

(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2005-519091****(P2005-519091A)**

(43) 公表日 平成17年6月30日(2005.6.30)

|                                     |                     |             |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>           | F I                 | テーマコード (参考) |
| <b>A 6 1 K 35/76</b>                | A 6 1 K 35/76       | 4 C 0 6 0   |
| <b>A 6 1 B 17/00</b>                | A 6 1 B 17/00 3 2 0 | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 K 31/7088</b>              | A 6 1 K 31/7088     | 4 C 0 8 5   |
| <b>A 6 1 K 38/00</b>                | A 6 1 K 39/00 H     | 4 C 0 8 6   |
| <b>A 6 1 K 39/00</b>                | A 6 1 K 48/00       | 4 C 0 8 7   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁) 最終頁に続く |                     |             |

|               |                              |          |                       |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2003-572444 (P2003-572444) | (71) 出願人 | 399026731             |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年3月3日 (2003.3.3)         |          | スローン - ケタリング・インスティテ   |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成16年10月26日 (2004.10.26)     |          | ュート・フォー・キャンサー・リサーチ    |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2003/006519            |          | アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 |
| (87) 国際公開番号   | W02003/073918                |          | 2 1、ニューヨーク、ヨーク・アベニュー  |
| (87) 国際公開日    | 平成15年9月12日 (2003.9.12)       |          | 1 2 7 5               |
| (31) 優先権主張番号  | 60/361, 132                  | (74) 代理人 | 100102978             |
| (32) 優先日      | 平成14年3月1日 (2002.3.1)         |          | 弁理士 清水 初志             |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100108774             |
|               |                              |          | 弁理士 橋本 一憲             |
|               |                              | (74) 代理人 | 100128048             |
|               |                              |          | 弁理士 新見 浩一             |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の再発及び転移の予防

## (57) 【要約】

本発明は、弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルスの使用を含む、癌を防止又は処置する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象における癌を予防又は処置する方法であって、  
対象から腫瘍を外科的に切除する工程；及び  
弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルスを外科的切除の部位に投与する工程を含む  
方法。

## 【請求項 2】

癌が外科的切除の部位に存在するものである、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

癌が外科的切除の部位から転移したものである、請求項1記載の方法。

10

## 【請求項 4】

癌が対象のリンパ系に存在するものである、請求項3記載の方法。

## 【請求項 5】

癌が対象のリンパ節に存在するものである、請求項4記載の方法。

## 【請求項 6】

ヘルペスウイルスが単純ヘルペス1型由来ウイルスである、請求項1記載の方法。

## 【請求項 7】

ヘルペスウイルスがNV1023である、請求項6記載の方法。

## 【請求項 8】

対象がヒトである、請求項1記載の方法。

20

## 【請求項 9】

ヘルペスウイルスが注射によって対象に投与される、請求項1記載の方法。

## 【請求項 10】

ヘルペスウイルスが治療用生成物をコードする異種核酸分子を含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 11】

治療用生成物が、細胞毒素、免疫調節タンパク質、腫瘍抗原、アンチセンス核酸分子、及びリボザイムからなる群より選択される、請求項10記載の方法。

## 【請求項 12】

第二の抗癌処置を対象に投与することをさらに含む、請求項1記載の方法。

30

## 【請求項 13】

第二の抗癌処置が、化学療法、生物学的療法、放射線治療、及び遺伝子治療からなる群より選択される、請求項12記載の方法。

## 【請求項 14】

対象における癌を処置する方法であって、弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルスを該対象の腫瘍に注射することを含む、方法。

## 【請求項 15】

腫瘍へのウイルスの注射の後、対象から腫瘍を切除する段階をさらに含む、請求項14記載の方法。

## 【請求項 16】

弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルスを外科的切除の部位に投与する段階をさらに含む、請求項15記載の方法。

40

## 【請求項 17】

ヘルペスウイルスが単純ヘルペス1型由来ウイルスである、請求項14記載の方法。

## 【請求項 18】

ヘルペスウイルスがNV1023である、請求項17記載の方法。

## 【請求項 19】

対象がヒトである、請求項14記載の方法。

## 【請求項 20】

ヘルペスウイルスが治療用生成物をコードする異種核酸分子を含む、請求項14記載の方法

50

法。

【請求項 2 1】

治療用生成物が、細胞毒素、免疫調節タンパク質、腫瘍抗原、アンチセンス核酸分子、及びリボザイムからなる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項 2 2】

第二の抗癌処置を対象に投与することをさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項 2 3】

第二の抗癌処置が、化学療法、生物学的療法、放射線治療、及び遺伝子治療からなる群より選択される、請求項22記載の方法。

【請求項 2 4】

弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルスを外科的切除部位に投与することによって、腫瘍が外科的に切除されている患者における癌の転移を予防又は処置するために、薬物を調製する際の該ウイルスの使用法。

【請求項 2 5】

ヘルペスウイルスが単純ヘルペス1型由来ウイルスである、請求項24記載の使用法。

【請求項 2 6】

弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルスの腫瘍内注射により対象における癌を予防又は処置する薬物の調製における、該ウイルスの使用法。

【請求項 2 7】

ヘルペスウイルスが単純ヘルペス1型由来ウイルスである、請求項26記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の領域

本発明は、癌の防止及び処置の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

癌の当社会に対する影響は、誇張しようがない。癌は、米国における2番目に多い死因であり、それを超えているのは心疾患のみである。実際、米国における死亡の4分の1が、癌によって引き起こされている (American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2001, New York 2001, ACS, Inc.)。

【0003】

正常な増殖調節メカニズムが損なわれた場合に、細胞は癌性となる。初め、癌性細胞の無調節の増殖は、その細胞が起因した組織に制限されているが、時間とともに、起源部位から体内のもう一つのエリアへと細胞が蔓延又は転移する場合がある。例えば、癌細胞は、血管又はリンパ管の壁へと浸潤し、従って循環系又はリンパ系へと侵入し、そこから、もう一つの組織へと滞留し、二次性の転移性腫瘍の増殖の種となることができる。原発腫瘍から脱落した細胞のうち実際に生存しているのは10,000分の1未満であると考えられているが、この極一部の生存細胞は、体内の他の箇所において二次性腫瘍の種となるのに十分である。

【0004】

癌を有すると新たに診察される患者の約35%は、転移がなく、これらの患者は、腫瘍の局所的な処置、例えば手術又は放射線によって治癒可能である。残りの患者は、検出可能な転移を既に有しているか (約30%)、又は最終的に腫瘍へと発達するであろう検出不可可能な転移を有している (約35%)。これらの患者の処置は、多くの場合、例えば、癌細胞のような急速に分裂している細胞の増殖を妨害する化学療法薬の投与のような、全身性のアプローチを含む。全ての癌の全体5年相対生存率は、わずか60%であり、このことから、転移が起こる前の腫瘍処置 (例えば、除去) を可能にする早期検出、及び癌転移の処置又は好ましくは予防のための治療アプローチの開発の重要性が強調される。

10

20

30

40

50

## 【発明の開示】

## 【0005】

## 発明の概要

本発明は、対象、例えばヒト対象における癌を防止又は処置する方法を提供する。本法は、対象から腫瘍を外科的に切除した後、外科的切除の部位へ、例えば注射により、弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルスを投与することを含む。又は、ウイルスは腫瘍に直接注射されてもよく、随意的に、次いで、腫瘍が切除されてもよい。本発明は、これらの方法を実施するための薬物の調製における弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルス（例えば、HSV-1）の使用も含む。投与されたヘルペスウイルスは、切除の部位に残存している可能性のある癌の再発を予防又は処置し、さらに、外科的切除の部位から転移した可能性のある癌を予防又は処置する。転移した癌は、リンパ系、例えばリンパ節に見出され得る。

10

## 【0006】

本発明の方法において使用され得るヘルペスウイルスには、単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）由来ウイルス、例えば、NV1023が含まれる。随意的に、本発明の方法に従い投与されるヘルペスウイルスは、例えば、細胞毒素、免疫調節タンパク質（immunomodulatory protein）、腫瘍抗原、アンチセンス核酸分子、又はリボザイムであり得る治療用生成物をコードする異種核酸分子を含む。本発明の方法は、第二（又はそれ以上）の抗癌処置の使用も含み得る。例えば、本法は、化学療法、生物学的療法、放射線治療、又は遺伝子治療と併せて実施され得る。

20

## 【0007】

本発明は、いくつかの利点を提供する。例えば、ウイルスは、肉眼的疾患の外科的除去の後に投与された場合、大きな腫瘍塊ではなく、顕微鏡的遺残腫瘍のみを標的とするため、より集中的な効率的な送達が可能である。また、下記の実験において示されるように、ウイルスは、腫瘍に直接注射された場合、腫瘍退縮活性を有する。従って、本発明の方法は、原発腫瘍を処置すると共に、リンパ行性転移を予防するために使用され得る。本発明の方法に従い投与されたヘルペスウイルスは、転移腫瘍細胞と同じ経路をたどり、従って、転移性疾患を保有するリスクが最も高いリンパ系内のエリア、例えばリンパ節に到達する可能性が高い。本発明の方法の付加的な利点は、体内の他の休止細胞に影響を与えることなく、癌細胞のような分裂細胞において複製し、従ってそれらを破壊する変異ヘルペスウイルスを利用する点である。ヘルペスウイルスは、野生型への復帰の可能性が排除されるよう多重変異型であってもよい。さらに、必要であれば、もう一つの重要な予防措置が提供されるよう、ヘルペスウイルスの複製は、ウイルス複製を阻止するアシクロビルのような抗ウイルス薬の作用によってコントロールされてもよい。複製可能型ウイルスを使用することの付加的な利点は、ウイルスが許容性癌性組織において繁殖する前に、極少量の腫瘍細胞のみが最初に感染する必要があるという点である。従って、本発明は、原発部位癌再発及び局部リンパ行性転移を予防及び処置するための、標的指向化された、安全で、かつ効率的な方法を提供する。

30

## 【0008】

本発明のその他の特色及び利点は、以下の詳細な説明、図面、及び特許請求の範囲より明らかとなる。

40

## 【0009】

## 詳細な説明

本発明は、癌を予防又は処置する方法を提供する。本法においては、対象から腫瘍が外科的に除去され、そして切除の部位が弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルスにより処置される。又は、ウイルスは腫瘍に直接注射されてもよく、随意的に、次いで、腫瘍が切除されてもよい。前述のように、そのようなウイルスは、非癌性細胞に害を与えることなく、選択的に癌細胞において複製し、従ってそれらを破壊する。従って、投与されたヘルペスウイルスは、切除の部位に残存している顕微鏡的疾患を排除し、それにより、その部位における再発を予防する。投与されたヘルペスウイルスは、可能性のある転移腫瘍

50

細胞と同じ様式で原発腫瘍の部位からリンパ系へと侵入し、従って、原発腫瘍部位からの転移の処置及び予防も可能である。本発明の方法におけるこれらのウイルスの使用、及びこれらの方法の効力を示す実験結果を、以下にさらに記載する。

#### 【0010】

##### 癌

本発明の方法を使用して予防又は処置され得る癌の例には、皮膚（例えば、扁平上皮癌、基底細胞癌、又は黒色腫）、胸部、結腸直腸、前立腺、脳及び神経系、頭頸部、精巣、卵巣、膵臓、肺、肝臓（例えば、肝癌）、腎臓、膀胱、胃腸、骨、内分泌系（例えば、甲状腺及び下垂体の腫瘍）、並びにリンパ系（例えば、ホジキン・リンパ腫及び非ホジキン・リンパ腫）の癌が含まれる。神経系の癌には、例えば、星状細胞腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、神経線維腫、膠芽腫、上衣細胞腫、シュワン腫、神経線維肉腫、神経芽細胞腫、及び髄芽細胞腫が含まれる。本発明の方法を使用して処置され得る癌のその他の型には、線維肉腫、神経外胚葉腫瘍、中皮腫、類表皮癌、及び固形腫瘍を形成するその他の任意の癌が含まれる。

10

#### 【0011】

##### ウイルス

本発明の方法において使用され得るウイルスは、ヘルペスウイルス科（Herpesviridae）のメンバーに由来するものであり得る。例えば、単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）由来ウイルスが使用され得る。本発明において使用されるウイルスが由来し得るヘルペス科ウイルスの付加的な例は、単純ヘルペスウイルス2型（HSV-2）、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、ヒト・ヘルペスウイルス6型（HHV-6）、ヒト・ヘルペスウイルス7型（HHV-7）、及びヒト・ヘルペスウイルス8型（HHV-8）である。本発明の方法において使用され得るウイルスの中心的特質は、複製可能型であり、従って、悪性細胞に感染し、それらにおいて複製し、それらを溶解させることができると同時に、正常細胞に有害な影響を与えないよう十分に弱毒化されている、という点である。

20

#### 【0012】

本発明の方法において使用され得るHSV-1由来ウイルスの二つの具体例は、NV1023（Wongら、Hum. Gene Ther. 12: 253-265, 2001）、及び以下に詳細に記載されるNV1020である。本発明において使用され得るHSV-1由来ウイルスの付加的な具体例は、G207（Yazakiら、Cancer Res. 55 (21): 4752-4756, 1995）である。このウイルスは、34.5遺伝子の両コピーに欠失を有し、さらに、HSVリボヌクレオチド還元酵素の大サブユニット、インフェクティッド・セル・プロテイン（infected-cell protein）6（ICP6）をコードする遺伝子であるUL39に不活化挿入を有している。

30

#### 【0013】

本発明において使用され得るヘルペスウイルスのさらなる具体例は、非必須47遺伝子（Mavromara-Nazosら、J. Virol. 60: 807-812, 1986）内の312塩基対欠失によってG207から導出された多重変異型複製可能型HSV-1ベクターである、G47（Todoら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (11): 6396-6401, 2001）である。HSVにおいてICP47及びUS11をコードする転写物はオーバーラップしているため、47内の欠失によって、前初期47プロモーターの調節下に後期US11遺伝子が置かれるようになり、それにより、34.5<sup>+</sup>変異体の増殖特性が増強される。

40

#### 【0014】

本発明の方法において使用され得る弱毒化HSVウイルスの付加的な例には、リボヌクレオチド還元酵素を欠損しているhrR3（Spearら、Cancer Gene Ther. 7 (7): 1051-1059, 2000）、HF（ATCC VR-260）、マッキングタイア（MacIntyre）（ATCC VR-539）、MP（ATCC VR-735）、HSV-2 G株（ATCC VR-724）及びMS株（ATCC VR-540）、並びに以下の遺伝子のうちの1個以上に変異（例えば、不活化変異、欠失、又は挿入）を有する任意のウイルスが含まれる：前初期遺伝子ICP0、ICP22、及びICP47（米国特許第5,658,724号）；34.5遺伝子；リボヌクレオチド還元酵素遺伝子；並びにVP16遺伝子（即ち、Vmw65、国際公開公

50

報第91/02788号、第96/04395号、及び第96/04394号)。米国特許第6,106,826号及び第6,139,834号に記載されたベクター、並びにその他の複製可能型弱毒化ヘルペスウイルスも、本発明の方法において使用され得る。

#### 【0015】

本発明の方法において使用されるウイルスの効果は、所望により、1個以上の治療用生成物をコードする異種核酸配列をウイルスに含めることにより、強化され得る。例えば、細胞毒素、免疫調節タンパク質（即ち、抗原に対する患者の免疫応答を増強又は抑制するタンパク質）、腫瘍抗原、アンチセンスRNA分子、又はリボザイムをコードする核酸配列が、ウイルスに含まれ得る。異種核酸配列によってコードされ得る免疫調節タンパク質の例には、例えば、サイトカイン（例えば、インターロイキン、例えば、インターロイキン1~15のいずれか、又は -インターフェロン、腫瘍壊死因子（TNF）、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージ・コロニー刺激因子（M-CSF）、及び顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF））、ケモカイン（例えば、好中球活性化因子（neutrophil activating protein）（NAP）、マクロファージケモアトラクタントアンドアクチベータンクファクター（macrophage chemoattractant and activating factor）（MCAF）、RANTES、並びにマクロファージ炎症性ペプチド（macrophage inflammatory peptides）MIP-1a及びMIP-1b）、補体成分及びそれらの受容体、免疫系アクセサリー分子（例えば、B7.1及びB7.2）、接着分子（例えば、ICAM-1、2、及び3）、並びに接着受容体分子が含まれる。本発明の方法において使用するための適切な異種核酸配列は、当業者によって容易に選択され得る。

10

20

#### 【0016】

異種核酸配列は、ウイルスの制御配列の調節下に置かれるような位置で、本発明の方法において使用するためのウイルスに挿入され得る。又は、異種核酸配列は、プロモーターもしくはエンハンサーのような制御エレメントを含む発現カセットの一部として挿入され得る。適切な制御エレメントは、例えば、所望の組織特異性及び発現レベルに基づき、当業者によって選択され得る。例えば、細胞型特異的又は腫瘍特異的なプロモーターが、遺伝子産物の発現を特定の細胞型に限定するために使用され得る。これは、例えば、破壊を容易にするために腫瘍細胞において細胞毒性、免疫調節性、又は腫瘍抗原性の遺伝子産物が産生される場合、特に有用であり、特異性を有するさらなる予防措置を提供する。組織特異的プロモーターの使用に加え、本発明のウイルスの局所（即ち、切除部位内）投与は、局所的な発現及び効果をもたらし得る。

30

#### 【0017】

腫瘍特異的プロモーターは、癌の病因に基づき、本発明において使用するため選択され得る。腫瘍細胞において特異的に機能するプロモーターの例には、乳癌細胞に特異的であるストロメライシン3プロモーター（Bassetら、Nature 348: 699, 1990）；非小細胞肺癌細胞に特異的であるサーファクタント蛋白質（surfactant protein）Aプロモーター（Smithら、Hum. Gene Ther. 5: 29-35, 1994）；SLPI発現癌腫に特異的である分泌型ロイコプロテアーゼインヒビター（secretory leukoprotease inhibitor）（SLPI）プロモーター（Garverら、Gene Ther. 1: 46-50, 1994）；黒色腫細胞に特異的であるチロシナーゼプロモーター（Vileら、Gene Therapy 1: 307, 1994；国際公開公報第94/16557号；国際公開公報第93/GB1730号）；扁平上皮癌、神経膠腫、及び胸部腫瘍の細胞に特異的である上皮成長因子受容体プロモーター（Ishiiら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 282, 1993）；胸部癌腫細胞に特異的であるムチン様糖タンパク質（DF3、MUC1）プロモーター（Abeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 282, 1993）；転移性腫瘍に特異的であるmts1プロモーター（Tulchinskyら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 9146, 1992）；小細胞肺癌細胞に特異的であるNSEプロモーター及びソマトスタチン受容体プロモーター（Forss-Petterら、Neuron 5: 187, 1990；Bombardieriら、Eur. J. Cancer 31A: 184, 1995；Kohら、Int. J. Cancer 60: 843, 1995）；脾臓、胸部、胃、卵巣、及び非小細胞肺の細胞に特異的であるc-erbB-2プロモーター（Harrisら、Gene Ther. 1: 170, 1994）；乳癌細胞に特異的であるc-erbB-3プロモーター（Quinら、Histopathology 25: 247, 1994）；並びに肺癌及び胃癌の細胞に特異的

40

50

あるc-erbB4プロモーター (Rajkumarら、Breast Cancer Res.Trends 29:3,1994) が含まれる。本発明において使用され得る非組織特異的プロモーターの例には、初期サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (米国特許第4,168,062号) 及びラウス肉腫ウイルス・プロモーター (Nortonら、Mol.Cell Biol.5:281,1985) が含まれる。また、HSV-1 IEプロモーター及びIE4/5プロモーターのようなHSVプロモーターも、使用され得る。

【0018】

患者体内の細胞へウイルスを導入するための多数の周知の製剤のうちの任意のものが、本発明において使用され得る (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版) A.Gennaro編、1990年、Mack Publishing Co., Easton, PA参照)。しかしながら、ウイルスは、アジュバント又は担体を含む又は含まない、無菌生理食塩水又は無菌緩衝生理食塩水のような生理学的に許容される溶液で単に希釈されてもよい。投与すべきウイルスの量は、当業者によって容易に決定され得、例えば、投与が意図された患者の状態 (例えば、患者の体重、年齢、及び全身状態)、投与方式、並びに製剤の型のような要因に依存する。一般に、例えば、約 $10^1 \sim 10^{10}$  プラーク形成単位 (pfu)、例えば、 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$  pfu、例えば、 $1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$  pfuの有効用量が投与されるが、最も有効な範囲は、当業者によって容易に決定され得るように、患者によって変動し得る。

10

【0019】

ウイルスは、手術部位の閉鎖の前又は後に、患者における外科的切除の部位に、例えば、原発腫瘍の切除後の手術野への直接的な注射によって、投与される。又は、前述のように、ウイルスは、腫瘍に直接注射されてもよい。

20

【0020】

本発明の方法は、単独の治療剤として複製可能型弱毒化ヘルペスウイルスを利用することもできるし、又は、これらの薬剤は、他の抗癌処置と組み合わせられて使用されてもよい。使用され得る付加的な療法の例には、化学療法、生物学的療法、遺伝子治療、放射線治療、アンチセンス療法、及び血管形成阻害剤 (例えば、アンジオスタチン、エンドスタチン、及びイコン (icon)) の使用を含む療法が含まれる。本発明の方法において複製可能型弱毒化ヘルペスと共に使用するためのこれらの型の療法の選択は、当業者によって容易に実施され得る。

【0021】

本発明の方法において使用され得る化学療法剤の具体例は、以下のように提供される。これらの化合物は、例えば、アルキル化剤、抗腫瘍性抗生物質、代謝拮抗薬、及び天然起源の誘導体を含むいくつかの異なるカテゴリに分類される。本発明の方法において使用され得るアルキル化剤の例には、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド (即ち、サイトキサン (cytoxan))、ダカルバジン、イホスファミド、ロムスチン、メコラレタミン (mecholarethamine)、メルファラン、プロカルバジン、ストレプトゾシン、及びチオテパが含まれ；抗腫瘍性抗生物質の例には、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、マイトマイシン (例えば、マイトマイシンC)、ミトキサントロン、ペントスタチン、及びプリカマイシンが含まれ；代謝拮抗薬の例には、フルオロデオキシウリジン、クラドリビン、シタラビン、フロキシウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル (例えば、5-フルオロウラシル (5FU))、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メルカプトプリン、メトトレキサート、及びチオグアニンが含まれ；そして、天然起源の誘導体の例には、ドセタキセル、エトポシド、イリノテカン、パクリタキセル、テニポシド、トポテカン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、タキソール、プレドニゾン、タモキシフェン、アスパラギナーゼ、及びミトタンが含まれる。

30

40

【0022】

本発明の方法において使用され得る生物学的療法には、腫瘍抗原、抗体、サイトカイン (例えば、インターロイキン、インターフェロン、腫瘍壊死因子 (TNF)、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージ・コロニー刺激因子 (M-CSF)、及び顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF))、ケモカイン、補体成分、補体成分受容体、

50

免疫系アクセサリー分子、接着分子、並びに接着分子受容体からなる群より選択される分子のような免疫調節分子の投与が含まれ得る。

【0023】

本明細書に記載されるような本発明の方法は、一部、下記の実験結果に基づく。

【0024】

実験結果

概要

腫瘍退縮性ヘルペスウイルスは、確立された腫瘍に直接送達された場合、動物モデルにおける有意な抗腫瘍効果を有する。リンパ行性転移は、多くの腫瘍型で一般的に起こる。この研究は、直接注射により原発腫瘍を処置するための、そして原発癌の部位からのリンパ液が流入するリンパ節の転移性腫瘍を処置するためリンパ系を通して移動させるための、弱毒化複製可能型腫瘍退縮性単純ヘルペスウイルス (NV1023) の使用を検討する。正常なリンパ液流入パターンを決定するため、イソスルファン・ブルー色素をマウス耳介に注射し、同側頸部リンパ節群の一貫した青色染色を証明した。X-gal組織化学及びウイルス・ブランク・アッセイによって測定されるように、NV1023の耳介注射は、これらのリンパ節へのウイルスの移動をもたらした。SCC VII細胞系を使用して、およそ20%の頸部リンパ節転移の罹患率を有する新規の耳介扁平上皮癌マウスモデルを、開発した。耳介SCC VII腫瘍の切除後の手術野へのNV1023の送達によって、頸部リンパ節内の転移性SCC VII細胞にウイルスを感染させることができた。7週間の追跡の後、NV1023処理による、有意に増強された局所局所 (locoregional) コントロール ( $p < .05$ 、フィッシャーの直接法) 及び無疾患生存率 (disease free survival) ( $p < .05$ 、ログランク検定) が明白であった。この研究は、外科的切除後の原発腫瘍部位へのNV1023の送達が、原発部位再発及び局所節転移の両方を減少させることを証明している。

【0025】

リンパ節流入パターン

この解剖学的部位の正常流入リンパ節を同定するため、イソスルファン・ブルー色素 (100  $\mu$ l) を左後耳介の基部に注射した。全ての症例 ( $n = 5$ ) において、外頸静脈及び唾液腺組織に隣接している1~3同側頸部リンパ節群に、強い青色色素が可視であった。これらの頸部リンパ節は、耳介領域に対する主要流入節として一貫して同定された (図1A及び1B)。対側頸部リンパ節及び胸鎖乳突筋の深側の同側節は、いずれの動物においても青色に染色されなかった。

【0026】

SCC VII耳介 - 頸部転移モデル

頸部リンパ行性転移のモデルを開発するため、SCC VII腫瘍を、マウスの左耳介に移植し、頸部リンパ節の顕微鏡的播種 (seeding) を可能にするため、最大寸法13~18mmにまで増殖させた。これらの耳介腫瘍の増殖は、有意な病的状態を引き起こさず、摂食も呼吸も損なわなかった。次いで、原発部位病的状態をコントロールし、生存を延長させ、その後の触診可能な頸部節転移の発達を許容するため、耳介腫瘍を切除した。

【0027】

C3H/HeJマウスにおける耳介SCC VII腫瘍の移植及び切除によって、これらの動物のおよそ20%が、以後2週間以内に、同側の首に触診可能な腺症を発症した (図1C及び1D)。一般に > 8mmの寸法であった触診可能な節の症例において、組織学的調査によって、転移性扁平上皮癌の存在を確認した。切除されたリンパ節の組織学的調査は、転移性SCC VII細胞が、リンパ節の被膜下洞に沈着した後、進行性に節実質に浸潤し、節構造全体に取って代わることを証明した (図2A及び2B)。原発耳介腫瘍切除の部位における原発部位再発は、症例のおよそ10%に認められた。

【0028】

耳介から頸部リンパ節へのウイルス移動

非腫瘍保持動物の左耳介にNV1023を注射し、24時間目及び48時間目にX-gal染色細胞に関して同側流入リンパ節を組織学的に調査することにより、腫瘍退縮性ウイルスが耳介か



ら流入頸部リンパ節へと移行し得ることが証明された。24時間目、陽性X-gal染色が、同側頸部リンパ節に存在した(図3A)。青色に染色された細胞は、低密度で、散在している傾向があった。48時間目には、大部分の同側流入節が、青色細胞に関して陰性であった。24時間目及び48時間目いずれにおいても、対側リンパ節は、X-gal染色細胞に関して陰性であった。

#### 【0029】

ウイルスの耳介から頸部リンパ節への移動が成功したことを、GFP発現NV1066ウイルスを使用することによりさらに確認した。NV1066を左後耳介に注射し、頸部リンパ節を24時間後に採集した。同側頸部リンパ節の蛍光顕微鏡検により、NV1066感染細胞の存在を反映する、低密度の散在した緑色蛍光の存在が証明された(図3B及び3C)。

10

#### 【0030】

ウイルス・ブランク・アッセイによって、流入リンパ節から回収可能なウイルス・ブランク形成単位(pfu)の数も決定した。NV1023の耳介ウイルス注射後10分目に切除された流入リンパ節は、節組織1グラム当たりおよそ5000ウイルスpfuを与えた。耳介ウイルス注射後24時間目に切除された同側節、又は10分目もしくは24時間目のいずれかに切除された対側リンパ節からは、生ウイルスが回収されなかった。癌を保持していない動物のリンパにおける、この一過性の低密度のウイルスの出現は、非癌性組織に対しては限定された感染性を有するよう設計されたウイルスから予想される通りのものである。

#### 【0031】

SCC VII耳介腫瘍のウイルス療法

20

確立されたSCC VII腫瘍に対するNV1023のインビボ効力を決定するため、確立された耳介腫瘍へ3回の連続的な用量としてNV1023を注射し、その後の腫瘍寸法を記録した。NV1023により処理された動物の平均腫瘍体積は、対照と比較して有意に減少した(7日目において $p < .0001$ 、t検定、図4)。

#### 【0032】

SCC VII頸部転移のウイルス療法

NV1023を、確立された耳介SCC VII腫瘍の切除後に手術野へと送達した。ウイルス送達後24時間目に、首の検査、頸部節切除、及び両側節群の組織学的調査を動物に実施した。X-gal染色によって、リンパ節内の青色染色転移性SCC VII沈着物の存在が明らかとなった(図5A及び5B)。X-gal染色は、隣接正常リンパ球及び転移性SCC VII細胞のないリンパ節においては最小であった。

30

#### 【0033】

耳介腫瘍の切除後の、PBS( $n = 28$ )又はNV1023( $n = 28$ )のいずれかによる手術野処理を比較することにより、生存率実験を実施した。その後、動物を、原発(耳介)再発又は局部(頸部)転移の発達のいずれかに関してモニタリングした。15日目、PBS処理群の平均頸部節体積( $440\text{mm}^3$ )は、NV1023処理群のそれ( $98\text{mm}^3$ )より大きかった。PBSを受け取った動物28匹のうち3匹(10.7%)が、耳介切除部位における原発部位再発を発症し、5匹(17.9%)が、同側の首における触診可能な節転移を発症し、局所局部失敗は合計8匹(28.6%)であった。NV1023を受け取った動物28匹のうち1匹(3.6%)が原発部位再発を発症し、1匹(3.6%)が触診可能な節転移を発症し、局所局部失敗は合計2匹(7.1%)であった。原発部位再発及び節転移の両方が同一動物に起こる例は、存在しなかった。いずれの群にも、遠位転移の証拠は存在しなかった。NV1023処理群は、PBS処理対照群と比較して有意に増強された局所局部コントロール率( $p < .05$ 、フィッシャーの直接法)を示した。7週間の追跡期間により、NV1023処理群の無疾患生存率は、有意に増強された( $p < .05$ 、ログランク検定)(図7)。

40

#### 【0034】

NV1023投与に起因する病的状態の証拠も、存在しなかった。ウイルスで処理された動物のいずれにおいても、有意な体重減少、粘膜もしくは皮膚の潰瘍、神経毒性、又はその他の毒性は検出されなかった。耳介切開部位は、全て、手術野へのNV1023投与の後、迅速かつ完全な創傷治癒を示した。

50

## 【 0 0 3 5 】

## 材料及び方法

## 細胞系

マウスSCC VII細胞系は、C3H/HeJマウスから自然発生した皮膚扁平上皮癌である。SCC VII (H.Suit, Harvard University) は、18時間という推定倍化時間を有する急速に分裂する細胞系である (Fuら、Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.10: 1473-1478,1984; O'Malleyら、Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.123: 20-24,1997)。SCC VII細胞は、標準的な細胞培養条件で10%FCSを含有しているMEMの中でインピトロで増殖させた。ウイルス・ブランク・アッセイのためのアフリカミドリザル腎臓 (Vero) 細胞も、標準的な細胞培養条件で10%FCSを含有しているMEMの中で増殖させた (American Type Culture Collection, Manassas, VA)。

10

## 【 0 0 3 6 】

## ウイルス

NV1023は、弱毒化複製可能型腫瘍退縮性ヘルペスウイルスであり、その構築は、以前に詳細に記載されている (Wongら、Hum.Gene Ther.12: 253-265,2001)。NV1023は、 $U_L$  ジャンクション内に非機能性の5.2kbのHSV-2 DNAの断片を保持している。このHSV-2断片は、最初は、ヘルペス・ワクチンとしての可能性のある適用を広げるため、NV1020 (R7020) ウイルスに挿入され、それから、NV1023が導出された (Meignierら、J.Infect.Dis.158: 602-614,1988)。NV1023は、1コピーの  $\gamma$ 34.5神経毒性遺伝子及びUL56遺伝子を欠失させる、逆位反復 $U_L$  ジャンクション内の15キロ塩基の欠失によって弱毒化されている。NV1023は、感染のマーカーとして用いるための、US10-12遺伝子座に挿入された大腸菌 - ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子も含有している。

20

## 【 0 0 3 7 】

NV1020 (Medigene Inc., San Diego, CA) は、単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) の弱毒化複製可能型誘導体である (Delmanら、Hum.Gene Ther.11: 2465-2472,2000)。NV1020は、Dr.B.Roizmanより入手された候補HSV-1/2ワクチン株R7020からの未選択クローン性誘導体である (Meignierら、J.Infect.Dis.158: 602-614,1998)。NV1020の構造は、HSV-1ゲノムにおいて通常は二倍体である以下の遺伝子の1コピーのみを残す、内部反復領域を包含している15キロ塩基の欠失を特徴とする：ICP0、ICP4、潜伏関連転写物 (latency associated transcripts) (LAT)、及び神経毒性遺伝子  $\gamma$ 34.5。いくつかの糖タンパク質遺伝子をコードするHSV-2 DNAの断片が、この欠失領域に挿入された。さらに、700塩基対の欠失は、オーバーラップしている $U_L$  24遺伝子の転写物の発現も防止する、内因性チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子座を包含している。HSV-1 TK遺伝子の外因性コピーが、 $\alpha$ 4プロモーターの調節下に挿入された。ウイルスは、Vero細胞において繁殖させ、細胞画分からウイルスを放出させるために凍結解凍溶解によって採集した。細胞溶解物を遠心分離によって清浄化し、ウイルス力価をブランク・アッセイによってVero細胞において決定した。ウイルス調製物は、全て、D-PBS-10%グリセリン中に製剤化し、-80℃で保管した。

30

## 【 0 0 3 8 】

## 動物

動物における手順は、全て、メモリアル・スローン - ケタリング研究所の動物の管理及び使用に関する委員会 (Memorial Sloan-Kettering Institutional Animal Care and Use Committee) によって承認された。イソスルファン・ブルー色素、SCC VII腫瘍細胞、及びNV1023又はNV1066ウイルスの注射のため、6週齢雄C3H/HeJマウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、吸入メトキシフルレンによる麻酔を施した。耳介腫瘍の外科的切除の前には、各動物に、ケタミン (70  $\mu$ g) 及びキシラジン (20  $\mu$ g) を含む滅菌水100  $\mu$ lの腹腔内注射を与えた。動物は、CO<sub>2</sub>吸入によって屠殺された。

40

## 【 0 0 3 9 】

## リンパ節流入パターン

耳介領域の正常リンパ液流入パターンは、C3H/HeJマウス (n=5) の後左耳介の基部へ1%イソスルファン・ブルー色素 (100  $\mu$ l) を注射することにより決定した。注射後2分目

50

にマウスを屠殺し、それらの首を外科的に検査し、流入頸部節を青色色素の存在によって視覚的に同定した。

#### 【 0 0 4 0 】

#### SCC VII耳介 - 頸部転移モデルの開発

新規のマウス扁平上皮癌頸部転移モデルを開発した。SCC VII細胞 $1 \times 10^6$ 個を含むPBS 50  $\mu$ lを、各マウスの左後耳介の基部へ注射することによって、耳介腫瘍を確立した。13日目までに、耳介腫瘍は、最大寸法13~18mmの範囲となった。次いで、全ての腫瘍を、左耳介と共に完全に外科的に切除し、切開部を、ランニング4-0ナイロン縫合糸により閉鎖した。

#### 【 0 0 4 1 】

術後2~3週間にわたり、その後の同側の首における触診可能な腺症の発達に関して動物をモニタリングした。腫瘍切除後の様々な時点で、動物を屠殺し、首を外科的に検査した。肥大した頸部節を切除し、包埋媒体（ティッシュ・テック（Tissue Tek）、Sagura Inc., Torrance, CA）中で直ちに凍結させ、6  $\mu$ m厚さの切片へと切断し、ヘマトキシリン及びエオシンで染色し、転移性扁平上皮癌の存在を同定するため組織学的に調査した。

#### 【 0 0 4 2 】

#### 耳介から頸部リンパ節へのウイルス移動

ウイルスが耳介から頸部リンパ節へと移行し得ることを立証するため、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）100  $\mu$ l当たり $2 \times 10^7$  pfuという用量で、NV1066又はNV1023を、非癌保持C3H/HeJマウスの左後耳介の基部へ注射した。24時間後又は48時間後、マウスを屠殺し、首を外科的に検査した。同側及び対側の頸部リンパ節を切除し、ティッシュ・テック（Tissue Tek）中で凍結させ、6  $\mu$ m厚さに切断し、ガラススライド上に設置し、PBSで洗浄し、調査した。

#### 【 0 0 4 3 】

NV1066を注射された動物及び対照動物からの節を、515~585nmの波長の蛍光顕微鏡下で調査し、蛍光性緑色の存在によってGFP発現を同定した。青色蛍光により細胞核を同定するため、切片を、4,6-ジアミノ-2-フェニルインドール20  $\mu$ l（DAPI、0.1  $\mu$ g/ml）を含むマウンティング媒体（mounting media）（1mg p-フェニレンジアミン / 1cc 80%グリセロール含有PBS）により染色した。

#### 【 0 0 4 4 】

NV1023を注射された動物及び対照からの節を、-gal発現の査定のため、以前に記載されたようにして（Gellerら、Science 241: 1667-1669, 1988）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドール- $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ（X-gal）により37℃で2時間染色した。ヌクレアー・ファースト・レッド（nuclear fast red）による背景細胞核の対比染色を実施した。-ガラクトシダーゼを発現しているウイルス感染細胞を、青色染色細胞として組織学的に同定した。

#### 【 0 0 4 5 】

頸部リンパ節からのウイルス回収量を測定するため、PBS 100  $\mu$ l中 $2 \times 10^7$  pfuという用量で、NV1023を、マウス左耳介に再び注射した。ウイルス注射後10分目（n=3）及び24時間目（n=3）に、動物を屠殺し、両側頸部リンパ節を外科的に切除し、計量し、PBS 250  $\mu$ l中でホモジナイズし、混合し、細胞を溶解させるため、3回の凍結解凍サイクルに供した。第二の遠心分離（30秒、10,000rpm）の後、上清を回収し、回収されたウイルス・プラーク形成単位の量を決定するため、以前に記載されたようにして、コンフルエントVero細胞において力価決定した（Wongら、Hum. Gene Ther. 12: 253-265, 2001）。

#### 【 0 0 4 6 】

#### SCC VII耳介腫瘍のウイルス療法

SCC VII細胞 $5 \times 10^5$ 個を含むPBS 50  $\mu$ lを、C3H/HeJマウスの左後耳介の基部へ注射することにより、耳介腫瘍を確立した。3~4日以内に全ての動物において可視の腫瘍が発達した。6日目までに、腫瘍は最大寸法およそ5~6mmとなり、動物を、等しい腫瘍体積の二群に分けた。一方の群（n=8）を、（隔日送達された）NV1023  $2 \times 10^7$  pfuを含むPBS 100  $\mu$ l

10

20

30

40

50

の3回の連続的な腫瘍内注射により処理した。他方の群 (n=8) には、対照として、同一計画のPBS注射を与えた。その後の腫瘍寸法を記録し、楕円体の体積に関する以下の式によって体積を計算した：体積 = (4/3) \* π \* (長さ/2) \* (幅/2)<sup>2</sup>。

【0047】

原発腫瘍部位の注射によるSCC VII頸部転移のウイルス療法

耳介SCC VII腫瘍を、前記のようにして確立した。腫瘍細胞注射後13日目、腫瘍体積を測定し、動物を等しい腫瘍体積を有する二群に分割した。全てのマウスにおいて、耳介腫瘍を完全に切除した。腫瘍切除及び4-0ナイロン縫合系による創傷閉鎖の後直ちに、一方の動物群 (n=28) をNV1023で処理し、他方の群 (n=28) をPBSで処理した。PBS 100 μl 中5 × 10<sup>7</sup> pfuという用量のNV1023を、閉鎖された切開線より、皮膚と手術野との間の可能性のある間隙へと注射した。対照動物群には、PBS 100 μlを同様に注射した。別の動物群 (n=10) を、NV1023により同様に処理し、その24時間後及び48時間後に頸部リンパ節を切除し、組織化学的染色により - ガラクトシダーゼ発現に関して調査した。

10

【0048】

術後、動物を、触診可能な頸部転移性疾患、原発部位 (耳介) 再発、又は腫瘍成長もしくはウイルス投与に関連した任意の毒性の発生に関してルーチンにモニタリングした。その後発達した触診可能な頸部腺症の寸法を、ノギスにより測定し、節体積を計算した。最大節寸法もしくは原発部位再発が18mmを越えた場合、又は皮膚潰瘍の証拠が存在した場合、又はその他の病的状態が認められた場合には、動物を屠殺した。

【0049】

本明細において言及された出版物及び特許出願は、全て、独立の出版物又は特許出願が各々参照として組み込まれると特別かつ個別に示されたかのごとく、参照として本明細書に組み込まれる。

20

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】Aは、後耳介の基部に青色色素を注射されたマウスを示す写真である。Bは、青色色素の注射が、同側頸部リンパ節における迅速な青色検出をもたらすことを示す写真である。マウス耳介の正常リンパ液流入パターンは、同側頸部リンパ節に至る。C及びDは、扁平上皮癌 (SCC) VII腫瘍の耳介への移植後2週間目 (1C) 及び4週間目 (1D) の、これらの同じ頸部リンパ節における転移性疾患の発達を示す写真である。

30

【図2】耳介SCC VII腫瘍の移植及び増殖が、流入頸部リンパ節への転移の組織学的証拠をもたらすことを示す写真である。Aは、まず被膜下洞に浸潤しているSCC VII細胞を示す頸部リンパ節のH&E染色 (100×) である。Bは、正常リンパ球に隣接している転移性SCC VII細胞を示すもう一つのH&E染色リンパ節切片の高倍率視野 (800×) である。

【図3】腫瘍退縮性ヘルペスウイルスの耳介注射後、ウイルス感染細胞が、流入頸部リンパ節に組織学的に検出され得ることを示す写真である。Aは、NV1023 (2 × 10<sup>7</sup> pfu) の左耳介への注射によって、24時間目に、低密度lacZ発現青色細胞が、同側頸部リンパ節に検出されることを示す。Bは、NV1066 (2 × 10<sup>7</sup> pfu) が左耳介に注射されたDAPI染色節切片が、24時間目の調査により、同側頸部リンパ節に蛍光顕微鏡下で観察され得ることを示す。DAPI染色は、全ての核を可視化するために使用される。Cは、緑色蛍光タンパク質の発現を促進するNV1066が感染した隣接頸部リンパ節切片からの細胞を示す。

40

【図4】NV1023の腫瘍内注射による平均耳介腫瘍体積の減少を示すグラフである。6~8mm寸法の確立された耳介腫瘍を、NV1023 (2 × 10<sup>7</sup> pfu) の3回の連続的な腫瘍内注射 (0日目、2日目、及び4日目) により処理した。平均耳介腫瘍体積は、7日目、PBS処理群と比較してウイルス処理群において有意に減少した (p < .0001、t検定)。

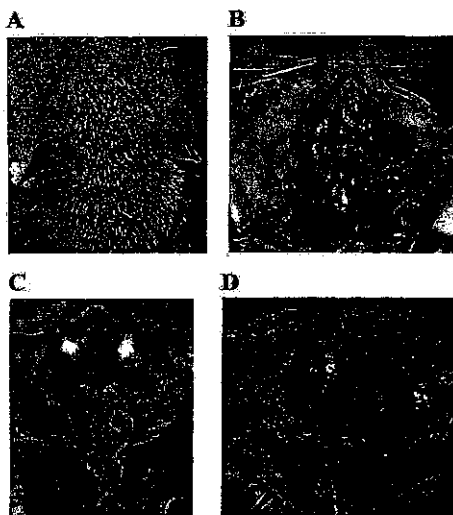
【図5】頸部リンパ節内のSSC VIIの転移性沈着物が、切除された耳介腫瘍の手術野へ送達されたNV1023により感染され得ることを示す写真である。Aは、転移性SSC VII細胞による完全な置き換わりを示す、切除された頸部節からのH&E染色切片 (400×) である。Bは、NV1023による感染を反映している、散在した青色染色転移性SSC VII細胞を示すX-galで染色された隣接節切片を示す写真である (400×)。

50

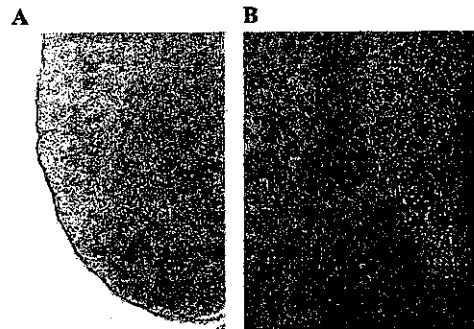
【図 6】頸部リンパ節内の転移性腫瘍体積が、原発部位における NV1023 処理により減少することを示すグラフである。耳介腫瘍を切除し、手術野を  $5 \times 10^7$  pfu の NV1023 により処理した。平均頸部節体積は、PBS 処理群と比較してウイルス処理群の方が低かった（6～15 日目）。

【図 7】無疾患生存率が、耳介 SSC VII 腫瘍の切除後の手術野の NV1023 処理（ $5 \times 10^7$  pfu）により有意に改善されることを示すグラフである（ $p < .05$ 、ログランク検定）。

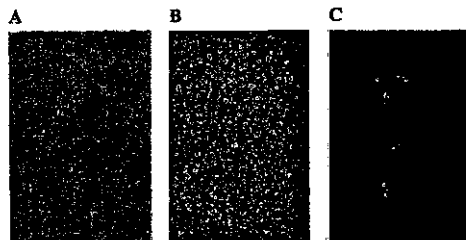
【図 1】



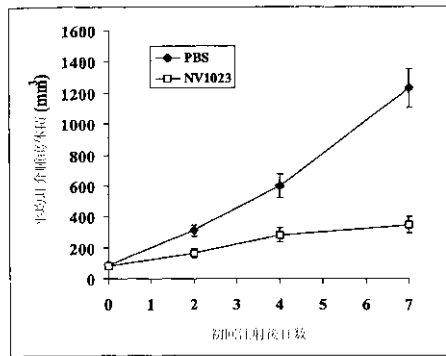
【図 2】



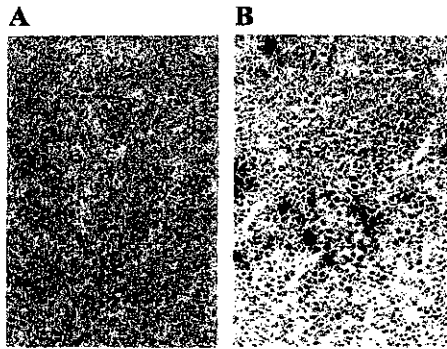
【図 3】



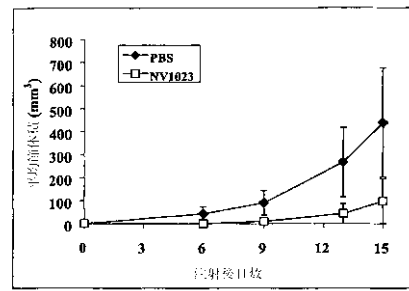
【図 4】



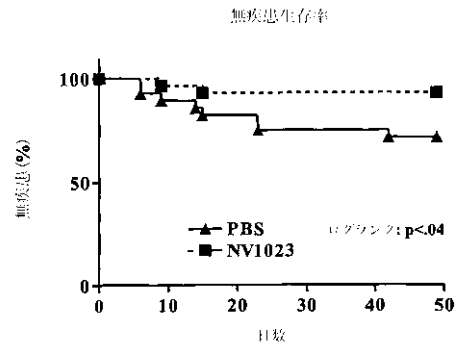
【図 5】



【図 6】



【図 7】



## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT   |   | International application No.<br>PCT/US03/06519   |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
|---|---|---|------------|--|-----------------------|---|---|------|-----|--|------|---------------|--|--|-----|---|----------------|-----|--|----------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(7) : C12N 15/63, 15/85, 15/87; A01N 43/04; A61K31/70<br>US CL : 435/455; 514/44<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |   |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 435/455; 514/44<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Please See Continuation Sheet  |   |   |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>T</td> <td>JARNAGIN et al. Neoadjuvant treatment of hepatic malignancy: an oncolytic herpes simplex virus expressing IL-12 effectively treats the parent tumor and protects against recurrence-after resection. Cancer Gene Therapy. 2003, Vol. 10, pages 215-223.</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>X,P</td> <td>WONG et al. Oncolytic herpesvirus effectively treats murine squamous cell carcinoma and spreads by natural lymphatics to treat sites of lymphatic metastases. Human Gene Therapy. 1 July 2002, Vol. 13, pages 1213-1223.</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>X<br/>---<br/>Y</td> <td>WONG et al. Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma Human Gene Therapy. 10 February 2001, Vol. 12, pages 253-265.</td> <td>14,15,17,18,19,20,21,24-27<br/>-----<br/>1-13,16,22,23</td> </tr> <tr> <td>X,P</td> <td>US 6,428,968 B1 (MOLNAR-KIMBER et al) 6 August 2002 (06.08.2002), see whole document, especially columns 21-24.</td> <td>1-6,8-17,19-27</td> </tr> <tr> <td>X,P</td> <td>US 2002/0071832 A1 (FONG et al) 13 June 2002 (13.06.2002), see whole document, especially pages 11-13.</td> <td>1-6,8-17,19-27</td> </tr> </tbody> </table> |   |   | Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | T | JARNAGIN et al. Neoadjuvant treatment of hepatic malignancy: an oncolytic herpes simplex virus expressing IL-12 effectively treats the parent tumor and protects against recurrence-after resection. Cancer Gene Therapy. 2003, Vol. 10, pages 215-223. | 1-27 | X,P | WONG et al. Oncolytic herpesvirus effectively treats murine squamous cell carcinoma and spreads by natural lymphatics to treat sites of lymphatic metastases. Human Gene Therapy. 1 July 2002, Vol. 13, pages 1213-1223. | 1-27 | X<br>---<br>Y | WONG et al. Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma Human Gene Therapy. 10 February 2001, Vol. 12, pages 253-265. | 14,15,17,18,19,20,21,24-27<br>-----<br>1-13,16,22,23 | X,P | US 6,428,968 B1 (MOLNAR-KIMBER et al) 6 August 2002 (06.08.2002), see whole document, especially columns 21-24. | 1-6,8-17,19-27 | X,P | US 2002/0071832 A1 (FONG et al) 13 June 2002 (13.06.2002), see whole document, especially pages 11-13. | 1-6,8-17,19-27 |
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| T   | JARNAGIN et al. Neoadjuvant treatment of hepatic malignancy: an oncolytic herpes simplex virus expressing IL-12 effectively treats the parent tumor and protects against recurrence-after resection. Cancer Gene Therapy. 2003, Vol. 10, pages 215-223. | 1-27  |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| X,P   | WONG et al. Oncolytic herpesvirus effectively treats murine squamous cell carcinoma and spreads by natural lymphatics to treat sites of lymphatic metastases. Human Gene Therapy. 1 July 2002, Vol. 13, pages 1213-1223.                                | 1-27  |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| X<br>---<br>Y   | WONG et al. Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma Human Gene Therapy. 10 February 2001, Vol. 12, pages 253-265.  | 14,15,17,18,19,20,21,24-27<br>-----<br>1-13,16,22,23  |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| X,P   | US 6,428,968 B1 (MOLNAR-KIMBER et al) 6 August 2002 (06.08.2002), see whole document, especially columns 21-24.   | 1-6,8-17,19-27  |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| X,P   | US 2002/0071832 A1 (FONG et al) 13 June 2002 (13.06.2002), see whole document, especially pages 11-13.  | 1-6,8-17,19-27  |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| <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:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family  |   |   |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| Date of the actual completion of the international search<br>07 August 2003 (07.08.2003)  |   | Date of mailing of the international search report<br>27 OCT 2003                               |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (703)305-3230  |   | Authorized officer<br>Patricia D. Roberts for<br>Brian Whiteman<br>Telephone No. (703) 308-0196 |            |  |                       |   |   |      |     |  |      |               |  |  |     |   |                |     |  |                |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06519

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

WEST 2.1, STN

search terms: cancer, tumor, herpes virus, NV1023, gene therapy, HSV-1, replication competent, resecting



## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I           | テーマコード(参考) |
|--------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 K 48/00            | A 6 1 P 35/00 |            |
| A 6 1 P 35/00            | A 6 1 P 35/04 |            |
| A 6 1 P 35/04            | A 6 1 K 37/02 |            |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フォン ユマン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー ヨーク アpartment 4ビー イースト 68ス  
ストリート 345

(72)発明者 ワン リチャード

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 スカーズデール セネカ ロード 9

Fターム(参考) 4C060 MM01 MM24

4C084 AA02 AA03 AA13 BA44 DA01 DA02 DA12 DA19 DA21 DA25  
DA32 MA66 NA10 NA13 ZB262  
4C085 AA03 BB01 CC08 DD62 EE03 GG01  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA66 NA10 NA13 ZB26  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA10 NA13 ZB26