

(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2004-505924

(P2004-505924A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

|                                   |               |             |
|-----------------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int. Cl. <sup>7</sup>        | F I           | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 35/76                     | A 6 1 K 35/76 | 4 C O 8 4   |
| A 6 1 K 38/00                     | A 6 1 K 39/15 | 4 C O 8 5   |
| A 6 1 K 39/15                     | A 6 1 K 45/00 | 4 C O 8 7   |
| A 6 1 K 45/00                     | A 6 1 P 1/00  |             |
| A 6 1 P 1/00                      | A 6 1 P 1/16  |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 84 頁) 最終頁に続く |               |             |

|               |                              |          |                      |
|---------------|------------------------------|----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2002-517077 (P2002-517077) | (71) 出願人 | 503051567            |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年7月20日 (2001.7.20)       |          | オンコリティクス バイオテック, イン  |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成15年2月7日 (2003.2.7)         |          | コーポレイティッド            |
| (86) 国際出願番号   | PCT/CA2001/001055            |          | カナダ国 ティー2エヌ 1エックス7   |
| (87) 国際公開番号   | W02002/011742                |          | アルベルタ, カルガリー, ケンジント  |
| (87) 国際公開日    | 平成14年2月14日 (2002.2.14)       |          | ン クレセント エヌ. ダブリュー. 1 |
| (31) 優先権主張番号  | 09/636, 597                  |          | 1 6 7, スイート 2 1 0    |
| (32) 優先日      | 平成12年8月10日 (2000.8.10)       | (74) 代理人 | 100078282            |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 山本 秀策            |
|               |                              | (74) 代理人 | 100062409            |
|               |                              |          | 弁理士 安村 高明            |
|               |                              | (74) 代理人 | 100113413            |
|               |                              |          | 弁理士 森下 夏樹            |
| 最終頁に続く        |                              |          |                      |

(54) 【発明の名称】 細胞増殖性障害の処置のためのレオウイルスの認識を妨げる方法

## (57) 【要約】

本発明は、哺乳動物の細胞増殖性障害、特に、r a s 媒介性細胞増殖性障害の処置におけるレオウイルスの認識を妨げるための方法に関する。哺乳動物は、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、ヒト、およびヒト以外の霊長類から選択され得る。本発明の方法は、哺乳動物の免疫系を抑制するかまたはそうでなければ阻害すること、そして同時にまたはそれに続いて、有効量の1つ以上のレオウイルスを増殖している細胞の実質的な溶解を生じる条件下で増殖している細胞に投与することを包含する。詳細には、この方法によって、増殖性障害を処置するための免疫抑制型哺乳動物または免疫不全型哺乳動物のレオウイルス処置を提供する。免疫抑制、免疫阻害、または他の方法での哺乳動物の免疫不全状態の誘導は、レオウイルスをより有効にする。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳動物の r a s 媒介性増殖性障害を処置するためのキットであって、該キットは、以下：

A) 1つ以上のレオウイルス、および

B) 該1つ以上のレオウイルスを使用するための方法を記載した指示書

を含み、ここで該方法は、以下：

工程 a) 以下からなる群より選択される工程を実行する工程：

i) 該哺乳動物中の増殖している細胞に有効量の免疫抑制薬を投与する工程；

i i) 該哺乳動物から B細胞または T細胞を除去する工程；

i i i) 該哺乳動物から抗レオウイルス抗体を除去する工程；

i v) 該哺乳動物から抗体を除去する工程；

v) 抗-抗レオウイルス抗体を該哺乳動物に投与する工程；および

v i) 該哺乳動物の免疫系を抑制する工程；ならびに

工程 b) 該哺乳動物中の増殖している細胞に、該増殖している細胞の実質的な溶解を生じる条件下で、有効量の該1つ以上のレオウイルスを投与する工程、を包含する、キット。

## 【請求項 2】

前記レオウイルスが、哺乳類レオウイルスおよびトリレオウイルスからなる群より選択される、請求項 1 に記載のキット。

## 【請求項 3】

前記レオウイルスが哺乳類レオウイルスである、請求項 2 に記載のキット。

## 【請求項 4】

前記レオウイルスがヒトレオウイルスである、請求項 3 に記載のキット。

## 【請求項 5】

前記レオウイルスが、血清型 1 のレオウイルス、血清型 2 のレオウイルス、および血清型 3 のレオウイルスからなる群より選択される、請求項 4 に記載のキット。

## 【請求項 6】

前記レオウイルスが血清型 3 のレオウイルスである、請求項 5 に記載のキット。

## 【請求項 7】

前記レオウイルスがトリレオウイルスである、請求項 2 に記載のキット。

## 【請求項 8】

1つ以上の型のレオウイルスが投与される、請求項 1 に記載のキット。

## 【請求項 9】

1つ以上の株のレオウイルスが投与される、請求項 1 に記載のキット。

## 【請求項 10】

前記レオウイルスが野生単離物である、請求項 1 に記載のキット。

## 【請求項 11】

前記 r a s 媒介性増殖性障害が新生物である、請求項 1 に記載のキット。

## 【請求項 12】

前記 r a s 媒介性増殖性障害が神経線維腫症である、請求項 1 に記載のキット。

## 【請求項 13】

前記新生物が固形の新生物である、請求項 11 に記載のキット。

## 【請求項 14】

前記新生物が、肺癌、前立腺癌、結直腸癌、甲状腺癌、腎臓癌、副腎癌、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、ならびに中枢および末梢神経系癌からなる群より選択される、請求項 11 に記載のキット。

## 【請求項 15】

前記新生物が、中枢神経系癌である、請求項 14 に記載のキット。

## 【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記新生物が、乳癌である、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 17】

前記新生物が、造血系の新生物である、請求項 11 にキット。

【請求項 18】

前記レオウイルスが、固形の新生物内にまたはその近くに注射によって投与される、請求項 13 に記載のキット。

【請求項 19】

前記レオウイルスが哺乳動物に静脈内投与される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 20】

前記レオウイルスが哺乳動物に腹腔内投与される、請求項 1 に記載のキット。

10

【請求項 21】

前記哺乳動物が免疫応答性である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 22】

前記レオウイルスが免疫防御される、請求項 21 に記載のキット。

【請求項 23】

前記レオウイルスがミセル中にカプセル化される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 24】

請求項 1 に記載のキットであって、ここで前記方法において、工程 (a) の前に、有効量の該 1 つ以上のレオウイルスが、増殖している細胞の実質的な溶解を生じる条件下で投与される、キット。

20

【請求項 25】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 26】

レオウイルスの約  $1 \sim 10^{1.5}$  のプラーク形成単位 / kg 体重が投与される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 27】

前記レオウイルスが単回用量で投与される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 28】

前記レオウイルスが 1 回より多い用量で投与される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 29】

30

前記新生物が転移性である、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 30】

前記方法が有効量の化学療法剤を投与する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 31】

前記レオウイルスが、投与の前にプロテアーゼで処理される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 32】

前記新生物が膵臓癌である、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 33】

請求項 11 に記載のキットであって、ここで前記方法が、新生物の実質的に全ての外科的切除、および全ての残存している新生物細胞の実質的な腫瘍崩壊を生じるために十分な量での外科手術部位へのレオウイルスの投与をさらに含む、請求項 11 に記載のキット。

40

【請求項 34】

前記工程 a) が、前記哺乳動物中の増殖している細胞に有効量の免疫抑制剤を投与する工程である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 35】

前記免疫抑制剤がレオウイルスと同時に投与される、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 36】

前記免疫抑制剤がレオウイルスの前に投与される、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 37】

50

前記免疫抑制剤が、シクロスポリン、ラパマイシン、タクロリムス、ミコフェノール酸、アザチオプリン、上記の薬剤のアナログ、放射線照射、H I V感染、および抗－抗レオウイルス抗体からなる群より選択される、請求項 3 4 に記載のキット。

【請求項 3 8】

免疫抑制剤、レオウイルス、および薬学的に受容可能な賦形剤を含有している、薬学的組成物。

【請求項 3 9】

化学療法剤をさらに含有している、請求項 3 8 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 0】

改変型レオウイルスおよび免疫防御型レオウイルスからなる群より選択される少なくとも 10  
1 つのレオウイルスを含有している、請求項 3 8 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 1】

免疫抑制剤およびレオウイルスを含有している薬学的組成物を包含している、キット。

【請求項 4 2】

化学療法剤をさらに包含している、請求項 4 1 に記載のキット。

【請求項 4 3】

前記工程 a) が、前記哺乳動物から B 細胞または T 細胞を除去する工程である、請求項 1  
に記載のキット。

【請求項 4 4】

前記 B 細胞または T 細胞が、濾過およびヘム透析によって除去される、請求項 4 3 に記載  
のキット。 20

【請求項 4 5】

前記濾過がアフィニティークロマトグラフィーで行われ、アフィニティークロマトグラフ  
ィーは固体支持体に固定された抗体を含む、請求項 4 4 に記載のキット。

【請求項 4 6】

前記抗体が、抗 T 細胞または抗 B 細胞抗体である、請求項 4 5 に記載のキット。

【請求項 4 7】

前記 B 細胞および T 細胞が放射線治療によって除去される、請求項 4 3 に記載のキット。

【請求項 4 8】

前記 B 細胞および T 細胞が環式ステロイドの使用によって除去される、請求項 4 3 に記載  
のキット。 30

【請求項 4 9】

前記環式ステロイドがシクロスポリンである、請求項 4 8 に記載のキット。

【請求項 5 0】

キットであって、以下：

a) 哺乳動物から B 細胞または T 細胞を除去するための手段；および

b) レオウイルスを含有している薬学的組成物

を包含している、キット。

【請求項 5 1】

化学療法剤をさらに包含している、請求項 5 0 に記載のキット。 40

【請求項 5 2】

前記工程 a) が、前記哺乳動物から抗レオウイルス抗体を除去する工程である、請求項 1  
に記載のキット。

【請求項 5 3】

前記抗レオウイルス抗体が、ヘム透析および固定化レオウイルス上の血液の通過によって  
除去される、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 5 4】

前記レオウイルスが固体支持体に対して固定される、請求項 5 3 に記載のキット。

【請求項 5 5】

キットであって、以下：

a) 前記哺乳動物から抗レオウイルス抗体を除去するための手段；および  
b) レオウイルスを含有している薬学的組成物を包含している、キット。

【請求項 56】

化学療法剤をさらに包含している、請求項 55 に記載のキット。

【請求項 57】

前記工程 a) が、前記哺乳動物から抗体を除去する工程である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 58】

前記抗体が IgG 抗体である、請求項 57 に記載のキット。

10

【請求項 59】

前記抗体が、ヘム透析および固定化プロテイン A 上の血液の通過によって除去される、請求項 57 に記載のキット。

【請求項 60】

前記工程 a) が、抗-抗レオウイルス抗体を前記哺乳動物に投与する工程である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 61】

前記抗-抗レオウイルス抗体が静脈内投与される、請求項 60 に記載のキット。

【請求項 62】

前記抗-抗レオウイルス抗体がヒト化抗体である、請求項 60 に記載のキット。

20

【請求項 63】

抗-抗レオウイルス抗体、レオウイルス、および薬学的に受容可能な賦形剤を含有している、薬学的組成物。

【請求項 64】

化学療法剤をさらに含有している、請求項 63 に記載の薬学的組成物。

【請求項 65】

改変型レオウイルスおよび免疫防御型レオウイルスからなる群より選択される少なくとも 1 つのレオウイルスを含有している、請求項 63 に記載の薬学的組成物。

【請求項 66】

抗-抗レオウイルス抗体およびレオウイルスを含有している薬学的組成物を包含している、キット。

30

【請求項 67】

化学療法剤をさらに包含している、請求項 66 に記載のキット。

【請求項 68】

前記工程 a) が、前記哺乳動物の免疫系を抑制する工程である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 69】

前記免疫系が放射線治療によって抑制される、請求項 68 に記載のキット。

【請求項 70】

前記免疫系が環式ステロイドによって抑制される、請求項 68 に記載のキット。

40

【請求項 71】

前記環式ステロイドがシクロスポリンである、請求項 70 に記載のキット。

【請求項 72】

少なくとも 1 つの前記レオウイルスが、組換えレオウイルスである、請求項 1～4、7～37、43～49、52～54、57～62 および 68～71 のいずれかに記載のキット。

【請求項 73】

前記組換えレオウイルスが、2 つ以上のレオウイルス株に由来する、請求項 72 に記載のキット。

【請求項 74】

50

請求項 7 3 に記載のキットであって、ここで前記 2 つ以上のレオウイルス株が、Dear ing 株、Abney 株、Jones 株および Lang 株からなる群から選択される、キット。

【請求項 7 5】

請求項 7 2 ～ 7 4 のいずれかに記載のキットであって、ここで前記組換えレオウイルスが、哺乳動物細胞を、異なるサブタイプのレオウイルスを用いて同時感染させることにより生じる、キット。

【請求項 7 6】

前記組換えレオウイルスが、天然に存在するものである、請求項 7 2 ～ 7 5 のいずれかに記載のキット。

【請求項 7 7】

前記組換えレオウイルスが、天然に存在しないものである、請求項 7 2 ～ 7 5 のいずれかに記載のキット。

【請求項 7 8】

請求項 7 2 ～ 7 7 のいずれかに記載のキットであって、ここで前記組換えレオウイルスが、天然に存在する変異コートタンパク質コード配列を含む、キット。

【請求項 7 9】

請求項 7 2 ～ 7 7 のいずれかに記載のキットであって、ここで前記組換えレオウイルスが、変異コートタンパク質コード配列を含む、キット。

【請求項 8 0】

請求項 7 2、7 3 および 7 5 ～ 7 7 のいずれかに記載のキットであって、ここで前記組換えレオウイルスが、血清型 1 のレオウイルス、血清型 2 のレオウイルスおよび血清型 3 のレオウイルスからなる群から選択されるレオウイルスの再組み合わせより生じる、キット。

【請求項 8 1】

1 より多い組換えレオウイルス株が投与される、請求項 7 2 ～ 8 0 のいずれかに記載のキット。

【請求項 8 2】

請求項 1 ～ 3 7、4 3 ～ 4 9、5 2 ～ 5 4、5 7 ～ 6 2 および 6 8 ～ 7 1 のいずれかに記載のキットであって、ここで前記レオウイルスが、以下：血管内投与、くも膜下内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与、局所投与、経口投与、直腸内投与、膣内投与、鼻腔内投与および腫瘍内投与からなる群から選択される投与経路により投与される、キット。

【請求項 8 3】

請求項 7 2 ～ 8 1 のいずれかに記載のキットであって、ここで前記組換えレオウイルスが、以下：血管内投与、くも膜下内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与、局所投与、経口投与、直腸内投与、膣内投与、鼻腔内投与および腫瘍内投与からなる群から選択される投与経路により投与される、キット。

【請求項 8 4】

前記レオウイルスが組換えレオウイルスである、請求項 3 8 ～ 4 0 または 6 3 ～ 6 5 のいずれかに記載の薬学的組成物。

【請求項 8 5】

前記レオウイルスが、1 つ以上の組換えレオウイルスである、請求項 4 1、4 2、5 0、5 1、5 5、5 6、6 6 または 6 7 のいずれかに記載のキット。

【請求項 8 6】

哺乳動物の ras 媒介性増殖性障害を処置するための薬学的組成物の製造のための 1 つ以上のレオウイルスの使用であって、該薬学的組成物は、有効量の 1 つ以上のレオウイルスを含み、ここで該薬学的組成物は、以下の工程：

工程 a) 以下からなる群より選択される工程を実行する工程：

i) 該哺乳動物中の増殖している細胞に有効量の免疫抑制薬を投与する工程；

10

20

30

40

50

i i) 該哺乳動物からB細胞またはT細胞を除去する工程；  
i i i) 該哺乳動物から抗レオウイルス抗体を除去する工程；  
i v) 該哺乳動物から抗体を除去する工程；  
v) 抗－抗レオウイルス抗体を該哺乳動物に投与する工程；および  
v i) 該哺乳動物の免疫系を抑制する工程；ならびに  
工程b) 該哺乳動物中の増殖している細胞に、該増殖している細胞の実質的な溶解を生じる条件下で、該薬学的組成物を投与する工程、  
を包含する方法を通じて使用される、使用。

【請求項87】

請求項86に記載の使用であって、ここで、該薬学的組成物は、免疫抑制剤および抗－抗レオウイルス抗体からなる群から選択される少なくとも1つの成分をさらに含む、使用。 10

【請求項88】

前記レオウイルスが、哺乳類レオウイルスおよびトリレオウイルスからなる群より選択される、請求項86または87に記載の使用。

【請求項89】

前記レオウイルスが哺乳類レオウイルスである、請求項88に記載の使用。

【請求項90】

前記レオウイルスがヒトレオウイルスである、請求項89に記載の使用。

【請求項91】

前記レオウイルスが、血清型1のレオウイルス、血清型2のレオウイルス、および血清型 20  
3のレオウイルスからなる群より選択される、請求項90に記載の使用。

【請求項92】

前記レオウイルスが血清型3のレオウイルスである、請求項91に記載の使用。

【請求項93】

前記レオウイルスがトリレオウイルスである、請求項88に記載の使用。

【請求項94】

1つ以上の型のレオウイルスが投与される、請求項86～93のいずれかに記載の使用。

【請求項95】

1つ以上の株のレオウイルスが投与される、請求項86～93のいずれかに記載の使用。

【請求項96】

少なくとも1つのレオウイルスが野生単離物である、請求項86～95に記載の使用。 30

【請求項97】

前記ras媒介性増殖性障害が新生物である、請求項86～96に記載の使用。

【請求項98】

前記ras媒介性増殖性障害が神経線維腫症である、請求項86～96に記載の使用。

【請求項99】

前記新生物が固形の新生物である、請求項97に記載の使用。

【請求項100】

前記新生物が、肺癌、前立腺癌、結直腸癌、甲状腺癌、腎臓癌、副腎癌、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、ならびに中枢および末梢神経系癌からなる群より選択される、請求項97に記載 40  
の使用。

【請求項101】

前記新生物が、中枢神経系癌である、請求項97または100に記載の使用。

【請求項102】

前記新生物が、乳癌である、請求項97または100に記載の使用。

【請求項103】

前記新生物が、造血系の新生物である、請求項97に記載の使用。

【請求項104】

前記レオウイルスが、固形の新生物内にまたはその近くに注射によって投与される、請求項99に記載の使用。

## 【請求項 105】

前記レオウイルスが前記哺乳動物に静脈内投与される、請求項 86～104 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 106】

前記レオウイルスが前記哺乳動物に腹腔内投与される、請求項 86～104 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 107】

前記哺乳動物が免疫応答性である、請求項 86～106 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 108】

前記レオウイルスが免疫防御される、請求項 86～107 のいずれかに記載の使用。

10

## 【請求項 109】

前記レオウイルスがミセル中にカプセル化される、請求項 86～108 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 110】

前記方法において、工程 (a) の前に、該薬学的組成物が、増殖している細胞の実質的な溶解を生じる条件下で投与される、請求項 86～109 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 111】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 86～110 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 112】

レオウイルスの約  $1 \sim 10^{15}$  のプラーク形成単位 / kg 体重が投与される、請求項 86～111 のいずれかに記載の使用。

20

## 【請求項 113】

前記レオウイルスが単回用量で投与される、請求項 86～112 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 114】

前記レオウイルスが 1 回より多い用量で投与される、請求項 86～112 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 115】

前記新生物が転移性である、請求項 97 または 99～103 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 116】

前記方法が、有効量の化学療法剤の投与をさらに包含する、請求項 86～115 のいずれかに記載の使用。

30

## 【請求項 117】

前記レオウイルスが、投与の前にプロテアーゼで処理される、請求項 86～116 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 118】

前記新生物が膵臓癌である、請求項 97、100 または 105～117 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 119】

請求項 97、99～103 または 105～118 のいずれかに記載の使用であって、前記方法が、前記新生物の実質的に全ての外科的切除、および全ての残存している新生物細胞の実質的な腫瘍崩壊を生じるために十分な量での外科手術部位へのレオウイルスの投与をさらに含む、使用。

40

## 【請求項 120】

前記工程 a) が、前記哺乳動物中の増殖している細胞に有効量の免疫抑制剤を投与する工程である、請求項 86～119 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 121】

前記免疫抑制剤が前記レオウイルスと同時に投与される、請求項 120 に記載の使用。

## 【請求項 122】

前記免疫抑制剤が前記レオウイルスの前に投与される、請求項 120 に記載の使用。

50

## 【請求項 1 2 3】

前記免疫抑制剤が、シクロスポリン、ラパマイシン、タクロリムス、ミコフェノール酸、アザチオプリン、上記の薬剤のアナログ、放射線照射、H I V 感染、および抗－抗レオウイルス抗体からなる群より選択される、請求項 1 2 0～1 2 2 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 1 2 4】

改変型レオウイルスおよび免疫防御型レオウイルスからなる群より選択される少なくとも 1 つのレオウイルスを含有している、請求項 3 9 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 2 5】

前記工程 a) が、前記哺乳動物から B 細胞または T 細胞を除去する工程である、請求項 8 6～1 1 9 のいずれかに記載の使用。

10

## 【請求項 1 2 6】

前記 B 細胞または T 細胞が、濾過およびヘム透析によって除去される、請求項 1 2 5 に記載の使用。

## 【請求項 1 2 7】

前記濾過がアフィニティークロマトグラフィーで行われ、該アフィニティークロマトグラフィーは固体支持体に固定された抗体を含む、請求項 1 2 6 に記載の使用。

## 【請求項 1 2 8】

前記抗体が、抗 T 細胞抗体または抗 B 細胞抗体である、請求項 1 2 7 に記載の使用。

## 【請求項 1 2 9】

前記 B 細胞および T 細胞が放射線治療によって除去される、請求項 1 2 5 に記載の使用。

20

## 【請求項 1 3 0】

前記 B 細胞および T 細胞が環式ステロイドの使用によって除去される、請求項 1 2 5 に記載の使用。

## 【請求項 1 3 1】

前記環式ステロイドがシクロスポリンである、請求項 1 3 0 に記載の使用。

## 【請求項 1 3 2】

前記工程 a) が、前記哺乳動物から抗レオウイルス抗体を除去する工程である、請求項 8 6～1 1 9 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 1 3 3】

前記抗レオウイルス抗体が、ヘム透析および固定化レオウイルス上の血液の通過によって除去される、請求項 1 3 2 に記載の使用。

30

## 【請求項 1 3 4】

前記レオウイルスが固体支持体に対して固定される、請求項 1 3 3 に記載の使用。

## 【請求項 1 3 5】

前記工程 a) が、前記哺乳動物から抗体を除去する工程である、請求項 8 6～1 1 9 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 1 3 6】

前記抗体が I g G 抗体である、請求項 1 3 5 に記載の使用。

## 【請求項 1 3 7】

前記抗体が、ヘム透析および固定化プロテイン A 上の血液の通過によって除去される、請求項 1 3 5 に記載の使用。

40

## 【請求項 1 3 8】

前記工程 a) が、抗－抗レオウイルス抗体を前記哺乳動物に投与する工程である、請求項 8 6～1 1 9 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 1 3 9】

前記抗－抗レオウイルス抗体が静脈内投与される、請求項 1 3 8 に記載の使用。

## 【請求項 1 4 0】

前記抗－抗レオウイルス抗体がヒト化抗体である、請求項 1 3 8 または 1 3 9 に記載の使用。

## 【請求項 1 4 1】

50

改変型レオウイルスおよび免疫防御型レオウイルスからなる群より選択される少なくとも1つのレオウイルスを含有している、請求項64に記載の薬学的組成物。

【請求項142】

前記工程a)が、前記哺乳動物の免疫系を抑制する工程である、請求項86～119のいずれかに記載の使用。

【請求項143】

前記免疫系が放射線治療によって抑制される、請求項142に記載の使用。

【請求項144】

前記免疫系が環式ステロイドによって抑制される、請求項142に記載の使用。

【請求項145】

前記環式ステロイドがシクロスポリンである、請求項144に記載の使用。

【請求項146】

少なくとも1つの前記レオウイルスが、組換えレオウイルスである、請求項86～123、125～140および142～145のいずれかに記載の使用。

【請求項147】

前記組換えレオウイルスが、2つ以上のレオウイルス株に由来する、請求項146に記載の使用。

【請求項148】

請求項147に記載の使用であって、ここで前記2つ以上のレオウイルス株が、Dearing株、Abney株、Jones株およびLang株からなる群から選択される、使用。

【請求項149】

請求項146～148のいずれかに記載の使用であって、ここで前記組換えレオウイルスが、哺乳動物細胞を、異なるサブタイプのレオウイルスを用いて同時感染させることにより生じる、使用。

【請求項150】

前記組換えレオウイルスが、天然に存在するものである、請求項146～149のいずれかに記載の使用。

【請求項151】

前記組換えレオウイルスが、天然に存在しないものである、請求項146～149のいずれかに記載の使用。

【請求項152】

請求項146～151のいずれかに記載の使用であって、ここで前記組換えレオウイルスが、天然に存在する変異コートタンパク質コード配列を含む、使用。

【請求項153】

請求項146～151のいずれかに記載の使用であって、ここで前記組換えレオウイルスが、変異コートタンパク質コード配列を含む、使用。

【請求項154】

請求項146、147および149～151のいずれかに記載の使用であって、ここで前記組換えレオウイルスが、血清型1のレオウイルス、血清型2のレオウイルスおよび血清型3のレオウイルスからなる群から選択されるレオウイルスの再組み合わせより生じる、使用。

【請求項155】

1より多い組換えレオウイルス株が投与される、請求項146～154のいずれかに記載の使用。

【請求項156】

請求項86～123、125～140および142～144のいずれかに記載の使用であって、ここで前記レオウイルスが、以下：血管内投与、くも膜下内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与、局所投与、経口投与、直腸内投与、膣内投与、鼻腔内投与および腫瘍内投与からなる群から選択される投与経路により投与される、使用。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 5 7】

請求項 1 4 6 ～ 1 5 5 のいずれかに記載の使用であって、ここで前記組換えレオウイルスが、以下：血管内投与、くも膜下内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与、局所投与、経口投与、直腸内投与、腔内投与、鼻腔内投与および腫瘍内投与からなる群から選択される投与経路により投与される、使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0 0 0 1】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、哺乳動物の細胞増殖性障害、特に、*r a s* 媒介性細胞増殖性障害の処置における、レオウイルス認識を妨げるための方法に関する。詳細には、この方法は、増殖性障害を処置するための、免疫抑制された哺乳動物または免疫不全哺乳動物のレオウイルス処置を提供する。免疫抑制、免疫阻害、または哺乳動物において免疫不全状態の誘導する他の事象は、レオウイルスをより有効なものにする。この方法は、このウイルスの全身的送達を妨害し得る免疫成分を選択的に除去すること；宿主免疫系によるレオウイルス認識を妨げること；およびレオウイルスでの処置後に免疫抑制宿主または免疫不全宿主からこのウイルスを除去すること、を包含し得る。

10

## 【0 0 0 2】

(参考文献)

以下の刊行物、特許出願、および特許が、本出願で引用される：

20

## 【0 0 0 3】

## 【表 1】

U.S. Patent No. 5,023,252

Armstrong, G.D. *et al.* (1984), *Virology* 138:37

Aronheim, A., *et al.*, (1994) *Cell*, 78:949-961

Barbacid, M., *Annu. Rev. Biochem.*, 56:779-827 (1987)

Berrozpe, G., *et al.* (1994), *Int. J. Cancer*, 58:185-191

Bischoff, J.R. and Samuel, C.E., (1989) *Virology*, 172:106-115

Bos, J. (1989) *Cancer Res.* 49:4682

10

Cahill, M.A., *et al.*, *Curr. Biol.*, 6:16-19 (1996)

Chandron and Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle", *J. of Virology* 72(1):467-75 (1998)

Chaubert, P. *et al.* (1994), *Am. J. Path.* 144:767

Cuff *et al.*, "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract" *Toxicological Sciences* 42(2):99-108 (1998)

Der, S.D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3279-3283 (1997)

20

Dudley, D.T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7686-7689 (1995)

Duncan *et al.*, "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein" *Virology* 182(2):810-9 (1991)

Fields, B.N. *et al.* (1996), *Fundamental Virology, 3rd Edition*, Lippincott-Raven

Gentsch, J.R.K. and Pacitti, A.F. (1985), *J. Virol.* 56:356

E. Harlow and D. Lane, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)

Helbing, C.C. *et al.*, *Cancer Res.* 57:1255-1258 (1997)

30

Hu, Y. and Conway, T.W. (1993), *J. Interferon Res.*, 13:323-328

James, P.W., *et al.* (1994) *Oncogene* 9:3601

Laemmli, U.K., (1970) *Nature*, 227:680-685

Lee, J.M. *et al.* (1993) *PNAS* 90:5742-5746

- Lee, P.W.K. *et al.* (1981) *Virology*, 108:134-146
- Lee, P.W.K. *et al.* (1999) Reovirus for the Treatment of Neoplasia, PCT International Application No. PCT/CA98/00774
- Levitzki, A. (1994) *Eur. J. Biochem.* 226:1
- Lowe, S.W. *et al.* (1994) *Science*, 266:807-810
- Lyon, H., *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, J.E. Celis, ed., Academic Press, 1994, p. 232
- Mah *et al.*, "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function" *Virology* 179(1):95-103 (1990)
- McRae, M.A. and Joklik, W.K., (1978) *Virology*, 89:578-593
- Millis, NE *et al.* (1995) *Cancer Res.* 55:1444
- Mundschau, L.J. and Faller, D.V., (1992) *J. Biol. Chem.*, 267:23092-23098
- Nagata, L., *et al.*, (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12:8699-8710
- Paul R.W. *et al.* (1989) *Virology* 172:382-385
- Raybaud-Diogene, H. *et al.* (1997) *J. Clin. Oncology*, 15(3):1030-1038
- Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Company, Philadelphia PA 17<sup>th</sup> ed. (1985)
- Robinson, M.J. and Cobb, M.H., *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:180-186 (1997)
- Rosen, L. (1960) *Am. J. Hyg.* 71:242
- Sabin, A.B. (1959), *Science* 130:966
- Samuel, C.E. and Brody, M., (1990) *Virology*, 176:106-113
- Smith, R.E. *et al.*, (1969) *Virology*, 39:791-800
- Stanley, N.F. (1967) *Br. Med. Bull.* 23:150

10

20

30

Strong, J.E. *et al.*, (1993) *Virology*, 197:405-411

Strong, J.E. and Lee, P.W.K., (1996) *J. Virol.*, 70:612-616

Trimble, W.S. *et al.* (1986) *Nature*, 321:782-784

Turner and Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1:evidence for a conformation-dependent receptor binding domain" *Virology* 186(1):219-27 (1992)

Waters, S.D. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:20883-20886 (1995)

Wiessmuller, L. and Wittinghofer, F. (1994), *Cellular Signaling* 6(3):247-267

Wong, H., *et al.*, (1994) *Anal. Biochem.*, 223:251-258

Yang, Y.L. *et al.* *EMBO J.* 14:6095-6106 (1995)

Yu, D. *et al.* (1996) *Oncogene* 13:1359

10

上記の刊行物、特許出願、および特許の全ては、各々の刊行物、特許出願、または特許が、詳細かつ個々に示され、その全体において参考として援用されているのと同じ程度で、その全体において参考として本明細書中で援用される。

20

#### 【0004】

(当該分野の状況)

正常な細胞増殖は、増殖を促進する癌原遺伝子と増殖を抑制する腫瘍抑制遺伝子との間での平衡によって調節される。腫瘍形成は、細胞性シグナルの解釈を支配するそれらの細胞成分の変異を生じる、ゲノムに対する遺伝的変更（例えば、前癌遺伝子の活性の増強または腫瘍抑制の不活化）によって引き起こされ得る。これらのシグナルの解釈は最終的には細胞の増殖および分化に影響を与え、そしてこれらのシグナルの誤った解釈によって腫瘍増殖（新生物）を生じ得ると考えられている。

#### 【0005】

癌原遺伝子 Ras の遺伝的変更は、全てのヒトの腫瘍の約 30% に寄与していると考えられる (Wiessmuller, L. および Wittinghofer, F. (1994) *Cellular Signaling* 6(3):247-267; Barbacid, M. (1987) *A Rev. Biochem.* 56, 779-827)。Ras がヒトの腫瘍の発病において果たす役割は、腫瘍の型に特異的である。Ras 自体における活性化変異は、ヒトの悪性腫瘍のほとんどの型で見られ、そして膵臓癌 (80%)、散发性結直腸癌 (40~50%)、ヒト肺腺癌 (15~24%)、甲状腺腫瘍 (50%)、および骨髄性白血病 (30%) において多く存在する (Millis, NE ら (1995) *Cancer Res.* 55:1444; Chaubert, P. ら (1994) *Am. J. Path.* 144:767; Bos, J. (1989) *Cancer Res.* 49:4682)。Ras 活性化はまた、上流の有糸分裂促進シグナル成分によって、特にチロシンレセプターキナーゼ (RTK) によって実証される。これらの上流の成分は、増幅されるかまたは過剰発現される場合、Ras のシグナル伝達活性によって、最終的に Ras 活性の上昇を生じる。この例としては、神経膠芽細胞腫の特定の形態ならびに乳癌の c-erbB-2/neu における、PDGFR の過剰発現が挙げられる (Levitzki, A. (1994) *Eur. J. Biochem.* 226:1; James, P. W. ら (1994) *Oncogene* 9:3601; Bos, J. (1989) *Cancer Res.* 49:4682)。

30

40

#### 【0006】

新生物についての現在の処置方法としては、手術、化学療法、および放射線治療が挙げら

50

れる。手術は、代表的に、初期段階の癌についての主要な処置として使用される；しかし、多くの腫瘍は外科的手段によっては完全には除去され得ない。さらに、新生物の転移性増殖は、手術による癌の完全な治癒を妨げ得る。化学療法は、抗腫瘍活性を有している化合物（例えば、アルキル化剤、代謝拮抗薬、および抗腫瘍性抗生物質）の投与を含む。化学療法の有効性は、しばしば、重度の副作用（吐き気および嘔吐を含む）、骨髄抑制、腎臓障害、および中枢神経系の抑制によって制限される。放射線治療は、正常細胞の、新生物細胞とは対照的な、放射線での処置後にそれら自体を修復するより高い能力に依存する。しかし、腫瘍の周辺組織の感受性に起因して、放射線治療は、多くの新生物を治療するために使用することができない。さらに、特定の腫瘍は、放射線治療に抵抗性であることが実証されており、そしてこれらは、その細胞の癌遺伝子または抗癌遺伝子の状態に依存し得る（Lee, J. M. ら（1993）PNAS 90:5742-5746；Lowie, S. W. ら（1994）Science, 266:807-810；Raybaud-Diogene, H. ら（1997）J. Clin. Oncology, 15（3）:1030-1038）。新生物増殖を処置するための現在の方法に関連するこれらの欠点を考慮すると、癌のほとんどの型の処置のための改善された方法の必要性が、なお存在する。

#### 【0007】

（発明の要旨）

本発明は、増殖性障害の処置における既存のレオウイルス治療の有効性の増強に関する。

#### 【0008】

本発明は、哺乳動物の細胞増殖性障害、特にras媒介性細胞増殖性障害の処置における、レオウイルス認識を妨げるための方法に関する。哺乳動物は、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、ヒト、および非ヒト霊長類から選択され得る。この方法は、哺乳動物の免疫系を抑制するかまたはさもなければ阻害する工程、および、同時にまたはそれに続いて、増殖中の細胞の実質的な溶解を生じる条件下で、有効量の1以上のレオウイルスをその増殖中の細胞に投与する工程を包含する。詳細には、この方法は、増殖性障害を処置するための、免疫抑制された哺乳動物または免疫不全哺乳動物のレオウイルス処置を提供する。免疫抑制、免疫阻害、または哺乳動物の免疫不全状態を誘導する他の事象は、レオウイルスをより有効なものとする。この方法は、ウイルスの全身的送達を妨害し得る免疫成分を選択的に除去すること；宿主免疫系によるレオウイルス認識を妨げること；およびレオウイルスでの処置後に免疫抑制宿主または免疫不全宿主からウイルスを除去すること、を包含し得る。あるいは、レオウイルスは、増殖している細胞の実質的な溶解を生じる条件下で、免疫応答系が減退された哺乳動物に投与され得る。免疫系は、以下の1つ以上によって損なわれ得る：HIV感染；化学療法または放射線治療の副作用として；B細胞集団および／またはT細胞集団の選択的除去によって；抗体（抗レオウイルス抗体または全ての抗体）の除去によって、など。

#### 【0009】

免疫抑制または免疫阻害は、免疫抑制薬、免疫抑制剤によってか、または哺乳動物の免疫系を阻害するかもしれない哺乳動物を免疫不全にする任意の他の手段によって達成され得る。免疫抑制剤が使用される場合、免疫抑制剤は、レオウイルスの投与の前に投与され得るか、またはレオウイルスの投与と同時に投与され得る。哺乳動物は、レオウイルスの投与の前に、またはレオウイルスの投与と同時に、免疫抑制されるか、免疫不全にされるか、免疫阻害される。

#### 【0010】

レオウイルスは、哺乳類レオウイルスまたは鳥類レオウイルスであり得る。レオウイルスは、外側のカプシドが除去されるように改変され得、ビリオンが、リポソームまたはミセル中にパッケージングされるか、または外側カプシドのタンパク質が変異されている。レオウイルスおよび／または免疫抑制薬は、単回用量または複数回の用量で投与され得る。増殖性障害は新生物であり得る。固形新生物および造血性新生物の両方が標的とされ得る。免疫抑制は、より有効なレオウイルス処置を生じる。

## 【0011】

従って、1つの局面において、本発明は、哺乳動物における r a s 媒介性増殖性障害を処置する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：

a) 以下：

i) 上記哺乳動物中の増殖中の細胞に有効量の免疫抑制剤を投与する工程；

i i) 上記哺乳動物から B細胞または T細胞を除去する工程；

i i i) 上記哺乳動物から抗レオウイルス抗体を除去する工程；

i v) 上記哺乳動物から抗体を除去する工程；

v) 抗-抗レオウイルス抗体を上記哺乳動物に投与する工程；および

v i) 上記哺乳動物の免疫系を抑制する工程；

からなる群より選択される工程を実行する工程、ならびに

b) 増殖中の細胞の実質的な溶解を生じる条件下で、上記哺乳動物中の増殖中の細胞に有効量の1つ以上のレオウイルスを投与する工程。

10

## 【0012】

ヒトにおける r a s 媒介性新生物を処置する方法もまた提供され、この方法は、哺乳動物の免疫系を抑制するかまたはさもなければ損なわせる工程、および、同時にかまたはそれに続いて、その新生物細胞の実質的な腫瘍崩壊を生じるに十分な量のレオウイルスを新生物に投与する工程、を包含する。レオウイルスは、固形新生物中またはその付近に注射によって投与され得る。

20

## 【0013】

哺乳動物における新生物の転移を阻害する方法もまた提供され、この方法は、哺乳動物の免疫系を抑制するかまたはさもなければ損なわせる工程、および、同時にかまたはそれに続いて、その新生物細胞の実質的な溶解を生じるに十分な量でレオウイルスを哺乳動物に投与する工程、を包含する。

30

## 【0014】

哺乳動物における疑わしい r a s 媒介性新生物を処置する方法もまた提供され、この方法は、その新生物の実質的に全てを外科的に除去する工程、その哺乳動物の免疫系を抑制または他の阻害をする工程、およびその手術部位またはその付近へ有効量のレオウイルスを投与する工程であって、それによって全ての残存している新生物細胞の腫瘍崩壊を生じる、工程、を包含する。

40

## 【0015】

免疫抑制剤または免疫阻害剤（例えば、抗-抗レオウイルス抗体）、レオウイルス、および薬学的に受容可能な賦形剤を含有する薬学的組成物もまた、提供される。

## 【0016】

レオウイルスおよび別の成分（例えば、免疫抑制剤、哺乳動物から B細胞または T細胞を除去するための手段、哺乳動物から抗レオウイルス抗体を除去するための手段、哺乳動物から抗体を除去するための手段、抗-抗レオウイルス抗体、および哺乳動物の免疫系を抑制するための手段）備えるキットもまた、提供される。

## 【0017】

免疫抑制剤または免疫阻害剤、改変型レオウイルス、および薬学的に受容可能な賦形剤を含有する薬学的組成物もまた、提供される。

## 【0018】

本発明の方法および薬学的組成物は、他の形態の癌治療に関連する副作用を伴うことなく、新生物を処置するための有効な手段を提供する。免疫系の阻害または抑制は、抗レオウイルス抗体が形成されないので、r a s 媒介性の増殖中の細胞に感染しそしてそれらを溶解させるレオウイルスの有効性を増大させる。レオウイルスは疾患と関係することが知られていないで、ウイルスの意図的な投与に関連するいかなる安全性の問題も、最小化される。

## 【0019】

本発明の上記および他の目的、特徴、および利点は、添付の図面に示されているような、

50

以下の本発明の好ましい実施態様のより詳細な説明から明らかである。

#### 【0020】

(発明の詳細な説明)

本発明者らは、ヒトレオウイルスが、培養細胞の感染のために、活性化Rasシグナル伝達経路を必要とすることを実証した(Strong, JEら、1998 EMBO J 17:3351)。さらに、本発明者らは、レオウイルスが多数の動物モデルにおいて腫瘍崩壊剤(oncolytic agent)として使用され得ることを実証した(Lee, P. W. K. ら(1999))。v-erbB形質転換マウスNIH 3T3細胞またはヒトU87神経膠芽細胞腫細胞から確立された腫瘍を保有している重症複合型免疫不全(SCID)マウスは、このウイルスで処置された(Coffey, MCら、1998 Science 282:1332)。ウイルスの1回の腫瘍内注射は、腫瘍の退行を生じた。本発明者らはさらに、両側にU87腫瘍異種移植片を与えた動物において、同側腫瘍内へのレオウイルスの一侧注射が対側腫瘍の退行を生じることを実証した。この離れた腫瘍部位でのこの退行は、ウイルスの全身的拡散の結果である。機能的な免疫系がこの型の治療に対して果たし得る効果を試験するために、免疫応答性マウスモデルが確立された。ras形質転換C3H-10T1/2細胞から確立された腫瘍を保有する免疫応答性C3Hマウスの処置もまた、腫瘍の退行を生じたが、一連の注射を要した(Coffey, MCら、1998)。このように、免疫抑制剤とのこのウイルスの同時投与、または免疫応答が減退された動物に対するウイルスの投与は、レオウイルス処置の濃度および/または頻度を減少させる。さらに、動物の免疫抑制は、注射されたかあるいは全身的に送達された場合に、腫瘍から離れて同時に存在しているras媒介性病変における応答速度を改善し得る。免疫抑制はまた、生体利用可能なウイルスを増加することによって、全身的送達を補助し得る。

#### 【0021】

本発明は、哺乳動物におけるras媒介性増殖性障害を処置する方法に関し、これは、哺乳動物を免疫抑制するか、免疫阻害するか、またはさもなければ免疫不全にし、そして同時にまたはそれに続いて、増殖中の細胞にレオウイルスを投与することによる。

#### 【0022】

学名レオウイルス(Respiratory and enteric orphan virus)は、記述上の頭字語であり、これらのウイルスが(ヒトの任意の公知の疾患状態とは無関係であるが)呼吸管および腸管の両方から単離され得ることを示唆している(Sabin, A. B. (1959)、Science 130:966)。この用語「レオウイルス」は、レオウイルス属に分類される全てのウイルスを指す。

#### 【0023】

レオウイルスは、二本鎖の断片化されたRNAゲノムを有するウイルスである。ビリオンは直径60~80nmの寸法であり、そして2つの同心性のカプシド殻を保有している。殻のそれぞれは正二十面体である。ゲノムは、10~12個の不連続なセグメントである二本鎖のRNAから構成され、16~27kbpの全ゲノムサイズを有する。個々のRNAセグメントは大きさが異なる。3個の異なる(しかし関連するレオウイルスの型)が、多くの種から回収されている。全ての3個の型は、共通の相補-固定抗原を共有する。

#### 【0024】

ヒトレオウイルスは3個の血清型から構成される:1型(Lang株またはT1L)、2型(Jones株、T2J)、および3型(Dearing株またはAbney株、T3D)。この3個の血清型は、中和反応およびヘマグルチニン阻害アッセイに基づいて容易に同定することができる(Sabin, A. B. (1959)、Science 130:966; Fields, B. N. ら(1996)、Fundamental Virology、第3版、Lippincott-Raven; Rosen, L. (1960) Am. J. Hyg. 71:242; Stanley, N. F. (1967) Br. Med. Bull. 23:150)。

#### 【0025】

レオウイルスは、任意の特定の疾患に関係することは知られていないが、多くのヒトが、彼らが成人期に達するまでの時間にレオウイルスに曝されている（すなわち、5歳未満の子供の25%未満から、20～30歳のヒトの50%以上）（Jackson G. G. および Muldoon R. L. (1973) J. Infect. Dis. 128: 811; Stanley N. F. (1974)、Comparative Diagnosis of Viral Disease、B. Kurstak および K. Kurstak 編、385-421、Academic Press, New York）。

#### 【0026】

哺乳動物レオウイルスについては、細胞表面認識シグナルはシアル酸である（Armstrong, G. D. ら (1984)、Virology 138: 37; Gentsch, J. R. K. および Pacitti, A. F. (1985)、J. Virol. 56: 356; Paul R. W. ら (1989) Virology 172: 382-385）。シアル酸の遍在性質に起因して、レオウイルスは多数の細胞株に効率良く結合し、このようにして多くの異なる組織を標的化し得る可能性がある；しかし、レオウイルス感染に対する感受性においては細胞株間で有意な差異が存在する。

#### 【0027】

本明細書中に記載されるように、本出願人らは、レオウイルス感染に対して耐性である細胞が、Ras 経路の遺伝子によって形質転換された場合にはレオウイルス感染に対して感受性になることを発見した。レオウイルス感染に対する細胞の「耐性」は、細胞のウイルス感染が有意なウイルスの産生または産出を生じないことを示す。「感受性」の細胞は、細胞変性作用、ウイルスタンパク質の合成、および／またはウイルス産生の誘導を示す細胞である。レオウイルス感染に対する耐性は、初期の転写よりもむしろ遺伝子翻訳のレベルで見出された、すなわち、ウイルス転写は生じるが、ウイルスタンパク質は発現されなかった。理論には束縛されないが、耐性細胞中でのウイルス遺伝子の転写は、二本鎖 RNA 活性化プロテインキナーゼ（PKR）であると決定された約 65 kDa の細胞タンパク質のリン酸化に関係していると考えられる。PKR は、形質転換された細胞中では観察されなかった。PKR のリン酸化は、翻訳の障害を導いた。リン酸化が PKR の既知のインヒビターである 2-アミノプリンによって抑制された場合には、レオウイルスタンパク質の合成の顕著な増大が、形質転換されていない細胞中で生じた。さらに、重症複合型免疫不全（SCID）マウスモデル（ここでは、腫瘍は、右および左の両方の背側に作成された）は、右側の腫瘍内に直接注射された場合にレオウイルスが腫瘍の大きさを有意に減少させたことを明らかにした；さらに、腫瘍の大きさの有意な減少がまた、レオウイルスを直接は注射されなかった左側の腫瘍についても記録された。このことは、レオウイルスの腫瘍崩壊能力が、全身的ならびに局所的であることを示している。

#### 【0028】

レオウイルスは、免疫応答性マウスの新生物を処置するために効率良く使用され得るが、本発明者らは、より多数（約 10 倍）のレオウイルスおよび複数回の処置が、最良の効果には必要であり得ることを見出した。さらに、腫瘍内注射が、免疫応答性動物における最大の効果には必要であり得る。

#### 【0029】

これらの結果は、レオウイルスが、PKR を下方調節しそれによって再生するために、宿主細胞の Ras 経路機構を使用することを示した。形質転換されていない（レオウイルス耐性）細胞、および EGF R で形質転換された、Sos で形質転換された、または ras で形質転換された（レオウイルス反応性）細胞の両方について、ウイルス結合、内在化、非被覆（uncoating）、およびウイルス遺伝子の初期転写は全て正常に行われた。形質転換されていない細胞の場合には、初期のウイルス転写物の二次構造によって PKR のリン酸化を必然的に誘発し、それによって PKR を活性化し、翻訳開始因子 eIF-2 $\alpha$  のリン酸化を導き、従ってウイルス遺伝子の翻訳の障害を導く。EGF R で形質転換された細胞、Sos で形質転換された細胞、または ras で形質転換された細胞の場合には、PKR リン酸化工程は Ras またはその下流の成分の 1 つによって妨げられるかまた

は逆流させられ、それによってウイルス遺伝子の翻訳を確実にする。R a s（または下流の成分）の作用は、P K Rリン酸化を遮断することによって形質転換されていない細胞中のウイルス遺伝子の翻訳（従ってレオウイルス感染）を促進する、2-アミノプリン（2-A P）の使用によって模倣され得る。

#### 【0030】

S C I Dマウス中へのヒト腫瘍細胞の移植は、ヒトにおける種々の抗腫瘍薬の有効性を試験するための周知のモデル系として認識されている。S C I Dマウス中に移植されたヒト腫瘍に対する医薬品の有効性は、ヒトでの同じ腫瘍に対するそれらの有効性の指標であることは、すでに示されている。

#### 【0031】

これらの発見に基づいて、本出願人らは、哺乳動物中のr a s媒介性増殖性障害を処置するための方法を開発した。代表的な哺乳動物として、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、ヒト以外の霊長類、およびヒトが挙げられる。好ましい実施形態においては、哺乳動物はヒトである。

#### 【0032】

本発明の方法においては、レオウイルスは個々の哺乳動物中のR a s媒介性の増殖している細胞に対して投与される。本発明の1つの実施形態においては、一連のレオウイルス治療が1回または複数回投与される。レオウイルス治療の最初の投与後に、レオウイルスの続く投与を妨害し得る特定の免疫成分が患者から取り出される。これらの免疫成分として、B細胞、T細胞、抗体などが挙げられる。

#### 【0033】

B細胞またはT細胞集団のいずれかの除去は、いくつかの方法によって達成され得る。1つの方法においては、血液が濾過され得、そしてヘム透析が行われ得る。別の方法は、細胞集団を除去し得る体外化合物と、例えば、除去される細胞集団上の特異的なレセプターを認識する固定化抗体と結合させた血液の濾過である。細胞集団の除去のためのなお別の方法は、免疫抑制による。これは、最重要（f i r s t l i n e）放射線治療によって、またはシクロスポリンのような環式ステロイドによって行われ得る。

#### 【0034】

抗レオウイルス抗体の選択的除去もまた、患者の免疫系が治療的に投与されたレオウイルスを除去することを妨げ得る。抗体とウイルスとの相互作用を妨げることによってまた、全身的処置ストラテジーを補助するし得る。抗体は、以下を含むいくつかの方法によって除去され得る：ヘム透析および血液を固定化レオウイルス上を通過させること（選択的抗体除去）；ヘム透析による全I g G抗体の除去および血液を固定化プロテインA（P R O S O R B A, C y p r e s s B i o s c i e n c e, S a n D i e g o, C Aとして商業的に入手することができる）上を通過させることによる；または、ヒト化抗イディオタイプ抗体（ここではレオウイルスに対するイディオタイプ）の投与による。

#### 【0035】

本発明の別の方法は、レオウイルスの免疫認識を遮蔽するかまたは損傷させることによって、正常な免疫機能を損傷させることなく、レオウイルスが全身的に作用することを可能にすることである。患者の免疫系がレオウイルスを認識することを妨げるために、本発明の別の実施形態は、レオウイルスおよびレオウイルス再配列株の連続的投与である。あるいは、レオウイルスは非ウイルス毒性のヒト化抗体で被覆（例えば、抗体のF<sub>a b</sub>部分での被覆、ミセル中への被覆）され得る。

#### 【0036】

さらに、ウイルスは、感染性亜ウイルス（s u b v i r a l）粒子（I S V P）を生じるようにキモトリプシンで処理され得る。I S V Pは単独で使用され得るか、またはウイルス全体と併用され得、患者の免疫系によってそれほど認識されず、妨げられない試薬を提供し得る。

#### 【0037】

本発明の別の実施形態は、投与後の患者からのレオウイルスの除去を含む。この方法は免

10

20

30

40

50

疫抑制型または免疫不応答性のいずれかである患者について使用され得るので、一連の処置後に血流からウイルスを除去することが重要であり得る。レオウイルスは、ヘム透析に付随する体外抗レオウイルス抗体、B細胞増殖試薬、もしくはUV不活化ウイルスのようなウイルスに対する免疫応答を刺激するアジュバント、またはフロイトのアジュバントを使用して、アフィニティークロマトグラフィーによって除去され得る。

#### 【0038】

本発明の方法においては、レオウイルスは、個々の哺乳動物中のras媒介性の増殖している細胞に対して投与される。使用され得るヒトレオウイルスの代表的な型として、1型（例えば、Lang株またはT1L）；2型（例えば、Jones株またはT2J）；および3型（例えば、Dearing株またはAbney株、T3DまたはT3A）が挙げられる；レオウイルスの他の株もまた使用され得る。好ましい実施形態においては、レオウイルスは、ヒトレオウイルス血清3型であり、より好ましくは、レオウイルスは、ヒトレオウイルス血清3型、Dearing株である。あるいは、レオウイルスは、ヒト以外の哺乳動物レオウイルス（例えば、ヒト以外の霊長類レオウイルス（例えば、ヒヒレオウイルス）；ウマレオウイルス；またはイヌレオウイルス）、あるいは非哺乳動物レオウイルス（例えば、トリレオウイルス）であり得る。レオウイルスの異なる血清型および／または異なる株の組合せ（例えば、異なる種の動物に由来する複数のレオウイルス）が使用され得る。

10

#### 【0039】

レオウイルスは、天然型（naturally occurring）であり得るかまたは改変型であり得る。レオウイルスは、それが天然の供給源から単離され得るそして研究室でヒトによって意図的に改変されていない場合に「天然型」である。例えば、レオウイルスは、それがヒト患者に由来する場合には、「野生供給原（field source）」に由来し得る。

20

#### 【0040】

レオウイルスは改変され得るが、なお活性なras経路を有している哺乳動物細胞を溶解性感染し得る。レオウイルスは、増殖している細胞への投与の前に、化学的または生化学的に（例えば、キモトリプシンまたはトリプシンのようなプロテアーゼでの処理によって）予め処理され得る。プロテアーゼでの予備処理によって、ウイルスの外殻またはキャプシドを除去し、そしてウイルスの感染性を増大させ得る。レオウイルスは、レオウイルスに対する免疫性を発現した哺乳動物による免疫応答を減少させるかまたは妨げるために、リボソームまたはミセル中に被覆され得る（ChandronおよびNibert、「Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle」J of Virology 72（1）：467-75（1998））。例えば、ビリオンは、新規の感染性の亜ビリオン粒子を作成するために、ミセル形成濃度のアルキル硫酸界面活性剤の存在下にてキモトリプシンで処理され得る。

30

#### 【0041】

レオウイルスは、異なる病原性表現形を有する2つ以上の型のレオウイルスに由来する組換えレオウイルスであり得る。その結果、これは異なる抗原決定基を含み、それによってレオウイルスの亜型に対して予め暴露された哺乳動物による免疫応答を減少させるかまたは妨げる。このような組換えビリオン（再配列株としてもまた公知である）は、得られた再配列株とともに異なる亜型のレオウイルスを用いる哺乳動物細胞の同時感染、および得られたビリオンキャプシド中への異なる亜型の被覆タンパク質の取り込みによって作成され得る。

40

#### 【0042】

レオウイルスは、ビリオンの外側のキャプシド中への変異型被覆タンパク質（例えば、 $\sigma 1$ ）の取り込みによって改変され得る。タンパク質は、置換、挿入、または欠失によって

50

変異させられ得る。置換は、天然のアミノ酸の代わりの異なるアミノ酸の挿入を含む。挿入は、1つ以上の位置でのタンパク質中へのさらなるアミノ酸残基の挿入を含む。欠失は、タンパク質中の1つ以上のアミノ酸残基の欠失を含む。このような変異は、当該分野で公知の方法によって作成され得る。例えば、被覆タンパク質の1つをコードする遺伝子のオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発によって、所望される変異体被覆タンパク質の作成を生じ得る。レオウイルスに感染した哺乳動物細胞（例えば、COS1細胞）中の変異型タンパク質のインビトロでの発現は、レオウイルスビリオン粒子中への変異型タンパク質の取り込みを生じる（TurnerおよびDuncan、「Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence for a conformation dependent receptor binding domain」*Virology* 186 (1) : 219-27 (1992) ; Duncanら、「Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein」*Virology* 182 (2) : 810-9 (1991) ; Mahら、「The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function」*Virology* 179 (1) : 95-103 (1990) ）。 10 20

#### 【0043】

レオウイルスは好ましくは、レオウイルスの免疫反応を減少させるかまたは排除するように改変されたレオウイルスである。このような改変型レオウイルスは、「免疫防御型レオウイルス」と呼ばれる。このような改変は、哺乳動物の免疫系からレオウイルスを遮蔽するための、リポソーム、ミセル、または他のビヒクル中へのレオウイルスのパッケージングを含み得る。あるいは、レオウイルスのビリオン粒子の外側のキャプシドは、外側のキャプシド中に存在するタンパク質が宿主の体液性および細胞性応答の主要な決定基であるので、除去され得る。

#### 【0044】

「増殖性障害」は、正常な組織の増殖よりも迅速に細胞増殖する任意の細胞性障害である 30。従って、「増殖性細胞」は、正常な細胞よりも迅速に増殖している細胞である。増殖性障害として、新生物が挙げられるがこれに限定されない。新生物は異常な組織増殖であり、一般的にははっきりとした塊を形成し、これは正常な組織増殖よりも迅速な細胞増殖によって生長する。新生物は、正常組織が有する構造体系および機能配位の、部分的または全体的な欠損を示す。これらは、3つの主要な型に大きく分類され得る。上皮構造から生じる悪性新生物は癌腫、筋肉、軟骨、脂肪または骨のような結合組織から生じる悪性新生物は肉腫と呼ばれ、そして免疫系の成分を含む造血性構造（血液細胞の形成に関係している構造）に影響を与える悪性腫瘍は、白血病およびリンパ腫と呼ばれる。腫瘍は、癌の腫瘍性増殖である。本明細書中で使用される場合には、「新生物」（「腫瘍」とも呼ばれる）は、造血性新生物ならびに固形新生物を含むように意図される。他の増殖性障害として、 40 神経繊維腫症が挙げられるがこれに限定されない。

#### 【0045】

増殖性障害の細胞の少なくともいくつかは、Ras遺伝子（またはRasシグナル伝達経路の成分）が直接（例えば、Ras中の活性化変異による）または間接的（例えば、Ras経路の上流の成分の活性化による）のいずれかで活性化される変異を有する。Ras経路の上流の成分の活性化として、例えば、表皮成長因子レセプター（EGFR）またはSosでの形質転換が挙げられる。Ras、Rasの上流の成分、またはRasシグナル伝達経路中の成分の活性化によって少なくとも一部生じる増殖性障害は、本明細書中では「Ras媒介性増殖性障害」と呼ばれる。

#### 【0046】

「B細胞」はBリンパ球をいう。Bリンパ球の2つの主要な亜集団（B-1およびB-2）が存在する。B-1細胞は自己再生し、そして比較的低い親和性を有して複数の抗原の範囲に結合する（多特異性）高いレベルの抗体を頻繁に分泌する。B細胞の大部分であるB-2細胞は、骨髄中の前駆体から直接生成され、そして高特異的抗体を分泌する。

【0047】

「T細胞」はTリンパ球をいう。T細胞は胸腺へと分化し、そして細胞内器官を有している細胞に対して作動するように特殊化される。T細胞は、それが体細胞の表面上に存在する場合にのみ、抗原を認識する。

【0048】

「抗レオウイルス抗体」は、レオウイルスに結合する抗体をいう。「IgG抗体」は、イムノグロブリンG抗体をいう。最も豊富な抗体の型であるIgGは、細菌毒素を中和しそしてそれらの食作用を増強するために微生物に結合する主要な役割を有する。「ヒト化抗体」は、非抗原結合領域中のアミノ酸配列が変更されており、その結果、抗体がヒト抗体により近く似ており、そしてそのもとの結合能力をなお保持している抗体分子をいう。 10

【0049】

本発明の方法による処置に特に感受性である1つの新生物は、膵臓癌である。これは、膵臓癌に関連するRas媒介性新生物の出現率に起因する。本発明の方法による処置に特に感受性である他の新生物として、乳癌、中枢神経系癌（例えば、神経芽細胞腫および神経膠芽細胞腫）、末梢神経系癌、肺癌、前立腺癌、結直腸癌、甲状腺癌、腎臓癌、副腎癌、肝臓癌、リンパ腫、および白血病が挙げられる。本発明の方法による処置に特に感受性である他の増殖性障害として、神経繊維腫症1が挙げられる。これはras経路の活性化に起因する。 20

【0050】

「増殖している細胞または新生物への投与」は、レオウイルスが、それが増殖している細胞または新生物の細胞（本明細書中では「新生物細胞」とも呼ばれる）と接触する様式で投与されることを示す。レオウイルスが投与される経路、ならびに処方物、キャリア、またはビヒクルは、新生物の位置ならびに型に依存する。広範囲の種々の投与経路が使用され得る。例えば、影響を受けやすい固形新生物については、レオウイルスは、新生物への直接的な注射によって投与され得る。造血性新生物については、例えば、レオウイルスは静脈内または血管内投与され得る。体内で容易には接近できない新生物（例えば、転移性または脳腫瘍）については、レオウイルスは、それが哺乳動物の体を通じて全身的に輸送され得るそれによって新生物に到達するような様式（例えば、髄こう内、静脈内、または筋肉内）で投与される。あるいは、レオウイルスは、単一の固形新生物に対して直接投与され得る。次いで、ここでレオウイルスは、転移部位へと体を通じて全身に運ばれる。レオウイルスはまた、皮下に、腹膜内に、局所的に（例えば、黒色腫について）、経口で（例えば、口頭または食道新生物について）、直腸に（例えば、結直腸新生物について）、膣に（例えば、子宮頸または膣新生物について）、鼻腔に、または吸入噴霧で（例えば、肺新生物について）投与され得る。 30

【0051】

レオウイルスは、免疫無防備状態である哺乳動物かまたはレオウイルスエピトープに対する免疫性を発現していない哺乳動物に全身的に投与され得る。このような場合には、全身的に（すなわち、静脈内注射によって）投与されたレオウイルスは、増殖している細胞と接触し、細胞の溶解を生じる。 40

【0052】

レオウイルス亜型に予め曝された免疫応答性の哺乳動物は、レオウイルス亜型に対する体液性および／または細胞性免疫を発現し得る。それにもかかわらず、免疫応答性哺乳動物中の固形腫瘍内へのレオウイルスの直接的な注射が、新生物細胞の溶解を生じることが見出されている。一方、レオウイルスが免疫応答性哺乳動物に全身的に投与された場合には、哺乳動物は、レオウイルスに対する免疫応答を生じ得る。レオウイルスが、哺乳動物がそれに対しては免疫性を発現していない亜型であるか、またはレオウイルスが免疫防御型 50

であるように本明細書中で先に記載されているように改変されている（例えば、外側のキャプシドのプロテアーゼ消化またはミセル中でのパッケージングによる）場合には、このような免疫応答は回避され得る。

#### 【0053】

あるいは、レオウイルスに対する哺乳動物の免疫応答能力が、一般的に免疫系を抑制することが当該分野で公知である医薬品の事前投与または同時投与によって（Cuffら、「Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract」*Toxicological Sciences* 42（2）：99-108（1998））か、あるいは、抗-抗レオウイルス抗体としてのそのような免疫阻害剤の投与のいずれかによって抑制され得ることが、意図される。レオウイルスに対する哺乳動物の体液性免疫もまた、抗レオウイルス抗体を除去するための哺乳動物の血液の血漿搬出（*plasmaphoresis*）によって一時的に減少させられ得るかまたは抑制され得る。レオウイルスに対する哺乳動物の体液性免疫は、哺乳動物への非特異的免疫グロブリンの静脈内投与によって、さらに一時的に減少させられ得るかまたは抑制され得る。

10

#### 【0054】

レオウイルスが、免疫抑制剤および／または免疫阻害剤の投与と組み合わせて、レオウイルスに対して免疫化された免疫応答性哺乳動物に投与され得ることが意図される。このような免疫抑制剤および免疫阻害剤は当業者に公知であり、そしてシクロスポリン、ラパマイシン、タクロリムス、ミコフェノール酸、アザチオプリン、およびそれらのアナログなどの試薬を含む。他の試薬が免疫抑制特性を有することは周知である（例えば、GoodmanおよびGilman、第7版、1242頁を参照のこと、その開示は本明細書中で参考として援用されている）。このような免疫阻害剤はまた、「抗-抗レオウイルス抗体」を含む。これは、抗レオウイルス抗体に対して指向された抗体である。このような抗体は、当該分野で公知の方法によって作成され得る。例えば、「Antibodies: A laboratory manual」E. HarlowおよびD. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory（1988）を参照のこと。このような抗-抗レオウイルス抗体は、レオウイルスの投与の前、投与と同時、または投与の直後に投与され得る。好ましくは、有効量の抗-抗レオウイルス抗体が、投与されたレオウイルスに対する哺乳動物による免疫応答を減少または排除するために十分な時間の間投与される。用語「免疫抑制剤」または「免疫抑制薬剤」は、従来の免疫抑制剤、免疫阻害剤、抗体、および免疫系の無防備状態を生じる放射線治療またはHIV感染のような状態を含む。

20

30

#### 【0055】

用語「実質的な溶解」は、増殖している細胞の少なくとも10%が溶解させられる、より好ましくは、少なくとも50%、そして最も好ましくは少なくとも75%の細胞が溶解させられることを意味する。溶解の割合は、哺乳動物中の腫瘍の大きさの減少、またはインビトロでの腫瘍細胞の溶解を測定することによって、腫瘍細胞について決定され得る。

#### 【0056】

「増殖性障害を有していると疑われる哺乳動物」は、哺乳動物が増殖性障害もしくは腫瘍を有し得ること、または増殖性障害もしくは腫瘍を有していると診断されていること、または増殖性障害もしくは腫瘍を有していると以前に診断されていること、腫瘍または腫瘍の実質的に全てが外科的に除去されていること、そして哺乳動物がいくらかの残存している腫瘍細胞を保有していると疑われることを意味する。

40

#### 【0057】

本発明はまた、薬学的組成物を含む。これは、有効成分として、1つ以上の免疫抑制剤または免疫阻害剤、および「薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤」を伴う1つ以上のレオウイルスを含有する。本発明の組成物の作製においては、有効成分／免疫抑制剤または免疫阻害剤、およびレオウイルスが、通常は賦形剤と混合され、賦形剤によって稀釈さ

50

れるか、またはカプセル、袋 (s a c h e t)、紙、または他の容器の形態であり得るそのようなキャリア中に封入される。薬学的に受容可能な賦形剤が希釈剤として作用する場合には、これは固体、半固体、または液体材料であり得る。これは、有効成分についてのビヒクル、キャリア、または媒体として作用する。従って、組成物は、錠剤、丸剤、散剤、ロゼンジ、袋入りの薬 (s a c h e t s)、カシェ剤、エリキシル剤、懸濁物、乳濁物、液剤、シロップ剤、エアロゾル剤 (固体として、または液体媒体中)、例えば、10重量%までの活性化化合物を含有している軟膏、軟質および硬質ゼラチンカプセル、坐剤、滅菌の注射可能な溶液、ならびに滅菌のパッケージされた散剤の形態であり得る。

#### 【0058】

適切な賦形剤のいくつかの例として、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアガム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、滅菌水、シロップ、およびメチルセルロースが挙げられる。処方物はさらに：タルク、ステアリン酸マグネシウム、および鉱油のような潤滑剤；湿潤剤；乳濁剤；ならびに懸濁剤；メチルー安息香酸およびプロピルヒドロキシー安息香酸のような保存料；甘味料；ならびに香味料を含有し得る。本発明の組成物は、当該分野で公知の手順を使用することによって、患者への投与後に有効成分の迅速な、持続的な、または遅延させられた放出を提供するように処方され得る。

10

#### 【0059】

錠剤のような固体の組成物を調製するために、重要な有効成分／免疫抑制剤または免疫阻害剤、およびレオウイルスが、本発明の化合物の均質な混合物を含有している固体の事前処方組成物を形成するように、薬学的賦形剤と混合される。これらの事前処方組成物について均質であるという場合には、組成物が、錠剤、丸剤、およびカプセル剤のような等価に有効な単位投薬形態に容易に分割され得るように、有効成分が組成物全体にわたって均質に分散させられることが意味される。

20

#### 【0060】

本発明の錠剤または丸剤は、延長した作用の利点を付与する投薬形態を提供するように、被覆され得るかまたは他の方法で調合され得る。例えば、錠剤または丸剤は、内部の投薬成分、および外部の投薬成分を含有し得、外部の投薬成分が内部の投薬成分を包む形態である。2つの成分は、胃での分解に抵抗するように作用し、そして内部の成分が十二指腸内へとインタクトで通過させるかまたは放出を遅らせる腸溶性の層によって分離され得る。種々の材料が、このような腸溶性の層または被覆のために使用され得る。このような材料として、多数の重合酸 (p o l y m e r i c a c i d)、およびセラック、セチルアルコール、および酢酸セルロースのような材料との重合酸の混合物が挙げられる。

30

#### 【0061】

本発明の新規の組成物が、経口投与または注射による投与のために取り込まれ得る液体の形態として、水溶液、適切に風味をつけたシロップ、水性または油性懸濁剤、および食用油 (例えば、トウモロコシ油、綿実油、ゴマ油、ココナッツ油、またはピーナッツ油) で香味づけた乳濁物、ならびにエリキシル剤、および類似の薬学的ビヒクルが挙げられる。

#### 【0062】

吸入 (i n h a l a t i o n) または吸入 (i n s u f f l a t i o n) のための組成物は、薬学的に受容可能な水性溶媒もしくは有機溶媒、またはそれらの混合物中の溶液および懸濁物、ならびに散剤を含む。液体または固体の組成物は、本明細書中に記載されるような適切な薬学的に受容可能な賦形剤を含有し得る。好ましくは、組成物は、局所または全身的な効果のために、経口または鼻腔の呼吸経路によって投与される。好ましい薬学的に受容可能な溶媒中の組成物は、不活性ガスの使用によって噴霧され得る。噴霧溶液は、噴霧デバイスから直接吸入され得るか、または噴霧デバイスはフェースマスクテント、または断続的陽圧呼吸機器 (i n t e r m i t t e n t p o s i t i v e p r e s s u r e b r e a t h i n g m a c h i n e) に取り付けられ得る。溶液、懸濁物、または散剤組成物は、好ましくは、適切な様式で処方物を送達するデバイスから、経口または

40

50

鼻腔によって投与され得る。

【0063】

本発明の方法において使用される別の好ましい処方物は、経皮送達デバイス（「パッチ」）を使用する。このような経皮パッチは、制御された量での本発明のレオウイルスの持続的または断続的な注入を提供するために使用され得る。薬学的薬剤の送達のための経皮パッチの構築および使用は、当該分野で周知である。例えば、米国特許第5,023,252号（本明細書中で参考として援用されている）を参照のこと。このようなパッチは、薬学的薬剤の持続的、拍動性の、またはオンデマンド送達のために構築され得る。

【0064】

本発明での使用のための他の適切な処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciencesに見出され得る。その開示は、本明細書中で参考として援用される。

【0065】

免疫抑制剤または免疫阻害剤、およびレオウイルス、あるいは、免疫抑制剤または免疫阻害剤およびレオウイルスを含有している薬学的組成物は、適切な容器にパッケージされた必須の材料を提供する便利なキットにパッケージされ得る。キットはまた、化学療法剤をも含む得ることが意図される。

【0066】

免疫抑制剤または免疫阻害剤は、適切な量で、そして哺乳動物の免疫系の免疫抑制または免疫阻害を生じるために十分な適切な投与スケジュールを使用して投与される。このような量およびスケジュールは、当業者に周知である。

【0067】

レオウイルスは、増殖性障害を処置するために十分な量（例えば、「有効量」）で投与される。増殖性障害は、増殖している細胞へのレオウイルスの投与が増殖している細胞の溶解をもたらす場合に、「処置」される。これは、新生物の大きさの減少、または新生物の完全な排除を生じ得る。新生物の大きさの減少または新生物の排除は、一般的には、レオウイルスによる新生物細胞の溶解（「腫瘍崩壊」）によって引き起こされる。好ましくは、有効量は、腫瘍細胞の増殖を阻害することが可能な量である。好ましくは、有効量は、約 $1.0 \text{ pfu/kg}$ 体重～約 $10^{15} \text{ pfu/kg}$ 体重、より好ましくは、約 $10^2 \text{ pfu/kg}$ 体重～約 $10^{13} \text{ pfu/kg}$ 体重である。例えば、ヒトの処置のためには、存在する腫瘍の型、大きさ、および数に依存して、約 $10^2 \sim 10^{17}$  プラーク形成単位（PFU）のレオウイルスを使用され得る。有効量は、個々の基準に対して決定され、そして少なくとも一部、レオウイルスの型の考慮；選択される投与経路；個体の大きさ、年齢、性別；患者の症状の重篤度；新生物の大きさおよび他の特徴などに基づき得る。治療の過程は、数日から数ヶ月まで続き得るか、または疾患の縮小が達成されるまで続き得る。

【0068】

免疫抑制剤または免疫阻害剤、およびレオウイルスは、単回用量で、または複数回の用量（すなわち、1回以上の用量）で投与され得る。複数回の用量が、同時にまたは連続的に（例えば、数日から数週間の期間にわたって）投与され得る。レオウイルスはまた、同じ個体中の1つ以上の新生物に対しても投与され得る。

【0069】

組成物は好ましくは、単位投薬形態で処方される。それぞれの投薬は、適切な量の免疫抑制剤または免疫阻害剤、および約 $10^2 \text{ pfu} \sim 10^{13} \text{ pfu}$ のレオウイルスを含有している。用語「単位投薬形態」は、ヒト被験体および他の哺乳動物について単位投薬として適切な、物理的に分離した単位をいう。それぞれの単位は、適切な薬学的賦形剤を伴って、所望される治療効果を生じるように計算された、予め決定された量のレオウイルスを含有している。

【0070】

上記のように、レオウイルスが免疫応答性哺乳動物における固形の新生物の処置に有効で

あることが見出されている。未改変のレオウイルスの新生物への直接投与は、新生物細胞の腫瘍崩壊および免疫応答性動物中の腫瘍の大きさの減少を生じる。動物が、何らかの方法で免疫抑制または免疫不全にされる場合には、レオウイルスの全身的投与は腫瘍崩壊を生じることに於いてより有効である。

#### 【0071】

レオウイルスは、外科手術または新生物の除去と組合せて投与され得ることが意図される。従って、新生物の外科的除去、および新生物の部位でまたはその付近でのレオウイルスの投与を包含する、固形の新生物の処置のための方法が、本明細書中で提供される。

#### 【0072】

レオウイルスが、哺乳動物を免疫抑制にする放射線治療と組合せて、またはそれに加えて投与され得ることが意図される。 10

#### 【0073】

本発明のレオウイルスが、公知の抗ガン化合物または化学療法剤と組合せて、またはそれに加えて投与され得ることがさらに意図される。化学療法薬は、腫瘍の増殖を阻害し得る化合物である。このような薬剤として、以下が挙げられるがこれらに限定されない：5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、メトトレキサート、ヒドロキシウレア、シクロホスファミド、ダカルバジン、ミトキサントロン、アントラサイクリン（エピルビシンおよびドキソルビシン）、レセプターに対する抗体（例えば、ヘルセプチン（herceptin））、エトポシド（etoposide）、プレグナソーム（pregnasome）、白金化合物（例えば、カルボプラチンおよびシスプラチン）、タキサン（例えば、タキソールおよびタキソテール（taxotere））、ホルモン治療薬（例えば、タモキシフェンおよび抗エストロゲン）、インターフェロン、アロマターゼインヒビター、プロゲステロン剤、ならびにLHRHアナログ。 20

#### 【0074】

本発明のレオウイルスおよび免疫抑制剤は、転移性の腫瘍の増殖を減少させることが見出されている。本発明の1つの実施形態においては、免疫抑制型哺乳動物に対して有効量のレオウイルスを投与する工程を包含する、哺乳動物の転移性腫瘍の増殖を減少させるための方法が提供される。

#### 【0075】

（有用性）

本発明のレオウイルスおよび免疫抑制剤は、種々の目的のために使用され得る。これらは、哺乳動物のras媒介性増殖性障害を処置するための方法において使用され得る。これらは、新生物を減少または排除するために使用され得る。これらは、転移を処置するための方法において使用され得る。これらは、外科手術、化学療法、および放射線治療を含むガンの公知の処置と組合せて使用され得る。 30

#### 【0076】

本発明およびその利点をさらに説明するために、以下の特定の実施例が提供されるが、いかなる方法においても特許請求の範囲を限定するようには意味されない。

#### 【0077】

（実施例）

以下の実施例においては、全ての温度は（他の場所で特に示されていない限りは）摂氏であり、そして全ての割合は（他の場所で特に示されていない限りは）重量パーセントである。 40

#### 【0078】

以下の実施例においては、以下の略号は以下の意味を有する。略号が定義されていない場合は、その一般的に受容されている意味を有する：

μM = マイクロモル

mM = ミリモル

M = モル

ml = ミリリットル

$\mu$  l = マイクロリットル

m g = ミリグラム

$\mu$  g = マイクログラム

P A G E = ポリアクリルアミドゲル電気泳動

r p m = 1 分あたりの回転数

F B S = ウシ胎仔血清

D T T = ジチオスレイトール

S D S = ドデシル硫酸ナトリウム

P B S = リン酸緩衝化生理食塩水

D M E M = ダルベッコ改変イーグル培地

10

$\alpha$  - M E M =  $\alpha$  - 改変イーグル培地

$\beta$  - M E =  $\beta$  - メルカプトエタノール

M O I = 感染多重度

P F U = プラーク形成単位

M A P K = M A P キナーゼ

p h o s p h - M A P K = リン酸化 M A P キナーゼ

H R P = 西洋ワサビペルオキシダーゼ

P K R = ニ本鎖 R N A 活性化プロテインキナーゼ

R T - P C R = 逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応

G A P D H = グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ

20

E G F R = 上皮増殖因子レセプター

M E K キナーゼ = マイトジェン活性化細胞外シグナル調節キナーゼ

D M S O = ジメチルスルホキシド

S C I D = 重症複合免疫不全

(一般的方法)

(細胞およびウイルス)

親 N I H - 3 T 3、ならびに H a r v e y - r a s (H - r a s) および E J - r a s 腫瘍遺伝子でトランスフェクトした N I H - 3 T 3 細胞を、D o u g l a s F a l l e r 博士 (B o s t o n U n i v e r s i t y S c h o o l o f M e d i c i n e) から懇意により譲り受けた。それらの S o s 形質転換対照物を有している N I H - 3 T 3 細胞 (T N I H # 5 と命名した) は、M i c h a e l K a r i n 博士 (U n i v e r s i t y o f C a l i f o r n i a , S a n D i e g o) から懇意により譲り受けた。H . - J . K u n g 博士 (C a s e W e s t e r n R e s e r v e U n i v e r s i t y) は、v - e r b B 腫瘍遺伝子でトランスフェクトした N I H - 3 T 3 細胞 (T H C - 1 1 と命名した) とともに、親 N I H - 3 T 3 細胞を好意によって贈与して下さった。マウスメタロチオネイン-1 プロモーターの転写制御下に H a r v e y - r a s 遺伝子を含む、C 3 H 1 0 T 1 / 2 マウス繊維芽細胞株の誘導体である 2 H 1 細胞を、N o b u m i c h i H o z u m i 博士 (M o u n t S i n a i H o s p i t a l R e s e a r c h I n s t i t u t e) から入手した。これらの 2 H 1 細胞は、5 0  $\mu$  M の Z n S O <sub>4</sub> の存在下で H - r a s 腫瘍遺伝子を発現する条件付 r a s 形質転換体である。全ての細胞株を、1 0 % のウシ胎児血清 (F B S) を含有しているダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) 中で増殖させた。

30

40

【0079】

N I H - 3 T 3 t e t - m y c 細胞を、R . N . J o h n s t o n 博士 (U n i v e r s i t y o f C a l g a r y) から入手し、そして 2  $\mu$  g / m l のテトラサイクリンの存在下または非存在下で、1 0 % の熱不活化 F B S および抗生物質を含有している D M E M 中で増殖させた (H e l b i n g , C . C . ら、C a n c e r R e s . 5 7 : 1 2 5 5 - 1 2 5 8 ( 1 9 9 7 ) ) 。テトラサイクリンの存在下では、ヒト c - m y c 遺伝子の発現が抑制される。テトラサイクリンの除去によって、これらの細胞中で 1 0 0 倍までの c - m y c の発現の増大を生じる。これはまた、形質転換された表現型を提示する。

50

## 【0080】

PKR<sup>+</sup> / <sup>+</sup> および PKR<sup>0</sup> / <sup>0</sup> マウス胚性繊維芽細胞 (MEF) を、B. R. G. Williams 博士 (the Cleveland Clinic Foundation) から入手し、そして以前に記載したようにウシ胎児血清および抗生物質を含有している  $\alpha$ -MEM 中で増殖させた (Yang, Y. L. ら、EMBO J. 14: 6095-6106 (1995); Der, S. D. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3279-3283 (1997))。

## 【0081】

これらの研究で使用したレオウイルス血清3型の Dearing 株を、L細胞の懸濁培養物中で増殖させ、そして  $\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta$ -ME) を抽出緩衝液から省いた事を除いて Smith に従って精製した (Smith, R. E. ら (1969) Virology, 39: 791-800)。 [<sup>35</sup>S] メチオニンで標識したレオウイルスを増殖させ、そして McRae および Joklik によって記載されているように精製した (MaRae, M. A. および Joklik, W. K., (1978) Virology, 89: 578-593)。精製したレオウイルスについての粒子/PFU比は、代表的には 100/1 であった。

## 【0082】

(レオウイルス感染の免疫蛍光分析)

免疫蛍光研究のために、NIH-3T3、TNIH#5、H-ras、EJ-ras、2H1 (+/- ZnSO<sub>4</sub>)、および THC-11 細胞をカバーガラス上で増殖させ、そして約 10 PFU 細胞の感染多重度 (MOI) でレオウイルスで感染させたか、または細胞に対するウイルスの投与と同一の様式での細胞に対するキャリア剤 (リン酸緩衝化生理食塩水、PBS) の塗布によって擬似感染させた。感染の 48 時間後、細胞をエタノール/酢酸 (20/1) 混合物中で 5 分間固定させ、次いで 75%、50%、および 25% のエタノール中での段階洗浄、続くリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) での 4 回の洗浄によって再水和した。次いで、固定しそして再水和した細胞を一次抗体 (PBS 中で 1/100 に希釈したウサギポリクローナル抗レオウイルス血清3型) [フロイントの完全なアジュバント中のレオウイルス血清3型でのウサギの注射、および続く放血によって調製した抗血清] に対して室温で 2 時間暴露した。PBS での 3 回の洗浄後、細胞を、二次抗体 [10% のヤギ血清および 0.005% の Evan's Blue を含有している PBS 中で 1/100 に希釈したヤギ抗-ウサギ IgG (全分子) -フルオレセインイソチオシアネート結合体 (FITC) [Sigma Immunochemicals F-0382]] に対して室温で 1 時間暴露した。最後に、固定しそして処理した細胞を PBS で 3 回洗浄し、次いで二倍量の滅菌水で 1 回洗浄し、乾燥させ、そして 0.1% のフェニレンジアミンを含有している 90% のグリセロール中でスライド上に固定し、そして Carl Zeiss カメラをその上に取り付けた Zeiss AxioPhot 顕微鏡で観察した (全ての写真についての倍率は 200 倍であった)。

## 【0083】

(MAPキナーゼ (ERK) 活性の検出)

PhosphoPlus p44/42 MAPキナーゼ (Thr202/Tyr204) 抗体キット (New England Biolabs) を、製造業者に説明書に従って細胞溶解物中の MAPキナーゼの検出のために使用した。簡潔には、サブコンフルエントな単層培養物を、推奨される SDS 含有サンプル緩衝液を用いて溶解させ、そして SDS-PAGE、続いてニトロセルロース紙上での電気的ブロッティングに供した。次いで、メンブレンを一次抗体 (抗-全 MAPK または抗-phospho-MAPK) でプローブし、続いて製造業者の機器マニュアルに記載されているように西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合二次抗体によってプローブした。

## 【0084】

(レオウイルス感染細胞の放射性標識および溶解物の調整)

NIH-3T3、TNIH#5、H-ras、EJ-ras、2H1 (+/- ZnSO<sub>4</sub>)

）、およびTHC-11細胞のコンフルエントな単層を、レオウイルスで感染させた（MOI 約10PFU／細胞）。感染の12時間後、培地を、10%の透析したFBSおよび0.1mCi/mlの $[S^{35}]$ メチオニンを含むメチオニンを含まないDMEMと置き換えた。37℃で36時間のさらなるインキュベーション後、細胞をリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）中で洗浄し、そして1%のTriton X-100、0.5%のデオキシコール酸ナトリウムおよび1mMのEDTAを含む同じ緩衝液中に溶解させた。次いで、核を低速遠心分離によって除去し、そして上清を使用するまで-70℃で保存した。

#### 【0085】

（インビトロでのキナーゼアッセイのための細胞質抽出物の調製）

10

種々の細胞株のコンフルエントな単層を、96ウェル細胞培養プレート上で増殖させた。感染後の適切な時点で培地を吸引して除き、そして細胞を、20mMのHEPES [pH 7.4]、120mMのKCl、5mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのジチオスレイトール、0.5%のNonidet P-40、2μg/mlのロイペプチン、および50μg/mlのアプロチニンを含む緩衝液で溶解させた。次いで、核を低速遠心分離によって除去し、そして上清を使用するまで-70℃で保存した。

#### 【0086】

細胞質抽出物を、使用前に、Bio-Radタンパク質マイクロアッセイ方法によってタンパク質濃度について正規化した。それぞれのインビトロでのキナーゼ反応には、20μlの細胞抽出物、7.5μlの反応緩衝液（20mMのHEPES [pH 7.4]、120mMのKCl、5mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのジチオスレイトール、および10%のグリセロール）、ならびに7.0μlのATP混合物（7μlの反応緩衝液中の1.0μCi  $[\gamma-^{32}P]$  ATP）を含み、そして37℃で30分間インキュベートした（Mundschau, L. J. およびFallier, D. V., J. Biol. Chem., 267:23092-23098 (1992)）。インキュベーションの直後、標識した抽出物を、Laemmli SDSサンプル緩衝液中で沸騰させるか、あるいはアガロース-ポリ（I）ポリ（C）ビーズを用いて沈殿させるか、または抗-PKR抗体を用いて免疫沈降させるかのいずれかを行った。

20

#### 【0087】

（アガロースポリ（I）ポリ（C）沈降）

30

それぞれのインビトロでのキナーゼ反応混合物に対して、30μlの50%のAgポリ（I）ポリ（C）6型スラリー（Pharmacia LKB Biotechnology）を添加し、そして混合物を4℃で1時間インキュベートした。吸着した標識したタンパク質を有するAgポリ（I）ポリ（C）ビーズを、次いで、洗浄緩衝液（20mMのHEPES [7.5 pH]、90mMのKCl、0.1mMのEDTA、2mMのジチオスレイトール、10%のグリセロール）で室温で4回洗浄し、そして2×のLaemmli SDSサンプル緩衝液と混合した。次いで、ビーズを5分間沸騰させ、そして解離したタンパク質をSDS-PAGEによって分析した。

#### 【0088】

（ポリメラーゼ連鎖反応）

40

感染後の種々の時点で細胞を抽出し、そして氷冷TNE（10mMのTris [pH 7.8]、150mMのNaCl、1mMのEDTA）中に再懸濁した。次いでこれに対して、1%の最終濃度にまでNP-40を添加した。5分後、核をペレット化し、そしてRNAをフェノール：クロロホルム手順を使用して上清から抽出した。次いで、それぞれのサンプルに由来する当量の全細胞RNAを、製造業者のプロトコールに従ってランダムヘキサヌクレオチドプライマー（Pharmacia）およびRTase（GIBCO-BRL）を使用して、RT-PCRに供した（Wong, H. ら（1994）Anal. Biochem., 223:251-258）。次いで、RT-PCR工程によるcDNAを、予め決定したS1配列に由来する適切なプライマー配列を使用するレオウイルスsl cDNAの選択的増幅に供した（Nagata, L. ら（1984）Nucleic A

50

c i d Res. , 12 : 8699 - 8710 ) 。 G A P D H プライマー ( W o n g , H . ら ( 1994 ) A n a l . B i o c h e m . , 223 : 251 - 258 ) を、推定される 306 b p の G A P D H フラグメントを増幅するために使用した。これは、P C R およびゲル充填コントロールとして提供される。s1 および G A P D H c D N A の選択的増幅を、T a q D N A ポリメラーゼ ( G I B C O - B R L ) を使用して P e r k i n E l m e r G e n e A m p P C R システム 9600 を使用して製造業者のプロトコールに従って行った。97℃で30秒間の変性工程、55℃で45秒間のアニーリング工程、および72℃で60秒間の重合工程からそれぞれ構成されるP C R を、28サイクル行った。P C R 産物を、エチジウムブロマイドを染み込ませたT A E - 2 % アガロースゲルを通じる電気始動によって分析し、そしてP o l a r o i d 57 フィルムを用いて紫外照明下で写真を撮影した。 10

#### 【0089】

(免疫沈降およびS D S - P A G E 分析)

抗レオウイルス血清3型の血清を用いて、<sup>35</sup>S 標識レオウイルスに感染した細胞溶解物の免疫沈降を、以前に記載されているように行った ( L e e , P . W . K . ら ( 1981 ) V i r o l o g y , 108 : 134 - 146 ) 。<sup>32</sup>P 標識細胞溶解物の免疫沈降を、抗P K R 抗体 ( M i c h a e l M a t h e w s 博士による、C o l d S p r i n g H a r b o r ) を用いて同様に行った。免疫沈降物を、L a e m m l i のプロトコール ( L a e m m l i , U . K . , ( 1970 ) N a t u r e , 227 : 680 - 685 ) に従って不連続なS D S - P A G E によって分析した。 20

#### 【0090】

(実施例1 生存性に対する事前のレオウイルス暴露の影響)

C3Hマウスを、上記に記載したようにレオウイルスの注射でチャレンジした。2週間後、レオウイルスに対する抗体を、これらの動物中で検出した。レオウイルスに暴露した動物、および事前暴露しなかった動物に、C3腫瘍他家移植片を与えた。腫瘍の確立後、生存しているまたはUV不活化レオウイルスを全ての動物に投与した。レオウイルスに事前暴露した動物は、事前暴露しなかったマウスよりも低い完全な腫瘍の退行の指標を有した。チャレンジした9匹の動物のうちの3匹(33%)が完全な腫瘍の退行を有したことに對して、レオウイルスに事前暴露しなかった9匹のマウスのうちの6匹(66%)が完全な腫瘍の退行を有した。 30

#### 【0091】

(実施例2 有効用量を減少させるための、免疫抑制剤とのレオウイルスの同時投与)

レオウイルスは、免疫不全型動物および免疫応答性動物の両方において腫瘍細胞崩壊剤として作用し得ることが実証されている。しかし、免疫応答性動物は、増大したウイルスの投与量および増大した処置頻度を必要とする。免疫抑制剤の存在下でのレオウイルスの同時投与が、免疫応答性動物での処置における投与量および頻度を減少させることを実証するために、C3Hマウスに、r a s 形質転換C3H 10T1/2細胞に由来する腫瘍を移植する。次いで、動物を、処置または擬似処置の開始前またはその時点のいずれかで、免疫抑制剤を用いて処置する。これらの2つの群の動物を、レオウイルスの単回の腫瘍内注射で処置するか、またはUV不活化レオウイルスで擬似処置のいずれかを行う。第2および第3の試行の動物においては、別の日にレオウイルスの3回または5回のいずれかの注射を用いて、処置または擬似処置する。動物を、4週間の間、腫瘍の退行について追跡し、そして4週間の終わりに屠殺する。結果は、レオウイルスに加えた免疫抑制剤を用いる処置が、レオウイルスのみでの処置よりも、より有効な腫瘍の退行を生じることを示す。免疫抑制剤を用いて処置した動物は、溶解を達成するためにより少ない回数およびより少量のレオウイルスの投与を必要とすることを見出す。 40

#### 【0092】

(実施例3 離れた腫瘍の退行を増強させるための、免疫抑制剤とのレオウイルスの同時投与)

レオウイルスの単回の注射は、免疫不全型マウスにおいて全身的に送達された場合、腫瘍 50

の退行を引き起こし得ることが実証されている。レオウイルスの全身的送達は、免疫応答性動物において腫瘍の退行を生じ得るが、増大した投与量および処置頻度が、免疫不全型動物において観察されるものと等しい結果を導くために必要とされることがまた、実証されている。免疫抑制剤の使用がこれらの免疫応答性動物中での高用量の必要性を緩和し得ることを実証するために、C3Hマウスに、重なっているそれらの後方の側腹部にras形質転換C3H 10T1/2細胞に由来する腫瘍を移植する。次いで、動物を、免疫抑制剤を用いて処置するか、または擬似処置のいずれかを行う。次いで、これらの2つの群を、レオウイルスの単回の静脈内注射で処置するか、またはUV不活化レオウイルスを用いて処置するかのいずれかを行う。第2および第3の試行においては、動物に、それぞれ2日ごとに、レオウイルスまたはUV不活化レオウイルスを3回または5回の静脈内注射で投与する。動物を、4週間の間、それぞれ2日ごとに腫瘍の退行を測定して追跡する。全ての動物を、4週間の終わりに屠殺する。結果は、レオウイルスに加えた免疫抑制剤を用いる処置が、レオウイルスのみでの処置よりもより有効な腫瘍の退行を生じることを示す。免疫抑制剤を用いて処置した動物は、溶解を達成するためにより少ない回数およびより少量のレオウイルスの投与を必要とすることを見出す。

#### 【0093】

(実施例4 体外免疫吸収 (immunoadsorption))

宿主免疫系が治療的に適用されたレオウイルスを除去することを防ぐために、免疫成分 (例えば、B細胞、T細胞、および抗体) (これらは、全身的送達を妨害し得る) の選択的除去が、レオウイルスの治療的送達の前に達成される。

#### 【0094】

B細胞およびT細胞集団のいずれかまたは両方の除去は、細胞集団を除去し得る体外化合物 (例えば、除去される細胞集団の特異的レセプターを認識する固定化抗体) と組合せた血液濾過を通じて行われ得る。

#### 【0095】

抗体の選択的除去はまた、宿主の免疫系が治療用ウイルスを除去することを妨ぎ得る。ウイルスとの抗体相互作用を防ぐこともまた、レオウイルスの全身的治療処置を補助し得る。これは、いくつかの方法によって達成され得る：

- 1) ヘム透析および血液を固定化レオウイルス上を通過させることによる抗レオウイルス抗体の除去 (選択的抗体除去) ；
- 2) ヘム透析および血液を固定化プロテインA (例えば、PROSORBA<sup>TM</sup> (Cypress Bioscience, San Diego, CA)) 上を通過させることによる全IgG抗体の除去；
- 3) ヒト化抗イディオタイプ抗体 (ここではレオウイルスに対するイディオタイプ) の投与。

#### 【0096】

体外免疫吸収のための手順は、Singhalの米国特許第4,711,839号およびBallintらの同第4,681,870号に記載されている。これらは、本明細書中にその全体が参考として援用される。

#### 【0097】

本発明の方法において、レオウイルスが投与され、免疫成分が除去され、そしてレオウイルスが再び患者に投与され得ることが理解される。これらの工程は、必要な場合に繰り返され得る。この方法が繰り返される回数は、患者の症状に基づいて実施する開業医によって決定され得る。

#### 【0098】

本発明は、その好ましい実施形態を参照して詳細に示されそして記載されているが、形態および詳細における種々の変更が、添付の特許請求の範囲によって定義されるような本発明の精神および範囲を逸脱することなくその中で行われ得ることが、当業者によって理解される。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/11742 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 35/76 (74) Agent: DONAHUE ERNST & YOUNG LLP, Toronto-Dominion Centre, 222 Bay Street, Suite 1800, P.O. Box 197, Toronto, Ontario M4K 1H6 (CA).
- (21) International Application Number: PCT/CA01/01055
- (22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001) (81) Designated States (national): 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, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/636,597 10 August 2000 (10.08.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 09/636,597 (CON) Filed on 10 August 2000 (10.08.2000)
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): ON-COLYTICS BIOTECH INC. [CA/CA]; Suite 210, 1167 Kensington Crescent N.W., Calgary, Alberta T2N 1X7 (CA).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): COFFEY, Matthew, C. [CA/CA]; 2231 Bowness Road N.W., Calgary, Alberta T2N 3L4 (CA). THOMPSON, Bradley, G. [CA/CA]; 1775 - 7th Avenue N.W., Calgary, Alberta T2N 0Z5 (CA).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR PREVENTING REOVIRUS RECOGNITION FOR THE TREATMENT OF CELLULAR PROLIFERATIVE DISORDERS

WO 02/11742 A2

(57) Abstract: The present invention pertains to methods for preventing reovirus recognition in the treatment of cellular proliferative disorders, and particularly ras-mediated cellular proliferative disorders, in mammals. The mammal may be selected from dogs, cats, sheep, goats, cattle, horses, pigs, mice, humans and non-human primates. The method comprises suppressing or otherwise inhibiting the immune system of the mammal and, concurrently or subsequently, administering to the proliferating cells an effective amount of one or more reoviruses under conditions which result in substantial lysis of the proliferating cells. In particular, the methods provide for reovirus treatment of immunosuppressed or immuno-deficient mammals to treat the proliferative disorders. Immunosuppression, immunoinhibition or otherwise inducing an immunodeficient state in a mammal renders the reovirus more effective. The methods may include the selective removal of immune constituents that may interfere with the systemic delivery of the virus; preventing reovirus recognition by the host immune system; and removal of the virus from an immune suppressed or immune incompetent host following treatment with reovirus. Alternatively, reovirus may be administered to a mammal with a diminished immune response system under conditions which result in substantial lysis of the proliferating cells. Immune systems may be compromised by one or more of the following: an HIV infection; as a side effect of chemotherapy or radiation therapy; by selective removal of B and/or T cell populations; by removal of antibodies (anti-reovirus antibodies or all antibodies), and the like.

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 1 -

METHODS FOR PREVENTING REOVIRUS RECOGNITION FOR THE  
TREATMENT OF CELLULAR PROLIFERATIVE DISORDERS

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

5       The present invention pertains to methods for preventing reovirus  
recognition in the treatment of cellular proliferative disorders, and particularly ras-  
mediated cellular proliferative disorders, in mammals. In particular, the methods  
provide for reovirus treatment of immunosuppressed or immunodeficient mammals  
to treat the proliferative disorders. Immunosuppression, immunoinhibition or  
10 otherwise inducing an immunodeficient state in a mammal renders the reovirus  
more effective. The methods may include the selective removal of immune  
constituents that may interfere with the systemic delivery of the virus; preventing  
reovirus recognition by the host immune system; and removal of the virus from an  
immune suppressed or immune incompetent host following treatment with  
15 reovirus.

References

The following publications, patent applications and patents are cited in this  
application:

U.S. Patent No. 5,023,252

20 Armstrong, G.D. *et al.* (1984), *Virology* 138:37

Aronheim, A., *et al.*, (1994) *Cell*, 78:949-961

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 2 -

- Barbacid, M., *Annu. Rev. Biochem.*, 56:779-827 (1987)
- Berrozpe, G., *et al.* (1994), *Int. J. Cancer*, 58:185-191
- Bischoff, J.R. and Samuel, C.E., (1989) *Virology*, 172:106-115
- Bos, J. (1989) *Cancer Res.* 49:4682
- 5 Cahill, M.A., *et al.*, *Curr. Biol.*, 6:16-19 (1996)
- Chandron and Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle", *J. of Virology* 72(1):467-75 (1998)
- Chaubert, P. *et al.* (1994), *Am. J. Path.* 144:767
- 10 Cuff *et al.*, "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract" *Toxicological Sciences* 42(2):99-108 (1998)
- Der, S.D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3279-3283 (1997)
- Dudley, D.T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7686-7689 (1995)
- Duncan *et al.*, "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein" *Virology* 182(2):810-9 (1991)
- 15 Fields, B.N. *et al.* (1996), *Fundamental Virology, 3rd Edition*, Lippincott-Raven
- Gentsch, J.R.K. and Pacitti, A.F. (1985), *J. Virol.* 56:356
- E. Harlow and D. Lane, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)
- 20 Helbing, C.C. *et al.*, *Cancer Res.* 57:1255-1258 (1997)
- Hu, Y. and Conway, T.W. (1993), *J. Interferon Res.*, 13:323-328
- James, P.W., *et al.* (1994) *Oncogene* 9:3601
- Laemmli, U.K., (1970) *Nature*, 227:680-685
- Lee, J.M. *et al.* (1993) *PNAS* 90:5742-5746

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 3 -

- Lee, P.W.K. *et al.* (1981) *Virology*, 108:134-146
- Lee, P.W.K. *et al.* (1999) Reovirus for the Treatment of Neoplasia, PCT International Application No. PCT/CA98/00774
- Levitzki, A. (1994) *Eur. J. Biochem.* 226:1
- 5 Lowe, S.W. *et al.* (1994) *Science*, 266:807-810
- Lyon, H., *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, J.E. Celis, ed., Academic Press, 1994, p. 232
- Mah et al., "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function" *Virology* 179(1):95-103 (1990)
- 10 McRae, M.A. and Joklik, W.K., (1978) *Virology*, 89:578-593
- Millis, NE *et al.* (1995) *Cancer Res.* 55:1444
- Mundschauf, L.J. and Faller, D.V., (1992) *J. Biol. Chem.*, 267:23092-23098
- Nagata, L., *et al.*, (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12:8699-8710
- Paul R.W. *et al.* (1989) *Virology* 172:382-385
- 15 Raybaud-Diogene, H. *et al.* (1997) *J. Clin. Oncology*, 15(3):1030-1038
- Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Company, Philadelphia PA 17<sup>th</sup> ed. (1985)
- Robinson, M.J. and Cobb, M.H., *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:180-186 (1997)
- Rosen, L. (1960) *Am. J. Hyg.* 71:242
- 20 Sabin, A.B. (1959), *Science* 130:966
- Samuel, C.E. and Brody, M., (1990) *Virology*, 176:106-113
- Smith, R.E. *et al.*, (1969) *Virology*, 39:791-800
- Stanley, N.F. (1967) *Br. Med. Bull.* 23:150

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

-4-

Strong, J.E. *et al.*, (1993) *Virology*, 197:405-411

Strong, J.E. and Lee, P.W.K., (1996) *J. Virol.*, 70:612-616

Trimble, W.S. *et al.* (1986) *Nature*, 321:782-784

5 Turner and Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain" *Virology* 186(1):219-27 (1992)

Waters, S.D. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:20883-20886 (1995)

Wiessmuller, L. and Wittinghofer, F. (1994), *Cellular Signaling* 6(3):247-267

Wong, H., *et al.*, (1994) *Anal. Biochem.*, 223:251-258

10 Yang, Y.L. *et al. EMBO J.* 14:6095-6106 (1995)

Yu, D. *et al.* (1996) *Oncogene* 13:1359

All of the above publications, patent applications and patents are herein incorporated by reference in their entirety to the same extent as if each individual publication, patent application or patent was specifically and individually indicated  
15 to be incorporated by reference in its entirety.

#### State of the Art

Normal cell proliferation is regulated by a balance between growth-promoting proto-oncogenes and growth-constraining tumor-suppressor genes. Tumorigenesis can be caused by genetic alterations to the genome that result in the  
20 mutation of those cellular elements that govern the interpretation of cellular signals, such as potentiation of proto-oncogene activity or inactivation of tumor suppression. It is believed that the interpretation of these signals ultimately

- 5 -

influences the growth and differentiation of a cell, and that misinterpretation of these signals can result in neoplastic growth (neoplasia).

Genetic alteration of the proto-oncogene Ras is believed to contribute to approximately 30% of all human tumors (Wiessmuller, L. and Wittinghofer, F. (1994), *Cellular Signaling* 6(3):247-267; Barbacid, M. (1987) *A Rev. Biochem.* 56, 779-827). The role that Ras plays in the pathogenesis of human tumors is specific to the type of tumor. Activating mutations in Ras itself are found in most types of human malignancies, and are highly represented in pancreatic cancer (80%), sporadic colorectal carcinomas (40-50%), human lung adenocarcinomas (15-24%), thyroid tumors (50%) and myeloid leukemia (30%) (Millis, NE *et al.* (1995) *Cancer Res.* 55:1444; Chaubert, P. *et al.* (1994), *Am. J. Path.* 144:767; Bos, J. (1989) *Cancer Res.* 49:4682). Ras activation is also demonstrated by upstream mitogenic signaling elements, notably by tyrosine receptor kinases (RTKs). These upstream elements, if amplified or overexpressed, ultimately result in elevated Ras activity by the signal transduction activity of Ras. Examples of this include overexpression of PDGFR in certain forms of glioblastomas, as well as in c-erbB-2/neu in breast cancer (Levitzki, A. (1994) *Eur. J. Biochem.* 226:1; James, P.W., *et al.* (1994) *Oncogene* 9:3601; Bos, J. (1989) *Cancer Res.* 49:4682).

Current methods of treatment for neoplasia include surgery, chemotherapy and radiation. Surgery is typically used as the primary treatment for early stages of cancer; however, many tumors cannot be completely removed by surgical means. In addition, metastatic growth of neoplasms may prevent complete cure of cancer by surgery. Chemotherapy involves administration of compounds having antitumor activity, such as alkylating agents, antimetabolites, and antitumor antibiotics. The efficacy of chemotherapy is often limited by severe side effects,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 6 -

including nausea and vomiting, bone marrow depression, renal damage, and central nervous system depression. Radiation therapy relies on the greater ability of normal cells, in contrast with neoplastic cells, to repair themselves after treatment with radiation. Radiotherapy cannot be used to treat many neoplasms, however, because of the sensitivity of tissue surrounding the tumor. In addition, certain tumors have demonstrated resistance to radiotherapy and such may be dependent on oncogene or anti-oncogene status of the cell (Lee. J.M. *et al.* (1993) *PNAS* 90:5742-5746; Lowe. S.W. *et al.* (1994) *Science*, 266:807-810; Raybaud-Diogene. H. *et al.* (1997) *J. Clin. Oncology*, 15(3):1030-1038). In view of the drawbacks associated with the current means for treating neoplastic growth, the need still exists for improved methods for the treatment of most types of cancers.

## SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to the enhancement of the effectiveness of existing reovirus therapies in the treatment of proliferative disorders.

15 This invention pertains to methods for preventing reovirus recognition in the treatment of cellular proliferative disorders, and particularly ras-mediated cellular proliferative disorders, in mammals. The mammal may be selected from dogs, cats, sheep, goats, cattle, horses, pigs, mice, humans and non-human primates. The method comprises suppressing or otherwise inhibiting the immune system of the mammal and, concurrently or subsequently, administering to the proliferating cells an effective amount of one or more reoviruses under conditions which result in substantial lysis of the proliferating cells. In particular, the methods provide for reovirus treatment of immunosuppressed or immunodeficient mammals to treat the proliferative disorders. Immunosuppression, immunoinhibition or otherwise inducing an immunodeficient state in a mammal renders the reovirus more effective. The methods may include the selective

## SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 7 -

removal of immune constituents that may interfere with the systemic delivery of the virus; preventing reovirus recognition by the host immune system; and removal of the virus from an immune suppressed or immune incompetent host following treatment with reovirus. Alternatively, reovirus may be administered to  
5 a mammal with a diminished immune response system under conditions which result in substantial lysis of the proliferating cells. Immune systems may be compromised by one or more of the following: an HIV infection; as a side effect of chemotherapy or radiation therapy; by selective removal of B and/or T cell populations; by removal of antibodies (anti-antireovirus antibodies or all  
10 antibodies), and the like.

The immunosuppression or immunoinhibition may be accomplished by means of an immunosuppressant, an immune suppressive agent, or by any other means which inhibits a mammal's immune system or renders the mammal immunodeficient. When an immunosuppressant is used, it may be administered  
15 prior to or concurrent with reovirus administration. The mammal should be rendered immunosuppressed, immunodeficient or immunoinhibited prior to or concurrent with reovirus administration.

The reovirus may be a mammalian reovirus or an avian reovirus. The reovirus may be modified such that the outer capsid is removed, the virion is  
20 packaged in a liposome or micelle or the proteins of the outer capsid have been mutated. The reovirus and/or immunosuppressive agent can be administered in a single dose or in multiple doses. The proliferative disorder may be a neoplasm. Both solid and hematopoietic neoplasms can be targeted. The immunosuppression results in more effective reovirus treatment.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 8 -

Accordingly, in one aspect the invention provides a method of treating a ras-mediated proliferative disorder in a mammal, comprising the steps of:

- a) performing a step selected from the group consisting of:
- i) administering to the proliferating cells in said mammal an effective amount of an immune suppressive agent;
  - ii) removing B-cells or T-cells from said mammal;
  - iii) removing anti-reovirus antibodies from said mammal;
  - iv) removing antibodies from said mammal;
  - v) administering anti-antireovirus antibodies to said mammal; and
  - vi) suppressing the immune system of the mammal; and
- b) administering to the proliferating cells in said mammal an effective amount of one or more reoviruses under conditions which result in substantial lysis of the proliferating cells.

Also provided is a method of treating a ras-mediated neoplasm in a human, comprising suppressing or otherwise compromising the immune system of the mammal and, concurrently or subsequently, administering to the neoplasm a reovirus in an amount sufficient to result in substantial oncolysis of the neoplastic cells. The reovirus may be administered by injection into or near a solid neoplasm.

Also provided is a method of inhibiting metastasis of a neoplasm in a mammal, comprising suppressing or otherwise compromising the immune system of the mammal and, concurrently or subsequently, administering to the mammal a reovirus in an amount sufficient to result in substantial lysis of the neoplastic cells.

Also provided is a method of treating a suspected ras-mediated neoplasm in a mammal, comprising surgical removal of the substantially all of the neoplasm,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 9 -

suppression or other inhibition of the immune system of the mammal and, administration of an effective amount of reovirus at or near to the surgical site resulting in oncolysis of any remaining neoplastic cells.

Also provided is a pharmaceutical composition comprising an  
5 immunosuppressant or an immunoinhibitor such as an anti-antireovirus antibody, a reovirus, and a pharmaceutically acceptable excipient.

Kits comprising a reovirus and another component such as an immune suppressive agent, means for removing B-cells or T-cells from a mammal, means for removing anti-reovirus antibodies from a mammal, means for removing  
10 antibodies from a mammal, anti-antireovirus antibodies and means for suppressing the immune system of the mammal are also provided.

Also provided is a pharmaceutical composition comprising an immunosuppressant or immunoinhibitor, a modified reovirus and a pharmaceutically acceptable excipient.

15 The methods and pharmaceutical compositions of the invention provide an effective means to treat neoplasia, without the side effects associated with other forms of cancer therapy. Inhibition or suppression of the immune system increases the availability of reovirus to infect and lyse ras-mediated proliferating cells because anti-reovirus antibodies are not formed. Because reovirus is not  
20 known to be associated with disease, any safety concerns associated with deliberate administration of a virus are minimized.

The foregoing and other objects, features and advantages of the invention will be apparent from the following more particular description of preferred embodiments of the invention, as illustrated in the accompanying drawings.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 10 -

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

We have demonstrated the human reovirus requires an activated Ras signaling pathway for infection of cultured cells (Strong, JE et al 1998 EMBO J 17: 3351). Further, we have demonstrated that reovirus could be used as an  
5 oncolytic agent in a number of animal models (Lee, P.W.K. et al (1999)). Severe combined immune deficient mice (SCID) mice bearing tumors established from v-erbB-transformed murine NIH 3T3 cells or human U87 glioblastomas cells were treated with the virus (Coffey, MC et al 1998 Science 282: 1332). A single intratumoral injection of virus resulted in regression of tumor. We have further  
10 demonstrated that in animals given bilateral U87 tumor xenografts that a single unilateral injection of reovirus into the ipsilateral tumor resulted in reduction in the contralateral tumor. This reduction in the remote tumor site is the result of systemic spread of the virus. To examine the effect that a functional immune system could play upon this type of therapy, an immune competent mouse model  
15 was established. Treatment of immune-competent C3H mice bearing tumors established from ras-transformed C3H-10T1/2 cells also resulted in tumor regression, although a series of injections was required (Coffey, MC et al 1998). Thus, co-administration of the virus with an immune suppressive agent, or to an animal with a diminished immune response, allows a reduction in the concentration  
20 and/or frequency of reovirus treatments. Further, immune suppression of the animal may improve response rates in synchronous ras mediated lesions remote from the tumor injected or alternatively when delivered systemically. Immune suppression may also aid in systemic delivery by increasing the bioavailable virus.

The invention pertains to methods of treating a ras-mediated proliferative  
25 disorder in a mammal, by immunosuppressing, immunoinhibiting or otherwise

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 11 -

rendering the mammal immunodeficient and, concurrently or subsequently,  
administering reovirus to the proliferating cells.

The name reovirus (*Respiratory and enteric orphan virus*) is a descriptive  
acronym suggesting that these viruses, although not associated with any known  
5 disease state in humans, can be isolated from both the respiratory and enteric tracts  
(Sabin, A.B. (1959), *Science* 130:966). The term "reovirus" refers to all viruses  
classified in the reovirus genus.

Reoviruses are viruses with a double-stranded, segmented RNA genome.  
The virions measure 60-80 nm in diameter and possess two concentric capsid  
10 shells, each of which is icosahedral. The genome consists of double-stranded  
RNA in 10-12 discrete segments with a total genome size of 16-27 kbp. The  
individual RNA segments vary in size. Three distinct but related types of reovirus  
have been recovered from many species. All three types share a common  
complement-fixing antigen.

15 The human reovirus consists of three serotypes: type 1 (strain Lang or  
T1L), type 2 (strain Jones, T2J) and type 3 (strain Dearing or strain Abney, T3D).  
The three serotypes are easily identifiable on the basis of neutralization and  
hemagglutinin-inhibition assays (Sabin, A.B. (1959), *Science* 130:966; Fields,  
B.N. *et al.* (1996), *Fundamental Virology*, 3rd Edition, Lippincott-Raven; Rosen,  
20 L. (1960) *Am. J. Hyg.* 71:242; Stanley, N.F. (1967) *Br. Med. Bull.* 23:150).

Although reovirus is not known to be associated with any particular  
disease, many people have been exposed to reovirus by the time they reach  
adulthood (i.e., fewer than 25% in children < 5 years old, to greater than 50% in  
those 20-30 years old (Jackson G.G. and Muldoon R.L. (1973) *J. Infect. Dis.*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- 12 -

128:811; Stanley N.F. (1974) *In: Comparative Diagnosis of Viral Diseases*, edited by E. Kurstak and K. Kurstak, 385-421, Academic Press, New York).

For mammalian reoviruses, the cell surface recognition signal is sialic acid (Armstrong, G.D. *et al.* (1984), *Virology* 138:37; Gentsch, J.R.K. and Pacitti, A.F. (1985), *J. Virol.* 56:356; Paul R.W. *et al.* (1989) *Virology* 172:382-385) Due to the ubiquitous nature of sialic acid, reovirus binds efficiently to a multitude of cell lines and as such can potentially target many different tissues; however, there are significant differences in susceptibility to reovirus infection between cell lines.

10 As described herein, Applicants have discovered that cells which are resistant to reovirus infection became susceptible to reovirus infection when transformed by a gene in the Ras pathway. "Resistance" of cells to reovirus infection indicates that infection of the cells with the virus did not result in significant viral production or yield. Cells that are "susceptible" are those that  
15 demonstrate induction of cytopathic effects, viral protein synthesis, and/or virus production. Resistance to reovirus infection was found to be at the level of gene translation, rather than at early transcription: while viral transcripts were produced, virus proteins were not expressed. Without being limited to a theory, it is thought that viral gene transcription in resistant cells correlated with  
20 phosphorylation of an approximately 65 kDa cell protein, determined to be double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR), that was not observed in transformed cells. Phosphorylation of PKR lead to inhibition of translation. When phosphorylation was suppressed by 2-aminopurine, a known inhibitor of PKR, drastic enhancement of reovirus protein synthesis occurred in the  
25 untransformed cells. Furthermore, a severe combined immunodeficiency (SCID) mouse model in which tumors were created on both the right and left hind flanks

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 13 -

revealed that reovirus significantly reduced tumor size when injected directly into the right-side tumor; in addition, significant reduction in tumor size was also noted on the left-side tumor which was not directly injected with reovirus, indicating that the oncolytic capacity of the reovirus was systemic as well as local.

5        While reovirus may effectively be used to treat neoplasia in immunocompetent mice, we have found that larger numbers (about ten-fold) of reovirus and multiple treatments may be required for best effect. Further, intratumoral injection may be needed for maximum effect in immunocompetent animals.

10        These results indicated that reovirus uses the host cell's Ras pathway machinery to downregulate PKR and thus reproduce. For both untransformed (reovirus-resistant) and EGFR-, Sos-, or ras-transformed (reovirus-susceptible) cells, virus binding, internalization, uncoating, and early transcription of viral genes all proceed normally. In the case of untransformed cells, secondary  
15 structures on the early viral transcripts inevitably trigger the phosphorylation of PKR, thereby activating it, leading to the phosphorylation of the translation initiation factor eIF-2 $\alpha$ , and hence the inhibition of viral gene translation. In the case of EGFR-, Sos-, or ras-transformed cells, the PKR phosphorylation step is prevented or reversed by Ras or one of its downstream elements, thereby allowing  
20 viral gene translation to ensue. The action of Ras (or a downstream element) can be mimicked by the use of 2-aminopurine (2-AP), which promotes viral gene translation (and hence reovirus infection) in untransformed cells by blocking PKR phosphorylation.

25        The implantation of human tumor cells into SCID mice is recognized as a well known model system for testing the effectiveness of various anti-tumor agents

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 14 -

in humans. It has previously been shown that pharmaceuticals effective against human tumors implanted into SCID mice are predictive of their effectiveness against the same tumors in humans.

Based upon these discoveries, Applicants have developed methods for  
5 treating ras-mediated proliferative disorders in mammals. Representative mammals include dogs, cats, sheep, goats, cattle, horses, pigs, mice, non-human primates, and humans. In a preferred embodiment, the mammal is a human.

In the methods of the invention, reovirus is administered to Ras-mediated proliferating cells in the individual mammal. In one embodiment of this invention  
10 a course of reovirus therapy is administered one or more times. Following the first administration of reovirus therapy particular immune constituents that may interfere with subsequent administrations of reovirus are removed from the patient. These immune constituents include B cells, T cells, antibodies, and the like.

Removal of either the B cell or T cell population can be accomplished by  
15 several methods. In one method, the blood may be filtered and heme-dialysis may be performed. Another method is the filtration of the blood coupled with extra corporeal compounds that can remove the cell populations, for example, with immobilized antibodies that recognize specific receptors on the cell population which is to be remove. Yet another method for removal of a cell population is by  
20 immune suppression. This can be done by first line radiation therapy or by cyclic steroids such as cyclosporin.

Selective removal of anti-reovirus antibodies can also prevent the patient's immune system from removing therapeutically administered reovirus. Preventing antibody interaction with the virus may also assist systemic treatment strategies.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 15 -

Antibodies can be removed by several methods, including heme-dialysis and passing the blood over immobilized reovirus (selective antibody removal); by removal of all IgG antibodies by heme-dialysis and passing the blood over immobilized protein A (commercially available as PROSORBA, Cypres  
5 Bioscience, San Diego, CA); or by administration of humanized anti-idiotypic antibodies, where the idiotype is against reovirus

Another method of this invention is to allow reovirus to act systemically without impairing normal immune function by masking or impairing immune recognition of reovirus. To prevent the patient's immune system from recognizing  
10 reovirus, another embodiment of this invention is the serial administration of reovirus and reovirus reassortants. Alternatively, the reovirus may be coated with non-virotoxic humanized antibodies, such as coating with the F<sub>ab</sub> portion of the antibody, or coated in a micelle.

Additionally, the virus may be treated with chymotrypsin to yield an  
15 infectious subviral particle (ISVP). An ISVP may be used either alone or in combination with whole virus to provide an agent that is either poorly recognized has not been previously prevented by the patient's immune system.

Another embodiment of this invention includes the removal of reovirus from the patient following administration. Since this method may be used on  
20 patients that are either immune suppressed or immune incompetent, it may be of importance to remove virus from the blood stream following the course of treatment. Reovirus may be removed by affinity chromatography using extra corporeal anti-reovirus antibodies associated with heme dialysis, B-cell proliferative agents, or adjuvants to stimulate immune response against the virus  
25 such as UV inactivated virus or Freund's adjuvant.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 16 -

In the methods of the invention, reovirus is administered to ras-mediated proliferating cells in the individual mammal. Representative types of human reovirus that can be used include type 1 (e.g., strain Lang or T1L); type 2 (e.g., strain Jones or T2J); and type 3 (e.g., strain Dearing or strain Abney, T3D or T3A); other strains of reovirus can also be used. In a preferred embodiment, the reovirus is human reovirus serotype 3, more preferably the reovirus is human reovirus serotype 3, strain Dearing. Alternatively, the reovirus can be a non-human mammalian reovirus (e.g., non-human primate reovirus, such as baboon reovirus; equine; or canine reovirus), or a non-mammalian reovirus (e.g., avian reovirus). A combination of different serotypes and/or different strains of reovirus, such as reovirus from different species of animal, can be used.

The reovirus may be naturally occurring or modified. The reovirus is "naturally-occurring": when it can be isolated from a source in nature and has not been intentionally modified by humans in the laboratory. For example, the reovirus can be from a "field source": that is, from a human patient.

The reovirus may be modified but still capable of lytically infecting a mammalian cell having an active ras pathway. The reovirus may be chemically or biochemically pretreated (e.g., by treatment with a protease, such as chymotrypsin or trypsin) prior to administration to the proliferating cells. Pretreatment with a protease removes the outer coat or capsid of the virus and may increase the infectivity of the virus. The reovirus may be coated in a liposome or micelle (Chandron and Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle", *J. of Virology* 72(1):467-75 (1998)) to reduce or prevent an immune response from a mammal which has developed immunity to the reovirus. For example, the virion may be treated with chymotrypsin in the presence of

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 17 -

micelle forming concentrations of alkyl sulfate detergents to generate a new infectious subviral particle.

The reovirus may be a recombinant reovirus from two or more types of reoviruses with differing pathogenic phenotypes such that it contains different antigenic determinants thereby reducing or preventing an immune response by a mammal previously exposed to a reovirus subtype. Such recombinant virions, also known as reassortants, can be generated by co-infection of mammalian cells with different subtypes of reovirus with the resulting resorting and incorporation of different subtype coat proteins into the resulting virion capsids.

10 The reovirus may be modified by incorporation of mutated coat proteins, such as for example  $\sigma 1$ , into the virion outer capsid. The proteins may be mutated by replacement, insertion or deletion. Replacement includes the insertion of different amino acids in place of the native amino acids. Insertions include the insertion of additional amino acid residues into the protein at one or more  
15 locations. Deletions include deletions of one or more amino acid residues in the protein. Such mutations may be generated by methods known in the art. For example, oligonucleotide site directed mutagenesis of the gene encoding for one of the coat proteins could result in the generation of the desired mutant coat protein. Expression of the mutated protein in reovirus infected mammalian cells *in vitro*  
20 such as COS1 cells will result in the incorporation of the mutated protein into the reovirus virion particle (Turner and Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain" *Virology* 186(1):219-27 (1992); Duncan et al., "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the  
25 reovirus cell attachment protein" *Virology* 182(2):810-9 (1991); Mah et al., "The

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 18 -

N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function" *Virology* 179(1):95-103 (1990))

- The reovirus is preferably a reovirus modified to reduce or eliminate an immune reaction to the reovirus. Such modified reovirus are termed
- 5 "immunoprotected reovirus". Such modifications could include packaging of the reovirus in a liposome, a micelle or other vehicle to mask the reovirus from the mammals immune system. Alternatively, the outer capsid of the reovirus virion particle may be removed since the proteins present in the outer capsid are the major determinant of the host humoral and cellular responses.
- 10 A "proliferative disorder" is any cellular disorder in which the cells proliferate more rapidly than normal tissue growth. Thus a "proliferating cell" is a cell that is proliferating more rapidly than normal cells. The proliferative disorder, includes but is not limited to neoplasms. A neoplasm is an abnormal tissue growth, generally forming a distinct mass, that grows by cellular
- 15 proliferation more rapidly than normal tissue growth. Neoplasms show partial or total lack of structural organization and functional coordination with normal tissue. These can be broadly classified into three major types. Malignant neoplasms arising from epithelial structures are called carcinomas, malignant neoplasms that originate from connective tissues such as muscle, cartilage, fat or bone are called
- 20 sarcomas and malignant tumors affecting hematopoietic structures (structures pertaining to the formation of blood cells) including components of the immune system, are called leukemias and lymphomas. A tumor is the neoplastic growth of the disease cancer. As used herein, a "neoplasm", also referred to as a "tumor", is intended to encompass hematopoietic neoplasms as well as solid neoplasms.
- 25 Other proliferative disorders include, but are not limited to neurofibromatosis.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 19 -

At least some of the cells of the proliferative disorder have a mutation in which the Ras gene (or an element of the Ras signaling pathway) is activated, either directly (e.g., by an activating mutation in Ras) or indirectly (e.g., by activation of an upstream element in the Ras pathway). Activation of an upstream element in the Ras pathway includes, for example, transformation with epidermal growth factor receptor (EGFR) or Sos. A proliferative disorder that results, at least in part, by the activation of Ras, an upstream element of Ras, or an element in the Ras signaling pathway is referred to herein as a "Ras-mediated proliferative disorder".

10 "B-cells" refers to B-lymphocytes. There are two major subpopulations of B lymphocytes, B-1 and B-2 cells. B-1 cells are self-renewing and frequently secrete high levels of antibody which binds to a range of antigens (polyspecificity) with a relatively low affinity. The majority of B cells, B-2 cells, are directly generated from precursors in the bone marrow and secrete highly specific  
15 antibody.

"T-cells" refers to T-lymphocytes. T-cells differentiate within the thymus gland and are specialized to operate against cells bearing intracellular organisms. T-cells only recognize antigen when it is on the surface of a body cell.

"Anti-reovirus antibody" refers to an antibody which binds to reovirus.  
20 "IgG antibodies" refers to immunoglobulin G antibodies. IgG, the most abundant type of antibody, carries the major burden of neutralizing bacterial toxins and binding to microorganisms to enhance their phagocytosis. "Humanized antibodies" refers to antibody molecules in which the amino acid sequence in the non-antigen binding regions has been altered so that the antibody more closely  
25 resembles a human antibody, and still retains its original binding ability.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 20 -

One neoplasm that is particularly susceptible to treatment by the methods of the invention is pancreatic cancer, because of the prevalence of Ras-mediated neoplasms associated with pancreatic cancer. Other neoplasms that are particularly susceptible to treatment by the methods of the invention include breast cancer, central nervous system cancer (e.g., neuroblastoma and glioblastoma), peripheral nervous system cancer, lung cancer, prostate cancer, colorectal cancer, thyroid cancer, renal cancer, adrenal cancer, liver cancer, lymphoma and leukemia. One proliferative disorder that is particularly susceptible to treatment by the methods of this invention include neurofibromatosis 1 because of the activation of the ras pathway.

"Administration to a proliferating cell or neoplasm" indicates that the reovirus is administered in a manner so that it contacts the proliferating cells or cells of the neoplasm (also referred to herein as "neoplastic cells"). The route by which the reovirus is administered, as well as the formulation, carrier or vehicle, will depend on the location as well as the type of the neoplasm. A wide variety of administration routes can be employed. For example, for a solid neoplasm that is accessible, the reovirus can be administered by injection directly to the neoplasm. For a hematopoietic neoplasm, for example, the reovirus can be administered intravenously or intravascularly. For neoplasms that are not easily accessible within the body, such as metastases or brain tumors, the reovirus is administered in a manner such that it can be transported systemically through the body of the mammal and thereby reach the neoplasm (e.g., intrathecally, intravenously or intramuscularly). Alternatively, the reovirus can be administered directly to a single solid neoplasm, where it then is carried systemically through the body to metastases. The reovirus can also be administered subcutaneously, intraperitoneally, topically (e.g., for melanoma), orally (e.g., for oral or esophageal neoplasm), rectally (e.g., for colorectal neoplasm), vaginally (e.g., for

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

-21-

cervical or vaginal neoplasm), nasally or by inhalation spray (e.g., for lung neoplasm).

Reovirus can be administered systemically to mammals which are immune compromised or which have not developed immunity to the reovirus epitopes. In  
5 such cases, reovirus administered systemically, i.e. by intravenous injection, will contact the proliferating cells resulting in lysis of the cells.

Immunocompetent mammals previously exposed to a reovirus subtype may have developed humoral and/or cellular immunity to that reovirus subtype. Nevertheless, it has been found that direct injection of the reovirus into a solid  
10 tumor in immunocompetent mammals will result in the lysis of the neoplastic cells. On the other hand, when the reovirus is administered systemically to immunocompetent mammals, the mammals may produce an immune response to the reovirus. Such an immune response may be avoided if the reovirus is of a  
15 subtype to which the mammal has not developed immunity, or the reovirus has been modified as previously described herein such that it is immunoprotected, for example, by protease digestion of the outer capsid or packaging in a micelle.

Alternatively, it is contemplated that the immunocompetency of the mammal against the reovirus may be suppressed either by the prior or co-administration of pharmaceuticals known in the art to suppress the immune system  
20 in general (Cuff et al., "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract" *Toxicological Sciences* 42(2):99-108 (1998)) or alternatively the administration of such immunoinhibitors as anti-antireovirus antibodies. The humoral immunity of the mammal against reovirus may also be temporarily reduced or suppressed by plasmaphoresis of the mammals  
25 blood to remove the anti-reovirus antibodies. The humoral immunity of the

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 22 -

mammal against reovirus may additionally be temporarily reduced or suppressed by the intravenous administration of non-specific immunoglobulin to the mammal.

It is contemplated that the reovirus may be administered to immunocompetent mammals immunized against the reovirus in conjunction with the administration of immunosuppressants and/or immunoinhibitors. Such immunosuppressants and immunoinhibitors are known to those of skill in the art and include such agents as cyclosporin, rapamycin, tacrolimus, mycophenolic acid, azathioprine and their analogs, and the like. Other agents are known to have immunosuppressant properties as well (see, e.g., Goodman and Gilman, 7<sup>th</sup> Edition, page 1242, the disclosure of which is incorporated herein by reference). Such immunoinhibitors also include "anti-antireovirus antibodies," which are antibodies directed against anti-reovirus antibodies. Such antibodies can be made by methods known in the art. See for example "Antibodies: A laboratory manual" E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988). Such anti-antireovirus antibodies may be administered prior to, at the same time or shortly after the administration of the reovirus. Preferably an effective amount of the anti-antireovirus antibodies are administered in sufficient time to reduce or eliminate an immune response by the mammal to the administered reovirus. The terms "immunosuppressant" or "immune suppressive agent" include conventional immunosuppressants, immunoinhibitors, antibodies, and conditions such as radiation therapy or HIV infection which result in compromise of the immune system.

The term "substantial lysis" means at least 10% of the proliferating cells are lysed, more preferably of at least 50% and most preferably of at least 75% of the cells are lysed. The percentage of lysis can be determined for tumor cells by

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 23 -

measuring the reduction in the size of the tumor in the mammal or the lysis of the tumor cells *in vitro*.

A "mammal suspected of having a proliferative disorder" means that the mammal may have a proliferative disorder or tumor or has been diagnosed with a proliferative disorder or tumor or has been previously diagnosed with a proliferative disorder or tumor, the tumor or substantially all of the tumor has been surgically removed and the mammal is suspected of harboring some residual tumor cells.

This invention also includes pharmaceutical compositions which contain, as the active ingredient, one or more immunosuppressants or immunoinhibitors and one or more of the reoviruses associated with "pharmaceutically acceptable carriers or excipients". In making the compositions of this invention, the active ingredients/ immunosuppressant or immunoinhibitor and reovirus are usually mixed with an excipient, diluted by an excipient or enclosed within such a carrier which can be in the form of a capsule, sachet, paper or other container. When the pharmaceutically acceptable excipient serves as a diluent, it can be a solid, semi-solid, or liquid material, which acts as a vehicle, carrier or medium for the active ingredient. Thus, the compositions can be in the form of tablets, pills, powders, lozenges, sachets, cachets, elixirs, suspensions, emulsions, solutions, syrups, aerosols (as a solid or in a liquid medium), ointments containing, for example, up to 10% by weight of the active compound, soft and hard gelatin capsules, suppositories, sterile injectable solutions, and sterile packaged powders.

Some examples of suitable excipients include lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, starches, gum acacia, calcium phosphate, alginates, tragacanth, gelatin, calcium silicate, microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 24 -

cellulose, sterile water, syrup, and methyl cellulose. The formulations can additionally include: lubricating agents such as talc, magnesium stearate, and mineral oil; wetting agents; emulsifying and suspending agents; preserving agents such as methyl- and propylhydroxy-benzoates; sweetening agents; and flavoring agents. The compositions of the invention can be formulated so as to provide quick, sustained or delayed release of the active ingredient after administration to the patient by employing procedures known in the art.

For preparing solid compositions such as tablets, the principal active ingredients/ immunosuppressant or immunoinhibitor and reovirus are mixed with a pharmaceutical excipient to form a solid preformulation composition containing a homogeneous mixture of a compound of the present invention. When referring to these preformulation compositions as homogeneous, it is meant that the active ingredient is dispersed evenly throughout the composition so that the composition may be readily subdivided into equally effective unit dosage forms such as tablets, pills and capsules.

The tablets or pills of the present invention may be coated or otherwise compounded to provide a dosage form affording the advantage of prolonged action. For example, the tablet or pill can comprise an inner dosage and an outer dosage component, the latter being in the form of an envelope over the former. The two components can be separated by an enteric layer which serves to resist disintegration in the stomach and permit the inner component to pass intact into the duodenum or to be delayed in release. A variety of materials can be used for such enteric layers or coatings, such materials including a number of polymeric acids and mixtures of polymeric acids with such materials as shellac, cetyl alcohol, and cellulose acetate.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 25 -

The liquid forms in which the novel compositions of the present invention may be incorporated for administration orally or by injection include aqueous solutions, suitably flavored syrups, aqueous or oil suspensions, and flavored emulsions with edible oils such as corn oil, cottonseed oil, sesame oil, coconut oil, or peanut oil, as well as elixirs and similar pharmaceutical vehicles.

Compositions for inhalation or insufflation include solutions and suspensions in pharmaceutically acceptable, aqueous or organic solvents, or mixtures thereof, and powders. The liquid or solid compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable excipients as described herein. Preferably the compositions are administered by the oral or nasal respiratory route for local or systemic effect. Compositions in preferably pharmaceutically acceptable solvents may be nebulized by use of inert gases. Nebulized solutions may be inhaled directly from the nebulizing device or the nebulizing device may be attached to a face mask tent, or intermittent positive pressure breathing machine. Solution, suspension, or powder compositions may be administered, preferably orally or nasally, from devices which deliver the formulation in an appropriate manner.

Another preferred formulation employed in the methods of the present invention employs transdermal delivery devices ("patches"). Such transdermal patches may be used to provide continuous or discontinuous infusion of the reovirus of the present invention in controlled amounts. The construction and use of transdermal patches for the delivery of pharmaceutical agents is well known in the art. See, for example, U.S. Patent 5,023,252, herein incorporated by reference. Such patches may be constructed for continuous, pulsatile, or on demand delivery of pharmaceutical agents.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 26 -

Other suitable formulations for use in the present invention can be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, the disclosure of which is incorporated herein by reference.

The immunosuppressant or immunoinhibitor and reovirus or the  
5 pharmaceutical composition comprising the immunosuppressant or  
immunoinhibitor and reovirus may be packaged into convenient kits providing the  
necessary materials packaged into suitable containers. It is contemplated the kits  
may also include chemotherapeutic agent.

The immunosuppressant or immunoinhibitor is administered in an  
10 appropriate amount and using an appropriate schedule of administration sufficient  
to result in immunosuppression or immunoinhibition of the mammal's immune  
system. Such amounts and schedules are well known to those of skill in the art.

The reovirus is administered in an amount that is sufficient to treat the  
proliferative disorder (e.g., an "effective amount"). A proliferative disorder is  
15 "treated" when administration of reovirus to the proliferating cells effects lysis of  
the proliferating cells. This may result in a reduction in size of the neoplasm, or  
in a complete elimination of the neoplasm. The reduction in size of the neoplasm,  
or elimination of the neoplasm, is generally caused by lysis of neoplastic cells  
("oncolysis") by the reovirus. Preferably the effective amount is that amount able  
20 to inhibit tumor cell growth. Preferably the effective amount is from about 1.0  
pfu/kg body weight to about  $10^{15}$  pfu/kg body weight, more preferably from about  
 $10^2$  pfu/kg body weight to about  $10^{13}$  pfu/kg body weight. For example, for  
treatment of a human, approximately  $10^2$  to  $10^{17}$  plaque forming units (PFU) of  
reovirus can be used, depending on the type, size and number of tumors present.  
25 The effective amount will be determined on an individual basis and may be based,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 27 -

at least in part, on consideration of the type of reovirus; the chosen route of administration; the individual's size, age, gender; the severity of the patient's symptoms; the size and other characteristics of the neoplasm; and the like. The course of therapy may last from several days to several months or until diminution  
5 of the disease is achieved.

The immunosuppressant or immunoinhibitor and reovirus can be administered in a single dose, or multiple doses (i.e., more than one dose). The multiple doses can be administered concurrently, or consecutively (e.g., over a period of days or weeks). The reovirus can also be administered to more than one  
10 neoplasm in the same individual.

The compositions are preferably formulated in a unit dosage form, each dosage containing an appropriate amount of immunosuppressant or immunoinhibitor and from about  $10^2$  pfus to about  $10^{13}$  pfus of the reovirus. The term "unit dosage forms" refers to physically discrete units suitable as unitary  
15 dosages for human subjects and other mammals, each unit containing a predetermined quantity of reovirus calculated to produce the desired therapeutic effect, in association with a suitable pharmaceutical excipient.

As mentioned above, it has been found that the reovirus is effective for the treatment of solid neoplasms in immunocompetent mammals. Administration of  
20 unmodified reovirus directly to the neoplasm results in oncolysis of the neoplastic cells and reduction in the size of the tumor in immunocompetent animals. When animals are rendered immunosuppressed or immunodeficient in some way, systemic administration of reovirus will be more effective in producing oncolysis.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 28 -

It is contemplated that the reovirus may be administered in conjunction with surgery or removal of the neoplasm. Therefore, provided herewith are methods for the treatment of a solid neoplasm comprising surgical removal of the neoplasm and administration of a reovirus at or near to the site of the neoplasm.

- 5 It is contemplated that the reovirus may be administered in conjunction with or in addition to radiation therapy which renders the mammal immunosuppressed.

- It is further contemplated that the reovirus of the present invention may be administered in conjunction with or in addition to known anticancer compounds or  
10 chemotherapeutic agents. Chemotherapeutic agents are compounds which may inhibit the growth of tumors. Such agents, include, but are not limited to, 5-fluorouracil, mitomycin C, methotrexate, hydroxyurea, cyclophosphamide, dacarbazine, mitoxantrone, anthracyclins (Epirubicin and Doxorubicin), antibodies to receptors, such as herceptin, etoposide, pregnasome, platinum compounds such  
15 as carboplatin and cisplatin, taxanes such as taxol and taxotere, hormone therapies such as tamoxifen and anti-estrogens, interferons, aromatase inhibitors, progestational agents and LHRH analogs.

- The reovirus and immunosuppressants of the present invention have been found to reduce the growth of tumors that are metastatic. In an embodiment of the  
20 invention, a method is provided for reducing the growth of metastatic tumors in a mammal comprising administering an effective amount of a reovirus to the immunosuppressed mammal.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 29 -

Utility

The reoviruses and immunosuppressants of the present invention may be used for a variety of purposes. They may be used in methods for treating ras-mediated proliferative disorders in a mammal. They may be used to reduce or eliminate neoplasms. They may be used in methods for treating metastases. They may be used in conjunction with known treatments for cancer including surgery, chemotherapy and radiation.

In order to further illustrate the present invention and advantages thereof, the following specific examples are given but are not meant to limit the scope of the claims in any way.

**EXAMPLES**

In the examples below, all temperatures are in degrees Celsius (unless otherwise indicated) and all percentages are weight percentages (also unless otherwise indicated).

In the examples below, the following abbreviations have the following meanings. If an abbreviation is not defined, it has its generally accepted meaning:

|         |   |            |
|---------|---|------------|
| $\mu$ M | = | micromolar |
| mM      | = | millimolar |
| M       | = | molar      |
| ml      | = | milliliter |
| $\mu$ l | = | microliter |

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 30 -

|    |               |                   |                                                         |
|----|---------------|-------------------|---------------------------------------------------------|
|    | mg            | =                 | milligram                                               |
|    | $\mu$ g       | =                 | microgram                                               |
|    | PAGE          | =                 | polyacrylamide gel electrophoresis                      |
|    | rpm           | =                 | revolutions per minute                                  |
| 5  | FBS           | =                 | fetal bovine serum                                      |
|    | DTT           | =                 | dithiothrietol                                          |
|    | SDS           | =                 | sodium dodecyl sulfate                                  |
|    | PBS           | =                 | phosphate buffered saline                               |
|    | DMEM          | =                 | Dulbecco's modified Eagle's medium                      |
| 10 | $\alpha$ -MEM | =                 | $\alpha$ -modified Eagle's medium                       |
|    | $\beta$ -ME   | =                 | $\beta$ -mercaptoethanol                                |
|    | MOI           | =                 | multiplicity of infection                               |
|    | PFU           | =                 | plaque forming units                                    |
|    | MAPK =        | MAP kinase        |                                                         |
| 15 | phosph-MAPK   | =                 | phosphorylated-MAP kinase                               |
|    | HRP           | =                 | horseradish-peroxidase                                  |
|    | PKR           | =                 | double-stranded RNA activated protein kinase            |
|    | RT-PCR        | =                 | reverse transcriptase-polymerase chain reaction         |
|    | GAPDH         | =                 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                |
| 20 | EGFR          | =                 | epidermal growth factor receptors                       |
|    | MEK kinase    | =                 | mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase |
|    | DMSO =        | dimethylsulfoxide |                                                         |
|    | SCID          | =                 | severe combined immunodeficiency                        |

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 31 -

General Methods*Cells and Virus*

Parental NIH-3T3 and NIH-3T3 cells transfected with the Harvey-ras (H-ras) and EJ-ras oncogenes were a generous gift of Dr. Douglas Faller (Boston University School of Medicine). NIH-3T3 cells along with their Sos-transformed counterparts (designated TNIH#5) were a generous gift of Dr. Michael Karin (University of California, San Diego). Dr. H.-J. Kung (Case Western Reserve University) kindly donated parental NIH-3T3 cells along with NIH-3T3 cells transfected with the v-erbB oncogene (designated THC-11). 2H1 cells, a derivative of the C3H 10T1/2 murine fibroblast line, containing the Harvey-ras gene under the transcriptional control of the mouse metallothionein-I promoter were obtained from Dr. Nobumichi Hozumi (Mount Sinai Hospital Research Institute). These 2H1 cells are conditional ras transformant that express the H-ras oncogene in the presence of 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>. All cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS).

The NIH-3T3 tet-myc cells were obtained from Dr. R.N. Johnston (University of Calgary) and were grown in DMEM containing 10% heat-inactivated FBS and antibiotics in the presence or absence of 2  $\mu$ g/ml tetracycline (Helbing, C.C. *et al.*, *Cancer Res.* 57:1255-1258 (1997)). In the presence of tetracycline, expression of the human *c-myc* gene is repressed. Removal of tetracycline results in the elevation of expression of *c-myc* by up to 100-fold in these cells, which also display a transformed phenotype.

The PKR <sup>+/+</sup> and PKR <sup>0/0</sup> mouse embryo fibroblasts (MEFs) were obtained from Dr. B.R.G. Williams (the Cleveland Clinic Foundation) and were grown in

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 32 -

$\alpha$ -MEM containing fetal bovine serum and antibiotics as previously described (Yang, Y.L. *et al.* *EMBO J.* 14:6095-6106 (1995); Der, S.D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3279-3283 (1997)).

The Dearing strain of reovirus serotype 3 used in these studies was  
5 propagated in suspension cultures of L cells and purified according to Smith  
(Smith, R.E. *et al.*, (1969) *Virology*, 39:791-800) with the exception that  $\beta$ -  
mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) was omitted from the extraction buffer. Reovirus labeled  
with [ $^{35}$ S]methionine was grown and purified as described by McRae and Joklik  
(McRae, M.A. and Joklik, W.K., (1978) *Virology*, 89:578-593). The  
10 particle/PFU ratio for purified reovirus was typically 100/1.

#### *Immunofluorescent analysis of reovirus infection*

For the immunofluorescent studies the NIH-3T3, TNH#5, H-ras, EJ-ras,  
2H1 (+/- ZnSO<sub>4</sub>), and THC-11 cells were grown on coverslips, and infected with  
reovirus at a multiplicity of infection (MOI) of ~10 PFU cell or mock-infected by  
15 application of the carrier agent (phosphate-buffered saline, PBS) to the cells in an  
identical fashion as the administration of virus to the cells. At 48 hours  
postinfection, cells were fixed in an ethanol/acetic acid (20/1) mixture for 5  
minutes, then rehydrated by sequential washes in 75%, 50% and 25% ethanol,  
followed by four washes with phosphate-buffered saline (PBS). The fixed and  
20 rehydrated cells were then exposed to the primary antibody (rabbit polyclonal anti-  
reovirus type 3 serum diluted 1/100 in PBS) [antiserum prepared by injection of  
rabbits with reovirus serotype 3 in Freund's complete adjuvant, and subsequent  
bleedings] for 2 hours at room temperature. Following three washes with PBS,  
the cells were exposed to the secondary antibody [goat anti-rabbit IgG (whole  
25 molecule)-fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC) [Sigma ImmunoChemicals  
F-0382] diluted 1/100 in PBS containing 10% goat serum and 0.005% Evan's Blue

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- 33 -

] for 1 hour at room temperature. Finally, the fixed and treated cells were washed three more times with PBS and then once with double-distilled water, dried and mounted on slides in 90% glycerol containing 0.1% phenylenediamine, and viewed with a Zeiss Axiophot microscope on which Carl Zeiss camera was mounted (the magnification for all pictures was 200X).

*Detection of MAP Kinase (ERK) Activity*

The PhosphoPlus p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) Antibody kit (New England Biolabs) was used for the detection of MAP kinase in cell lysates according to the manufacturer's instructions. Briefly, subconfluent monolayer cultures were lysed with the recommended SDS-containing sample buffer, and subjected to SDS-PAGE, followed by electroblotting onto nitrocellulose paper. The membrane was then probed with the primary antibody (anti-total MAPK or anti-phospho-MAPK), followed by the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody as described in the manufacturer's instruction manual.

*Radiolabelling of reovirus-infected cells and preparation of lysates*

Confluent monolayers of NIH-3T3, TNIH#5, H-ras, EJ-ras, 2H1 (+/- ZnSO<sub>4</sub>), and THC-11 cells were infected with reovirus (MOI ~10 PFU/cell). At 12 hours postinfection, the media was replaced with methionine-free DMEM containing 10% dialyzed FBS and 0.1 mCi/ml [<sup>35</sup>S]methionine. After further incubation for 36 hours at 37°C, the cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in the same buffer containing 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate and 1 mM EDTA. The nuclei were then removed by low speed centrifugation and the supernatants were stored at -70°C until use.

*Preparation of cytoplasmic extracts for in vitro kinase assays*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 34 -

Confluent monolayers of the various cell lines were grown on 96 well cell culture plates. At the appropriate time postinfection the media was aspirated off and the cells were lysed with a buffer containing 20mM HEPES [pH 7.4], 120 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 0.5% Nonidet P-40, 2 µg/ml leupeptin, and 50 µg/ml aprotinin. The nuclei were then removed by low-speed centrifugation and the supernatants were stored at -70°C until use.

Cytoplasmic extracts were normalized for protein concentrations before use by the Bio-Rad protein microassay method. Each in vitro kinase reaction contained 20 µl of cell extract, 7.5 µl of reaction buffer (20 mM HEPES [pH 7.4], 120 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, and 10% glycerol) and 7.0 µl of ATP mixture (1.0 µCi[γ-<sup>32</sup>P]ATP in 7 µl of reaction buffer), and was incubated for 30 minutes at 37°C (Mundschau, L.J., and Faller, D.V., *J. Biol. Chem.*, 267:23092-23098 (1992)). Immediately after incubation the labeled extracts were either boiled in Laemmli SDS-sample buffer or were either precipitated with agarose-poly(I)poly(C) beads or immunoprecipitated with an anti-PKR antibody.

*Agarose poly(I)poly(C) precipitation*

To each in vitro kinase reaction mixture, 30 µl of a 50% Ag poly(I)poly(C) Type 6 slurry (Pharmacia LKB Biotechnology) was added, and the mixture was incubated at 4°C for 1 h. The Ag poly(I)poly(C) beads with the absorbed, labeled proteins were then washed four times with wash buffer (20 mM HEPES [7.5 pH], 90 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 10% glycerol) at room temperature and mixed with 2X Laemmli SDS sample buffer. The beads were then boiled for 5 min, and the released proteins were analyzed by SDS-PAGE.

*Polymerase chain reaction*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- 35 -

Cells at various times postinfection were harvested and resuspended in ice cold TNE (10 mM Tris [pH 7.8], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) to which NP-40 was then added to a final concentration of 1%. After 5 minutes, the nuclei were pelleted and RNA was extracted from the supernatant using the phenol:chloroform procedure. Equal amounts of total cellular RNA from each sample were then subjected to RT-PCR (Wong, H., *et al.*, (1994) *Anal. Biochem.*, 223:251-258) using random hexanucleotide primers (Pharmacia) and RTase (GIBCO-BRL) according to the manufacturers' protocol. The cDNA's from the RT-PCR step was then subjected to selective amplification of reovirus s1 cDNA using suitable primer sequences derived from the S1 sequence determined previously (Nagata, L., *et al.*, (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12:8699-8710). GAPDH primers (Wong, H., *et al.*, (1994) *Anal. Biochem.*, 223:251-258) were used to amplify a predicted 306 bp GAPDH fragment which served as a PCR and gel loading control. Selective amplification of the s1 and GAPDH cDNA's was performed using Taq DNA polymerase (GIBCO-BRL) according to the manufacturers' protocol using a Perkin Elmer Gene Amp PCR system 9600. PCR was carried out for 28 cycles with each consisting of a denaturing step for 30 seconds at 97°C, annealing step for 45 seconds at 55°C, and polymerization step for 60 seconds at 72°C. PCR products were analyzed by electrophoresis through an ethidium bromide-impregnated TAE-2% agarose gel and photographed under ultra-violet illumination with Polaroid 57 film.

#### *Immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis*

Immunoprecipitation of <sup>35</sup>S-labeled reovirus-infected cell lysates with anti-reovirus serotype 3 serum was carried out as previously described (Lee, P.W.K. *et al.* (1981) *Virology*, 108:134-146). Immunoprecipitation of <sup>32</sup>P-labeled cell lysates with an anti-PKR antibody (from Dr. Michael Mathews, Cold Spring Harbor) was similarly carried out. Immunoprecipitates were analyzed by discontinuous SDS-

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 36 -

PAGE according to the protocol of Laemmli (Laemmli, U.K., (1970) *Nature*, 227:680-685).

Example 1. Effect of prior reovirus exposure on survivability

C3H mice were challenged with an injection of reovirus as described  
5 above. After two weeks, antibodies to reovirus were detected in these animals.  
Animals exposed to reovirus and animals with no prior exposure were given a C3  
tumor allograft. Following tumor establishment, live or UV-inactivated reovirus  
was administered to all animals. Animals with previous exposure to reovirus had  
lower incidence of complete tumor regression than did mice with no prior  
10 exposure. Three of nine (33%) challenged animals had complete tumor regression  
versus six of nine (66%) of mice with no prior exposure to reovirus.

Example 2. Co-administration of reovirus with an immune suppressive agent to  
decrease the effective dose.

It has been demonstrated that reovirus can act as an oncolytic agent in both  
15 immune deficient and immune competent animals, although immune competent  
animals require increased dosage of virus and increased frequency of treatment.  
To demonstrate that co-administration of reovirus in the presence of an immune  
suppressive agent allows for a decreased dosage and frequency of treatment in  
immune competent animals, C3H mice will be implanted with tumors derived from  
20 ras-transformed C3H 10T1/2 cells. Animals will then be treated either with an  
immune suppressive agent prior to the start of or at the time of treatment or  
mock-treated. Animals in these two groups will be treated either with a single  
intratumoral injection of reovirus or mock treated with UV-inactivated reovirus.  
In a second and third trial animals, will be treated or mock-treated with either 3 or  
25 5 injections of reovirus on alternating days. Animals are followed for tumor

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 37 -

regression for a 4 week period and sacrificed at the end of the fourth week.

Results will show that treatment with an immune suppressive agent in addition to reovirus results in more effective tumor regression than treatment with reovirus alone. Animals treated with an immune suppressive agent will be found to require

5 lower numbers and fewer administrations of reovirus to effect lysis.

Example 3. Co-administration of reovirus with an immune suppressive agent to augment remote tumor regression.

It has been demonstrated that a single injection of reovirus is capable of  
10 causing tumor regression when delivered systemically in immune deficient mice. It has also been demonstrated that systemic delivery of reovirus is capable of causing tumor regression in immune competent animals, although increased dosages and frequency of treatment were required to elicit equivalent results to what were observed in immune deficient animals. To demonstrate that the use of  
15 an immune suppressive agent can alleviate the requirement for higher doses in these immune competent animals, C3H mice are implanted with tumors derived from ras-transformed C3H 10T1/2 cells on sites overlying their hind flanks. Animals are then either treated with an immune suppressive agent or are mock-treated. These two groups are then either treated with single intravenous injection  
20 of reovirus or are treated with UV-inactivated reovirus. In a second and third trial, animals are administered 3 or 5 intravenous reovirus or UV-inactivated reovirus injections every second day. Animals are followed for a 4 week period measuring tumor regression every second day. All animals are sacrificed at the end of week four. Results will show that treatment with an immune suppressive  
25 agent in addition to reovirus results in more effective tumor regression than treatment with reovirus alone. Animals treated with an immune suppressive agent

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 38 -

will be found to require lower numbers and fewer administrations of reovirus to effect lysis.

Example 4: Extracorporeal Immunoadsorption

In order to prevent the host immune system from removing the  
5 therapeutically applied reovirus, selective removal of the immune constituents, such as B cells, T cells and antibodies, that may interfere with the systemic delivery is effected prior to the therapeutic delivery of reovirus.

Removal of either or both B cell and T cell populations can be conducted through blood filtration coupled with extracorporeal compounds that can remove  
10 the cell populations, for example, immobilized antibodies that recognize specific receptors of the cell population being removed.

Selective removal of antibodies can also prevent the host's immune system from removing the therapeutic virus. Preventing antibody interaction with the virus can also assist systemic therapeutic treatment of reovirus. This can be  
15 accomplished by several methods:

- 1) removal of anti-reovirus antibodies by heme-dialysis and passing the blood over immobilized reovirus (selective antibody removal);
- 2) removal of all IgG antibodies by heme-dialysis and passing the blood over immobilized protein A, such as PROSORBA™ (Cypress Bioscience, San  
20 Diego, CA)
- 3) administration of humanized anti-idiotypic antibody, where the idiotypic is against reovirus.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 39 -

Procedures for extracorporeal immunoadsorption are described in U.S. Patent 4,711,839 to Singhal and 4,681,870 to Balint et al., which are incorporated herein by reference in their entirety.

It is understood that in the methods of this invention, reovirus is  
5 administered, immune constituents are removed, and reovirus may be administered to the patient again. These steps may be repeated as necessary. The number of times this method is repeated may be determined by a skilled medical practitioner based upon the condition of the patient.

While this invention has been particularly shown and described with  
10 references to preferred embodiments thereof, it will be understood by those skilled in the art that various changes in form and details may be made therein without departing from the spirit and scope of the invention as defined by the appended claims.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 40 -

## CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of treating a ras-mediated proliferative disorder in a mammal,  
comprising the steps of:
  - 5 a) performing a step selected from the group consisting of:
    - i) administering to the proliferating cells in said mammal an  
effective amount of an immune suppressive agent;
    - ii) removing B-cells or T-cells from said mammal;
    - iii) removing anti-reovirus antibodies from said mammal;
    - 10 iv) removing antibodies from said mammal;
    - v) administering anti-antireovirus antibodies to said mammal; and
    - vi) suppressing the immune system of the mammal; and
  - b) administering to the proliferating cells in said mammal an effective  
amount of one or more reoviruses under conditions which result in  
15 substantial lysis of the proliferating cells.
2. The method of Claim 1, wherein the reovirus is selected from the group  
consisting of a mammalian reovirus and an avian reovirus.
3. The method of Claim 2, wherein the reovirus is a mammalian reovirus.
4. The method of Claim 3, wherein the reovirus is a human reovirus

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 41 -

5. The method of Claim 4, wherein the reovirus is selected from the group consisting of serotype 1 reovirus, serotype 2 reovirus and serotype 3 reovirus.
6. The method of Claim 5, wherein the reovirus is serotype 3 reovirus.
- 5 7. The method of Claim 2, wherein the reovirus is an avian reovirus.
8. The method of Claim 1, wherein more than one type of reovirus is administered.
9. The method of Claim 1, wherein more than one strain of reovirus is administered.
- 10 10. The method of Claim 1, wherein the reovirus is a field isolate.
11. The method of Claim 1, wherein the ras-mediated proliferative disorder is a neoplasm.
12. The method of Claim 1, wherein the ras-mediated proliferative disorder is neurofibromatosis.
- 15 13. The method of Claim 11, wherein the neoplasm is a solid neoplasm.
14. The method of Claim 11, wherein the neoplasm is selected from the group consisting of lung cancer, prostate cancer, colorectal cancer, thyroid cancer, renal cancer, adrenal cancer, liver cancer, pancreatic cancer, breast cancer and central and peripheral nervous system cancer.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 42 -

15. The method of Claim 14, wherein the neoplasm is a central nervous system cancer.
16. The method of Claim 15, wherein the neoplasm is breast cancer.
17. The method of Claim 11, wherein the neoplasm is a hematopoietic  
5 neoplasm.
18. The method of Claim 13, wherein the reovirus is administered by injection into or near the solid neoplasm.
19. The method of Claim 1, wherein the reovirus is administered intravenously into the mammal.
- 10 20. The method of Claim 1, wherein the reovirus is administered intraperitoneally into the mammal.
21. The method of Claim 1 wherein the mammal is immunocompetent.
22. The method of Claim 21 wherein the reovirus is immunoprotected.
23. The method of Claim 1 wherein the reovirus is encapsulated in a micelle.
- 15 24. The method of Claim 1 wherein prior to step (a) an effective amount of one or more reoviruses is administered under conditions which result in substantial lysis of the proliferating cells.
25. The method of Claim 1, wherein the mammal is a human.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 43 -

26. The method of Claim 1, wherein approximately 1 to  $10^{15}$  plaque forming units of reovirus/kg body weight are administered.
27. The method of Claim 1, wherein the reovirus is administered in a single dose.
- 5 28. The method of Claim 1, wherein the reovirus is administered in more than one dose.
29. The method of Claim 11, wherein the neoplasm is metastatic.
30. The method of Claim 1 further comprising the administration of an effective amount of a chemotherapeutic agent.
- 10 31. The method of Claim 1, wherein the reovirus is treated with a protease prior to administration.
32. The method of Claim 11, wherein the neoplasm is pancreatic cancer.
33. The method of Claim 11 further comprising surgical removal of the substantially all of the neoplasm and administration of the reovirus to the surgical site in an amount sufficient to result in substantial oncolysis of any remaining neoplastic cells.
- 15 34. The method of Claim 1, wherein step a) is administering to the proliferating cells in said mammal an effective amount of an immune suppressive agent.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 44 -

35. The method of Claim 34 wherein the immune suppressive agent is administered concurrently with the reovirus.
36. The method of Claim 34 wherein the immune suppressive agent is administered prior to the reovirus.
- 5 37. The method of Claim 34 wherein the immune suppressive agent is selected from the group consisting of cyclosporin, rapamycin, tacrolimus, mycophenolic acid, azathioprine, analogs of the above agents, radiation, HIV infection and anti-antireovirus antibodies.
38. A pharmaceutical composition comprising an immune suppressive agent, a reovirus, and a pharmaceutically acceptable excipient.
- 10 39. The pharmaceutical composition of Claim 38 further comprising a chemotherapeutic agent.
40. The pharmaceutical composition of Claim 38 comprising at least one selected from the group consisting of modified reovirus and an immunoprotected reovirus.
- 15 41. A kit comprising a pharmaceutical composition comprising an immune suppressive agent and a reovirus.
42. The kit of Claim 41 further comprising a chemotherapeutic agent.
43. The method of Claim 1, wherein step a) is removing B-cells or T-cells from said mammal.
- 20

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 45 -

44. The method of Claim 43 wherein the B-cells or T-cells are removed by filtration and heme-dialysis.
45. The method of Claim 44 wherein the filtration is conducted with affinity chromatography, wherein the affinity chromatography comprises antibodies  
5 immobilized to a solid support.
46. The method of claim 45 wherein the antibodies are anti-T-cell or anti-B-cell antibodies.
47. The method of Claim 43 wherein the B-cells and T-cells are removed by radiation therapy.
- 10 48. The method of Claim 43 wherein the B-cells and T-cells are removed by the use of cyclic steroids.
49. The method of Claim 48 wherein the cyclic steroid is cyclosporin.
50. A kit comprising: a) a means for removing B-cells or T-cells from a mammal; and b) a pharmaceutical composition comprising a reovirus.
- 15 51. The kit of Claim 50 further comprising a chemotherapeutic agent.
52. The method of Claim 1, wherein step a) is removing anti-reovirus antibodies from said mammal.
53. The method of Claim 52 wherein the anti-reovirus antibodies are removed  
20 by heme-dialysis and passing the blood over immobilized reovirus.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 46 -

54. The method of Claim 53 wherein the reovirus is affixed to a solid support.
55. A kit comprising: a) a means for removing anti-reovirus antibodies from said mammal; and b) a pharmaceutical composition comprising a reovirus.
56. The kit of Claim 55 further comprising a chemotherapeutic agent.
- 5 57. The method of Claim 1, wherein step a) is removing antibodies from said mammal.
58. The method of Claim 57 wherein said antibodies are IgG antibodies.
59. The method of Claim 57 wherein the antibodies are removed by hemodialysis and passing the blood over immobilized protein A.
- 10 60. The method of Claim 1, wherein step a) is administering anti-antireovirus antibodies to the mammal.
61. The method of Claim 60 wherein the anti-antireovirus antibodies are administered intravenously.
62. The method of Claim 60 wherein the anti-antireovirus antibodies are humanized antibodies.
- 15 63. A pharmaceutical composition comprising an anti-antireovirus antibody, a reovirus, and a pharmaceutically acceptable excipient.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11742

PCT/CA01/01055

- 47 -

64. The pharmaceutical composition of Claim 63 further comprising a  
chemotherapeutic agent.
65. The pharmaceutical composition of Claim 63 comprising at least one  
selected from the group consisting of modified reovirus and an  
immunoprotected reovirus.
66. A kit comprising a pharmaceutical composition comprising an anti-  
antireovirus antibody and a reovirus.
67. The kit of Claim 66 further comprising a chemotherapeutic agent.
68. The method of Claim 1, wherein step a) is suppressing the immune system  
of the mammal.
69. The method of Claim 68 wherein the immune system is suppressed by  
radiation therapy.
70. The method of Claim 68 wherein the immune system is suppressed by  
cyclic steroids.
71. The method of Claim 70 wherein the cyclic steroid is cyclosporin.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/11742 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 35/76, A61P 35/00
- (21) International Application Number: PCT/CA01/01055
- (22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/636,597 10 August 2000 (10.08.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 09/636,597 (CON) US Filed on 10 August 2000 (10.08.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): ON-COLYTICS BIOTECH INC. [CA/CA]; Suite 210, 1167 Kensington Crescent N.W., Calgary, Alberta T2N 1X7 (CA).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): COFFEY, Matthew, C. [CA/CA]; 2231 Bowness Road N.W., Calgary, Alberta T2N 3L4 (CA); THOMPSON, Bradley, G. [CA/CA]; 1775 - 7th Avenue N.W., Calgary, Alberta T2N 0Z5 (CA).
- (74) Agent: DONAHUE ERNST & YOUNG LLP, Toronto-Dominion Centre, 222 Bay Street, Suite 1800, P.O. Box 197, Toronto, Ontario M4K 1H6 (CA).
- (81) Designated States (national): 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, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
- with international search report
  - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 18 April 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR PREVENTING REOVIRUS RECOGNITION FOR THE TREATMENT OF CELLULAR PROLIFERATIVE DISORDERS

WO 02/11742 A3

(57) Abstract: The present invention pertains to methods for preventing reovirus recognition in the treatment of cellular proliferative disorders, and particularly ras-mediated cellular proliferative disorders, in mammals. The mammal may be selected from dogs, cats, sheep, goats, cattle, horses, pigs, mice, humans and non-human primates. The method comprises suppressing or otherwise inhibiting the immune system of the mammal and, concurrently or subsequently, administering to the proliferating cells an effective amount of one or more reoviruses under conditions which result in substantial lysis of the proliferating cells. In particular, the methods provide for reovirus treatment of immunosuppressed or immuno-deficient mammals to treat the proliferative disorders. Immunosuppression, immunoinhibition or otherwise inducing an immunodeficient state in a mammal renders the reovirus more effective. The methods may include the selective removal of immune constituents that may interfere with the systemic delivery of the virus; preventing reovirus recognition by the host immune system; and removal of the virus from an immune suppressed or immune incompetent host following treatment with reovirus. Alternatively, reovirus may be administered to a mammal with a diminished immune response system under conditions which result in substantial lysis of the proliferating cells. Immune systems may be compromised by one or more of the following: an HIV infection; as a side effect of chemotherapy or radiation therapy; by selective removal of B and/or T cell populations; by removal of antibodies (anti-reovirus antibodies or all antibodies), and the like.

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                   | International Application No.<br>PCT/CA 01/01055                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 A61K35/76 A61P35/00<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>IPC 7 A61K<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 practical, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                  |
| <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 99 08692 A (LEE PATRICK W K ;STRONG JAMES (CA); COFFEY MATTHEW C (CA))<br>25 February 1999 (1999-02-25)<br>cited in the application<br>the whole document                                                                                                      | 1-71                                                             |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | IKEDA K ET AL: "Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses."<br>NATURE MEDICINE,<br>vol. 5, no. 8, August 1999 (1999-08),<br>pages 881-887, XP002187854<br>the whole document<br>-/- | 1-71                                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but 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>*Z* document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                  |
| Date of the actual completion of the international search<br>21 January 2002                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                   | Date of mailing of the international search report<br>05/02/2002 |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3018                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                   | Authorized officer<br>Teyssier, B                                |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.  
PCT/CA 01/01055

| C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                       |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
| Y                                                    | IKEDA K ET AL: "Complement depletion facilitates the infection of multiple brain tumors by an intravascular, replication-conditional herpes simplex virus mutant."<br>JOURNAL OF VIROLOGY,<br>vol. 74, no. 10, May 2000 (2000-05), pages 4765-4775, XP002187855<br>the whole document          | 1-71                  |
| Y                                                    | KIRN D H & MCCORMICK F: "Replicating viruses as selective cancer therapeutics."<br>MOLECULAR MEDICINE TODAY,<br>vol. 2, no. 12, 1996, pages 519-527, XP000891648<br>Box 2; pages 525-527, "Antiviral immunity and viral proteins counteracting host defenses"                                  | 1-71                  |
| A                                                    | TODD T ET AL: "Corticosteroid administration does not affect viral oncolytic activity, but inhibits antitumor immunity in replication-competent herpes simplex virus tumor therapy."<br>HUMAN GENE THERAPY,<br>vol. 10, no. 17,<br>20 November 1999 (1999-11-20), pages 2869-2878, XP000999918 |                       |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family membersInternational Application No.  
PCT/CA 01/01055

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date |    | Patent family<br>member(s) |  | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|----|----------------------------|--|---------------------|
| WO 9908692                                | A | 25-02-1999          | US | 6110461 A                  |  | 29-08-2000          |
|                                           |   |                     | AU | 731810 B2                  |  | 05-04-2001          |
|                                           |   |                     | AU | 8847198 A                  |  | 08-03-1999          |
|                                           |   |                     | WO | 9908692 A1                 |  | 25-02-1999          |
|                                           |   |                     | DE | 1003534 T1                 |  | 23-08-2001          |
|                                           |   |                     | EP | 1003534 A1                 |  | 31-05-2000          |
|                                           |   |                     | ES | 2157870 T1                 |  | 01-09-2001          |
|                                           |   |                     | US | 6136307 A                  |  | 24-10-2000          |
|                                           |   |                     | US | 6261555 B1                 |  | 17-07-2001          |

## 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 P 1/16             | A 6 1 P 1/18  |             |
| A 6 1 P 1/18             | A 6 1 P 7/00  |             |
| A 6 1 P 7/00             | A 6 1 P 11/00 |             |
| A 6 1 P 11/00            | A 6 1 P 13/08 |             |
| A 6 1 P 13/08            | A 6 1 P 13/12 |             |
| A 6 1 P 13/12            | A 6 1 P 15/00 |             |
| A 6 1 P 15/00            | A 6 1 P 25/00 |             |
| A 6 1 P 25/00            | A 6 1 P 35/00 |             |
| A 6 1 P 35/00            | A 6 1 K 37/02 |             |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 コフィー, マシュー シー.

カナダ国 ティー2エヌ 3エル4 アルベルタ, カルガリー, エヌ. ダブリュー. ボウネ  
ス ロード 2 2 3 1

(72)発明者 トンプソン, ブラッドリー ジー.

カナダ国 ティー2エヌ 0ゼット5 アルベルタ, カルガリー, エヌ. ダブリュー. 7テ  
ィーエイチ アベニューー1 7 7 5

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA19 AA23 BA44 CA62 DC50 MA02 MA37 MA52 MA56  
MA59 MA60 MA65 NA05 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA201 ZA202  
ZA511 ZA512 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812  
ZB261 ZB262 ZC611 ZC612  
4C085 AA15 BA56 CC08 EE03 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08  
4C087 AA02 BC83 MA02 MA37 MA52 MA56 MA59 MA60 MA65 NA05  
ZA01 ZA02 ZA20 ZA51 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZB26 ZC61