

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7326663号  
(P7326663)

(45)発行日 令和5年8月16日(2023.8.16)

(24)登録日 令和5年8月7日(2023.8.7)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	35/768 (2015.01)	A 6 1 K	35/768
A 6 1 K	31/17 (2006.01)	A 6 1 K	31/17
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

請求項の数 18 (全30頁)

(21)出願番号	特願2022-503939(P2022-503939)	(73)特許権者	520211498
(86)(22)出願日	令和1年8月26日(2019.8.26)		バイオノックス インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2022-546798(P2022-546798 A)		大韓民国, キョンギ-ド 1 3 5 5 4 ,
(43)公表日	令和4年11月9日(2022.11.9)		ソンナム-シ, プンダン-グ, ジョン
(86)国際出願番号	PCT/KR2019/010849	(74)代理人	100107456
(87)国際公開番号	WO2021/040064		弁理士 池田 成人
(87)国際公開日	令和3年3月4日(2021.3.4)	(74)代理人	100162352
審査請求日	令和4年3月18日(2022.3.18)		弁理士 酒巻 順一郎
		(74)代理人	100123995
			弁理士 野田 雅一
		(72)発明者	ファン, テ-ホ
			大韓民国, キョンギ-ド 1 3 5 5 4 ,
			ソンナム-シ, プンダン-グ, ジョン
			ジャイル-ロ, 2 4 8 , 1 9 0 5 -ホ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんの処置のための活性成分としてワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

活性成分として：

ワクシニアウイルス；及び

ヒドロキシ尿素

を含み、

前記ワクシニアウイルスが、チミジンキナーゼ遺伝子が欠失した組換えワクシニアウイルスであり、

前記組換えワクシニアウイルスが、ワクシニア増殖因子遺伝子が欠失したものであるか、又は単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)をコードする遺伝子が挿入されたものである、

がんを処置するための医薬組成物。

【請求項2】

前記ワクシニアウイルスが、Western Reserve(WR)、New York ワクシニアウイルス(NYVAC)、Wyeth(The New York City Board of Health; NYCBOH)、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、International Health Division-J(IHD-J)又はInternational Health Division-White(IHD-W)ワクシニアウイルス株に属する、請求項1に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3】

前記ワクシニアウイルスが、F 1 3 . 5 L 遺伝子、F 1 4 . 5 遺伝子、A 5 6 R 遺伝子、B 1 8 R 遺伝子又はその組合せからなる群から選択されるいずれか 1 つがさらに欠失したものである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

前記ワクシニアウイルスが、変異した HSV - TK、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF)、シトシンデアミナーゼ (CD)、カルボキシルエステラーゼ 1 型、カルボキシルエステラーゼ 2 型、インターフェロンベータ (INF - )、ソマトスタチン受容体 2 及びその組合せからなる群から選択されるいずれか 1 つをコードする遺伝子がさらに挿入されたものである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

10

## 【請求項 5】

前記がんが、肺がん、結腸直腸がん、前立腺がん、甲状腺がん、乳がん、脳がん、頭頸部がん、食道がん、皮膚がん、胸腺がん、胃がん、結腸がん、肝がん、卵巣がん、子宮がん、膀胱がん、直腸がん、胆嚢がん、胆道がん、膵がん及びその組合せからなる群から選択されるいずれか 1 つである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

がんを処置するための前記医薬組成物が前記ワクシニアウイルスの増加したがん選択性によって特徴付けられる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

がんを予防又は処置するためのキットであって：

活性成分としてワクシニアウイルスを含む第 1 の組成物；及び

活性成分としてヒドロキシ尿素を含む第 2 の組成物

を含み、

前記ワクシニアウイルスが、チミジンキナーゼ遺伝子が欠失した組換えワクシニアウイルスであり、

前記組換えワクシニアウイルスが、ワクシニア増殖因子遺伝子が欠失したものであるか、又は単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV - TK) をコードする遺伝子が挿入されたものである、

キット。

## 【請求項 8】

ヒドロキシ尿素とともに用いられ、がんを処置するための、ワクシニアウイルスを含む医薬組成物であって、

前記ワクシニアウイルスが、チミジンキナーゼ遺伝子が欠失した組換えワクシニアウイルスであり、

前記組換えワクシニアウイルスが、ワクシニア増殖因子遺伝子が欠失したものであるか、又は単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV - TK) をコードする遺伝子が挿入されたものである、医薬組成物。

## 【請求項 9】

前記ワクシニアウイルスを前記ヒドロキシ尿素と同時に、逐次的に又は逆順に併用投与するためのものである、請求項 8 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 10】

前記ヒドロキシ尿素が前記ワクシニアウイルスの投与の前、その間又は後に投与されるためのものである、請求項 8 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 11】

前記ヒドロキシ尿素が、前記ワクシニアウイルスの投与の 3 ~ 5 日前から開始して、及び前記ワクシニアウイルスの投与の後の 9 ~ 28 日間、1 日に 1 回連続的に投与されるためのものである、請求項 8 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 12】

前記ヒドロキシ尿素が  $10 \text{ mg / kg / 日} \sim 90 \text{ mg / kg / 日}$  の用量で投与されるためのものである、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

50

## 【請求項 13】

前記ワクシニアウイルスを  $1 \times 10^5$  p f u ~  $1 \times 10^{10}$  p f u の用量で投与するためのものである、請求項 8 ~ 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 14】

前記ワクシニアウイルスを 7 ~ 30 日の間隔で個体に投与するためのものである、請求項 8 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 15】

前記ヒドロキシ尿素が腫瘍内、腹腔内又は静脈内に投与されるためのものである、請求項 8 ~ 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 16】

前記ワクシニアウイルスを腫瘍内、腹腔内又は静脈内に投与するためのものである、請求項 8 ~ 15 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 17】

がんの予防又は処置のための医薬の製造のための、ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む組成物の使用であって、

前記ワクシニアウイルスが、チミジンキナーゼ遺伝子が欠失した組換えワクシニアウイルスであり、

前記組換えワクシニアウイルスが、ワクシニア増殖因子遺伝子が欠失したものであるか、又は単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ ( H S V - T K ) をコードする遺伝子が挿入されたものである、使用。

## 【請求項 18】

がんを有する非ヒト個体にワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を投与することを含む、がんを処置するための方法であって、

前記ワクシニアウイルスが、チミジンキナーゼ遺伝子が欠失した組換えワクシニアウイルスであり、

前記組換えワクシニアウイルスが、ワクシニア増殖因子遺伝子が欠失したものであるか、又は単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ ( H S V - T K ) をコードする遺伝子が挿入されたものである、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、活性成分としてワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む、がんを予防又は処置するための医薬組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

腫瘍溶解性ウイルスは、優れた腫瘍特異的標的化能力、がん細胞での増殖能力及び殺がん細胞能力を有する。近年、腫瘍溶解性ウイルスに基づく様々な臨床試験が実行されている。2015年に、単純ヘルペスウイルスに基づく腫瘍溶解性ウイルスであるタリモジンラヘルパレブベク ( T - V e c ) が進行した黒色腫のための治療剤として首尾よく商品化されたので、腫瘍溶解性ウイルス分野の時代が米国及び欧州で開始した。

## 【0003】

近年、腫瘍溶解性ウイルスの有用性はそれら自身の有効性を超え、このウイルスは腫瘍免疫を活性化し、それによって別の免疫療法剤と併用される治療剤としてのそれらの可能性を示す。腫瘍溶解性ウイルスの開発の初期段階であった2000年までは、そのがん細胞特異的増殖によってもたらされるウイルスの直接殺作用は比較的より重要であった。しかし、以降の臨床試験は、腫瘍免疫の活性化が直接殺がん細胞作用よりも重要な機構であることを見出した。この知見に基づいて、両方とも併用される腫瘍溶解性ウイルスを含む治療剤及び免疫チェックポイント阻害剤などの免疫療法剤が近年開発されている。これは、免疫が抑制される腫瘍微小環境を免疫療法に適当な腫瘍微小環境に腫瘍溶解性ウイルスが変換することが知られているからである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 4 】

ワクシニアウイルスベースの腫瘍溶解性ウイルスに関するいくつかの臨床試験で、腫瘍溶解性ウイルス療法は、急性腫瘍壊死、永続的応答又は完全応答をもたらすことができるが、一部の場合には、進行性疾患又は早朝死亡などの予測困難な結果（薬力学変動）につながる可能性がある。例えば、ワクシニアウイルスに基づく P e x a - v e c の場合、フェーズ 1 臨床試験では、一部の患者は腫瘍溶解性ウイルス療法から 1 カ月以内に早期に死亡し、これは持続的な全身炎症応答及び主要臓器機能障害と関連付けられた。さらに、腫瘍溶解性ウイルス処置の後に観察される一時的な風邪症状（高熱）及び低血圧は、腫瘍溶解性ウイルス療法の後の最も頻繁な有害事象である。

## 【 0 0 0 5 】

したがって、腫瘍溶解性ウイルスの治療効果を増強するために、がん細胞、患者の免疫状態及び腫瘍溶解性ウイルスの間の相互作用を理解することが必要であり、この理解に基づいて、腫瘍溶解性ウイルスの臨床有効性を増加させることが可能な技術の研究の必要性がある。

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 6 】

したがって、腫瘍溶解性ウイルスとして使用するワクシニアウイルスの抗がん効果を増強するための研究を実行した結果として、本発明者らは、がんを有する個体にワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素が同時投与される場合に、ワクシニアウイルスだけが投与される従来の場合と比較して、安全な使用を確実にするために顕著に減少した全身炎症応答が得られることを見出した。さらに、本発明者らは、ワクシニアウイルスが全身投与されるときにヒドロキシ尿素が同時投与される場合、優れたがん細胞特異的選択性及び増殖能力が得られることを見出した。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 7 】

上記の目的を達成するために、本発明の一態様では、活性成分としてワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む、がんを処置するための医薬組成物が提供される。

## 【 0 0 0 8 】

本発明の別の態様では、がんを処置するための方法であって、がんを有する個体にワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を投与するステップを含む方法が提供される。

## 【 0 0 0 9 】

本発明のさらに別の態様では、がんの予防又は処置のためのワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む組成物の使用が提供される。

## 【 0 0 1 0 】

本発明のさらに別の態様では、がんを予防又は処置するための医薬の製造のための、ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む組成物の使用が提供される。

## 【 0 0 1 1 】

本発明のさらに別の態様では、活性成分としてヒドロキシ尿素を含む抗がんアジュバントが提供される。

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 1 2 】

活性成分としてワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む、本発明のがんを処置するための医薬組成物は、ワクシニアウイルスだけが投与される従来の場合と比較して優れた抗がん効果及び安全性を有する。したがって、活性成分としてワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む、本発明の医薬組成物は、がんの処置のために効果的に使用することができる。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 マウス腎臓がん細胞移植マウス ( R e n c a ) に、野生型ワクシニアウイルス (

10

20

30

40

50

Western Reserve株ワクシニアウイルス、WR)及びヒドロキシ尿素(HU)を投与し、その後0、3、7、10及び14日目に腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図2】マウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)に、野生型ワクシニアウイルス(WR)及びHUを投与し、その後0、3、7、10及び14日目に体重を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図3】マウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)に、WRからTK遺伝子を欠失させて得られた組換えワクシニアウイルス(WR VV<sup>t k-</sup>)及びHU(60mg/kg)を投与し、その後0、3、7、10、14、17及び21日目に腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

10

【図4】マウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)に、組換えワクシニアウイルス(WR VV<sup>t k-</sup>)及びHU(30mg/kg)を投与し、その後0、3、7、10及び14日目に腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図5】マウス黒色腫移植マウス(B16F10)に、WRからTK遺伝子及びワクシニアウイルス増殖因子(VGF)遺伝子を同時に欠失させて得られた組換えワクシニアウイルス(VV<sub>DD</sub>)及びHUを投与した1日前、並びにそれから4及び7日目に腫瘍体積を測定して得られた結果を例示する図である。

【図6】ヒト結腸直腸がん細胞(CT-26)移植マウスに組換えワクシニアウイルス(WOTS-418)及びHUを投与し、その後0、5、10、12及び15日目に腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

20

【図7】ヒト肺がん細胞(NCI-H460)移植マウスに組換えワクシニアウイルス(WOTS-418)及びHUを投与し、その後生存率を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図8】マウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)に組換えワクシニアウイルス(VV<sup>t k-</sup>)及びヒト顆粒球コロニー刺激因子(rhG-CSF)又はHUを投与し、その後マウスで腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図9】組換えワクシニアウイルス(VV<sup>t k-</sup>)及びヒト顆粒球コロニー刺激因子(rhG-CSF)又はHUを投与したマウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)からの脾臓のリンパ球を単離し、リンパ球を新規のマウスに投与し、その後この新規のマウスで腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

30

【図10】マウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)に組換えワクシニアウイルス(OVS-412)及びHUを投与し、その後マウスで腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図11】組換えワクシニアウイルス(Wyeth VV<sup>t k-</sup>)及びHUを投与したマウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)からTリンパ球を単離し、Tリンパ球を新規のマウスに投与し、その後この新規のマウスで腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図12】組換えワクシニアウイルス(Wyeth VV<sup>t k-</sup>)及びHUを投与したマウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)から脾細胞を単離し、脾細胞を新規のマウスに投与し、その後この新規のマウスで腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

40

【図13】マウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)に組換えワクシニアウイルス(OVS-412)及びHUを投与し、その後22日目に腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図14】マウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)に組換えワクシニアウイルス(OVS-412)及びHUを投与し、その後脾臓組織におけるCD4+T細胞又はCD8+T細胞の増殖を観察することによって得られた結果を例示する図である。

【図15】マウス乳がん細胞移植マウス(4T1)に組換えワクシニアウイルス(OVS-412)及びHUを投与し、その後血液及び脾臓組織におけるCD4+T細胞又はCD8+T細胞の増殖を観察することによって得られた結果を例示する図である。

50

【図16】マウス乳がん細胞移植マウス(4T1)の左腫瘍に組換えワクシニアウイルス(WR VV<sup>tk-</sup>)及びHUを投与し、その後左腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図17】マウス乳がん細胞移植マウス(4T1)の左腫瘍に組換えワクシニアウイルス(WR VV<sup>tk-</sup>)及びHUを投与し、その後右腫瘍体積を測定することによって得られた結果を例示する図である。

【図18】マウス腎臓がん細胞移植マウス(Renca)に組換えワクシニアウイルス(WR VV<sup>tk-</sup>)及びHUを投与し、その後マウス腫瘍組織における組換えワクシニアウイルスの分布を特定するために22日目に染色を実行することによって得られた結果を例示する図である。

【図19】正常マウスに野生型ワクシニアウイルス(WR)か、又は野生型ワクシニアウイルス(WR)とHUを投与し、その後肝臓及び腎臓組織における野生型ワクシニアウイルスの分布を特定することによって得られた結果を例示する図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

[発明を実施するための最良の形態]

以後、本発明を具体的に記載する。

【0015】

本発明の一態様では、活性成分としてワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む、がんを予防又は処置するための医薬組成物が提供される。

【0016】

医薬組成物に含まれるワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素は、同時に、逐次的に又は逆順に併用投与することができる。具体的には、ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素は同時に投与することができる。さらに、ヒドロキシ尿素を最初に、その後ワクシニアウイルスを投与することができる。さらに、ワクシニアウイルスを最初に、その後ヒドロキシ尿素を投与することができる。さらに、ヒドロキシ尿素を最初に、その後ワクシニアウイルスを投与することができ、ヒドロキシ尿素を再び投与することができる。

【0017】

ワクシニアウイルスは、限定されずに、Western Reserve(WR)、New Yorkワクシニアウイルス(NYVAC)、Wyeth(The New York City Board of Health;NYCBOH)、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、International Health Division-J(IHD-J)又はInternational Health Division-White(IHD-W)ワクシニアウイルス株に属することができる。本発明の一実施形態では、Western Reserve株ワクシニアウイルス及びWyeth株ワクシニアウイルスが使用された。

【0018】

ワクシニアウイルスは野生型ワクシニアウイルス又は組換えワクシニアウイルスであってよい。具体的には、組換えワクシニアウイルスは、野生型ワクシニアウイルスから遺伝子を欠失させるか又は野生型ワクシニアウイルスに外来遺伝子を挿入することによって得ることができる。ここで、野生型ワクシニアウイルスの遺伝子の中で、チミジンキナーゼ(TK)、ワクシニア増殖因子(VGF)、WR53.5、F13.5L、F14.5、A56R、B18R又はその組合せからなる群から選択されるいずれか1つをコードする、ウイルス病原性に関する遺伝子を欠失させることができる。

【0019】

さらに、挿入される外来遺伝子は、免疫を促進し、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)、変異したHSV-TK、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、シトシンデアミナーゼ(CD)、カルボキシルエステラーゼ1型、カルボキシルエステラーゼ2型、インターフェロ

10

20

30

40

50

ンベータ (INF - )、ソマトスタチン受容体 2 及びその組合せからなる群から選択されるいずれか 1 つをコードする遺伝子であってよい。

【0020】

具体的には、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve (WR)、New York ワクシニアウイルス (NYVAC)、Wyeth (The New York City Board of Health; NYCBOH)、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、International Health Division - J (IHD - J) 又は International Health Division - White (IHD - W) ワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスから TK 遺伝子を欠失させることによって得ることができる。本発明の一実施形態では、Western Reserve 株ワクシニアウイルスから TK 遺伝子を欠失させることによって得られた組換えワクシニアウイルスを使用し、このウイルスは「WR VV tk - 」と命名した。さらに本発明の一実施形態では、Wyeth 株ワクシニアウイルスから TK 遺伝子を欠失させることによって得られた組換えワクシニアウイルスを使用し、このウイルスは「Wyeth VV tk - 」と命名した。

10

【0021】

さらに、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、IHD - J 又は IHD - W ワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスから TK 遺伝子及び VGF 遺伝子を欠失させることによって得ることができる。本発明の一実施形態では、Western Reserve 株ワクシニアウイルスから TK 遺伝子及び VGF 遺伝子を欠失させることによって得られた組換えワクシニアウイルスを使用し、このウイルスは「VV\_DD」と命名した。

20

【0022】

さらに、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、IHD - J 又は IHD - W ワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスから TK 遺伝子を欠失させ、そこに HSV - TK 遺伝子を挿入することによって得ることができる。

30

【0023】

さらに、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、IHD - J 又は IHD - W ワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスから TK 遺伝子を欠失させ、そこに変異した HSV - TK 遺伝子を挿入することによって得ることができる。本発明の一実施形態では、Wyeth 株ワクシニアウイルスから TK 遺伝子を欠失させ、欠失位置に配列番号 1 の HSV - TK 断片 (1 ~ 330 aa) をコードする遺伝子を挿入することによって得られた組換えワクシニアウイルスを使用し、このウイルスは「OTS - 412」と命名した。さらに、本発明の一実施形態では、Western Reserve 株ワクシニアウイルスから TK 遺伝子を欠失させ、欠失位置に HSV - TK 遺伝子の配列番号 2 の HSV - TK バリエーションをコードする遺伝子を挿入することによって得られた組換えワクシニアウイルスを使用し、このウイルスは「WOTS - 418」と命名した。

40

【0024】

さらに、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、IHD - J 又は IHD - W ワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスから TK 遺伝子を欠失させ、そこに GM - CSF 遺伝子を挿入することによって得ることができる。

【0025】

50

さらに、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、IHD-J又はIHD-Wワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスからTK遺伝子を欠失させ、そこにC-CSF遺伝子を挿入することによって得ることができる。

【0026】

さらに、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、IHD-J又はIHD-Wワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスからTK遺伝子を欠失させ、そこにシトシンデアミナーゼ(CD)遺伝子を挿入することによって得ることができる。

10

【0027】

さらに、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、IHD-J又はIHD-Wワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスからTK遺伝子を欠失させ、そこにソマトスタチン受容体2遺伝子を挿入することによって得ることができる。

【0028】

さらに、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、IHD-J又はIHD-Wワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスからTK遺伝子を欠失させ、そこに単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)、変異したHSV-TK、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、シトシンデアミナーゼ(CD)、又はソマトスタチン受容体2を各々コードする遺伝子からなる群から選択される任意の2つ以上の遺伝子を挿入することによって得ることができる。

20

【0029】

さらに、組換えワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、Tian Tan、USSR、Tashkent、Evans、IHD-J又はIHD-Wワクシニアウイルス株に属するワクシニアウイルスからTK遺伝子及びVGF遺伝子を欠失させ、そこに単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)、変異したHSV-TK、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、シトシンデアミナーゼ(CD)、又はソマトスタチン受容体2を各々コードする遺伝子及びその任意の組合せからなる群から選択される任意の1つの遺伝子を挿入することによって得ることができる。

30

【0030】

本明細書で使用されるように、用語「遺伝子欠失」は、遺伝子の部分的若しくは完全な欠失のために、又はそこへの外来遺伝子の挿入のために遺伝子が発現されないことを意味する。部分的欠失が遺伝子で起こる場合、遺伝子によって発現されるポリペプチドのN末端又はC末端の一部のアミノ酸が欠失してもよい。

40

【0031】

本明細書で使用されるように、用語「チミジンキナーゼ(TK)」は、チミジンキナーゼと呼ばれてヌクレオチド生合成に関与する酵素を指す。TKは、細胞及びウイルスの両方でヌクレオチド生合成のために使用される酵素である。ここで、細胞については、正常な細胞はもはや分裂せず、したがってTKはそこに存在しない；毛包細胞などの速やかに分裂する細胞であっても、TKはウイルスが利用するのに十分な量で存在しない。これらの視点から、ウイルスはその中のTK遺伝子の欠失によってTKが存在するがん細胞の存在下だけで増殖が許され、そのためがん細胞を選択的に死滅させることができる。

【0032】

50

本明細書で使用されるように、用語「ワクシニア増殖因子 (VGF)」は上皮増殖因子と配列相同性を有し、感染細胞周囲の細胞増殖を刺激するポリペプチドを指す。ワクシニアウイルスは増殖細胞でより良好に複製し、したがって *in vivo* ウイルス複製のために有利に使用することができる。腫瘍溶解性ウイルスをがん細胞だけでより特異的に増殖させるために、ウイルスはTK遺伝子の欠失に加えてVGF遺伝子の欠失をさらに受けることができる。

## 【0033】

本明細書で使用されるように、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子と呼ばれる「GM-CSF」という用語は、マクロファージ、T細胞、肥満細胞、ナチュラルキラー細胞、内皮細胞及び線維芽細胞によって分泌されるタンパク質を指す。GM-CSFは、顆粒球（好中球、好塩基球、好酸球）及び単球を産生するように幹細胞を刺激する。さらに、GM-CSFはマクロファージの数を速やかに増加させ、それによって免疫応答を誘導する。GM-CSFはヒト起源であってよく、GenBank: AAA52578.1の配列を有するタンパク質であってよい。

10

## 【0034】

本明細書で使用されるように、シトシンデアミナーゼと呼ばれる「CD」という用語は、ウラシル及びアンモニアへのシトシンの加水分解性脱アミノを触媒する酵素を指す。

## 【0035】

本明細書で使用されるように、顆粒球コロニー刺激因子と呼ばれる「G-CSF」という用語は、炎症又はエンドトキシンによる刺激の後にマクロファージ、線維芽細胞、内皮細胞などによって産生されるサイトカインを指す。G-CSFは、好中球の産生を促進する。G-CSFはヒト起源 (rhGCSF) であってよく、GenBank: AAA03056.1の配列を有するタンパク質であってよい。

20

## 【0036】

本明細書で使用されるように、用語「ソマトスタチン受容体2」は、ヒトのSSTR2遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。ソマトスタチン受容体2は主に腫瘍で発現され、ソマトスタチン受容体2を過剰発現する神経内分泌腫瘍の患者は向上した予後を示す。ソマトスタチン受容体2は、がん細胞を含む多くの細胞でアポトーシスを刺激する能力を有する。

## 【0037】

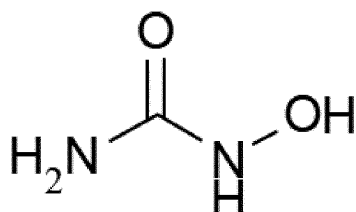
本明細書で使用されるように、用語「ヒドロキシ尿素」は、以下の式を有する化合物を指す。

30

## 【0038】

## 【化1】

(式1)



40

## 【0039】

ヒドロキシ尿素は、DNA合成を阻害する抗がん剤として知られる；しかし、その正確な作用機構は解明されていない。さらに、ヒドロキシ尿素は、ヒドロキシ尿素を含有する市販薬の形で医薬組成物に含まれてもよい。ヒドロキシ尿素を含有する市販薬の例は、ヒドロキシ尿素（登録商標）、ヒドレア (Hydrea)（登録商標）、ドロキシア (Droxia)（商標）、ミロセル (Mylocel)（商標）、シクロス (Siklos)（登録商標）及びヒドリン (Hydrine)（登録商標）カプセルを限定されずに含む

50

ことができる。ヒドロキシ尿素は経口的にとることができ、その非経口投与も可能である。

【0040】

ワクシニアウイルスの投薬量は、個体の状態及び体重、疾患の重症度、薬物のタイプ、投与の経路及び期間によって異なり、当業者が適切に選択することができる。投薬量は、患者が $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{18}$ のウイルス粒子、感染性ウイルス単位(TCID<sub>50</sub>)又はプラーク形成単位(pfu)でワクシニアウイルスを受けるようなものであってよい。具体的には、投薬量は、患者が $1 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{17}$ 又はそれ以上のウイルス粒子、感染性ウイルス単位又はプラーク形成単位でワクシニアウイルスを受けるようなものであってよく、上記の数値の間の様々な数値及び範囲がその中に含まれてもよい。好ましくは、ワクシニアウイルスは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$  pfuの用量で投与することができる。より好ましくは、ワクシニアウイルスは $1 \times 10^5$ 以上及び $1 \times 10^9$  pfu未満の用量で投与することができる。本発明の一実施形態では、ワクシニアウイルスは $1 \times 10^5$ 又は $1 \times 10^7$  pfuで投与された。

10

【0041】

さらに、ヒドロキシ尿素は $1 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 100 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、又は $10 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 90 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ の用量で投与することができる。具体的には、ヒドロキシ尿素は $10 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 90 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $15 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 80 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $20 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 70 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $25 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 65 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、又は $30 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 60 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ の用量で投与することができる。本発明の一実施形態では、ヒドロキシ尿素は $30 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 又は $60 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ で投与された。投薬量によって、ヒドロキシ尿素は分割用量によって1日につき数回投与することができる。具体的には、ヒドロキシ尿素は1日につき1～4回又は1日につき1～2回投与することができる。

20

【0042】

がんは、固形がん又は血液がんであってよい。具体的には、血液がんは、リンパ腫、急性白血病及び多発性骨髄腫からなる群から選択されるいずれか1つであってよい。固形がんは、肺がん、結腸直腸がん、前立腺がん、甲状腺がん、乳がん、脳がん、頭頸部がん、食道がん、皮膚がん、胸腺がん、胃がん、結腸がん、肝がん、卵巣がん、子宮がん、膀胱がん、直腸がん、胆嚢がん、胆道がん、膵がん及びその組合せからなる群から選択されるいずれか1つであってよい。

30

【0043】

さらに、本発明の医薬組成物は、生理的に許容される担体をさらに含むことができる。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の調製で一般的に使用される好適な賦形剤及び希釈剤をさらに含むことができる。さらに、医薬組成物は、従来の方法によって注射剤の形で製剤化することができる。

【0044】

非経口投与のための調製物として製剤化される場合、医薬組成物は、無菌水溶液、非水性溶液、懸濁液、乳剤、フリーズドライ調製物、坐薬などに製剤化することができる。非水性溶液又は懸濁液の場合、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射用エステルなどを使用することができる。坐薬の基剤として、ウイテップゾール(Witepsol)(商標)、マクロゴール、ツイーン(Tween)(商標)61、カカオ脂、ラウリン系脂肪、グリセロゼラチンなどを使用することができる。

40

【0045】

投与経路、投薬量及び投与の頻度に関して、医薬組成物は、患者の状態及び副作用の有無；並びに最適な投与経路、投薬量及び投与の頻度によって様々な方法及び量で対象に投与することができる。したがって、好適な範囲内で当業者が選択することができる。さらに

50

、医薬組成物はその治療効果が処置する疾患について知られている別の薬物若しくは生理活性物質と併用投与することができるか、又は他の薬物との併用調製物の形で製剤化することができる。

【0046】

医薬組成物是非経口的に投与することができ、そのような投与は任意の好適な方法、例えば腫瘍内、腹腔内、皮下、皮内、結節内、静脈内又は動脈内投与によって実行することができる。これらの中で、腫瘍内、腹腔内又は静脈内投与が好ましいかもしれない。他方、医薬組成物の投薬量は投与スケジュール、全投薬量及び患者の健康状態によって決定することができる。

【0047】

がんを処置するための医薬組成物は、ワクシニアウイルスの増加したがん選択性によって特徴付けることができる。

【0048】

本発明の別の態様では、活性成分としてワクシニアウイルスを含む第1の組成物、及び活性成分としてヒドロキシ尿素を含む第2の組成物を含む、がんを予防又は処置するためのキットが提供される。

【0049】

ワクシニアウイルスは、医薬組成物について上で記載される通りである。

【0050】

活性成分としてヒドロキシ尿素を含む第2の組成物は、市販薬であってよい。活性成分としてヒドロキシ尿素を含有する市販薬の例は、ヒドロキシ尿素（登録商標）、ヒドレア（登録商標）、ドロキシア（商標）、ミロセル（商標）、シクロス（登録商標）及びヒドリリン（登録商標）カプセルを含むことができる。第2の組成物は経口的にとることができ、その非経口投与も可能である。

【0051】

ワクシニアウイルスの投薬量は、個体の状態及び体重、疾患の重症度、薬物のタイプ、投与の経路及び期間によって異なり、当業者が適切に選択することができる。投薬量は、患者が  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{18}$  のウイルス粒子、感染性ウイルス単位 (TCID<sub>50</sub>) 又はプラーク形成単位 (p f u) でワクシニアウイルスを受けるようなものであってよい。具体的には、投薬量は、患者が  $1 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{17}$  又はそれ以上のウイルス粒子、感染性ウイルス単位又はプラーク形成単位でワクシニアウイルスを受けるようなものであってよく、上記の数値の間の様々な数値及び範囲がその中に含まれてもよい。好ましくは、ワクシニアウイルスは  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$  p f u の用量で投与することができる。より好ましくは、ワクシニアウイルスは  $1 \times 10^5$  以上及び  $1 \times 10^9$  p f u 未満の用量で投与することができる。本発明の一実施形態では、ワクシニアウイルスは  $1 \times 10^5$  又は  $1 \times 10^7$  p f u で投与された。

【0052】

さらに、第2の組成物は、 $1 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 100 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、又は  $10 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 90 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  の用量で投与することができる。具体的には、第2の組成物は、 $10 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 90 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $15 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 80 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $20 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 70 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $25 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 65 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  又は  $30 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日} \sim 60 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  の用量で投与することができる。本発明の一実施形態では、第2の組成物は  $30 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  又は  $60 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  で投与された。投薬量によって、第2の組成物は分割用量によって1日につき数回投与することができる。具体的には、第2の組成物は1日につき1～4回又は1日につき1～2回投与することができる。

【0053】

10

20

30

40

50

がんは、固形がん又は血液がんであってよい。具体的には、血液がんは、リンパ腫、急性白血病及び多発性骨髄腫からなる群から選択されるいずれか1つであってよい。固形がんは、肺がん、結腸直腸がん、前立腺がん、甲状腺がん、乳がん、脳がん、頭頸部がん、食道がん、皮膚がん、胸腺がん、胃がん、結腸がん、肝がん、卵巣がん、子宮がん、膀胱がん、直腸がん、胆嚢がん、胆道がん、膵がん及びその組合せからなる群から選択されるいずれか1つであってよい。

【0054】

第1の組成物及び第2の組成物は、生理的に許容される担体をさらに含むことができる。さらに、本発明のキットに含まれる組成物は、医薬組成物の調製で一般的に使用される好適な賦形剤及び希釈剤をさらに含むことができる。さらに、組成物は、従来の方法によ

10

【0055】

非経口投与のための調製物として製剤化される場合、第1の組成物及び第2の組成物は、無菌水溶液、非水性溶液、懸濁液、乳剤、フリーズドライ調製物、坐薬などに製剤化することができる。非水性溶液又は懸濁液の場合、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射用エステルなどを使用することができる。坐薬の基剤として、ウィテップゾール（商標）、マクロゴール、ツイーン（商標）61、カカオ脂、ラウリン系脂肪、グリセロゼラチンなどを使用することができる。

【0056】

投与経路、投薬量及び投与頻度に関して、第1の組成物及び第2の組成物は、患者の状態及び副作用の有無；並びに最適な投与経路、投薬量及び投与頻度によって様々な方法及び量で対象に投与することができ、したがって、好適な範囲内で当業者が選択することができる。さらに、医薬組成物はその治療効果が処置する疾患について知られている別の薬物又は生理活性物質と併用投与することができるか、又は他の薬物との併用調製物の形で製剤化することができる。

20

【0057】

第2の組成物は、経口的に又は非経口的に投与することができる。具体的には、第2の組成物是非経口的に投与することができ、そのような投与は腹腔内、動脈内又は静脈内投与によって実行することができる。

30

【0058】

第1の組成物是非経口的に投与することができ、そのような投与は任意の好適な方法、例えば腫瘍内、腹腔内、皮下、皮内、結節内、動脈内又は静脈内投与によって実行することができる。これらの中で、腫瘍内、腹腔内又は静脈内投与が好ましいかもしれない。他方、第1の組成物及び第2の組成物の投薬量は投与スケジュール、全投薬量及び患者の健康状態によって決定することができる。

【0059】

さらに、第1の組成物は1～10回又は2～5回投与することができ、個体へのその投与は7～30日の間隔で実行することができる。具体的には、第1の組成物は、7日、14日、21日又は30日の間隔で投与することができる。

40

【0060】

第2の組成物は、第1の組成物の投与の前後に投与することができる。具体的には、第2の組成物は、第1の組成物の投与の3～5日前から開始して1日に1回連続的に投与することができ、第1の組成物の投与から24時間以内又はその24時間後に開始して9～28日間、1日に1回連続的に投与することができる。本発明の一実施形態では、第2の組成物は、第1の組成物の投与の1～3日前から開始して1日に1回連続的に投与することができ、第1の組成物の投与の後に13日間、17日間、18日間又は28日間、1日に1回投与することができる。

【0061】

本発明のさらに別の態様では、がんを処置するための方法であって、がんを有する個体

50

にワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を投与するステップを含む方法が提供される。

【0062】

ワクシニアウイルスは、Western Reserve、NYVAC、Wyeth、LC16m8、Lister、Copenhagen、TianTan、USSR、Tashkent、Evans、IHD-J又はIHD-Wワクシニアウイルス株に限定されずに属することができる。

【0063】

ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素は、同時に、逐次的に又は逆順に併用投与することができる。具体的には、ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素は同時に投与することができる。さらに、ヒドロキシ尿素を最初に、その後ワクシニアウイルスを投与することができる。さらに、ワクシニアウイルスを最初に、その後ヒドロキシ尿素を投与することができる。さらに、ヒドロキシ尿素を最初に、その後ワクシニアウイルスを投与ことができ、その後ヒドロキシ尿素を再び投与することができる。

10

【0064】

ワクシニアウイルスの投薬量は、個体の状態及び体重、疾患の重症度、薬物のタイプ、投与の経路及び期間によって異なり、当業者が適切に選択することができる。投薬量は、患者が $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{18}$ のウイルス粒子、感染性ウイルス単位(TCID<sub>50</sub>)又はプラーク形成単位(pfu)でワクシニアウイルスを受けるとよい。具体的には、投薬量は、患者が $1 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{17}$ 又はそれ以上のウイルス粒子、感染性ウイルス単位又はプラーク形成単位でワクシニアウイルスを受けるとよく、上記の数値の間の様々な数値及び範囲がその中に含まれてもよい。好ましくは、ワクシニアウイルスは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$  pfuの用量で投与することができる。より好ましくは、ワクシニアウイルスは $1 \times 10^5$ 以上及び $1 \times 10^9$  pfu未満の用量で投与することができる。本発明の一実施形態では、ワクシニアウイルスは $1 \times 10^5$ 又は $1 \times 10^7$  pfuで投与された。

20

【0065】

さらに、ヒドロキシ尿素は $1 \text{ mg/kg/day} \sim 100 \text{ mg/kg/day}$ 、又は $10 \text{ mg/kg/day} \sim 90 \text{ mg/kg/day}$ の用量で投与することができる。具体的には、ヒドロキシ尿素は $10 \text{ mg/kg/day} \sim 90 \text{ mg/kg/day}$ 、 $15 \text{ mg/kg/day} \sim 80 \text{ mg/kg/day}$ 、 $20 \text{ mg/kg/day} \sim 70 \text{ mg/kg/day}$ 、 $25 \text{ mg/kg/day} \sim 65 \text{ mg/kg/day}$ 又は $30 \text{ mg/kg/day} \sim 60 \text{ mg/kg/day}$ の用量で投与することができる。本発明の一実施形態では、ヒドロキシ尿素は $30 \text{ mg/kg/day}$ 又は $60 \text{ mg/kg/day}$ で投与された。投薬量によって、ヒドロキシ尿素は分割用量によって1日につき数回投与することができる。具体的には、ヒドロキシ尿素は1日につき1~4回又は1日につき1~2回投与することができる。

30

【0066】

さらに、ワクシニアウイルスは1~10回又は2~5回投与することができ、7~30日の間隔で個体に投与することができる。具体的には、ワクシニアウイルスは、7日、14日、21日又は30日の間隔で投与することができる。

40

【0067】

ヒドロキシ尿素は、ワクシニアウイルスの投与の前、その間又は後に投与することができる。具体的には、ヒドロキシ尿素は、ワクシニアウイルスの投与の前後に投与することができる。ヒドロキシ尿素は、ワクシニアウイルスの投与の3~5日前から開始して1日に1回連続的に投与することができ、ワクシニアウイルスの投与から24時間後に開始して9~28日間、1日に1回連続的に投与することができる。本発明の一実施形態では、ヒドロキシ尿素は、ワクシニアウイルスの投与の1~3日前から開始して1日に1回連続的に投与することができ、ワクシニアウイルスの投与の後に13日間、17日間、18日

50

間又は28日間、1日に1回投与することができる。

【0068】

がんは、固形がん又は血液がんであってよい。具体的には、血液がんは、リンパ腫、急性白血病及び多発性骨髄腫からなる群から選択されるいずれか1つであってよい。固形がんは、肺がん、結腸直腸がん、前立腺がん、甲状腺がん、乳がん、脳がん、頭頸部がん、食道がん、皮膚がん、胸腺がん、胃がん、結腸がん、肝がん、卵巣がん、子宮がん、膀胱がん、直腸がん、胆嚢がん、胆道がん、膵がん及びその組合せからなる群から選択されるいずれか1つであってよい。

【0069】

ヒドロキシ尿素は、経口的に又は非経口的に投与することができる。具体的には、ヒドロキシ尿素は非経口的に投与することができ、そのような投与は腹腔内、動脈内又は静脈内投与によって実行することができる。

10

【0070】

ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素は非経口投与することができ、そのような投与は任意の好適な方法、例えば腫瘍内、腹腔内、皮下、皮内、結節内、静脈内又は動脈内投与によって実行することができる。これらの中で、腫瘍内、腹腔内又は静脈内投与が好ましいかもしれない。他方、ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素の投薬量は投与スケジュール、全投薬量及び患者の健康状態によって決定することができる。

【0071】

本明細書で使用されるように、用語「個体」は、本発明の医薬組成物を投与することによって緩和、抑制又は処置することができる状態の疾患を有するか又は患っている人を指す。

20

【0072】

本明細書で使用されるように、用語「投与」は、適当な方法によって物質の有効量を個体に導入することを意味し、ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素の投与は、物質が標的組織に到達することを可能にする一般的な経路を通して実行することができる。

【0073】

さらに、ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素は、その治療効果が処置する疾患について知られている別の薬物又は生理活性物質と併用投与することができるか、又は他の薬物との併用調製物の形で製剤化することができる。

30

【0074】

本発明のさらに別の態様では、がんの予防又は処置のためのワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む組成物の使用が提供される。

【0075】

本発明のさらに別の態様では、がんを予防又は処置するための医薬の製造のための、ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を含む組成物の使用が提供される。

【0076】

本発明のさらに別の態様では、活性成分としてヒドロキシ尿素を含む抗がんアジュバントが提供される。ここで、ヒドロキシ尿素は、医薬組成物について上で記載される通りである。さらに、抗がんアジュバントは、活性成分としてワクシニアウイルスを含む抗がん剤のための抗がんアジュバントとして使用されることを特徴とし得る。抗がんアジュバントは、ワクシニアウイルスの抗がん活性を向上させるか、増強するか、又は増加させることを特徴とし得る。抗がんアジュバントは、ワクシニアウイルスのがん選択性を増加させることを特徴とし得る。

40

【実施例】

【0077】

[発明の形態]

以降、本発明は実施例によりさらに詳細に記載される。しかし、以下の実施例は例示だけが目的であり、本発明の範囲はそれに限定されない。

【0078】

50

調製実施例 1。組換えワクシニアウイルス (Wyeth VV<sup>tk-</sup>、WR VV<sup>tk-</sup>) の生成

調製実施例 1.1。シャトルプラスミドベクターの構築

チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子が欠失している組換えワクシニアウイルスを生成するために、野生型ワクシニアウイルス、すなわち、Wyeth株 (NYC Department of Health) 及びWestern Reserve株を、アメリカ基準株保存機構 (ATCC) から購入した。組換えのために、野生型ワクシニアウイルスのTK領域を、ホタルルシフェラーゼリポーター (p7.5プロモーター) 遺伝子又はGFP遺伝子を含むシャトルプラスミドベクターを使用した置換にかけた。

【0079】

調製実施例 1.2。組換えワクシニアウイルスの生成

組換えウイルスを得るために、HeLa細胞 (ATCC) を1ウェルにつき  $4 \times 10^5$  細胞で6ウェルプレートに播種し、次に、10%ウシ胎児血清を含むEMEM培地で培養を実行した。その後、野生型ワクシニアウイルスによる処理を0.05のMOIで行った。2時間後に、培地を2%ウシ胎児血清を含むEMEM培地で置き換え、次に、Xfect (商標) ポリマー (Clonetech 631317、USA) を使用して、調製実施例 1.1で構築されて線状化された4  $\mu$ gのシャトルプラスミドベクターで細胞をトランスフェクトした。培養は、4時間実行した。その後、培地を2%ウシ胎児血清を含むEMEM培地で置き換え、その後、培養を72時間さらに実行した。最後に、感染細胞を収集し、次に凍結解凍を3回繰り返した。その後、細胞を超音波処理によって溶解し、スクロースクッション方法を使用して遊離の組換えワクシニアウイルスを得、それらをWyeth VV<sup>tk-</sup>又はWR VV<sup>tk-</sup>と命名した。

【0080】

調製実施例 2。組換えワクシニアウイルス (OTS-412) の生成

チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子が欠失し、変異した単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスを生成するために、Wyeth株野生型ワクシニアウイルスのTK領域を、配列番号1の合成された変異した1型HSV-TK遺伝子 (pSE/Lプロモーター) 及びホタルルシフェラーゼリポーター (p7.5プロモーター) 遺伝子を組み換えたpUC57amp<sup>+</sup>プラスミド (Genewiz、USA) をシャトルベクターとして使用した置換にかけた。上で構築したシャトルベクターを使用して、組換えワクシニアウイルスを調製実施例 1.2と同様に得、このウイルスをOTS-412と命名した。

【0081】

調製実施例 3。組換えワクシニアウイルス (WOTS-418) の生成

チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子が欠失し、変異した単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスを生成するために、Western Reserve株野生型ワクシニアウイルスのTK領域を、配列番号2の合成された変異した1型HSV-TK遺伝子 (pSE/Lプロモーター) 及びホタルルシフェラーゼリポーター (p7.5プロモーター) 遺伝子を組み換えたpUC57amp<sup>+</sup>プラスミド (Genewiz、USA) をシャトルベクターとして使用した置換にかけた。上で構築したシャトルベクターを使用して、組換えワクシニアウイルスを調製実施例 1.2と同様に得、このウイルスをWOTS-418と命名した。

【0082】

組換えワクシニアウイルス (WR VV<sub>DD</sub>) の生成

チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子及びワクシニア増殖因子 (VGF) 遺伝子が欠失している組換えワクシニアウイルスを生成するために、Western Reserve株野生型ワクシニアウイルスのTK領域を、増強した緑色蛍光性タンパク質 (EGFP) 遺伝子を含むシャトルプラスミドを使用した置換にかけ、同じウイルスのVGF遺伝子領域を、lacZ遺伝子を含むシャトルプラスミドを使用した置換にかけた。EGFP遺伝子を含むシャトルプラスミド及びlacZ遺伝子を含むシャトルプラスミド

10

20

30

40

50

を使用して、組換えワクシニアウイルスを調製実施例 1 . 2 と同様に得、このウイルスを V V \_ D D と命名した。

【 0 0 8 3 】

実験的実施例 1 . マウス腎臓がん細胞移植マウス：R e n c a ( I ) における野生型ワクシニアウイルス ( W R ) 及びヒドロキシ尿素のがん治療効果の特定

実験的実施例 1 . 1 . マウス腎臓がん細胞移植マウスの生成及び薬物投与

O R I E N T B I O ( B u s a n , K o r e a ) から購入した B a l b / c マウス ( 雌、10 週齢 ) を 2 日間の順化にかけ、次に R e n c a がん細胞株 ( K o r e a C e l l L i n e B a n k ) を皮下に  $5 \times 10^6$  細胞で移植した。それが  $50 \text{ mm}^3 \sim 80 \text{ mm}^3$  に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後野生型ワクシニアウイルスの投与を開始した。他方、W e s t e r n R e s e r v e 株野生型ワクシニアウイルス ( W R ) は、同種移植モデルにおいて W y e t h 株野生型ワクシニアウイルスより強力な増殖能力を有する。

10

【 0 0 8 4 】

生成されたマウス腎臓がん細胞移植マウスは、3 群 (  $n = 6$  ) に分割した。食塩水の腹腔内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、野生型ワクシニアウイルス ( W R 、  $1 \times 10^5 \text{ p f u}$  ) の投与を受ける群は陽性対照群として設定した。さらに、野生型ワクシニアウイルス ( W R 、  $1 \times 10^5 \text{ p f u}$  ) 及びヒドロキシ尿素 (  $30 \text{ mg / kg}$  ) の同時投与を受ける群は、実験群として設定した。野生型ワクシニアウイルスは腫瘍内に 1 回投与し；ヒドロキシ尿素は、野生型ワクシニアウイルスの投与日を除いて野生型ワクシニアウイルスの投与の 1 日前から開始して、投与から 14 日目にかけて、腹腔内に 1 週につき 5 回投与した。

20

【 0 0 8 5 】

実験的実施例 1 . 2 . 腫瘍体積の変化の検査

腫瘍体積は、実験的実施例 1 . 1 の各群のマウスへの薬物投与の 0、3、7、10 及び 14 日目に測定した。その結果、陽性対照群のマウスの腫瘍体積は陰性対照群と比較して抑制され、実験群のマウスの腫瘍体積は著しく抑制されることが特定された ( 図 1 ) 。

実験的実施例 1 . 3 . 体重変化の検査

体重は、実験的実施例 1 . 1 の陰性対照群、陽性対照群及び実験群のマウスへの各薬物投与の 3、7、10 及び 14 日目に測定した。その結果、全 3 群で有意な体重減少はなかった ( 図 2 ) 。

30

【 0 0 8 6 】

実験的実施例 2 . マウス腎臓がん細胞移植マウス：R e n c a ( I I ) における組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup> ) 及びヒドロキシ尿素のがん治療効果の特定

実験的実施例 2 . 1 . マウス腎臓がん細胞移植マウスの生成及び薬物投与

O R I E N T B I O ( B u s a n , K o r e a ) から購入した B a l b / c マウス ( 雌、8 週齢 ) を 1 週間の順化にかけ、次に R e n c a がん細胞株 ( K o r e a C e l l L i n e B a n k ) を  $5 \times 10^6$  細胞で同種移植した。それが  $100 \text{ mm}^3 \sim 150 \text{ mm}^3$  に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後組換えワクシニアウイルスの投与を開始した。他方、W e s t e r n R e s e r v e 株由来組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup> ) は、同種移植モデルにおいて W y e t h 株由来組換えワクシニアウイルスより強力な増殖能力を有する。

40

【 0 0 8 7 】

生成されたマウス腎臓がん細胞移植マウスは、3 群 (  $n = 8$  ) に分割した。食塩水の腹腔内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup> 、  $1 \times 10^7 \text{ p f u}$  ) の投与を受ける群は陽性対照群として設定した。さらに、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素 (  $60 \text{ mg / kg}$  ) の同時投与を受ける群は、実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは腫瘍内に 2 回投与し；ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与日を除いて、組換えワクシニアウイルスの投与の 1 日前から開始して、投与から 21 日目にかけて、腹腔内に 1 週につき 6 回投与した。

【 0 0 8 8 】

50

### 実験的実施例 2 . 2 . 腫瘍体積の変化の検査

腫瘍体積は、実験的実施例 2 . 1 の各群のマウスへの薬物投与から 0、3、7、10、14、17 及び 21 日目に測定した。その結果、実験群のマウスの腫瘍体積は陽性対照群のマウスの腫瘍体積と比較して有意に抑制されることが特定された ( 図 3 ) 。

【 0 0 8 9 】

実験的実施例 3 . マウス腎臓がん細胞移植マウス : R e n c a ( I I I ) における組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup> ) 及びヒドロキシ尿素のがん治療効果の特定

O R I E N T B I O ( B u s a n , K o r e a ) から購入した B a l b / c マウス ( 雌、10 週齢 ) を 2 日間の順化にかけ、次に R e n c a がん細胞株 ( K o r e a C e l l L i n e B a n k ) を左大腿の皮下に  $5 \times 10^6$  細胞で移植した。それが  $50 \text{ mm}^3 \sim 150 \text{ mm}^3$  に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後組換えワクシニアウイルスの投与を開始した。

10

【 0 0 9 0 】

生成されたマウス腎臓がん細胞移植マウスは、3 群 (  $n = 6$  ) に分割した。食塩水の腹腔内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^5$  p f u ) の投与を受ける群は陽性対照群として設定した。さらに、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素 (  $30 \text{ mg} / \text{kg}$  ) の同時投与を受ける群は、実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは腫瘍内に 1 回投与し ; ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与日を除いて、組換えワクシニアウイルスの投与の 1 日前から開始して、投与から 14 日目にかけて、腹腔内に 1 週につき 6 回投与した。

20

【 0 0 9 1 】

腫瘍体積は、各群のマウスへの薬物投与から 0、3、7、10 及び 14 日目に測定した。その結果、実験群のマウスの腫瘍体積は陽性対照群のマウスの腫瘍体積と比較して成長が約 25 % 抑制されることが特定された ( 図 4 ) 。

【 0 0 9 2 】

実験的実施例 4 . マウス黒色腫移植マウス : B 1 6 F 1 0 における組換えワクシニアウイルス ( W R V V \_ D D ) 及びヒドロキシ尿素のがん治療効果の特定

K O A T E C H ( K o r e a ) から購入した C 5 7 B L / 6 マウス ( 雌、7 週齢 ) を 2 日間の順化にかけ、次にマウス黒色腫がん細胞株 ( A T C C、B 1 6 F 1 0 ) を  $5 \times 10^5$  細胞で皮下に移植した。それが  $50 \text{ mm}^3 \sim 100 \text{ mm}^3$  に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後組換えワクシニアウイルス ( W R V V \_ D D ) の投与を開始した。組換えワクシニアウイルス ( W R V V \_ D D ) は、W e s t e r n R e s e r v e 株ワクシニアウイルスのチミジンキナーゼ ( T K ) 及びワクシニア増殖因子 ( V G F ) 領域の二重欠失を実行して得られ、同種移植モデルにおいて限定的な増殖能力を有する。

30

【 0 0 9 3 】

生成されたマウス黒色腫移植マウスは、4 群 (  $n = 6$  ) に分割した。食塩水の腹腔内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、ヒドロキシ尿素 (  $30 \text{ mg} / \text{kg}$  ) 又は組換えワクシニアウイルス ( V V \_ D D、 $1 \times 10^6$  p f u ) の投与を単独で受ける群は陽性対照群として設定した。さらに、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素 (  $30 \text{ mg} / \text{kg}$  ) の同時投与を受ける群は、実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは 0 及び 5 日目に腹腔内に投与した ; ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与日を除いて、組換えワクシニアウイルスの投与の 1 日前から開始して、投与から 15 日目にかけて、腹腔内に 1 週につき 6 回投与した。

40

【 0 0 9 4 】

腫瘍体積は、各群のマウスへの薬物投与の 1 日前と投与の 4 及び 7 日目に測定した。その結果、実験群のマウスの腫瘍体積は陽性対照群のマウスの腫瘍体積と比較して有意に抑制されることが特定された ( 図 5 ) 。これらの結果から、組換えワクシニアウイルス ( V V \_ D D ) 及びヒドロキシ尿素が同時投与される場合に相乗効果が観察されることが特定された。

【 0 0 9 5 】

50

実験的実施例 5。ヒト肺がん細胞株移植マウス：NCI - H 4 6 0 における組換えワクシニアウイルス (WOTS - 4 1 8) 及びヒドロキシ尿素のがん治療効果の特定

ORIENT BIO (Busan, Korea) から購入した Balb / c nu / nu マウス (雌、7 週齢) を 2 日間の順化にかけ、次に NCI - H 4 6 0 ヒト肺がん細胞株 (Korea Cell Line Bank) を皮下に  $5 \times 10^6$  細胞で異種移植した。それが  $100 \text{ mm}^3 \sim 150 \text{ mm}^3$  に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後組換えワクシニアウイルス (WOTS - 4 1 8) の投与を開始した。他方、Western Reserve 株由来組換えワクシニアウイルス (WOTS - 4 1 8) は、ヒト肺がん細胞株 (NCI - H 4 6 0) 異種移植マウスにおいて増殖能力を有する。

【0096】

生成されたヒト肺がん細胞株移植マウスは、2 群 ( $n = 4$ ) に分割した。食塩水の腹腔内投与を受ける群は対照群として設定し、組換えワクシニアウイルス (WOTS - 4 1 8、 $1 \times 10^7 \text{ pfu}$ ) 及びヒドロキシ尿素 ( $30 \text{ mg / kg}$ ) の同時投与を受ける群は、実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは腹腔内に 1 回投与した；ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与日を除いて組換えワクシニアウイルスの投与の 1 日前から開始して投与から 15 日目にかけて、腹腔内に 1 週につき 6 回投与した。

【0097】

腫瘍体積は、各群のマウスへの薬物投与の 0、5、10、12 及び 15 日目に測定した。その結果、実験群のマウスの腫瘍体積は対照群と比較して約 40% 抑制されることが特定された (図 6)。

【0098】

実験的実施例 6。マウス結腸直腸がん細胞移植マウス：CT - 2 6 における組換えワクシニアウイルス (WOTS - 4 1 8) 及びヒドロキシ尿素の生存分析

ORIENT BIO (Busan, Korea) から購入した Balb / c マウス (雌、7 週齢) を 2 日間の順化にかけ、次にマウス結腸直腸がん細胞株 (CT - 2 6、Korea Cell Line Bank) を皮下に  $5 \times 10^6$  細胞で移植した。7 日後に、組換えワクシニアウイルス (WOTS - 4 1 8) 及びヒドロキシ尿素の投与を開始した。他方、Western Reserve 株由来組換えワクシニアウイルス (WOTS - 4 1 8) は、同種移植モデルにおいて Wyeth 株由来組換えワクシニアウイルスより強力な増殖能力を有する。

【0099】

生成されたマウス結腸直腸がん細胞株移植マウスは、2 群 ( $n = 12$ ) に、すなわち、組換えワクシニアウイルス (WOTS - 4 1 8、 $1 \times 10^7 \text{ pfu}$ ) の腹腔内投与を受ける群、並びに組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素 ( $30 \text{ mg / kg}$ ) の同時投与を受ける群に分割した。組換えワクシニアウイルスは腹腔内に 1 回投与した；ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与の 1 日目から開始して腹腔内に連続 5 回投与した。

【0100】

それぞれの群のマウスの生存曲線を分析した。その結果、組換えワクシニアウイルスの投与を単独で受けた群では、全てのマウスは投与の 25 日後に死んだ；しかし、ヒドロキシ尿素及び組換えワクシニアウイルスの同時投与を受けたマウスの 30% 以上は、55 日間以上生存した (図 7)。これらの結果から、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素が同時投与される場合に、組換えワクシニアウイルスだけが投与される場合と比較して増強された安全性が得られることが特定された。

【0101】

実験的実施例 7。マウス腎臓がん細胞移植マウス：Renca (IV) における組換えワクシニアウイルス (Wyeth VV<sup>tk</sup>-) 及びヒドロキシ尿素のがん治療効果の特定

実験的実施例 7. 1。マウス腎臓がん細胞移植マウスの生成及び薬物投与

ORIENT BIO (Busan, Korea) から購入した Balb / c マウス (雌、7 週齢) を 2 日間の順化にかけ、次に Renca がん細胞株 (Korea Cell

10

20

30

40

50

Line Bank)を $5 \times 10^6$ 細胞で同種移植した。それが $100 \text{ mm}^3 \sim 150 \text{ mm}^3$ に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後組換えワクシニアウイルスの投与を開始した。

#### 【0102】

生成されたマウス腎臓がん細胞移植マウスは、4群 ( $n = 4$ ) に分割した。食塩水の腫瘍内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、組換えワクシニアウイルス (W y e t h V V <sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^7$  p f u) の投与を受ける群は陽性対照群として設定した。さらに、組換えワクシニアウイルス (W y e t h V V <sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^7$  p f u) 及び組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子 (r h G - C S F、 $75 \mu\text{g} / \text{kg}$ ) の同時投与を受ける群、並びに組換えウイルス (V V <sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^7$  p f u) 及びヒドロキシ尿素 ( $30 \text{ mg} / \text{kg}$ ) の投与を受ける群は、実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは腫瘍内に投与し、r h G - C S F 又はヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与の3日前から開始して 殺まで腹腔内に1週につき5回投与した。

10

#### 【0103】

実験的実施例7.2。腫瘍体積の変化の検査

実験的実施例7.1の各群のマウスは薬物投与から16日目に 殺し、腫瘍体積を測定した。その結果、陽性対照群のマウスと組換えワクシニアウイルス及びr h G - C S F の同時投与を受けた実験群のマウスは、最初の腫瘍体積と比較してほぼ10倍の増加を示した。組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素の同時投与を受けた実験群のマウスは、最初の腫瘍体積と比較してほぼ8倍の増加を示し、これは、観察された中で最も抑制された腫瘍体積であった (図8)。

20

#### 【0104】

実験的実施例7.3。抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球 (C T L) 活性化の特定

組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素が同時投与される場合に腫瘍特異的抗がん効果が得られるかどうか特定するために、実験的実施例7.1の各群のマウスを16日目に 殺し、次に脾臓中のリンパ球を各群から単離した。次に、単離したリンパ球を新規の正常マウスにそれぞれ注射した。がん移植を実行し、腫瘍体積を観察した。具体的には、1週後に、マウスにR e n c aがん細胞株 (K o r e a C e l l L i n e B a n k) を $5 \times 10^6$ 細胞で同種移植し、19日目に腫瘍体積を測定した。

#### 【0105】

その結果、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素の同時投与を受けた群のマウスから収集した脾細胞を注射したマウスで、腫瘍増殖は著しく抑制された。他方、残りの群のマウスから収集した脾細胞を注射したマウスの各々では、腫瘍増殖は有意に抑制されなかった (図9)。これらの結果から、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素の同時投与を受けた群の場合、細胞傷害性T細胞などの免疫細胞が生成されただけでなく、適応免疫も活性化されたことが特定された。

30

#### 【0106】

実験的実施例8。マウス腎臓がん細胞移植マウス：R e n c a ( V ) における組換えワクシニアウイルス (W y e t h V V <sup>t k -</sup>) 及びヒドロキシ尿素のがん治療効果の特定

実験的実施例8.1。マウス腎臓がん細胞移植マウスの生成及び薬物投与

O R I E N T B I O ( B u s a n , K o r e a ) から購入したB a l b / cマウス ( 雌、7週齢) を1週間の順化にかけ、次にR e n c aがん細胞株 (K o r e a C e l l L i n e B a n k) を $5 \times 10^6$ 細胞で同種移植した。それが $50 \text{ mm}^3 \sim 100 \text{ mm}^3$ に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後組換えワクシニアウイルスの投与を開始した。他方、W y e t h株由来組換えワクシニアウイルス (W y e t h V V <sup>t k -</sup>) は、マウス腎臓がん細胞移植マウスモデルではほとんど増殖しない。

40

#### 【0107】

生成されたマウス腎臓がん細胞移植マウスは、4群 ( $n = 4$ ) に分割した。食塩水の腫瘍内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、ヒドロキシ尿素の投与を単独で受ける群及び組換えワクシニアウイルス (W y e t h V V <sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^7$  p f u) の投与を単独で受ける群は陽性対照群として設定した。さらに、組換えワクシニアウイルス (W y e

50

t h V V<sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^7$  p f u ) 及びヒドロキシ尿素 ( 3 0 m g / k g ) の同時投与を受ける群は、実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは腫瘍内に投与し、ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与の3日前から開始して 殺まで腹腔内に1週につき5回投与した。

#### 【 0 1 0 8 】

##### 実験的実施例 8 . 2 . 腫瘍体積の変化の検査

腫瘍体積は、実験的実施例 8 . 1 の各群のマウスへの薬物投与の 0、4、10、15 及び 22 日目に測定した。その結果、陽性対照群のマウスの腫瘍体積は最初の腫瘍体積と比較して約 1.1 ~ 1.3 倍増加した。他方、実験群のマウスの腫瘍体積は最初の腫瘍体積と比較して約 4 倍増加した ( 図 10 )。

10

#### 【 0 1 0 9 】

##### 実験的実施例 8 . 3 . 腫瘍特異的細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) 活性化の特定

組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素が同時投与される場合に腫瘍特異的抗がん効果が得られるかどうか特定するために、実験的実施例 8 . 1 の各群のマウスを 16 日目に 殺し、次に、脾細胞及び細胞傷害性 T リンパ球 ( C D 8 + T 細胞 ) を各群から単離した。次に、単離した脾細胞又は細胞傷害性 T リンパ球を新規の正常マウスにそれぞれ注射した。がん移植を実行し、腫瘍体積を観察した。具体的には、1週後に、マウスに R e n c a がん細胞株 ( K o r e a C e l l L i n e B a n k ) を  $5 \times 10^6$  細胞で同種移植し、7、10、14、18 及び 21 日目に腫瘍体積を測定した。

20

#### 【 0 1 1 0 】

その結果、実験群のマウスから収集した脾細胞又は T リンパ球を注射したマウスで、腫瘍増殖は著しく抑制された。他方、残りの群のマウスから収集した脾細胞又は T リンパ球を注射したマウスでは、腫瘍増殖は有意に抑制されなかった ( 図 11 )。これらの結果から、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素の同時投与を受けた群の場合、抗がん効力を有する適応免疫が、T リンパ球だけでなく脾臓で形成される他の免疫細胞によっても活性化されることが特定された ( 図 11 及び 12 )。

#### 【 0 1 1 1 】

実験的実施例 9 . マウス腎臓がん細胞移植マウス : R e n c a ( V I ) における組換えワクシニアウイルス ( W y e t h V V<sup>t k -</sup> ) 及びヒドロキシ尿素のがん治療効果の特定

##### 実験的実施例 9 . 1 . マウス腎臓がん細胞移植マウスの生成及び薬物投与

O R I E N T B I O ( B u s a n , K o r e a ) から購入した B a l b / c マウス ( 雌、8週齢 ) を1週間の順化にかけ、次に R e n c a がん細胞株 ( K o r e a C e l l L i n e B a n k ) を  $5 \times 10^6$  細胞で同種移植した。それが  $100 \text{ mm}^3 \sim 150 \text{ mm}^3$  に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後組換えワクシニアウイルスの投与を開始した。他方、W y e t h 株由来組換えワクシニアウイルス ( W y e t h V V<sup>t k -</sup> ) は、マウス腎臓がん細胞移植マウスモデルではほとんど増殖しない。

30

#### 【 0 1 1 2 】

生成されたマウス腎臓がん細胞移植マウスは、3群 ( n = 6 ) に分割した。食塩水の腫瘍内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、組換えワクシニアウイルス ( W y e t h V V<sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^7$  p f u ) の投与を受ける群は陽性対照群として設定した。さらに、組換えワクシニアウイルス ( W y e t h V V<sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^7$  p f u ) 及びヒドロキシ尿素 ( 3 0 m g / k g ) の投与を受ける群は、実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは腫瘍内に投与し、ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与の1日前から開始して 殺まで腹腔内に1週につき6回投与した。

40

#### 【 0 1 1 3 】

##### 実験的実施例 9 . 2 . 腫瘍体積の変化の検査

実験的実施例 9 . 1 の各群のマウスは薬物投与から 22 日目に 殺し、腫瘍体積を測定した。その結果、陽性対照群のマウスの腫瘍体積は、陰性対照群のマウスの腫瘍体積と比較して約 25% 抑制された。特に、実験群のマウスの腫瘍体積は陰性対照群のマウスの腫瘍体積と比較して約 37.5% 抑制され、陽性対照群のマウスの腫瘍体積と比較したとき

50

は約15%抑制された(図13)。

【0114】

実験的実施例9.3. 脾臓組織微小環境の特定

組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素を同時投与した場合の、腫瘍微小環境中の免疫細胞の分布を分析した。分析のために、ジアミノベンジジン(DAB)を使用した免疫組織化学染色を実行した。具体的には、脾臓を各群のマウスから収集した。脾臓組織は0.4µmに切断して乾燥させた。その後、組織をPBSで洗浄し、次にウシ血清アルブミン(BSA)で処理した。組織は、1:50の比に希釈した一次抗体(抗CD3抗体(Abcam)、抗CD4抗体(BD Biosciences)、抗CD8抗体(BD Biosciences))による処理にかけ、反応は4で一晩進行させた。翌日、組織をPBSで洗浄し、次に室温で二次抗体(Dako)と30分間反応させた。組織をPBSで再び洗浄し、ABCキット(Dako)を使用して反応させ、次にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加によって発色させた。次に、組織を脱水させ、その後封入した。

10

【0115】

その結果、CD4+T細胞及びCD8+T細胞が実験群のマウスの腫瘍組織により豊富に分布していたことが特定された(図14)。これらの結果から、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素が同時投与される場合に、脾臓組織中のCD4+T細胞及びCD8+T細胞が組換えワクシニアウイルスだけが投与される場合より分化し、活性化されることが特定された。すなわち、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素が同時投与される場合に、組換えワクシニアウイルスだけが投与される場合より適応免疫がより活性化されることが特定された。

20

【0116】

実験的実施例10. マウス乳がん細胞移植マウス:4T1(I)における組換えワクシニアウイルス(OTS-412)及びヒドロキシ尿素によって引き起こされる抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)活性化の特定

ORIENT BIO(Busan, Korea)から購入したBalb/cマウス(雌、7週齢)を1週間の順化にかけ、次に4T1がん細胞株(Korea Cell Line Bank)を $1 \times 10^6$ 細胞で同種移植した。それが $100\text{mm}^3 \sim 150\text{mm}^3$ に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後組換えワクシニアウイルスの投与を開始した。他方、Wyeth株由来組換えワクシニアウイルス(OTS-412)は、マウス乳がん細胞移植マウスモデルではほとんど増殖しない。さらに、乳がん細胞株移植マウスは、転移が肺組織を含む体全体で進行する動物モデルであり、転移は腫瘍表面の小結節の数によって一般的に評価される。

30

【0117】

生成されたマウス乳がん細胞移植マウスは、4群(n=5)に分割した。食塩水の腫瘍内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、組換えワクシニアウイルス(OTS-412、 $1 \times 10^7$  pfu)又はヒドロキシ尿素(30mg/kg)の投与を受ける群は、陽性対照群として設定した。組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素の同時投与を受ける群は、実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは先ず腫瘍内に投与し、次に第2に、第1の投与から7日目に投与した。ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与日を除いて組換えワクシニアウイルスの投与の3日前から開始して 殺の3日前まで、1日に1回腹腔内に投与した。

40

【0118】

薬物投与から18日目に、各群のマウスを 殺し、血液及び脾臓をそこから収集した。血液及び脾臓中の免疫細胞の分布を、フローサイトメトリーによって分析した。その結果、腫瘍免疫応答を誘導する血液及び脾臓中のCD4+T細胞及びCD8+T細胞の分布は、実験群のマウスで最も高いことが特定された。さらに、免疫抑制機能を有する骨髓由来サプレッサー細胞(MDSC)の数が、陰性対照群及び陽性対照群のマウスと比較して実験群のマウスで著しく低いことが特定された(図15)。

【0119】

50

実験的実施例 11。マウス乳がん細胞移植マウス：4 T 1 ( I I ) における組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup> ) 及びヒドロキシ尿素の適応免疫増加効果の特定

O R I E N T B I O ( B u s a n , K o r e a ) から購入した B a l b / c マウス ( 雌、10 週齢 ) を 2 日間の順化にかけ、次に 4 T 1 がん細胞株 ( K o r e a C e l l L i n e B a n k ) を左大腿の皮下に  $1 \times 10^6$  細胞で移植した。2 日後に、マウスに同数の 4 T 1 がん細胞株を右大腿の皮下に移植した。その体積が  $50 \text{ mm}^3 \sim 200 \text{ mm}^3$  に到達するまで右大腿の皮下に移植した腫瘍を観察し、その後組換えワクシニアウイルスの投与を開始した。

#### 【 0 1 2 0 】

生成されたマウス乳がん細胞移植マウスは、3 群 (  $n = 6$  ) に分割した。食塩水の腫瘍内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^5$  p f u ) の投与を受ける群は陽性対照群として設定した。さらに、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素 (  $90 \text{ mg} / \text{kg}$  ) の同時投与を受ける群は実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは左腫瘍に 1 回投与し、ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与日を除いて、組換えワクシニアウイルスの投与の 1 日前から開始して投与から 14 日目にかけて、腹腔内に 1 週につき 6 回投与した。

10

#### 【 0 1 2 1 】

両方の大腿の皮下に移植した腫瘍の体積は、各群のマウスへの薬物投与の 0、3、7、10 及び 14 日目に測定した。その結果、実験群のマウスの左腫瘍の体積は陽性対照群のマウスの左腫瘍の体積と比較して成長が約 35% 抑制されることが特定された ( 図 16 )。さらに、実験群のマウスの右腫瘍の体積は陽性対照群のマウスの右腫瘍の体積と比較して成長が約 45% 抑制されることが特定された ( 図 17 )。これらの結果から、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素の同時投与がどのような効果を周囲の腫瘍に及ぼすかが特定された。

20

#### 【 0 1 2 2 】

すなわち、腫瘍がワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素による同時投与によって局所的に処置される場合、ウイルスが投与されなかった腫瘍においてさえ抗がん効果が観察されることが特定された。

#### 【 0 1 2 3 】

実験的実施例 12。マウス腎臓がん細胞移植マウス ( I ) における組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup> ) 及びヒドロキシ尿素の同時投与後の増加したがん選択性の特定

O R I E N T B I O ( B u s a n , K o r e a ) から購入した B a l b / c マウス ( 雌、8 週齢 ) を 1 週間の順化にかけ、次に R e n c a がん細胞株 ( K o r e a C e l l L i n e B a n k ) を  $5 \times 10^6$  細胞で同種移植した。それが  $100 \text{ mm}^3 \sim 150 \text{ mm}^3$  に到達するまで腫瘍体積を観察し、その後組換えワクシニアウイルスの投与を開始した。他方、W e s t e r n R e s e r v e 株由来組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup> ) は、同種移植モデルにおいて W y e t h 株由来組換えワクシニアウイルスより強力な増殖能力を有する。

30

#### 【 0 1 2 4 】

生成されたマウス腎臓がん細胞移植マウスは、3 群 (  $n = 8$  ) に分割した。食塩水の腹腔内投与を受ける群は陰性対照群として設定し、組換えワクシニアウイルス ( W R V V <sup>t k -</sup>、 $1 \times 10^7$  p f u ) の投与を受ける群は陽性対照群として設定した。さらに、組換えワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素 (  $60 \text{ mg} / \text{kg}$  ) の同時投与を受ける群は、実験群として設定した。組換えワクシニアウイルスは腫瘍内に 2 回投与し、ヒドロキシ尿素は、組換えワクシニアウイルスの投与日を除いて、組換えワクシニアウイルスの投与の 1 日前から開始して投与から 21 日目にかけて、腹腔内に 1 週につき 6 回投与した。

40

#### 【 0 1 2 5 】

各群のマウスを 22 日目に 殺し、腫瘍をそこから単離した。ジアミノベンジジン ( D A B ) を使用した免疫組織化学染色を通して、ウイルス増殖を比較した。具体的には、腫瘍組織を各群のマウスから収集した。腫瘍組織は  $0.4 \mu\text{m}$  に切断して乾燥させた。その

50

後、組織をPBSで洗浄し、次にウシ血清アルブミン(BSA)で処理した。組織は1:50の比で希釈した一次抗体(カタログ番号ABIN1606294、抗体-オンライン)による処理にかけ、反応を4℃で一晩進行させた。翌日、組織をPBSで洗浄し、次に室温で二次抗体(Alexa 594、カタログ番号A21205、Invitrogen)と30分間反応させた。組織をPBSで再び洗浄し、ABCキット(Dako)を使用して反応させ、次にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加によって発色させた。次に、組織を脱水させ、その後封入した。

#### 【0126】

その結果、組換えワクシニアウイルスが実験群のマウスの腫瘍組織により豊富に分布していたことが特定された(図18)。これらの結果から、ヒドロキシ尿素が組換えワクシニアウイルスの全身投与時に同時投与された場合に、組換えワクシニアウイルスのより効果的な腫瘍特異的増殖が観察されることが特定された。

10

#### 【0127】

実験的実施例13。正常マウス(II)における野生型ワクシニアウイルス(WR)及びヒドロキシ尿素の同時投与後の増加した生存及びがん選択性の特定

ORIENT BIO(Busan, Korea)から購入したBalb/c nu/nuマウス(雌、7週齢)を2日間の順化にかけ、その後野生型Western Reserve株ワクシニアウイルス(WR)の投与を開始した。他方、野生型Western Reserve株ワクシニアウイルスは、同系マウスで限定的な増殖能力を有する。

#### 【0128】

マウスは2群(n=12)に分割した。野生型Western Reserve株ワクシニアウイルス(1×10<sup>7</sup> pfu)の投与を受ける群は対照群として設定し、野生型Western Reserve株ワクシニアウイルス及びヒドロキシ尿素(50mg/kg)の同時投与を受ける群は実験群として設定した。野生型ワクシニアウイルスは鼻腔内に1回投与し;ヒドロキシ尿素は、野生型ワクシニアウイルスの投与の1日前から開始して、野生型ワクシニアウイルスの投与日を除いて腹腔内に1週につき5回投与した。

20

#### 【0129】

8日目に、対照群及び実験群のマウスを殺し、腎臓及び肝臓組織をそこから単離した。免疫組織化学的染色を実行した。パラフィンブロックを作製し、キシレン及びエチルアルコールを使用して各ブロックを脱パラフィンした。生じたブロックは、デクロッキングチャンバーを使用して抗原回収にかけた。次に、一次抗体(カタログ番号ABIN1606294、抗体-オンライン)をこのブロックに結合させ、FITC標識二次抗体(Alexa 594、カタログ番号A21205、Invitrogen)をそれに結合させた。次に、蛍光顕微鏡を使用して観察を行った。

30

#### 【0130】

その結果、対照群のマウスの肝臓及び腎臓組織と比較して、実験群のマウスの肝臓及び腎臓組織にウイルスが少数分布し、増殖することが特定された(図19)。

40

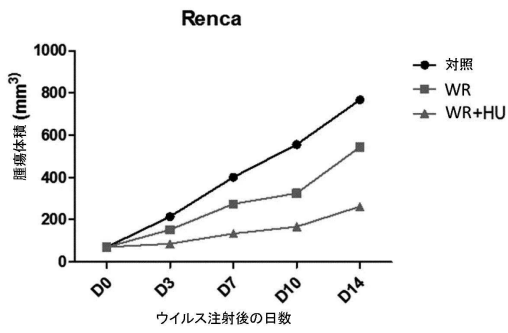
50

【 図 面 】

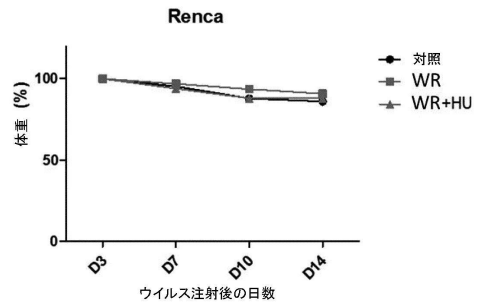
【 図 1 】

【 図 2 】

[FIG. 1]



[FIG. 2]



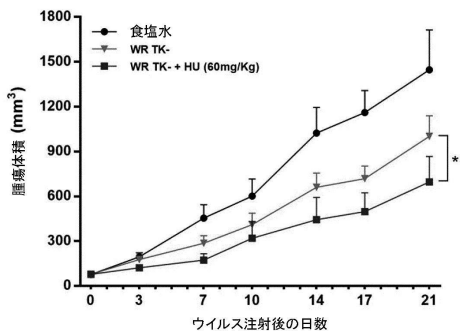
10

20

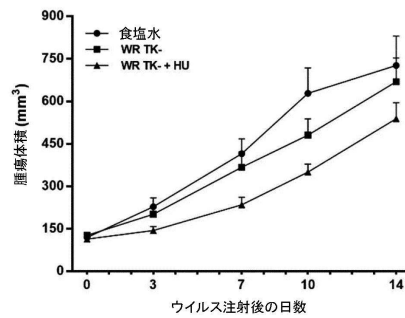
【 図 3 】

【 図 4 】

[FIG. 3]



[FIG. 4]



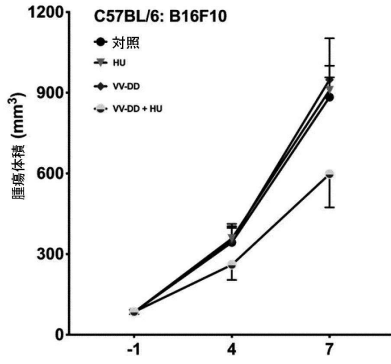
30

40

50

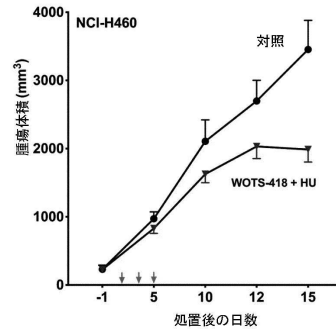
【 図 5 】

[FIG. 5]



【 図 6 】

[FIG. 6]

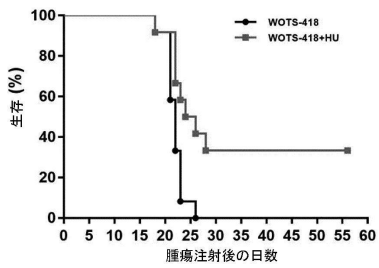


10

20

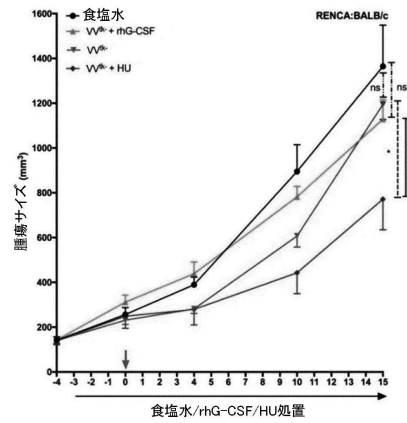
【 図 7 】

[FIG. 7]



【 図 8 】

[FIG. 8]



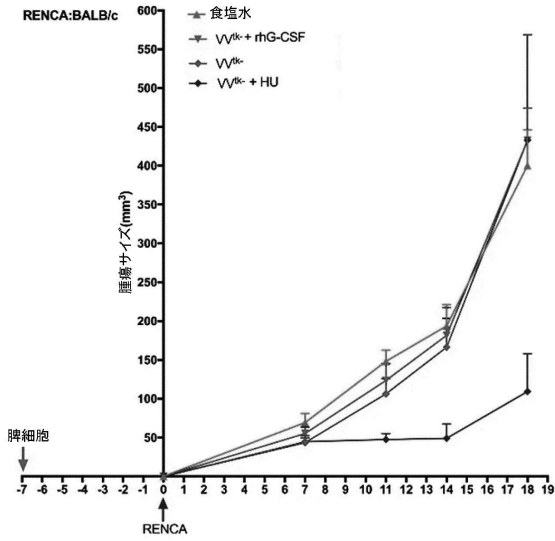
30

40

50

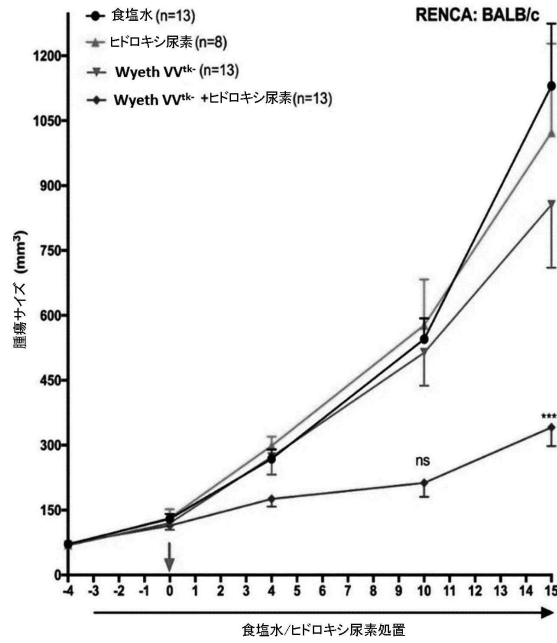
【 図 9 】

[FIG. 9]



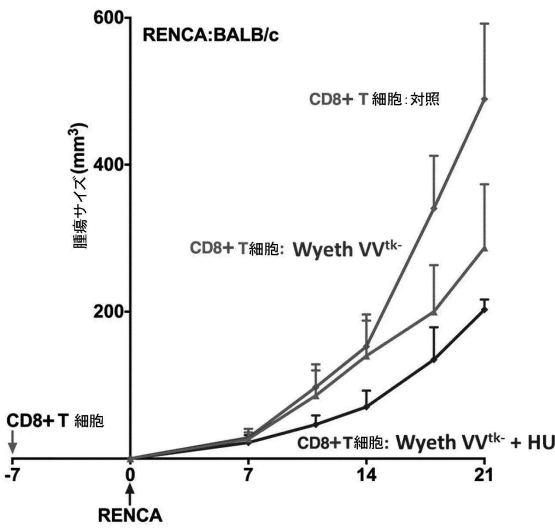
【 図 1 0 】

[FIG. 10]



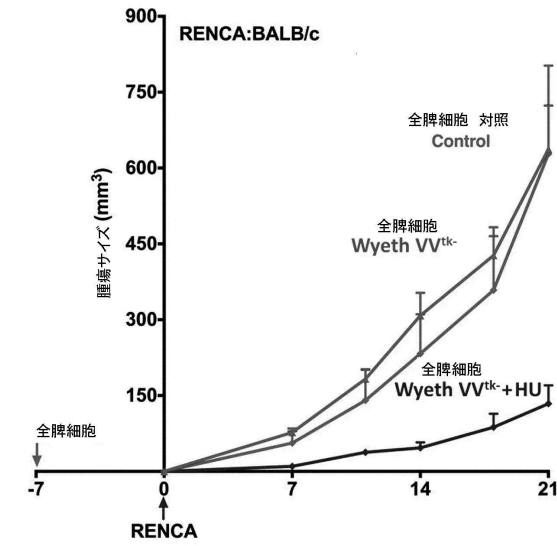
【 図 1 1 】

[FIG. 11]



【 図 1 2 】

[FIG. 12]



10

20

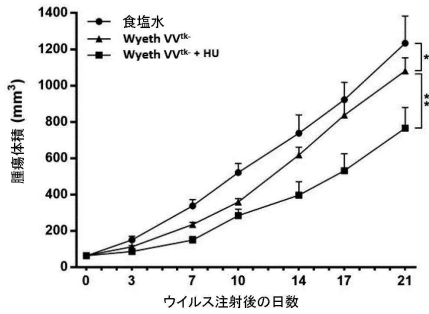
30

40

50

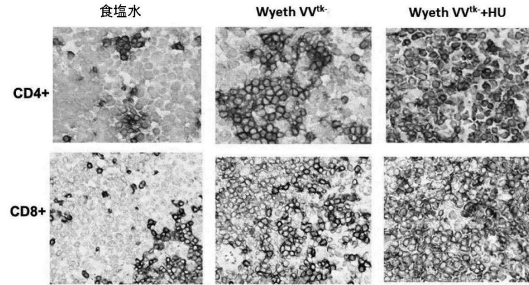
【 図 1 3 】

[FIG. 13]



【 図 1 4 】

[FIG. 14]

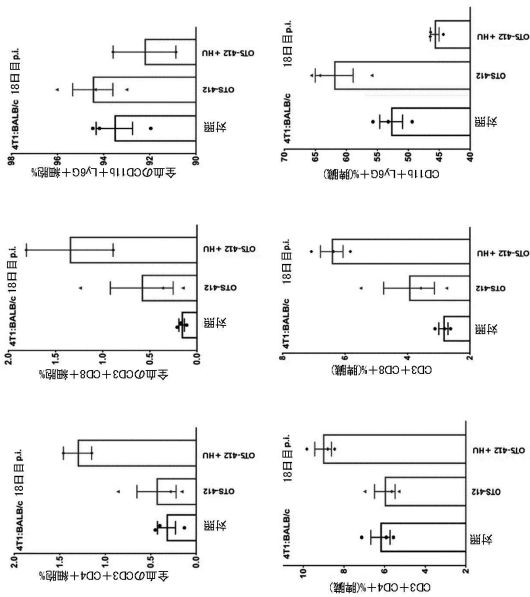


10

20

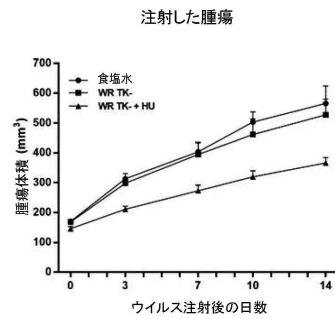
【 図 1 5 】

[FIG. 15]



【 図 1 6 】

[FIG. 16]



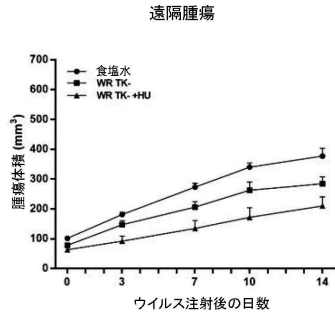
30

40

50

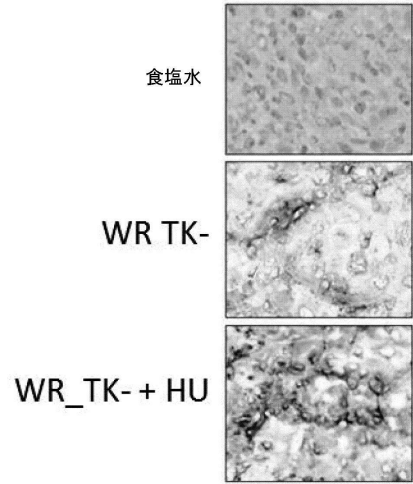
【 図 1 7 】

[FIG. 17]



【 図 1 8 】

[FIG. 18]

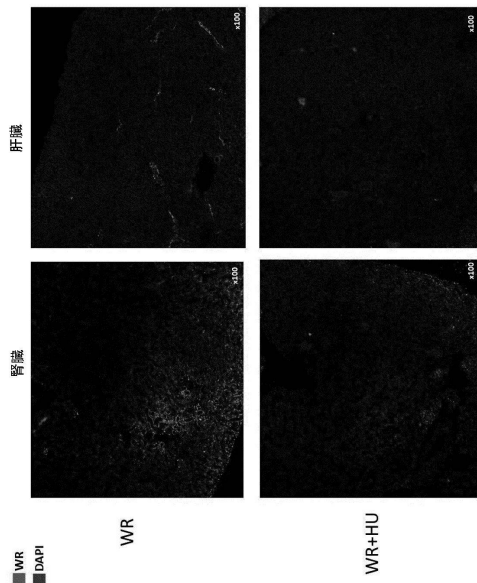


10

20

【 図 1 9 】

[FIG. 19]



30

40

50

【配列表】

0007326663000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(72)発明者 チョー, モン

大韓民国, キョンギ - ド 1 3 5 5 4, ソンナム - シ, プンダン - グ, ジョンジャイル - ロ,  
2 4 8, 1 9 0 5 - ホ

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 1 4 6 1 2 ( U S , A 1 )

国際公開第 2 0 1 7 / 2 0 5 6 7 4 ( W O , A 1 )

特表 2 0 1 7 - 5 2 2 0 2 5 ( J P , A )

特許第 7 1 6 7 3 9 5 ( J P , B 2 )

特表 2 0 2 2 - 5 3 9 0 1 6 ( J P , A )

Molecular Therapy, 2010年, Vol.18, No.12, p.2085-2093

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )