乾燥及びフリーズドライ技術である。

10

#### 【0216】

本明細書で開示する組成物は、中性又は塩形態で製剤化することができる。製薬上許容できる塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基と共に形成される）、及び、例えば、塩酸若しくはリン酸などの無機酸、又は、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と共に形成されるものが挙げられる。遊離カルボキシル基と共に形成される塩もまた、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、若しくは水酸化第二鉄などの無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来することができる。製剤化の際、溶液は、投薬形態と適合性のある方法で、そして、治療的有効量で投与される。製剤は、注射可能な溶液、薬剤放出カプセルなどの、様々な投薬形態にて容易に投与される。

20

#### 【0217】

##### C. 追加の抗癌治療法

p 53、ADP、及び/又はMDA-7核酸、並びに少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストの有効性を増加させるために、これらを、癌の治療において効果的な、少なくとも1種の追加の作用物質と組み合わせることができる。より一般的には、これらその他の組成物は、細胞の増殖を殺傷又は阻害するのに効果的な併用量で、提供される。このプロセスには、細胞を、発現構築物と、作用物質又は複数の因子と同時に接触させることを伴う場合がある。これは、細胞を、両方の作用物質を含む単一の組成物又は薬理的製剤と接触させることにより、又は、一方の組成物が発現構築物を含み、他方が第二の作用物質を含む、2つの異なる組成物又は製剤に、細胞を接触させることにより、達成することができる。あるいは、発現構築物は増殖細胞に接触する場合があります。かつ、追加の治療法は、免疫系又は腫瘍微小環境の他の細胞に影響を及ぼし、抗腫瘍免疫応答及び治療効果を向上させることができる。少なくとも1種の追加の抗癌治療法は、外科療法、化学療法（例えば、プロテインキナーゼ阻害剤又はEGFR標的化療法の投与）、放射線療法、凍結療法、高体温治療、写真療法、放射線切除療法、ホルモン療法、免疫チェックポイント阻害剤を含むがこれに限定されない免疫療法、小分子療法、受容体キナーゼ阻害剤療法、抗血管新生療法、サイトカイン療法又は生物学的療法（例えばモノクローナル抗体、siRNA、miRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、又は遺伝子治療）であることができるが、これらに限定されない。生物学的療法は、癌抑制遺伝子治療法、細胞死タンパク質遺伝子治療法、細胞周期制御因子遺伝子治療法、サイトカイン遺伝子治療法、毒性遺伝子治療法、免疫原治療法、スーサイド遺伝子治療法、プロドラッグ遺伝子治療法、抗細胞増殖遺伝子治療法、酵素遺伝子治療法、又は、抗血管新生因子遺伝子治療法などの遺伝子治療法であることができるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0218】

遺伝子治療法は、数分～数週間の範囲のインターバルで、他の作用物質治療に先行する、又はこの後に続くことができる。他の作用物質及び発現構築物が細胞に個別に適用される実施形態において、一般的に、作用物質及び発現構築物が依然として、組み合わせられた有利な効果を発揮することができるように、各送達の間時間が著しく延びないことが確

50

実に行われる。このような例において、細胞を、約12～24時間で互いに、両方の様式で、かつ好ましくは、約6～12時間で互いに、接触することができると想到される。しかし、場合によっては、それぞれの投与の間が数日（例えば、2、3、4、5、6、又は7日）から数週間（例えば、1、2、3、4、5、6、7、又は8週間）かかる場合、治療のための期間を著しく延ばすのが望ましい場合がある。特定の実施形態において、1つ以上の治療法を、維持療法としての他の療法と共に、又はそれなしで、続けることができる。

#### 【0219】

各種組み合わせを用いることができ、遺伝子治療法及びCD122/CD132アゴニストは「A」であり、第2の作用物質、即ち免疫チェックポイント阻害剤は「B」である

10

A / B / A    B / A / B    B / B / A    A / A / B    A / B / B    B / A / A    A / B / B / B    B / A / B / B  
 B / B / B / A    B / B / A / B    A / A / B / B    A / B / A / B    A / B / B / A  
 B / B / A / A  
 B / A / B / A    B / A / A / B    A / A / A / B    B / A / A / A    A / B / A / A  
 A / A / B / A

#### 【0220】

##### 1. 化学療法

癌治療法は一般的に、化学ベース及び放射線ベースの治療の両方による、様々な併用療法もまた含む。併用化学療法としては、例えば、シスプラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリコマイシン、マイトマイシン、エトポシド（VP16）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタビン、ナベルピン、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、trans-白金、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチン及びメトトレキサート、テモゾロマイド（DTICの水性形態）、又は、前述の任意の類似体若しくは誘導体の異型が挙げられる。化学療法を生物学的療法と組み合わせることは、バイオケモセラピーとして知られている。化学療法は、少量を継続して投与されることもまた可能であり、これはメトロノーム化学療法として知られている。

20

30

#### 【0221】

また更なる併用化学療法としては、例えば、アルキル化剤、例えば、チオテバ及びシクロホスファミド；アルキルスルホネート、例えば、ブスルファン、イムプロスルファン及びピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ及びウレドーパ；エチレンイミン及びメチラメラミン、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド及びトリメチロロメラミン；アセトゲニン（特に、プラタシン及びプラタシノン）；カンプトセシン（合成アナログであるトポテカンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む）；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログであるKW-2189及びCB1-TM1を含む）；エリユーセロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニムスチン；抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特に、カリケアミシンガンマI及びカリケアミシンオメガI1）；ダイネミシン、ダイネミシンAを含む；ビスホスホネート、例えば、クロンドロネート；エスペラミシ

40

50

ン；及びネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連する色素タンパク質エンジン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン（モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン及びデオキシドキシソルピシンを含む）、エビルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサート及び5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸アナログ、例えば、デノプテリン、プテロプテリン、トリメトレキサート；プリンアナログ、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えば、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えば、フォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルチン；ジアジクオン；エフロールニチン；酢酸エリプチニウム；エポシロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；メイタンシノイド、例えば、メイタンシン及びアンサマイトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメト；ピラルピシン；ロキソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK多糖複合体；ラゾキサソ；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、T-2毒素、ベラキュリンA、ロリジンA及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；タキソイド、例えば、パクリタキセル及びドセタキセルゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；白金配位複合体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン及びカルボプラチン；ピンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピンブラスチン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン（例えば、CPT-11）；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド、例えば、レチノイン酸；カペシタピン；カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン、ゲムシタピン、ナベルピン、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランス白金、及び上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、又は誘導体が挙げられる。特定の実施形態において、本明細書において提供する組成物を、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤と組み合わせることができる。特定の実施形態において、本明細書において提供する組成物を、ゲフィチニブと組み合わせることができる。別の実施形態において、本実施形態を、Gleevecと組み合わせて実践することができる（例えば、約400～約800mg/日のGleevecを患者に投与することができる）。特定の実施形態において、1つ以上の化学療法を、本明細書において提供する組成物と組み合わせて使用することができる。

## 【0222】

### 2. 放射線療法

DNAの損傷を引き起こす、幅広く使用されてきた他の因子としては、 $\gamma$ 線、X線として一般に知られているもの、及び/又は、放射性同位体を腫瘍細胞に向けて送達することが挙げられる。マイクロ波及び紫外線などの、DNA損傷因子の他の形態もまた知られて

いる。これらの因子全てが、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製及び修復、並びに染色体の集合及び維持の広範囲に影響を及ぼす可能性が最も高い。X線の照射範囲は、長期間（3～4週間）では1日あたり50～200レントゲンの照射から、1回の照射では2000～6000レントゲンの範囲で変動する。放射性同位体の照射範囲は広範に変化し、同位体の半減期、放射される放射線の強さ及び種類、並びに新生細胞による取り込みに依存する。

### 【0223】

#### 3. 免疫療法

免疫療法は一般に、癌細胞を標的化し破壊するための、免疫エフェクター細胞及び分子の使用に依存する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞表面にあるいくつかのマーカーに特異的な抗体であってもよい。抗体のみが、治療のエフェクターとして役立つことができる、又は細胞の殺傷に実際に影響を与えるように、他の細胞を動員することができる。抗体はまた、薬物又は毒素（化学療法、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素等）に抱合してよく、また、単に標的化剤として機能してよい。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接又は間接的のいずれかで相互作用する表面分子を担持するリンパ球であってもよい。様々なエフェクター細胞としては、細胞傷害性T細胞及びNK細胞、並びに、キメラ抗原受容体を発現するように改変された、これらの細胞型の遺伝子組み換え多様体が挙げられる。腫瘍細胞へのMda-7遺伝子導入により、腫瘍細胞死及びアポトーシスが引き起こされる。アポトーシス腫瘍細胞は、樹状細胞及びマクロファージを含む細網内皮細胞により捕捉され、免疫系に提示されて抗腫瘍免疫を生成する（Rovet et al., 1999; Steinman et al., 1999）。

10

20

### 【0224】

他の補助的な免疫療法を、上述のレジメンに追加して、GM-CSFが挙げられるがこれに限定されない、有効性を更に向上させ、骨髄由来の自然免疫系細胞の数、先天性及び適応免疫及び5FU（例えば、カペシタビン）を阻害するT制御性細胞を取り除くための、低用量のシクロホスファミド又はPI3K阻害剤（例えば、PI3K阻害剤）の数、阻害性骨髄由来免疫抑制細胞を取り除くための、PI3K阻害剤又はヒストンデアセチラーゼ阻害剤の数、を増加させることができるということが、癌免疫療法の当業者によって理解されるであろう。例えば、PI3K阻害剤としては、LY294002、ペリホシン、BKM120、デュベリシブ、PX-866、BAY80-6946、BEZ235、SF1126、GDC-0941、XL147、XL765、パロミド529、GSK1059615、PWT33597、IC87114、TG100-15、CAL263、PI-103、GNE-477、CUDC-907、及びAEZS-136が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様では、PI3K阻害剤は、限定されるものではないが、イデラリシブRP6530、TGR1202、及びRP6503などのPI3K阻害剤である。更なるPI3K阻害剤は、米国特許出願公開第2015029159号、同第20110190319号、並びに、国際特許出願公開第2012146667号、同第2014164942号、同第2012062748号、及び同第2015082376号に開示されている。免疫療法は、IL-2などのインターロイキン、又は、INFなどのインターフェロンの投与もまた含むことができる。

30

40

### 【0225】

p53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法、並びに、CD122/CD132アゴニストと組み合わせることができる免疫療法の例は、免疫アジュバント（例えば、ウシ型結核菌、熱帯熱マラリア原虫、ジニトロクロロベンゼン、及び芳香族化合物）（米国特許第5,801,005号、同第5,739,169号; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998）、サイトカイン療法（例えば、インターフェロン、及び ; インターロイキン（IL-1、IL-2）、GM-CSF、並びにTNF）（Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998）、遺伝子治療法（例えば、TNF、IL-1、IL-2、p53）（

50

Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 米国特許第5,830,880号及び同第5,846,945号)、並びにモノクローナル抗体(例えば、抗ガングリオシドGM2、抗HER-2、抗p185)(Pietras et al., 1998; Hanibuchi et al., 1998; 米国特許第5,824,311号)である。ハーセプチン(トラスツズマブ)は、HER2-neu受容体を遮断するキメラ(マウス-ヒト)モノクローナル抗体である。ハーセプチンは抗腫瘍活性を有し、悪性腫瘍の治療での使用が認可されている(Dillman, 1999)。癌をハーセプチンと化学療法とで併用療法することは、個別の治療法よりも効果的であることが示されている。したがって、1種以上の抗癌治療法を、本明細書に記載されるp53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法と共に用いることができる」と想到される。

10

## 【0226】

p53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法、並びにCD122/CD132アゴニストと組み合わせて使用することができる追加の免疫療法としては、免疫チェックポイント阻害剤、共刺激受容体アゴニスト、先天性免疫細胞の刺激因子、又は、先天性免疫の活性因子が挙げられる。特定の態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR、又はA2aRの阻害剤である。いくつかの態様では、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体である。いくつかの態様では、抗CTLA-4抗体はトレメリムマブ又はイピリムマブである。特定の態様において、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤は、抗キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)抗体である。いくつかの実施形態において、抗KIR抗体はリリルマブである。いくつかの態様では、PD-L1の阻害剤はデュルバルマブ、アテゾリズマブ、又はアベルマブである。いくつかの態様では、PD-L2の阻害剤はrHlgM12B7である。いくつかの態様では、LAG3阻害剤は、IMP321又はBMS-986016である。いくつかの態様では、A2aRの阻害剤はPBF-509である。

20

## 【0227】

いくつかの態様では、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤は、ヒトプログラム細胞死1(PD-1)軸結合アンタゴニストである。特定の態様において、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニスト、PDL1結合アンタゴニスト、及びPDL2結合アンタゴニストからなる群から選択される。いくつかの態様では、PD-1軸結合アンタゴニストはPD-1結合アンタゴニストである。特定の態様において、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1の、PDL1及び/又はPDL2への結合を阻害する。特に、PD-1結合アンタゴニストは、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストはニボルマブ、ペムプロリズマブ、ピディリズマブ、AMP-514、REGN2810、CT-011、BMS936559、MPDL3280A、又はAMP-224である。

30

## 【0228】

特定の態様において、少なくとも1種のチェックポイント阻害剤は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR、又はA2aRの阻害剤から選択される。いくつかの態様では、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体である。いくつかの態様では、抗CTLA-4抗体はトレメリムマブ又はイピリムマブである。特定の態様において、少なくとも1種の免疫チェックポイント阻害剤は、抗キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)抗体である。いくつかの実施形態において、抗KIR抗体はリリルマブである。いくつかの態様では、PD-L1の阻害剤はデュルバルマブ、アテゾリズマブ、又はアベルマブである。いくつかの態様では、PD-L2の阻害剤はrHlgM12B7である。いくつかの態様では、LAG3阻害剤は、IMP321又はBMS-986016である。いくつかの態様では、A2aRの阻害剤はPBF-509である。

40

## 【0229】

50

共刺激受容体アゴニストは、抗OX40抗体（例えば、MEDI6469、MEDI6383、MEDI0562、及びMOXR0916）、抗GITR抗体（例えば、TRX518、及びMK-4166）、抗CD137抗体（例えばウレルマブ、及びPF-05082566）、抗CD40抗体（例えば、CP-870, 893、ChiLob7/4）、又は、抗CD27抗体（例えば、CDX-1127としても知られているバルリルマブ）であることができる。先天性免疫細胞の刺激因子としては、KIRモノクローナル抗体（例えばリリルマブ）、細胞傷害性阻害受容体の阻害剤（例えば、KLRG1及びCD94としても知られているNKGA、例えば、モノクローナル抗体のモナリズマブ、並びに、TACTILEとしても知られている抗CD96）、並びに、トル様受容体（TLR）アゴニストが挙げられるが、これらに限定されない。TLRアゴニストは、BCG、TLR7アゴニスト（例えば、poly0ICLC、及びイミキモド）、TLR8アゴニスト（例えばレシキモド）、又はTLR9アゴニスト（例えばCPG7909）であることができる。ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、及び樹状細胞などの先天性免疫細胞の活性因子としては、IDO阻害剤、TGF阻害剤、IL-10阻害剤が挙げられる。先天性免疫の例示的活性因子は、インドキシモドである。いくつかの態様では、免疫療法は、インターフェロン遺伝子刺激因子（STING）アゴニストである（Corrales et al., 2015）。

#### 【0230】

本開示の方法で用いることが想到される他の免疫療法としては、参照により本明細書に組み込まれている、Tchekmedian et al., 2015により説明されているものが挙げられる。免疫療法は、T制御性細胞（Treg）、骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）、及び癌関連線維芽細胞（CAF）の抑制を含むことができる。いくつかの実施形態では、免疫療法は、腫瘍ワクチン（例えば、全腫瘍細胞ワクチン、樹状細胞ワクチン、DNA及び/若しくはRNA発現ワクチン、ペプチド、並びに、組み換え腫瘍関連抗原ワクチン）、又は、養子細胞治療法（ACT）（例えば、T細胞、ナチュラルキラー細胞、及びLAK細胞）である。T細胞及び/又はナチュラルキラー細胞を、特異的腫瘍抗原に対するキメラ抗原受容体（CAR）又はT細胞受容体（TCR）を用いて改変することができる。本明細書で使用する場合、キメラ抗原受容体（又はCAR）とは、T細胞又はナチュラルキラー細胞で発現したときに、そのT細胞又はナチュラルキラー細胞にCARの特異性を付与する、目的の抗原に特異的な、任意の改変受容体を意味することができる。標準的な分子技術を用いて作製したら、キメラ抗原受容体を発現するT細胞又はナチュラルキラー細胞を、養子細胞導入などの技術と同様に、患者に導入することができる。いくつかの態様では、T細胞は、組み合わせの投与前と比較して、IFN $\gamma$ 産生CD4<sup>+</sup>及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞、及び/又は増強された細胞溶解活性を特徴とする、個体において活性化されたCD4<sup>+</sup>及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞である。CD4<sup>+</sup>及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞は、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、及びインターロイキンからなる群から選択されるサイトカインの放出の増加を示す可能性がある。CD4<sup>+</sup>及び/又はCD8<sup>+</sup>T細胞は、エフェクターメモリーT細胞であることができる。特定の実施形態において、CD4<sup>+</sup>及び/又はCD8<sup>+</sup>エフェクターメモリーT細胞は、CD4<sup>+</sup>high CD62L<sup>low</sup>の発現を有することを特徴とする。

#### 【0231】

特定の態様において、2種以上の免疫療法を、T細胞共刺激受容体のアゴニストと組み合わせた、又は、TIL-ACTと組み合わせた、追加の免疫チェックポイント阻害剤を含む、p53、ADP、及び/又はMDA-7遺伝子治療法、並びにCD122/CD132アゴニストと組み合わせることができる。他の組み合わせとしては、T細胞チェックポイント遮断+共刺激受容体アゴニスト、先天性免疫細胞機能を改善するためのT細胞チェックポイント遮断、チェックポイント遮断+IDO阻害、又は、チェックポイント遮断+養子T細胞導入が挙げられる。特定の態様において、免疫療法は、抗PD-L1免疫チェックポイント阻害剤（例えばアベルマブ）、4-1BB（CD-137）アゴニスト（例えばウトミルマブ）、及びOX40（TNFRS4）アゴニストの組み合わせを含む。

10

20

30

40

50

免疫療法を、5 - アザシチジン及びエンチノスタットなどのヒストンデアセチラーゼ (H D A C) 阻害剤と組み合わせることができる。

【0232】

免疫療法は、1種以上の癌抗原、特に、タンパク質若しくはその免疫原性断片、上記癌抗原、特に、タンパク質又はその免疫原性断片をコードするDNA若しくはRNA、細胞可溶化物、並びに/又は、腫瘍細胞由来のタンパク質調製物を含む癌ワクチンであることができる。本明細書で使用する場合、癌抗原は、癌細胞に存在する抗原性物質である。原則として、通常の細胞と比較して、癌細胞内で上方制御された、又は変異により異常構造を有する癌細胞内で産生されたあらゆるタンパク質は、癌抗原として作用することができる。原則として、癌抗原は、変異若しくは過剰発現した癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の産生物；他の変異遺伝子、過剰発現若しくは異常発現した細胞タンパク質の産生物；発癌性ウイルスにより産生された癌抗原；癌胎児性抗原；変化した細胞表面糖脂質及び糖タンパク質；又は、細胞の種類に特異的な分化抗原であることができる。癌抗原の例としては、異常又は過剰発現した、ras及びp53遺伝子の産生物である。他の例としては、組織分化抗原、変異タンパク質抗原、発癌性ウイルス性抗原、癌精巢抗原、及び血管又は間質特異的抗原が挙げられる。組織分化抗原は、特定の種類の組織に対して特異的な抗原である。変異タンパク質は、通常の細胞がこれらのタンパク質を含有していないために、癌細胞に対してはるかに特異的である可能性がある。通常の細胞は、MHC分子に対して通常のタンパク質抗原を提示する一方で、癌細胞は変異版を提示する。いくつかのウイルス性タンパク質は癌を形成することが示唆されており、いくつかのウイルス性抗原は、癌抗原でもある。癌精巢抗原は、睾丸の生殖細胞で主に発現するが、胎児の卵巣及び栄養芽細胞でもまた発現する抗原である。いくつかの癌細胞はこれらのタンパク質を異常発現するが故に、これらの抗原を提示し、これらの抗原に特異的なT細胞による攻撃を可能にする。この種の例示的な抗原は、CTAG1 B及びMAGEA1、並びに、上皮成長因子受容体 (EGFR) V1I1多様体に対して標的化された、14量体の皮内注射可能なペプチドワクチンである、リンドペプチドである。リンドペプチドは、本明細書に記載したCD95 / CD95Lシグナル伝達系の阻害剤と組み合わせて使用する際、グリア芽腫を治療するのに特に好適である。また、通常は非常に少量が産生されるが、癌細胞での産生が劇的に増加するタンパク質は、免疫応答をトリガーする場合がある。このようなタンパク質の例は酵素のチロシナーゼであり、メラニン産生に必要である。通常、チロシナーゼは微量で産生されるが、その量は、黒色腫細胞では非常に増加する。癌胎児性抗原は、癌抗原の別の重要な部類である。例としては、 $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) 及び癌胎児性抗原 (CEA) がある。これらのタンパク質は通常、胚発達の初期段階で産生され、免疫系が完全に発達するときまでには消失する。したがって、自己寛容は、これらの抗原に対しては発達しない。異常タンパク質もまた、例えばEBV及びHPVなどのオンコウイルスで感染した細胞により産生される。これらのウイルスにより感染される細胞は、転写され、得られるタンパク質が免疫応答を生み出す、潜在的なウイルスDNAを含有する。癌ワクチンはペプチド癌ワクチンを含むことができ、これは、いくつかの実施形態では、個人向けにデザインされたペプチドワクチンである。いくつかの実施形態では、ペプチド癌ワクチンは、多価の長いペプチドワクチン、多ペプチドワクチン、ペプチドカクテルワクチン、ハイブリッドペプチドワクチン、又は、ペプチドによりパルスされた樹状細胞ワクチンである。

【0233】

免疫療法は、ポリクローナル抗体調製物の一部としてなどの抗体であることができる、又はモノクローナル抗体であることができる。抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体断片、二重特異性抗体、又は一本鎖抗体であることができる。本明細書で開示する抗体としては、例えばFab、Fab'、及びF(ab')<sub>2</sub>、Fd、一本鎖Fvs (scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs (sdFv)、及び、VL又はVHドメインのいずれかを含む断片があるが、これらに限定されない抗体断片が挙げられる。いくつかの態様では、抗体又はその断片は、上皮成長因子受容体 (EGFR1、Erb-B1)、HE

10

20

30

40

50

R2/neu (Erb-B2)、CD20、血管内皮増殖因子(VEGF)、インスリン様成長因子受容体(IGF-1R)、TRAIL受容体、上皮細胞接着分子、癌胎児性抗原、前立腺特異的膜抗原、ムチン-1、CD30、CD33、又はCD40に特異的に結合する。

#### 【0234】

本明細書において提供する組成物と組み合わせ使用可能なモノクローナル抗体の例としてはトラスツズマブ(抗HER2/neu抗体);ペルツズマブ(抗HER2 mAb);セツキシマブ(上皮成長因子受容体EGFRに対するキメラモノクローナル抗体);パニツムマブ(抗EGFR抗体);ニモツズマブ(抗EGFR抗体);ザルツムマブ(抗EGFR mAb);ネシツムマブ(抗EGFR mAb);MDX-210(ヒト化抗HER-2二重特異性抗体);MDX-210(ヒト化抗HER-2二重特異性抗体);MDX-447(ヒト化抗EGF受容体二重特異性抗体);リツキシマブ(キメラマウス/ヒト抗CD20 mAb);オビヌツズマブ(抗CD20 mAb);オフアツムマブ(抗CD20 mAb);トシツモマブ-I131(抗CD20 mAb);イブリツモマブチウキセタン(抗CD20 mAb);ベバシズマブ(抗VEGF mAb);ラムシルマブ(抗VEGFR2 mAb);ラニビズマブ(抗VEGF mAb);アフリベルセプト(IgG1 Fcに融合したVEGFR1及びVEGFR2の細胞外ドメイン);AMG386(IgG1 Fcに融合したアンジオポエチン-1及び2結合ペプチド);ダロツズマブ(抗IGF-1R mAb);ゲムツズマブオゾガマイシン(抗CD33 mAb);アレムツズマブ(抗キャンパス-1/CD52 mAb);ブレンツキシマブベドチン(抗CD30 mAb);カツマキソマブ(上皮細胞接着分子及びCD3を標的化する二重特異的mAb);ナブツモマブ(抗5T4 mAb);ジレンツキシマブ(抗カルボニックアンヒドラーゼix);又はファーレッツズマブ(抗葉酸塩受容体)が挙げられるが、これらに限定されない。他の例としては、Panorex(商標)(17-1A)(マウスモノクローナル抗体);Panorex(@)(17-1A)(キメラマウスモノクローナル抗体);BEC2(GDエピトープの模倣物である、抗イディオタイプmAb)(BCGを有する);Oncolym(Lym-1モノクローナル抗体);SMART M195 Ab(ヒト化13'1 LYM-1(Oncolym)、Ovarex(B43.13、抗イディオタイプマウスmAb));腺癌にてEGP40(17-1A)汎用癌腫(pancarcinoma)抗原に結合する3622W94 mAb;Zenapax(SMART Anti-Tac(IL-2受容体));SMART M195 Ab(ヒト化Ab、ヒト化);NovoMab-G2(汎用癌腫特異的Ab);TNT(ヒストン抗原に対するキメラmAb);TNT(ヒストン抗原に対するキメラmAb);グリオーマブ(Gliomab)-H(モノクローナル-ヒト化Ab);GNI-250 Mab;EMD-72000(キメラEGFアンタゴニスト);LymphoCide(ヒト化IL.L.2抗体);及び、GD-2、ANA Ab、SMART IDIO Ab、SMART ABL 364 Ab、又はImmurAIT-CEAを標的化する、二重特異性のMDX-260などの抗体が挙げられる。抗体の例としては、米国特許第5,736,167号、同第7,060,808号、及び同第5,821,337号に開示されているものが挙げられる。

#### 【0235】

抗体の更なる例としては、ザヌリムマブ(抗CD4 mAb)、ケリキシマブ(抗CD4 mAb);イピリムマブ(MDX-101;抗CTLA-4 mAb);レメリムマブ(抗CTLA-4 mAb);ダクリズマブ(抗CD25/IL-2R mAb);パシリキシマブ(抗CD25/IL-2R mAb);MDX-1106(抗-PD1 mAb);GITRに対する抗体;GC1008(抗TGF-抗体);メテリムマブ/CAT-192(抗TGF-抗体);レルデリムマブ/CAT-152(抗TGF-抗体);ID11(抗TGF-抗体);デノスマブ(抗RANKL mAb);BMS-663513(ヒト化抗4-1BB mAb);SGN-40(ヒト化抗CD40 mAb);CP870,893(ヒト抗CD40 mAb);インフリキシマブ(キメラ抗T

10

20

30

40

50

N F m A b ) ; アダリムマブ ( ヒト抗 T N F m A b ) ; セルトリズマブ ( ヒト化 F a b 抗 T N F ) ; ゴリムマブ ( 抗 T N F ) ; エタネルセプト ( I g G 1 F c に融合した T N F R の細胞外ドメイン ) ; ベラタセプト ( F c に融合した C T L A - 4 の細胞外ドメイン ) ; アパタセプト ( F c に融合した C T L A - 4 の細胞外ドメイン ) ; ベリムマブ ( 抗 B リンパ球刺激因子 ) ; ムロモナブ - C D 3 ( 抗 C D 3 m A b ) ; オテリキシズマブ ( 抗 C D 3 m A b ) ; テプリズマブ ( 抗 C D 3 m A b ) ; トシリズマブ ( 抗 I L 6 R m A b ) ; R E G N 8 8 ( 抗 I L 6 R m A b ) ; ウステキヌマブ ( 抗 I L - 1 2 / 2 3 m A b ) ; ウステキヌマブ ( 抗 I L - 1 2 / 2 3 m A b ) ; ナタリズマブ ( 抗 4 イнтеグリン ) ; ベドリズマブ ( 抗 4 7 イнтеグリン m A b ) ; T 1 h ( 抗 C D 6 m A b ) ; エブラツズマブ ( 抗 C D 2 2 m A b ) ; エファリズマブ ( 抗 C D 1 1 a m A b ) ; 並びに、アタシセプト ( F c に融合した、膜貫通活性化因子及びカルシウム制御リガンド相互作用因子の細胞外ドメイン ) が挙げられる。

10

#### 【 0 2 3 6 】

##### a . 受動免疫療法

癌の受動免疫療法に関する、多数の異なるアプローチが存在する。これらは以下のように、大別することができる：抗体のみの注射；毒素又は化学療法剤に結合した抗体の注射；放射性同位元素に結合した抗体の注射；抗イディオタイプ抗体の注射；及び最後に、腫瘍細胞の骨髄へのパーズング。

#### 【 0 2 3 7 】

ヒトモノクローナル抗体は、患者において副作用をほとんど、又は生じないために、受動免疫療法にて用いられるのが好ましい。ガングリオシド抗原に対するヒトモノクローナル抗体が、皮膚再発性黒色腫に苦しむ患者に病巣内投与されてきた ( I r i e & M o r t o n , 1 9 8 6 ) 。退化は、毎日、又は毎週病巣内注射をした後で、10名の患者のうち6名で観察された。別の研究では、2種類のヒトモノクローナル抗体を病巣内注射することで、適度な成功が達成された ( I r i e e t a l . , 1 9 8 9 ) 。

20

#### 【 0 2 3 8 】

2つの異なる抗原に対して向けられる2種以上のモノクローナル抗体、又は更に、複数の抗原特異性を有する抗体を投与するのが、好ましい場合がある。治療プロトコールは、B a j o r i n e t a l . ( 1 9 8 8 ) により記載されているような、リンホカイン又はその他の免疫促進因子の投与を含むこともまた可能である。ヒトモノクローナル抗体の開発については、本明細書の他の箇所にて更に詳細に記載されている。

30

#### 【 0 2 3 9 】

##### b . 能動免疫療法

能動免疫療法において、一般的に、異なる細菌アジュバントと共に、抗原性ペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質、又は、自己若しくは同種異系腫瘍細胞組成物、即ち「ワクチン」が投与される ( R a v i n d r a n a t h & M o r t o n , 1 9 9 1 ; M o r t o n & R a v i n d r a n a t h , 1 9 9 6 ; M o r t o n e t a l . , 1 9 9 2 ; M i t c h e l l e t a l . , 1 9 9 0 ; M i t c h e l l e t a l . , 1 9 9 3 ) 。黒色腫の免疫療法において、高いI g M 応答を誘発する患者は、I g M 抗体を全く、又はほとんど誘発しない患者よりも多くの場合、生残が良好である ( M o r t o n e t a l . , 1 9 9 2 ) 。I g M 抗体は多くの場合、一過性抗体であり、この規則の例外としては、抗ガングリオシド又は抗炭水化物抗体があるようである。

40

#### 【 0 2 4 0 】

##### c . 養子免疫療法

養子免疫療法において、患者の血液を循環するリンパ球、又は腫瘍が浸潤したリンパ球を、インビトロで単離し、I L - 2 などのリンホカインで活性化する、又は腫瘍壊死のために遺伝子を形質導入し、再投与する ( R o s e n b e r g e t a l . , 1 9 8 8 ; 1 9 8 9 ) 。これを達成するために、動物又はヒト患者に、免疫学的有効量の、活性化したリンパ球を、本明細書に記載した、アジュバントを組み込んだ抗原性ペプチド組成物と共に投与する。活性化したリンパ球は、血液又は腫瘍から以前に単離され、インビトロで

50

活性化された（又は、「膨張」した）、患者自身の細胞であるのが最も好ましい。この形態の免疫療法は、黒色腫及び腎癌腫の退行のいくつかのケースを生み出したが、応答した対象の割合は、応答しなかった対象と比較して低かった。より最近では、このような養子免疫細胞療法に、CAR T細胞治療法と呼ばれる、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する遺伝子組み換えT細胞を組み込んだ際に、より高い奏効率が観察されている。同様に、自己及び同種異系の両方のナチュラルキラー細胞が単離され、膨張して遺伝子組み換えられて、腫瘍細胞の結合及び殺傷を容易にする受容体又はリガンドを発現する。

#### 【0241】

#### 4. 他の作用物質

治療の治療効果を改善するために、その他の作用物質を、本明細書において提供する組成物と組み合わせて使用することができることが想到されている。これらの追加の作用物質としては、免疫賦活剤、細胞表面受容体及びギャップ結合の上方制御に影響を及ぼす作用物質、細胞増殖抑制剤及び分化剤、細胞接着阻害剤、又は、増殖過剰細胞の、アポトーシス誘発因子に対する感度を増加させる作用物質が挙げられる。免疫賦活剤としては、腫瘍壊死因子；インターフェロン、及び；IL-2及びその他のサイトカイン；又は、MIP-1、MIP-1、MCP-1、RANTES、及びその他のケモカインが挙げられる。細胞表面受容体、又は、Fas/Fasリガンド、DR4又はDR5/TRAILなどの、それらのリガンドを上方制御することにより、増殖過剰細胞におけるオートクライン又はパラクリン効果を確立することで、本明細書において提供する組成物のアポトーシス誘導能力が増強されることが更に想到される。ギャップ結合の数を増加させることで細胞内シグナル伝達を増加させることにより、隣接する増殖過剰細胞集団の抗増殖過剰効果が増加する。別の実施形態において、細胞増殖抑制又は分化剤を、本明細書において提供する組成物と組み合わせて使用し、治療の抗増殖過剰効果を改善することができる。細胞接着阻害剤は、本発明の有効性を改善すると想到されている。細胞接着阻害剤の例は、焦点接着キナーゼ（FAK）阻害剤及びロバスタチンである。抗体c225などの、アポトーシスに対する増殖過剰細胞の感度を増加させる、他の作用物質を、本明細書において提供する組成物と共に使用して、治療の有効性を改善できると更に想到される。

#### 【0242】

更なる実施形態では、他の作用物質は、1種以上の腫瘍崩壊ウイルスであることができる。これらの腫瘍崩壊ウイルスを改変して、p53及び/若しくはIL24を発現することができる、かつ/又は、サイトカイン、ADP、若しくは熱ショックタンパク質などの、p53及び/若しくはIL24以外の遺伝子が発現することができる。腫瘍崩壊ウイルスの例としては、一本鎖若しくは二本鎖DNAウイルス、RNAウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ポリオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、インフルエンザウイルス及びレオウイルス、粘液腫ウイルス、マラバウイルス、ラウドウイルス、エナデノチュシレブ、又はコクサッキーウイルスが挙げられる。特定の実施形態では、他の作用物質は、GM-CSFを発現するように遺伝子組み換えされた腫瘍崩壊性単純ヘルペスウイルスである、タリモジーン・ラハーパレブベック（T-VEC）である。タリモジーン・ラハーパレブベックである、HSV-1 [株JS1] ICP34.5- / ICP47- / hGM-CSF（OncoVEX<sup>GM-CSF</sup>として以前は知られていた）は、充実性腫瘍にて選択的に複製する免疫増強HSV-1を含む、腫瘍内に送達される腫瘍崩壊性免疫療法である。（Lui et al., Gene Therapy, 10: 292-303, 2003; 米国特許第7,223,593号、及び同第7,537,924号；参照により本明細書に組み込まれている。）2015年10月に、アメリカのFDAは、手術不可能な腫瘍を持つ患者における黒色腫の治療のために、商品名IMLYGIC（商標）にて、T-VECを認可した。T-VECの特徴及び投与方法は例えば、IMLYGIC（商標）の添付文書（Amgen, 2015）、及び米国特許出願公開第2015/0202290号（両方が

10

20

30

40

50

参照により本明細書に組み込まれている)に記載されている。例えば、タリモジーン・ラハーパーレブベックは典型的には、1週目の1日目に、最大4.0 mLの、 $10^6$  プラーク形成ユニット/mL (PFU/mL)の用量で、続いて、4週目の1日目、及びその後隔週にて(±3日)、最大4.0 mLの、 $10^8$  PFU/mLの用量で、注射可能な皮膚、皮下、及び結節腫瘍への腫瘍内注射により投与される。腫瘍に注射されるタリモジーン・ラハーパーレブベックの、推奨される体積は、腫瘍サイズに左右され、注入量ガイドラインに従い決定されなければならない。T-VECは、黒色腫患者において臨床活性を示したものの、多くの癌患者は、T-VEC治療に応答しないか、又は治療への応答を終えるかのいずれかである。一実施形態では、p53、ADP、及び/又はMDA-7核酸、並びに少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストを、T-VEC治療法の後、間、又は前に投与して、例えば治療耐性を逆転させることができる。例示的な腫瘍崩壊ウイルスとしては、Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12、Cavatank(商標)、CG0070、DNX-2401、G207、HF10、IMLYGIC(商標)、JX-594、MG1-MA3、MV-NIS、OBP-301、Reolysin(登録商標)、Toca 511、Oncorine(H101)、Onyx-015、H102、H103、及びRIGVIRが挙げられるが、これらに限定されない。他の例示的な腫瘍崩壊ウイルスは、例えば、国際公開第2015/027163号、同第2014/138314号、同第2014/047350号、及び同第2016/009017号に記載されており、全てが参照により本明細書に組み込まれている。

10

#### 【0243】

20

特定の実施形態において、ホルモン療法は、本実施形態と組み合わせ、又は、前述の任意の他の癌治療法と組み合わせ使用することもまた、可能である。ホルモンの使用を、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、又は子宮頸癌などの特定の癌の治療で用いて、テストステロン又はエストロゲンなどの特定のホルモンの量を低下させる、又は影響を遮断することができる。この治療は多くの場合、治療オプションとして、少なくとも1種のその他の癌治療と組み合わせ、又は転移リスクを低下させるために、使用される。

#### 【0244】

いくつかの態様では、更なる抗癌剤は、EGFR、VEGFR、AKT、Erb1、Erb2、ErbB、Syk、Bcr-Abl、JAK、Src、GSK-3、PI3K、Ras、Raf、MAPK、MAPKK、mTOR、c-Kit、eph受容体、又はBRAF阻害剤などの、プロテインキナーゼ又は成長因子シグナル伝達経路に關与する受容体を阻害する、プロテインキナーゼ阻害剤又はモノクローナル抗体である。プロテインキナーゼ又は成長因子シグナル伝達経路阻害剤の非限定例としては、アフアチニブ、アキシチニブ、ベバシズマブ、ボスチニブ、セツキシマブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、フォスタマチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レンバチニブ、ムブリチニブ、ニロチニブ、パニツムマブ、パゾパニブ、ペガブタニブ、ラニビズマブ、ルキソリチニブ、サラカチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トラスツズマブ、バンデタニブ、AP23451、ベムラフェニブ、MK-2206、GSK690693、A-443654、VQD-002、ミルテフォシン、ペリホシン、CAL101、PX-866、LY294002、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、リダフォロリムス、アルボシジブ、ゲニステイン、セルメチニブ、AZD-6244、パタラニブ、P1446A-05、AG-024322、ZD1839、P276-00、GW572016、又はこれらの混合物が挙げられる。

30

40

#### 【0245】

いくつかの態様では、PI3K阻害剤は、プバリシブ、イデラリシブ、BYL-719、ダクトリシブ、PF-05212384、ピクチリシブ、コパンリシブ、コパンリシブジヒドロクロリド、ZSTK-474、GSK-2636771、デュベリシブ、GS-9820、PF-04691502、SAR-245408、SAR-245409、ソノリシブ、アルヘクシン、GDC-0032、GDC-0980、アピトリシブ、ピララリシブ、DLBS 1425、PX-866、ボクスタリシブ、AZD-8186、BG

50

T - 2 2 6、DS - 7 4 2 3、GDC - 0 0 8 4、GSK - 2 1 2 6 4 5 8、INK - 1 1 1 7、SAR - 2 6 0 3 0 1、SF - 1 1 2 6、AMG - 3 1 9、BAY - 1 0 8 2 4 3 9、CH - 5 1 3 2 7 9 9、GSK - 2 2 6 9 5 5 7、P - 7 1 7 0、PWT - 3 3 5 9 7、CAL - 2 6 3、RG - 7 6 0 3、LY - 3 0 2 3 4 1 4、RP - 5 2 6 4、RV - 1 7 2 9、タセリシブ、TGR - 1 2 0 2、GSK - 4 1 8、INCB - 0 4 0 0 9 3、Panulisib、GSK - 1 0 5 9 6 1 5、CNX - 1 3 5 1、AMG - 5 1 1、PQR - 3 0 9、1 7 - ヒドロキシワートマニン、AEZS - 1 2 9、AEZS - 1 3 6、HM - 5 0 1 6 6 9 9、IPI - 4 4 3、ONC - 2 0 1、PF - 4 9 8 9 2 1 6、RP - 6 5 0 3、SF - 2 6 2 6、X - 3 3 9、XL - 4 9 9、PQR - 4 0 1、AEZS - 1 3 2、CZC - 2 4 8 3 2、KAR - 4 1 4 1、PQR - 3 1 1、PQR - 3 1 6、RP - 5 0 9 0、VS - 5 5 8 4、X - 4 8 0、AEZS - 1 2 6、AS - 6 0 4 8 5 0、BAG - 9 5 6、CAL - 1 3 0、CZC - 2 4 7 5 8、ETP - 4 6 3 2 1、ETP - 4 7 1 8 7、GNE - 3 1 7、GS - 5 4 8 2 0 2、HM - 0 3 2、KAR - 1 1 3 9、LY - 2 9 4 0 0 2、PF - 0 4 9 7 9 0 6 4、PI - 6 2 0、PKI - 4 0 2、PWT - 1 4 3、RP - 6 5 3 0、3 - HOI - BA - 0 1、AEZS - 1 3 4、AS - 0 4 1 1 6 4、AS - 2 5 2 4 2 4、AS - 6 0 5 2 4 0、AS - 6 0 5 8 5 8、AS - 6 0 6 8 3 9、BCCA - 6 2 1 C、CAY - 1 0 5 0 5、CH - 5 0 3 3 8 5 5、CH - 5 1 0 8 1 3 4、CUDC - 9 0 8、CZC - 1 9 9 4 5、D - 1 0 6 6 6 9、D - 8 7 5 0 3、DPT - NX7、ETP - 4 6 4 4 4、ETP - 4 6 9 9 2、GE - 2 1、GNE - 1 2 3、GNE - 1 5 1、GNE - 2 9 3、GNE - 3 8 0、GNE - 3 9 0、GNE - 4 7 7、GNE - 4 9 0、GNE - 4 9 3、GNE - 6 1 4、HMPL - 5 1 8、HS - 1 0 4、HS - 1 0 6、HS - 1 1 6、HS - 1 7 3、HS - 1 9 6、IC - 4 8 6 0 6 8、INK - 0 5 5、KAR 1 1 4 1、KY - 1 2 4 2 0、ワートマニン、Lin - 0 5、NPT - 5 2 0 - 3 4、PF - 0 4 6 9 1 5 0 3、PF - 0 6 4 6 5 6 0 3、PGNX - 0 1、PGNX - 0 2、PI 6 2 0、PI - 1 0 3、PI - 5 0 9、PI - 5 1 6、PI - 5 4 0、PIK - 7 5、PWT - 4 5 8、RO - 2 4 9 2、RP - 5 1 5 2、RP - 5 2 3 7、SB - 2 0 1 5、SB - 2 3 1 2、SB - 2 3 4 3、SHBM - 1 0 0 9、SN 3 2 9 7 6、SR - 1 3 1 7 9、SRX - 2 5 2 3、SRX - 2 5 5 8、SRX - 2 6 2 6、SRX - 3 6 3 6、SRX - 5 0 0 0、TGR - 5 2 3 7、TGX - 2 2 1、UCB - 5 8 5 7、WAY - 2 6 6 1 7 5、WAY - 2 6 6 1 7 6、EI - 2 0 1、AEZS - 1 3 1、AQX - MN 1 0 0、KCC - TGX、OXY - 1 1 1 A、PI - 7 0 8、PX - 2 0 0 0、及び WJD - 0 0 8 からなる PI 3 K 阻害剤の群から選択される。

#### 【0246】

更なる癌治療法としては、例えば、上皮成長因子受容体 (EGFR、EGFR1、ErbB - 1、HER1)、ErbB - 2 (HER2/neu)、ErbB - 3/HER3、ErbB - 4/HER4、EGFRリガンドファミリー；インスリン様成長因子受容体 (IGFR)ファミリー、IGF - 結合タンパク質 (IGFBP)、IGFRリガンドファミリー (IGF - 1R)；血小板由来成長因子受容体 (PDGFR)ファミリー、PDGFRリガンドファミリー、線維芽細胞増殖因子 (FGFR)ファミリー、FGFRリガンドファミリー、血管内皮成長因子 (VEGFR)ファミリー、VEGFファミリー；HGF受容体ファミリー；TRK受容体ファミリー；エフリン (EPH)受容体ファミリー；AXL受容体ファミリー；白血球チロシンキナーゼ (LTK)受容体ファミリー；TIE受容体ファミリー、アンジオポエチン1、2；受容体型チロシンキナーゼ様オーファン受容体 (ROR)受容体ファミリー；ジスコイジンドメイン受容体 (DDR)ファミリー；RET受容体ファミリー；KLG受容体ファミリー；RYK受容体ファミリー；MuSK受容体ファミリー；トランスフォーミング増殖因子 (TGF - )、TGF - 受容体；トランスフォーミング増殖因子 (TGF - )、TGF - 受容体；インターロイキン13受容体 2鎖 (IL13Ralpha2)、インターロイキン - 6 (IL - 6)、IL - 6受容体、インターロイキン - 4、IL - 4受容体、サイトカイン受容体、クラス

I (ヘマトポイエチンファミリー) 及びクラスII (インターフェロン/IL-10ファミリー) 受容体、腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリー、TNF-、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体スーパーファミリー (TNTRSF)、死受容体ファミリー、TRAIL 受容体; 癌精巢 (CT) 抗原、リネージ特異的抗原、分化抗原、-アクチニン-4、ARTC1、ブレイクポイントクラスター領域 Abelson (Bcr-abl) 融合生成物、B-RAF、カスパーゼ-5 (CASP-5)、カスパーゼ-8 (CASP-8)、-カテニン (CTNNB1)、細胞分裂サイクル27 (CDC27)、サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)、CDKN2A、COA-1、dek-can 融合タンパク質、EFTUD-2、延長因子2 (ELF2)、Ets 多様体遺伝子6/急性骨髄性白血病1遺伝子 ETS (ETC6-AML1) 融合タンパク質、フィブロネクチン (FN)、GPNMB、低密度脂質受容体/GDP-Lフコース: -Dガラクトース2-Lフコシルトランスフェラーゼ (LDLR/FUT) 融合タンパク質、HLA-A2、HLA-A2 遺伝子における 2ドメインの ヘリックスの残基170における、アルギニンのイソロイシンへの交換 (HLA-A\*201-R170I)、MLA-A11、熱ショックタンパク質70-2変異 (HSP70-2M)、KIAA0205、MART2、黒色腫遍在変異1、2、3 (MUM-1、2、3)、前立腺酸性リン酸化酵素 (PAP)、ネオPAP、ミオシンクラス1、NFYC、OGT、OS-9、pml-RAR 融合タンパク質、PRDX5、PTPRK、K-ras (KRAS2)、N-ras (NRAS)、HRAS、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1又は-SSX2 融合タンパク質、トリオースリン酸イソメラーゼ、BAGE、BAGE-1、BAGE-2、3、4、5、GAGE-1、2、3、4、5、6、7、8、GnT-V (異常N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV、MGAT5)、HERV-K-MEL、KK-LC、KM-HN-1、LAGE、LAGE-1、黒色腫でのCTL認識抗原 (CAMEL)、MAGE-A1 (MAGE-1)、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-AS、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-3、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C1、MAGE-C2、ムチン1 (MUC1)、MART-1//Melan-A (MLANA)、gp100、gp100/Pme117 (S1LV)、チロシナーゼ (TYR)、TRP-1、HAGE、NA-88、NY-ESO-1、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-1、2、3、4、TRP2-1NT2、癌胎児性抗原 (CEA)、カリクフェイン4、マンマグロビン-A、OA1、前立腺特異抗原 (PSA)、前立腺特異的膜抗原、TRP-1/gp75、TRP-2、アジポフィリン、ニエラノルナ (nie lan or na) に存在しないインターフェロン誘導性タンパク質 (AIM-2)、BING-4、CPSF、サイクリンD1、上皮細胞接着分子 (Ep-CAM)、EpbA3、線維芽細胞増殖因子-5 (FGF-5)、糖タンパク質250 (gp250腸カルボキシルエステラーゼ (iCE))、フェトタンパク質 (AFP)、M-CSF、mdm-2 (例えば、HDM201などの、p53活性の阻害を逆転させるためなどの、MDM2としても知られているHDM2、及び/又はHDM4の、低分子阻害剤、cisイミダゾリン (例えばヌトリン)、ベンゾジアゼピン (BDP)、スピロオキシインドール)、MUCI、p53 (TP53)、PBF、FRAME、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU2AS、SOX10、STEAP1、スルビピン (BIRCS)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、テロメラーゼ、ウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1)、SYCP1、BRDT、SPANX、XAGE、ADAM2、PAGE-5、LIP1、CTAGE-1、CSAGE、MMA1、CAGE、BORIS、HOM-TES-85、AF15q14、HCA66I、LDHC、MORC、SGY-1、SPO11、TPX1、NY-SAR-35、FTHLI7、NXF2 TDRD1、TEX 15、FATE、TPTE、免疫グロブリンイディオタイプ、ベンスジョンズタンパク質、エストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR)、CD40、CD30、CD20、CD19、CD33、CD4、CD25、CD3、癌抗原72-4 (CA 72-4)、癌抗原15-3

10

20

30

40

50

(CA 15-3)、癌抗原27-29(CA 27-29)、癌抗原125(CA125)、癌抗原19-9(CA 19-9)、ヒト絨毛膜性腺刺激ホルモン、1-2マイクログリブリン、扁平上皮細胞癌抗原、ニューロン特異的エノラーゼ、熱ショックタンパク質gp96、GM2、サルグラモスチム、CTLA-4、707アラニンプロリン(707-AP)、T細胞4により認識される腺癌抗原(ART-4)、癌胎児性抗原ペプチド1(CAP-1)、カルシウム活性化塩素イオンチャンネル2(CLCA2)、サイクロフィリンB(Cyp-B)、ヒト印環腫瘍2(HST-2)、ヒトパピローマ・ウイルス(HPV)タンパク質(HPV-E6、HPV-E7、主及び副キャプシド抗原など)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)タンパク質(EBV潜在性膜タンパク質-LMP1、LMP2など)、B型肝炎又はC型肝炎ウイルスタンパク質、並びにHIVタンパク質を標的化する、抗体、ペプチド、ポリペプチド、低分子阻害剤、siRNA、miRNA、又は遺伝子治療法を含むことができることが想到されている。

10

## 【0247】

## IX. 製品又はキット

少なくとも1種のCD122/CD132アゴニスト(例えば、IL-2/抗IL-2免疫複合体、IL-15/抗IL-15免疫複合体、IL-15/IL-15受容体-IgG1-Fc(IL-15/IL-15R-IgG1-Fc)免疫複合体、PEG化IL-2、PEG化IL-15、IL-2ムテイン、及び/又はIL-15ムテイン)、並びに、p53をコードする核酸、ADP、及び/又はMDA-7をコードする核酸(例えば、ad-p53及び/又はad-MDA-7)を含む製造物品又はキットもまた、本明細書で提供する。製品又はキットは、個体における癌を治療する、若しくは癌の進行を遅延するため、又は、癌を有する個体の免疫機能を増強するために、癌抑制遺伝子治療法と組み合わせて、少なくとも1種のCD122/CD132アゴニストを使用するための取扱説明書を含む添付文書を更に含むことができる。本明細書に記載されるCD122/CD132アゴニスト、及びp53をコードする核酸、ADP、並びに/又はMDA-7をコードする核酸のいずれかを、製品又はキットに含めることができる。キットは、細胞外マトリックス分解タンパク質、又は、細胞外マトリックス分解タンパク質をコードする発現構築物を更に含むことができる。

20

## 【0248】

いくつかの実施形態では、少なくとも1種の選択性CD122/CD132アゴニスト(例えば、IL-2/抗IL-2免疫複合体、IL-15/抗IL-15免疫複合体、IL-15/IL-15受容体-IgG1-Fc(IL-15/IL-15R-IgG1-Fc)免疫複合体、PEG化IL-2、PEG化IL-15、IL-2ムテイン、及び/又はIL-15ムテイン)、並びに、p53をコードする核酸、ADP、及び/又はMDA-7をコードする核酸は、同じ容器、又は個別の容器の中に存在する。好適な容器としては例えば、ボトル、バイアル瓶、バッグ、及びシリンジが挙げられる。容器は、ガラス、プラスチック(ポリ塩化ビニル若しくはポリオレフィンなど)、又は合金(ステンレス鋼若しくはハステロイなど)といった、様々な材料から形成することができる。いくつかの実施形態では、容器は製剤を保持し、容器上の、又は容器に付着したラベルは、使用のための指示を示すことができる。製品又はキットは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、使用のため取扱説明書を有する添付文書などの、商業的観点及び使用者観点から望ましい他の材料を更に含むことができる。いくつかの実施形態では、製品は更に、1種以上の別の作用物質(例えば、化学療法剤、及び抗新生物剤)を含む。1種以上の作用物質様の好適な容器としては例えば、ボトル、バイアル瓶、バッグ、及びシリンジが挙げられる。

30

40

## 【実施例】

## 【0249】

## X. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために含まれている。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において十分に機能するように本願発明者によって開

50

発された技術を表し、そのため、その実施のための好ましい態様を構成すると考えることができることが、当業者によって理解されるべきである。しかし、当業者は、本開示の観点で、開示される具体的な実施形態において、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、同じ又は同様の結果が依然として得られる多くの変更をなし得ることを理解するべきである。

#### 【0250】

実施例1 - 局所及び全身的な有効性の増強、並びに、以前の免疫療法に対する耐性の逆転のための、選択性CD122 / 132アゴニスト及び免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせた、Ad-p53及びAd-IL24癌抑制因子、並びに腫瘍崩壊ウイルス(VirRx007)免疫遺伝子治療法

CD122 / CD132アゴニストを癌抑制因子、及びウイルス腫瘍崩壊性免疫遺伝子治療法と組み合わせて、以前の免疫療法に対して耐性を有する腫瘍を含む、局所及び全身性抗腫瘍効果を増強させる有効性を、免疫応答性動物腫瘍モデルにて示す。以下の治療法、用量、及びスケジュールを利用した：

#### 【0251】

動物、腫瘍播種、及び測定：病原体非含有のC57BL / 6 (B6)オスマウス(Charles River Labsから入手した、6~8週齢)を利用した。動物の右脇腹に、B16F10黒色腫細胞(ATCC、 $5 \times 10^5$  cells / マウス、血清非含有培地にて懸濁)を皮下注射して、「原発性腫瘍」を形成した。腫瘍のサイズが約50mm<sup>3</sup>に達したときに治療を開始し、これを治療1日目と呼ぶ。腫瘍の長さ(L)と幅(w)を測定することで腫瘍増殖を監視し、以下の式：体積 =  $0.523 L (w)^2$  を使用して、腫瘍の体積を計算した。最大40日間動物を監視し、腫瘍が約2000mm<sup>3</sup>に達したときに犠牲にした。

#### 【0252】

ウイルスベクター：p53又はIL24癌抑制遺伝子のいずれかを発現させるためにコードする、複製不能なヒト5型アデノウイルス(Ad5)、及び、ADP(VirRx007)を過剰発現するように改変された、複製可能な腫瘍崩壊アデノウイルスを、これらの実験に使用した。ベクターの構築、性質、及び精製は、Ad5 / CMV p53、IL24及びVirRx007ベクターに関する他の箇所では報告されている(Zhang 1994; Mhashilkar et al., 2001; 米国特許第7589069B1号)。ウイルスベクターの4回用量のうち3回を、腫瘍内投与する。Ad-p53及び/又はADP(VRX-007)に関して、ウイルスベクターを2、5、及び8日目に投与した。Ad-IL24に関して、ベクターを3、5、7、及び9日目に(48時間の間隔で)投与した。CD122 / CD132アゴニストと免疫チェックポイント阻害剤とを組み合わせるウイルス治療を評価する群において、更なる腫瘍内ウイルス注射を、21日目に投与した。各ウイルス投与量は、50µLの体積に $5 \times 10^9$ のウイルス粒子を含んだ。

#### 【0253】

CD122 / CD132アゴニスト治療：B16F10モデルに関して、マウスIL-2(eBioscience又はR&D Systems Minneapolis, MN)を、S4B6-1抗マウスIL2抗体(Bioxcell, West Lebanon, NH又はBD Biosciences)と、2:1のモル比で混合し、選択性CD122 / CD132アゴニスト免疫複合体を作製した。ヒトT細胞を伴う研究のために、ヒトIL-2を、MAB602抗ヒトIL-2抗体(R&D Systems)と混合した。IL-2 / S4B6又はIL-2 / MAB602 mAb免疫複合体を、2、6、及び10日目に、2.5µgのIL2 / 用量にて、腹腔内(IP)投与した。あるいは、IL-2 / S4B6 mAb免疫複合体を、2~6日目に注射した(1.0µgのIL2 / 用量)。15分間室温で、抗IL-2モノクローナルをIL-2とインキュベートすることで、免疫複合体を調製する。

#### 【0254】

いくつかのマウス実験において、CD122/CD132アゴニストは、組み換えマウスIL-15 (eBioSciences) 及びIL-15-R<sub>Fc</sub> (R&D Systems) を含んだ。これらを合わせて37°Cで30分間インキュベートすることで免疫複合体を調製し、腫瘍が触知可能になったら、この選択性CD122/CD132アゴニスト免疫複合体を、連続して2日間静脈内注射した。代替スケジュールは、腫瘍が触知可能になった後、3、5、及び7日目に、腹腔内注射されるIL-15免疫複合体を投与することである。IL-15免疫複合体研究のために、静脈内注射で1週間に1回、1回の注射当たり2µgの組み換えマウスIL-15の用量で、組み換えマウスIL-15 (Peprotech, Rocky Hill, CT, USA) を、インビボ研究で使用する。組み換えマウスIL-15 R<sub>Fc</sub>キメラタンパク質をR&D Systems (Minneapolis, MN) から入手し、IL-15サイトカインと等モルの用量 (免疫複合体内の各2µgのIL-15タンパク質に対して、1回の注射当たり12µgのIL-15-R<sub>Fc</sub>) で使用する。

10

#### 【0255】

免疫チェックポイント阻害剤：免疫チェックポイント阻害剤治療の間に、腫瘍進行の一般的な臨床状態を模倣するために、マウス一匹当たり200µgの用量で、抗PD1治療を、1日目に腹腔内で開始し、30日目まで、3日ごとに投与した。いくつかの実験において、以前の免疫療法に対して耐性を有する、選択性CD122/132アゴニスト及び免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせた、癌抑制及び腫瘍崩壊ウイルスVirRx007治療法の効果を評価するために、抗PD-1治療を開始した後に、最初の癌抑制治療法用量を1~2日間与えることで、抗PD-1治療法における腫瘍進行の後、癌抑制治療を開始した。B16F10及びB16黒色腫モデルは、免疫療法に対して非常に耐性があることが知られている。これらのモデルにおいて、腫瘍は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いる対象治療に対して、免疫チェックポイント阻害剤、及び選択性CD122/132治療の治療法にて同様に進行する。インビボでの使用のために特別に作製した抗マウスPD-1抗体 (CD279) を、BioXcellから購入した (カタログ番号BE0146)。

20

#### 【0256】

以前の免疫療法に対する耐性の逆転：選択性CD122/CD132アゴニスト、及び免疫チェックポイント阻害剤治療と組み合わせた癌抑制因子又はウイルス腫瘍崩壊性治療法が、以前の免疫療法に対する耐性を逆転させる能力もまた、実証した。免疫チェックポイント阻害剤治療の間に、腫瘍進行の一般的な臨床状態を模倣するために、10mg/kgの用量で、抗PD1治療を、1日目に腹腔内で開始し、30日目まで、3日ごとに投与した。いくつかの実験において、以前の免疫療法に対して耐性を有する腫瘍における、CD122/CD132治療法と組み合わせた癌抑制又はウイルス腫瘍崩壊性治療の効果を評価するために、抗PD-1治療を開始した後に、最初の癌抑制及びCD122/CD132治療法の用量を1~2日間与えて、抗PD-1治療法における腫瘍の進行後、併用治療を開始した。これらの研究を、免疫療法に対して非常に耐性があることが知られている、B16F10及びB16黒色腫モデルで実施した。これらのモデルにおいて、腫瘍は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いる対象治療に対して、免疫チェックポイント阻害剤治療法にて同様に進行する。インビボでの使用のために特別に作製した、抗PD-L1に対する抗体であり、免疫調節剤抗LAG-3である、抗マウスPD-1抗体 (CD279) を、BioXcellから購入する (カタログ番号BE0146)。抗マウスPD-L1抗体 (クローン9G2、BioLegend)、及び/又は抗CTLA-4抗体 (クローンUC10-4F10-11; Altor) を2週間、1週間に2回の注射当たり100µgで腹腔内投与した。

30

40

#### 【0257】

原発性腫瘍及び対側腫瘍での腫瘍体積の測定、並びに、T検定、分散分析 (ANOVA)、クラスカル・ウォリス (ANOVA) による、これらの統計学的分析により、並びに、カプランマイヤー及びログランク検定を用いて生残を比較することにより、治療の有効

50

性、及びその相乗的な相互作用が示された。

【0258】

驚くべきことに、発見は、原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方の完全な腫瘍の寛解と関連する、潜在的な治癒治療をもたらした、予想外の、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1及びVirR x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法の実質的な相乗作用即ち、癌抑制治療法を注射されていない離れた腫瘍における、著しく優れたアブスコパル効果を示した。これらの効果は、例外的に長い、全体の生残をもたらした。減少した腫瘍増殖、及び増加した生残における、統計的に有意な改善もまた、Ad-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法で観察された。

【0259】

Ad-p53 + CD122 / 132アゴニスト、及びチェックポイント阻害剤免疫療法：CD122 / 132アゴニスト及び抗PD-1治療と組み合わせた、Ad-p53の治療の有効性を、(原発性腫瘍及び対側腫瘍における)腫瘍体積、腫瘍の完全奏功、並びに生残を確認することにより評価した。原発性腫瘍の体積に関して、図4のグラフは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)対照、CD122 / 132、抗PD-1、CD122 / 132 + 抗PD-1、Ad-p53、又は、Ad-p53 + CD122 / 132、Ad-p53 + 抗PD-1、及びAd-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な腫瘍体積を示す。CD122 / 132、抗PD-1、及びCD122 / 132 + 抗PD-1治療法の間には深刻な腫瘍の進行があり、これらは、Ad-p53治療法と組み合わせることにより逆転した。単独の治療法のいずれかと比較して、Ad-p53 + CD122 / 132、Ad-p53 + 抗PD-1、及びAd-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の有効性は向上した。21日目までに、(PBS)、CD122 / 132、抗PD-1、CD122 / 132 + 抗PD-1、及びAd-p53で治療した群の平均腫瘍体積は全て、2,000 mm<sup>3</sup>を超えた。対照的に、Ad-p53 + CD122 / 132、Ad-p53 + 抗PD-1、及びAd-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1との併用治療はそれぞれ、非Ad-p53治療法、又はAd-p53治療のみのいずれかと比較して、腫瘍体積の大幅な減少を誘発した。21日目における腫瘍体積の、統計学的分散分析(ANOVA)により、Ad-p53 + CD122 / 132、Ad-p53 + 抗PD-1、及びAd-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値 < 0.0001)。しかし、30日目までに、Ad-p53 + CD122 / 132、及びAd-p53 + 抗PD-1治療群の平均腫瘍体積もまた、2,000 mm<sup>3</sup>を超えていた。重要なことに、30日目における腫瘍体積の統計学的分散分析(ANOVA)比較により、抗腫瘍効果の相乗作用は、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の組み合わせにおいてのみ維持された(それぞれの別の治療群と比較して、p値 < 0.0001(全体)、及びp値 < 0.0001(個別))ことが測定された。

【0260】

Ad-p53治療群：腫瘍の完全奏成功率の評価。治療法に対する腫瘍の完全奏功は、重要な治療効果と関連し、治癒性のアウトカムのために必要とされていると、一般に理解されている。p53治療群及びこれらの対照に関して、図5に示すように、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療のみが、原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方において、完全な腫瘍の寛解をもたらした。原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方の、腫瘍の完全奏功は、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群の60%にて観察され、他の治療群において、70匹の動物のいずれにおいても、原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方の腫瘍の完全奏功は存在しなかった(Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群対全ての他の治療群の動物を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によると、p値 < 0.0001; Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によると、p値 < 0.011)。予想外なことに、腫瘍の完全奏功は持続的であり、これらの腫瘍を有するこれらの動物を恐らく治癒する、Ad-p53 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群の50%において、40日後

10

20

30

40

50

も維持された。

【0261】

A d - p 5 3 治療群：対側腫瘍増殖における、全身性 / アブスコパル治療効果。対側に移植した腫瘍の原発性腫瘍治療における全身性 / アブスコパル効果を、原発性腫瘍が A d - p 5 3 治療法のうちの1つを受けた齧歯類にて、評価し、結果を図6に示す。予想外の、原発性腫瘍増殖及び完全寛解率における、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の実質的に増加した相乗効果に一致して、我々は、他の A d - p 5 3 治療群と比較して、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の驚くべき程に強力で統計的に有意なアブスコパル効果もまた、観察した。図6Aに示すように、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 の原発性腫瘍治療を受けた動物の90% (10匹の動物のうち9匹) において、対側腫瘍増殖が消滅した。対照的に、対側腫瘍増殖は、他の A d - p 5 3 治療群の動物の62.5 ~ 100%で観察された。対側腫瘍増殖のこの差は、統計的に有意であった (全ての治療群に対するカイ二乗検定による  $p$  値 = 0.0004 ; A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療群対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定による  $p$  値 < 0.0430) 図6Bは、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2、A d - p 5 3 + 抗 P D - 1、又は A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 の組み合わせのいずれかの、3つの最も効果的な原発性腫瘍治療を受ける齧歯類における、経時的な対側腫瘍体積を示すグラフを表す。22日目における、これらの対側腫瘍体積の統計学的分散分析 (ANOVA) 比較により、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された ( $p$  値 = 全体で 0.0435)。A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 群のみが、対側腫瘍増殖対 A d - p 5 3 + 抗 P D - 1 群における、統計的に有意な減少を示した ( $p$  値 = 0.0360)。これらを合わせると、全ての A d - p 5 3 治療法のうち、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療の3つの組み合わせのみが、実質的なアブスコパル効果を媒介する強力な局所及び全身抗腫瘍免疫を誘発することにより治癒の有効性をもたらしたことを、これらの発見は示す。

10

20

【0262】

A d - p 5 3 治療群：生残の持続をもたらす治療の有効性。P B S、C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1、A d - p 5 3、又は、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2、A d - p 5 3 + 抗 P D - 1、及び A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 のいずれかで治療したマウスの、カプランマイヤー生残曲線を、図7に示す。ログランク検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった (全体で  $p$  < 0.0001 ; A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療群対任意の他の治療群の比較では  $p$  値 < 0.0003)。予想できない、A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療法の実質的な相乗作用もまた、この結果は示す。A d - p 5 3 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療法の群の中央生残は、40日後にも達せず、この治療群の80%が依然として生きていた。著しく対照的に、他の治療群における動物の98% (49匹 / 50匹) は30日目までに死に、10 ~ 28日の範囲の中央生残を有した。

30

【0263】

V i r R x 0 0 7 + C D 1 2 2 / 1 3 2 アゴニスト、及びチェックポイント阻害剤免疫療法：C D 1 2 2 / 1 3 2 アゴニスト及び抗 P D - 1 治療と組み合わせた V i r R x 0 0 7 の、同様に印象的かつ予想外の治療の有効性もまた、(原発性腫瘍及び対側腫瘍における) 腫瘍体積、腫瘍の完全奏功、並びに生残を確認することにより観察された。原発性腫瘍の体積に関して、図8のグラフは、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 対照、C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1、C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1、V i r R x 0 0 7、又は、V i r R x 0 0 7 + C D 1 2 2 / 1 3 2、V i r R x 0 0 7 + 抗 P D - 1、及び V i r R x 0 0 7 + C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な腫瘍の体積を示す。C D 1 2 2 / 1 3 2、抗 P D - 1、及び C D 1 2 2 / 1 3 2 + 抗 P D - 1 治療法の間には深刻な腫瘍の進行があり、これらは、V i r R x 0 0 7 治療法と組み合わせることにより逆転した。単独の治療法のいずれかと比較しての、V i

40

50

Vir R x 0 0 7 + 抗PD - 1 及び Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療の向上した有効性を、結果は示す。Ad - p 5 3 を用いる発見とは対照的に、Vir R x 0 0 7 は、CD 1 2 2 / CD 1 3 2 治療との相乗作用を示さなかった。30日目までに、PBS、CD 1 2 2 / 1 3 2、抗PD - 1、CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1、Vir R x 0 0 7、及び Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / CD 1 3 2 で治療した群の平均腫瘍体積は全て、2,000 mm<sup>3</sup> を超えた。対照的に、Vir R x 0 0 7 + 抗PD - 1 及び Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 との組み合わせ治療のそれぞれは、非Vir R x 0 0 7 治療法、又は Vir R x 0 0 7 治療のみのいずれかと比較して、腫瘍体積の大きな減少を誘発した。30日目における腫瘍体積の統計学的分散分析 (ANOVA) 比較により、Vir R x 0 0 7 + 抗PD - 1 及び Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療の、抗腫瘍効果の相乗作用が測定された (全体、及び、これらの治療対 Vir R x 0 0 7 のそれぞれに関して、p 値 < 0.0001)。Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療は、Vir R x 0 0 7 + 抗PD - 1 よりも優れていた (p 値 = 0.0002)。驚くべきことに、Vir R x 0 0 7 の単剤療法と比較して、Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 の組み合わせ治療の明らかな利点はなかったものの、Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 を組み合わせる三重治療法に関して、相乗作用が示された。

10

#### 【0264】

Vir R x 0 0 7 治療群 - 腫瘍の完全奏功率の評価。治療法に対する腫瘍の完全奏功は、重要な治療効果と関連し、治癒性のアウトカムのために必要とされていると、一般に理解されている。Vir R x 0 0 7 治療群及びこれらの対照に関して、図9に示すように、Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療のみが、原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方の、完全な腫瘍寛解をもたらした。原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方の、腫瘍の完全奏功は、Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療群の60%にて観察され、他の治療群において、70匹の動物のいずれにおいても、原発性腫瘍及び対側腫瘍の両方の腫瘍の完全奏功は存在しなかった (Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療群対全ての他の治療群の動物を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によると、p 値 < 0.0001; Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定によると、p 値 < 0.011)。予想外なことに、腫瘍の完全奏功は持続的であり、これらの腫瘍を有するこれらの動物を恐らく治癒する、Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療群の50%において、40日後も維持された。

20

30

#### 【0265】

Vir R x 0 0 7 治療群 - 対側腫瘍増殖における、全身性/アブスコパル治療の効果。対側に移植した腫瘍の原発性腫瘍治療における全身性/アブスコパル効果を、原発性腫瘍が Vir R x 0 0 7 治療法のうちの1つを受けた齧歯類にて、評価し、結果を図10に示す。予想外の、原発性腫瘍増殖及び完全寛解率における、Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療の実質的に増加した相乗効果に一致して、我々は、他の Vir R x 0 0 7 治療群と比較して、Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療の驚くべき程に強力で、とても統計的に有意なアブスコパル効果もまた、観察した。図10Aに示すように、Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 原発性腫瘍治療を受ける動物の80%において、対側腫瘍増殖が消失した。対照的に、対側腫瘍増殖は、他の Vir R x 0 0 7 治療群の動物の80~100%で観察された。対側腫瘍増殖のこの差は、統計的に有意であった (全ての治療群を比較するカイ二乗検定による p 値 = 0.0002; Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療群対あらゆる他の治療群を比較する、フィッシャーの両側正確確率検定による p 値 < 0.0230)。Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1 治療の組み合わせが、強力な全身性抗腫瘍免疫を誘発し、潜在的な治癒の有効性を有する、実質的なアブスコパル効果を媒介したことを、これらの発見は示唆する。図10Bは、Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2、Vir R x 0 0 7 + 抗PD - 1、又は Vir R x 0 0 7 + CD 1 2 2 / 1 3 2 + 抗PD - 1

40

50

のいずれかの、3つの最も効果的な原発性腫瘍の組み合わせ治療を受ける齧歯類における、経時的な対側腫瘍体積を示すグラフを表す。22日目における、これらの対側腫瘍体積の統計学的分散分析(ANOVA)比較により、Vir R x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値 = 全体で0.0171)。Vir R x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1群のみが、対側腫瘍増殖対Vir R x 007 + 抗PD-1群における、統計的に有意な減少を示した(p値 = 0.0115)。これらを合わせると、全てのVir R x 007治療法のうち、Vir R x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の3つの組み合わせのみが、実質的なアブスコパル効果を媒介する強力な局所及び全身抗腫瘍免疫を誘発することにより治療の有効性をもたらしたことを、これらの発見は示す。

10

## 【0266】

Vir R x 007治療群 - 生残の持続をもたらす治療の有効性。PBS、CD122 / 132 + 抗PD-1、Vir R x 007、又は、Vir R x 007 + CD122 / 132、Vir R x 007 + 抗PD-1、及びVir R x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1の組み合わせのいずれかで治療したマウスの、カプランマイヤー生残曲線を、図11に示す。ログランク検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった(全体で $p < 0.0001$ ; Vir R x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療群対任意の他の治療群の比較では $p < 0.0005$ )。予想できない、Vir R x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法の実質的な相乗作用もまた、この結果は示す。Vir R x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法の群の中央生残は、40日後にも達せず、この治療群の90%が依然として生きていた。著しく対照的に、他の治療群における動物の98%(49匹/50匹)は40日目までに死に、10~33日の範囲の中央生残を有した。驚くべきことに、Vir R x 007の単剤療法と比較して、Vir R x 007 + CD122 / 132の組み合わせ治療の、明らかな生残の利点はなかったものの、Vir R x 007 + CD122 / 132 + 抗PD-1を組み合わせる三重治療法に関して、相乗作用が示された。

20

## 【0267】

Ad-IL24 + CD122 / 132アゴニスト、及びチェックポイント阻害剤免疫療法: CD122 / 132アゴニスト及び抗PD-1治療と組み合わせたAd-IL24の、類似の優れた治療の有効性もまた、原発性腫瘍の体積と生残を評価することにより、観察した。原発性腫瘍の体積に関して、図12のグラフは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)対照、CD122 / 132、抗PD-1、CD122 / 132 + 抗PD-1、Ad-IL24、又は、Ad-IL24 + CD122 / 132及びAd-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な腫瘍の体積を示す。CD122 / 132、抗PD-1、及びCD122 / 132 + 抗PD-1治療法の間には深刻な腫瘍の進行があり、これらは、Ad-IL24治療法と組み合わせることにより逆転した。単独の治療法のいずれかと比較して、Ad-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療では有効性が向上した。16日目までに、PBS、CD122 / 132、抗PD-1、CD122 / 132 + 抗PD-1、及びAd-IL24で治療した群の平均腫瘍体積は全て、2,000mm<sup>3</sup>を超えた。対照的に、Ad-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1との組み合わせ治療は、非Ad-IL24治療法、又はAd-IL24治療法のみと比較して、腫瘍体積の実質的な減少を誘発した。16日目における腫瘍体積の、統計学的分散分析(ANOVA)により、Ad-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値 < 0.0001)。Ad-IL24(p = 0.0025)又はCD122 / 132 + 抗PD-1治療(p値 < 0.0001)のいずれかと比較して、Ad-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療では、腫瘍体積が統計的に有意に減少した。

30

40

## 【0268】

Ad-IL24治療群 - 生残の持続をもたらす治療の有効性。PBS、CD122 / 132 + 抗PD-1、Ad-IL24、又はAd-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD

50

- 1の組み合わせのいずれかで治療したマウスの、カプランマイヤー生残曲線を、図13に示す。ログランク検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった ( $p < 0.0001$ )。予想できない、Ad-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法の実質的な相乗作用を、この結果は示す。Ad-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法の群の中央生残は、相乗的に向上した。PBS、CD122 / 132 + 抗PD-1、及びIL24治療群の全ての動物は、16日目までに死んだが、Ad-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法の群の動物の50%は、19日目にて生きていた。Ad-IL24のみ ( $p = 0.0003$ ) 又はCD122 / 132 + 抗PD-1治療群 ( $p < 0.0001$ ) のいずれかと比較して、統計的に有意に改善された生残を、Ad-IL24 + CD122 / 132 + 抗PD-1治療法の群は示した。興味深いことに、CD122 / 132 + 抗PD-1の対と比較して、Ad-IL24 + CD122 / 132の対は驚くほど優れた有効性を有した (ログランク検定による  $p = 0.0002$ 、データは図示せず)。

10

#### 【0269】

Ad-ルシフェラーゼ (Ad-Luc) を用いる陰性対照。Ad-Luc対照 + CD122 / 132アゴニスト + 抗PD-1：腫瘍体積。図14のグラフは、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 対照、CD122 / 132、抗PD-1、CD122 / 132 + 抗PD-1、Ad-Luc対照、又は、Ad-Luc対照 + CD122 / 132、Ad-Luc対照 + 抗PD-1、及びAd-Luc対照 + CD122 / 132 + 抗PD-1の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な原発性腫瘍の体積を示す。Ad-p53、VirRx007、及びAd-IL24を用いる治療とは対照的に、Ad-Lucを抗PD-1、CD122 / 132、又はCD122 / 132 + 抗PD-1治療と組み合わせたときに、治療の有効性の有意な増加は存在しなかった。16日目までに、全ての群の平均腫瘍体積は2,000 mm<sup>3</sup>を超えた。16日目における腫瘍体積の、統計学的分散分析 (ANOVA) は、統計的に有意ではなかった ( $p$  値 = 0.1212、これらのあらゆる治療群の間での平均腫瘍体積が、統計的に有意ではなかった)。

20

#### 【0270】

CD122 / 132 + 抗PD-1を用いるAd-Luc陰性対照と比較しての、それぞれ、CD122 / 132 + 抗PD-1と組み合わせた、Ad-p53、VirRx007、及びAd-IL24の「三重治療法」との優秀性。生残に関して、それぞれCD122 / 132 + 抗PD-1と組み合わせた、Ad-p53、VirRx007、及びAd-IL24との「三重治療法」はそれぞれ、Ad-Luc + CD122 / 132 + 抗PD-1による治療と比較して、生残を統計的に有意に増加させたことを、図15は明らかにする。ログランク検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった ( $p < 0.0001$ )。CD122 / 132 + 抗PD-1三重治療法と組み合わせた、Ad-p53、VirRx007、及びAd-IL24のそれぞれは、Ad-Luc + CD122 / 132 + 抗PD-1三重治療法対照と比較して、統計的に有意な生残の増加を示した (ログランク検定によると、CD122 / 132 + 抗PD-1三重治療法と組み合わせたAd-p53及びVirRx007は共に、 $p$  値  $< 0.0001$  ; CD122 / 132 + 抗PD-1と組み合わせたAd-IL24は  $p < 0.015$ )。

30

40

#### 【0271】

CD122 / CD132アゴニストが組み換えマウスIL-15及びIL-15-R - Fcからなる場合の実験。これらの研究において、これらの試薬を共に、37Cで30分間インキュベートすることで選択性CD122 / CD132アゴニストを調製し、得られる免疫複合体を、腫瘍が触知可能になった後の3、5、及び7日目に腹腔内注射する。

#### 【0272】

Ad-p53 + CD122 / 132 (IL15)アゴニスト、及びチェックポイント阻害剤免疫療法 - 腫瘍体積：IL15ベースのCD122 / 132アゴニスト及び抗PD-1治療と組み合わせた、Ad-p53の治療の有効性を、(原発性腫瘍及び対側腫瘍における) 腫瘍体積、並びに生残を確認することで評価した。原発性腫瘍体積に関して、図1

50

6のグラフは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)対照、CD122/132+抗PD-1、Ad-p53のみ、又は、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1の組み合わせのいずれかを受ける齧歯類における、経時的な腫瘍の体積を示す。PBS、CD122/132+抗PD-1、及びAd-p53治療の間には、深刻な腫瘍の進行があった。上述の、初期のAd-p53組み合わせ治療の結果と一致して、あらゆる治療法と比較して、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療では、実質的に有効性が向上した。30日目までに、PBS、CD122/132+抗PD-1、及びAd-p53で治療した群の平均腫瘍体積は、全て2,000mm<sup>3</sup>を超えた。対照的に、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1を用いる組み合わせ治療は、腫瘍体積の大きな減少を誘発した。腫瘍体積の統計学的分散分析(ANOVA)により、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値<0.0001(全体)、及び、それぞれの別の治療群と個別に比較したp値<0.0001)。

10

#### 【0273】

Ad-p53+CD122/132(IL15)アゴニスト、及びチェックポイント阻害剤免疫療法-対側腫瘍増殖における全身性/アブスコパル治療効果。対側に移植した腫瘍の原発性腫瘍治療における全身性/アブスコパル効果を、原発性腫瘍がAd-p53治療法のうちの1つを受けた齧歯類にて、評価し、結果を図17に示す。図16に示す原発性腫瘍増殖における、予想しなかった、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療の実質的に増加した相乗効果に一致して、我々は、他のAd-p53治療群と比較して、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療の驚くべき程に強力で非常に統計的に有意なアブスコパル効果もまた、観察した。図17は、Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1、又はAd-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1の組み合わせのいずれかの、原発性腫瘍治療を受ける齧歯類における、経時的な対側腫瘍体積を示すグラフを表す。22日目における、これらの対側腫瘍体積の統計学的分散分析(ANOVA)比較により、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療の抗腫瘍効果の相乗作用が測定された(p値=全体で0.0433)。Ad-p53+CD122/132+抗PD-1群のみが、対側腫瘍増殖対Ad-p53+抗PD-1群における、統計的に有意な減少を示した(p値=0.0359)。

20

30

#### 【0274】

Ad-p53+CD122/132(IL15)アゴニスト、並びにチェックポイント阻害剤免疫療法-生残の持続をもたらす治療効果。PBS、CD122/132+抗PD-1、Ad-Luc+CD122/132+抗PD-1対照、Ad-p53、又はAd-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1の組み合わせのいずれかで治療したマウスの、カプランマイヤー生残曲線を、図18に示す。ログランク検定によると、これらの生残曲線には統計的な有意差があった(全体でp<0.0001、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療群対任意の他の治療群を比較するp値<0.0001)。結果は、予想外の、Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療法の実質的な相乗作用を更に示す。Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治療法の群において、動物の50%が36日目に生きていた。著しく対照的に、他の治療群の全ての動物は、22日目までに死に、10~18日の範囲の中央生残を有した。

40

#### 【0275】

実施例2-局所領域及び全身投与の両方のための、PI3K/阻害剤と組み合わせた、N1L欠損、IL12発現、及び選択性CD122/CD132アゴニストで改変したワクシニアベクターを用いる適用

この治療用アプローチの別の実施形態において、VV15-N1L-IL12と呼ばれる新規の腫瘍崩壊性ワクシニアウイルスを、追加の治療用ウイルスとして用い、上記実施例1に記載するアプローチの有効性を向上させる。いくつかの腫瘍崩壊性ワクシニア

50

ウイルスの株、例えばWestern Reserve、Wyeth、及びLister株が報告されている。これらの株のそれぞれの、様々な欠損変異体が作製されている。Wang et al (国際公開第2015/150809A1号の特許)は、向上した選択性及び抗腫瘍有効性を示す、不活性化N1L遺伝子を有するTK欠失ワクシニアウイルス株を開発している。N1Lは、感染した細胞のアポトーシス、及び、NF-kB活性化を阻害すると考えられている。N1L遺伝子の欠損は、ナチュラルキラー(NK)細胞応答の制御に加えて、NF-kBにより制御されるプロ炎症性の抗ウイルスサイトカインの増加をもたらすことが示されている。N1L欠損誘導体は、Wang et al., 2015 (国際公開第2015/150809A1号の特許)に記載されている。VVL 15N1L、GM-CSF、IL-12、IL-21の抗腫瘍有効性を向上させるために、癌抑制因子及び他の治療用遺伝子を、VVL 15N1LベクターのN1L領域に挿入する。これらの治療用「アームド」VVL 15N1Lベクターを、上記実施例1に記載する治療と1つずつ、又は複数で組み合わせて使用し、治療の局所及びアブスコパル効果を向上させる。

#### 【0276】

上記実施例1及び2に記載するアプローチを評価することに加えて、ウイルスベクターもまた、PI3K阻害剤と組み合わせる。PI3K 又はPI3K / 阻害剤を組み込む例を記載して、ウイルスベクターの静脈内投与を向上させる。動物は、尾静脈を通して75 mg · kg<sup>-1</sup>の濃度でIC87114 (PI3K 阻害剤)を受け、3時間後に、100 µLのPBS中に1 × 10<sup>8</sup> PFU/マウスにて、静脈内VVL 15N1Lベクターを受ける。この治療を、0日目、3日目、及び5日目に少なくとも3回、与える。これらの治療を、上述したものと同一治療法と組み合わせる。腫瘍のサイズと動物の生残を測定し、データを上述のとおり分析すると、Ad-p53及び/又はAd-IL24及び/又はVVL 15N1Lベクター、CD122 / CD132アゴニスト、免疫チェックポイント阻害剤、並びにPI3K阻害剤と組み合わせた治療の有効性の増加を示す。

#### 【0277】

実施例3 - 免疫両方を含む以前の治療の患者の進行における、腫瘍内Ad-p53、CD122 / CD132アゴニスト、及び抗PD-1治療を含む併用療法。

各バイアル瓶当たり2 mLの体積にて、Ad-p53を供給し、1 mL当たり1 × 10<sup>12</sup>のウイルス粒子(vp)を含有する。Ad-p53は、安定剤として10% (v/v)グリセロールを含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に、滅菌したウイルス性懸濁液として提供される。投与前に、操作を記載する手順に従い、Ad-p53を希釈してフィルタにかける。抗PD-1治療法を、FDAが認可した添付文書の取扱説明書に従い投与する。CD122 / CD132アゴニスト治療法(例えば、IL-2 / 抗IL-2免疫複合体、IL-15 / 抗IL-15免疫複合体、IL-15 / IL-15受容体 - IgG1-Fc (IL-15 / IL-15R - IgG1-Fc)免疫複合体、PEG化IL-2、PEG化IL-15、IL-2ムテイン及び/又はIL-15ムテイン)を、毎週、隔週、3週間に1回、4週間に1回の範囲の間隔で、皮下又は経静脈投与のいずれかで投与する場合、5 ~ 100 µg / kgの範囲の用量で投与する。CD122 / CD132アゴニストは、ALT-803などの、IL-15受容体 / IgG1 Fc融合タンパク質に結合したIL-15変異体(例えば、IL-15N72D)であることができる。

#### 【0278】

治療は、例えば、Ad-p53、選択性CD122 / CD132アゴニスト、及び抗PD-1抗体を用いる治療により、HNSCCが進行した患者の予後を改善するように設計されている。併用療法の臨床的有効性には、全体の奏効率の評価[ORR = 部分奏功(PR) + 完全奏功(CR)]、完全寛解率(CRR)、持続性奏効率(DRR = 少なくとも6ヶ月間維持されるPR + CR); 内臓器官への転移に関する速度及び時間; 無進行生存(PFS)及び全体の生残(OS)が含まれる。リンパ球表現型及び血清サイトカイン、病気に関係するバイオマーカー、選択した抗原に対する抗体応答、並びに、腫瘍抗原に対する体液性応答及び細胞応答における、研究薬物の効果もまた、評価する。有効性の工

ンドポイントは、診断分析における、PD-L1、PD-L2、免疫細胞浸潤物、及び腫瘍変異負荷バイオマーカーと相関する。

【0279】

患者は28日毎に、1、2、及び3日目に、Ad-p53の腫瘍内注射を受ける。5日目に始まる、2週間毎のニボルマブ注入、並びに、選択性CD122/CD132アゴニスト治療法（例えば、IL2/抗IL2免疫複合体、及び/又はIL15/抗IL15免疫複合体、及び/又はIL15/IL15受容体-IgG1-Fc(IL15/IL15R-IgG1-Fc)免疫複合体、及び/又はPEG化IL2、及び/又はPEG化IL15、及び/又はIL2ムテイン、及び/又はIL15ムテイン)を、毎週、隔週、3週間に1回、4週間に1回の範囲の間隔で、皮下又は経静脈投与のいずれかで投与する場合、5~100µg/kgの範囲の用量で投与する。

10

【0280】

表3に記載する腫瘍損傷の直径に基づく、Ad-p53注射用量(mL)及びAd-p53注射法の決定。表3は、CT又はMRIスキャンで測定した、2次元の損傷直径に対応する、各腫瘍損傷に対するAd-p53の注射用量(mL)を識別するために使用されなければならない。Ad-p53の注射用量(mL)を、 $1 \times 10^{12}$ のウイルス粒子(vp)/mLを含有する、提供される2mLのバイアル瓶から差し引かなければならない。記載する損傷の直径に対応するAd-p53の注射用量(mL)は、 $1 \text{ cm}^3$ の腫瘍体積当たり、少なくとも、 $1 \times 10^{11}$ のウイルス粒子(vp)のAd-p53用量を受ける各腫瘍損傷をもたらす。この治療用量は、以前のAd-p53臨床試験の腫瘍応答、生

20

【0281】

全ての腫瘍損傷が治療されるはずである。しかし、Ad-p53のMTDが1治療日当たり $2.5 \times 10^{13}$ vpであるため、Ad-p53注射用量(mL)の総計は、25mL未満でなければならない。下表は、Ad-p53の注射用量(mL)に基づき、各損傷に利用される、対応するAd-p53の注射法を一覧に記載する。Ad-p53の注射用量(mL)の量に基づき、下表に列挙した各損傷に対してのAd-p53注射法を用いる。添付文書の取扱説明書に従うと、細針シリンジ技術により、2mL以下のAd-p53注射用量(mL)が投与されなければならないが、以下に示すQuadrifuseデバイスを用いるのであれば、4mL以下のAd-p53注射用量(mL)が投与されなければならない。

30

【0282】

【表 3】

表 3：損傷の直径に基づく、A d - p 5 3 注射用量 (m L) 及び A d - p 5 3 注射法。

損傷の直径 <sup>a</sup> (c m) (L × W)	A d - p 5 3 の注射用量 <sup>b</sup> (m L)	A d - p 5 3 の注射法 <sup>c</sup>
1 x 1	1	細針シリンジ
2 x 1	2	細針シリンジ
2 x 2	2	細針シリンジ
3 x 2	2	細針シリンジ
3 x 3	2	細針シリンジ
4 x 1	2	細針シリンジ
4 x 2	2	細針シリンジ
4 x 3	2	細針シリンジ
4 x 4	4	Q u a d r a - F u s e
5 x 2	2	細針シリンジ
5 x 3	2	細針シリンジ
5 x 4	4	Q u a d r a - F u s e
5 x 5	6	Q u a d r a - F u s e
6 x 2	2	細針シリンジ
6 x 3	4	Q u a d r a - F u s e
6 x 4	5	Q u a d r a - F u s e
6 x 5	8	Q u a d r a - F u s e
6 x 6	1 2	Q u a d r a - F u s e
7 x 2	2	細針シリンジ
7 x 3	4	Q u a d r a - F u s e
7 x 4	6	Q u a d r a - F u s e
7 x 5	8	Q u a d r a - F u s e
7 x 6	1 2	Q u a d r a - F u s e
7 x 7	1 8	Q u a d r a - F u s e
8 x 2	2	細針シリンジ
8 x 3	4	Q u a d r a - F u s e
8 x 4	6	Q u a d r a - F u s e
8 x 5	1 0	Q u a d r a - F u s e
8 x 6	1 4	Q u a d r a - F u s e
8 x 7	2 0	Q u a d r a - F u s e
8 x 8	2 4	Q u a d r a - F u s e
9 x 2	2	細針シリンジ
9 x 3	4	Q u a d r a - F u s e
9 x 4	8	Q u a d r a - F u s e
9 x 5	1 2	Q u a d r a - F u s e
9 x 6	1 6	Q u a d r a - F u s e
9 x 7	2 2	Q u a d r a - F u s e
1 0 x 2	2	細針シリンジ
1 0 x 3	4	Q u a d r a - F u s e
1 0 x 4	8	Q u a d r a - F u s e
1 0 x 5	1 2	Q u a d r a - F u s e
1 0 x 6	1 8	Q u a d r a - F u s e
1 0 x 7	2 4	Q u a d r a - F u s e

10

20

30

40

a：損傷の直径 - L は長いほうの直径で、W は短いほうの直径 (c m) である (最も近い整数に切り上げ)。b：1 c m<sup>3</sup> の腫瘍体積当たり、約  $1 \times 10^{11}$  のウイルス粒子 (

50

v p) の A d - p 5 3 用量を受ける各腫瘍損傷をもたらす、 $1 \times 10^{12}$  v p (ウイルス粒子) / m L を含有するバイアル瓶からの、A d - p 5 3 の注射用量 (m L)。A d - p 5 3 の M T D が 1 治療日当たり  $2.5 \times 10^{13}$  v p であるため、A d - p 5 3 の注射用量 (m L) の総計は、25 m L 未満でなければならない。c : A d - p 5 3 の注射法。

【0283】

A d - p 5 3 の注射法 : A d - p 5 3 の注射用量 (m L) の量に基づき、表 3 に列挙した各損傷に対しての A d - p 5 3 注射法を用いる。細針シリンジ技術により、2 m L 以下の A d - p 5 3 注射用量 (m L) が投与されなければならないが、記載の Q u a d r a - F u s e デバイスを用いるのであれば、2 m L を超える A d - p 5 3 注射用量 (m L) が投与されなければならない。

10

【0284】

2 m L 以下の A d - p 5 3 の注射用量 (m L) 用の細針シリンジ : A d - p 5 3 の注射用量 (m L) が 2 m L 以下である場合の損傷に関して、A d - p 5 3 の注射用量 (1 又は 2 m L のいずれか) は、27 ゲージ針を備えた標準的な 1 m L シリンジを用いて送達されなければならない。A d - p 5 3 の全注射用量 (m L) の 4 分の 1 を、針を配置する腫瘍損傷の各四分円に、各四分円内での注射の分配を最大しながら、注射しなければならない。

【0285】

2 m を超える A d - p 5 3 の注射用量 (m L) のための、Q u a d r a - F u s e デバイス : A d - p 5 3 の注射用量 (m L) が 2 m L を超える場合の損傷に関して、A d - p 5 3 の注射用量は、Q u a d r a - F u s e 送達デバイス (R e x M e d i c a l , P A) を使用して送達されなければならない。Q u a d r a - F u s e デバイス (F D A 1 等級の医療用デバイス) は 1 つの中央トロカールから構成され、ここから 3 つの尖叉が、調節可能な 1 ~ 5 c m 直径の放射状方向に延びる (図 3)。

20

【0286】

以下に詳述するように、Q u a d r a - F u s e デバイスは、損傷の複数領域に薬物を正確かつ拡散して、同時に送達することを可能にする。

【0287】

1 . 腫瘍損傷の 2 次元直径に一致する、表 3 の A d - p 5 3 の注射用量 (m L) を、標準的なシリンジに引き出し、Q u a d r a - F u s e デバイスの拡張管材に取り付ける。

30

【0288】

2 . 腫瘍損傷の下半分をまず治療し、デバイスの深度マーカーを使用して、損傷の最も長い長さ直径 (L) の底部に、Q u a d r a - F u s e の中央トロカール端を配置し、C T 又は超音波ガイダンスの下で、損傷の最も長い直径に一致させる。Q u a d r a - F u s e デバイスの尖叉アレイ治療直径を、腫瘍損傷の最も短い幅直径 (W) の 1 c m 未満に調節する (尖叉アレイ治療直径 = 幅腫瘍直径 - 1 c m)。Q u a d r a - F u s e デバイスを尖叉アレイ治療直径に調節した後、尖叉を開けて、A d - p 5 3 の 4 分の 1 の注射用量 (m L) をこの位置に送達する。(注 : 各損傷の 4 つ全ての A d - p 5 3 の注射用量注射に対して、同じ尖叉アレイ治療直径を用いる。) 尖叉を収縮させて、デバイスを同じ深さで 60 ° 回転させる。次に、尖叉を再度開けて、A d - p 5 3 の、2 番目の 4 分の 1 の注射用量 (m L) を、この位置に送達する。これらの手順により、A d - p 5 3 の治療量の半分が、腫瘍損傷の下半分に効率的に送達される。

40

【0289】

3 . 腫瘍損傷の上半分を治療するために、尖叉を再び収縮し、中央トロカール端を、腫瘍損傷の最長の L 直径の中点まで移動させる。尖叉を再び、尖叉アレイ治療直径 (= 幅腫瘍直径 - 1 c m) まで延ばし、A d - p 5 3 の 3 番目の 4 分の 1 の注射用量 (m L) を、この位置に送達する。尖叉を収縮させて、デバイスを同じ中点の腫瘍の深さで 60 ° 回転させる。次に、尖叉を再度開けて、A d - p 5 3 の、最後の 4 分の 1 の注射用量 (m L) を、この位置に送達する。

【0290】

50

このようにして、各腫瘍損傷における合計で48部位が、Ad-p53を受ける。それぞれの尖叉アレイ展開当たりで、各尖叉は、合計で12箇所の同時薬物注入のための、2つの貫通孔(4つの流体出口)を有する(4つの尖叉アレイ展開×12=48箇所のAd-p53送達部位)。

【0291】

5×4cmの腫瘍損傷の治療：表3に記載のとおり、L(最長直径)が5cm、及びW(最短直径)が4cmの損傷直径を有する腫瘍を、Quadra-Fuse Ad-p53注射法により、4mLのAd-p53の注射用量で治療する。

【0292】

CT又はUSガイダンスの下でQuadra-Fuseの中央トロカール端を最初に配置するのは、より長いL=5cmの腫瘍直径の底部でなければならない。尖叉を3cm(幅腫瘍直径4cm-1cm=3cm)の尖叉アレイ治療直径まで拡張する必要があり、最初の4分の1の治療用量(1mL)を注入する。(注：この損傷の4つ全てのAd-p53の注射用量注入に対して、同じ尖叉アレイ治療直径を用いる。)尖叉を収縮させて、デバイスを、腫瘍の5cm深さの同じ底部で60°回転させる。尖叉を、3cmの尖叉アレイ治療直径まで再度拡張して、Ad-p53の、2番目の4分の1の1mL用量を注入する。これらの手順により、Ad-p53の注射用量の半分が、腫瘍の下半分に送達される。

10

【0293】

腫瘍損傷の上半分を治療するために、Quadra-Fuse中央トロカールの深さを、最長の損傷直径=2.5cmの中点まで上げる。尖叉を再び、3cmの尖叉アレイ治療直径まで拡張し、3番目の4分の1の、治療用量(1mL)を注入する。最長の腫瘍直径に沿って、同じ腫瘍内深さ(2.5cm)を維持しながら、尖叉を収縮し、中央トロカールを60°回転させて、尖叉を3cmの尖叉アレイ治療直径まで再度拡張し、4番目であり最終の4分の1の、1mLのAd-p53用量を注入する。これらの手順により、Ad-p53の注射用量の半分が、腫瘍の上半分に送達される。まとめると、これらの手順で、4mLのAd-p53が、腫瘍損傷内の48箇所の注入点に送達される。

20

【0294】

治療期間：1回の治療の期間は28日(4週間)である。治療サイクルの1日目は、研究治療投与の最初の日である。治療レジメンは以下のとおりである：

30

【0295】

治療レジメン：Ad-p53を用いるスケジュールされた治療日は、28日毎に1、2、及び3日目である。ニボルマブは、5日目から始まって、2週間毎に投与される。抗PD-1治療法を、FDAが認可した添付文書の取扱説明書に従い投与する。選択性CD122/CD132アゴニスト治療法(例えば、IL2/抗IL2免疫複合体、及び/又はIL15/抗IL15免疫複合体、及び/又はIL15/IL15受容体-IgG1-Fc(IL15/IL15R-IgG1-Fc)免疫複合体、及び/又はPEG化IL2、及び/又はPEG化IL15、及び/又はIL2ムテイン、及び/又はIL15ムテイン)を、毎週、隔週、3週間に1回、4週間に1回の範囲の間隔で、皮下又は経静脈投与のいずれかで投与する場合、5~100µg/kgの範囲の用量で投与する。

40

【0296】

研究の28又は29日目に、腫瘍の位置及び測定値を評価するための検査を終わらせ、その後で、新しい治療サイクルを開始する。

【0297】

局所での病気の進行(治療可能な新規の損傷を除く)、又は許容されない有害事象が生じる場合を除き、患者は、3回又はそれ以上のサイクルで治療される。

【0298】

有効性評価の基準：

1. CT又はMRIにより、腫瘍のサイズを監視する。測定は研究の28又は29日目に実施し、この後で、CT又はMRIの場合、3回目のサイクルの1日目の注射を行い、

50

8週間毎にスキャンする。RECIST 1.1基準を適用する。

2. 奏効期間は、応答日から進行日まで経過した時間として定義される。

3. 無進行生存は、無作為化の日から、進行を記録した日まで経過した時間として定義される。

4. 全体の生残は、無作為化から死亡した日まで経過した時間として定義される。

5. 有効性のエンドポイントは、診断分析における、PD-L1、PD-L2、免疫細胞浸潤物、及び腫瘍変異負荷バイオマーカーと相関する。

【0299】

安全性の評価：

1. 有害事象の報告。

2. CBC、生化学、及び尿検査を含む、身体検査、生命徴候、実験室試験。

3. 抗体試験による、アデノベクターの体内分布。

10

【0300】

治療及び研究患者含有基準のために、Ad-p53有効性の好ましいバイオマーカーが必要であり、Sobol et al., 2012に記載されているように、免疫組織化学により、野生型p53遺伝子配列、又は20%未満のp53-陽性腫瘍細胞のいずれかが挙げられる。

【0301】

再発性HNSCCにおける、抗PD-1の近年のブレイクスルーをもたらす任命、及び認可の加速の観点から、我々は、再発性HNSCC患者において、Ad-p53治療データのメタ分析を行い、可能性のある治療用量とスケジュールを識別し、公表された抗PD-1の結果を改善した。メタ分析には、大多数が以前の手術、放射線及び白金ベースの化学療法を受けた、好ましいp53バイオマーカープロファイルを有する、再発性HNSCCの患者(n=54)を伴った。メタ分析において、最も高い奏効率が臨床試験で観察され、これには、最初に1週間の間の3日連続の治療、又は、各月の治療サイクルの最初の2週間に隔週、のいずれかで、1週間当たり3回の治療スケジュールで、Ad-p53が腫瘍内投与された。奏功者(RECIST 1.1基準により定義される)は全て、1cm<sup>3</sup>の腫瘍体積当たり、7 x 10<sup>10</sup>のウイルス粒子を超えるAd-p53の用量を受けた。

20

【0302】

下表に示すように、より少ないAd-p53用量で治療を受けた患者と比較して、7 x 10<sup>10</sup>のウイルス粒子/cm<sup>3</sup>を超えて治療を受けた患者の腫瘍奏功には、統計的な有意差が存在した(7 x 10<sup>10</sup>のウイルス粒子/cm<sup>3</sup>を超えるAd-p53については、31%(9/29)の腫瘍奏功に対して、7 x 10<sup>10</sup>のウイルス粒子/cm<sup>3</sup>未満のAd-p53については、0%(0/25); p = 0.0023)。

30

【0303】

【表6】

表6. Ad-p53用量HNSCCによる、RECIST標的損傷の奏効率

用量Ad-p53 v p / cm <sup>3</sup>	奏功者の数	非奏功者の数	奏効率の割合	P値 フィッシャーの2両側正確確率検定
> 7 x 10 <sup>10</sup>	9	20	31.0% (9/29)	0.0023
< 7 x 10 <sup>10</sup>	0	25	0% (0/25)	

40

【0304】

図1は、7 x 10<sup>10</sup>のウイルス粒子/cm<sup>3</sup>未満のAd-p53用量(右パネル)と比較した、7 x 10<sup>10</sup>のウイルス粒子/cm<sup>3</sup>を超えるAd-p53(左パネル)で治療した患者亜群に対する、腫瘍奏功のウォーターフォールプロットを示す。

【0305】

奏功者の大部分(7/9の患者)が、1 x 10<sup>11</sup> v p / cm<sup>3</sup>付近、又はこれを超過

50

する (  $7.81 \sim 333.2 \times 10^{10} \text{ v p / cm}^3$  ) Ad - p 5 3 の用量を受けたことが、Ad - p 5 3 奏功者の更に詳細な調査により明らかとなった。

【 0 3 0 6 】

以前のフェーズ3再発性HNSCC臨床治験で、好ましいAd - p 5 3 バイオマーカープロファイルを有する、メトトレキサートで治療した患者と比較した、 $7 \times 10^{10}$  のウイルス粒子 /  $\text{cm}^3$  を超えるAd - p 5 3 用量で治療した、好ましいAd - p 5 3 バイオマーカープロファイルを有する患者の、1年及び全体の生残。結果を図2に示し、メトトレキサートと比較して、Ad - p 5 3 バイオマーカー及び用量最適化Ad - p 5 3 治療に関する全体生残の、統計的に有意な増加を示す ( Ad - p 5 3 治療の中央生残 : 11.5ヶ月に対して、メトトレキサートでは4.5ヶ月 ;  $p < 0.016$ 、HR 1.9767 )。

10

【 0 3 0 7 】

表4に示すとおり、メタ分析データからの最適なAd - p 5 3 再発性HNSCC治療は、腫瘍奏功の有効性エンドポイント、1年生残、及び全体の中央生残に関して、Ferris et al., 2016により報告された、標準治療 (SOC) 化学療法及び抗PD - 1治療に匹敵した。

【 0 3 0 8 】

【表4 - 1】

表4 : 再発性頭頸部扁平上皮細胞癌 (HNSCC) における、有効性エンドポイント Ad - p 5 3、標準治療 (SOC) 及び抗PD - 1の比較

20

有効性 エンドポイント	標準治療	Ad - p 5 3 *	抗PD - 1
腫瘍奏功	約5%	31%	16%
1年生残	16.6%	40.0%	36.6%
中央生残	5.1か月	11.5ヶ月	7.5ヶ月

\* N = 30、予想できるp 5 3 バイオマーカー及び用量最適化集団

【 0 3 0 9 】

したがって、選択性CD122 / CD132アゴニストと抗PD - 1治療法の併用治療のためのAd - p 5 3の用量 (腫瘍体積  $1 \text{ cm}^3$  当たり、 $1 \times 10^{11} \text{ v p}$ ) を、このデータに基づき選択する。

30

【 0 3 1 0 】

実施例4 - Ad - MDA7 (IL24)、CD122 / CD132アゴニスト及び抗PD1抗体を用いる併用療法

抗PD - 1治療は、進行した切除不能な病気を有する黒色腫患者に対して認可された治療法である。抗PD - 1は、多くの患者に利点をもたらす、躍進的な治療を提示する一方で、複数の研究での臨床データは、患者の大多数はこの治療法に应答しないことを示している。

【 0 3 1 1 】

この治療法は、Ad - MDA - 7 (注 : Ad - MDA - 7 = Ad - IL24)、並びにCD122 / CD132アゴニスト及び抗PD - 1抗体を用いる治療により、進行した黒色腫患者の予後を改善するように設計されている。併用療法の臨床的有効性には、全体の奏効率の評価 [ ORR = 部分奏功 (PR) + 完全奏功 (CR) ]、完全寛解率 (CRR)、持続性奏効率 (DRR = 少なくとも、6ヶ月間維持されるPR + CR) ; 内臓器官への転移に関する速度及び時間 ; 無進行生存 (PFS) 及び全体の生残 (OS) が含まれる。リンパ球表現型及び血清サイトカイン、病気に関係するバイオマーカー、選択した抗原に対する抗体応答、並びに、腫瘍抗原に対する体液性応答及び細胞応答における、研究薬物の効果もまた、評価される。

40

【 0 3 1 2 】

更に、炎症性浸潤物 (例えば、それぞれ、リンパ球及び腫瘍細胞における、CD8及びCD4細胞、並びに、プログラム細胞死1 (PD - 1) 及びプログラム細胞死リガンド1

50

(PD-L1)の発現)の量及び特徴、並びに、腫瘍変異の負荷を含む(しかし、これらに限定されない)臨床活性の病理学的相関について、腫瘍サンプルを調査する。

【0313】

そのときに患者が奏功するのであれば、患者を最大12ヶ月、又は最大18ヶ月間治療する。12ヶ月で奏功する(CR又はPR)患者は、18ヶ月、又は臨床的に関連する進行性疾患(PDr)のいずれか早いほうまで、治療を続けなければならない。

【0314】

免疫療法は、腫瘍応答の開始の遅延を引き起こし得、かつ、腫瘍進行に関する誤った腫瘍炎症と関連する可能性があるため、3種類のPDが定義される。臨床的に関連のない進行性の病気(PDn)は、パフォーマンス状態の低下を被らない患者における、かつ/又は、医師の意見により、代替の治療法を必要としないPDとして定義される。PDnを示す患者は、治療を続けることが許可される。臨床的に関連のある進行性の病気(PDr)は、パフォーマンス状態の低下と関連のある、かつ/又は、医師の意見において、患者が代替の治療法を必要としないPDとして定義される。PDrの患者は、医師の意見により、他の治療が保証される場合を除いて、治療法を受けた24週間まで、治療を受けたままとなる。CNS進行性の病気(PDcns)は、中枢神経系(脳)での進行と定義される。

10

【0315】

治療のAd-IL24は、生理食塩水及び10%グリセロールを含有する中性緩衝液中の、 $1 \times 10^{12}$  vp/mLの濃度での凍結バイアル懸濁液(バイアル瓶当たり2.0 mL)として提供される。注射を受けるための腫瘍質量に関して、最小サイズは存在しない。治療される腫瘍の第1の群に皮膚損傷を含めて、皮膚抗原提示細胞により媒介される治療法の免疫効果を増強しなければならない。

20

【0316】

個々の患者は、最長直径が5 cmを超える単独の損傷が存在しない状態で、最大20個の損傷を有することができる。最終的に全ての損傷を、少なくとも1サイクルのAd-IL24治療法で治療することを意図している(3週間で、週に2回腫瘍内注射)。各患者の損傷をAd-IL24治療群に分け、各治療群における損傷の数は、各治療に送達されるAd-IL24が、表4に明記する用量エスカレーションスキームに明記される各治療日に対して許可される全体積用量を超過しないように、腫瘍直径及び用量エスカレーションコホートにより示される。腫瘍に送達される全用量(体積)は、表4に明記される体積を超えず、治療群の各個別の腫瘍に注射される量は、腫瘍の結節のサイズに左右され、以下のアルゴリズムに従い決定される：

30

最長寸法が0.5 cm以下の腫瘍に対しては、0.1 mL以下。

最長寸法が0.5 ~ 1.5 cmの腫瘍に対しては、0.5 mL以下。

最長寸法が1.5 ~ 2.5 cmの腫瘍に対しては、1.0 mL以下。

最長寸法が2.5 ~ 5 cmの腫瘍に対しては、2.0 mL以下。

【0317】

あらゆる個別の損傷に注射される最大体積は、2 mLである。任意の1治療日における最大用量は、下表に明記する、治療用量エスカレーションコホートに応じて、2、4、又は6 mLのいずれかである。

40

【0318】

【表 4 - 2】

表 4：治療スケジュール。

サイクル	1								2								3							
週間	1		2		3		4		1		2		3		4		1		2		3		4	
日	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T		M	T	M	T	M	T			
Ad-IL24	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+			
Nivo.*									+				+			+					+			
Pembro.*									+					+							+			

サイクル	4								5								6							
週間	1		2		3		4		1		2		3		4		1		2		3		4	
日	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T		M	T	M	T	M	T	M	T	
Ad-IL24	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+			
Nivo.	+				+				+				+			+					+			
Pembro.		+							+				+								+			

\* 不応性になった患者を抗PD-1で治療する。

【0319】

【表 5】

表 5：用量エスカレーション設計。

コホート番号	患者数	Ad-IL24 の用量/月曜と 木曜	治療した最大腫瘍直 径の合計/投与した Ad-IL24体積 /日	ニボルマブ 3mg/kgの静脈 内注入 ニボルマブに不応性 の患者	ペムブロリズマブを 2mg/kgで静脈 内注入 ペムブロリズマブに 不応性の患者
用量上昇3	6~16	6 x 10 <sup>12</sup> v p	20 cm/6 ml	同じ*	同じ*
用量上昇2	3~12	4 x 10 <sup>12</sup> v p	10 cm/4 ml	同じ*	同じ*
開始用量1	3~12	2 x 10 <sup>12</sup> v p	5 cm/2 ml	3 mg/kg / IV *	2 mg/kg / IV *
用量の再上昇2	3~12	1 x 10 <sup>12</sup> v p	2.5 cm/1 ml	同じ*	同じ*
用量の再上昇3	3~12	5 x 10 <sup>11</sup> v p	1.25 cm/0.5 ml	同じ*	同じ*

【0320】

上記表の治療レジメンを、毎週、隔週、3週間に1回、4週間に1回の範囲の間隔で、皮下又は経静脈投与のいずれかで投与する場合、5~100 μg/kgの範囲の用量で投与される、IL2/抗IL2免疫複合体、及び/又はIL15/抗IL15免疫複合体、及び/又はIL15/IL15受容体 - IgG1 - Fc (IL15/IL15R - IgG1 - Fc) 免疫複合体、及び/又はPEG化IL2、及び/又はPEG化IL15、及び/又はIL2ムテイン、及び/又はIL15ムテイン) などの、選択性CD122/CD132アゴニストを組み合わせることができるであろう。

【0321】

まとめ：実施例に記載の動物研究集団は、免疫療法に一般的に耐性があることが知られている、非常に侵襲性の形態の癌を用いる。驚くべきことに、選択性CD122/CD132療法と組み合わせた、局所領域癌抑制及び腫瘍崩壊ウイルス治療は、全身性免疫チェックポイント阻害剤治療法に対する耐性を逆転させ、このことは、免疫チェックポイント阻害剤治療との予想外の相乗作用を示した。また、併用療法は、癌抑制又は腫瘍崩壊ウイルス療法で治療しなかった、離れた腫瘍において、優れたアブスコパル効果を誘発した。免疫療法に対する耐性が非常に高い癌において、これらの治療は驚くべきことに、完全な腫瘍の寛解及び治癒性のアウトカムをもたらした。

【0322】

本明細書で開示及び権利主張する方法は全て、本開示を考慮して、過度な実験をすることなく作製及び実施可能である。本発明の組成物及び方法は、好ましい実施形態の観点で

10

20

30

40

50

記載されてきたが、本発明の概念、精神及び範囲を逸脱することなく、本明細書に記載の方法、工程又は工程の順序に変化が加えられてもよいことは当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的及び生理学的に関連する特定の作用物質を、同じ結果又は同様の結果が達成されつつ、本明細書に記載される作用物質に交換されてもよいことは明らかであろう。当業者に明らかな全てのこのような同様の代替物及び改変は、添付の特許請求の範囲に定義されるような本発明の精神、範囲及び概念の範囲内であると考えられる。

#### 参考文献

以下の参考文献は、本明細書に示されるものに対して補助的に例示的な手順又は他の詳細を与える程度まで、本明細書に参照により組み込まれる。

- Aghi et al., *Cancer Res.*, 59: 3861 - 3865, 1999. 10
- Aksentjevich et al. *Human Gene Ther.* 7: 111, 1996.
- Aoki et al., *J Cell Sci.*, 120: 3327 - 35, 2007.
- Backman et al., *Curr Opin Neurobiol.*, 12 (5): 516, 2002.
- Baichwal and Sugden, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117 - 148, 1986. 20
- Bailey and Levine, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11: 285 - 292, 1993.
- Bernstein et al., *Mutat Res.*, 511 (2): 145 - 78, 2002.
- Bouvet et al., *Cancer Res.*, 58: 2288 - 2292, 1998.
- Buller et al., *Cancer Gene Therapy*, 9: 553 - 566, 2002.
- Camacho et al. *J Clin Oncology*, 22 (145), 2004. 30
- Carroll et al., *Mol Cancer Therapeutics*, 1: 49 - 60, 2001.
- Caudell et al., *J Immunol.*, 168: 6041 - 6046, 2002.
- Chada et al., *Cancer Gene Ther.*, 13: 490 - 502, 2006. 444 - 448, 1998.
- Chada et al., *Cancer Gene Ther.*, 13: 490 - 502, 2006. 444 - 448, 1998.
- Chase et al., *Nat. Biotechnol.*, 16:
- Chen and Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745 - 2752, 1987. 40
- Choi et al. *Gene Therapy*, 17: 190 - 201, 2010.
- Corrales et al., *Cell Reports*, 11, 1018 - 1030, 2015.
- Couch et al., *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88: 394 - 403, 1963.
- Doronin et al., *Virology*, 305: 378 - 387, 2003.
- Dubois et al., 2008. 50

- 欧州特許出願公開第2403951A2号  
 欧州特許出願公開第2724728A1号  
 Fraley et al, Proc. Nat'l Acad. Sci. 76:3348-3352, 1979.  
 Fujiwara et al., J Natl Cancer Inst, 86:1458-1462, 1994.  
 Ghiringhelli et al., Biomed. J., 38:111-116, 2015.  
 Giono et al., J Cell Physiol. 209(1):13-20, 2006. 10  
 Gladden et al., Dev Cell. 16;19(5):727-39, 2010.  
 Graham and Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.  
 Greenberg et al., Chromosoma. 117(4):305-17, 2008.  
 Gurnani et al., Cancer Chemother Pharmacol., 44(2):143-151, 1999.  
 Harland and Weintraub, J. Cell Biol, 101:1094-1099, 1985. 20  
 Hartwell et al., Science, 266:1821-1828, 1994.  
 Hashemi et al., Cancer Lett., 180(2):211-21, 2002.  
 Heldin et al., Curr Opin Cell Biol. 21(2):166-76, 2009.  
 Hurwitz et al. Proc Natl Acad Sci. 95(17):10067-10071, 1998.  
 Hynes and Ferretti, Methods Enzymol., 235:606-616, 1994. 30  
 Iannello et al., J Experimental Medicine, 210(10):2057-2069.  
 I M L Y G I C (商標) [添付文書]. Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA; October 2015.  
 Inoue et al., Cancer Letters, 157:105-112, 2000.  
 国際特許出願公開第1995001994号。  
 国際特許出願公開第1998042752号。  
 国際特許出願公開第2000037504号。  
 国際特許出願公開第2001014424号。 40  
 国際特許出願公開第2004058801号。  
 国際公開第2005/003168号。  
 国際公開第2005/009465号。  
 国際公開第2006/003179号。  
 国際公開第PCT/KR2011/004693号  
 国際公開第2006/072625号。  
 国際公開第2006/072626号。  
 国際公開第2007/042573号。  
 国際公開第2008/084106号。  
 国際公開第2010/065939号。 50

- 国際公開第2012/071411号。  
 国際公開第2012/160448号。  
 国際公開第2012009703号。  
 国際公開第1995011986号。  
 国際公開第2014/047350号  
 国際公開第2014/047350号。  
 国際公開第2014/138314号  
 国際公開第2014/138314号。  
 国際公開第2014100014A1号。  
 国際公開第2015/016718号。 10  
 国際公開第2015/027163号  
 国際公開第2015/027163号。  
 国際公開第2015/150809号。  
 国際公開第2016/009017号  
 国際公開第2016/009017号。  
 Jiang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 916  
 0 - 9165 .  
 Johannesen et al., Proc Natl Acad Sci U  
 S A. 102(24): 8573 - 8, 2005 .  
 Kaelin et al., Nat Rev Cancer, 2(9): 673 - 8 20  
 2, 2002 .  
 Kawabe et al., Mol Ther. 6(5): 637 - 44, 2002  
 .  
 Kawabe et al., Mol. Ther. 6(5): 637 - 644, 200  
 2 .  
 Kim et al. Journal of the National Cance  
 r Institute, 98(20): 1482 - 1493, 2006 .  
 Kotin et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2  
 21 1 - 2215, 1990 .  
 Kreil, Protein Sci., 4: 1666 - 1669, 1995 . 30  
 Li Phase 1 Clinical Trial, Gene Therapy ;  
 16 376 - 382, 2009 .  
 Lichtenstein et al, Int. Rev. Immunol., 23 :  
 75 - 111, 2004 .  
 Liu et al J. Biol. Chem., 270: 24864, 1995 .  
 Lui et al., Gene Therapy, 10: 292 - 303, 2003  
 .  
 Lui et al., Gene Therapy, 10: 292 - 303, 2003  
 .  
 Mann et al, Cell, 33: 153 - 159, 1983 . 40  
 Markowitz et al., J. Virol., 62: 1 120 - 1 12  
 4, 1988 .  
 McLaughlin et al, J. Virol., 62: 1963 - 1973 ,  
 1988 .  
 Mellman et al., Nature 480: 480 - 489, 2011 .  
 Mellman et al., Nature, 480: 480 - 489, 2011 .  
 Mhashilkar et al., Mol. Medicine 7(4): 271  
 - 282, 2001 .  
 Miyahara et al., Cancer Gene Therapy, 13 :  
 753 - 761, 2006 . 50

- Mokyr et al., *Cancer Res.*, 58:5301-5304, 1998.
- Multivir Inc., Form S-1 Registration Statement, U.S. Securities and Exchange Commission, 2015
- Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol Immunol*, 158:97-129, 1992.
- Nemunaiti et al., *Clin Cancer Res.*, 15(24):7719-25, 2009.
- Nicolas and Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, pp. 493-513, 1988. 10
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau et al. *Methods Enzymol*, 149:157-176, 1987.
- Nishikawa et al., *Mol. Ther.*, 9(8):818-828, 2004b.
- Nishikawa et al., *Oncogene*, 23(42):7125-7131, 2004a. 20
- Nishizaki M, et al., *Clin. Can. Res.*, 5:1015-1023, 1999.
- Ohashi M, et al., *Gut*, 44:366-371, 1999.
- Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4):252-64, 2012.
- Pardoll, *Nature Rev Cancer*, 12:252-264, 2012.
- Philip et al. *J. Biol. Chem.*, 268:16087, 1993. 30
- Pierceall et al., *Dev Biol.*, 166:654-665, 1994.
- Qin, X., et al., *Biol Reprod.*, 56:800-11, 1997a.
- Qin, X., et al., *Biol Reprod.*, 56:812-20, 1997b.
- Rhode et al., *Cancer Immunol Res*, 4(1):49-60, 2016.
- Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988. 40
- Rippe et al, *Mol. Cell Biol*, 10:689-695, 1990.
- Rocco et al., *Exp Cell Res.*, 10;264(1):42-55, 2001.
- Rosenberg et al., *Nat Med.*, 10(19):909-15, 2004.
- Samulski et al, *EMBO J.* 10:3941-3950, 1991. 50

Samulski et al, *J Virol*, 63:3822 - 3828, 1989.

Sherwood et al., *Endocrinology* 114:806 - 13, 1984.

Sobol RE, et al., Chapter 11:Tp53 Gene Therapy for Cancer Treatment and Prevention, NY:Springer Science+Business Media, 2013.

Solodin et al, *Biochemistry*, 34:13537, 1995.

Spitz et al., *Clin Cancer Research*, 2:1665 - 1671, 1996.

Starker et al., *Curr Opin Oncol.*, 21(1):29 - 33, 2009.

Swisher et al., *Clin Cancer Research*, 9:93 - 101, 2003.

Tatebe S, et al., *Int. J Oncol.*, 15:229 - 235, 1999.

Tatebe S, et al., *Int. J Oncol.*, 15:229 - 235, 1999.

Tchekmedyan et al., *Oncology*, 29(12):990 - 1002, 2015.

Temin, n:Gene Transfer, Kucherlapati (ed.), New York:Plenum Press, pp.149 - 188, 1986.

Textor et al., *Cancer Res.*, 71(18):5998 - 6009, 2011.

Thierry et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(21):9742 - 6, 1995.

Timiryasova et al., *Biotechniques*. 31:534, 6, 8 - 40, 2001.

Toda et al., *Mol. Therapy*, 2(4):324 - 329, 2000.

Tollefson et al., *J. Virol.*, 70:2296 - 2306, 1996.

Top et al, *J. Infect. Dis.*, 124:155 - 160, 1971.

Tsukamoto et al, *Nature Genetics*, 9:243, 1995.

米国特許出願公開第20110008369号。

米国特許出願公開第2014022021号。

米国特許出願公開第20140294898号。

米国特許第4,797,368号。

米国特許第4,835,251号。

米国特許第5,023,321号。

米国特許第5,139,941号。

米国特許第5,302,523号。

米国特許第5,384,253号。

米国特許第5,464,765号。

米国特許第5,580,859号。

米国特許第5,589,466号。

10

20

30

40

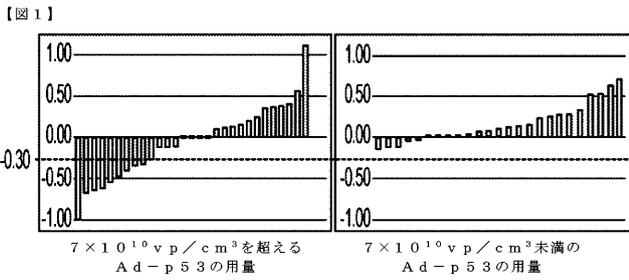
50

- 米国特許第5,656,610号。  
 米国特許第5,702,932号。  
 米国特許第5,736,524号。  
 米国特許第5,780,448号。  
 米国特許第5,789,215号。  
 米国特許第5,811,395号。  
 米国特許第5,925,565号。  
 米国特許第5,935,819号。  
 米国特許第5,945,100号。  
 米国特許第5,981,274号。 10  
 米国特許第5,994,136号。  
 米国特許第5,994,624号。  
 米国特許第6,013,516号。  
 米国特許第6,207,156号。  
 米国特許第7,223,593号。  
 米国特許第7,537,924号。  
 米国特許第8,017,114号。  
 米国特許第8,119,129号。  
 米国特許第8,329,867号。  
 米国特許第8,354,509号。 20  
 米国特許第9,746,471号。  
 米国特許出願公開第2017/0044229号。  
 米国特許出願公開第20060257361号。  
 米国特許出願公開第20070160578号。  
 米国特許出願公開第2011/0039778号。  
 米国特許出願公開第2015/0202290号。  
 米国特許出願公開第2015/0202290号。  
 米国特許出願公開第20170183403号。  
 米国特許第8,067,567号。  
 Vincent et al., Cancer Res., 70(8):3052-3061, 2010. 30  
 Waku et al., J Immunol., 165:5884-5890, 2000.  
 Xu et al. Gene Therapy, 22(3):31-40, 2015.  
 Xu et al., J Gastroenterol., 48(2):203-13, 2013.  
 Xue et al., Nature, 445(7128):656-660, 2007.  
 Yachida et al., Arch Pathol Lab Med. 133(3):413-22, 2009. 40  
 Yamasaki, Cancer Treat Res. 115:209-39, 2003.  
 Young et al., Cancer Gene Ther., 20(9):531-537, 2013.  
 Yu and Fang, Current Cancer Drug Targets; 7:659-670, 2007.  
 Yun et al., Human Gene Therapy 23:609-622, 2012.  
 Zeimet and Marth, The Lancet Oncology, 7:415-422, 2003. 50

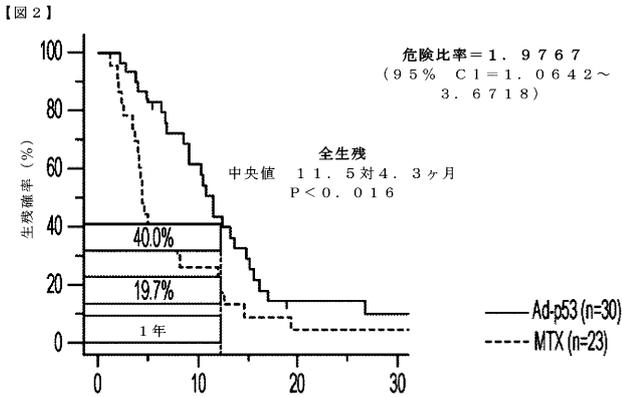
Zhang et al., Cancer Gene Ther, 22:17-22, 2015.

Zhang et al., Cancer Gene Ther., 1:5-13, 1994.

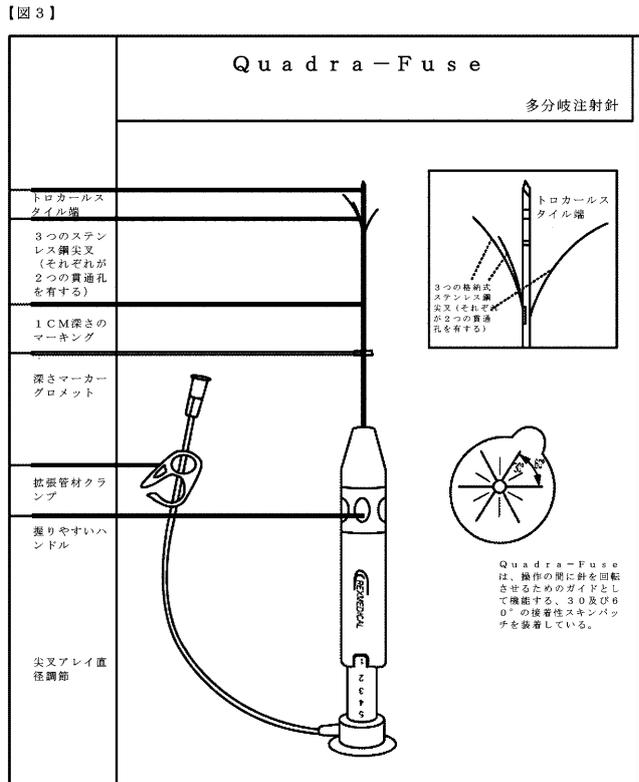
【図1】



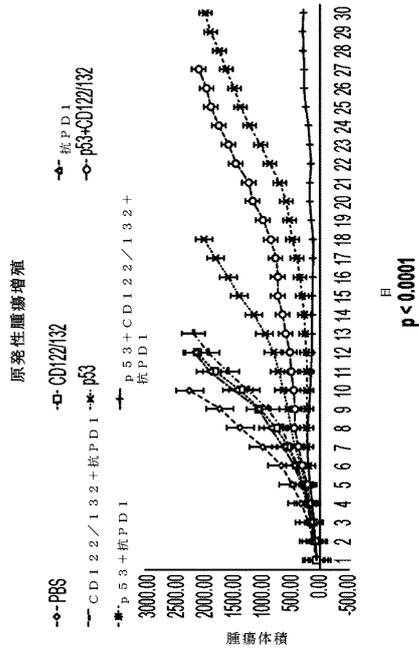
【図2】



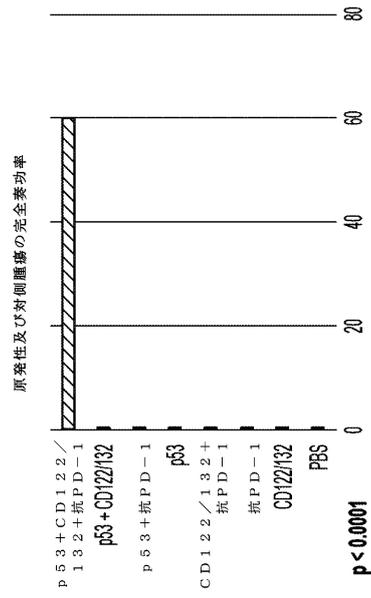
【図3】



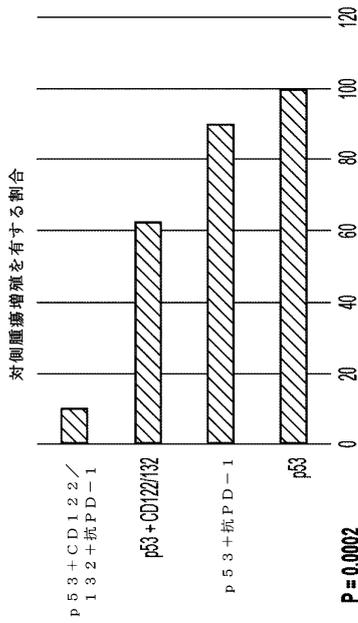
【 図 4 】



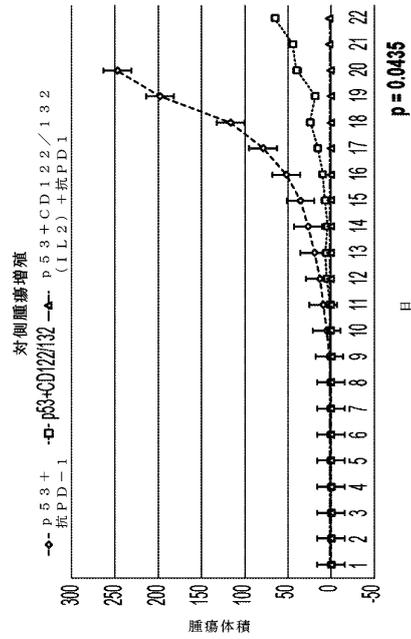
【 図 5 】



【 図 6 A 】

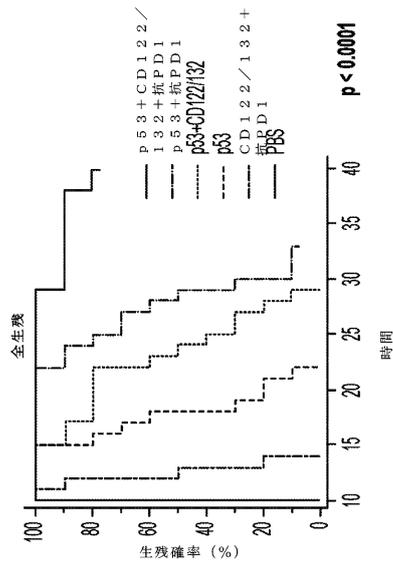


【 図 6 B 】



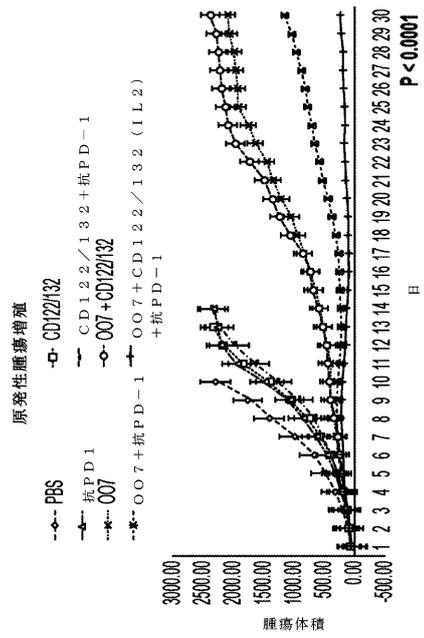
【 図 7 】

【 図 7 】



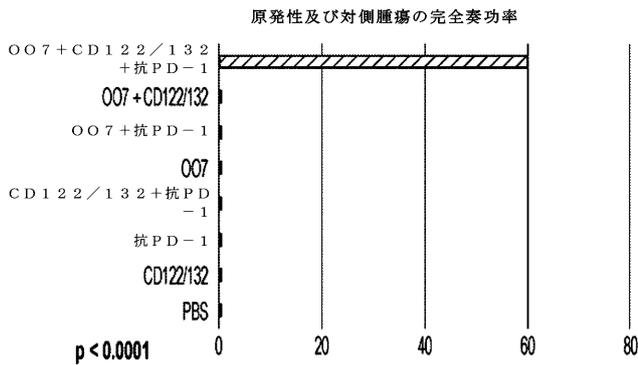
【 図 8 】

【 図 8 】



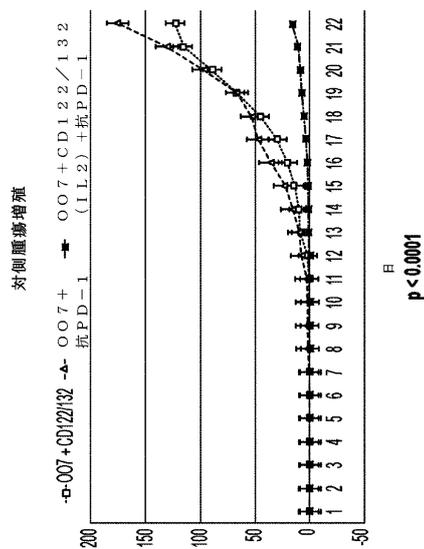
【 図 9 】

【 図 9 】



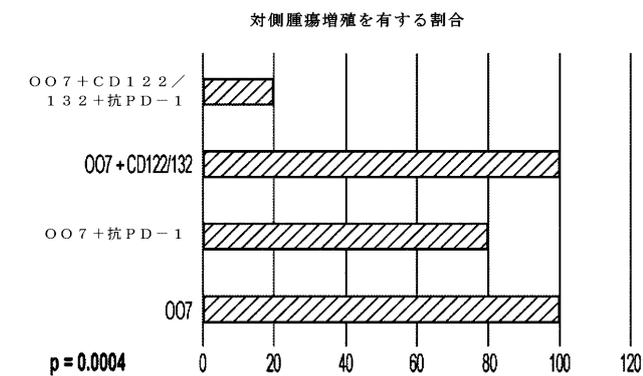
【 図 10 B 】

【 図 10 B 】



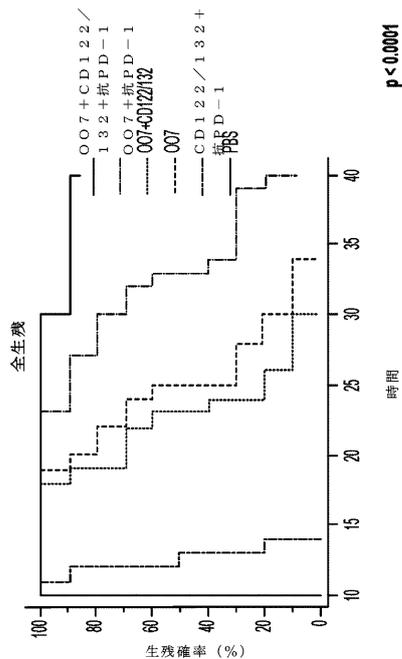
【 図 10 A 】

【 図 10 A 】



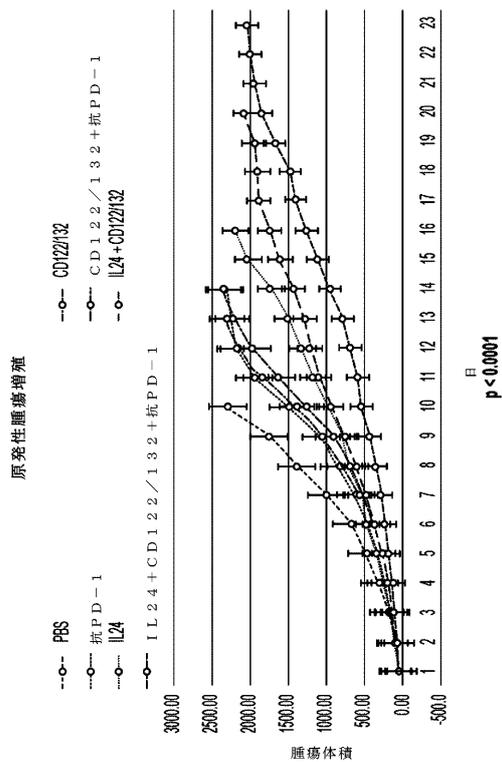
【図 1 1】

【図 1 1】



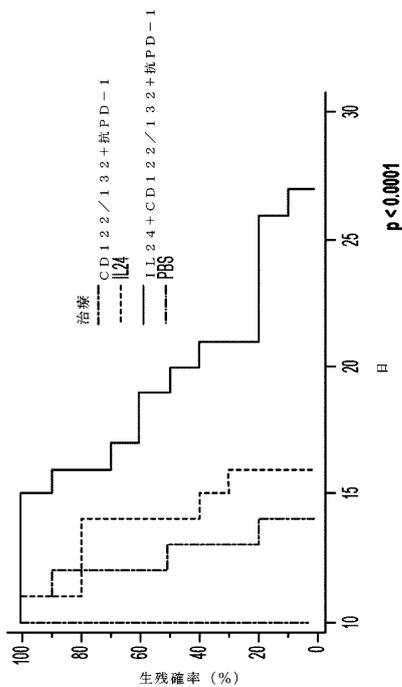
【図 1 2】

【図 1 2】



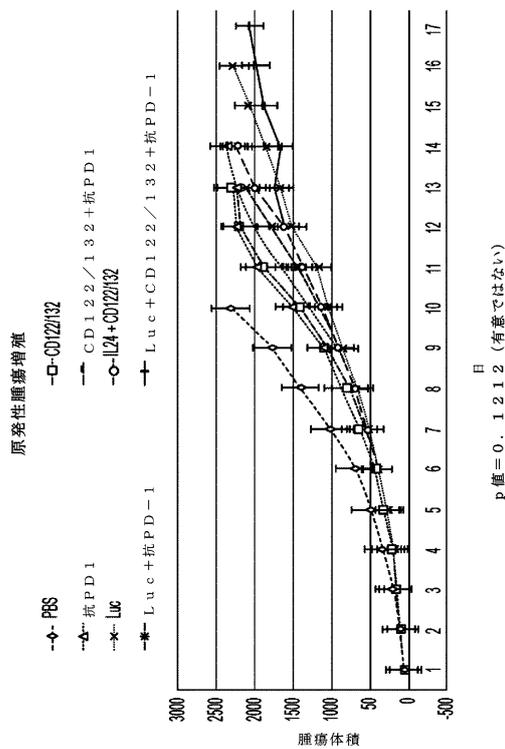
【図 1 3】

【図 1 3】



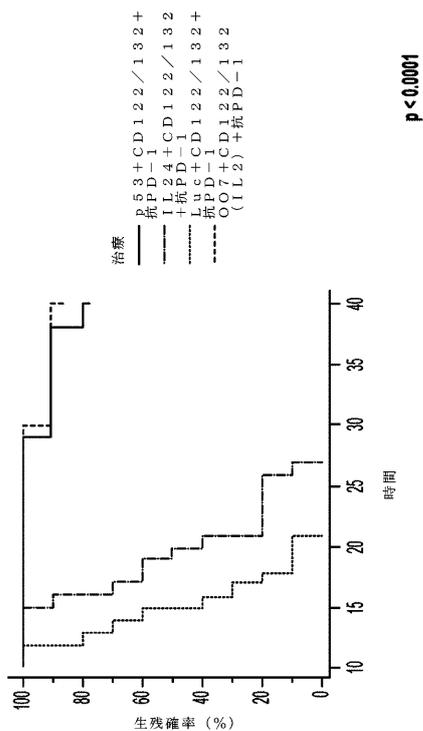
【図 1 4】

【図 1 4】



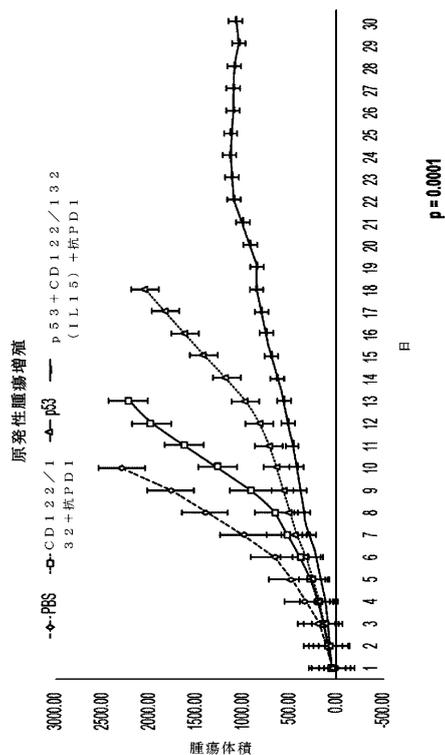
【 図 15 】

【 図 15 】



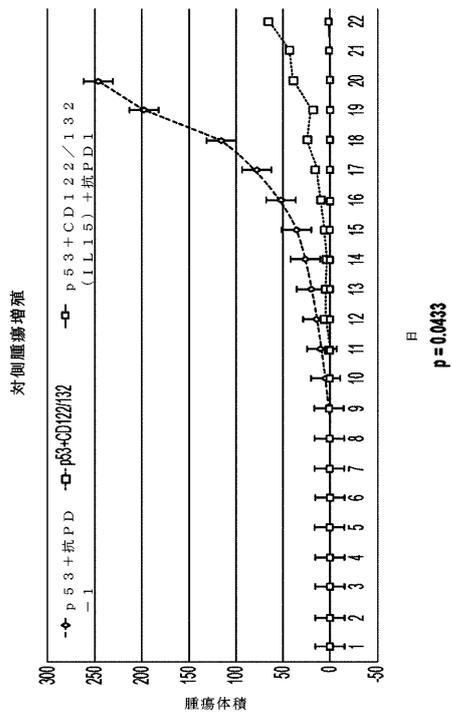
【 図 16 】

【 図 16 】



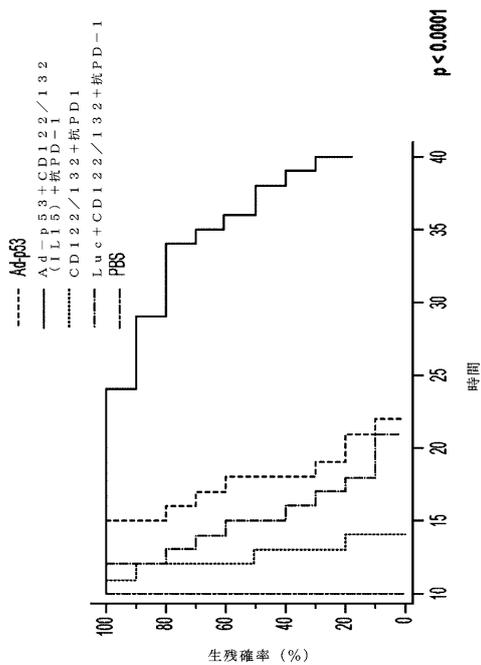
【 図 17 】

【 図 17 】



【 図 18 】

【 図 18 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2019/022985
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 14/47; C07K 14/54; C12N 15/86 (2020.01) CPC - C07K 14/4746; C07K 14/5443; C07K 14/55; C12N 15/86 (2020.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/85.2; 424/93.2; 514/19.3 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/079746 A2 (MULTIVIR INC.) 11 May 2017 (11.05.2017) entire document	1-118
Y	US 2017/0044229 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY et al) 16 February 2017 (16.02.2017) entire document	1-118
Y	US 2017/0151310 A1 (NOVARTIS AG et al) 01 June 2017 (01.06.2017) entire document	6
Y	EP 2522726 A1 (FUNDACIÓ PRIVADA CENTRE DE REGULACIÓ GENÒMICA (CRG)) 14 November 2012 (14.11.2012) entire document	20-22
Y	US 2015/0072988 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 12 March 2015 (12.03.2015) entire document	49, 114
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 January 2020		Date of mailing of the international search report <b>05 FEB 2020</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## 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 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 35/763 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 35/763	
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/21	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 38/20	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 38/22	
A 6 1 K 38/39 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	
A 6 1 K 38/47 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 35/768 (2015.01)	A 6 1 K 38/39	
A 6 1 K 35/766 (2015.01)	A 6 1 K 38/47	
A 6 1 K 35/765 (2015.01)	A 6 1 K 31/7088	
	A 6 1 K 35/768	
	A 6 1 K 35/766	
	A 6 1 K 35/765	

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ソボリ, ロバート イー.

アメリカ合衆国 テキサス 77010-1028, ヒューストン, ファニン 909, ヒューストン センター 2, 스위트 2100, マルチビア インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 メナンダー, カースティン ビー.

アメリカ合衆国 テキサス 77010-1028, ヒューストン, ファニン 909, ヒューストン センター 2, 스위트 2100, マルチビア インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ウィーダーホールド, ドラ

アメリカ合衆国 テキサス 77010-1028, ヒューストン, ファニン 909, ヒューストン センター 2, 스위트 2100, マルチビア インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 チャダ, スニル

アメリカ合衆国 テキサス 77010-1028, ヒューストン, ファニン 909, ヒ

ユーストン センター 2 , スイート 2100 , マルチピア インコーポレイテッド 気付

F ターム(参考) 4C076 CC41 DD48A DD70A EE59

4C084 AA13 AA20 BA34 BA35 DA01 DA12 DA14 DA21 DA22 DA39

DA40 DA46 DB01 DB51 DC22 MA63 MA65 MA66 ZB261 ZB262

ZB271 ZC202 ZC751

4C085 AA13 AA14 BB12 CC23 EE03

4C086 AA01 AA02 BC42 EA16 GA07 MA03 MA04 NA05 ZB26 ZB27

ZC75

4C087 AA01 AA02 BC83 DA19 NA05 ZB26 ZB27 ZC75