

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6879996号
(P6879996)

(45) 発行日 令和3年6月2日(2021. 6. 2)

(24) 登録日 令和3年5月7日(2021. 5. 7)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00 ZMD
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00

請求項の数 24 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-502042 (P2018-502042)	(73) 特許権者	517238396
(86) (22) 出願日	平成28年3月24日 (2016. 3. 24)		オンコセック メディカル インコーポレ イテッド
(65) 公表番号	特表2018-509477 (P2018-509477A)		アメリカ合衆国 08534 ニュージャ ージー ペニントン ノース メイン ス トリート 24
(43) 公表日	平成30年4月5日 (2018. 4. 5)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/024079	(74) 代理人	110000796
(87) 国際公開番号	W02016/154473		特許業務法人三枝国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成28年9月29日 (2016. 9. 29)	(72) 発明者	ピアース ロバート エイチ.
審査請求日	平成31年3月22日 (2019. 3. 22)		アメリカ合衆国 92101 カリフォル ニア サンディエゴ アイランド アペニ ュー 877 ユニット 1002
(31) 優先権主張番号	62/309, 131		
(32) 優先日	平成28年3月16日 (2016. 3. 16)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/138, 793		
(32) 優先日	平成27年3月26日 (2015. 3. 26)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 悪性腫瘍の治療方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下 a) ~ c) を含む方法により癌性腫瘍を有する被験体を治療するために用いられる、免疫賦活性サイトカイン I L - 1 2 をコードするプラスミドを含む医薬：

- a) 有効量の、前記プラスミドを患者中の前記癌性腫瘍に注入することと、
b) 前記腫瘍に対して電気穿孔療法を適用することと、
c) 前記被験体に対して有効量の抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体を投与すること。

【請求項 2】

前記電気穿孔療法が、約 1 0 0 マイクロ秒～約 2 0 ミリ秒の持続時間に亘る少なくとも 1 回の電圧パルスの適用を含む、請求項 1 に記載の医薬。

【請求項 3】

前記腫瘍に送達された前記電圧パルスが約 2 0 0 V / c m ～約 1 5 0 0 V / c m の電場強度を有する、請求項 2 に記載の医薬。

【請求項 4】

A) 前記抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体が前記免疫賦活性サイトカインをコードするプラスミドとは別のプラスミド上にコードされ、電気穿孔療法によって前記癌性腫瘍に送達されるか、又は

B) 前記抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体が、前記免疫賦活性サイトカイン I L - 1 2 をコードする前記プラスミド上にコードされ、電気穿孔療法によって前記癌性腫瘍に送達される、

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 5】

前記抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体が、全身投与される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 6】

前記抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、及び M P D L 3 2 8 O A からなる群から選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 7】

前記抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体が I L - 1 2 をコードする前記プラスミドの電気穿孔の後に投与される、請求項 1 ～ 3、5 及び 6 のいずれか一項に記載の医薬。 10

【請求項 8】

I L - 1 2 をコードする前記プラスミドが内部リボソームの進入部位によって分離された I L - 1 2 の p 3 5 及び p 4 0 サブユニットをコードする、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 9】

前記癌性腫瘍が三種陰性乳癌である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 10】

前記癌性腫瘍が黒色腫である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 11】 20

以下 a) ～ d) を含む方法により患者中の癌性腫瘍を治療するために用いられる、免疫賦活性サイトカイン I L - 1 2 をコードするプラスミドを含む医薬：

a) 第 1 の時間 (T 1) に第 1 の治療を適用することと、

ここで、前記第 1 の治療が、第 1 の有効量の、前記プラスミドを前記癌性腫瘍に注入することと、

前記癌性腫瘍に対して第 1 の電気穿孔療法を適用することとを含み、

ここで、前記第 1 の電気穿孔療法が、約 1 0 0 マイクロ秒～約 2 0 ミリ秒の持続時間を有する少なくとも 1 回の電圧パルスの適用を含む；

b) T 1 の後の第 2 の時間 (T 2) に第 2 の治療を適用することと、

前記第 2 の治療が、第 2 の有効量の、前記プラスミドを前記癌性腫瘍に注入することと、 30

時間 T 2 に前記癌性腫瘍に対して第 2 の電気穿孔療法を適用することとを含み、

ここで、前記第 2 の電気穿孔療法が、約 1 0 0 マイクロ秒～約 2 0 ミリ秒の持続時間を有する少なくとも 1 回の電圧パルスの適用を含む；

c) T 2 の後の第 3 の時間 (T 3) に第 3 の治療を適用することと、

前記第 3 の治療が、第 3 の有効量の、前記プラスミドを前記癌性腫瘍に注入することと、

前記癌性腫瘍に対して第 3 の電気穿孔療法を適用することとを含み、

ここで、前記第 3 の電気穿孔療法が、約 1 0 0 マイクロ秒～約 2 0 ミリ秒の持続時間を有する少なくとも 1 回の電圧パルスの適用を更に含む； 40

d) 時間 T 3 の後に治療有効量の抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体を投与すること

。

【請求項 12】

前記腫瘍に送達された前記 1 回の電圧パルスが約 2 0 0 V / c m ～約 1 5 0 0 V / c m の電場強度を有する、請求項 11 に記載の医薬。

【請求項 13】

前記抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、及び M P D L 3 2 8 O A からなる群から選択される、請求項 11 又は 12 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 14】 50

前記抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体が全身送達される、請求項11～13のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項15】

IL-12をコードする前記プラスミドが、内部リボソームの進入部位によって分離されたIL-12のp35及びp40サブユニットをコードする、請求項11～14のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項16】

前記癌性腫瘍が三種陰性乳癌である、請求項11～15のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項17】

前記癌性腫瘍が黒色腫である、請求項11～15のいずれか一項に記載の医薬。

10

【請求項18】

下記a)～c)を含む、患者中の癌性腫瘍治療するために用いられる、免疫賦活性サイトカインIL-12をコードするプラスミドを含む医薬

a) 電気穿孔によってIL-12をコードする前記プラスミドの腫瘍内送達の少なくとも1回のサイクルと、

b) 前記少なくとも1回のサイクルに続く少なくとも20日間～120日間のインターバルと、

c) 少なくとも1つの治療有効量の抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体、又は少なくとも1つの治療有効量の抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体と、電気穿孔による免疫賦活性サイトカインIL-12をコードする前記プラスミドの腫瘍内送達の少なくとも1回の追加のサイクルとの組み合わせの前記患者への投与。

20

【請求項19】

IL-12をコードする前記プラスミドが内部リボソームの進入部位によって分離されたIL-12のp35及びp40サブユニットをコードする、請求項18に記載の医薬。

【請求項20】

前記抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、及びMPDL3280Aからなる群から選択される、請求項18又は19に記載の医薬。

【請求項21】

前記抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体が全身送達される、請求項18～20のいずれか一項に記載の医薬。

30

【請求項22】

前記腫瘍内送達のサイクルが、約200V/cm～約1500V/cmの電場強度、及び約100マイクロ秒～約20ミリ秒の持続時間を有する少なくとも1回の電気パルスを含む、請求項18～21のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項23】

前記少なくとも1回のサイクルが、1日目、5日目及び8日目の電気穿孔による免疫賦活性サイトカインIL-12をコードする前記プラスミドの腫瘍内送達を含む、請求項18～22のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項24】

40

前記少なくとも1回の追加のサイクルが少なくとも2回の追加のサイクルを含む、請求項18～23のいずれか一項に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫チェックポイント阻害剤の腫瘍内送達を提供する。特に、本発明は、腫瘍内電気穿孔によるチェックポイント阻害剤の送達を提供する。

【背景技術】

【0002】

最近では、免疫療法は、腫瘍を治療するための手術、化学療法及び放射線療法に続く第

50

4の方法として注目されている。免疫療法がヒトに固有の免疫性を利用することから、患者の肉体的負荷は、免疫療法では他の治療法におけるものより小さいと言われている。免疫療法として知られる治療的アプローチとして、例えば、外因性に誘導された細胞毒性Tリンパ球（CTL）、又は様々な方法を使用する拡大培養による末梢血リンパ球から得られたリンホカイン活性化細胞、ナチュラルキラーT細胞又は $\gamma\delta$ T細胞等の細胞を移植する細胞移植療法、抗原特異性CTLの*in vivo*での誘導が期待される樹状細胞移植療法又はペプチドワクチン療法、Th1細胞療法、及び様々な効果を有すると期待される遺伝子を上記細胞へと*ex vivo*で導入してそれらを*in vivo*へと移植する免疫遺伝子療法が挙げられる。これらの免疫療法では、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞は、重大な役割を果たすことがこれまでに知られている。

10

【0003】

癌を有するヒトにおいて、抗腫瘍免疫は、免疫のホメオスタシスの維持と関連する厳格な調節のため効果がないことが多い。主な制限のうちの1つは、抗原に対する慢性曝露によって生じ、抑制性受容体の上方制御を特徴とする「T細胞疲弊（T-cell exhaustion）」として知られるプロセスである。これらの抑制性受容体は、制御されない免疫応答を防止するため、免疫チェックポイントとしてはたらく。モノクローナル抗体（mAb）によるこれらの免疫チェックポイントの1又はいくつかの遮断は、遮断しない場合には疲弊してしまう抗腫瘍T細胞をレスキューする（rescue：機能回復させる）ことが示され、最も重要なことには、癌患者では客観的な臨床奏功と関係している。

【0004】

最適なT細胞活性化は、T細胞受容体及び共刺激分子による同時シグナルを必要とする。共刺激分子のプロトタイプであるCD28は、そのリガンドB7-1及びB7-2との相互作用により、初回T細胞プライミングに決定的な役割を果たす（例えば、非特許文献1を参照されたい）。CD28が媒介するT細胞の拡大は、別のB7-1、B7-2の対抗受容体、すなわち最近活性化されたT細胞の増殖を減ずる、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）によって妨害される（例えば、非特許文献2、非特許文献3を参照されたい）。

20

【0005】

追加のCD28及びB7ファミリーのメンバーである、PD-1（プログラム死-1）、PD-L1（プログラム死リガンド-1又はB7-H1）及びPD-L2（B7-DC）の同定及び特性評価によって、ヒトにおけるT細胞活性化及び末梢性免疫寛容のプロセスが更に複雑になっている。B7-1とB7-2/CTLA-4との相互作用と同様に、PD-1とPD-L1及びPD-L2との相互作用は中枢及び末梢の免疫応答を下方制御する（例えば、非特許文献4を参照されたい）。したがって、CTLA-4のように、PD-1の抗体に基づく遮断もまた、癌の治療に対するヒト臨床試験において調査されている（例えば、非特許文献5を参照されたい）。それにもかかわらず、CTLA-4と同様に、治療法の改善が今も必要とされている。

30

【0006】

*in vivo*における電気穿孔は、多くの様々な組織へのプラスミドDNAの効率的な送達の成功に使用された遺伝子送達法である。研究は、B16メラノーマ及び他の腫瘍組織へのプラスミドDNAの送達に対する*in vivo*電気穿孔の適用を報告した。プラスミドによってコードされる遺伝子又はcDNAの全身及び局所の発現は、*in vivo*電気穿孔の適用により得ることができる。*in vivo*電気穿孔の使用は、腫瘍組織におけるプラスミドDNA取り込みを増強して腫瘍内での発現をもたらす、また筋組織へプラスミドを送達して、サイトカイン等の或る特定の免疫調節分子の全身性の発現をもたらす。

40

【0007】

電気穿孔を使用して、プラスミドDNAにより*in vivo*で細胞に形質移入できることが示されている。最近の研究は、電気穿孔が抗腫瘍物質としてのプラスミドDNAの送達を増強し得ることを示した。電気穿孔は、齧歯類モデルにおける肝細胞性癌、腺癌、

50

乳腺腫瘍、扁平上皮癌、及びB16、F10メラノーマの治療に対して適用されている。B16、F10マウスのメラノーマモデルは、組換えタンパク質として又は遺伝子療法のいずれかによって、サイトカインを含む免疫調節分子の送達に関して可能性のある免疫療法プロトコルを試験するため、広範囲に使用されている。

【0008】

当該技術分野において既知の様々なプロトコルは、癌の治療に対する*in vivo*電気穿孔を利用するチェックポイント阻害剤をコードするプラスミドの送達に利用することができる。当該技術分野において既知のプロトコルは、低電圧及び長パルス電流を利用する、腫瘍内及び筋肉内の両方の*in vivo*での電気穿孔を媒介とするサイトカインに基づく遺伝子療法を記載する。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Sharpe et al., (2002) Nat. Rev. Immunol. 2:203-209

【非特許文献2】Krummel et al., (1996) J. Exp. Med. 183:2533-2540

【非特許文献3】Leach et al., (1996) Science 271:1734-1736

【非特許文献4】Fife et al., (2008) Immunol. Rev. 224:166-82

【非特許文献5】Berger et al. (2008) Clin. Cancer Res. 14:3044-3051

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0010】

したがって、当該技術に必要とされているものは、実質的に長期生存率を改善しながら、黒色腫等の癌性腫瘍の退縮に実質的に改善された結果を提供する、腫瘍内免疫賦活性サイトカイン療法と、該腫瘍内免疫賦活性サイトカイン療法と同時に又はその後のいずれかの、プラスミド上にコードされて同時送達され、腫瘍への電気穿孔によって、又はチェックポイント阻害タンパク質治療薬の全身送達によって送達されるチェックポイント阻害剤との併用療法である。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、癌性腫瘍を有する被験体を治療する方法であって、

a) 有効量の、少なくとも1つの免疫賦活性サイトカインをコードする少なくとも1つのプラスミドを癌性腫瘍に注入することと、

b) 腫瘍に対して電気穿孔療法を適用することと、

c) 被験体に対して有効量のチェックポイント阻害剤を投与することと、

を含む、方法を提供する。或る特定の実施の形態において、電気穿孔療法は、約100マイクロ秒～約1ミリ秒の持続時間に亘る少なくとも1回の電圧パルスの適用を含む。腫瘍に送達することができる少なくとも1回の電圧パルスは、約200V/cm～約1500V/cmである。別の実施の形態において、チェックポイント阻害剤は、全身投与される。別の実施の形態において、チェックポイント阻害剤は、プラスミド上にコードされ、電気穿孔療法によって癌性腫瘍に送達される。別の実施の形態において、チェックポイント阻害剤（複数の場合もある）は、免疫賦活性サイトカインをコードするプラスミド上にコードされ、電気穿孔療法によって癌性腫瘍に送達される。チェックポイント阻害剤は、表1の少なくとも1つのチェックポイント標的のアンタゴニストである。更なる実施の形態において、チェックポイント阻害剤が、ニボルマブ（ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO）、ペンブロリズマブ（MK-3475、KEYTRUDA）、ピディリズマブ（CT-011）、及びMPDL3280A（ROCHE）からなる群から選択される、請求項7に記載の方法。更なる実施の形態において、チェックポイント阻害剤は、免疫賦活性サイトカインの電気穿孔の後に投与される。免疫賦活性サイトカインをコードするプラスミドは、表2から選択される。或る特定の実施の形態において、免疫賦活性サイトカインは、IL-12である。癌性腫瘍は、黒色腫である。

30

40

50

【0012】

本発明は、癌性腫瘍を有する被験体を治療する方法であって、

a) 時間T1に第1の電気穿孔療法を適用することと、

ここで、第1の治療が、第1の有効量の、免疫賦活性サイトカイン（複数の場合もある）をコードするプラスミドを癌性腫瘍に注入することを更に含む；

b) 時間T1に腫瘍に対して第1の電気穿孔療法を適用することと、

ここで、第1の電気穿孔療法が、約100マイクロ秒～約20ミリ秒の持続時間を有する少なくとも1回の電圧パルスの適用を更に含む；

c) 時間T2に第2の治療を適用することと、

ここで、時間T2は時間T1より後であり、

第2の治療が、第2の有効量の、少なくとも1つの免疫賦活性サイトカインをコードする少なくとも1つのプラスミドを癌性腫瘍に注入することを更に含む；

d) 時間T2に腫瘍に対して第2の電気穿孔療法を適用することと、

ここで、第2の電気穿孔療法が、約100マイクロ秒～約20ミリ秒の持続時間を有する少なくとも1回の電圧パルスの適用を更に含む；

e) 時間T3に第3の治療を適用することと、

ここで、時間T3は時間T2より後であり、

第3の治療が、第3の有効量の、治療用タンパク質をコードするプラスミドを癌性腫瘍に注入することを更に含む；

f) 腫瘍に対して第3の電気穿孔療法を適用することと、

ここで、第3の電気穿孔療法が、約100マイクロ秒～約20ミリ秒の持続時間を有する少なくとも1回の電圧パルスの適用を更に含む；

g) 時間T3の後にチェックポイント阻害剤を投与することと、

を含む、方法を包含する。別の実施の形態において、腫瘍に送達された1回の電圧パルスは、約200V/cm～約1500V/cmの電場強度を有する。更なる実施の形態において、チェックポイント阻害剤は、表1の少なくとも1つのチェックポイント標的のアンタゴニストである。チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ（ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO）、ペンブロリズマブ（MK-3475、KEYTRUDA）、ピディリズマブ（CT-011）、及びMPDL3280A（ROCHE）からなる群から選択され、チェックポイント阻害剤は、全身送達される。別の実施の形態において、チェックポイント阻害剤は、プラスミド上にコードされ、電気穿孔療法によって癌性腫瘍に送達される。或る特定の実施の形態において、チェックポイント阻害剤は、免疫賦活性サイトカインの電気穿孔の後に投与され、免疫賦活性サイトカインをコードするプラスミドは、表2から選択される。更なる実施の形態において、免疫賦活性サイトカインは、IL-12である。癌性腫瘍は、黒色腫である。

【0013】

癌性腫瘍を患う患者に対する治療計画であって、

a) 電気穿孔によって免疫賦活性サイトカインをコードするプラスミドの腫瘍内送達の少なくとも1回のサイクルと、

b) 1回のサイクルに続く少なくとも20日間～120日間のインターバルと、

c) チェックポイント阻害剤、又はチェックポイント阻害剤と、電気穿孔による免疫賦活性サイトカインをコードするプラスミドの腫瘍内送達の少なくとも1回の追加のサイクルとの組み合わせの患者への投与と、

を含む、治療計画。更なる実施の形態において、チェックポイント阻害剤は、抗PD-1又は抗PD-L1療法である。特に、抗PD-1/抗PD-L1療法は、ニボルマブ（ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO）、ペンブロリズマブ（MK-3475、KEYTRUDA）、ピディリズマブ（CT-011）、及びMPDL3280A（ROCHE）からなる群から選択される。一実施の形態において、腫瘍内送達のサイクルは、約20V/cm～約1500V/cmの電場強度、及び約100マイクロ秒～約20ミリ秒の持続時間を有する少なくとも1回の電気パルスを含む。更なる

10

20

30

40

50

実施の形態において、サイクルは、1日目、5日目及び8日目の3回の治療を含む。別の実施の形態において、患者を少なくとも3サイクルで治療する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】ラマの免疫化から6週間後の抗hCTLA-4抗体の力価を示す図である。

【図2】免疫化から0週間後、9週間後及び13週間後の抗hCTLA-4抗体の力価を示す図である。ラマに50 μ gのhCTLA-4タンパク質ブーストを与えた1週間後に9週目の力価を測定した。13週目の力価を、2回の500 μ gのhCTLA-4タンパク質ブーストの2週間後に測定した。

【図3】CTLA-4/B7.1競合ELISAを示す図である。抗マウスCTLA-4抗体を抗ヒトCTLA-4抗体に代えて使用した。

10

【図4】Jurkat細胞IL-2分泌物アッセイのデータを示す図である。マウスCTLA-4及び抗マウスCTLA-4アンタゴニスト抗体をヒト相当物に代えて使用した。抗mCTLA-4アンタゴニスト抗体治療は、IL-2産生の増加を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

添付の特許請求の範囲を含めて、本明細書で使用される「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」等の単数形の単語は、文脈に別段の明らかな指示がない限り、それらの対応する複数の参照を含む。

【0016】

20

本明細書に引用される参照文献はいずれも、あたかも個々の出版物、特許出願、又は特許がそれぞれ具体的かつ個別に参照により援用されることが示されるのと同じ程度に参照により援用される。

【0017】

定義

本明細書で使用される「免疫チェックポイント」分子は、T細胞機能不全又はアポトーシスを誘導する一群の免疫細胞表面受容体／リガンドを指す。これらの免疫抑制性の標的は、過剰な免疫応答を減じ、自己寛容を確実にする。腫瘍細胞は、これらのチェックポイント分子の抑制効果を利用する。免疫チェックポイント標的分子として、限定されないが、表1に記載されるチェックポイント標的が挙げられる。

30

【0018】

【表 1】

表 1 : チェックポイント標的アクセッション番号

標的	正式名称	GenBank アクセッション 番号 マウス核 酸	GenBank アクセシ ョン番号 マ ウスアミノ酸	GenBank アクセシ ョン番号 ヒト核 酸	GenBank アクセシ ョン番号 ヒ トアミノ酸
CTLA-4	細胞毒性 T リン パ球抗原-4	U90271	AAD00697	L15006	AAL07473
PD-1	プログラム死 1	NM_008798.2	MP_032824	NM_005018	NP_005009.2
PD-L1	プログラム死リ ガンド 1	GQ904197	ADK70950	AY254342	AAP13470
LAG-3	リンパ球活性化 遺伝子-3	AY230414	AAP57397	X51985	CAA36243
TIM3	T 細胞免疫グロ ブリンムチン- 3	AF450241	AAL35776	JX049979	AF066593
KIR	キラー細胞免疫 グロブリン様受 容体	AY130461	AY130461.1	AY601812	AAT11793
BTLA	B リンパ球及び T リンパ球アテ ニューエータ	AY293285	AAP44002	AY293286	AAP44003
A2aR	アデノシン A 2 a 受容体	NM_009630	NP_033760	NP_001265428	NM_001278499
HVEM	ヘルペスウイル ス侵入メディエ ーター	AF515707	AAQ08183	AY358879	AAQ89238

10

20

【0019】

「免疫チェックポイント阻害剤」の句は、免疫チェックポイント分子の効果を阻止することによって免疫抑制を妨げる分子を含む。チェックポイント阻害剤として、抗体及び抗体フラグメント、ナノボディ、二重特異性抗体、チェックポイント分子の可溶性結合パートナー、低分子治療薬、ペプチドアンタゴニスト等が挙げられ得る。阻害剤として、限定されないが、表 1 に記載されるチェックポイント阻害剤が挙げられる。

30

【0020】

「免疫賦活性サイトカイン」の句は、ウイルス、細菌、又は腫瘍抗原を含む、外来抗原に対する免疫応答を媒介する、又は増強するサイトカインを含む。生得の免疫賦活性サイトカインとして、例えば、TNF- α 、IL-1、IL-10、IL-12、IL-15、I 型インターフェロン (IFN- α 及び IFN- β)、IFN- γ 、及びケモカインが挙げられ得る。適応型の免疫賦活性サイトカインとして、例えば IL-2、IL-4、IL-5、TGF- β 、IL-10 及び IFN- γ が挙げられる。免疫賦活性サイトカインの例を、下記表 2 に提供する。

40

【0021】

【表 2】

表 2：免疫賦活性サイトカインアクセション番号

サイトカイン	GenBank アクセション番号 マウス核酸	GenBank アクセション番号 マウスアミノ酸	GenBank アクセション番号 ヒト核酸	GenBank アクセション番号 ヒトアミノ酸
TNF α	M20155	CAA68530	X02910	ADV31546
IL-1	RNU48592	CAA28637	X03833	CAA27448
IL-10	MUSIL10Z	AAA39275	HSU16720	AAA80104
IL-12				AAD16432
p35	NM_001159424.2	NP_001152896.1	NM_000882.3	NP_000873.2
p40	NM_001303244.1	NP_001290173.1	NM_002187.2	NP_002178.2
IL-15	NM_001254747.1	NP_001241676	NM_000585.4	NP_000576
IL-15R α	NM_008358.2	NP_032384	NM_002189.3	NP_002180
IFN α	NM_010502.2	NP_034632.2.	NM_006900.3. NM_024013.2.	NP_008831.3 NP_076918.1
IFN β	NM_010510.1	NP_034640.1	NM_002176.3.	NP_002167.1.
IFN γ	NM_008337.4.	NP_032363.1.	NM_000619.2.	NP_000610.2
IL-2	NM_008366.3.	NP_032392.1.	NM_000586.3.	NP_000577.2.
TGF β	NM_011577.2.	NP_035707.1	NM_000660.5.	NP_000651.3.

10

20

【0022】

「癌」の用語は、一般に、不適当な細胞増殖、異常又は過度の細胞増殖を特徴とする、多様な疾患を含む。癌の例として、限定されないが、乳癌、結腸癌、前立腺癌、膀胱癌、黒色腫、肺癌、卵巣癌、腎臓癌、脳腫瘍、又は肉腫が挙げられる。かかる癌は、環境要因、染色体異常、変性増殖 (degenerative growth) 及び発育障害、細胞分裂促進薬剤、紫外線 (UV)、ウイルス感染症、遺伝子の不適当な組織発現、遺伝子発現の変更、又は発癌物質によって引き起こされ得る。

【0023】

「治療」の用語は、限定されないが、癌細胞の増殖の阻害若しくは減少、癌細胞の破壊、癌細胞の増殖の予防若しくは悪性細胞の開始の予防、又は形質転換された前癌細胞の悪性疾患への進行の停止若しくは逆転、又はその疾患の改善を含む。

30

【0024】

「被験体」の用語は、任意の動物、好ましくはヒト等の哺乳動物を指す。獣医学的用途も、本発明に包含されることが意図される。

【0025】

本明細書で同義的に使用される、「電気穿孔」、「電気透過化」、又は「電気運動増強」(「EP」)の用語は、生体膜において微視的な経路(孔)を誘導するための膜貫通性の電界パルスの使用を指し、それら経路の存在は、プラスミド、オリゴヌクレオチド、siRNA、薬物、イオン及び水等の生体分子が細胞性膜の一方から他方へと通過することを可能とする。

40

【0026】

本明細書で使用される「生体分子」の用語は、抗体、抗体フラグメント、全長の免疫調節タンパク質、膜アンカー分子の可溶性ドメイン、融合タンパク質等をコードするプラスミドを包含する。

【0027】

抗体

本発明は、個体において腫瘍のサイズを減少させる若しくは癌細胞の増殖を阻害する、又は癌を患う個体において転移性癌の発症を減少させる若しくは阻害する、免疫療法的アプローチを提供する。治療法は、タンパク質治療薬の全身送達、又は電気穿孔を使用する、チェックポイント阻害剤の様々な可溶性形態をコードするプラスミドの腫瘍内送達のい

50

ずれかによって達成される。チェックポイント阻害剤療法は、免疫賦活性サイトカイン、例えば I L-12 の電気穿孔による腫瘍内送達の前であってもよく、その間であってもよく、又はその後であってもよい。

【0028】

チェックポイント阻害剤は、抗体又は抗体フラグメントの形態であってもよく、それらはいずれもプラスミド中にコードされ、電気穿孔によって腫瘍に送達されてもよく、又はタンパク質／ペプチドとして全身に送達されてもよい。上に述べたように、チェックポイント阻害剤の治療薬の送達は、免疫賦活性サイトカイン、例えば I L-12 の電気穿孔による腫瘍内送達の前であってもよく、その間であってもよく、又はその後であってもよい。

10

【0029】

本明細書で使用される「抗体」の用語は、B細胞の生成物及びその変異体である、免疫グロブリンを含む。免疫グロブリンは、多様な免疫グロブリン可変領域遺伝子と同様に、免疫グロブリンカッパ及びラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、並びにミューの定常領域遺伝子によって実質的にコードされる1以上のポリペプチドを含むタンパク質である。軽鎖は、カッパ又はラムダのいずれかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ又はイプシロンに分類され、これらは免疫グロブリンクラス、I g G、I g M、I g A、I g D、及びI g Eをそれぞれ定義する。また、重鎖のサブクラスが知られている。例えば、ヒトにおけるI g G重鎖はI g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4のサブクラスのいずれであってもよい。

20

【0030】

典型的な免疫グロブリン構造単位は、四量体を含むことが知られている。四量体は、それぞれ同一の2対のポリペプチド鎖で構成され、各対は1つの「軽鎖」（約25 kD）及び1つの「重鎖」（約50 kD～70 kD）を有する。各鎖のN末端は、抗原認識を主に担う約100～110以上のアミノ酸の可変領域を規定する。可変軽鎖（V L）及び可変重鎖（V H）の用語は、これらの軽鎖及び重鎖をそれぞれ指す。

【0031】

抗体は、全長の無傷の抗体、又は多様なペプチダーゼ若しくは化学物質による消化によって産生された、多くの十分に特性評価されたフラグメントとして存在する。したがって、例えば、ペプシンは、F（a b'）₂、すなわちそれ自体がジスルフィド結合によってV H-C H₁に連結された軽鎖であるF a bの二量体をもたらすためにヒンジ領域のジスルフィド結合の下位の抗体を消化する。F（a b'）₂は、穏やかな条件の下で還元して、ヒンジ領域のジスルフィド結合を壊すことで、F（a b'）₂二量体をF a b'単量体に変換し得る。F a b'単量体は、本質的にはヒンジ領域を有するF a bフラグメントである（他の抗体フラグメントのより詳細な説明については、Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)を参照されたい）。F a bフラグメント及びF cフラグメントは、パパインによるI g Gの消化によって生成される。パパインは、鎖間S-S結合形成に含まれる残基のすぐ上のヒンジ領域で切断し、各々ヒンジの下部、C H₂ドメイン及びC H₃ドメインを含む、2つの定常領域フラグメントを含む、1価のF a bフラグメント及びF cフラグメントを生じる。ヒンジ領域の下部の残基の鎖間S-S結合形成によって、F cの定常領域フラグメントは二量体として安定化される。

30

40

【0032】

免疫グロブリン「F c」は、古典的にパパインによる消化によって生成された定常領域の部分指す。これには鎖間のS-S結合を有する下部ヒンジが含まれる。本明細書で使用する「F c」の用語は、各々、ヒンジの下部、C H₂ドメイン及びC H₃ドメインを含む、1対の免疫グロブリン定常領域ポリペプチドを含む二量体タンパク質を指す。かかる「F c」フラグメントは、ヒンジ領域にS-S鎖間結合形成を含んでもよく、含まなくてもよい。F cは、いずれのI gクラスに由来してもよく、それ自体、例えばI g Mの場合にはC H₄ドメインを含んでいてもよいことが理解されるべきである。F cの突然変異体配列は、Wines et al., J. Immunol. 2000 May 15; 164(10):5313-8によって記載され

50

るように既知であり、本発明において使用され得る。

【0033】

多様な抗体フラグメントが無傷の抗体の消化に関して定義されるが、当業者は、様々な抗体フラグメントがいずれも、新たに化学的に又は組換えDNA方法論のいずれかの利用によって合成され得ることを理解するだろう。したがって、本明細書で使用される抗体の用語は、抗体全体の修飾によって産生された若しくは新たに合成された抗体フラグメント、又は組換えDNA方法論を用いることにより得られた抗体及びフラグメントも含む。

【0034】

組換え抗体は、従来の全長抗体、タンパク質消化による既知の抗体フラグメント、Fv又は単鎖Fv (scFv) 等の特有の抗体フラグメント、ドメイン欠失抗体等であってもよい。フラグメントは、わずか1個又は数個の欠失若しくは変異したアミノ酸を有するドメイン又はポリペプチドを含んでもよいが、1以上のドメインの欠失等のより広範囲な欠失が可能である。

10

【0035】

Fv抗体は、約50Kdのサイズであり、軽鎖及び重鎖の可変領域を含む。単鎖Fv (「scFv」) ポリペプチドは、直接連結されたか、ペプチドをコードするリンカーによって連結された、VH及びVLをコードする配列を含む、核酸から発現され得る、共有結合で連結されたVH::VLヘテロ二量体である。例えば、Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883を参照されたい。抗原結合部位の構造に実質的に類似する三次元構造へと折り畳む、自然に凝集しているが、化学的には分離されている軽鎖及び重鎖のポリペプチドを抗体V領域からscFv分子へと変換するための多くの構造。

20

【0036】

上記の従来の抗体フラグメントの代わりは、ラクダ、ラマ及びサメの免疫系によって産生された1組の特有の抗体において見出された。他の抗体と異なり、これらの親和性試薬は2つの重鎖のみで構成され、更に良いことに、単一ドメインがこれらの重鎖抗体に対する抗原結合部位を形成する。該ドメインを、「ナノボディ」と呼ばれる極めて小さく、非常に安定した単一ドメイン組換え抗体フラグメントを産生するように、更に遺伝子操作してもよい。重鎖(VHH)のみ、すなわち単一ドメイン抗体をコードするプラスミド、及びナノボディもまた、電気穿孔による腫瘍内送達が意図される。

30

【0037】

可溶性アンタゴニスト

チェックポイント分子のアンタゴニスト/阻害剤は、少なくともPD-L1の細胞外ドメイン(ECD)を含む可溶性PD-L1等の表1の中のチェックポイント阻害剤の可溶性結合パートナーであってもよい。他の可溶性チェックポイント阻害剤は、同様に、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを欠くが、それらの結合パートナーに結合して、生物学的作用を誘発することができる。電気穿孔による腫瘍内送達のため、ECDは発現ベクターにコードされ、腫瘍に送達された場合に発現される。

【0038】

チェックポイント阻害剤の可溶性コード形態は、発現ベクターにおいて別のタンパク質又はポリペプチドをコードするDNAに連結されてもよい。かかる他のポリペプチドは、免疫グロブリンのFc部分、アルブミン、又はチェックポイント阻害剤分子の溶解度を維持する任意の他の種類の血清タンパク質若しくはそれらのフラグメントであってもよい。可溶性形態のチェックポイント阻害剤分子は、フラグメント又は全長の重鎖若しくは軽鎖であってもよい重鎖及び/又は軽鎖を介して免疫グロブリンに連結されてもよい。免疫グロブリンは、癌細胞又は腫瘍に関連する抗原を標的とすることができる抗体であってもよい。

40

【0039】

可溶性チェックポイント阻害剤は、タンパク質として全身、又は核酸として電気穿孔によって腫瘍内のいずれかに送達される。核酸は、標準的なリン酸ジエステル結合又は他の

50

結合によって共有結合された、窒素複素環塩基又は塩基性アナログを有するヌクレオシド又はヌクレオシドアナログを含むオリゴヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチド化合物を指す。核酸は、RNA、DNA、キメラDNA-RNAポリマー、又はそれらのアナログを含んでもよい。DNAは、目的の特定の可溶性チェックポイント阻害剤分子を発現するプラスミドであってもよい。

【0040】

コードされた可溶性チェックポイント阻害剤の電気穿孔に使用されるDNAプラスミドは、電気穿孔後の上記DNAプラスミドの進入により、哺乳動物細胞において発現され得る、組換え抗原のコード配列を含むものである。好ましくは、コード配列は、標的腫瘍中の免疫反応を誘発するコンセンサスチェックポイント阻害剤分子である。いくつかの実施形態では、コード配列は、哺乳動物の発現に対して最適化され、Kozak配列の付加、コドン最適化、及びRNA最適化を含む、1以上を含んでもよい。これらの最適化されたコード配列を、多様な商業的に入手可能なベクターへとサブクローニングすることができる。

10

【0041】

併用療法

少なくとも1つのチェックポイント阻害剤治療薬の全身送達、又はチェックポイント阻害剤をコードするプラスミドDNAの腫瘍内電気穿孔を、他の治療薬の実体、特に、少なくとも1つの免疫賦活性サイトカインと共に（例えば電気穿孔によるIL-12の腫瘍内の送達）適用することができることが意図される。併用療法の適用は、電気穿孔単独、又は電気穿孔と全身送達との組み合わせによって達成され得る。

20

【0042】

他の意図された併用療法は、TLRアゴニスト（例えばフラジェリン、CpG）、IL-10アンタゴニスト（例えば抗IL-10又は抗IL-10R抗体）、TGF- β アンタゴニスト、CD3アゴニスト、テロメラーゼアンタゴニスト等と合わせたチェックポイント阻害剤である。

【0043】

チェックポイント阻害剤及びIL-12を利用する併用療法に関して、ペンブロリズマブ（抗PD-1抗体）の全身投与、及び免疫賦活性サイトカイン、例えばIL-12をコードするDNAの、電気穿孔による、腫瘍内投与を含む臨床研究が進行中である。免疫賦活性サイトカインの例を表2に提供する。以下は、臨床研究及び関連データの説明である。また、他のアンタゴニストPD-1療法が、IL-12の腫瘍内発現と組み合わせて使用され得ることが意図される。PD-1アンタゴニストは、ニボルマブ（ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO、BRISTOL MYERS SQUIBB）、ペンブロリズマブ（MK-3475、KEYTRUDA、Merck）、ピディリズマブ（CT-011、CURE TECH）、MPDL3280A（ROCHE）等の1以上を含む。これらの治療法は、推奨される投薬量レベルで全身投与され得るか、又は発現ベクター若しくはプラスミド上にコードされ、IL-12をコードする発現プラスミド又はベクターを用いた電気穿孔によって腫瘍内に送達され得る。また、IL-12及びPD-1アンタゴニストをコードする遺伝子が、同じ発現ベクター上にコードされることが意図される。

30

40

【0044】

電気穿孔

装置は、癌又は他の非癌性の（良性）増殖に悩む患者における使用が意図される。これらの増殖は病変、ポリープ、新生物（例えば乳頭状尿路上皮新生物）、乳頭腫、悪性腫瘍、腫瘍（例えばクラッキン腫瘍、肝門部腫瘍、非侵襲性乳頭状尿路上皮腫瘍、胚細胞腫瘍、ユーイング腫瘍、アスキン腫瘍、原始神経外胚葉性腫瘍、ライディッヒ細胞腫瘍、ウィルムス腫瘍、セルトリ細胞腫瘍）、肉腫、癌（例えば扁平上皮癌、総排泄腔癌、腺癌、腺扁平上皮癌、胆管細胞癌、肝細胞癌、侵襲性乳頭状尿路上皮癌、扁平尿路上皮癌）、瘤、又は他の型の癌性若しくは非癌性増殖のいずれかとして現れ得る。本実施形態の装置及び方法で処理される腫瘍は非侵襲性、侵襲性、表在性、乳頭状、扁平、転移性、限局性、単

50

中心性、多中心性、低悪性度、及び高悪性度のいずれかであってもよい。

【0045】

本装置は多くの型の悪性腫瘍（すなわち癌）及び良性腫瘍への使用が意図される。例えば、本明細書に記載の装置及び方法は、副腎皮質癌、肛門癌、胆管癌（例えば肝門部周囲癌、遠位胆管癌、肝内胆管癌）、膀胱癌、良性及び癌性の骨癌（例えば骨腫、類骨骨腫、骨芽腫、骨軟骨腫、血管腫、軟骨粘液線維腫、骨肉腫、軟骨肉腫、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、骨の巨細胞腫瘍、脊索腫、リンパ腫、多発性骨髄腫）、脳及び中枢神経系の癌（例えば髄膜腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、上皮腫、神経膠腫、髄芽腫、神経節膠腫、シュワン腫、胚細胞腫、頭蓋咽頭腫）、乳癌（例えば非浸潤性乳管癌、浸潤性乳管癌、浸潤性小葉癌、非浸潤性小葉癌、女性化乳房症）、キャッスルマン病（例えば巨大リンパ節過形成、血管胞状リンパ節過形成）、子宮頸癌、大腸癌、子宮内膜癌（例えば子宮内膜腺癌、腺類癌、乳頭状漿液性腺癌、明細胞癌）、食道癌、胆嚢癌（粘液性腺癌、小細胞癌）、消化管カルチノイド腫瘍（例えば絨毛癌、破壊性絨毛膜腺腫）、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、カポジ肉腫、腎癌（例えば腎細胞癌）、喉頭下咽頭癌、肝癌（例えば血管腫、肝腺腫、限局性結節性過形成、肝細胞癌）、肺癌（例えば小細胞肺癌、非小細胞肺癌）、中皮腫、形質細胞腫、鼻腔副鼻腔癌（例えば感覚神経芽腫、正中線肉芽腫）、上咽頭癌、神経芽腫、口腔中咽頭癌、卵巣癌、睪癌、陰莖癌、下垂体癌、前立腺癌、網膜芽腫、横紋筋肉腫（例えば胎児性横紋筋肉腫、胞巣状横紋筋肉腫、多型細胞型横紋筋肉腫）、唾液腺癌、皮膚癌、黒色腫及び非黒色腫両方の皮膚癌）、胃癌、精巣癌（例えば精上皮腫、非精巢上皮腫胚細胞癌）、胸腺癌、甲状腺癌（例えば濾胞状癌、未分化癌、低分化癌、甲状腺髓様癌、甲状腺リンパ腫）、腔癌、外陰癌、及び子宮癌（例えば子宮平滑筋肉腫）への使用が意図される。

10

20

【0046】

本発明の実施形態の装置及び方法は、電気療法を連続的に、及び／又は1秒の数分の1～数日間、数週間、及び／又は数か月に及ぶ期間のパルスで腫瘍へと送達することにより癌性腫瘍を治療するようにはたらく。好ましい実施形態では、電気療法は直流電気療法である。

【0047】

本明細書で使用される「電気穿孔」の用語（すなわち、細胞膜浸透性を与える）は、（例えば、生細胞中への医薬品、溶液、遺伝子及び他の薬剤等の分子の拡散を可能とするため）細胞膜に孔を開けるのに十分な任意の期間に患者に送達される任意の量のクーロン、電圧、及び／又は電流によってもたらされてもよい。

30

【0048】

組織に電気療法を送達すると、一連の生物学的及び電気化学反応を引き起こす。十分に高い電圧では、細胞構造及び細胞代謝は、電気療法の適用によって極度に妨げられる。癌性及び非癌性細胞はいずれも一定レベルの電気療法で破壊されるが、腫瘍細胞は、非癌性細胞よりそれらの微小環境の変化に敏感である。多量元素及び微量元素の分布は電気療法の結果変更される。

【0049】

単電極配置では、リード電極とジェネレーターハウジングとの間に数秒分の1～数時間に亘って電圧を印加して、癌組織の破壊を始めてもよい。所与の電圧の印加は、各パルスが1秒の数分の1～数分間続く一連のパルスであってもよい。或る特定の実施形態では、パルス持続時間又は幅はおおよそそのものであってもよい。また、低電圧は、腫瘍部位に白血球を引き付け得る、数秒分の1～数分の持続期間に亘って印加されてもよい。この方法では、細胞媒介免疫系は、死んだ腫瘍細胞を除去し、腫瘍細胞に対する抗体が生じ得る。さらに、賦活された免疫系は、境界型腫瘍細胞及び転移を攻撃する場合がある。

40

【0050】

任意の免疫学的応答を増加させるため、宿主の種に応じて、限定されないが、フロイントのアジュバント（完全、及び不完全）、水酸化アルミニウム又はリン酸アルミニウム等のミネラル塩、様々なサイトカイン、リゾレシチン、プルロニック多価アルコール、ポリ

50

アニオン、ペプチド、油エマルジョン等の界面活性物質、並びにBCG（カルメット・گران桿菌（*bacille Calmette-Guerin*））及びコリネバクテリウム・パルブム（*Corynebacterium parvum*）等の潜在的に有用なヒトアジュバントを含む、様々なアジュバントを使用してもよい。代替的には、キーホールリンペットヘモシニアン、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、オブアルブミン、コレラ毒素又はそれらのフラグメント等の分子との組み合わせ及び／又はカップリングによって免疫応答を増強してもよい。

【0051】

Draghia-Akli, et al.による米国特許第7, 245, 963号は、モジュール電極システム、及び身体又は植物の選択された組織の細胞中への生体分子の導入を促進するためのそれらの使用を記載する。モジュール電極システムは複数の針電極と、皮下注射針と、プログラム可能な定電流パルスコントローラから複数の針電極に導電性リンクを提供する電気的コネクタと、電源とを備える。オペレーターは、支持構造にマウントされ、身体又は植物の選択された組織にそれらをしっかりと挿入する複数の針電極をつかむことができる。その後、生体分子が選択された組織中への皮下注射針によって送達される。プログラム可能な定電流パルスコントローラが活性化され、定電流電気パルスが複数の針電極に印加される。印加された定電流電気パルスは、複数の電極間の細胞中への生体分子の導入を促進する。米国特許第7, 245, 963号の全内容が、引用することにより本明細書の一部をなす。

【0052】

米国特許出願公開第2005/0052630号は、身体又は植物の選択された組織の細胞中への生体分子の導入を効果的に促進するため使用され得る、電気穿孔装置を記載する。該電気穿孔装置は、その操作がソフトウェア又はファームウェアによって指定される、電気運動装置（「EKD装置」）を備える。EKD装置は、ユーザ制御及びパルスパラメータの入力に基づいたアレイ中の電極間の一連のプログラム可能な定電流パルスパターンをもたらし、電流波形データの蓄積及び獲得を可能とする。また、電気穿孔装置は、針電極アレイを有する取り換え可能な電極ディスクと、注射針に対する中心注射チャンネルと、リムーバブルガイドディスクとを備え（例えば、米国特許出願公開第2005/0052630号を参照されたい）、引用することにより本明細書の一部をなす。

【0053】

米国特許第7, 245, 963号、及び米国特許出願公開第2005/0052630号に記載される電極アレイ及び方法は、筋肉等の組織のみならず、他の組織又は臓器中への深い浸透に対して適合される。電極アレイの配置のために、電極によってあらかじめ描写される領域において、注射針（選択された生体分子を送達するため）も完全に標的臓器に挿入され、その注射は標的組織に垂直に適用される。

【0054】

また、本発明の非ウイルス送達ベクターの取り込みは、電子なだれ（avalanche）トランスフェクションとも名付けられた血漿電気穿孔によって増強されてもよい。簡潔には、マイクロ秒放電は、電極表面でキャビテーションマイクロバブルを生じる。磁界と併せてマイクロバブル崩壊によって生じた機械力は、従来の電気穿孔に関連する拡散媒介輸送と比較して、細胞膜を横切る輸送効率を増加させる役目を果たす。血漿電気穿孔の技術は、2011年4月12日付発行のVankov, et al.の米国特許第7, 923, 251号、及び2012年10月9日付発行のVankov, et al.の米国特許第8, 283, 171号に記載される。また、この技術を細胞の形質転換のため *in vivo* で採用してもよい。Chalberg, et al (2006) *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47:4083-4090; 2012年1月24日付発行のChalberg, et al.の米国特許第8, 101169号。

【0055】

黒色腫病変の病期分類

TNMシステム（例えば、Edge SB et al. (2010) "Melanoma of the skin", *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York, NY: Springer-Verlagを参照されたい）を、病変の特性を判断し、その疾患のステージを決定するために使用する。

【0056】

T（腫瘍）カテゴリーは、黒色腫の厚さ、及び皮膚生検材料において見られる他の主要因（腫瘍厚さ、分裂速度及び潰瘍形成）に基づく。表3は、T群評価の更なる分類を提供する。

【0057】

【表3】

表3：原発性腫瘍に対するT分類

TX	原発腫瘍の評価が不可能（すなわち、掻爬又は著しく退縮した黒色腫）
T0	原発腫瘍の兆候なし
Tis	表皮内黒色腫
T1	厚さ1.0mm以下の黒色腫 T1a：潰瘍がなく、有糸分裂が1/mm ² 未満 T1b：潰瘍があり、又は有糸分裂が1/mm ² 以上
T2	厚さ1.01mm～2.0mmの黒色腫 T2a：潰瘍なし T2b：潰瘍あり
T3	厚さ2.01mm～4.0mmの黒色腫 T3a：潰瘍なし T3b：潰瘍あり
T4	厚さ4.0mm超の黒色腫 T4a：潰瘍なし T4b：潰瘍あり

10

20

【0058】

N（リンパ節）カテゴリーは、検出可能な腫瘍を伴うセンチネルリンパ節／遠隔リンパ節（複数の場合もある）の存在／数に依存する。M（転移）カテゴリーは、転移の存在、位置及び重症度に依存する。表4は、N群評価の更なる分類を提供する。

30

【0059】

【表 4】

表 4：所属リンパ節の N 分類

NX	所属リンパ節の評価が不可能な患者（すなわち、別の理由により以前に摘除されている）。
N0	所属リンパ節に転移を検出しない。
N1-3	節転移の数に基づく局所転移、及びリンパ内転移の存在又は不在（i n t r a n s i t 転移又は衛星転移）
N1	1 個のリンパ節 N 1 a：顕微鏡的転移 N 1 b：肉眼的転移
N2	2 個又は 3 個のリンパ節 N 2 a：顕微鏡的転移 N 2 b：肉眼的転移 N 2 c：リンパ節転移を伴わない i n - t r a n s i t 転移（複数の場合もある） ／衛星病巣（複数の場合もある）
N3	4 個以上のリンパ節転移、又は癒着したリンパ節、又はリンパ節転移（複数の場合もある）を伴う i n - t r a n s i t 転移（複数の場合もある）／衛星病巣（複数の場合もある）

10

20

【0060】

一旦 T 群、N 群及び M 群が決定されれば、それらを組み合わせて、ローマ数字の I ～ I V（1 ～ 4）を使用して、時には大文字を使用して細分し、全体的なステージを与える。表 5 は、M 群評価の更なる分類を提供する。

【0061】

【表 5】

表 5：転移の M 分類

M0	遠隔転移の検出可能な兆候なし
M 1 a	皮膚、皮下又は遠隔リンパ節への転移、正常血清乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）レベル
M 1 b	肺転移、正常 LDH レベル
M 1 c	他の全ての内臓部位への転移、又は血清 LDH 高値を伴う任意の部位への遠隔転移

30

【0062】

ステージ I I I B - T 1 a ～ T 4 a、N 2 c、M 0 の例：腫瘍は任意の厚さであってもよいが、潰瘍化していない。腫瘍は、近くの皮膚の小領域に（衛星腫瘍）、又は本来の腫瘍周辺のリンパ管（i n - t r a n s i t 腫瘍）に伝播したが、節は黒色腫を含んでいない。離れた伝播はない。

40

【0063】

ステージ I V - 任意の T、任意の N、M 1（a、b 又は c）の例：黒色腫は、皮膚の本来の領域を超えて、肺、肝臓若しくは脳等の他の臓器に近いリンパ節、又は皮膚の離れた領域、皮下組織若しくは離れたリンパ節に伝播した。

【0064】

臨床成果の測定

50

黒色腫試験における臨床成果は、固形癌効果判定（RECIST：Response Evaluation Criteria in Solid Tumors）基準によって測定されてもよい。RECISTは、腫瘍が改善する（「奏功」）、同じままである（「安定化」）、又は悪化する（「増悪」）場合を定義するガイドラインを提供する。

【0065】

全ての標的病変に対する最長径（LD）合計が、ベースライン合計LDとなる。これは、標的とされる病変（複数の場合もある）における客観的な腫瘍奏功を特徴づける参照として使用される。

- a. 完全奏功（CR）は全ての標的病変の消滅である；
- b. 部分奏功（PR）は、標的病変のLD合計の少なくとも30%の減少を示す；
- c. 安定状態（SD）は、PRの資格を得るのに十分な収縮も、進行性疾患（PD）の資格を得るのに十分な増加もない場合に起こる；
- d. 進行性疾患（PD）：標的病変のLD合計の少なくとも20%の増加、又は1以上の新たな病変の出現。

10

【0066】

また、「修正」RECISTを、臨床治療の成果を測定するために使用することができる。修正「皮膚」RECIST：全ての測定可能な（0.3cm超）病変の合計によって計算される。以下の基準を、測定可能な腫瘍病変を定義するために使用する：

皮膚病変の最大数は規定されない；

全ての測定可能な皮膚病変が客観的な腫瘍評価に含まれる；

20

全ての測定可能な皮膚病変の合計を使用して、治療法に対する奏功を特性評価する；

合計増加が天底から30%未満である場合に許容される皮膚上の新たな病変。

【0067】

追加のより精密な測定（修正免疫関連効果判定基準（irRC）として知られている）を使用することができ、全ての測定可能な（0.3cm超）病変の合計によって計算され得る。以下の基準を使用して測定可能な腫瘍病変を定義することができる：

最大10個の内臓病変が、評価用の指標病変として認められる；

新たな病変は、自動的に完全奏功（CR）を排除しない；

新たな病変は、一旦それらが測定可能であるとされれば、直径の合計に追加される；

修正irRC腫瘍量 = SPD_{指標} + SPD_{New measurable}。SPDは、各病変の直交径の合計である。

30

指標は、治療に先立って観察される10個の内臓病変を表し、New measurableは、治療中に出現する新たな病変を表す。

【0068】

修正「皮膚」RECIST及び修正irRCの両方に対する完全奏功（CR）は、追加スキャン、及びCRの最初の記録の4週間後～6週間後の受診によって確認される、全ての病変の完全消滅（測定可能か否かに関わらず）、及び少なくとも4週間に亘る新たな病変の欠如として定義される。

【0069】

部分奏功（PR）は、修正「皮膚」RECIST：LDのベースラインから30%以上の減少として定義される。奏功の日付は奏功の最初の記録の日付である。修正irRC：直径の積のベースラインから50%以上の減少。奏功の日付は奏功の最初の記録の日付である。

40

【0070】

疾患の進行（PD）は、修正「皮膚」RECISTとして定義される：LDの20%以上の増加。20%の相対的な増加に加えて、合計は5mm²以上の絶対的な増加も示さなければならない。修正irRC：直径の積の25%以上の増加。

【実施例】

【0071】

I. ラマの免疫化

50

最初の3回の免疫化が目的の抗原をコードするプラスミドの電気穿孔、続いて2回のタンパク質ブーストによって与えられるプライム／ブースト法に従ってラマ（Abcore）で抗体を作製した。DNA免疫化によるプライミングはヒトCTLA-4の細胞外ドメインを発現するプラスミド250 µgのラマへの皮内注入、続く電気穿孔、及び隣接する領域での該処置の反復によって1日目、14日目及び28日目に行った。その後、56日目及び84日目に、2 mLの不完全フロイントアジュバント（MP Biologicals）で乳化した50 µgのヒトCTLA-4タンパク質（Sino Biological）の皮下注入による最後2回のブーストをラマに与えた。力価レベルをモニターするため、免疫化処置の期間中に試験出血を採取した。

【0072】

10

II. 単ドメイン抗体の単離のためのcDNA合成

末梢血リンパ球（PBL）を、密度勾配分離によって免疫化サイクルの終わりにラマから採取した全血から単離する。密度勾配媒質であるLymphoprep（Stemcell）との遠心分離の前に、2% FBSを補足したPBSと全血を50：50で混合する。PBLの層を単離し、トータルRNAをRNeasy maxikit（Qiagen）を使用して、PBLから抽出する。First-Strand cDNA合成キット（GE Healthcare）を使用してcDNAを合成する。

【0073】

III. 単ドメイン抗体の単離

ネステッドPCR戦略を使用し、免疫化したラマのPBLから抽出したRNAより合成したcDNAを使用して、VHH遺伝子を単離する。フォワードプライマーMJ1、MJ2、MJ3、VHBACKA6及びリバースプライマーCH2FORTA4を使用して一次PCRを行って（例えば、Baral et al., (2013) Curr. Protoc. Immunol. 103:2.17.1-2.17.57、及びSabir et al., (2014) C. R. Biol., 337: 244-249を参照されたい）、VHH及びVHの両方の可変ドメインを増幅する。VHHフラグメント（約550 bp～650 bp）をゲル電気泳動法によってVHフラグメント（約900 bp）から分離し、ゲル抽出キット（Qiagen）を使用して該VHHフラグメントを精製する。フォワードプライマーMJ7、VHBACKA5、及びリバースプライマーMJ8、隣接して付くpADL-20c（Antibody Design Labs）ファージミドベクターに対して特異的なSfiI制限酵素部位を有するF4revを使用して、二次PCR反応を行った。最終PCR産物を、SfiI制限酵素部位を使用してファージミドpADL-20cベクターへライゲートする。その後、ライゲートしたプラスミドを使用して、ファージディスプレイ用のエレクトロコンピテントTG1 E. coli（E. coli）細胞を形質転換する。

20

30

【0074】

VHHのレパトリをM13K07ヘルパーファージ（Antibody Design Labs）でレスキューした後、ファージ粒子上で発現する。Maxisorbマイクロタイタープレート（Sigma-Aldrich）上に被覆したヒトCTLA-4組換えタンパク質に対して3回～5回バイオパニングすることにより、ヒトCTLA-4に特異的なVHHを濃縮する。結合したファージを0.1 Mのトリエチルアミンの添加によって溶出する。該溶液を1 MのTris-HClによってpH7.4に中和する。

40

【0075】

溶出したファージを指数関数的に成長しているTG1細胞を感染させるために使用する。バイオパニングの最後のラウンドで選択された個々のクローンを配列決定し、ファージ結合ELISAにおいてヒトCTLA-4に対して試験する。0.1 µg/mlカルベニシリン及び0.2%グルコースを補足した2×YT培地中で、OD約0.5までクローンを増殖させる。その後、M13K07ヘルパーファージを、最終濃度50 µg/mlのカナマイシンと共に20倍の過剰量で添加する。振盪しながら37℃で一晩インキュベートすることによってクローンを増幅させる。その後、細胞をペレット化するため、4℃、4000 rpmで15分間クローン培養物を遠心分離機にかける。ファージを含む上清100 µlをヒトCTLA-4で予め被覆したマイクロタイタープレートに移す。37℃で2

50

時間のインキュベーションの後、マイクロタイタープレートを、PBS中0.1%のTween-20 (PBST)で3回洗浄した後、抗M13 HRP抗体 (Abcam) を添加する。ヒトCTLA-4に結合したVHHファージをTMB (Pierce) の添加によって検出する。発色を4N H₂SO₄の添加によって停止し、吸光度をOD 450 nmに設定したSpectramax (Molecular Devices) で読み取る。

【0076】

IV. CTLA-4 結合

CTLA-4との相互作用は、固定化ヒトCTLA-4組換えタンパク質 (Sino Biological) に対する抗ヒトCTLA-4抗体又は抗体フラグメントの結合の検出によって測定される。組み換えヒトCTLA-4タンパク質を、4℃で一晩、高結合EIAプレート (Corning) 上に被覆する。PBST (PBS中0.1%のTween-20) でウェルを洗浄した後、プレートを室温で1時間、Super Block (Scytek) によってブロッキングする。プレートをPBSTで洗浄し、抗ヒトCTLA-4の試料をウェルに添加して、1時間インキュベートする。ウェルをPBSTで再び洗浄し、2次ヤギ抗ヒトIgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) を添加する。1時間のインキュベーションの後、2次抗体 (the secondary) をPBSTで洗い流し、プレートをTMB (Pierce) で発色させた。発色を4N H₂SO₄で停止し、ヒトCTLA-4組換えタンパク質に対する抗ヒトCTLA-4の結合親和性を測定するため、450 nmに設定した分光光度計で光学密度を読み取る。

【0077】

V. B7とCTLA-4との競合アッセイ

in vitroでの抗ヒトCTLA-4活性を、ヒトCTLA-4タンパク質とそのリガンドであるB7.1及びB7.2との相互作用を妨害する能力により測定する。組み換えヒトB7.1又はヒトB7.2 (R&D Systems) を、4℃にて一晩、高結合EIAプレート (Corning) 上に被覆させる。PBST (PBS中0.1%のTween-20) でウェルを洗浄した後、プレートを室温で1時間、Super Block (Scytek) によってブロッキングする。タイトレーションした抗ヒトCTLA-4を、一定濃度の組み換えヒト抗CTLA-4と混合する。Super Blockをウェルから除去した後、プレートをPBSTで洗浄し、抗ヒトCTLA-4/ヒトCTLA-4混合物をウェルに添加して、室温で1時間インキュベートする。ウェルをPBSTで洗浄し、ビオチン化抗ヒトCTLA-4 (R&D Systems) を試料ウェルに添加し、1時間インキュベートする。プレートをPBSTで再び洗浄し、ストレプトアビジン-HRP (Abcam) をウェルに添加する。1時間のインキュベーションの後、結合していないストレプトアビジン-HRPをPBSTで洗い流し、プレートをTMB (Pierce) で発色させる。発色を4N H₂SO₄の添加によって停止し、抗ヒトCTLA-4試験試料によるhB7.1又はhB7.2へのヒトCTLA-4結合の妨害を測定するため、450 nmに設定した分光光度計で光学密度を読み取る。阻害曲線をプロットし、IC₅₀をPrism (Graphpad) 等のソフトウェアを使用して計算する。

【0078】

上記のアッセイを、抗マウスCTLA-4抗体 (eBioscience) 及び100 ng/mlのmCTLAタンパク質 (Sino Biological) を用いて実行した。結果を図3に表す。

【0079】

VI. Jurkat IL-2 放出アッセイ

抗ヒトCTLA-4活性は、Jurkat細胞においてB7誘導性IL-2分泌のCTLA-4の阻害を妨げる能力によって細胞系で測定される。Jurkat細胞 (ATCC) を、10% FBS及び2 mM L-グルタミンを補足したRPMI-1640 (Corning) 中で培養する。細胞を採取し、アッセイ培地 (5% FBS及び2 mM L-グルタミンを補足したRPMI-1640) で生育させ、96ウェル組織培養処理プレート (Greiner Bio-One) のウェルに蒔く。その後、Jurkat細胞をPHA-L (Sigma) 及び組み換えヒトB7.1タンパク質 (R&D Systems) を用いて共刺激する。一定濃度の組み換えヒ

トCTLA-4タンパク質(R&D Systems)を、タイトレーションした抗ヒトCTLA-4と混合した後、該溶液を刺激したJurkat細胞に添加し、37℃、5%CO₂の加湿したインキュベーターで2日間～3日間インキュベートする。上清を採取し、IL-2デュオセット検出キット(R&D systems)を使用してIL-2レベルを測定する。測定したIL-2をグラフで示し、抗ヒトCTLA-4のEC₅₀をPrismで計算する。

【0080】

上記のアッセイをマウスCTLA-4の抗体及びタンパク質で実行した。結果を図4に表す。

【0081】

VIII. 腫瘍及びマウス

B16. F10マウスメラノーマ細胞(CRL 6475; メリーランド州ロックヴィルのAmerican Type Culture Collection)を10% FCS及び0.2%ゲンタマイシンを補足したダルベッコ最小イーグル培地(DMEM)で維持する。細胞をトリプシン処理し、注入前に無菌PBSで洗浄する。C57BL/6マウス(メリーランド州ベテスダのNational Cancer Institute)の左脇腹を剃毛し、50mlの無菌PBS中、 1×10^6 細胞を皮下注入する。チャレンジの際、マウスに 5×10^5 のB16. F10細胞を右脇腹に注入する。デジタルカリパスを使用して腫瘍を測定し、腫瘍が注入の7日後～10日後に直径3mm～5mmに達したら、治療を開始する。マウスをAALACガイドラインに従って収容する。

【0082】

IX. プラスミドDNA

チェックポイント阻害剤(例えばアンタゴニスト抗体又はそのフラグメント)及びIL-12をコードするDNAを含むpUMVC3プラスミド(ALDEVERON)を作製する。チェックポイント阻害剤を含むpUMVC3を、エンドトキシンフリーのキットで作製する。全てのプラスミドDNAを無菌注射用生理食塩水(0.9%)で希釈し、-20℃で保存する。

【0083】

X. 腫瘍内治療

マウスを97%の酸素及び3%イソフルランを使用して麻酔する。25ゲージ針を備えるツベルクリン注射器を使用して、無菌の生理食塩水中のプラスミドDNA 50μL(1.0μg/ml)を腫瘍に注入する。6本の直径1cmの貫通電極を備えるアプリケーションを腫瘍に挿入する。最大6回のパルス、適切なパルス発生器を使用して1500V/cm(99its、1Hz)で送達する。

【0084】

XI. 組織学

マウスをCO₂窒息によって人道的に屠殺する。腫瘍を切除し、10%ホルマリン10mlを含む50mlの円錐管に入れる。固定後、組織をH&Eで次のように染色する: 10%の中性緩衝ホルマリン中で6時間固定した後、代表的な組織試料をMiles VIP組織プロセッサ(インディアナ州ミシャウオーカのMiles Inc.)を使用して、パラフィンブロックへと加工する。簡潔には、組織を上昇グレードのエタノールで脱水し、キシレンで透徹し、パラフィン(Tissue Prep 2; Fisher Scientific)中で浸透させる。包埋の後、組織を標準的な回転ミクロトームで切片にして、4mmの切片を水浴から回収し、スライドガラスに置く。1つの腫瘍当たり3枚の切片を調べる。切片を熱乾燥し、標準的な組織学の技術を使用して、H&E(ミシガン州カラマズーのRichard-Allen Scientific)で染色する。

【0085】

XII. 免疫組織化学

次の抗体、それぞれ、ラット抗マウスCD4、ラット抗マウスCD8(Ly2)及びラット抗マウスCD31(PECAM-1)(マサチューセッツ州ケンブリッジのPharMingen)を使用して、CD4+リンパ球、CD8+リンパ球及び血管の存在について腫瘍を調

10

20

30

40

50

べるため免疫組織化学染色を行う。マウスをCO₂窒息によって人道的に屠殺する。腫瘍をハサミで切除し、皮膚を除去してドライアイス及びエタノールの混合物で直ちに80℃で凍結保存する。5mの凍結切片を得る。免疫組織化学分析のため、ラット抗マウスCD4、ラット抗マウスCD8 (Ly2) 又はラット抗マウスCD31 (PECAM-1) を、1:50の希釈で組織切片に塗布して30分間インキュベートした後、2倍濃度のVector EliteラットIgGペルオキシダーゼキットで検出する(ビオチン化抗ラットIgG及びABC複合体において各15分間)。免疫染色をDako自動染色機で行う。切片を400倍の倍率で分析する。

【0086】

XII. 臨床研究番号第1番—三種陰性 (Triple Negative) 乳癌における腫瘍内のIL-12

本研究は、直後に電気穿孔が続くpIL-12の腫瘍内注入の薬力学的効果を評価した。患者を米国の1つの研究センターから集めた。生検のアクセスが可能な三種陰性乳癌 (TNBC) の最低10名の患者をこの研究で治療した。全ての患者が単回の28日間の治療サイクルを受けた。スクリーニング中、研究者は、治療していないままの(すなわち、注入されておらず、電気穿孔を受けていない) 1つの対照病変を選択した。非治療対照病変は、最長径が少なくとも0.5cmであり、生検のアクセスが可能であった。治療を1日目、5日目及び8日目に適用した。スケジュールリングの制約を融通するため、各予定された治療に対して±2日の期間を認めた。以下に定義されるように各予定された病変に対し、治療を適用した。治療は、直後に電気穿孔が続くpIL-12の腫瘍内注入(複数の場合もある) からなつた。治療サイクルの終わりに、患者は、総括的な安全性評価及び腫瘍生検サンプリングのため再度病院を訪れた(最後の研究訪問)。最後の研究(EOS) 訪問は、いかなる新たな抗癌療法/治療計画も始める前に、及び最後のIT-pIL-12-EP治療の20日間以内(±2日)に行われた。

【0087】

患者は、局所的に重度の、手術のできない、転移性の及び/又は治療難治性の(treatment-refractory) 三種陰性乳癌 (TNBC) の組織学的に確認された診断を有した。治療難治性の疾患は、化学療法、放射線、及び/又は手術、又はそれらの任意の組み合わせを含み得る、少なくとも1つの事前の介入に続く、腫瘍病変の持続として定義される。患者は、5%未満のER及びPRの両方の染色を有し、かつHER2陰性[免疫組織化学0~1+又は蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH) 陰性] でなくてはならない。5%~10%のER又はPRの染色を有するが、TNBCとして歴史的に治療されていた患者もまた登録された。患者は、研究者の見解では、治癒の可能性のある治療に適用可能であるとされる疾患を有してはならなかった。患者は、米国東海岸癌臨床試験グループ(ECOG) のパフォーマンスステータス0~1を有し、年齢18歳以上であり、少なくとも6ヶ月の平均寿命を有していなければならなかった。患者は、放射線療法を行っていてもよいが、治療される病変が放射線照射野にあった場合、放射線療法の後に進行性の疾患を有していなければならない。さらに、放射線治療は、サイクル1の1日目の少なくとも4週間前に完了されなければならない。患者は、皮膚又は皮下の疾患として定義される注入及び電気穿孔にアクセス可能な病変を有していなければならなかった。患者は、生検のアクセスが可能な少なくとも2つの解剖学的に異なる病変を有していなければならなかった。これらの病変のうちの1つは、治療していないままであり、免疫原性の増加のバイオマーカーについて評価された。

【0088】

IL-12 cDNAを発現するDNAプラスミドベクター(「pIL-12」と呼ばれるpUMVC3-hIL-12-NGVL331) は、単一のCMVプロモータによって制御される内部リボソームの進入部位によって分離されたヒトIL-12のp35及びp40サブユニットを含んだ。in vivo EPに続く直接の腫瘍内注入に対し、リン酸緩衝食塩水(PBS) 中にpIL-12を配合した。GMPグレードのpIL-12はVGXI USAによって製造され、利用可能なバッチは0.5mg/mLの濃度で2.0mL

バイアルとして1.5 mLの充填容量で供給される。未開封のp I L-12のバイアルを、薬局若しくは他の適切な安全な場所の安全で継続的に温度監視がなされる警報を備える冷蔵庫において $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ で保存した。温度の規定外変動が起こると、p I L-12プラスミドを研究治療のために利用する前に、治験依頼者に通知された。試験薬剤の受取及び調剤を、治験実施施設で認可された人によって記録した。臨床供給は、プロトコルで述べられた以外のいかなる目的にも使用されなかった。

【0089】

プラスミド注入に先立って、無菌操作法 (sterile precautions) を使用して、局所麻酔を得るために1%リドカインを病変の周囲に注入した。臨床上指定され、臨床上最適とされる代替的な局所麻酔薬を使用した。さらに、治療に先立って、又は治療中に必要に応じて、患者に鎮痛剤又は抗不安剤を与えた。不快を軽減するために病変に局所麻酔を直接注入した場合、プラスミドを注入する前に組織拡散を生じさせるため最低2分間おいた。大規模な疾患を有する患者に関する状況では、患者の不快をより良好に管理し最小限にするために、治療する研究者の判断で意識下鎮静を利用した。意識下鎮静を治験ガイドライン及び要件により行った。

【0090】

アクセス可能な病変にプラスミド溶液を注入した後、円形に配置された6本のステンレス鋼電極を備える無菌アプリケータを腫瘍の周りに置いた。アプリケータを電源に接続し、 $1500\text{ V} / \text{cm}$ の電場強度 (E+) 及びパルス幅 $100\text{ }\mu\text{s}$ の6回のパルスを1秒間隔で予め注入した各腫瘍に適用した。電気穿孔パルスは、6本の六角形に向かい合った針電極間で行われた。第1のパルスの後、向かい合った針電極対の間の極性を逆にし、針対に再びパルスが送られる。最初の一対のパルスの後、合計6回のパルスを送達して電気穿孔シーケンスを完了するまで、パルス送達を次の向かい合った針対まで時計回りに回転させた。一旦病変を完全に治療すると、次の腫瘍に注入し、直ちに電気穿孔を行った。追加の構造マッピングが適切となる場合には、病変の治療に対して超音波誘導の使用が推奨される。

【0091】

プラスミド溶液を $0.5\text{ mg} / \text{mL}$ の濃度で投薬した。腫瘍サイズを、患者一人当たり1つの病変当たりの全投薬量を計算するために使用した。各バイアルの未使用部分を承認されたバイオハザードコンテナに廃棄し、治験の要件により処分した。投薬の日 (治療サイクルの1日目、5日目及び8日目)、研究所の薬剤師又は主任研究者によって認定された指定職員が、融解のため -20°C の冷凍庫から必要数のp I L-12バイアルを取り出した。解凍したら、投薬溶液を無菌的に調製した。被験者への投薬溶液の投与は、調製から8時間以内であった。プラスミドの保存、取り扱い及び調製に関する更なる詳細については、Pharmacy Manualを参照されたい。

【0092】

最初の調査でアクセス可能な病変 (AL) を決定した。治療するALを治療サイクルに先立って選択し、センチメートル単位で測定した。各病変に対するプラスミド注入量 (P) を次式で計算した： $P = ab^2 / 8$ 。

【0093】

上記式中、(a) はセンチメートル単位の最長径であり、(b) は (a) に対して直行する直径である。病変は、それぞれ 0.1 mL の最小のプラスミド注入量を受けた。計算されたP量が 0.1 mL 未満の小さな病変については、 0.1 mL の最小量を投与した。治療する病変の最大数の規定はなかったが、1日当たり患者一人当たりの合計プラスミド注入量は 20 mL を超過することはなかった。適切な場合、針の空所を占めるため計算したプラスミド注入量に 0.1 mL を追加して各治療用シリンジを充填した。また、サイクルの1日目に治療される各病変を、そのサイクルの5日目及び8日目に治療した。より大きな病変については、プラスミド注入及び電気穿孔を、腫瘍の最も免疫学的に活性な部分であると考えられる腫瘍の周縁部に向けた。

【0094】

個々の被験者は、患者が3回全てのI T - p I L - E P治療（1日目、5日目、8日目）を全て受けた場合に研究を完了したとし、全ての必要な治療前及び治療後の腫瘍生検材料を得て、E O S安全性フォローアップ評価を行った。研究参加の期間は、各患者についておよそ4週間であった。最後の患者が全ての必要な治療を完了し、E O S安全性フォローアップ評価を終えると、研究を完了した。合計の研究期間は、およそ12か月であると予想された。全ての被験者の登録におよそ10ヶ月間を要した。

【0095】

スクリーニングでは、研究者は、皮膚又は皮下の疾患として定義される、注入及び電気穿孔に対してアクセス可能な病変（複数の場合もある）を同定した。アクセス可能な病変は、電気穿孔針アレイにより表面から到達することができるものであった。針アレイのプローブは、1.5cmの深さまで達した。電気穿孔の適用に適しており、安全な位置にある、記録されたアクセス可能な病変のみが、治療適格であった。同じアクセス可能な病変を、治療サイクルの1日目、5日目、及び8日目に治療した。

【0096】

スクリーニングでは、研究者は治療していないままの（すなわち、注入されておらず、電気穿孔を行っていない）1つの解剖学的に異なる病変を対照病変として指定した。この対照病変は生検のアクセスが可能であった。

【0097】

全ての患者は、分子及び組織学の分析のために各々の2つの別々の時間点（治療前及びE O S）に研究に特有の腫瘍生検に同意した。少なくとも1つの生検試料がスクリーニングで必要であり、追加の生検は任意であり、実行可能な場合に得られた。1つの治療していない病変（対照病変）及び少なくとも1つの治療された病変の1セットの治療後生検試料をE O Sで得た。E O Sに先立って、腫瘍病変の退縮又は増悪のいずれかの兆候を有する患者に対し、腫瘍生検試料を腫瘍変化の最初の徴候の際に要求した。研究者の判断により、生検試料の収集を促し、集めた試料が分析に十分な量の腫瘍を含むことを確実にするため、病理学コア調査チームを利用することができた。全ての得られた生検試料を、多重パラメーター免疫組織化学（I H C）及びN a n o s t r i n g（商標）によって腫瘍浸潤リンパ球（T I L）、I L - 12発現及び増強された免疫学的又は免疫原性の表現型の他のマーカーの存在について評価した。追加のバイオマーカーの評価を、出現するデータに基づいて行った。バイオマーカー分析は、患者の腫瘍の適切で代表的なサンプリングを含む、治療前及び治療後の生検材料の比較を必要とする。生検試料が十分な量の腫瘍を含んでいない場合、適切であれば、治験依頼者は以下を要求した：スクリーニング／ベースラインの腫瘍サンプリングが不適切である場合、スクリーニングの前90日以内に得られ、かつその間の癌に対する全身治療の適用のない、記録された腫瘍組織；E O S訪問の際の腫瘍サンプリングが不適切な場合、治療及び／又は非治療病変の追加の生検材料を得るための患者からの許可。

【0098】

本研究の主目的は、炎症促進性分子及び組織学的な兆候を局所的に及び全身の両方で促進するI T - p I L 12 - E Pの可能性を評価することであった。これを、ベースライン（すなわち、治療前）のT I Lの存在を治療後の生検と比較することにより評価した。

【0099】

一対の腫瘍生検試料は、V E C T R A免疫組織化学プラットフォーム（Perkin-Elmer）による（6 - p l e x I H C）法であった。このプラットフォームは、ロバストな定量的スライドベースの免疫表現型検査を容易にするための技術水準の画像分析能力と共に、各抗体からの光学信号を分離するためのスペクトルデコンボリューションイメージング（spectral deconvolution imaging）を採用する。データを、集団中の合計陽性細胞、陽性細胞数/mm²又は陽性細胞パーセンテージの形態で生成した。各試料を、隣接する組織切片を使用して、3セットの6多重染色で染色した。T I L分布（すなわち、腫瘍内、間質、及び境界／侵入周縁部）の定量的分析を行った。

【0100】

I L-12の形質導入の成功は、限定されないが(1)インターフェロン-ガンマ(I F N γ)及びI F N γ 下流標的遺伝子の上方制御、(2)抗原提示及びプロセッシング機構(A P M)、すなわちT I L、具体的にはNK細胞及びC D 8⁺ T細胞の流入／拡大を反映する細胞系列特異的遺伝子の上方制御を含む免疫学的活性の幅広い遺伝子発現パターン特性をもたらすと仮定される。N a n o S t r i n gに基づく遺伝子発現プロファイルの比較を、スクリーニング時及び治療後に得られた一対の腫瘍試料により完了した。インターフェロン経路活性化、抗原提示及びプロセッシング機構(A P M)の上方制御、並びに免疫細胞浸潤を反映する特定の転写産物のサブセットを含む、免疫学的に重要なm R N A種に対するおよそ600のプロンプを提示する、N a n o S t r i n gのヒト免疫学パネルをこの分析に使用した。これらは、限定されないが、C D 3 e、C D 8 a、P D-1、P D-L1、C T L A-4、I F N- γ 、C C R 5、I D O-1、C X C L-10、C X C L-11、I R F-1、及びC D 80を含む。データを正規化し、標的転写産物の有無について評価した。各試料(およそ50ng)から抽出したR N Aを、n C o u n t e r(商標)G Xヒト免疫学v2パネルを使用して実行した。データを正規化し、標的転写産物の有無について評価した。成果の変化を、対データ中の治療前及び治療後の試料より評価した。

10

【0101】

主要エンドポイント分析の後の腫瘍組織の有効性に基づいて、以下の評価を行う：

【0102】

マルチパラメータフローサイトメトリー分析

20

I T-p I L 12-E P治療がT I Lの増加を導くという仮説を検証するための腫瘍組織試料の詳細なフローサイトメトリー免疫表現型検査を行う。T I Lを治療前及び治療後の腫瘍試料から単離し、3種の免疫表現型検査抗体パネル(表2)で染色する。マルチレーザーフローサイトメーターを使用して生存細胞を分析し、F L O W J O単一細胞分析ソフトウェア(FlowJo, LLC)を使用して分析する。

【0103】

X I I. 臨床研究番号第2番-黒色腫の腫瘍内I L-12治療及びチェックポイント阻害剤による後治療

この第2相試験は、重度の黒色腫における腫瘍内I L-12プラスミド電気穿孔の安全性、抗腫瘍活性及び免疫学的効果を評価した。患者は、各90日の治療サイクルの1日目、5日目及び8日目に治療、すなわちアクセス可能な病変へのプラスミド注入／電気穿孔を受けた。各治療サイクルの後に奏功を評価した。安全性評価(臨床試験及び実験室での評価)を治療法の開始に先立って、及び一定間隔で、全ての治療した患者に対して行った。有害事象の重症度を、N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e C o m m o n T e r m i n o l o g y C r i t e r i a f o r A d v e r s e E v e n t sのバージョン4.0に従って採点した。

30

【0104】

適格な患者は、注入／電気穿孔のアクセスが可能な少なくとも1つの皮下又は皮膚の病変を伴う、ステージI I I B/C又はI Vの病理学的に裏付けられた転移性黒色腫を有した。患者は、米国東海岸癌臨床試験グループ(E C O G)のパフォーマンスステータス2以下を有し、適切な腎臓、肝臓、骨髄の機能を有していなければならなかった(正常上限の2倍未満のクレアチニン、制度上の正常限界内のビリルビン、好中球絶対数1000/mm³超、及び血小板数100000/mm³超)。電子ペースメーカーを有する患者を研究から除外した。

40

【0105】

プラスミドp U M V C 3-h I L-12-N G V L 331をV G X I Incorporated(テキサス州ザ・ウッドランズ)において、優良医薬品製造基準(G M P)の条件下で製造し、最終濃度2.1mg/mLで無菌のバイアルに供給し、-80℃で保存した。使用前に、プラスミドを4℃に解凍し、必要濃度である0.5mg/mLまで無菌の生理食塩水で希釈した。

50

【0106】

リドカインを各腫瘍部位の周辺に塗布し、治療前に全ての患者に対して静脈内の鎮痛剤（硫酸モルヒネ）及び／又は抗不安剤（ロラゼパム）の投与を行った。プラスミド溶液を、腫瘍結節中に25ゲージ針を使用して注入した。円形に配置された6本の針電極を備える無菌のアプリケータを腫瘍に挿入し、OncoSec Medical Electrototherapy System（カリフォルニア州サンディエゴのOncoSec Medical Inc.）を使用して、1500V/cmの電場強度及び100μsのパルス持続時間で6回のパルスを印加した。治療を1日目、5日目及び8日目に行った。

【0107】

プラスミドを0.5mg/mLで投与した。プラスミド注入量を、式 $P = V / 4$ （式中、Pはプラスミド注入量であり、Vは推定腫瘍体積である）を用いて計算した。腫瘍体積を式 $V = a b^2 / 2$ （式中、aは最長径であり、bは任意の寸法のaに対して直行する次に長い径である）を使用して推定した。1mLの最大プラスミド注入量（最大0.5mgのプラスミド）が治療1日あたりに許容され、1個～4個のアクセス可能な病変に対して分布される。

10

【0108】

全奏効率に関する主要エンドポイントに対する疾患評価を、in-transitの皮膚及び皮下の転移性黒色腫に対する腫瘍量の測定を可能とする修正された固形癌効果判定基準（RECIST）、すなわち修正「皮膚」RECISTによって判断した。ベースラインでの腫瘍量は、患者の疾患状態の正確な計算を可能とするため、最大数の皮膚病変によらず、臨床検査及びCTによって測定された病変を含んだ。治療後の疾患評価における新たな病変は、腫瘍量に追加され、進行性疾患（PD）を示さなかった。進行性疾患（PD）は少なくとも90日間の腫瘍量の20%以上の増加によって定義され、安定状態（SD）は20%未満の腫瘍量の増加によって定義される。部分奏功（PR）は、腫瘍量の30%以上の減少によって定義され、完全奏功（CR）の患者は完全な放射線学的及び臨床学的な評価による疾患の兆候を有していなかった。

20

【0109】

皮膚病変に対する修正された免疫関連効果判定基準（irRC）による全奏効率を、二次奏功エンドポイントとして評価した。注入／電気穿孔した病変、及び注入／電気穿孔していない病変の個々の病変の局所及び遠隔の退縮率を判断した。客観的奏功までの期間、無増悪期間（TTP）、奏功期間（DOR）、及び無増悪生存期間（PFS）を、効力を評価することができる集団で判断した。

30

【0110】

長期フォローアップ及び生存。

患者は、最長5年間、増悪、粗生存率及び治療後療法について、研究停止による一定間隔でフォローを受けた。

【0111】

特定の患者では、無治療インターバル後に、抗PD-1又は抗PD-L1療法を適用した。上に記載される奏功について、患者を再び評価した。表3は、プラスミドIL-12電気穿孔に続く追加のチェックポイント阻害剤療法を受ける患者の遡及的分析を要約する。

40

【0112】

【表 6】

表 3：連続的プラスミド I L-12 電気穿孔チェックポイント阻害療法の臨床分析

患者 I D 番号	最終 E P 治療から抗 P D-1 療法開始までの間隔 (日)	抗 P D-1 / P D-L1 療法の名称 (例えば、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、イピリムマブ)	奏功 (C R = 完全奏功、P R = 部分奏功、S D = 安定状態、P D = 進行性疾患)	インターバル中の治療
100-001-003	188	ペンブロリズマブ	CR	なし
100-001-006	189	ペンブロリズマブ	PD	なし
100-001-012	98	ペンブロリズマブ	CR	なし
100-001-013	121	ペンブロリズマブ	CR	なし
100-001-014	617	ペンブロリズマブ	PR	有り
100-001-015	49	ペンブロリズマブ	CR	なし
100-001-020	112	ペンブロリズマブ	SD	なし
100-001-102	68	MEDI4736、トラメチニブ	PR	なし
100-001-106	74	ペンブロリズマブ	PR	なし
100-001-109	34	ペンブロリズマブ	SD	なし
100-001-110	34	ニボルマブ、イピリムマブ	PD	なし
100-001-111	36	ペンブロリズマブ	PR	なし
100-001-112	N/D	ペンブロリズマブ	PD	なし
100-001-113	21	ペンブロリズマブ	CR	なし

【0113】

全身の P D-1 阻害剤治療に加えて、患者を、約 20 日間～120 日間の後のインターバルを伴ってプラスミド I L-12 による電気穿孔で同時に治療し、例えばインターバルに続いて、チェックポイント阻害剤、例えば抗 P D-1、抗 P D-L1 を使用する治療を、単独で又はプラスミド I L-12 電気穿孔の別のサイクル（1 日目、5 日目及び 8 日目の治療）と組み合わせて適用する。

【0114】

X I V. 臨床研究番号第 2 番に対する追加

上に記載される最初の第 2 相研究に対する追加プロトコルを開始して、より頻繁な治療計画で治療した患者における I T-I L12-E P の同様の安全性、抗腫瘍活性及び免疫学的効果を評価した。患者は、後のサイクルを含めて 6 週毎に 1 日目、8 日目、及び 15 日目に治療を受けるか（治療計画 A）、又は、最大で合計 9 治療サイクルの間 6 週毎に 1 日目、5 日目及び 8 日目に治療を受けた（治療計画 B）。研究集団を割り当てた治療計画に従って治療計画 A、治療計画 B、及び治療計画 A / B にグループ分けした。治療計画 A / B の患者は、治療計画 A を受ける研究を開始したが、その治療計画を研究に参加している間に治療計画 B に変更した患者を含んでいた。奏功を 12 週毎に評価し、安全性評価を治療法の開始に先立って、一定間隔で実施した。

【0115】

p I L-12 ベクター及びその調製物の用量は同じであったが、修正で使用するベクターを、生理学的に適合性のバッファー、例えば直接の腫瘍内注入に対する注射用リン酸緩

衝液 (s W F I) 中に配合した。

【0116】

X V. 臨床研究第3番—腫瘍内 I L - 1 2 電気穿孔及びチェックポイント阻害剤の組み合わせによる黒色腫の治療

これは、黒色腫を有する患者におけるペンブロリズマブと組み合わせた腫瘍内 p I L - 1 2 E P の多施設、第 I I 相、非盲検、単一群試験である。評価可能な患者 (n = 4 2) は、腫瘍内 p I L - 1 2 E P の第1のサイクルの後にペンブロリズマブによる治療を開始する。ペンブロリズマブを、サイクル2から開始して、3週毎に 2 0 0 m g の一律の用量 (flat dose) で投与する。患者が E P に対してアクセス可能な病変を有する限り、腫瘍内 p I L - 1 2 E P (各サイクルとも1日目、5日目及び8日目の治療からなる) のサイクルを6週毎に行う。12週毎に奏功について患者を評価する。患者が、疾患評価の際に研究者による評価のもと定義される安定状態又は改善 (better) を有する場合、患者は治療法を継続する。疾患が増悪するか又は毒性が許容できなくなるまで治療法を施す。研究者の評価により、R E C I S T v 1. 1 又は修正 R E C I S T を使用して、p I L - 1 2 E P 及びペンブロリズマブによる第1の治療の24週間以内の最良総合効果 (Best overall response rate) (B O R R)、すなわち C R + P R を決定し、同様の集団における単独療法としてのペンブロリズマブに対する既存効果 (historical rates) と比較する。さらに、安全性及び認容性として定義される有害事象を、N C I C T C A E のバージョン 4. 0 を使用して評価する。この試験で対処された他のエンドポイントは、C R 又は P R、24週間の画期的な無増悪生存率 (治療開始日から疾患増悪又は24における死亡のいずれかの最初の日までの期間によって定義される P F S)、全生存期間 (O S) 及び最良総合効果 (C R + P R) を経験する者に対する奏功期間 (D O R) を含む。

【0117】

治療目的で確定的な局所療法に適さない進行性の局所的に重度の疾患又は転移性疾患を伴う黒色腫の患者が適格である。患者は、3以上の可視的で治療可能な病変が存在する場合に、治療していない病変を有することが意図される。さらに、患者は、治療目的を伴う確定的な局所療法に適さない進行性の局所的に重度の疾患又は転移性疾患を伴う黒色腫の組織学的診断又は細胞診を有していなければならない。また研究者の評価による腫瘍内注入及び E P のアクセスが可能な少なくとも1つの腫瘍を有していなければならない。患者は、研究治療の第1の投薬の4週間前に全ての先の治療法を停止して (6週間前にイピリムマブを停止しなければならない) 事前の化学療法又は免疫療法又は放射線療法を行ってもよい。患者は、研究治療の第1の投薬に先立って30日以内に生ワクチンを受けること、又は研究の間、全身化学療法、生物学的療法、このプロトコルで指定されていない免疫療法を含む他の形態のいかなる抗腫瘍療法も使用することを禁じられる。

【0118】

プラスミド p U M V C 3 - h I L - 1 2 - N G V L 3 3 1 を、VGXI Incorporated (テキサス州ザ・ウッドランズ) において優良医薬品製造基準 (G M P) の条件下で製造し、直接腫瘍内注入に続く i n v i v o E P に対してリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中に配合する。プラスミドを、0. 5 m g / m L の濃度、1. 5 m L の充填容量で2. 0 m L バイアルとして供給する。

【0119】

プラスミド注入に先立って、局所麻酔を得るため、病変又は I T - p I L - 1 2 E P が意図される全ての病変の周辺に、無菌操作法を使用して、1%リドカインを注射してもよい。さらに、治療に先立って又は治療中、必要に応じて、患者に鎮痛剤又は抗不安剤を与えてもよい。アクセス可能な腫瘍にプラスミド溶液を注入した後、円形に配置された6本のステンレス鋼電極を備える無菌のアプリータを腫瘍の中に、又はその周囲に配置する。アプリータを電源に接続し、1500 V / c m の電場強度 (E +) 及びパルス幅 1 0 0 μ s の6回のパルスを1秒間隔で予め注入された各腫瘍に適用する。腫瘍内の p I L - 1 2 注入に続く E P は、方形波パルスパターンで制御された電気パルスを送達し、o c c u r 3 9 への電気穿孔に最適な膜電位差を生じる。電気穿孔パルスは、6本の六角形に

向かい合った針電極間で行われる。第1のパルスの後、向かい合った針電極対の間の極性を逆にし、針対に再びパルスが送られる。最初の一对のパルスの後、合計6回のパルスを送達して電気穿孔シーケンスを完了するまで、パルス送達を次の向かい合った針対まで時計回りに回転させた。同じ日に複数の腫瘍に注入される場合、各腫瘍のプラスミド注入直後にEPを行わなくてはならない。一旦腫瘍を完全に治療すると、次の腫瘍にプラスミドを注入し、直ちに電気穿孔を施すことができる。

【0120】

全ての試験治療を、外来患者方式で適用する。腫瘍内pIL-12を、サイクル1に対して単独の薬剤として与える。その後、奇数サイクル3から開始して、腫瘍内pIL-12を最初に与えた後、2つの治療の間、最低60分間の観察期間が続く。

10

【0121】

被験者が治療に対して少なくとも1つのアクセス可能な表在性の病変(ASL: accessible superficial lesion)を有する限り、後にEPが続く腫瘍内pIL-12を各奇数サイクルで投与する。ASLは次の基準、(1)最長の直交径が少なくとも0.3cm×0.3cmであること、(2)電気穿孔の適用に適した位置にあることを満たすものとして定義される。被験者が複数のASLを有し得る場合、(1)患者の認容性、及び(2)20mLの最大一日投与量を超過しないことに留意して、最大数の病変を各サイクルで治療すべきである。pIL-12 EPの新たな治療サイクルの開始に先立って、研究者は、そのサイクル中の治療に対してASLを決定する。サイクルの各日(すなわち1日目、5日目及び8日目)において同じASLを治療すべきである。1日当たり患者一人当たりの最大のプラスミド注入量が20mLを超過しない限り、ベースラインに存在する以前に治療されて以前に同定された、治療されていない病変、及び研究期間中に出現する、ASLの定義に合致する新たな病変を治療してもよい。ASLが後のサイクルで存在しない場合、被験者は、pIL-12のそのサイクルを飛ばして、研究日程を継続してもよい。実行可能であれば、治療していない病変の生検を可能とするため、1つの病変をサイクル1の間、治療せずに維持する(6.1.2.3セクションを参照されたい)。

20

【0122】

ペンブロリズマブ(ニュージャージー州のMerck & Co.)は、PD-1とそのリガンドであるPD-L1及びPD-L2との間の相互作用を直接遮断するように設計されたIgG4/カッパアイソタイプの強力で非常に選択的なヒト化mAbである。この抗体は、各用量200mgで患者に静脈内投与される、100mg/4mLの注射用に溶液で供給される。ペンブロリズマブは、全ての処置/評価が完了した後のサイクルの1日目(±3日)に、全てのサイクルの開始時(IT-PIL-12のみのサイクル1の後)に投与されなければならない。ペンブロリズマブは、30分間の静脈内点滴として投与される(治療サイクルの間隔は、5.2セクションに記載されるように毒性により増加される場合がある)。

30

【0123】

この研究の奏功及び増悪は、固形癌効果判定基準(RECIST)委員会[JNCI 92(3):205-216, 2000]によって提案される新たな国際基準を使用して評価される。腫瘍病変における最大径のみの変化(一次元測定)をRECIST v1.1又は修正RECIST基準において使用する。

40

【0124】

測定可能な疾患:

2面における直交径で正確に測定することができる新生物性腫瘍。その最長径及びその最長の直交線の両方が10mm以上でなくてはならないか、又は軸方向のスライス厚が2倍でなくてはならない。リンパ節は、15mm以上の短軸線長を有していなければならない。悪性リンパ節は、2つの直交径において測定可能でなければならない。その最長径及びその最長の直交線の両方が15mm以上でなくてはならないか、又は軸方向のスライス厚が2倍でなくてはならない。量的エンドポイントは、最長径とその最長の直交線との積として定義される。

50

【0125】

測定不可能な疾患：

測定不可能な病変は、経時的な量的評価に適していないものである。これらは以下を含む：

【0126】

1. それらの連続した最長径又は最長の直交線が10mm未満であるか、又は軸方向のスライス厚の2倍未満であるため、小さすぎて測定が不可能な新生物性腫瘍。

【0127】

2. その境界を識別することができない新生物性腫瘍。これは、不適切な造影、過度に複雑な形態を有する腫瘍、又は非常に不均質な組織組成のため、取り囲んでいる組織と区別することができない腫瘍を含む。

10

【0128】

3. 新生物の組織を表すと確信されるものの再現可能に定量することが困難な他の種類の病変。これらは、骨転移、軟膜髄膜転移、悪性腹水、胸膜／心外膜液貯留、炎症性乳房疾患、皮膚／肺リンパ管炎（lymphangitis cutis/pulmonis）、嚢胞性病変、輪郭が不明確な（ill defined）腹部腫瘍等を含む。

【0129】

さらに、現在のプロトコルに対する修正された免疫関連効果判定基準（irRC）をWolchok et al (2009)から採用し、二次的な目的の評価に使用することができる。irRCについて、ベースラインで選択された標的病変及び測定可能な新たな病変だけが、考慮に入れられる。

20

【0130】

安全性フォローアップの完了に際して、全ての患者は、更なるデータ収集に対する同意を撤回しないか、又は安全性要件が満たされる限り、生存フォローアップ相に登録する。放射線学的なモニタリングを、（1）新たな抗癌治療の開始、（2）実証された疾患の増悪、又は（3）死亡のいずれかが最初に起こるまで継続する。臨床上指定されるように、又はケアのローカル規格ごとに、フォローアップにおけるX線写真の画像化を行ってもよい。長期フォローアップの調査として以下が挙げられる。

【0131】

第1の増悪（第1の増悪がフォローアップ相への登録に先立って生じていない場合）の日付

30

【0132】

黒色腫の治療に対するフォローアップ療法（放射線、抗癌治療、アジュバント療法又は手術を含む）。

【0133】

生存フォローアップへの登録時に増悪中のAE及びSAEの分析（Resolution）

【0134】

状態（生存、疾患の兆候なし、疾患を伴って生存、死亡）

【0135】

死因及び死亡日（適用可能な場合）

40

【図 1】

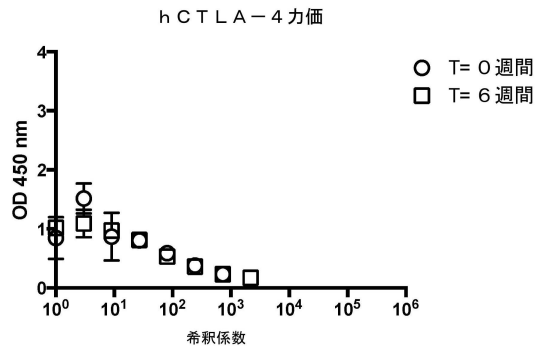


FIG. 1

【図 2】

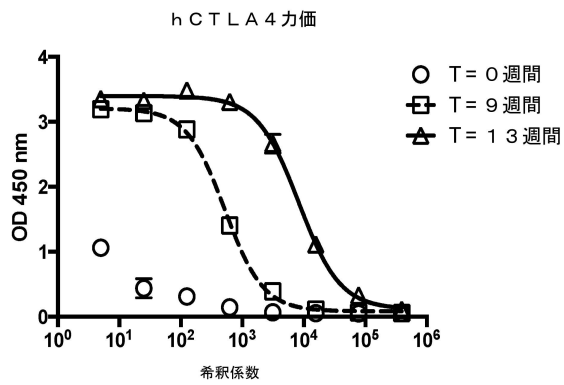


FIG. 2

【図 3】

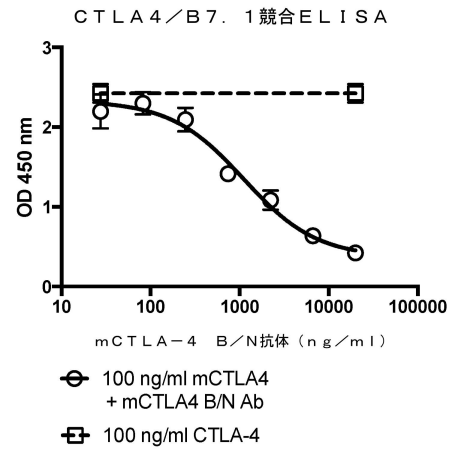


FIG. 3

【図 4】

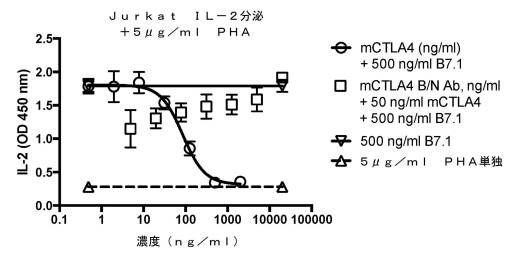


FIG. 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/20 (2006.01) A 6 1 K 38/20

(72)発明者 ダウド アディル
アメリカ合衆国 9 4 0 1 0 カリフォルニア ヒルズボロウ ブラント ロード 1 3 2 0

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 特表2015-505813 (JP, A)
特表2007-501283 (JP, A)
特開2006-340714 (JP, A)
Journal of Translational Medicine, 2015年 1月15日, Vol.13, Suppl.1, Article 01
1
Journal of Biomedical Science, 2003年, Vol.10, pp.73-86

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 38/00-38/58
A 6 1 K 39/00-39/44