202217002

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202217002 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：110125715 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 07 月 13 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/86 (2006.01)* *A61K38/20 (2006.01)*
A61K39/12 (2006.01) *A61P37/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/07/13 歐洲專利局 20305798.9

(71)申請人：法商傳斯堅公司 (法國) TRANSGENE SA (FR)
法國

(72)發明人：英賈斯皮 吉尼維弗 INCHAUSPE, GENEVIEVE (FR)；馬汀 皮瑞尼 MARTIN, PERRINE (FR)；梁騰龍 史蒂芬 LEUNG-THEUNG-LONG, STEPHANE (FR)；里盧仙杜納拉 卡瑞琳 LELU-SANTOLARIA, KARINE (FR)；埃拉切夫 阿列克謝 EVLACHEV, ALEXEI (FR)；寇佩特 查爾斯安托萬 COUPET, CHARLES-ANTOINE (FR)；雷 奧雷利 RAY, AURELIE (FR)；杜波依斯 克拉麗絲 DUBOIS, CLARISSE (FR)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：39 共 166 頁

(54)名稱

免疫抑制之治療

(57)摘要

本發明係在免疫療法領域中。本發明提供包含編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽之核酸分子的非繁殖病毒載體，其中該非繁殖病毒載體係用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制。

The present invention is in the field of immunotherapy. The invention provides non-propagative viral vectors comprising a nucleic acid molecule encoding at least a polypeptide having an IL-7 activity, wherein said non-propagative viral vector is for use in the treatment of immune depression induced by sepsis, burn, trauma, major surgery, senescence and/or coronavirus.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

免疫抑制之治療

【英文發明名稱】

TREATMENT OF IMMUNE DEPRESSION

【中文】

本發明係在免疫療法領域中。本發明提供包含編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽之核酸分子的非繁殖病毒載體，其中該非繁殖病毒載體係用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制。

【英文】

The present invention is in the field of immunotherapy. The invention provides non-propagative viral vectors comprising a nucleic acid molecule encoding at least a polypeptide having an IL-7 activity, wherein said non-propagative viral vector is for use in the treatment of immune depression induced by sepsis, burn, trauma, major surgery, senescence and/or coronavirus.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

免疫抑制之治療

【英文發明名稱】

TREATMENT OF IMMUNE DEPRESSION

【技術領域】

發明領域

【0001】 本發明係在免疫療法領域中。本發明提供包含編碼至少一多肽之核酸分子之病毒載體，該等病毒載體係用於治療免疫抑制。更精確而言，本發明之病毒載體為非繁殖病毒載體，多肽具有 IL-7 活性，且免疫抑制係由敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發。本發明特別適用於治療敗血症誘發之免疫抑制。

【先前技術】

發明背景

【0002】 免疫抑制(immunodepression) (亦稱為免疫抑制(immunosuppression)或免疫麻痺(immunoparalysis))為免疫反應之暫時性或永久性功能障礙狀態。其係由對免疫系統之損害造成，導致對致病原(disease agent)之易感性增加且將患者置於較高的感染、敗血症及後續死亡風險下。各種功能障礙係與影響宿主防禦之特異性組分及非特異性組分之免疫抑制狀態相關，該等免疫抑制狀態包括免疫效應細胞活性異常、免疫刺激 T 細胞活化減少、抑制 T 細胞功能增強及細胞介素含量更改。

【0003】 多份文件顯示敗血症、創傷、大手術、燒傷、衰老及冠狀病毒誘發之免疫抑制之間的類似性，該免疫抑制包括在患有創傷及敗血症之患者中誘發單核球增多症及單核球表面上 HLA-DR 少(Heftrig 等人, 2017, Mediat Inflamm,

文章 ID 2608349)、在衰老期間及手術或創傷後促炎性細胞介素(例如 TNFα、IL-6 及 IL-8)大量產生(Jia 等人, 2019, Eur J Trauma Emerg S, https://doi.org/10.1007/s00068-019-01271-6 ；Kovac 等人, 2005, Exp Gerontol., 40(7):549-55)、患有敗血症、燒傷或創傷之患者血漿中 IL-10 含量持續升高(Thomson 等人, 2019, Military Medical Research, 6:11)以及對於患有創傷及冠狀病毒之患者，影響所有淋巴球子集之重度淋巴球減少症、mHLA-DR 減少及血漿細胞介素含量適當地增加，該細胞介素同時顯示發炎性反應(IL-6)及免疫抑制性反應(IL-10) (Monneret 等人, 2020, Intensive Care Med, 46:1764-1765)。

【0004】 敗血症經定義為由對感染之失調宿主反應造成之危及生命的器官功能障礙，且死亡率保持高。如今，敗血症係加護病房中之主要死亡原因且經宣告為全球健康首要任務：採用改進敗血症之預防、診斷及管理之解決方案(Venet 及 Monneret, 2017, Nat Rev Nephrol., 14(2):121-137)。

【0005】 在敗血症中，促炎性介體之釋放誘發血液動力學不穩定性、末梢器官功能障礙及凝聚異常(Meisel 等人, 2009, Am J Respir Crit Care Med., 180(7):640-8)。因此，直至數年，臨床試驗集中於阻止敗血症病程初期之發炎以便抑制宿主免疫系統反應。然而，阻止發炎未能改善敗血症結果(Hamers 等人, 2015, Minerva Anestesiol., 81(4):426-439)。以下已變得明顯可見：相當大比例之敗血症患者並不死於難以抵擋的免疫反應且抑制免疫系統在經應用於所有敗血症患者時不為有效策略(Peters van Ton 等人, 2018, Front Immunol, 9: 1926)。

【0006】 進行研究以便理解敗血症生理病理學且減少敗血症相關死亡。似乎，敗血症期間及之後的宿主免疫反應極其複雜：其隨時間推移而變化，且伴隨地存在促炎性機制及抗炎性機制，且其無法恢復至體內恆定(Venet 及 Monneret, 2017, Nat Rev Nephrol., 14(2):121-137)。亦似乎，敗血症相關死亡大部分歸因於稱為敗血症誘發之免疫抑制、敗血症相關免疫抑制或敗血症相關免疫麻痺的免

疫系統之極度抑制狀態而非初始高炎狀態(Hamers 等人, 2015, Minerva Anestesiol., 81(4):426-439)。

【0007】 敗血症誘發之免疫抑制之特徵在於先天性及適應性免疫反應受損，該先天性及適應性免疫反應受損包括細胞凋亡以及 CD8+及 CD4+淋巴球功能障礙增強、吞噬細胞功能受損、單核球性去活化伴 II 類 HLA 表面表現減少以及離體細胞介素產生更改(Meisel 等人, 2009, Am J Respir Crit Care Med., 180(7):640-8)。

【0008】 許多患者在敗血症之初始高炎階段存活，但在免疫抑制狀態時死亡。免疫抑制使敗血性患者更易受繼發性機會性感染、潛伏感染再活化(Hamers 等人, 2015, Minerva Anestesiol., 81(4):426-439)及共生病症(例如惡性疾病、心血管疾病、糖尿病、腎功能衰竭、呼吸道機能不全等)影響。

【0009】 似乎，與敗血症相關之累積死亡率在第一週之後為 10% (初期死亡率)、在敗血症之後 28 天在 20%與 40%之間(延遲死亡率)及在敗血症之後 3 年在 50%與 70%之間(長期死亡率) (Venet 及 Monneret., 2017, Nat Rev Nephrol., 14(2):121-137)。

【0010】 因此，評估旨在刺激免疫功能之新穎治療策略對患有敗血症誘發之免疫抑制之患者的治療(Venet 及 Monneret., 2017, Nat Rev Nephrol., 14(2):121-137)，其中對以免疫調節為主之方法研發之關注不斷增長。

【0011】 就此而言，測試多種免疫刺激分子：將 GM-CSF、IFNγ、抗 PD-1 及抗 PD-L1 投與至受敗血症免疫抑制之患者，且在動物模型中用如細胞凋亡抑制劑之試劑進行初步研究。然而，儘管在少數經治療患者或動物中觀測到對免疫系統有一些作用(例如單核球性免疫能力恢復、促炎性細胞介素產生增強、T 細胞及 NK 細胞存活延長或對細胞凋亡之強效抑制)，但該等結果在大型臨床試驗時未受證實(Peters van Ton 等人, 2018, Front Immunol, 9; 1926)。

【0012】 介白素-7 對適應性免疫系統之發展及體內恆定十分重要(Shindo 等人, 2015; 43(4): 334-343)。因此，提議 IL-7 用於旨在改進淋巴球減少症之後的 T 細胞復原之療法(Ponchel 等人, 2011, Clinica Chimica Acta 412, 7-16)。在超過 390 位腫瘤及淋巴球減少患者中之臨床試驗顯示，IL-7 係安全的且增加 CD4+及 CD8+淋巴球計數(François 等人, 2018, JCI Insight.;3(5):e98960)。

【0013】 進行臨床前研究及臨床研究以評估 IL-7 恢復敗血症誘發之免疫抑制狀態時之免疫功能的能力。重組 IL-7 之潛在治療作用首次在二個相關敗血症動物模型中經研究，該等模型各別地為盲腸結紮及穿孔(CLP)誘發之鼠類腹膜內腹膜炎模型(Unsinger 等人, 2010, J Immunol; 184:3768-3779)及 CLP、接著為白色念珠菌(*Candida albicans*)感染之雙擊敗血症模型(Shindo 等人, 2015 *Shock*. ; 43(4): 334-343)。認為此後一模型模擬患有繼發性院內真菌感染(真菌生物體為許多加護病房中之血流感染之第三至第四最常見原因)之患拖延性敗血症患者之受損免疫狀態。二個特徵在於長循環半衰期之 rhIL-7 用於此等研究中：經抗 IL-7 抗體穩定之 rhIL-7 (R&D System)及完全人類化之醣化低免疫原性 rhIL-7 (稱為 CYT-107，由 Cytheris, Rockville, MD 研發)。Unsinger 報導，二個 rhIL-7 均改善咸信對敗血症之致死性有主要責任之許多關鍵病理生理過程，該改善包括敗血症誘發之 CD4+ T 細胞及 CD8+ T 細胞耗乏逆轉、免疫效應細胞(例如淋巴球)向經感染部位之募集增強及 IFNγ 生產恢復以及在 CLP 後 48 小時內經 2 次或 3 次 rhIL-7 投與治療之動物存活改進(Unsinger 等人, 2010, J Immunol; 184:3768-3779)。

【0014】 相比之下，Shindo 等人在雙擊敗血症模型(CLP、接著為白色念珠菌)中報導，在白色念珠菌注射之後 24 小時開始連續 5 天皮下投與 CYT-107 之後，對小鼠存活無作用(Shindo 等人, 2015 *Shock*. 43(4): 334-343)。

【0015】 在自敗血性患者收集且與 rhIL-7 一起培育之 PBMC 上進行之離體分析確認 IL-7 恢復敗血症誘發之淋巴球更改的能力(Venet 等人, 2012, J Immunol

November 15, 189 (10) 5073-5081)。

【0016】 最近，在患有敗血性休克及重度淋巴球減少症之患者中臨床上研究 rhIL-7 治療。二十七位患者經由肌內途徑接受至多 8 次 CYT-107 rhIL-7 注射達 4 週。重組 IL-7 具有良好耐受性而無誘導細胞介素風暴或使發炎或器官功能障礙惡化之跡象，但具體而言，在注射部位觀測到 1-3 級疹。rhIL-7 引起絕對淋巴球計數增加以及循環 CD4+ T 細胞及 CD8+ T 細胞增多，且增加 T 細胞增殖及活化。然而，與經安慰劑治療之患者相比，rhIL-7 治療並不改進死亡率(François 等人, JCI Insight. 2018;3(5):e98960)。

【0017】 與上文所提及之用可溶性重組 rhIL-7 進行，因此要求強烈穩定化以改進其循環半衰期(例如：醣化位點添加)及多次投與以提供治療作用的研究形成對比，本發明人提議以載體化 IL-7 為主之免疫抑制之治療。幾項用載體化免疫調節劑進行之研究已在敗血症誘發之免疫抑制領域中進行。特定而言，Chen 等人在盲腸結紮及穿孔(CLP)之後的小鼠中局部或全身投與編碼腫瘤壞死因子(TNF)之腺病毒(Ad)，且伴隨地用綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)攻擊小鼠。Ad TNF 之局部投與顯著地改進小鼠之存活。然而，若全身投與 Ad TNF，則此作用喪失且甚至逆轉：此投與途徑增加小鼠死亡(Chen 等人, 2000, J Immunol, 165:6496-6503)。Ad TNF 尚未進一步發展。

【0018】 如上文所提及，數份文件顯示敗血症、創傷、大手術、燒傷、衰老及冠狀病毒誘發之免疫抑制之間的類似性。冠狀病毒為一組具備正義單股 RNA 基因體及具有螺旋形對稱性之核蛋白殼的包膜病毒。冠狀病毒在哺乳動物及鳥類中造成疾病：在母牛及豬中，其造成腹瀉，而在小鼠中，其造成肝炎及腦脊髓炎；在人類及鳥類中，其造成可在輕度至致死性範圍內之呼吸道感染。人類之輕度疾病包括一些普通感冒病例，而更加致死性變種可能會造成 SARS、MERS 及 COVID-19。COVID-19 為由 SARS-Cov2 造成之接觸性傳染病。COVID-19 症

狀為可變的，但常常包括發燒、咳嗽、頭痛、疲勞、呼吸困難以及嗅覺及味覺喪失。在先前所描述之 COVID-19 中之免疫更改之前，患者均勻地呈現重度淋巴球減少症：淋巴球計數已與 COVID-19 之疾病嚴重程度增加相關，此係因為死於 COVID-19 之患者經報導與存活者相比已具有明顯地較低之淋巴球計數。

【0019】 Monneret 等人在進入加護病房之 COVID-19 患者中在前 15 天內進行免疫監測。此研究顯示，對 SARS-CoV-2 感染之免疫反應展現與細菌敗血症中之免疫抑制之延遲階段的類似性，該細菌敗血症中之免疫抑制之延遲階段包括影響所有淋巴球子集之重度淋巴球減少症、mHLA-DR 減少及血漿細胞介素含量適當地增加，該細胞介素同時顯示發炎性反應(IL-6)及免疫抑制性反應(IL-10)。此等觀測結果強調在進入加護病房之後 COVID-19 期間之持續免疫抑制的潛在問題(Monneret 等人, 2020, Intensive Care Med, 46:1764-1765)。已測試許多針對 COVID-19 之治療，但其中各者均尚未給予令人滿意的結果。此處，本發明人提議以載體化 IL-7 為主之免疫抑制之治療。

技術問題

【0020】 就不存在用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制之醫療解決方案而言，吾人可預期該等免疫抑制將繼續為嚴重的全球健康威脅。

【0021】 因此，為了恢復該等免疫抑制患者之免疫功能，存在強烈的醫療需求，從而引起相關死亡減少。更特定而言，需要用於治療該等病況之 IL-7 多肽之替代物。

【0022】 在本發明之上下文中，本發明人發現經工程改造以表現 IL-7 之非繁殖病毒載體為 IL-7 多肽之替代物，其對免疫系統恢復具備有前景的作用。

【0023】 出乎意料地，似乎該等非繁殖病毒載體之單次投與誘導受試者內足以恢復與脾細胞數目及活化增加相關之功能性免疫的 IL-7 濃度以及原始小鼠

中脾及胸腺中之免疫細胞之經改進的 Bcl2 表現。在 CLP 模型中，該等非繁殖病毒載體之投與誘導正常脾細胞計數之恢復及至少部分地 T 細胞計數之恢復、血液免疫細胞計數之改進、脾、肺及血液中數個免疫細胞群體之活化、T 細胞功能性之加強、能夠在 IFNγ、TNFα 及 IL2 等當中尤其產生 TNFα、IL2 或 2 或 3 細胞介素之細胞之頻率加強。此外，在 CLP 模型中，該等非繁殖病毒載體之投與顯著地延長宿主存活，此指示病毒載體與經表現 IL-7 對免疫系統之組合作用可誘導免疫恢復。在 COVID 患者、衰老創傷患者、ICU 創傷患者及 ICU 重大手術患者中，該等非繁殖病毒載體誘導 STAT5 之磷酸化及/或 T 細胞功能性之加強，此亦在此等模型中指示病毒載體與經表現 IL-7 對免疫系統之組合作用可誘導免疫恢復。

【0024】 此外，由於原位載體介導之 IL-7 生產，吾人亦可預期該載體將解決 IL-7 多肽所遇到之問題。吾等之候選物可提高患者順應性，伴隨例如減少治療投與次數。其亦可提高治療安全性，從而降低與重複注射有關之感染風險。

【0025】 技術問題係藉由提供如申請專利範圍中所定義之實施例來解決。

【0026】 本發明之其他及另外態樣、特點及優點將自本發明之當前較佳實施例之以下描述顯而易見。

【發明內容】

發明概要

【0027】 本發明之一個態樣係關於包含編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽之核酸分子的非繁殖病毒載體，其中該非繁殖病毒載體係用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發(亦即本文所引用之免疫抑制之誘發物中之任一者或其任何組合誘發)之免疫抑制。

【0028】 在一個實施例中，用於本發明中之非繁殖病毒載體為選自由以下組成之群之載體：痘病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒、水皰性口炎病毒、麻疹病

毒、脊髓灰白質炎病毒、馬拉巴病毒(Maraba Virus)及病毒樣粒子。

【0029】 在再另一實施例中，用於本發明中之非繁殖病毒載體編碼至少一選自由以下組成之群之多肽：鼠類 IL-7、人類 IL-7、與 Fc (用於可結晶片段之 Fc)域融合之鼠類 IL-7 及與 Fc 域融合之人類 IL-7。

【0030】 在另一態樣中，本發明亦提供包含非繁殖病毒載體及可接受之醫藥媒劑的組合物。在一個實施例中，非繁殖病毒載體或其組合物係用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發(亦即本文所引用之免疫抑制之誘發物中之任一者或其任何組合誘發)之免疫抑制。在另一實施例中，其組合物係經由靜脈內、皮下、經黏膜或肌內途徑投與。

【0031】 在再另一實施例中，與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比，該非繁殖病毒載體或組合物係用於增強投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之功能性先天性及/或適應性免疫。在另一實施例中，與投與該非繁殖病毒載體或組合物之前的該受試者之免疫反應相比，該非繁殖病毒載體或組合物係用於增強投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之功能性先天性及/或適應性免疫。

【0032】 在一較佳實施例中，與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比，該使用增加投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之選自由 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、B 細胞、NKT 細胞、NK 細胞、樹突狀細胞、單核球、巨噬細胞及嗜中性球組成之群之至少一種類型的免疫相關細胞的含量。在另一實施例中，與投與該非繁殖病毒載體或組合物之前的該受試者之免疫相關細胞之含量相比，該使用增加投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之選自由 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、B 細胞、NKT 細胞、NK 細胞、樹突狀細胞、單核球、巨噬細胞及嗜中性球組成之群之至少一種類型的免疫相關細胞的含量。

【0033】 在另一較佳實施例中，與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受

試者相比，該使用增加投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之選自由經活化 CD4 T 細胞、經活化 CD8 T 細胞、經活化 B 細胞、經活化 NK 細胞、單核球及巨噬細胞組成之群之至少一種類型的經活化及/或成熟免疫相關細胞的含量或百分比。在另一實施例中，與投與該非繁殖病毒載體或組合物之前的該受試者之經活化免疫相關細胞之含量相比，該使用增加投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之選自由經活化 CD4 T 細胞、經活化 CD8 T 細胞、經活化 B 細胞、經活化 NK 細胞、單核球及巨噬細胞組成之群之至少一種類型的經活化及/或成熟免疫相關細胞的含量或百分比。

【0034】 在另一實施例中，向展現與免疫相關細胞含量及/或經活化免疫相關細胞含量減少相關之一或多種生物標記物之受試者投與所使用之非繁殖病毒載體或組合物。

【0035】 在另一態樣中，本發明亦提供用於治療有需要之受試者之敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發(亦即本文所引用之免疫抑制之誘發物中之任一者或其任何組合誘發)之免疫抑制的方法，該方法包含一或多次投與如本文所描述使用之非繁殖病毒載體或組合物。

【圖式簡單說明】

【0036】 圖 1.藉由 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)進行之 hIL-7-Fc 表現之活體外分析及功能性評估。

【0037】 **A.西方墨點法分析。**使 A549 細胞經空 MVA (MVATGN33.1，陰性對照)或 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)活體外感染且收集上清液及細胞。在 β-巰基乙醇存在或不存在之情況下經由西方墨點法分析於細胞中表現且於上清液中分泌之 hIL-7-Fc。藉由抗 IL-7 抗體(對人類 IL-7 具有特異性之兔單株抗體)偵測所產生之 IL-7。**B.在活體外感染之後經由 ELISA 分析 hIL-7-Fc 表現。**使 COS7 細胞以 0.3、1 或 3 之 MOI 經空 MVA (MVATGN33.1)或 MVA-hIL-7-Fc

(MVATG18897)感染。在感染後 48 至 72 小時收集經感染細胞之上清液，且遵循 ELISA 偵測經表現之 hIL-7。視所使用之 MOI 及載體而定之所偵測之 IL-7 濃度(以 ng/mL 為單位表示)表示於圖式上。黑色條柱對應於感染 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之細胞且空心條柱表示感染空 MVA 之細胞。**C.使用 PB1 細胞對所產生之 IL-7 進行功能性評估。**藉由評估上清液對作為視 IL-7 而定之細胞株之 PB1 細胞增殖之作用來測試所產生之 IL-7 於上清液中的功能性。在培育 72 h 之後，使用 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物)分析評估反映細胞增殖活性之細胞代謝活性。視上清液測試稀釋度而定之在 MTT 分析結束時量測之 OD (光學密度)呈現於圖式上。OD 最高，則所誘導之 PB1 增殖愈多。在 0.3、1 及 3 之 MOI 下，在來自空 MVA 之上清液之情況下所觀測到之 OD 各別地由空心三角形、空心正方形及空心圓圈表示，且對於 0.3、1 及 3 之 MOI，在來自 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之上清液之情況下所觀測到之 OD 各別地由黑色三角形、黑色正方形及黑色圓圈表示。

【0038】 **圖 2.注射 2 種不同劑量之 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之健康 C57BL6/J 小鼠中之循環人類 IL-7 及鼠類 IFNγ 藥物動力學(實驗 1)。**

【0039】 使用人類 IL-7 ELISA 及鼠類 IFNγ ELISA，使用來自經注射小鼠之血清樣本量測循環 hIL-7 及 mIFNγ。在 0 小時、2 小時、6 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、8 天、15 天及 21 天時收集血液樣本。對所有群組每個時間點對三隻小鼠進行取樣。所偵測之 hIL-7 之平均濃度(ng/mL)由黑色正方形表示且所偵測之 mIFNγ 之平均濃度(ng/mL)由空心正方形表示。具有大點之點線表示 mIFNγ ELISA 之定量極限且具有最小點之點線表示 hIL-7 ELISA 之定量極限。**圖 2A** 顯示隨時間推移之在 IV 注射一次空 MVA (1.10^8 pfu)之後所觀測到之循環 hIL-7 及 mIFNγ 之平均濃度值。**圖 2B** 顯示隨時間推移之在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (1.10^7 pfu)之後所觀測到之循環 hIL-7 及 mIFNγ 之平均濃度值。**圖**

2C 顯示隨時間推移之在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897) (1.10^8 pfu)之後所觀測到之循環 hIL-7 及 mIFNγ 之平均濃度值。

【0040】 **圖 3.注射 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之健康 C57BL6/J 小鼠中之循環人類 IL-7 及鼠類 IFNγ 藥物動力學(實驗 2)。**

【0041】 使用人類 IL-7 ELISA 及鼠類 IFNγ ELISA，使用來自經注射小鼠之血清樣本量測循環 hIL-7 及 mIFNγ。在 0 小時、6 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、7 天及 9 天時收集血液樣本。對所有群組每個時間點對三隻小鼠進行取樣。所偵測之 hIL-7 之平均濃度(ng/mL)由黑色正方形表示且所偵測之 mIFNγ 之平均濃度(ng/mL)由空心正方形表示。具有大點之點線表示 mIFNγ ELISA 之定量極限且具有最小點之點線表示 hIL-7 ELISA 之定量極限。**圖 3A** 顯示隨時間推移之在 IV 注射一次空 MVA 之後所觀測到之循環 hIL-7 及 mIFNγ 之平均濃度值。**圖 3B** 顯示隨時間推移之在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後所觀測到之循環 hIL-7 及 mIFNγ 之平均濃度值。

【0042】 **圖 4.在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後健康 C57BL6/J 小鼠中之脾細胞總數分析。**

【0043】 在注射之後 1、3、9 及 29 天時評估空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，將 3 隻小鼠/組處死且對脾進行取樣以便計數脾細胞總數。每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之平均值以白色條柱表示，經空 MVA (MVATGN33.1)治療之小鼠之平均值由灰色條柱表示，且經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之平均值由黑色條柱表示。使用 GraphPad Prism 執行使用雙向 ANOVA 進行之統計分析。對於多個比較測試使用 Bonferroni 校正計算 P 值，且< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示且< 0.0001 之 p 值由****表示。

【0044】 **圖 5.在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後健康**

C57BL6/J 小鼠中之脾中之總 CD4+ T 細胞及 4 個亞群(天然、急性效應、效應記憶及中樞記憶)數目分析。

【0045】 在注射之後 1、3、9 及 29 天時評估空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，將 3 隻小鼠/組處死且對脾進行取樣以便表徵 CD4+ T 細胞及以下亞群中之各者之總數：天然 CD4+ T 細胞(CD3+ CD4+ CD62L+ CD44-)、CD4+ T 效應記憶細胞(CD3+ CD4+ CD62L- CD44+)、CD4+中樞記憶細胞(CD3+ CD4+ CD62L+ CD44+)及 CD4+急性效應細胞(CD3+ CD4+ CD62L- CD44-)。如材料及方法部分中所描述製備、染色及分析細胞。圖 5A、圖 5B、圖 5C、圖 5D 及圖 5E 各別地表示 CD4+ T 細胞、天然 CD4+ T 細胞、CD4+ T 效應記憶細胞、CD4+ T 中樞記憶細胞及 CD4+ T 急性效應細胞之絕對數目/脾。每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之平均值以白色條柱表示，經空 MVA (MVATGN33.1)治療之小鼠之平均值由灰色條柱表示，且經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之平均值由黑色條柱表示。使用 GraphPad Prism 執行使用雙向 ANOVA 進行之統計分析。對於多個比較測試使用 Bonferroni 校正計算 P 值，且< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示且< 0.0001 之 p 值由****表示。

【0046】 圖 6.在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後健康 C57BL6/J 小鼠中之脾中之總 CD8+ T 細胞及 4 個亞群(天然、急性效應、效應記憶及中樞記憶)數目分析。

【0047】 在注射之後 1、3、9 及 29 天時評估空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，將 3 隻小鼠/組處死且對脾進行取樣以便表徵 CD8+ T 細胞及以下亞群中之各者之總數：天然 CD8+ T 細胞(CD3+ CD8+ CD62L+ CD44-)、CD8+ T 效應記憶細胞(CD3+ CD8+ CD62L- CD44+)、CD8+中樞記憶細胞(CD3+ CD8+ CD62L+ CD44+)及 CD8+急性效應細胞(CD3+ CD8+

CD62L- CD44-)。如材料及方法部分中所描述製備、染色及分析細胞。圖 6A、圖 6B、圖 6C、圖 6D 及圖 6E 各別地表示 CD8+ T 細胞、天然 CD8+ T 細胞、CD8+ T 效應記憶細胞、CD8+ T 中樞記憶細胞及 CD8+ T 急性效應細胞之絕對數目/脾。每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之平均值以白色條柱表示，經空 MVA (MVATGN33.1)治療之小鼠之平均值由灰色條柱表示，且經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之平均值由黑色條柱表示。使用 GraphPad Prism 執行使用雙向 ANOVA 進行之統計分析。對於多個比較測試使用 Bonferroni 校正計算 P 值，且< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示且< 0.0001 之 p 值由****表示。

【0048】 圖 7.在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後健康 C57BL6/J 小鼠中之脾中之 CD4+ T 細胞及 CD8+ T 細胞中及胸腺細胞內的 Bcl2 蛋白(抗細胞凋亡蛋白)表現分析。

【0049】 在注射之後 1 及 3 天時評估空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，將 3 隻小鼠/組處死且對脾及胸腺進行取樣以便表徵來自脾之 T 細胞及胸腺細胞上之 Bcl2 表現。表現位準經表徵為於脾中之 CD4+ T 細胞(圖 7A)、脾中之 CD8+ T 細胞(圖 7B)及胸腺細胞(圖 7C)上觀測到之 Bcl2 染色之平均螢光強度(MFI)。如材料及方法部分中所描述製備、染色及分析細胞。每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之平均值以白色條柱表示，經空 MVA (MVATGN33.1)治療之小鼠之平均值由灰色條柱表示，且經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之平均值由黑色條柱表示。使用 GraphPad Prism 執行使用雙向 ANOVA 進行之統計分析。對於多個比較測試使用 Bonferroni 校正計算 P 值，且< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示且< 0.0001 之 p 值由****表示。

【0050】 圖 8.在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後健康

C57BL6/J 小鼠中之胸腺內之細胞亞群比例。

【0051】 在注射之後 1 及 3 天時評估空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，將 3 隻小鼠/組處死且對胸腺進行取樣以便表徵通常存在於胸腺中之細胞之 4 亞群：雙陰性(DN)細胞(CD4- CD8-)、雙陽性(DP)細胞(CD4+ CD8+)、單陽性(SP) CD4+細胞(CD4+ CD8-)及單陽性(SP) CD8+細胞(CD4- CD8+)。如材料及方法部分中所描述製備、染色及分析細胞。各細胞亞群比例在此處呈現為每組及每個時間點(在圖 8A 上第 1 天及在圖 8B 上第 3 天)之平均百分比。DP 細胞由白色部分表示，DN 細胞由黑色豎直影線部分表示，SP CD4+細胞由格紋圖案部分表示且 SP CD8+細胞由黑色豎直影線部分表示。

【0052】 圖 9.在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後健康 C57BL6/J 小鼠中之脾中之嗜中性球及骨髓樹突狀細胞(mDC)總數分析。

【0053】 在注射之後 1、3、9 及 29 天時評估空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，將 3 隻小鼠/組處死且對脾進行取樣以便表徵嗜中性球(B220-、NK1.1-、CD11b+、CD11c-、Ly6G+)及骨髓樹突狀細胞(B220-、NK1.1-、CD11b-、CD11c+)。如材料及方法部分中所描述製備、染色及分析細胞。圖 9A 及圖 9B 各別地表示嗜中性球及 mDC 之絕對數目/脾。每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之平均值以白色條柱表示，經空 MVA (MVATGN33.1)治療之小鼠之平均值由灰色條柱表示，且經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之平均值由黑色條柱表示。使用 GraphPad Prism 執行使用雙向 ANOVA 進行之統計分析。對於多個比較測試使用 Bonferroni 校正計算 P 值，且< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示且< 0.0001 之 p 值由****表示。

【0054】 圖 10.在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後健康 C57BL6/J 小鼠中之脾中之單核球亞群(Ly6C ^{高}、Ly6C ^{中等}及 Ly6C ^{低})數目分析。

【0055】 在注射之後 1、3、9 及 29 天時評估空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，將 3 隻小鼠/組處死且對脾進行取樣以便表徵劃分為 3 個亞群之單核球：具有促炎性且介導吞噬作用之 Ly6C ^{高}單核球(B220-、NK1.1-、CD11b+、CD11c-、Ly6G、Ly6C ^{高})、具有促炎性之 Ly6C ^{中等}單核球(B220-、NK1.1-、CD11b+、CD11c-、Ly6G-、Ly6C ^{中等})及作為巡邏型單核球之 Ly6C ^{低}單核球(B220-、NK1.1-、CD11b+、CD11c-、Ly6G-、Ly6C ^{低})。如材料及方法部分中所描述製備、染色及分析細胞。圖 10A、圖 10B 及圖 10C 各別地表示 Ly6C ^{高}、Ly6C ^{中等}及 Ly6C ^{低}單核球之絕對數目/脾。每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之平均值以白色條柱表示，經空 MVA (MVATGN33.1)治療之小鼠之平均值由灰色條柱表示，且經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之平均值由黑色條柱表示。使用 GraphPad Prism 執行使用雙向 ANOVA 進行之統計分析。對於多個比較測試使用 Bonferroni 校正計算 P 值，且< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示且< 0.0001 之 p 值由****表示。

圖11：經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠之存活。

【0056】 小鼠在第 0 天經歷 CLP 且在 CLP 後第 4 天在後眼眶竇處靜脈內注射一次 100 μL 之 1×10^8 pfu MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)。存活曲線顯示為以下中之用 MVA-hIL-7-Fc 進行之治療前(A)及治療後(B)：Sham 小鼠(黑色圓圈及點線)、未經治療 CLP 小鼠(黑色圓圈)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色正方形及灰線)。MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療時間由豎直點線表示。二個獨立實驗之合併結果經顯示。使用對數等級檢定、接著為使用 Tukey 多重性調整檢定進行之各組之間的特定比較來執行統計分析(SAS® 9.4)。

圖12：在MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之後CLP小鼠中之循環hIL-7含量。

【0057】 藉由 hIL-7 ELISA 評估 Sham 小鼠(白色條柱，N=5)、CLP 小鼠(黑色條柱，N=7)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=15)之血清中的 hIL-7 含量。2 個合併實驗之結果表示為以 pg/mL 為單位之 hIL-7 之平均值± SD 值。

圖13：在MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之後CLP小鼠中之循環IFNγ含量。

【0058】 藉由 U-PLEX 多重分析評估 Sham 小鼠(白色條柱，N=5)、CLP 小鼠(黑色條柱，N=7)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=15)之血清中的 IFNγ 含量。2 個合併實驗之結果顯示為以 pg/mL 為單位表示之平均值± SD 值。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，且< 0.001 之 p 值由***表示。

圖14：經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠之脾中之免疫細胞子集。

【0059】 藉由流式細胞量測術使用經 Sham 操作小鼠(白色條柱，N=5)、CLP 小鼠(黑色條柱，N=7)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=15)之脾細胞評估脾細胞(A)、T 細胞($CD3^+$) (B)、CD4 T 細胞($CD3^+NK1.1^-CD4^+$) (C)及 CD8 T 細胞($CD3^+NK1.1^-CD8^+$) (D)總數。2 個合併實驗之結果顯示為以 10^6 個細胞/脾為單位表示之平均值± SD 值。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，且< 0.01 之 p 值由**表示。

圖15：經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠之脾中之免疫細胞活化狀態。

【0060】 藉由評估細胞表面 CD69 表現來測定來自經 Sham 操作小鼠(白色

條柱，N=5)、CLP 小鼠(黑色條柱，N=7)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=15)之脾細胞活化狀態。2 個合併實驗之結果顯示為 B 細胞($CD19^+$) (A)、CD4 T 細胞($CD3^+NK1.1^-CD4^+$) (B)、CD8 T 細胞($CD3^+NK1.1^-CD8^+$) (C)及 NK 細胞($CD3^-CD19^-NK1.1^+$) (D)的以 10^6 個細胞/脾為單位表示之 $CD69^+$細胞數目之平均值± SD 值。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，且< 0.001 之 p 值由***表示。

圖16：經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠之血液中之循環免疫細胞子集。

【0061】 藉由流式細胞量測術評估經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=8)或未經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠(黑色條柱，N=3)之血液中之 $CD3^+$ ($CD45^+$ $CD3^+$) (A)、CD4 T ($CD45^+$ $CD3^+$ $NK1.1^-$ $CD4^+$) (B)、CD8 T ($CD45^+$ $CD3^+$ $NK1.1^-$ $CD8^+$) (C)、NKT ($CD45^+$ $CD3^+$ $NK1.1^+$) (D)、NK ($CD45^+$ $CD3^-$ $CD19^-$ $NK1.1^+$) (E)、B ($CD45^+$ $CD19^+$) (F)、$CD11c^+$ ($CD45^+$ $CD19^-$ $CD3^-$ $NK1.1^-$ $CD11c^+$) (G)及 $CD11b^+$ ($CD45^+$ $CD19^-$ $CD3^-$ $NK1.1^-$ $CD11b^+$) (H)細胞總數。一個實驗之結果顯示為每微升血液之細胞數目之平均值± SD 值。使用 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示。

圖17：經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠中之免疫血細胞活化狀態。

【0062】 藉由評估細胞表面 CD69 表現來測定經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色條柱)或未經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(黑色條柱)中之血細胞活化狀態。結果顯示為 CD4 T 細胞($CD45^+$ $CD3^+$ $NK1.1^-$ $CD4^+$) (A)、CD8 T 細胞($CD45^+$ $CD3^+$ $NK1.1^-$ $CD8^+$) (B)、B 細胞($CD45^+$ $CD19^+$) (C)及 NK 細胞($CD45^+$ $CD3^-$ $CD19^-$ $NK1.1^+$) (D)的每微升血液之 $CD69^+$細

胞數目之平均值± SD 值(一個實驗，CLP：N=3 及 CLP+MVA-hIL-7-Fc：N=8)。使用 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示。

圖18：MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療增加CLP小鼠中產生IFNγ之T細胞之頻率。

【0063】 藉由 IFNγ ELISpot 分析使用與抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體一起培養之經 Sham 操作小鼠(白色條柱，N=5)、CLP 小鼠(黑色條柱，N=4)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=7)之脾細胞評估 IFNγ 斑點形成細胞。一個實驗之結果表示為每 10^5 個細胞之斑點形成單位之平均值± SD 值(A)及以 10^{-3} mm^2 為單位表示之斑點尺寸之平均值± SD 值(B)。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，且< 0.01 之 p 值由**表示。

圖19：經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠中之所有產生細胞介素之CD4 T細胞及CD8 T細胞。

【0064】 藉由三重胞內細胞介素染色分析量測在經抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體活體外刺激之後產生 IFNγ、TNFα 及 IL2 當中之至少一種細胞介素的經 Sham 操作小鼠(白色條柱，N=5)、CLP 小鼠(黑色條柱，N=8)及經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=15)之脾中之 CD4 T 細胞($CD4^+$) (A)及 CD8 T 細胞($CD8^+$) (B)的頻率。2 個合併實驗之結果表示為細胞介素陽性細胞之頻率之平均值± SD 值。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，且< 0.001 之 p 值由***表示。

圖20：經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠中之產生細胞介素之CD4 T細胞。

【0065】 藉由三重胞內細胞介素染色分析量測在經抗 CD3 抗體及抗 CD28

抗體活體外刺激之後產生 IFNγ、TNFα 及/或 IL2 的經 Sham 操作小鼠(白色條柱，N=5)、CLP 小鼠(黑色條柱，N=8)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=15)之脾中之 CD4 T 細胞的頻率。產生 IFNγ/TNFα (A)、IL2/TNFα (B)或 IFNγ/IL2/TNFα (C)之 CD4 T 細胞($CD4^+$)頻率經顯示。結果表示為所有 CD4 T 細胞群體當中之各細胞介素陽性細胞子集之頻率之平均值+/- SD 值。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：<0.05 之 p 值由*表示，<0.01 之 p 值由**表示，且<0.001 之 p 值由***表示。

圖21：經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠中之產生細胞介素之CD8 T細胞。

【0066】 藉由三重胞內細胞介素染色分析量測在經抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體活體外刺激之後產生 IFNγ、TNFα 及/或 IL2 的經 Sham 操作小鼠(白色條柱，N=5)、CLP 小鼠(黑色條柱，N=8)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=15)之脾中之 CD8 T 細胞的頻率。僅產生 IFNγ (A)、IFNγ/TNFα (B)及 IFNγ/IL2/TNFα (C)之 CD8 T 細胞($CD8^+$)頻率經顯示。結果表示為所有 CD8 T 細胞群體當中之各細胞介素陽性細胞子集之頻率之平均值+/- SD 值。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，且< 0.001 之 p 值由***表示。

圖22：在MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之後由經活化T細胞產生之促炎性細胞介素及抗炎性細胞介素。

【0067】 將來自經 Sham 操作小鼠(白色條柱，N=5)、CLP 小鼠(黑色條柱，N=7)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色條柱，N=15)之總脾細胞在經抗 CD3 抗體預塗之盤中培養，且藉由 U-PLEX 多重分析量測於上清

液中釋放之 IL-1β (A)、IL-6 (B)、TNFα (C)、IFNγ (D)及 IL-10 (E)。2 個合併實驗之結果顯示為屬於各細胞介素且以 pg/mL 為單位表示之平均值± SD 值。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.01 之 p 值由**表示，且< 0.001 之 p 值由***表示。

圖23：經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或空MVA (MVATGN33.1)治療之CLP小鼠之存活。

【0068】 小鼠在第 0 天經歷 CLP 且在 CLP 後第 4 天在後眼眶竇處靜脈內注射一次 100 μL 之 1×10^8 pfu MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或空 MVA (MVATGN33.1)。存活曲線顯示為以下中之治療前(A)及治療後(B)：經空 MVA 治療之 CLP 小鼠(黑色圓圈及黑色點線)及經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠(灰色正方形及灰線)。MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或空 MVA (MVATGN33.1)治療時間由豎直點線表示。

【0069】圖 24 ： 經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897) 或 空 MVA (MVATGN33.1)治療之CLP小鼠之血液中之循環免疫細胞子集。

【0070】 藉由流式細胞量測術評估經空 MVA 治療之 CLP 小鼠(黑色正方形，N=6)或經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠(灰色圓圈，N=9)之血液中之脾的各種細胞子集。CD8 T ($CD45^+$ $CD3^+$ $NK1.1^-$ $CD8^+$) (A)、NKT ($CD45^+$ $CD3^+$ $NK1.1^+$) (B)及 $CD11b^+$ ($CD45^+$ $CD19^-$ $CD3^-$ $NK1.1^-$ $CD11b^+$) (C)細胞數目以及每微升血液之細胞數目之平均值± SD 值示於此處。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示。

圖25：經空MVA (MVATGN33.1)或MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠中之產生細胞介素之CD4 T細胞。

【0071】 藉由三重胞內細胞介素染色分析量測在經抗 CD3 抗體及抗 CD28

抗體活體外刺激之後產生 IFNγ、TNFα 及/或 IL2 的經空 MVA 治療之 CLP 小鼠(黑色正方形，N=6)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色圓圈，N=9)之脾中之 CD4 T 細胞的頻率。所有產生至少一種細胞介素之 CD4 T 細胞($CD4^+$) (A)、所有產生 IFNγ 之 CD4 T 細胞、所有產生 TNFα 之 CD4 T 細胞及所有產生 IL2 之 CD4 T 細胞(B)且更具體而言產生 IFNγ 及 TNFα、或產生 IFNγ 及 IL2、或產生 IL2 及 TNFα、或產生 IFNγ 及 IL2 以及 TNFα 之 CD4 T 細胞(C)的頻率示於此處。個別值及平均值+/- SD 經表示。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示。

圖26：經空MVA (MVATGN33.1)或MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠中之產生細胞介素之CD8 T細胞。

【0072】 藉由三重胞內細胞介素染色分析量測在經抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體活體外刺激之後產生 IFNγ、TNFα 及/或 IL2 的經空 MVA 治療之 CLP 小鼠(黑色正方形，N=6)及經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(灰色圓圈，N=9)之脾中之 CD8 T 細胞的頻率。所有產生至少一種細胞介素之 CD8 T 細胞($CD4^+$) (A)、所有產生 IFNγ 之 CD8 T 細胞、所有產生 TNFα 之 CD8 T 細胞及所有產生 IL2 之 CD8 T 細胞(B)且更具體而言僅產生 IFNγ 之 CD8 T 細胞及僅產生 TNFα 之 CD8 T 細胞(C)、或產生 IFNγ 及 TNFα、或產生 IL2 及 TNFα、或產生 IFNγ 及 IL2 以及 TNFα 之 CD8 T 細胞(D)的頻率示於此處。個別值及平均值+/- SD 經表示。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Mann-Whitney 檢定執行統計分析：< 0.01 之 p 值由**表示。

【0073】 圖 27.在 IV 注射一次空 MVA (MVATGN33.1)或 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後健康 C57BL6/J 小鼠中之肺細胞及經活化(CD69+) NK、CD8+ T 細胞及 CD4+ T 細胞總數分析。

【0074】在注射之後第 3 天及第 9 天時評估空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，將 10 隻小鼠/組處死且在製備肺之後對肺進行取樣以便計數肺細胞總數(圖 27A)。亦經由流式細胞量測術監測經活化 NK 細胞(圖 27B)及經活化 CD8+ T 細胞(圖 27C)以及 CD4+ T 細胞(圖 27D)數目。執行實驗二次，且將結果彙集。個別值及每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之個別值由空圓圈表示，經空 MVA (MVATGN33.1)治療之小鼠之個別值由空正方形表示，且經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之個別值由全黑正方形表示。使用 GraphPad Prism 執行使用雙向 ANOVA 進行之統計分析。對於多個比較測試使用 Bonferroni 校正計算 P 值，且< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示且< 0.0001 之 p 值由****表示。

【0075】圖 28.在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 hIL-7-Fc 蛋白之後健康 C57BL6/J 小鼠中之肺細胞及經活化(CD69+) NK、CD8+ T 細胞及 CD4+ T 細胞總數分析。

【0076】在注射之後第 3 天及第 9 天時評估 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)及 hIL-7-Fc 蛋白之生物學活性，將 6 隻小鼠/組處死且在製備肺之後對肺進行取樣以便計數肺細胞總數(圖 28A)。亦經由流式細胞量測術監測經活化 NK 細胞(圖 28B)及經活化 CD8+ T 細胞(圖 28C)以及 CD4+ T 細胞(圖 28D)數目。個別值及每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之個別值由空圓圈表示，經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之個別值由全黑正方形表示，且經 IL-7-Fc 蛋白治療之小鼠之個別值由全黑三角形表示。使用 GraphPad Prism 執行使用雙向 ANOVA 進行之統計分析。對於多個比較測試使用 Bonferroni 校正計算 P 值，且< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示且< 0.0001 之 p 值由****表示。

【0077】圖 29：在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 hIL-7-Fc 蛋白之後健康 C57BL6/J 小鼠中之脾及肺中的產生細胞介素之 CD8 T 細胞。

【0078】藉由三重胞內細胞介素染色分析評估未經治療或藉由 IV 途徑注射一次 MVATG18897 或 hIL-7-Fc 蛋白之 C57BL6/J 健康小鼠之脾及肺中的在經抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體活體外刺激之後產生 IFNγ、TNFα 及/或 IL2 之 CD8 T 細胞的頻率。脾(圖 29A)或肺(圖 29B)中之僅產生 IFNγ 之 CD8+ T 細胞、脾(圖 29C)或肺(圖 29D)中之產生 IFNγ 及 TNFα 之 CD8+ T 細胞以及脾(圖 29E)或肺(圖 29F)中之產生 IFNγ、TNFα 及 IL2 之 CD8+ T 細胞呈現於此處。個別值及每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之個別值由空圓圈表示，經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之個別值由全黑正方形表示，且經 IL-7-Fc 蛋白治療之小鼠之個別值由全黑三角形表示。使用 GraphPad Prism 執行使用雙向 ANOVA 進行之統計分析。對於多個比較測試使用 Bonferroni 校正計算 P 值，且< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示且< 0.0001 之 p 值由****表示。

【0079】圖 30：經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 hIL-7-Fc 蛋白治療之 CLP 小鼠之存活。

【0080】小鼠在第 0 天經歷 CLP 且在 CLP 後第 4 天在後眼眶竇處靜脈內注射 100 µL 之 1×10^7 pfu MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 5 µg 之 hIL-7-Fc 蛋白一次。存活曲線顯示為未經治療 CLP 小鼠(全黑正方形及黑線)、經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠(半滿圓圈及點線)或經 hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠(空圓圈及點線)中之治療後。MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 hIL-7-Fc 蛋白治療時間由豎直點線表示。作為對照，原始及未經治療小鼠之存活亦由全黑菱形及點線表示。

【0081】圖 31.在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 hIL-7-Fc 蛋白之後 CLP 小鼠中之經活化(CD69+) CD8+ T 及 B 細胞分析。

【0082】 在注射後第 3 天(CLP 後 7 天)評估 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)及 hIL-7-Fc 蛋白之生物學活性，在 CLP 後第 7 天將各組中之存活小鼠處死。對脾進行取樣且經由流式細胞量測術監測經活化 CD8+ T 細胞(圖 31A)及 B 細胞(圖 31B)數目。個別值及每組及每個時間點之平均值+/- SD 表示於圖式上。未經治療小鼠之個別值由全黑圓圈表示，經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠之個別值由全黑正方形表示，且經 IL-7-Fc 蛋白治療之小鼠之個別值由全黑三角形表示。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Dunns 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示。

【0083】 圖 32 經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或經 hIL-7-Fc 蛋白治療之 CLP 小鼠中之產生細胞介素之 CD8 T 細胞。

【0084】 藉由三重胞內細胞介素染色分析評估在經抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體活體外刺激之後產生至少 IFNγ (僅 IFNγ 或 IFNγ 與其他細胞介素) (圖 32A)、僅產生 IFNγ (圖 32B)、產生 IFNγ 及 TNFα (圖 32C)或產生 IFNγ 及 TNFα 以及 IL2 (圖 32D)的未經治療 CLP 小鼠(全黑圓圈)、經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之 CLP 小鼠(全黑正方形)或經 hIL-7-Fc 蛋白治療之 CLP 小鼠(全黑三角形)之脾中之 CD8 T 細胞的頻率。個別值及平均值+/- SD 經表示。使用針對重複量測之單向 ANOVA 檢定、接著為針對組間比較之 Dunns 檢定執行統計分析：< 0.05 之 p 值由*表示，< 0.01 之 p 值由**表示，< 0.001 之 p 值由***表示。

【0085】 圖33.藉由MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897或MVATG19791)進行之hIL-7-Fc表現之活體外分析。

【0086】 **A及B.西方墨點法分析。**使雞胚胎纖維母細胞CEF) (A)或A549細胞(B)經空MVA (MVATGN33.1，陰性對照)或MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897或MVATG19791)活體外感染且收集上清液及細胞。在β-巰基乙醇存在或不存在之

情況下經由西方墨點法分析於細胞中表現且於上清液中分泌之hIL-7-Fc。藉由抗IL-7抗體(對人類IL-7具有特異性之兔單株抗體)偵測所產生之IL-7。**C.在活體外感染之後經由ELISA分析hIL-7-Fc表現。**收集經感染細胞(CEF或A549細胞)之上清液，且遵循ELISA偵測經表現之hIL-7。所偵測之IL7之濃度(以ng/mL為單位表示)表示於圖示上。灰色條柱對應於感染MVATG18897之細胞，黑色條柱表示感染MVATG19791之細胞，且空條柱對應於感染MVATGN33.1之細胞但在圖式上不可見，此係因為在此等上清液中未偵測到IL-7。

【0087】圖34.在經來自感染MVA-IL-7-Fc之細胞之上清液離體刺激之後的COVID19+患者之全血之CD3+ T細胞中的pSTAT5表現分析。

【0088】藉由流式細胞量測術分析在經來自感染MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或空MVA (MVATGN33.1)或未經感染之原代肝細胞之上清液刺激之後CD3+ T細胞中的pSTAT5表現。如材料及方法部分中所描述刺激、染色及分析全血。如下計算比率：以未經刺激情況之值標準化來自MVATG18897或MVATGN33.1或未經感染細胞之上清液之所獲得值。6位患者之比率平均值+/-標準差表示於圖式上。來自感染MVA-IL-7-Fc (SN IL-7-Fc)之細胞之上清液之平均值由黑色條柱表示，而來自空MVA (SN N33)或未經感染細胞(SN NI細胞)之上清液之平均值由灰色條柱表示。

【0089】圖35.在經感染MVA-hIL-7-Fc之細胞之上清液刺激之後COVID19+患者之全血之CD4+ T細胞所產生的總IFNγ及IFNγ-TNFα-IL-2分析。

【0090】除了來自感染MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或空MVA (MVATGN33.1)或未經感染之原代肝細胞之上清液之外在經Duractive 1離體刺激3小時之後藉由胞內染色分析CD4+ T細胞的功能性。如材料及方法部分中所描述刺激、染色及分析全血。產生IFNγ (A)或IFNγ-TNFα-IL-2 (B)之CD4+ T細胞百分比經顯示。如下計算比率：以Duractive 1情況之值標準化Duractive 1 +感染

MVATG18897或MVATGN33.1或未經感染之細胞之上清液的值。6位患者之比率平均值+/-標準差表示於圖式上。MVA-IL-7-Fc上清液(DA + SN IL-7-Fc)之平均值由黑色條柱表示，且空MVA (DA + SN N33)或未經感染之細胞上清液(DA + SN NI細胞)之平均值由灰色條柱表示。

【0091】 **圖36.來自衰老對照及髖部骨折患者之PBMC上之CD8 T細胞中之CD57表現分析。**

【0092】 如材料及方法部分中所描述將來自衰老對照及髖部骨折(HF)患者之PBMC解凍，對其進行染色，且藉由流式細胞量測術對其進行分析。CD8 T細胞中之CD57表現之平均值+/-標準差經表示。

【0093】 **圖37.經來自感染MVA-hIL-7-Fc之細胞之上清液刺激之衰老創傷患者PBMC評估。**

【0094】 **A. pSTAT5分析。**藉由流式細胞量測術分析未經刺激之CD3+細胞中及經來自感染空MVA (MVATGN33.1，SN N33於圖式中)或MVA-hIL-7-Fc (MVATG19791，SN IL-7-Fc於圖式中)之細胞之上清液離體刺激之後的pSTAT5表現。如材料及方法部分中所描述將來自衰老對照及髖部骨折(HF)患者之PBMC解凍，對其進行刺激、染色及分析。**B. T細胞增殖。**藉由流式細胞量測術分析未經刺激之CD3+細胞中及經來自感染空MVA (SN N33)或MVA-hIL-7-Fc (SN IL-7-Fc)之細胞之上清液離體刺激之後的增殖比例。如材料及方法中所描述將來自衰老對照及髖部骨折(HF)患者之PBMC解凍且對其進行染色、刺激5天，隨後對其進行染色及分析。平均值+/-標準差經表示。

【0095】 **圖38.在來自感染MVA-hIL-7-Fc之細胞之上清液存在之情況下經離體刺激之後創傷患者之PBMC的產生總IFNγ及IFNγ-TNFα-IL-2之CD4+ T細胞分析。**

【0096】 藉由胞內染色分析除了來自感染MVA-hIL-7-Fc (黑色)或空MVA

(灰色)之原代肝細胞或作為對照之培養基(白色)之上清液之外經PMA-離子黴素、抗CD3/抗CD28或未經刺激對照刺激之後的CD4+ T細胞的功能性。如材料及方法部分中所描述刺激、染色及分析經解凍PBMC。產生IFNγ (A)或IFNγ、TNFα及IL-2 (B)之CD4+ T細胞百分比經顯示。3位患者之平均值及+/-標準差表示於圖式上。SN IL-7-Fc : MVA-IL-7-Fc (MVATG19791)上清液；SN N33 :空MVA (MVATGN33.1)上清液；對照:培養基。

【0097】 圖39.在來自感染MVA-hIL-7-Fc之細胞之上清液存在之情況下經離體刺激之後重大手術患者之PBMC的產生總IFNγ及IFNγ-TNFα-IL-2之CD4+ T細胞分析。

【0098】 藉由胞內染色分析除了來自感染MVA-hIL-7-Fc (黑色)或空MVA (灰色)之原代肝細胞或作為對照之培養基(白色)之上清液之外經PMA-離子黴素、抗CD3/抗CD28或未經刺激對照刺激之後的CD4+ T細胞的功能性。

【0099】 如材料及方法部分中所描述刺激、染色及分析經解凍PBMC。產生IFNγ (A)或IFNγ、TNFα及IL-2 (B)之CD4+ T細胞百分比經顯示。3位患者之平均值及+/-標準差表示於圖式上。SN IL-7-Fc : MVA-IL-7-Fc (MVATG19791)上清液；SN N33 :空MVA (MVATGN33.1)上清液；對照:培養基。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

【0100】 本文提供將輔助對本發明之理解的許多定義。然而，除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域的一般技術人員通常所理解之含義相同之含義。本文所引用之所有參考文獻均以全文引用之方式併入。

一般定義

【0101】 如整個申請案通篇所使用，除非上下文另外清楚地指示，否則術

語「一(a/an)」以其意謂「至少一個」、「至少第一個」或「多個」所提及組分或步驟之意義使用。舉例而言，術語「非繁殖病毒載體」包括多個非繁殖病毒載體，包括其混合物。

【0102】 術語「一或多個」係指一個或大於一個之數目(例如 2 個、3 個、4 個、5 個等)。

【0103】 本文各處所使用之術語「及/或」包括含義「及」、「或」以及「由該術語連接之要素之全部或任何其他組合」。舉例而言，「先天性及/或適應性免疫系統」意謂先天性免疫系統或適應性免疫系統或先天性免疫系統及適應性免疫系統。

【0104】 如本文所使用，當用於定義產物、組合物及方法時，術語「包含(comprising)」(及諸如「包含(comprise)」及「包含(comprises)」之包含(comprising)之任何形式)、「具有(having)」(及諸如「具有(have)」及「具有(has)」之具有(having)之任何形式)、「包括(including)」(及諸如「包括(includes)」及「包括(include)」之包括(including)之任何形式)或「含有(containing)」(及諸如「含有(contains)」及「含有(contain)之含有(containing)之任何形式」為開放的且不排除額外未列出之要素或方法步驟。「由……組成」意謂排除具有任何必要意義之其他組分或步驟。因此，由所敍述組分組成之組合物將不排除痕量污染物及醫藥學上可接受之載劑。

【0105】 在本發明之上下文內，術語「核酸」、「核酸分子」、「多核苷酸」及「核苷酸序列」可互換使用且定義多去氧核糖核苷酸(DNA) (例如 cDNA、基因體 DNA、質體、載體、病毒基因體、經分離 DNA、探針、引子及其任何混合物)或多核糖核苷酸(RNA) (例如 mRNA、反義 RNA、SiRNA)或混合多核糖-多去氧核糖核苷酸的任何長度之聚合物。其涵蓋單股或雙股、線性或環形、天然或合成、經修飾或未經修飾之多核苷酸。

【0106】 術語「多肽」應理解為經由肽鍵鍵結之至少九個胺基酸殘基之聚合物，此與其尺寸及轉譯後組分(例如醣化)之存在或不存在無關。對多肽中所包含之胺基酸之最大數目不施加限制。作為一般指示，該術語係指短聚合物(通常在此項技術中稱為肽)及較長聚合物(通常在此項技術中稱為多肽或蛋白質)。此術語尤其涵蓋天然多肽、經修飾之多肽(亦稱為衍生物、類似物、變異體或突變體)、多肽片段、多肽多聚體(例如二聚體)、融合多肽。該術語亦指由編碼該多肽之多核苷酸序列表現之重組多肽。通常而言，此涉及藉由遞送有多核苷酸序列之細胞之核糖體機制將編碼核酸轉譯為 mRNA 序列及其轉譯體。

【0107】 術語「一致性」係指二個多肽或核酸序列之間的胺基酸與胺基酸或核苷酸與核苷酸對應關係。二個序列之間的一致性百分比隨該等序列共用之一致位置數目而變，此考慮到需要經引入以用於整體最佳比對之空隙數目及各間隙長度。此項技術中可獲得用於測定胺基酸序列之間的一致性百分比之各種電腦程式及數學演算法，諸如在 Atlas of Protein Sequence and Structure (Dayhoffed, 1981, 增刊, 3: 482-9)中之 NCBI 或 ALIGN 處可獲得之 Blast 程式。用於測定核苷酸序列之間的一致性之程式亦可在專用資料庫(例如 Genbank、Wisconsin 序列分析套裝、BESTFIT、FASTA 及 GAP 程式)中獲得。熟習此項技術者可確定適用於量測比對之參數，該等參數包括在要被比較之序列上達成最大比對所需之任何演算法。出於說明之目的，「至少 80%一致性」意謂 80%一致性或更高一致性(81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性)，而「至少 90%一致性」意謂 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性，且「至少 95%一致性」意謂 95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性。

【0108】 術語「獲自」、「起源(originating/originate)」及其任何等效術語係

用於識別組分(例如多肽、核酸分子、病毒、載體等)之原始來源，但不意欲限制藉以製造組分之方法，該方法可例如藉由化學合成或重組手段進行。

【0109】 如本文所使用之術語「宿主細胞」應在無任何關於組織、器官或經分離細胞中之特定組織化之限制之情況下加以廣泛地理解。該等細胞可屬於諸如經培養細胞株、原代細胞及分裂細胞的獨特類型之細胞或一組不同類型之細胞。此術語亦包括可為或已為用於本發明中之非繁殖病毒載體之受體的細胞以及該等細胞之後代。

【0110】 術語「受試者」一般指本文所描述之任何非繁殖病毒載體、組合物及方法為其所需或可對其有益之生物體。通常而言，生物體為哺乳動物，尤其為選自由以下組成之群之哺乳動物：家畜、農畜、運動型動物及靈長類動物。較佳地，受試者為已經診斷為患有免疫抑制或處於患有免疫抑制之風險下的人類。術語「受試者」及「患者」在提及人類生物體時可互換使用且涵蓋男性及女性。要被治療之受試者可為新生兒、嬰兒、青壯年、成年人或老年人。

【0111】 如本文所使用之術語「治療(treatment)」(及諸如「治療(treating)」、「治療(treat)」之治療(treatment)之任何形式)涵蓋防治(例如處於患有要被治療且由敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制之風險下的受試者中的預防性措施)及/或療法(例如在經診斷為患有敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制之受試者中)以及任擇的習知治療性儀器治療。治療結果為減緩、治癒、改善或控制免疫抑制之發展。舉例而言，若在投與如本文所描述之非繁殖病毒載體之後，受試者顯示其先天性及/或適應性免疫或免疫反應之可觀測改進及/或恢復，則受試者之敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制得到成功治療。

【0112】 如本文所使用之術語「先天性免疫」或「非特異性免疫」係指針對外來病原體之非特異性第一道防線。該先天性免疫係由包含樹突狀細胞(DC)、

自然殺手(NK)細胞、自然殺手 T(NKT)細胞、單核球、巨噬細胞、嗜中性球、嗜鹼性球、嗜酸性球及肥胖細胞之細胞介導。如皮膚、胃酸及血流中之化學物質之防禦機制之其他要素亦為先天性免疫之一部分。

【0113】 如本文所使用之術語「適應性免疫」或「特異性免疫」係指由 B 淋巴球、CD4+輔助 T 淋巴球、表現抗原特異性受體之 CD8+細胞毒性 T 淋巴球及自然殺手(NK)細胞介導之病原體特異性免疫。該適應性免疫產生記憶體且允許靈活且寬廣的反應組庫。

【0114】 如本文所使用之術語「投與(administering)」(或諸如「投與(administered)」之投與(administration)之任何形式)係指向受試者遞送諸如本文所描述之非繁殖病毒載體之防治劑或治療劑。

【0115】 如本文所使用之術語「組合」或「聯合」係指各種組分(例如如本文所描述之非繁殖病毒載體及一或多種有效改進先天性及/或適應性免疫或免疫反應之物質)之任何可能性排列。此類排列包括用於伴隨或依序投與之該等組分混合物以及單獨組合。本發明涵蓋包含相等莫耳濃度之各組分之組合以及具有極不同濃度之各組分之組合。應瞭解,該組合之各組分之最佳濃度可由熟習此項技術者確定。

【0116】 本發明之一個態樣係關於包含編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽之核酸分子的非繁殖病毒載體,其中該非繁殖病毒載體係用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制。

病毒載體

【0117】 術語「病毒載體」、「病毒」、「病毒體」、「病毒粒子」及「病毒載體粒子」可互換用於指在根據允許生成病毒粒子之合適條件將基因體核酸轉導至適當細胞或細胞株中時形成之病毒粒子。

【0118】 術語「非繁殖病毒載體」係指不能在宿主細胞或組織中繁殖之病

毒載體。此等病毒載體可為複製缺陷型或複製受損型載體(例如基因上失能之病毒載體)，此意指其無法在正常細胞中，尤其在正常人類細胞中複製達到任何顯著程度，從而阻礙病毒載體繁殖。複製功能之減損或缺陷可藉由習知手段，諸如藉由量測非容許細胞中之 DNA 合成及/或病毒力價來加以評估。病毒載體可藉由對病毒複製至關重要之區域之部分或總體缺失或失活而呈現為複製缺陷型的。該等複製缺陷型或受損病毒載體通常需要產生或補充缺失/受損功能之容許細胞株進行繁殖。此等病毒載體亦可為能夠在宿主經感染細胞中產生第一代病毒粒子之複製勝任型或複製選擇型載體(例如經工程改造以更好地或選擇性地在特定宿主細胞中進行複製)，但其中該第一代病毒粒子不能感染新的宿主細胞，從而阻礙病毒載體繁殖。此減損可為如 DNA 生產減少或減損、病毒蛋白生產減少或減損、抑制骨架組裝蛋白、不完全病毒粒子成熟、該等病毒粒子不能離開宿主細胞或進入新宿主細胞等之各種過程之結果。

【0119】 適用於本發明中之病毒之代表性實例由各種不同的病毒家族(例如腺病毒科、乳頭瘤病毒科、多瘤病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科、肝 DNA 病毒科、小核糖核酸病毒科、冠狀病毒科、絲狀病毒科、副黏液病毒科、彈狀病毒科、正黏液病毒科、沙粒病毒科、布尼亞病毒科(bunyaviridae)、反轉錄病毒科、呼腸孤病毒科、微小病毒科、黃病毒科等)生成。

【0120】 在一個實施例中，用於本發明中之非繁殖病毒載體選自由以下組成之群：痘病毒、腺病毒(Ad)、腺病毒相關病毒(AAV)、水皰性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MV)、脊髓灰白質炎病毒(PV)、馬拉巴病毒(Maraba Virus)及病毒樣粒子。儘管吾人可使用野生型或天然病毒(亦即在自然界中發現)，但在本發明之上下文中，病毒樣粒子及經基因工程改造之病毒(亦即相較於該病毒之野生型病毒株而言例如藉由截短、缺失、取代及/或插入一或多個在病毒基因體內，特別地在一或多個病毒複製所需之基因中連續或不連續之核苷酸來經修飾之病毒)為較

佳的。一或多種修飾可在內源性病毒基因(例如編碼序列及/或調節序列)內及/或在基因間區域內進行，從而較佳地產生經修飾之病毒基因產物。一或多種修飾可以熟習此項技術者已知之多種方式使用習知分子生物學技術進行。

【0121】 較佳地，本發明所涵蓋之修飾相較於不具有該修飾之病毒載體而言影響例如病毒載體之毒力、毒性或病原性，但不完全抑制至少容許細胞中之新病毒粒子之感染及生產。該一或多種修飾較佳地引起缺陷型(或缺乏合成)蛋白之合成，該缺陷或缺乏合成使得不能確保在正常條件下由未經修飾基因產生之蛋白質之活性。其他合適修飾包括插入一或多種外源性基因(亦即，外源性意謂未在天然病毒基因體中發現)，該一或多種外源性基因諸如為如下文所描述之編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽之核酸分子。

【0122】 特別地適用於本發明中之非繁殖病毒載體獲自痘病毒。如本文所使用之術語「痘病毒」係指屬於痘病毒科、較佳地關於脊椎動物宿主之脊椎動物痘病毒亞科之病毒，該脊椎動物痘病毒亞科包括諸如正痘病毒、羊痘病毒、禽痘病毒、副痘病毒、野兔痘病毒及豬痘病毒之數個屬。在本發明之上下文中，正痘病毒以及包括金絲雀痘病毒(例如 ALVAC)及雞痘病毒(例如 FP9 載體)之禽痘病毒為較佳的。各種痘病毒科之基因體之序列可在此項技術中在諸如 Genbank 之專用資料庫中獲得。舉例而言，痘瘡病毒株 Western Reserve、Copenhagen、牛痘病毒及金絲雀痘病毒基因體可各別地以寄存編號 NC_006998、M35027、NC_003663、NC_005309 在 Genbank 中獲得。

【0123】 在一較佳實施例中，用於本發明中之非繁殖病毒載體屬於正痘病毒屬且甚至更佳地屬於痘瘡病毒(VV)物種。在天然情形下，痘瘡病毒為具有編碼使得病毒能夠獨立地自宿主細胞機制複製之許多病毒酶及因子之長度為約 200 kb 之線性雙股 DNA 基因體的大型複雜的包膜病毒。存在二個不同的感染性病毒粒子，亦即由保持在經感染細胞之細胞溶質中直至溶解之單一脂質包膜包

圍的胞內 IMV (用於胞內成熟病毒體)及自經感染細胞分離出之雙包膜 EEV (用於胞外包膜病毒體)。在本發明之上下文中，可使用包括但不限於以下之任何痘瘡病毒株：MVA (改良型痘瘡病毒 Ankara)、NYVAC、Copenhagen (Cop)、Western Reserve (WR)、Wyeth、Lister、LIVP Tashkent、Tian Tan、Brighton、Ankara、LC16M8、LC16M0 病毒株等及其任何衍生物。本文所使用之基因命名法為 Copenhagen 痘瘡病毒株之基因命名法。除非另外指示，否則該基因命名法亦在本文中用於其他痘病毒科之同源基因。然而，基因命名法可根據痘病毒株而不同，但 Copenhagen 與其他痘瘡病毒株之間的對應關係一般可在文獻中獲得。

【0124】 可使用之具有修飾之經工程改造痘病毒旨在提高所得病毒之安全性(例如經增加之減毒)及/或功效及/或趨性。吾人亦可引用胸苷激酶(J2R；參見 Weir 及 Moss, 1983, Genbank 寄存編號 AAA48082)、去氧尿苷三磷酸酶(F2L)、病毒血球凝集素(A56R)、核糖核苷酸還原酶之小亞單元(F4L)及/或大亞單元(I4L)、絲胺酸蛋白酶抑制因子(B13R/B14R)、補體 4b 結合蛋白(C3L)、骨架組裝蛋白(D13L)內及如 K1L、C7L、A39R 及 B7R-B8R 之基因內的缺陷性修飾。

【0125】 特別地適用於本發明之上下文中之非繁殖病毒載體為 MVA，此係歸因於 MVA 之高度減毒表現型(Mayr 等人, 1975, Infection 3: 6-14；Sutter 及 Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10847-51)。出於說明之目的，MVA 已經由雞胚胎纖維母細胞中之連續繼代生成。MVA 基因體之序列分析顯示，MVA 經由其基因體更改而損失其親本病毒絨毛膜尿囊痘瘡病毒 Ankara 之病原性。(Antoine 等人, 1998, Virol. 244: 365-96 及 Genbank 寄存編號 U94848)。MVA 已在超過十萬位個體中安全地且有效地用於天花疫苗接種。病毒在人類細胞中之複製潛能具有缺陷性，但在雞胚胎細胞中不具有缺陷性。各種蜂巢式系統可在此項技術中獲得以產生大量病毒，特別地在以蛋為主之製造製程中(例如 WO2007/147528)。該 MVA 亦為特別地適當的，此係歸因於相較於非減毒載體而言更明顯的在感染

時生成之 1 型 IFN 反應且歸因於 MVA 基因體之序列在文獻(Antoine 等人, 1998, Virol. 244: 365-96)中及在 Genbank (以寄存編號 U94848)中之可獲得性。

【0126】 另一特別地適用於本發明之上下文中之非繁殖病毒載體為 NYVAC，此亦歸因於 NYVAC 之高度減毒表現型(Tartaglia 等人, 1992, Virol. 188(1):217-32)。出於說明性目的，NYVAC 為藉由自病毒基因體精確缺失 18 個開放閱讀框架(ORF)而衍生自 Copenhagen 疫苗病毒株之溶菌斑選殖分離株的高度減毒痘瘡病毒株。

【0127】 又另一適用於本發明之上下文中之非繁殖病毒載體為經工程改造為非繁殖之痘瘡病毒且特定較佳地具有 D13L 缺失之 Copenhagen 病毒株之非繁殖痘瘡病毒。

【0128】 又另一適用於本發明之上下文中之非繁殖病毒載體為較佳地源自人類或動物腺病毒(例如犬類、綿羊類、猴等)之腺病毒(Ad)。可採用任何血清型。合乎需要地，腺病毒載體源自人類腺病毒或黑猩猩腺病毒。黑猩猩 Ad 之代表性實例包括但不限於 ChAd3 (Peruzzi 等人, 2009, Vaccine 27: 1293)、ChAd63 (Dudareva 等人, 2009, Vaccine 27: 3501)、AdC6、AdC7 (Cervasi 等人, 2015, J. of Virology, 87(17):9420-9430；Chen 等人, 2015, J. of Virology, 84(20): 10522-10532)、ChAdOx1 (Dicks 等人, 2012, PLoS One.; 7(7): e40385)及此項技術中描述之黑猩猩 Ad 中之任一者(參見例如 WO03/000283；WO03/046124；WO2005/071093；WO2009/073103；WO2009/073104；WO2009/105084；WO2009/136977 及 WO2010/086189)。較佳地，所使用之該非繁殖病毒載體為較佳地選自由物種 A、B、C、D、E、F 及 G、較佳地物種 B、C 及 D 組成之群之人類腺病毒。該人類腺病毒較佳地選自由以下組成之群：血清型 1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、13、14、15、16、17、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、53、

54、55、56 及 57，且更佳地選自由以下組成之群：血清型 5、11、26 及 35。

【0129】 複製缺陷型腺病毒可如此項技術中所描述，例如藉由缺失病毒複製所需之腺病毒基因體或其部分之至少一區、特定較佳地部分或總體缺失包含 E1 編碼序列之 E1 區(E1A 及/或 E1B)來獲得。本發明亦涵蓋具有腺病毒基因體(例如如作為 E3 區之非必需區或作為 E2 及 E4 之必需區之全部或部分區，如 Lusky 等人, 1998, J. Virol 72: 2022；WO94/28152；WO03/104467；Capasso 等人, 2014, Viruses, 6, 832-855；Yamamoto 等人, 2017, Cancer Sci 108 (2017) 831-837 中所描述)內之一或多種額外缺失/修飾的病毒。在一較佳實施例中，用於本發明中之非繁殖病毒載體為 E1 功能缺陷型(例如參考以寄存編號 M_73260 揭露於 GenBank 中及揭露於 Chroboczek 等人(1992, Virol. 186:280)中之人類 Ad5 之序列，具有自約位置 459 延伸至位置 3510 或位置 455 延伸至位置 3512 之缺失)且在 E3 區內進一步缺失(例如參考同一 Ad5 序列，具有自約位置 28591 延伸至位置 30469 之缺失)的人類腺病毒 5。

具有介白素-7 活性之多肽

【0130】 在一個實施例中，根據本發明使用之非繁殖病毒載體包含編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽之核酸分子。術語「IL-7」、「IL7」、「介白素-7」或「介白素 7」在本文中可互換使用。

【0131】 IL-7 為在適應性免疫系統中具有重要活性之細胞介素(Gao 等人, 2015, Int J Mol Sci.; 16(5): 10267-10280)。其刺激多潛能造血幹細胞分化至淋巴祖細胞中，在淋巴球且更具體而言 T 譜系、B 譜系及自然殺手細胞之發育中在特定階段發揮重要作用。IL-7 為 T 細胞發育及擴展所需，且為維持及恢復成熟 T 細胞之體內恆定所需。IL-7 在各個發育階段及經由以下三個免疫調節路徑來調節 T 細胞體內恆定：胸腺分化、周邊擴展及胸腺外分化。IL-7 亦驅動 T 細胞增殖且促進周邊天然及記憶 T 細胞之存活。為了使周邊 T 細胞再生，IL-7 導引胸腺中之

T 細胞分化及成熟。IL-7 在初期 B 細胞分化中亦至關重要，此係因為其促進向 B 譜系送交共同淋巴祖細胞。其亦協同轉錄因子起作用以調節祖 B 細胞及初期前驅 B 細胞階段中之免疫球蛋白基因重排。隨後，經成功地重排之細胞響應於 IL-7 及其他細胞介素而增殖(Vanloan 等人, 2017, J. Immunol. Res., 文章 ID 4807853)。

【0132】 如同細胞介素之 γ 鏈(γc-CD132)家族之其他成員，IL-7 經由與其獨特 α-受體、IL-7Rα (CD127)及共同 γc 受體形成之三元複合物傳導信號。此相互作用刺激 Janus 激酶(JAK)以及信號轉導子及轉錄活化子(STAT)蛋白以及用於促進目標基因轉錄之磷脂醯肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 或 Src 路徑之後續活化。此初期路徑與 IL-7 之接合最終引起 T 細胞存活延長及增殖增加。受體於包括未成熟 B 細胞、初期胸腺祖細胞及大部分成熟 T 淋巴球之各種免疫細胞上經表現。更特定而言，此受體於大部分靜止人類 T 細胞上連續地表現且於天然及中樞記憶細胞上高位準表現且於 T-reg 上較低位準表現。IL-7R 信號轉導在導引包括 B 細胞、T 細胞及自然殺手細胞之免疫細胞之分化、增殖及存活中至關重要。

【0133】 具有 IL-7 活性之多肽係指提供天然 IL-7 之免疫效應功能中之至少一者，特別地選自由以下組成之群之免疫功能中之至少一者的多肽：包括 B 細胞、T 細胞及自然殺手細胞之免疫細胞之分化、增殖、活化及存活。具有 IL-7 活性之多肽之代表性實例包括天然 IL-7 多肽(例如天然存在之 IL-7 多肽)、經修飾 IL-7 多肽(例如經修飾 IL-7、包含一或多種胺基酸修飾之天然存在之 IL-7 之衍生物、類似物、變異體或突變體)、IL-7 多肽片段(例如經截短 IL-7)、IL-7 多肽多聚體(例如二聚體)、IL-7 融合多肽及其類似物，其限制條件為該等多肽保持實質 IL-7 活性(野生型對應體之至少 50%)。大量 IL-7 類似物可在此項技術中獲得且可用於本發明之上下文中。特別地適當之類似物包含 IL-7 與 Fc 域之融合體(IL-7-Fc)以提高 IL-7 之穩定性，如 Seo 等人, 2014 J. of Virology 88(16): 8998-9009；Choi 等人, 2016, Clin Cancer Res; 22(23): 5898-5908；及 Nam 等人, 2010, Eur. J.

Immunol., 40: 351-358 中所描述。Fc 域或片段可結晶域為具有與稱為 Fc 受體之細胞表面受體及補體系統之一些蛋白質相互作用之能力之免疫球蛋白的尾區。Fc 域可源自 A 類(IgA)、D 類(IgD)、E 類(IgE)、G 類(IgG)或 M 類(IgM)之免疫球蛋白。較佳地，選擇用於誘導低抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之 Fc 異型體(例如鼠類 IgG1、人類 IgG2)。

【0134】 在一個實施例中，由用於本文中之非繁殖病毒載體編碼之 IL-7 具有促進受試者之先天性及/或適應性反應之能力。

【0135】 IL-7 可源自任何生物體，較佳地源自鼠類(NP_032397 及 NP_000871)、猴(例如 G7PC28_MACFA、G7MZL5_MACMU)或人類(IL7RA_HUMAN)生物體。

【0136】 人類 IL-7 基因座具有 72 kb 之長度，駐存於染色體 8q12-13 上且編碼分子量為 20 kDa 之 177 個胺基酸之蛋白質。儘管鼠類 IL-7 基因具有 41 kb 之長度，但其編碼分子量為 18 kDa 之 154 個胺基酸蛋白質。野生型鼠類 IL-7 及人類 IL-7 之初級蛋白質序列各別地以寄存編號 NP_032397 及 NP_000871 揭露於 GenBank 中。在天然情形下，IL-7 經大量醣化且具有 25 kDa 之分子量。

【0137】 基於本文所提供之資訊及技術人員之常識，藉由選殖、藉由 PCR 或藉由化學合成可容易地獲得編碼 IL-7 之核酸分子。用於本文中之編碼 IL-7 之核酸分子可為天然 IL-7 編碼序列(例如 cDNA)或藉由突變、缺失、取代及/或添加一或多個核苷酸而衍生自後者之其類似物。此外，編碼 IL-7 之核酸分子可經最佳化以提供蛋白質之高位準表現及/或改進其在如下文所描述之特定宿主細胞或受試者中之存留及/或延長其半衰期。

【0138】 在一較佳實施例中，用於本發明中之非繁殖病毒載體編碼選自由以下組成之群之多肽：鼠類 IL-7 (mIL-7)、人類 IL-7 (hIL-7)、與 Fc 域融合之鼠類 IL-7 (mIL-7-Fc)及與 Fc 域融合之人類 IL-7 (hIL-7-Fc)。較佳地，該鼠類 IL-7

包含與示於 SEQ ID NO: 1 中之胺基酸序列具有至少 70%、較佳地至少 80%、更佳地至少 90%且甚至更佳地至少 95%一致性之胺基酸序列。較佳地，該人類 IL-7 包含與示於 SEQ ID NO: 2 中之胺基酸序列具有至少 70%、較佳地至少 80%、更佳地至少 90%且甚至更佳地至少 95%一致性之胺基酸序列。較佳地，該鼠類 IL-7-Fc 包含與示於 SEQ ID NO: 3 中之胺基酸序列具有至少 70%、較佳地至少 80%、更佳地至少 90%且甚至更佳地至少 95%一致性之胺基酸序列。較佳地，該人類 IL-7-Fc 包含與示於 SEQ ID NO: 4 中之胺基酸序列具有至少 70%、較佳地至少 80%、更佳地至少 90%且甚至更佳地至少 95%一致性之胺基酸序列。密碼子可藉由技術人員熟知之技術加以最佳化以改進鼠類或人類細胞中之 mIL-7、mIL-7-Fc、hIL-7 或 hIL-7-Fc 蛋白表現。

【0139】 編碼 IL-7 之核酸分子可經插入非繁殖病毒載體基因體中之任何位置處。MVA 基因體於任何缺失 I 至 VII 中之插入、較佳地於缺失 II 或缺失 III 內之插入為特別地適當的，此後者為較佳的。如下文所描述將編碼該鼠類或人類 IL-7 或 IL-7-Fc 之核酸分子置於適當調節要素之控制下以允許其在宿主細胞或受試者中表現。於 E1 區中之插入特別適合於腺病毒，但亦可設想於 E2 區、E3 區、E4 區或基因間區域中之插入。如下文所描述將編碼該鼠類或人類 IL-7 或 IL-7-Fc 之核酸分子置於適當調節要素之控制下以允許其在宿主細胞或受試者中表現。較佳地，編碼 IL-7 或 IL-7-Fc 之核酸分子代替腺病毒 E1 區在有義方位經插入。

【0140】 在一更佳實施例中，本發明係關於用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制的編碼鼠類 IL-7 (例如屬於 SEQ ID NO: 1)或人類 IL-7 (例如屬於 SEQ ID NO:2)或鼠類 IL-7-Fc (例如屬於 SEQ ID NO: 3)或人類 IL-7-Fc (例如屬於 SEQ ID NO: 4)之 MVA (例如具有如先前所描述之缺失 II 或缺失 III，較佳地具有缺失 III)。

其他感興趣之分子

【0141】 在一個實施例中，用於本發明中之非繁殖病毒載體進一步包含一或多個編碼至少一種感興趣之多肽之核酸分子。感興趣之多肽之實例包括細胞介素、群落刺激因子(例如 GM-CSF、C-CSF、M-CSF 等)、免疫刺激性多肽(例如 B7.1、B7.2 等)、免疫檢查點抑制劑(例如抗 PD1、抗 PD-L1、抗 CTLA4 等)、能夠抑制細菌、寄生蟲或病毒感染或其發展之多肽(例如抗原多肽、抗原決定基、藉由競爭抑制天然蛋白作用之反式顯性變異體等)或在此項技術中經辨識為適用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制的任何其他感興趣之多肽。

【0142】 編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽及一或多種額外感興趣之多肽的核酸分子可置放於非繁殖病毒載體基因體之相同位置或不同位置中，如例如缺失 II 或缺失 III 中。該等核酸分子可包含於相同或不同表現卡匣中。在該等核酸分子包含於相同表現卡匣中之情況下，核酸分子可以任何次序置放；其亦可藉由連接子或藉由自裂解肽融合。核酸分子可在相對於所論述之區域之天然轉錄方向之有義或反義方位定位。

編碼 IL-7 之核酸分子之表現

【0143】 如先前所提及，要被插入如本文所描述使用之非繁殖病毒載體之基因體中的一或多種編碼 IL-7 之核酸分子可經最佳化以在特定宿主細胞或受試者中提供高位準表現。實際上已觀測到，生物體之密碼子使用模式為高度非隨機的，且密碼子之使用在不同基因、細胞及宿主之間可明顯不同。因此，一或多個核酸可具有用於在高等真核細胞(例如人類)中有效表現之不當密碼子使用模式。通常而言，密碼子最佳化係藉由用一或多個編碼較頻繁使用之相同胺基酸之密碼子置換對應於在感興趣之宿主生物體中不頻繁使用之密碼子的一或多個「天然」密碼子來執行。置換對應於不頻繁使用之密碼子之所有天然密碼子不為必要

的，此係因為即使在部分置換之情況下，亦可達成經增加之表現。

【0144】 進一步關於密碼子使用之最佳化，宿主細胞或受試者中之表現可進一步經由核酸序列之額外修飾來加以改進。舉例而言，以下情況可能為有利的：防止存在於濃縮區域中之稀少、非最佳密碼子之聚集及/或抑制或修飾預期會負面地影響表現位準之「負」序列要素。該等負序列要素包括但不限於具有極高(> 80%)或極低(< 30%) GC 含量之區域；富含 AT 或富含 GC 之序列伸長段；不穩定的直接或反向重複序列；及/或內部隱蔽調節要素，諸如內部 TATA 盒、嵌合位點、核糖體進入位點及/或剪接供體/受體位點。

【0145】 根據本發明，所使用之非繁殖病毒載體包含具有 IL-7 活性之多肽在宿主細胞或受試者中之表現所需的調節要素。術語「調節要素」或「調節序列」係指允許、有助於或調節給定宿主細胞或受試者中之表現之任何要素。調節要素經排列以使得其出於其預期目的而協同起作用，例如用於啟動子以在容許宿主細胞中實現核酸分子自轉錄起始轉錄至該核酸分子之終止子中。在一較佳實施例中，用於本發明之非繁殖病毒載體包含一或多個表現卡匣，各表現卡匣包含置放於核酸分子之 5'之至少一個啟動子(例如編碼具有 IL-7 活性之多肽)及位於該核酸分子之 3'之一個多腺苷酸化序列。

【0146】 熟習此項技術者應瞭解，調節序列之選擇可視諸如以下之因素而定：核酸分子本身、其中插入核酸分子之非繁殖病毒載體、要被治療之宿主細胞或受試者、所需表現位準等。啟動子具有特殊重要性。在本發明之上下文中，其可為於許多類型之宿主細胞中或對某些宿主細胞具有特異性(例如肝特異性調節序列)或響應於特定事件或外源因素(例如藉由溫度、營養添加劑、激素等)或根據病毒循環階段(例如晚期或初期)經調節之經編碼產物(例如具有 IL-7、mIL-7、hIL-7、mIL-7-Fc、hIL-7-Fc 活性之多肽)的構成性導向表現。吾人亦可使用在生產步驟期間響應於特定事件或外源因素而受到抑制之啟動子以便使病毒載體生產最

佳化且阻止生產細胞中之一或多種經表現多肽之潛在毒性。

【0147】在目前先進技術中已知之各種啟動子可用於本發明之上下文中。痘瘡病毒啟動子特別地適用於非繁殖痘病毒載體(例如 MVA)中。代表性實例包括但不限於痘瘡 p7.5K、pH5R、p11K7.5 (Erbs 等人, 2008, Cancer Gene Ther. 15(1): 18-28)、TK、p28、p11、B2R、pF17R、pA14L、pSE/L、A35R 及 K1L 啟動子、諸如 Chakrabarti 等人(1997, Biotechniques 23: 1094-7；Hammond 等人, 1997, J. Virol Methods 66: 135-8；以及 Kumar 及 Boyle, 1990, Virology 179: 151-8)中所描述之合成啟動子的合成啟動子以及初期/晚期嵌合啟動子。可使用選自包含以下之清單之其他啟動子：巨細胞病毒(CMV)即刻初期啟動子(US 5,168,062)、雙向 CMV 啟動子、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma Virus，RSV)啟動子、腺病毒主要晚期(MLP)啟動子、磷酸甘油激酶(PGK)啟動子(Adra 等人, 1987, Gene 60: 65-74)、EF1α、單純疱疹病毒(HSV)-1 之胸苷激酶(TK)啟動子、T7 聚合酶啟動子(WO98/10088)及可誘導啟動子(例如轉錄活性係藉由存在或不存在醇、四環素、類固醇、金屬、糖等來加以調節之啟動子)。CMV 啟動子特別地適用於非繁殖腺病毒載體(例如 Ad5、Ad11、Ad26、Ad35)中。

【0148】所使用之非繁殖病毒載體可視要被表現之一或多個核酸分子之數目而含有一或多個啟動子。較佳地，當病毒載體編碼具有 IL-7 活性之多肽及另一感興趣之分子時，將編碼核酸分子中之各者置於獨立啟動子之控制下。可替代地，吾人可使用雙向啟動子。在一較佳實施例中，將編碼具有 IL-7 活性之多肽之核酸分子置於 pH5R 啟動子之控制下。

【0149】熟習此項技術者應瞭解，控制核酸表現之調節要素可進一步包含用於適當地起始、調節及/或終止以下之額外要素：轉錄(例如轉錄終止序列)、mRNA 轉運(例如核定位信號序列、多腺苷酸化序列)、加工(例如剪接信號、如 T2A、P2A、E2A、F2A 之自裂解肽、連接子)、穩定性(例如如 16S/19S 或嵌合人

類β球蛋白/IgG之內含子以及非編碼5'及3'序列)、轉譯(例如起始劑Met、三聯前導序列、IRES核糖體結合位點、信號肽等)；靶向序列、連接子(例如由如甘胺酸及絲胺酸之靈活殘基構成之連接子)、轉運序列、分泌信號及參與複製或整合之序列。該等序列已報導於文獻中且可容易地由熟習此項技術者獲得。

非繁殖病毒載體及生產細胞之生產

【0150】一旦用於本文中之非繁殖病毒載體生成，則其可使用習知技術產生/擴增。

【0151】通常而言，該等病毒載體係藉由包含以下步驟之方法產生：(a)將病毒載體引入合適生產細胞株中；(b)在合適條件下培養該細胞株以便允許產生/擴增該等病毒載體；(c)自該細胞株之培養物回收所產生之病毒載體；及(d)任擇地純化該等所回收之病毒載體。

【0152】生產細胞之選擇係視要被擴增之非繁殖病毒載體之類型而定。舉例而言，MVA係嚴格限定宿主的且通常在禽類細胞，亦即原代禽類細胞(諸如由獲自受精蛋之雞胚胎製備之雞胚胎纖維母細胞(CEF))或永生化禽類細胞株上擴增。適用於MVA生產之禽類細胞株之代表性實例包括但不限於經鴨TERT基因永生化之疣鼻棲鴨(*Cairina moschata*)細胞株(參見例如WO2007/077256、WO2009/004016、WO2010/130756及WO2012/001075)；經病毒及/或細胞基因之組合永生化之禽類細胞株(參見例如WO2005/042728)、自發地永生化細胞(例如揭露於US5,879,924中之雞DF1細胞株)或藉由自生長因子及飼養層進行漸進性斷裂而衍生自胚胎細胞之永生化細胞(例如揭露於WO2005/007840及WO2008/129058中之Ebx雞細胞株，諸如Olivier等人, 2010, mAbs 2(4): 405-15中所描述之Eb66)。

【0153】對於其他痘瘡病毒或其他痘病毒株，除了禽類原代細胞(諸如CEF)及禽類細胞株之外，包括以下之許多其他非禽類細胞株可用於生產：人類

細胞株，諸如 HeLa (ATCC-CRM-CCL-2™或 ATCC-CCL-2.2™)、MRC-5、HEK-293；倉鼠細胞株，諸如 BHK-21 (ATCC CCL-10)；及 Vero 細胞。在一較佳實施例中，非 MVA 痘瘡病毒在 HeLa 細胞中擴增(參見例如 WO2010/130753)。

【0154】 對於腺病毒且更特定而言對於 E1 缺失腺病毒載體，合適細胞株包括 293 細胞(Graham 等人, 1997, J. Gen. Virol. 36: 59-72)以及 PER-C6 細胞及 HER96 (例如 Fallaux 等人, 1998, Human Gene Ther. 9: 1909-1917；WO97/00326)或此等細胞株之任何衍生物。但此項技術中所描述之任何其他細胞株亦可用於本發明之上下文中，尤其用以產生用於人類用途之產物之諸如 Vero 細胞、HeLa 細胞及禽類細胞的任何細胞株。該等細胞可適於表現缺乏 E1 基因之缺陷性病毒。

【0155】 生產細胞可在習知醱酵生物反應器、燒瓶及培養盤中經培養。培養可在適合於給定宿主細胞之溫度、pH 及氧含量下進行。此處將嘗試不詳細地描述已知用於產生用於本發明中之非繁殖病毒載體之各種原核生物及真核宿主細胞以及方法。生產細胞較佳地使用無動物或人類來源產物之化學成分確定的培養基在不含動物或人類來源之產物之培養基中經培養。特定而言，雖然生長因子可能存在，但其較佳地以重組方式產生且不自動物物質純化。適當的無動物培養基可由熟習此項技術者視所選生產細胞而容易地進行選擇。該等培養基為市售的。特定而言，當 CEF 用作生產細胞時，其可在 VP-SFM 細胞培養基(Invitrogen)中經培養。在感染之前，生產細胞較佳地在包含於 30℃與 38℃之間的溫度下(更佳地在約 37℃下)經培養 1 天與 8 天之間(較佳地，對於 CEF，經培養 1 天至 5 天，且對於永生化細胞，經培養 2 天至 7 天)。若需要，則可進行 1 天至 8 天之數個繼代以便增加細胞總數。

【0156】 由用於本發明之非繁殖病毒載體感染生產細胞株係在適當條件(特定而言，使用適當感染倍率(MOI))下進行以准許生產細胞之生產性感染。

【0157】 隨後，經感染之生產細胞在熟習此項技術者熟知之適當條件下經

培養直至後代病毒載體產生為止。經感染之生產細胞之培養亦較佳地在 30℃與37℃之間的溫度下在不含動物或人類來源之產物之培養基(其可與用於生產細胞培養及/或用於感染步驟之培養基相同或不同) (使用無動物或人類來源之產物之化學成分確定的培養基)中執行 1 天至 5 天。

【0158】 用於本發明中之非繁殖病毒載體可自培養物上清液及/或生產細胞株中收集。細胞培養物上清液及生產細胞可經彙集或分開收集。自生產細胞回收(且任擇地亦自培養物上清液回收)可需要允許使生產細胞膜破裂以允許釋放病毒載體之步驟。包括但不限於冷凍/解凍、低滲透壓溶解、音波處理、微流體化或高速均質化之各種技術可供熟習此項技術者使用。根據一較佳實施例，回收所產生之病毒載體之步驟包含溶解步驟，其中生產細胞膜較佳地藉由使用高速均質機來加以破裂。高速均質機可商購自 Silverson Machines 公司(East Longmeadow, USA)或 Ika-Labotechnik (Staufen, Germany)。根據特別地較佳之實施例，該高速均質機為 SILVERSON L4R。

【0159】 隨後，用於本發明中之非繁殖病毒載體可使用此項技術中熟知之純化步驟進一步純化。可設想包括澄清、酶處理(例如核酸內切酶、蛋白酶等)、層析及過濾步驟之各種純化步驟。適當方法描述於此項技術中(例如 WO2007/147528 ； WO2008/138533 、 WO2009/100521 、 WO2010/130753 、 WO2013/022764)。在一較佳實施例中，純化步驟包含可用於將病毒與其他生物分子分離、使病毒懸浮液濃縮及/或去鹽之切向流過濾(TFF)步驟。視要被過濾之體積而定，此項技術中可獲得尤其包括但不限於 Spectrumlabs、Pall 公司、PendoTech 及 New Pellicon 之各種 TFF 系統及裝置。

【0160】 隨後，用於本發明中之非繁殖病毒載體可藉由此項技術中已知之任何方法來加以保護以便延長受試者血液循環中之病毒載體存留。該等方法包含但不限於如聚乙二醇化(Tesfay 等人, 2013, J. of Virology, 87(7): 3752-3759；

N'Guyen 等人, 2016, Molecular Therapy Oncolytics, 3, 15021)、病毒栓塞(WO2017/037523)等之化學屏蔽。

宿主細胞

【0161】在另一態樣中，本發明亦關於包含用於本發明中之非繁殖病毒載體之宿主細胞。該等宿主細胞涵蓋上文所描述之生產細胞。

病毒組合物

【0162】本發明亦關於用於治療疑似患有或經識別為患有敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發(亦即本文所引用之免疫抑制之誘發物中之任一者或其任何組合誘發)之免疫抑制之受試者的此類免疫抑制的組合物，其中該組合物包含至少一治療有效量之如本文所描述或根據本文所描述之方法製備的非繁殖病毒載體。較佳地，該組合物進一步包含醫藥學上可接受之媒劑。

【0163】「治療有效量」對應於足以產生一或多種有益結果之非繁殖病毒載體之量。此類治療有效量可隨各種參數而變化，該等參數例如為投與模式、疾病狀態、受試者之年齡及體重、受試者對治療起反應之能力、並行治療之種類及/或治療頻率。病毒載體之適當劑量可常規地由醫師鑒於相關情形而確定。適當地，視所用病毒載體之類型及定量技術而定，病毒載體之個別劑量可在自約 10^3 延伸至約 10^{12} vp (病毒粒子)、iu (感染性單位)或 pfu (溶菌斑形成單位)之範圍內變化。存在於樣本中之病毒載體之量可藉由常規滴定技術，例如藉由對容許細胞(例如 BHK-21、CEF 或 HEK-293)感染後之溶菌斑數目進行計數(pfu 力價)、藉由免疫染色定量免疫螢光法(例如使用抗病毒抗體) (iu 力價)、藉由 HPLC (vp 力價)來測定。出於說明之目的，適用於非繁殖痘病毒載體之劑量包含於約 10^6 pfu 與約 10^{12} pfu 之間、更佳地約 10^7 pfu 與約 10^{11} pfu 之間；甚至更佳地，約 10^8 pfu 與約 10^{10} pfu 之間(例如 5×10^8 至 6×10^9、6×10^8 至 5×10^9、7×10^8 至 4×10^9、8×10^8 至 3×10^9、9×10^8 至 2×10^9 pfu)適宜用於人類用途，其中較佳地，個別劑

量包含約 10^9 pfu 痘病毒載體。仍出於說明之目的，適用於非繁殖腺病毒載體之劑量包含於約 10^6 與約 10^{14} vp 之間、較佳地約 10^7 與約 10^{13} vp 之間、更佳地約 10^8 與約 10^{12} vp 之間且甚至更佳地約 10^9 與約 10^{11} vp 之間(例如 10^9、2×10^9、3×10^9、4×10^9、5×10^9、6×10^9、7×10^9、8×10^9、9×10^9、10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、10^{11} vp 之劑量)。

【0164】 術語「醫藥學上可接受之媒劑」意欲包括與哺乳動物且特定而言人類受試者中之投與相容之任何及所有載劑、溶劑、稀釋劑、賦形劑、佐劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、吸收劑及其類似物。

【0165】 用於本文中之非繁殖病毒載體可獨立地置於適合於人類或動物用途之溶劑或稀釋劑中。溶劑或稀釋劑較佳為等張、低滲或微弱地高滲的且具有相對低之離子強度。代表性實例包括無菌水、生理鹽水(例如氯化鈉)、林格氏溶液(Ringer's solution)、葡萄糖、海藻糖或蔗糖溶液、漢克氏溶液(Hank's solution)及其他生理學上平衡之鹽水溶液(參見例如最新版 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins)。

【0166】 在其他實施例中，病毒組合物經適當地緩衝以用於人類用途。合適緩衝液包括但不限於能夠維持生理或略微鹼性之 pH (例如約 pH 7 至約 pH 9)之磷酸鹽緩衝液(例如 PBS)、碳酸氫鹽緩衝液及/或 Tris 緩衝液。

【0167】 該組合物亦可含有用於提供所需醫藥學或藥效動力學特性之其他醫藥學上可接受之賦形劑，該等特性包括例如滲透壓、黏度、透明度、顏色、無菌性、穩定性、調配物溶解速率、調節或維持向人類或動物受試者中之釋放或吸收、促進跨血液障壁之輸送或在特定器官中之滲透。

【0168】 在另一實施例中，該組合物可與可溶性佐劑組合，該等可溶性佐劑包括但不限於明礬、礦物油乳液及相關化合物，該等相關化合物諸如為 WO2007/147529 中所描述之化合物；多醣，諸如 Adjuvax 及鯊烯；水包油乳液，

諸如 MF59；雙股 RNA 類似物，諸如聚(I:C)；單股胞嘧啶磷酸鹽鳥苷寡去氧核苷酸(CpG) (Chu 等人, 1997, J. Exp. Med., 186: 1623；Tritel 等人, 2003, J. Immunol., 171: 2358)；及陽離子型肽，諸如 IC-31 (Kritsch 等人, 2005, J. Chromatogr. Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 822: 263-70)。

【0169】 在一個實施例中，該組合物可以提高其穩定性為目標來加以調配，特定而言在冷凍溫度(例如-70℃、-20℃)、冷藏溫度(例如 4℃)或環境溫度下製造及長期儲存(亦即至少 6 個月、且較佳地至少二年)之條件下。呈冷凍、液體形式或凍乾形式之各種病毒調配物可在此項技術中獲得(例如 WO98/02522、WO01/66137、WO03/053463、WO2007/056847 及 WO2008/114021 等)。凍乾組合物通常藉由涉及真空乾燥及冷凍乾燥之方法獲得。出於說明之目的，包括 NaCl 及/或糖之緩衝調配物特別地適於病毒保存(例如 S01 緩衝液：342, 3 g/L 蔗糖、10 mM Tris、1 mM $MgCl_2$、150 mM NaCl、54 mg/L Tween 80；ARME 緩衝液：20 mM TRIS、25 mM NaCl、2.5% (w/v)甘油，pH 8.0)。

投與

【0170】 根據本發明使用之非繁殖病毒載體或組合物可以單次劑量或多次劑量投與。若考慮多次劑量，則投與可藉由相同或不同途徑來執行且可在相同部位或在替代性部位進行且可包含呈所指示間隔之相同或不同劑量。各投與之間的間隔可為數小時至 8 週(例如 24 小時、48 小時、72 小時、每週、每 2 或 3 週、每月等)。間隔亦可為不規律的。亦有可能經由在休息期之後重複之連續投與循環進行(例如 3 至 6 個每週或每二週投與之循環、接著為 3 至 6 週之休息期)。各投與之劑量可在上文所描述之範圍內變化。

【0171】 包括非經腸、局部或經黏膜途徑之習知投與途徑中之任一者均可應用於本發明之上下文中。非經腸途徑意欲用於以注射或輸注形式投與且涵蓋全身以及局部途徑。局部投與受限於身體之局部區域(例如腹膜內或胸膜內投

與)。常見非經腸注射類型為靜脈內(至靜脈中)、動脈內(至動脈中)、皮內(至真皮中)、皮下(皮膚下)及肌內(至肌肉中)。輸注通常藉由靜脈內途徑給予。局部投與可使用經皮手段(例如貼片及其類似手段)執行。經黏膜投與包括但不限於經口/消化、鼻內、氣管內、肺內、陰道內或直腸內途徑。在一較佳實施例中，所使用之該組合物係經由非經腸途徑、更佳地經由靜脈內、皮下或肌內途徑且甚至更佳地經由靜脈內途徑投與。在另一實施例中，所使用之該組合物係經由經黏膜投與、較佳地經由鼻內或肺內途徑投與。

【0172】 投與可使用習知注射器及針(例如 Quadrafuse 注射針)或此項技術中可獲得之能夠促進或改進受試者中病毒載體或組合物之遞送的任何化合物或裝置。

【0173】 出於說明之目的，合適組合物包含個別病毒劑量之 10^8 pfu 至 10^{10} pfu (例如約 10^9 pfu)編碼人類 IL-7-Fc 之 MVA，其較佳地藉由靜脈內途徑用於有需要之受試者(例如患有敗血症誘發之免疫抑制之受試者)。

用途及方法

【0174】 本發明提供用於治療有需要之受試者之敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發(亦即本文所引用之免疫抑制之誘發物中之任一者或其任何組合誘發)之免疫抑制的如本文所描述之非繁殖病毒載體或組合物。其亦提供治療方法，該方法包含投與呈足以治療該免疫抑制之量的如本文所描述之該病毒載體或組合物。

【0175】 術語「免疫抑制(immune depression/immunodepression/immune suppression/immunosuppression)」、「免疫麻痹(immune paralysis/immunoparalysis)」可互換使用。其係指免疫反應之暫時性或永久性功能障礙之狀態。其亦指身體免疫系統不能有效地工作以對抗感染及其他疾病。免疫系統之失能可為部分或完全的。

【0176】敗血症為危及生命之器官功能障礙，此係歸因於針對感染之宿主反應失調。敗血症誘發之免疫抑制可在超免疫反應之時段之後，該等超免疫反應包括細胞介素生產之強力增加。該免疫抑制之狀態危及生命，此係因為免疫防禦很大程度上不操作。

【0177】燒傷為由接觸乾熱(例如火)、濕熱(例如蒸汽或液體)、化學物質、電、雷電或輻射造成之對組織之損傷。

【0178】創傷為由外在因素造成之對活性組織之損傷。大手術為執行更大面積切除術(例如進入體腔、移除器官、更改正常解剖結構)之任何侵入性可操作程序。一般而言，若打開間葉障壁(胸腔、腹膜、腦膜)，則手術視為重大的。

【0179】衰老為年齡漸增過程，該過程發生在所有物種中且以逐漸減緩之代謝及組織分解為代表，常常伴有內分泌變化。

【0180】冠狀病毒造成不同冠狀病毒疾病，該等疾病包括重度急性呼吸症候群(SARS)、中東呼吸症候群(MERS)及冠狀病毒疾病 2019 (COVID-19)。經識別之冠狀病毒包括 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV2、229E、NL63、OC43 及 HKU1。

【0181】敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制顯示重大類似性，伴隨例如在創傷及敗血症中誘發單核球增多症及單核球表面上 HLA-DR 少(Heftrig 等人, 2017, Mediat Inflamm, 文章 ID 2608349, 12 頁)、在衰老期間及手術或創傷後促炎性細胞介素(例如 TNFα、IL-6 及 IL-8)大量產生(Jia 等人, 2019, Eur J Trauma Emerg S, https://doi.org/10.1007/s00068-019-01271-6；Kovac 等人, 2005, Exp Gerontol., 40(7):549-55)或患有敗血症、燒傷或創傷之患者血漿中 IL-10 含量持續升高(Thomson 等人, 2019, Military Medical Research, 6:11)以及對於患有創傷及冠狀病毒之患者，影響所有淋巴球子集之重度淋巴球減少症、mHLA-DR 減少及血漿細胞介素含量適當地增加，該細胞介素同時顯示發炎

性反應(IL-6)及免疫抑制性反應(IL-10) (Monneret 等人, 2020, Intensive Care Med, https://doi.org/10.1007/s00134-020-06123-1)。

【0182】 更一般而言，敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制之特徵可在於免疫細胞之細胞凋亡及/或高含量抑制淋巴球及巨噬細胞且抑制促炎性細胞介素生產之抗炎性細胞介素及/或高含量調節性 T 細胞及/或骨髓衍生之抑制細胞(MDSC)及/或抑制分子(例如 PD-1、PD-L1、CTLA4)。

【0183】 免疫抑制亦可由在敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制期間出現之繼發性感染(例如院內感染)造成。非限制性地，該等感染可由以下造成：

- 細菌(例如不動桿菌屬(*Acinetobacter spp.*)、難養芽胞梭菌(*Clostridium difficile*)、大腸桿菌、克雷伯氏菌屬(Klebsiella spp)、金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌、結核分支桿菌、腸球菌屬、退伍軍人桿菌屬)

- 病毒(例如 B 型及 C 型肝炎、流感、HIV、輪狀病毒、單純疱疹病毒)

- 真菌(例如念珠菌屬、麴菌屬、鐮菌屬、毛黴目屬、賽多孢子菌屬(*Scedosporium* spp.))。

【0184】 較佳地，本發明提供用於治療敗血症誘發之免疫抑制的編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽之非繁殖病毒載體或包含該病毒載體之組合物。

【0185】 在另一實施例中，本發明提供用於治療 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV2、229E、NL63、OC43 或 HKU1 誘發之免疫抑制的編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽之非繁殖病毒載體或包含該病毒載體之組合物。

【0186】 在另一實施例中，本發明提供用於治療創傷(例如多創傷、髖部骨折)、大手術及衰老誘發之免疫抑制的編碼至少一具有 IL-7 活性之多肽之非繁殖病毒載體或包含該病毒載體之組合物。

【0187】 在一個實施例中，非繁殖病毒載體或其組合物係在敗血症、燒傷、

創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制階段開始之後在 4 小時至 6 年範圍內變化之時間段內投與。在一個實施例中，用於治療免疫抑制之組合物係在初期，較佳地在免疫抑制階段開始之後第一個月內，例如在免疫抑制階段開始之後 28 天、21 天、14 天、7 天、6 天、5 天、4 天、3 天、2 天內或甚至前 24 小時(例如 4、6、8、12、16、20 小時)內投與。在另一實施例中，用於治療免疫抑制之組合物係在免疫抑制階段開始之後在約 1 個月至約 6 個月範圍內變化之時間段內(例如 180 天、150 天、120 天、100 天、90 天、80 天、70 天、60 天、50 天、40 天、35 天、30 天或 29 天內)投與。在再另一實施例中，用於治療免疫抑制之組合物係在免疫抑制階段開始之後的後期，較佳地在免疫抑制階段開始之後 6 個月至 6 年(例如 6 個月、7 個月、8 個月、9 個月、10 個月、11 個月、1 年、2 年、3 年、4 年、5 年、6 年)內投與。吾人亦可考慮在敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制之不同階段投與其組合物的任何組合。出於說明之目的，合適方案可包含在免疫抑制階段開始之後第一個月內的初期投與一或多次，及在免疫抑制階段開始之後 1 個月至 6 個月內或 6 個月至 6 年內、或在免疫抑制階段開始之後 1 個月至 6 個月內及 6 個月至 6 年內兩者的後期投與一或多次。

【0188】 較佳地，非繁殖病毒載體或其組合物係在敗血症誘發之免疫抑制階段開始之後在 4 小時至 6 年範圍內變化之時間段內投與。在一個實施例中，用於治療敗血症誘發之免疫抑制之組合物係在初期，較佳地在免疫抑制階段開始之後第一個月內，例如在免疫抑制階段開始之後 28 天、21 天、14 天、7 天、6 天、5 天、4 天、3 天、2 天內或甚至前 24 小時(例如 4、6、8、12、16、20 小時)內投與。在另一實施例中，用於治療敗血症誘發之免疫抑制之組合物係在免疫抑制階段開始之後在約 1 個月至約 6 個月範圍內變化之時間段內(例如 180 天、150 天、120 天、100 天、90 天、80 天、70 天、60 天、50 天、40 天、35 天、30 天或

29 天內)投與。在再另一實施例中，用於治療敗血症誘發之免疫抑制之組合物係在免疫抑制階段開始之後的後期，較佳地在免疫抑制階段開始之後 6 個月至 6 年(例如 6 個月、7 個月、8 個月、9 個月、10 個月、11 個月、1 年、2 年、3 年、4 年、5 年、6 年)內投與。吾人亦可考慮在敗血症誘發之免疫抑制之不同階段投與其組合物的任何組合。出於說明之目的，合適方案可包含在敗血症誘發之免疫抑制階段開始之後第一個月內的初期投與一或多次，及在敗血症誘發之免疫抑制階段開始之後 1 個月至 6 個月內或 6 個月至 6 年內、或在敗血症誘發之免疫抑制階段開始之後 1 個月至 6 個月內或 6 個月至 6 年內的後期投與一或多次。

【0189】 在一較佳實施例中，非繁殖病毒載體或組合物之使用包含在免疫抑制階段開始之後 1 次與 10 次之間、較佳地在免疫抑制階段開始之後 1 次與 5 次之間、更佳地在免疫抑制階段開始之後 1 次與 3 次之間、甚至更佳地在免疫抑制階段開始之後一次投與該病毒載體或組合物。在一更佳實施例中，一或多次投與係藉由一或多次靜脈內、皮下或肌內投與非繁殖病毒載體或其組合物來進行。

【0190】 由如本文所描述使用之非繁殖病毒載體或組合物或本發明之方法提供之有益作用可藉由在未根據本文所描述之儀器治療加以治療之情況下臨床狀態相對於基線狀態或相對於預期狀態的可觀測改進來證明。臨床狀態之改進可易於由醫師及熟練健康照護工作人員通常使用之任何相關臨床量測且藉由實驗室中常規使用之技術來加以評估。臨床有益作用亦可藉由諸如血液測試、生物流體分析之適當量測，例如使用各種可獲得之抗體來識別參與免疫反應之不同免疫細胞群體來證明。該等量測結果常規地在醫學實驗室及醫院中加以評估，且大量套組為市售的。該等量測可在投與之前(基線)及在治療期間之各種時間點及在治療停止之後執行。在本發明之上下文中，該等臨床有益作用可與以下但不限於以下相關：功能性先天性及/或適應性免疫增強、至少一種類型之免疫相關細胞含量增加、至少一種類型之經活化免疫相關細胞含量增加及免疫體內恆定恢

復(Takeyama 等人, 2004, Critical Care 20048 (增刊 1):P207)。免疫相關細胞包含但不限於 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、B 細胞、NKT 細胞、NK 細胞、樹突狀細胞、單核球、嗜中性球、巨噬細胞及嗜酸性球。

【0191】 在本發明之上下文中，治療效益可為短暫的(在投與停止之後達一二天、一二週或一二個月)或持續的(達數月或數年)。由於在受試者之間可顯著地變化之臨床狀態之自然過程，故不需要在各所治療之受試者中均觀測到治療效益，但要在大量受試者中觀測到治療效益(例如二組之間的統計學上顯著之差異可藉由諸如 Tukey 參數檢定、Kruskal-Wallis 檢定、根據 Mann 及 Whitney 之 U 檢定、Student t 檢定、Wilcoxon 檢定等之此項技術中已知之任何統計檢定來測定)。

【0192】 在一個實施例中，本文所描述之非繁殖病毒載體或組合物之特別地適當的用途在於提供與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比濃度增加之經治療受試者中之血液循環中具有 IL-7 (例如 hIL-7-Fc)活性之多肽。

【0193】 在一特定實施例中，有益作用可與以下中之一或多者相關：

- 與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比，投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之功能性先天性及/或適應性免疫增強；及/或

- 與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比，投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之選自由以下組成之群之至少一種類型的免疫相關細胞的含量增加：CD4 T 細胞(例如天然 CD4 T 細胞、CD4+效應記憶細胞、CD4+中樞記憶細胞、CD4+急性效應記憶細胞等)、CD8 T 細胞(例如天然 CD8 T 細胞、CD8+效應記憶細胞、CD8+中樞記憶細胞、CD8+急性效應記憶細胞等)、B 細胞、NKT 細胞、NK 細胞、樹突狀細胞、單核球及嗜中性球。較佳地，該使用增加較佳地至少 2 種類型、更佳地至少 3 種類型且更佳地至少 4 種類型之免疫相關細胞的含量；及/或

- 與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比，投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之選自由經活化 CD4 T 細胞、經活化 CD8 T 細胞、經活化 B 細胞及經活化 NK 細胞組成之群之至少一種類型的免疫相關細胞之至少一種類型的經活化狀態增加(從而引起選自由經活化 CD4 T 細胞、經活化 CD8 T 細胞、經活化 B 細胞及經活化 NK 細胞組成之群之至少一種類型的經活化免疫相關細胞的數目及/或百分比增加)。較佳地，該使用增加較佳地至少二種類型、更佳地至少 3 種類型且更佳地至少 4 種類型之免疫相關細胞的經活化狀態；及/或

- 與未投與該非繁殖病毒載體或組合物或投與 IL-7 蛋白之受試者相比，肺中之細胞且更特定而言選自由 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞及 NK 細胞組成之群之至少一種類型的免疫相關細胞的含量增加；及/或

- 與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者或經 IL-7 蛋白治療之受試者相比，投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之肺中選自由經活化 CD4 T 細胞、經活化 CD8 T 細胞及經活化 NK 細胞組成之群之至少一種類型的免疫相關細胞之至少一種類型的經活化狀態增加(從而引起選自由經活化 CD4 T 細胞、經活化 CD8 T 細胞及經活化 NK 細胞組成之群之至少一種類型的經活化免疫相關細胞的數目及/或百分比增加)；及/或與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比，投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之選自由 IFNγ、TNFα、IL-6 及 IL-1β 組成之群之至少一種類型的細胞介素的含量增加；及/或

- 與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比，投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之脾及/或血液 CD4 T 細胞、脾及/或血液 CD8 T 細胞及/或胸腺細胞上之 Bcl2 基因表現增加；及/或

- 與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比，投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之血液及/或脾及/或胸腺內 CD4+及 CD8+雙陽性細胞的百分比減少及 CD4+及 CD8+簡單陽性細胞的百分比增加；及/或

- 與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者或經 IL-7 蛋白治療之受試者相比，經該非繁殖病毒載體或組合物治療之受試者之存活延長。

【0194】 在再另一實施例中，如本文所描述之非繁殖病毒載體或組合物係用於治療展現與免疫相關細胞含量及/或經活化免疫相關細胞含量減少相關之一或多種生物標記物之免疫抑制受試者。在一較佳實施例中，該一或多種生物標記物選自由以下組成之群：循環單核球上之 HLA-DR 表現、循環 IL-10、絕對 CD3 T 細胞計數、包括調節性 T 細胞之數個免疫抑制性淋巴球亞群量測結果及如 PD-1、PD-L1、CTLA-4、Lag-3 及 BTLA 之抑制受體的表現。

【0195】 在一個實施例中，與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者相比，本文所描述之非繁殖病毒載體或組合物係用於增強投與該非繁殖病毒載體或組合物之受試者之功能性先天性及/或適應性免疫系統。在一較佳實施例中，該非繁殖病毒載體或組合物係用於增加至少一種類型之先天性免疫相關細胞且較佳地選自由 NK 細胞及單核球組成之群之至少一種類型之先天性免疫相關細胞的含量、及/或至少一種類型之經活化或成熟先天性免疫相關細胞且較佳地選自由 NK 細胞及單核球組成之群之至少一種類型之經活化或成熟先天性免疫相關細胞的含量。在另一較佳實施例中，該非繁殖病毒載體或組合物係用於增加至少一種類型之適應性免疫相關細胞且較佳地選自由 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、B 細胞及 NK 細胞組成之群之至少一種類型之適應性免疫相關細胞的含量、及/或至少一種類型之經活化適應性免疫相關細胞且較佳地選自由 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、B 細胞及 NK 細胞組成之群之至少一種類型之經活化適應性免疫相關細胞的含量。對於一般引導，功能性先天性及/或適應性免疫之增強可常規地例如藉由生物流體分析或藉由標記物使用如實例部分中所描述之合適抗體來加以評估。

【0196】 本發明亦關於用於治療有需要之受試者之敗血症、燒傷、創傷、

大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制的方法，該方法包含一或多次投與本文所描述或根據本文所描述之方法製備之非繁殖病毒載體或組合物。

組合療法

【0197】 在本發明之實施例中之任一者中，根據本發明使用之非繁殖病毒載體或其組合物可單獨或與可用於治療免疫抑制之任何習知治療性儀器治療聯合投與。舉例而言，該病毒載體或組合物可與免疫治療性產品聯合使用。代表性實例尤其包括免疫檢查點調節劑，亦即影響細胞表面受體之調節之藥劑，諸如阻斷表皮生長因子受體之單株抗體、阻斷血管內皮生長因子之單株抗體及 TLR 促效劑(例如 TLR9 促效劑、TLR4 促效劑)。適用於本發明中之該等免疫治療性產品之其他代表性實例尤其為表現載體(例如質體 DNA 載體、痘瘡病毒、腺病毒、慢病毒、疱疹病毒等)重組多肽及非肽佐劑。

【0198】 專利、公開案及資料庫條目之所有上文所引用之揭露內容均特定地以全文引用之方式併入本文中。本發明之其他特點、對象及優點將自實施方式、圖式及申請專利範圍顯而易見。併入以下實例以展現本發明之較佳實施例。然而，鑒於本揭露內容，熟習此項技術者應瞭解，可在不背離本發明之精神及範疇之情況下對所揭露之具體實施例作出改變。

實例

1.材料及方法

【0199】 下文所描述之建構係根據 Maniatis 等人(1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY 或後續版本)中詳述之一般基因工程改造及分子選殖技術或當使用商用套組時根據製造商建議來進行。PCR 擴增技術為熟習此項技術者已知(參見例如 PCR protocols - A guide to methods and applications, 1990, 由 Innis, Gelfand, Sninsky 及 White 發佈, Academic Press)。

1.1 載體構築

1.1.1 MVATG18897

【0200】 此後所說明之亦稱為 MVA-hIL-7-Fc 之 MVATG18897 經工程改造以表現處於 pH5R 啟動子控制下之與人類 IgG2 (SEQ ID NO: 4)之 Fc 序列融合之人類介白素-7。

【0201】 藉由合成方式生成含有 pH5R 啟動子及由與痘瘡轉移質體同源之約 40 bp 序列包圍之融合體 IL-7-Fc 的 DNA 片段，且將該 DNA 片段插入質體 15ABXMTP_IL-7 中。在藉由 *PsiI* 及 *ScaI* 限制此質體之後，藉由 In-Fusion 選殖 (In-Fusion HD 選殖套組，Clontech)在經 *Not*I 及 *Bgl*II 消化之痘瘡轉移質體 pTG18626 中插入該片段，從而產生 pTG18897。

【0202】 MVA 轉移質體 pTG18626 經設計以准許藉由同源重組在 MVA 基因體之缺失 III 中插入要被轉移之核苷酸序列。該質體源自其中在 MVA 缺失 III 周圍選殖側接序列(BRG3 及 BRD3)之質體 pUC18 (Sutter 及 Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10847)。

【0203】 使用含有編碼 mCherry 螢光蛋白之基因之親本 MVA 執行向該親本 MVA 之缺失 III (MVA mCherry)中之同源重組。MVA mCherry 之優點在於區分感染已成功地整合表現卡匣之重組病毒之細胞與感染初始 MVA mCherry 病毒(親本病毒)之細胞。實際上，在缺失 III 內之表現卡匣成功重組之情況下，mCherry 基因經移除，且病毒溶菌斑顯現為白色。

【0204】 藉由同源重組，藉由使用 MVA-mCherry 作為親本病毒且使用轉移質體 pTG18897 在雞胚胎纖維母細胞(CEF)上生成 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)。自 12 日齡含胚胎無特定病原體(SPF)蛋(Charles River)分離 CEF。將胚胎機械地撕開，溶解於 Tryple Select 溶液(Invitrogen)中，且在補充有 5% FCS (Gibco)及 2 mM L-麩醯胺酸之 MBE (以伊格爾(Eagle)為主之培養基；Gibco)中培

養離散細胞。

【0205】 轉移質體 pTG18897 與親本 MVA-mCherry 之間的同源重組使得能夠生成已損失其 mCherry 表現卡匣且獲得 IL-7-Fc 表現卡匣之重組痘瘡病毒且藉由分離白色非螢光溶菌斑來執行選擇。

【0206】 在二個 F175 燒瓶中在 CEF 上擴增 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之病毒儲備液以生成適當的病毒儲備液。在 DF1 細胞上滴定病毒儲備液且感染性力價係以 pfu/mL 為單位表示。藉由 PCR 分析此儲備液以使用適當引子對來驗證表現卡匣及重組臂之整合性。亦藉由表現卡匣定序來分析儲備液。定序結果之比對顯示與理論預期序列之 100%同源性。若需要，則使用習知技術純化病毒製劑。簡言之，在 37℃、5% CO_2 下執行病毒擴增 72 小時。隨後，將經感染細胞及培養基集結且冷凍。使用高速均質機(SILVERSON L4R)使粗收取物破裂且將其提交至純化過程(例如如 W02007/147528 中所描述)。簡言之，可藉由過濾來澄清經溶解之病毒製劑，且藉由切向流過濾(TFF)步驟將其純化。將經純化病毒再懸浮於合適病毒調配物緩衝液(例如 5% (w/v)蔗糖、50 mM NaCl、10 mM Tris/HCl、10 mM 麩胺酸鈉，pH 8)中。

1.1.2 MVATG19791

【0207】 MVATG19791 經工程改造以表現處於 pH5R 啟動子控制下之與人類 IgG2 (SEQ ID NO: 4)之 Fc 序列融合之人類介白素-7。編碼 hIL-7-Fc 之核苷酸序列經密碼子最佳化以改進重組蛋白在人類細胞中之表現。在 ATG 起始密碼子前添加 Kozak 序列(ACC)，且在終止密碼子後添加轉錄終止子(TTTTTNT)。此外，排除進入開放閱讀框架中之一些模式：對痘病毒表現不利之 TTTTTNT、GGGGG、CCCCC。

【0208】 藉由合成方式生成含有經最佳化融合體 IL-7-Fc 之 DNA 片段。藉由 In-Fusion 選殖(In-Fusion HD 選殖套組，Clontech)在經 *Pvu*II 消化之痘瘡轉移

質體 pTG19349 中插入此片段，從而產生 pTG19791。

【0209】 MVA 轉移質體 pTG19349 經設計以准許藉由同源重組在 MVA 基因體之缺失 III 中插入要被轉移之核苷酸序列。該質體源自其中在 MVA 缺失 III 周圍選殖側接序列(BRG3 及 BRD3)之質體 pUC18。該質體亦含有 pH5R 啟動子。

【0210】 如上文所描述，藉由同源重組，藉由使用 MVA-mCherry 作為親本病毒且使用轉移質體 pTG19791 在雞胚胎纖維母細胞(CEF)上生成 MVATG19791。

1.2.活體外評估 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897 及 MVATG19791)

【0211】 作為第一步驟，評估感染病毒載體之 A549 細胞中 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)表現 hIL-7-Fc 基因之能力。收集細胞及上清液且將其提交至西方墨點法，且使用對人類 IL-7 具有特異性之兔單株抗體評估 hIL-7-Fc 偵測。將該等細胞及上清液與不編碼任何外來蛋白之經空 MVA (MVATGN33.1)轉導之細胞進行比較。

【0212】 亦評估 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)表現功能性 hIL-7 之能力。以 0.3、1 及 3 之 MOI (感染倍率)感染 COS7 細胞，且在 48 小時至 72 小時後收集上清液。藉由 ELISA 評估所分泌之 IL-7 之量，且使用 PB1 細胞(ATCC)評估 IL-7 功能性，該等 PB1 細胞之增殖依賴於 hIL-7。在 PB1 細胞上培育上清液 72 小時，且執行旨在量測細胞代謝(反映細胞增殖)之 MTT 分析。

【0213】 作為第二步驟，評估且比較感染病毒載體之 CEF 及 A549 細胞中 MVATG18897 及 MVATG19791 表現 hIL-7-Fc 基因之能力。收集細胞及上清液且將其提交至西方墨點法，且使用對人類 IL-7 具有特異性之兔單株抗體評估 hIL-7-Fc 偵測。將該等細胞及上清液與不編碼任何外來蛋白之經空 MVA (MVATGN33.1)轉導之細胞進行比較。亦使用 hIL-7 ELISA 定量上清液中之 hIL-7-Fc 之量。

1.3.健康 C57BL6/J 小鼠模型中之藥物動力學及生物學活性

1.3.1 動物

【0214】 在於 Charles River Laboratories 購買之 C57BL/6J 小鼠中進行投與之後，評估由 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)表現之與人類 IgG2 之 Fc 域(hIL-7-Fc)融合之人類介白素-7 的藥物動力學。

1.3.2.投與方案

1.3.2.1 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)及空 MVA (MVATGN33.1)注射方案

【0215】 實驗 1：在後眼眶竇處向小鼠靜脈內(IV)注射一次 1×10^7 或 1×10^8 pfu MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 1×10^8 pfu MVATGN33.1 (用作對照之空 MVA) (15 隻小鼠/組)。

【0216】 實驗 2：在後眼眶竇處向小鼠靜脈內(IV)注射一次 1×10^8 pfu MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 2×10^8 pfu 空 MVA (MVATGN33.1) (15 隻小鼠/組)。

【0217】 實驗 3：在後眼眶竇處向小鼠靜脈內(IV)注射一次 1×10^8 pfu MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 1×10^8 pfu 空 MVA (MVATGN33.1)。執行實驗二次，且將結果彙集。

【0218】 實驗 4：在後眼眶竇處向小鼠靜脈內(IV)注射一次 1×10^7 pfu MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 5 μg 由 Geneart 在 CHO 細胞上生產之重組 IL-7-Fc 蛋白。

1.3.3 hIL-7-Fc 及 mIFNγ 之藥物動力學

1.3.3.1 血液取樣

【0219】 實驗 1：為了量測循環 hIL-7-Fc 及 mIFNγ，在以下時間點對經注射小鼠之血液進行取樣：0 小時、2 小時、6 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、8 天、15 天及 21 天(在各時間點，3 隻小鼠/組)。

【0220】 實驗 2：為了量測藉由注射 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)產生之

循環 hIL-7-Fc 以及循環 mIFNγ 之量，在以下時間點對經注射小鼠之血液進行取樣：0 小時、6 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、7 天及 9 天(在各時間點，3 隻小鼠/組)。

1.3.3.2 血清製備

【0221】 在取樣之後，將血液樣本保持在 4℃下約 1 小時。隨後，將血液樣本離心(在 4℃下 10000 rpm 達 5 min)，且將血清收集在新管中且在 ELISA 時將其儲存於-20℃下。

1.3.3.3 hIL-7 及 mIFN-γ ELISA

【0222】 對於 hIL-7-Fc 藥物動力學，根據提供商說明書使用來自 R&D systems 之人類 IL-7 Duoset ELISA 運行 ELISA。值得注意地，分析自始至終僅使用 50 µL 體積之樣本及各種試劑。視樣本及 IL-7 濃度而定，將樣本自 1/3 稀釋至 1/6561。隨後，使用由 R&D System 建立且提供之標準曲線來計算各樣本之濃度，該濃度涵蓋 7,81 pg/mL 至 500 pg/mL 之值。

【0223】 為了給藥 mIFNγ，根據提供商說明書使用來自 Biolegend 之小鼠 IFN-γ ELISA MAX™ Deluxe 運行 ELISA。值得注意地，除了塗佈步驟以外，分析自始至終僅使用 50 µL 體積之樣本及各種試劑。視樣本及 IFN-γ 濃度而定，將樣本自 1/3 稀釋至 1/6561。隨後，使用由 Biolegend 建立且提供之標準曲線來計算各樣本之濃度，該濃度涵蓋 15,62 pg/mL 至 1000 pg/mL 之值。

1.3.4 生物學活性評估

【0224】 在實驗 1 中，不評估生物學活性。

【0225】 實驗 2：為了量測 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，在第 1 天、第 3 天、第 9 天及第 29 天將 3 隻小鼠/組處死，且收集脾及胸腺。

【0226】 製備脾細胞及胸腺細胞，且溶解紅血球。在洗滌之後，使用以下抗體及試劑對所收集之細胞進行染色：Fc 阻斷溶液(抗 CD16-32 (2.4G2))、抗 CD3

APC、抗 CD4 APC-H7、抗 CD8 PE-CY7 或抗 CD8-PRCP、抗 CD19-PE、抗 B220-APCH7、抗 NK1.1 PercpCy-5、抗 CD11c-PE、抗 CD11b-V500、抗 Ly6G-FITC、抗 Ly6C-APC、抗 Bcl2-FITC、抗 CD62L-PECy7、抗 CD44-FITC、抗 CD127-PE、活力標記物(LiveDead LV450)，所有此等試劑均在 Becton Dickinson 購買，來自 Invitrogen 之活力標記物除外。在與抗體一起培育之前，與 Fc 阻斷溶液一起培育。隨後，將細胞與 3 種不同的抗體混合物/抗體組一起培育：

*T 細胞：抗 CD3、抗 CD8、抗 CD4、抗 CD44、抗 CD62L、LV450

*骨髓細胞：抗 B220、抗 NK1.1、抗 CD11b、抗 CD11c、抗 Ly6G、抗 Ly6C、LV450

*細胞凋亡：對於脾、抗 CD4、抗 CD8、抗 CD3、抗 Bcl2、LV450；對於胸腺，相同抗體混合物，抗 CD3 除外。

【0227】 在 FACSCanto II 細胞計數器上運行經洗滌之染色樣本。使用 BD diva 軟體分析資料。

【0228】 實驗 3 (執行二次且彙集)：為了量測肺上之 MVATG18897 及 MVATGN33.1 之生物學活性，在注射後第 3 天及第 9 天將 5 隻小鼠/組處死，且收集肺。

【0229】 製備肺細胞，且溶解紅血球。在洗滌之後，使用 Muse 細胞分析儀對所收集之細胞進行計數且使用以下抗體及試劑對其進行染色：Fc 阻斷溶液(抗 CD16-32 (2.4G2))、抗 CD3 APC、抗 CD4 APC-H7、抗 CD8 PE-CY7、抗 NK1.1 PercpCy-5、抗 CD69-FITC、活力標記物(LiveDead LV450)，所有此等試劑均在 Becton Dickinson 購買，來自 Invitrogen 之活力標記物除外。在與抗體一起培育之前，與 Fc 阻斷溶液一起培育。藉由流式細胞量測術(FACSCanto II)分析染色。

【0230】 實驗 4 (執行二次，一次係針對脾分析，一次係針對肺分析)：為了量測 MVATG18897 及 hIL-7-Fc 蛋白之生物學活性，在各實驗中在注射後第 3 天

及第 9 天將 6 隻小鼠/組處死，且收集脾或肺。

【0231】 製備脾細胞及肺細胞，且溶解紅血球。在洗滌之後，使用 Muse 細胞分析儀對所收集之細胞進行計數且使用以下抗體及試劑對其進行染色：Fc 阻斷溶液(抗 CD16-32 (2.4G2))、抗 CD3 APC、抗 CD4 APC-H7、抗 CD8 PE-CY7、抗 NK1.1 PercpCy-5、抗 CD69-FITC、活力標記物(LiveDead LV450)，所有此等試劑均在 Becton Dickinson 購買，來自 Invitrogen 之活力標記物除外。在與抗體一起培育之前，與 Fc 阻斷溶液一起培育。藉由流式細胞量測術(FACSCanto II)分析染色。

【0232】 亦使用脾細胞及肺細胞執行胞內細胞介素染色分析。在 Golgi Plug (1/1000 最終稀釋度)存在之情況下用各 1 μg/mL 之抗 CD3 抗體(1/1000 最終稀釋度)及抗 CD28 抗體(1/1000 最終稀釋度)刺激細胞 4 小時 30 分鐘。在培育之後，使用以下抗體及試劑對細胞進行染色：Fc 阻斷溶液(CD16/32)、抗 CD4-APC-H7、抗 CD8-V500、活力標記物(Live/Dead LV450)。在與抗體一起培育之前，與 Fc 阻斷溶液一起培育。隨後，將細胞固定且滲透，且用以下抗體執行胞內細胞介素染色：抗 CD3-PerCP、抗 IFNγ-Alexa488、抗 TNFα-APC 及抗 IL2-PE。在 BD Biosciences FACSCanto II 細胞計數器上運行樣本。使用 BD Biosciences Diva 軟體分析資料。

1.3.5 統計分析

【0233】 為了評估生物學活性，使用伴隨重複量測之雙向 ANOVA (混合模型)檢定、接著為用於組間比較之 Bonferonni 後檢定(若顯著($p< 0.05$))執行統計分析(GraphPad Prism 軟體)。由於多重比較，p 值經校正。若 Bonferonni 檢定之後及校正之後的 p 值低於 0.05，則在二組之間觀測到之差異視為顯著的。

1.4.敗血症小鼠模型中之生物學活性

1.4.1. 盲腸結紮及穿孔(CLP)

【0234】為了誘發多微生物腹膜炎，使 8 至 11 週齡 C57BL/6 雄性小鼠經受根據 Restagno 等人(2016, PLoS One, 11(8):e0162109)所描述之方案加以調適之盲腸結紮及穿孔(CLP)手術。簡言之，用甲苯噻咁與氯胺酮之混合物麻醉小鼠。使盲腸暴露，在其外部三分之一處結紮且用 21 號針穿孔二次以產生二個單孔。擠壓少量糞便以便誘發輕度級別之敗血症。對照為原始小鼠，且在僅暴露盲腸且無 CLP 之情況下經 Sham 操作小鼠經歷開腹術。所有經操作小鼠均在手術之前接受鎮痛(丁基原啡因(buprenorphine))。在手術結束時，所有經操作小鼠均接受 5%葡萄糖鹽水溶液之皮下注射。在手術之後約六小時且隨後每十二小時持續接下來二天，所有經操作小鼠均接受抗生素(亞胺培南(imipenem)/西司他汀(cilastatin))之腹膜內注射及丁基原啡因之皮下注射以控制疼痛。隨後，一天二次監測小鼠直至研究結束為止。界定臨床分數，若分數高於預定臨限值，則使小鼠安樂死。觀測到逐漸失能、呼吸困難、厭食症或體溫低於 30℃，則使動物安樂死。隨後，測定存活率直至手術後第 7 天為止。

1.4.2.投與方案

【0235】比較 Sham 小鼠、未經治療 CLP 小鼠及經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠的實驗：在 CLP 之後 4 天，在異氟醚吸入麻醉之後，在後眼眶竇處向一組 CLP 小鼠靜脈內(IV)注射一次含 1×10^8 pfu MVATG18897 (MVA-hIL-7-Fc)之 100 µL S08 緩衝液。

【0236】比較經空MVA治療之CLP小鼠及經MVA-hIL-7-Fc治療之CLP小鼠的實驗：在CLP之後4天，在異氟醚吸入麻醉之後，在後眼眶竇處向一組CLP小鼠靜脈內(IV)注射一次含1×10^8 pfu MVATG18897 (MVA-hIL-7-Fc)之100 µL S08緩衝液。恰好以相同方式、但用空MVA對第2組進行治療。

【0237】比較 MVA-hIL-7-Fc 及 hIL-7-Fc 蛋白之實驗(2 個實驗)：在 CLP 之後 4 天，在異氟醚吸入麻醉之後，在後眼眶竇處向一組 CLP 小鼠靜脈內(IV)注

射一次含 1 × 10^7 pfu MVATG18897 (MVA-hIL-7-Fc)之 100 µL S08 緩衝液。恰好以相同方式、但用 5 µg hIL-7-Fc 對第 2 組進行治療。

1.4.3.生物學活性評估

1.4.3.1.血液

1.4.3.1.1.血清製備

【0238】 在研究結束時，將血液收集至收集管(Microvette® CB 200 Z-Gel, Sarstedt)中。在取樣之後，將血液樣本保持在 4℃下約 1 小時。隨後，將血液樣本離心(在 4℃下 10000 rpm 達 5 min)，且將血清收集在新管中且將其儲存於-20℃下直至進行 ELISA 及多重分析為止。

1.4.3.1.2.細胞懸浮液製備

【0239】 自後眼眶竇獲取血液。將小體積全血用 1%乙酸溶液溶解，混合且在固定時間期間在 BD FACSCanto II 之培養基速度(1 微升/秒)下採集。對對應於未溶解核之事件數目進行計數，因此得到每微升全血之有核細胞濃度。為了進行進一步流式細胞量測術分析，將剩餘全血用 10 mL 紅血溶解緩衝液(BioLegend)溶解約 15 分鐘。在洗滌之後，使細胞繼續進行染色，如針對脾細胞一樣。

1.4.3.2.脾

【0240】 為了量測 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之生物學活性，在注射 MVA-hIL-7-Fc 之後三天，亦即在 CLP 之後七天將小鼠處死，且收集脾。將脾解離且獲得細胞懸浮液。在溶解紅血球之後，收集脾細胞，對其進行讀數且使其繼續進行下文所描述之免疫分析。

1.4.3.3. hIL-7 ELISA

【0241】 根據提供商說明書使用來自 R&D Systems 之人類 IL-7 DuoSet® ELISA 研發系統運行 ELISA。值得注意地，所有試劑體積均除以二。以 1/3 稀釋血清且隨後連續 5 次進行三倍稀釋。隨後，使用由 R&D Systems 建立且提供之

標準曲線來計算各樣本之濃度，該濃度涵蓋 7.81 pg/mL 至 500 pg/mL 之值。

1.4.3.4.多重分析

【0242】 在經刺激脾細胞之血清及上清液上執行分析。以 0.5×10^6 個細胞/經抗 CD3 抗體(1 μg/mL)預塗佈之孔接種脾細胞。二十四小時後，收集上清液且將其儲存於-20℃下。根據提供商說明書使用來自 Meso Scale Discovery (MSD)之 U-PLEX 多重分析在血清及上清液上運行多重分析以便評估以下細胞介素：IL-1β、IL-6、IL-10、TNFα 及 IFNγ。隨後，使用由 MSD 建立且提供之標準曲線來計算各樣本之濃度。

1.4.3.5. IFNγ ELISpot 分析

【0243】 以 25×10^3 個細胞/孔塗鋪脾細胞且將其與抗 CD3 抗體(1 μg/mL)及抗 CD28 抗體(1 μg/mL)一起培養隔夜(約 20 小時)。藉由來自 CTL 之鼠類 IFNγ 單色酶促酶相關免疫斑點(ELISpot)分析(MIFNGP-1M/5)定量產生 IFNγ 之 T 細胞。含有抗 CD3/CD28 抗體之實驗孔中所偵測到之斑點數目減去陰性對照孔中之斑點數目(對應於產生 IFNγ 之 T 細胞)。

1.4.3.6.流式細胞量測術分析

1.4.3.6.1.細胞表型分型

【0244】 使用以下抗體及試劑對脾細胞進行染色：Fc 阻斷溶液(抗 CD16/32，殖株 2.4G2)、抗 CD45-PE-Cy7、抗 CD3 APC、抗 CD4 APC-H7、抗 CD8 V500、抗 CD19-PE、抗 CD69-FITC、抗 NK1.1 PercpCy-5、活力標記物(LiveDead LV450)，所有試劑均在 Becton Dickinson 購買，來自 Invitrogen 之活力標記物除外。在與抗體一起培育之前，與 Fc 阻斷溶液一起培育。隨後，在 FACSCanto II 細胞計數器上運行樣本且使用 BD Diva 軟體分析資料。

1.4.3.6.2.三重胞內細胞介素染色分析

【0245】 在 Golgi Plug (1/1000)存在之情況下用抗 CD3 抗體(1 μg/mL)及抗

CD28 抗體(1 μg/mL)刺激脾細胞 4 小時。隨後，使用以下抗體及試劑對細胞進行染色：Fc 阻斷溶液(抗 CD16/32，殖株 2.4G2)、抗 CD4 V500、抗 CD8 APC-H7、活力標記物(LiveDead LV450)。在與抗體一起培育之前，與 Fc 阻斷溶液一起培育。在洗滌之後，將細胞固定且滲透。用以下抗體執行胞內細胞介素染色：抗 CD3 PerCP、抗 IFNγ Alexa488、抗 TNFα APC 及抗 IL2 PE。隨後，洗滌且在 FACSCanto II 細胞計數器上運行樣本。使用 BD Diva 軟體分析資料。

1.4.3.7.統計分析

【0246】 對於存活研究，使用對數等級檢定、接著為使用 Tukey 多重性調整檢定進行之各組之間的特定比較來執行統計分析(SAS® 9.4 軟體)。

【0247】 為了評估比較 Sham 小鼠、未經治療 CLP 小鼠及經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠的實驗以及比較經空 MVA 治療之 CLP 小鼠及經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠的實驗中的生物學活性，使用單向 ANOVA Kruskal-Wallis 檢定、接著為用於組間比較之配對 Mann-Whitney 檢定(若顯著($p< 0.05$))執行統計分析(GraphPad Prism 軟體)。若用 Mann-Whitney 檢定獲得之 p 值低於 0.05，則在二組之間觀測到之差異視為顯著的。

【0248】 為了評估比較 MVA-hIL-7-Fc 及 hIL-7-Fc 蛋白之實驗中之生物學活性，使用單向 ANOVA Kruskal-Wallis 檢定、接著為用於組間比較之配對 Dunns 檢定(若顯著($p< 0.05$))執行統計分析(GraphPad Prism 軟體)。若用 Dunns 檢定獲得之 p 值低於 0.05，則在二組之間觀測到之差異視為顯著的。

1.5. ICU Covid-19 免疫抑制患者中之生物學活性

【0249】 全血係獲自入選觀測性臨床研究 REA-IMMUNO-COVID (RICO)之感染 SARS-CoV-2 之患者，該研究經倫理委員會(法蘭西島人民保護委員會(Comité de Protection des Personnes Ile de France) 1 - N°IRB/IORG 編號：IORG0009918 -協定 2020-A01079-30)批准且在 ClinicalTrials.gov 以 NCT04392401

編號經登記(里昂綜合人民醫院(Hospices civils de Lyon)之加護病房)。在進入 ICU 之後第 3 天與第 5 天之間自六位在入院時展現大於或等於 5 之 SOFA 分數的患者獲得樣本。

【0250】 評估在用含有 hIL-7-Fc 之上清液刺激之後的 STAT5 磷酸化。使用來自 MVATG18897 或 MVATGN33.1 感染物之經稀釋上清液(1/2.5、1/5 及 1/10 稀釋度)及未經感染細胞上清液(1/2.5 稀釋度)刺激全血十分鐘。用抗人類 CD3 Pe-Cy7 及抗人類 CD45 APC-H7 對細胞進行染色。使用 Perfix 暴露套組執行固定、紅血球溶解及滲透步驟。在滲透之後，用抗人類 pSTAT5 (pY694)對細胞進行染色。在 CantoII 流式細胞儀上分析細胞且使用 Flow Jo 軟體分析資料。

【0251】 藉由胞內細胞介素染色來測定 CD4+ T 細胞之功能性。根據製造商說明書使用 Duractive 1 刺激套組刺激全血，來自 MVATG18897 或 MVATGN33.1 感染物之上清液或未經感染細胞上清液除外。以 1/2 及 1/10 稀釋上清液以刺激細胞。根據製造商說明書使用 Duraclone IF T 活化套組來執行 CD4+ T 細胞之胞內染色。在 CantoII 流式細胞儀上分析細胞且使用 Flow Jo 軟體分析資料。

1.6.衰老創傷患者中之生物學活性

【0252】 包括年齡超過 75 歲、入住皮提耶-薩爾佩特里爾醫院(Pitié Salpêtrière hospital)急診室之髖部骨折患者之前瞻性觀測性臨床研究 HIPAGE 經倫理委員會(CPP Pitié-Salpêtrière, Paris, France)批准。另外，亦募集年齡匹配之衰老對照患者。所有包括在內之參與者均被告知且提供其同意書。在 5 位衰老患者及 10 位在手術後 48 小時至 72 小時獲得之衰老髖部骨折患者之低溫保存 PBMC 上執行分析。

【0253】 進行免疫表型分型以評估 CD57 在 CD8 T 細胞當中之表現，亦即熟知的免疫衰老標記物(Kared 等人, 2016, J Immunol Immunother, 65(4):441-52)。

將 PBMC 解凍且用固定活力染料(eFluor 780)、抗人類 CD3-Pe-Cy7、抗人類 CD8-BV650 及抗人類 CD57-FITC 對其進行染色。使用 BD-LSRFortessa 流式細胞儀分析細胞且使用 Flow Jo 軟體分析資料。

【0254】 評估經解凍 PBMC 上之用含有 hIL7-Fc 之上清液刺激之後的 STAT5 磷酸化。使用來自感染 MVATG19791 之細胞之經稀釋上清液(在對應於 12.5 ng/mL IL-7-Fc 之稀釋度下)或來自感染 MVATGN33.1 之細胞之經稀釋上清液(具有相同稀釋度)刺激 PBMC 十分鐘。同時使用具有未經刺激對照之培養基。使用 BD-Cytofix 緩衝液執行固定，且使用 BD-Perm 緩衝液 III 進行滲透。在滲透之後，用抗人類 CD3 Pacific Orange、抗人類 pSTAT5 (pY694)對細胞進行染色。使用 BD-LSRFortessa 流式細胞儀分析細胞且使用 Flow Jo 軟體分析資料。

【0255】 評估經解凍 PBMC 上之 T 細胞增殖。用細胞增殖染料(eFluor 450)對 PBMC 進行染色且使用來自感染 MVATG19791 之細胞之經稀釋上清液(在對應於 12.5 ng/mL IL7-Fc 之稀釋度下)或來自感染 MVATGN33.1 之細胞之經稀釋上清液(具有相同稀釋度)對其刺激五天。同時使用具有未經刺激對照之培養基。隨後，用可固定活力染料(eFluor 780)及抗人類 CD3-Pe-Cy7 對 PBMC 進行染色。在 BD-LSRFortessa 流式細胞儀上分析細胞且使用 Flow Jo 軟體分析資料。

1.7. ICU 創傷及重大手術患者中之生物學活性

【0256】 低溫保存 PBMC 係獲自一組在創傷性休克之後或在重大手術操作之後入住加護病房之危重病患者。在入住 ICU 之後第 3 天至第 5 天時自在入院時具有大於或等於 4 之 SOFA 分數之患者獲得血液。緊接著製備 PBMC 且冷凍直至分析為止。PBMC 係由 Transhit Biomarker 公司提供，該公司具有包括患者及/或周圍家庭同意書之倫理條件保證書。分析三位重大手術操作之後的患者及三位強烈多創傷性休克之後的患者。

【0257】 藉由 3 位創傷患者及 3 位手術患者之 PBMC 上之胞內細胞介素染

色來測定 CD4+ T 細胞之功能性。在解凍及隔夜靜止之後，在蛋白質轉運抑制劑(布雷非德菌素 A (Brefeldin A) (GolgiPlug BD))存在之情況下使用 3 ng/mL PMA-0.3 μg/mL 離子黴素或抗 CD3/抗 CD28 抗體(各 1 μg/mL)刺激 PBMC 5 小時。同時使用未經刺激對照。對於各刺激條件，添加來自感染 MVATG19791 之細胞之上清液(在對應於 60 ng/mL IL7-Fc 之稀釋度下)或來自感染 MVATGN33.1 之細胞之上清液(具有相同稀釋度)且將其與僅具有對照之培養基進行比較。

【0258】 隨後，將 PBMC 固定且滲透(BD cytofix/cytoperm)，且用針對 CD3-PECy7、CD4-BV510、CD8-APC-H7、IFNγ-BB700、IL2-PE、TNFα-A488 之單株抗體對其進行染色。在 CantoII 流式細胞儀上分析細胞且使用 Flow Jo 軟體分析資料。

2.結果

2.1 活體外評估在藉由 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)轉導細胞之後的 hIL-7-Fc 表現及功能性

【0259】 在第一實驗中，藉由空 MVA (MVATGN33.1，陰性對照)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)轉導 A549 細胞。收集細胞及上清液且藉由西方墨點法對其進行分析(圖 1A)。在來自空 MVA (MVATGN33.1)轉導之細胞及上清液之情況下未偵測到特異性頻帶，而在經 MVA-hIL-7-Fc 轉導之細胞及對應上清液之情況下清楚地偵測到特異性信號。如所預期，在 β-巰基乙醇不存在之情況下，細胞及上清液顯現污跡，且在 β-巰基乙醇存在之情況下，細胞及上清液顯現清晰的單頻帶，該單頻帶由於蛋白質醣化而略微地大於 43 kDa。

【0260】 在第 2 實驗中，使用 MVA-hIL-7-Fc 以各種 MOI 轉導 COS7 細胞且在 48 小時或 72 小時收集上清液。隨後，在用 MVA-hIL-7-Fc 轉導之後，在所收集之上清液上執行偵測人類 IL-7 之 ELISA 以偵測所分泌之人類 IL-7 (圖 1B)。在用 MVA-hIL-7-Fc 轉導之後清楚地偵測到 hIL-7，而在用空 MVA 轉導之後在

COS7 細胞之上清液中未偵測到信號。在所收集之上清液內偵測到之 IL-7 之量清楚地為劑量/MOI 依賴性的(對於 MOI 0.3，為 25 ng/mL；對於 MOI 1，為 56 ng/mL；且對於 MOI 3，為 66 ng/mL)。

【0261】 在 PB1 細胞上評估上清液中之 hIL-7 之功能性，該等 PB1 細胞之生長為 hIL-7 依賴性的。在將細胞與各種稀釋度之所收集之上清液一起培育之後 72 小時，在 PB1 細胞上執行量測細胞代謝之 MTT 分析。如圖 1C 中所示，在來自空 MVA 轉導之上清液之情況下未偵測到活性，而在來自經 MVA-hIL-7-Fc 轉導之細胞之上清液之情況下偵測到信號。如所預期，所偵測活性係視 MOI 及上清液稀釋度而定。其展現在細胞感染之後由 MVA-hIL-7-Fc 產生之人類 IL-7 之活性/功能性。

2.2 活體內評估健康 C57BL6/J 小鼠模型中之 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)

2.2.1 實驗 1：以 2 種劑量(1 × 10^7 及 1 × 10^8 pfu)靜脈內注射 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之後的 hIL-7 的藥物動力學

【0262】 在此實驗中，將 C57BL6/J 小鼠分成 3 組 15 隻動物。向 3 組各別地注射呈 1 × 10^8 pfu 之劑量之空 MVA (MVATGN33.1)及呈 1 × 10^7 pfu 或 1 × 10^8 pfu 之劑量之 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)，以上全部藉由靜脈內途徑注射。在 0 小時、2 小時、6 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、8 天、15 天及 21 天時對 3 隻小鼠/組之血液進行取樣(各時間點之經取樣小鼠由於倫理考慮因素而為不同小鼠)。因此，使用血清，使用 ELISA 測定經注射小鼠之血液中之 hIL-7 藥物動力學，以及使用另一 ELISA 測定循環 mIFNγ 藥物動力學。

【0263】 圖 2 顯示不同組之小鼠血液中循環 hIL-7 及 mIFNγ 之偵測結果。圖 2A 顯示在 IV 注射空 MVA 之後，由於病毒載體自身誘導先天性免疫，故少量 IFNγ 被誘導(在注射後 6 小時，最大值 10.7 ng/mL)，而如所預期，未偵測到 hIL-

7。圖 2B 顯示在 IV 注射呈 10^7 pfu 之劑量之 MVA-hIL-7-Fc 之後，由於病毒主鏈，相同少量 IFNγ 被誘導(在注射後 6 小時，最大值 5.1 ng/mL)。平行地，在注射後 2 小時立即偵測到循環 hIL-7 之峰值，其中在注射後 24 小時偵測到最大值(2.4 ng/mL)。所偵測到之 hIL-7 之量隨時間推移而緩慢地減少：在注射後 4 天仍可偵測到 hIL-7 (0.1 ng/mL)，且在注射後第 8 天不再偵測到 hIL-7。圖 2C 顯示注射 10^8 pfu MVA-hIL-7-Fc 之小鼠之類似模式，不同之處在於最大峰值在注射後 24 小時較高且略微延遲(在注射後 6 小時，為 24.5 ng/mL，且在注射後 24 小時，為 61.4 ng/mL)。所偵測到之 hIL-7 之總體量比較低劑量高約 1-對數。關於低劑量，在注射後 4 天仍偵測到 hIL-7 (3.1 ng/mL)，且在注射後 8 天不再偵測到 hIL-7。循環 mIFNγ 之藥物動力學與在相同劑量之空 MVA 之情況下所觀測到之藥物動力學相同。

【0264】 此實驗清楚地證實與空 MVA 相比 MVA-IL-7 經至少 4 天表現可偵測含量之循環 hIL-7 之能力。

2.2.2 實驗 2：靜脈內注射 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或空 MVA (MVATGN33.1)之後的hIL-7 的藥物動力學及相關免疫活性

【0265】 在此實驗中，將 C57BL6/J 小鼠分成 2 組 15 隻動物。向 2 組各別地注射呈 2×10^8 pfu 之劑量之空 MVA (MVATGN33.1)及呈 1×10^8 pfu 之劑量之 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)，以上全部藉由靜脈內途徑注射。在 0 小時、6 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、8 天、9 天、15 天及 29 天時對 3 隻小鼠/組之血液進行取樣(各時間點之經取樣小鼠由於倫理考慮因素而為不同小鼠)。因此，使用血清，使用 ELISA 測定經注射小鼠之血液中之 hIL-7 藥物動力學，以及藉由另一 ELISA 測定給藥循環 mIFNγ 藥物動力學。另外，在第 1 天、第 3 天、第 9 天及第 29 天時將 3 隻小鼠/組處死，且對其脾及胸腺進行取樣以便監測免疫細胞、免疫細胞數目、活化狀態及表現型。

2.2.2.1 hIL-7 及 mIFNγ 藥物動力學

【0266】 圖 3A 顯示在實驗自始至終在 IV 注射空 MVA 之小鼠中可能未偵測到循環 hIL-7，而在注射後前 4 天內偵測到微量循環 mIFNγ，其中在注射後 6 小時偵測到 8.5 ng/mL 峰值，反映 MVA 載體自身誘導之先天性免疫反應。

【0267】 圖 3B 顯示經 MVATG18897 (MVA-hIL-7-Fc)治療之小鼠在注射後 6 小時立即展現循環 hIL-7 (在注射後 6 小時及 24 小時，23 ng/mL 之平均值)，該循環 hIL-7 隨時間推移而略微地減少(在注射後第 2 天、第 3 天及第 4 天，10 ng/mL、7 ng/mL 及 5.1 ng/mL 之平均值)。在注射後第 8 天，不再偵測到循環 hIL-7。循環 mIFNγ 之概況與在注射空 MVA 之小鼠中觀測到之概況完全相當，且因此可歸因於 MVA 載體自身。

2.2.2.2 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)之免疫學活性

2.2.2.2.1 脾細胞總數

【0268】 圖 4 顯示隨群組及時間而定之脾細胞總數。與未經治療小鼠相比，空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)均誘導脾細胞總數在第 1 天略微地減少(因此，作用可能由載體自身介導)。在第 3 天，未經治療小鼠及經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠展現類似數目之脾細胞，而經空 MVA 治療之小鼠仍展現較低數目之脾細胞。在第 9 天，與空 MVA (92×10^6 個細胞/脾之平均值)及未經治療小鼠(59×10^6 個細胞/脾)相比，MVA-hIL-7-Fc 在第 9 天強烈且顯著地增加脾細胞數目(231×10^6 個細胞/脾之平均值)。在第 29 天，3 組展現總數相當之脾細胞。

【0269】 呈現於圖 4 上之此等結果清楚地顯示能夠增加脾細胞總數之載體 MVA 的作用及能夠在第 9 天驚人地增加脾細胞數目之裝有 IL-7 臂之 MVA 的作用。MVA-hIL-7-Fc 概括載體自身與裝臂(arming)之免疫學作用。預期 MVA-hIL-7-Fc 增加脾細胞數目之能力在免疫抑制患者中藉由製備患者免疫系統以更好且

更迅速地對潛在新感染或侵入起反應而有益。

2.2.2.2.2 脾中之 CD4 T 細胞及 CD4+ T 細胞亞群之總數

【0270】 圖 5 顯示以下視群組及時間點而定之總數：脾內 CD4 T 細胞(圖 5A)以及 CD4+ T 細胞之各亞群，亦即天然 CD4 T 細胞(圖 5B)、CD4+效應記憶細胞(圖 5C)、CD4+中樞記憶細胞(圖 5D)及 CD4+急性效應記憶細胞(圖 5E)。經由以下標記物識別出 CD4+ T 細胞之此等 4 個亞群：對於天然細胞，CD3+ CD4+ CD62L+ CD44-；對於效應記憶細胞，CD3+ CD4+ CD62L- CD44+；對於中樞記憶細胞，CD3+ CD4+ CD62L+ CD44+；及對於急性效應細胞，CD3+ CD4+ CD62L- CD44-。

【0271】 關於脾中之 CD4+ T 細胞總數，所有 3 組(未經治療小鼠、經空 MVA 治療之小鼠及經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠)在第 1 天、第 3 天及第 29 天展現類似數目。相反地，經空 MVA (MVATGN33.1)治療之小鼠在第 9 天展現相較於未經治療小鼠而言略微地增加之 CD4+ T 細胞總數(20.8×10^6 相對於 13.2×10^6)。明顯地，經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之小鼠在第 9 天展現相較於未經治療小鼠而言及相較於經空 MVA 治療之小鼠而言顯著地增加之脾中之 CD4+ T 細胞總數(32.1×10^6)。MVA-hIL-7-Fc 誘導之 CD4+ T 細胞較高總數係用於治療免疫抑制患者之優點，此係因為此意指更多來自適應性免疫臂之細胞存在於次級淋巴器官中，準備好對新侵入起反應。

【0272】 與未經治療小鼠相比，脾中之天然 CD4+ T 細胞(圖 5B)似乎在第 1 天及第 3 天因空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 而略微地減少(作用與 MVA 載體相關)。相反地，天然 CD4+ T 細胞數目在第 9 天因 MVA-hIL-7-Fc 治療而相較於未經治療小鼠而言顯著地增加(各別地 16.9×10^6 相對於 9.9×10^6)。在注射後第 29 天，所有群組均展現類似數目之天然 CD4+ T 細胞。

【0273】 儘管空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 均在注射後第 1 天減少效應記憶

CD4+ T 細胞數目(圖 5C)，但僅 MVA-hIL-7-Fc 在第 3 天相較於經空 MVA 治療之小鼠(1.6×10^6 個細胞)及在第 9 天(10.6×10^6 個細胞)而言(相較於未經治療小鼠(1.8×10^6 個細胞)及經空 MVA 治療之小鼠(5.2×10^6 個細胞)而言)顯著地增加此亞群(3.8×10^6 個細胞)。在第 29 天仍觀測到類似趨勢。值得注意地，經空 MVA 治療之小鼠在第 9 天展現中等增加數目之 CD4+效應記憶細胞，該數目顯著地高於未經治療小鼠中之數目，但亦顯著地低於經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠中之數目。對於另一效應群體(急性效應，圖 5E)，與空 MVA (2×10^6 個細胞)及未經治療小鼠(1.4×10^6 個細胞)相比，MVA-hIL-7-Fc 在注射後第 9 天顯著地增加此群體(3.8×10^6 個細胞)。

【0274】 與在注射後第 3 天及第 9 天之空 MVA (在第 3 天及第 9 天各別地 1×10^6 個細胞及 1.4×10^6 個細胞相對於各別地 0.5×10^6 個細胞及 0.8×10^6 個細胞)相比以及與在注射後第 9 天及第 29 天之未經治療小鼠(對於 MVA-hIL-7-Fc，在第 9 天及第 29 天各別地 1.4×10^6 個細胞及 1.2×10^6 個細胞相對於對於未經治療小鼠，各別地 0.4×10^6 個細胞及 0.6×10^6 個細胞)相比，MVA-hIL-7-Fc 亦顯著地增加 CD4+中樞記憶細胞之數目(圖 5D)。對於此細胞亞群，未觀測到相較於未經治療小鼠而言顯著的空 MVA 作用。

【0275】 在注射後一個或若干個時間點，與空 MVA 相比，MVA-hIL-7-Fc 特異性誘導經注射小鼠之脾中之 CD4+效應記憶細胞、急性效應細胞及中樞記憶細胞。此證實 MVA-hIL-7-Fc 中之經編碼 IL-7 之作用。CD4 T 細胞之該等亞群之誘導在免疫抑制之治療中至關重要，一個特定實例為敗血症誘發之免疫抑制之治療，如在特定效應記憶細胞及急性效應細胞中為在第二次感染之後展現最快特異性免疫反應之細胞。

2.2.2.2.3 脾中之 CD8+ T 細胞及 CD8+ T 細胞亞群之總數

【0276】 圖 6 顯示以下視群組及時間點而定之總數：脾內 CD8 T 細胞(圖

6A)以及 CD8+ T 細胞之各亞群，亦即天然 CD8 T 細胞(圖 6B)、CD8+效應記憶細胞(圖 6C)、CD8+中樞記憶細胞(圖 6D)及 CD8+急性效應記憶細胞(圖 6E)。經由以下標記物識別出 CD8+ T 細胞之此等 4 個亞群：對於天然細胞，CD3+ CD8+ CD62L+ CD44-；對於效應記憶細胞，CD3+ CD8+ CD62L- CD44+；對於中樞記憶細胞，CD3+ CD8+ CD62L+ CD44+；及對於急性效應細胞，CD3+ CD8+ CD62L- CD44-。

【0277】 與未經治療小鼠相比，空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)在注射後第 1 天均減少脾中之 CD8+ T 細胞總數。經空 MVA 或 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠展現相當含量，此表明病毒載體自身之作用(圖 6A)。在第 3 天及第 9 天，與空 MVA (在第 3 天及第 9 天各別地 6.8×10^6 個細胞及 10.2×10^6 個細胞)及未經治療小鼠(對於第 3 天及第 9 天各別地 9.2×10^6 個細胞及 7.7×10^6 個細胞)相比，僅 MVA-hIL-7-Fc 顯著地增加 CD8 T 細胞總數(在第 3 天及第 9 天各別地 13.2×10^6 個細胞及 19.4×10^6 個細胞)，此表明 MVA-hIL-7-Fc 中經編碼之 IL-7 對脾之整體 CD8+ T 細胞群體的特異性作用。

【0278】 空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 亦在注射後第 1 天強烈地減少天然 CD8+ T 細胞數目(圖 6B)及 CD8+ T 中樞記憶細胞數目(圖 6D)。在注射後第 3 天，與未經治療小鼠相比，此減少仍在二種 MVA 針對天然 CD8+ T 細胞時偵測到。相反，在相同時間點(第 3 天)，與空 MVA (各別地 10.9×10^6 個細胞、6.6×10^6 個細胞及 16.5×10^6 個細胞)及未經治療小鼠(各別地 4.6×10^6 個細胞、9.2×10^6 個細胞及 16×10^6 個細胞)相比，僅 MVA-hIL-7-Fc 強烈且顯著地增加 CD8+效應記憶細胞數目(36.6×10^6 個細胞，圖 6C)、中樞記憶細胞數目(21.1×10^6 個細胞，圖 6D)及急性效應細胞數目(35.6×10^6 個細胞，圖 6E)。此作用在注射後第 9 天仍被偵測到且顯著：對於 MVA-hIL-7-Fc、空 MVA 及未經治療小鼠，各別地對於效應記憶 CD8+ T 細胞係 33.9×10^6 個細胞相對於 11.2×10^6 個細胞相對於 2.7×10^6 個細

胞；對於 MVA-hIL-7-Fc、空 MVA 及未經治療小鼠，各別地對於記憶中樞 CD8+ T 細胞係 35 × 10^6 個細胞相對於 8.4 × 10^6 個細胞相對於 4.3 × 10^6 個細胞；對於 MVA-hIL-7-Fc、空 MVA 及未經治療小鼠，各別地對於急性效應 CD8+ T 細胞係 40.5 × 10^6 個細胞相對於 19.7 × 10^6 個細胞相對於 21.1 × 10^6 個細胞。在此時間點，與未經治療小鼠(48.5 × 10^6 個細胞)相比，MVA-hIL-7-Fc 亦顯著地增加天然 CD8+ T 細胞數目(88.9 × 10^6 個細胞)。與空 MVA (8.5 × 10^6 個細胞)及未經治療小鼠(7.1 × 10^6 個細胞)相比，MVA-hIL-7-Fc 在注射後第 29 天對 CD8+中樞記憶細胞(16.4 × 10^6 個細胞)之作用仍顯著(圖 6D)。值得注意地，儘管與未經治療小鼠相比，CD8+效應記憶細胞數目在注射後第 3 天、第 9 天及第 29 天因空 MVA 而略微地增加，但該數目仍顯著地低於 MVA-hIL-7-Fc 誘導之該等細胞數目。

【0279】 MVA-hIL-7-Fc 對脾之 CD8+ T 細胞具有重大作用且其作用主要由裝臂人類 IL-7 介導。關於 CD4+ T 細胞，CD8 T 細胞之該等亞群之誘導在免疫抑制之治療中至關重要，一個特定實例為敗血症後之免疫抑制之治療，如在特定效應記憶細胞及急性效應細胞中為在第二次感染之後展現最快特異性免疫反應之細胞。另外，對於 T 細胞增殖及效應 T 細胞中之轉化，在注射後至多第 29 天 CD8+中樞記憶 T 細胞之誘導亦為人感興趣，此係因為此等細胞為適應性記憶反應儲集器。

2.2.2.2.4 脾及胸腺中之 T 細胞中之 Bcl2 表現

【0280】 Bcl2 為存活基因，對應蛋白質在抗細胞凋亡過程中發揮一定作用。在此實驗之小鼠之脾內之 T 細胞上以及在胸腺細胞上監測 Bcl2 表現(圖 7)。在注射後第 1 天及第 3 天及在來自 3 組中之各者之小鼠上藉由流式細胞量測術分析平均螢光強度(MFI)。

【0281】 圖 7 顯示表示為 MFI 的脾中之 CD4+ T 細胞(圖 7A)、CD8+ T 細胞(圖 7B)上及胸腺細胞上之 Bcl2 表現(圖 7C)。MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)在

注射後第 1 天在脾中之 CD4+ T 細胞上特異性誘導相較於展現類似含量之空 MVA (344)及未經治療小鼠(342)而言較高的 Bcl2 MFI (442，圖 7A)。在第 1 天，來自脾之 CD8+ T 細胞中經表現之 Bcl2 之 MFI (圖 7B)相較於未經治療小鼠(483)而言亦在經空 MVA 治療之小鼠中顯著地較高(630)，且相比於經空 MVA 治療之小鼠及未經治療小鼠而言在經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠中顯著地較高(757)。在第 3 天，3 組看起來相當。在脾中，空 MVA 及/或 MVA-hIL-7-Fc 似乎快速地增加 CD4 T 細胞及 CD8+ T 細胞上之 Bcl2 表現。

【0282】 在胸腺中，空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 在注射後第 3 天相較於未經治療小鼠(131)而言增加 Bcl2 表現(各別地 227 及 246)。此所觀測到之空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 之作用為等效的，此表明作用主要由 MVA 自身介導。

【0283】 總體而言，空 MVA 及/或 MVA-hIL-7-Fc 改進抗細胞凋亡蛋白 Bcl2 表現，極早地在注射後第 1 天在脾中之 CD4 T 細胞及 CD8 T 細胞上及在第 3 天在胸腺中。如在敗血症中所描述，免疫細胞經歷大規模細胞凋亡，該細胞凋亡為 MVA-hIL-7-Fc 改進諸如 Bcl2 之抗細胞凋亡蛋白之表現的令人感興趣的潛在治療作用。

2.2.2.2.5 胸腺內之細胞亞群比例

【0284】 圖 8 表示屬於 3 組且視時間點(第 1 天及第 3 天)而定之胸腺內之各細胞亞群百分比。將胸腺細胞分成 4 個亞群：雙陰性細胞(DN，其為 CD4-及 CD8-)、雙陽性細胞(DP，其為 CD4+及 CD8+)、單陽性 CD4+ (SP CD4+，其為 CD8-及 CD4+)及單陽性 CD8+ (SP CD8+，其為 CD8+及 CD4-)。胸腺中之分化路徑為分化成 DP 細胞之第一個 DN 細胞，該等 DP 細胞分化成 SP CD4+或 SP CD8+，且隨後成熟 SP CD4+及 SP CD8+可遷移出胸腺以在生物體中發揮其作用。在用空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療後，4 個細胞亞群之比例與未經治療小鼠相比在注射後第 1 天不經調節(圖 8A)。相反地，在

注射後第 3 天，空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 減少 DP 細胞百分比達至類似程度(在未經治療小鼠中 73%至對於空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 各別地 58%及 56%)，而二種 MVA 均增加 SP CD4+細胞比例(與對於未經治療小鼠之 12%相比，對於二種 MVA 均為 22%)及 SP CD8+細胞比例(與對於未經治療小鼠之 7%相比，對於空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 各別地為 12%及 13%) (圖 8B)。所有百分比均返回至等效於在第 9 天及第 29 天未經治療小鼠之值(未示出)。此等資料表明，MVA (空或編碼 IL-7)能夠推動 T 細胞自胸腺分化，此係因為其似乎增加單陽性細胞(CD4+或 CD8+)百分比，此舉將促進胸腺外部存在成熟 T 細胞。在敗血症後之免疫抑制之情形下，觀測到淋巴球減少症，且此免疫抑制階段中之療法目標中之一者在於恢復正常淋巴球計數。預期 MVA-hIL-7-Fc 對胸腺及對 T 細胞分化之作用有益於恢復正常淋巴球計數。

2.2.2.2.6 嗜中性球及骨髓樹突狀細胞數目

【0285】 圖 9 表示視治療及時間點而定之脾中之嗜中性球數目(圖 9A)及骨髓樹突狀細胞(mDC)數目(圖 9B)。在第 1 天，與未經治療小鼠相比，空 MVA (MVATGN33.1)及 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)均傾向於增加嗜中性球數目。明顯地，MVA-hIL-7-Fc 在以下時間誘導嗜中性球數目顯著地增加：注射後第 3 天 (1.9×10^6 個細胞)及第 9 天(1.1×10^6 個細胞)，此係相較於未經治療小鼠(在第 3 天 0.49×10^6 個細胞及在第 9 天 0.3×10^6 個細胞)及/或空 MVA (在第 3 天 0.42×10^6 個細胞及在第 9 天 0.6×10^6 個細胞)而言。所有 3 組在第 29 天均展現數目相當之嗜中性球。嗜中性球為在宿主防禦包括感染之各種攻擊中發揮重要作用之重要細胞。嗜中性球可在免疫抑制情形下，如例如在敗血症誘發之免疫抑制中更改。因此，MVA-hIL-7-Fc 誘導嗜中性球之能力表示達到嗜中性球之體內恆定恢復的強有利條件。

【0286】 平行地，與未經治療小鼠(9.3×10^5 個細胞)相比，脾中之 mDC 監

測顯示空 MVA (1.3×10^5 個細胞)及 MVA-hIL-7-Fc (3.2×10^5 個細胞)在注射後第 3 天顯著地減少 mDC。對於此減少之一個假設為 MVA 對 mDC 之可能性感染引起該等細胞凋亡(在感染後 48 小時由 MVA 誘導),同時該等細胞在脾內表現經編碼 hIL-7。相反地,在第 9 天,與空 MVA (6.1×10^5 個細胞)及未經治療小鼠(4.6×10^5 個細胞)相比,MVA-hIL-7-Fc 特異性誘導 mDC 顯著地增加(14.4×10^5 個細胞),而未經治療小鼠及經空 MVA 治療之小鼠中之 mDC 數目相當(空 MVA 誘導之減少恢復)。在各組中,mDC 數目在第 29 天相當,所觀測到之作用為短暫的。在免疫抑制且特定而言敗血症誘發之免疫抑制階段期間,mDC 數目減少。在第 9 天 MVA-hIL-7-Fc 對此等細胞數目之作用對於恢復該等細胞數目有吸引力。

2.2.2.2.7 單核球亞群數目

【0287】 在免疫抑制且特定而言敗血症誘發之免疫抑制期間,單核球明顯受影響。儘管更多描述 IL-7 對 T 細胞具有活性之事實,但監測 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)及其對照空 MVA (MVATGN33.1)對單核球之作用。特定而言,對小鼠中已描述之 3 個單核球亞群進行染色:具有促炎性且施加吞噬作用之單核球亞群(展現 Ly6C^{高}) (圖 10A),僅具有促炎性之單核球亞群(Ly6C^{中等}) (圖 10B)及經描述為組織/巨噬細胞中之巡邏者之單核球亞群(展現 Ly6C^{低}) (圖 10C)。單核球分化之天然方式係自 Ly6C^{高}階段至 Ly6C^{低}階段。

【0288】 在此實驗中,關於以上段落中所描述之其他細胞群體,在未經治療小鼠中觀測到之情況相比,空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 在第 1 天誘導脾中之 3 個單核球亞群數目略微地減少,作用可能由 MVA 載體介導。對於 Ly6C^{高}單核球,MVA-hIL-7-Fc 在第 3 天相較於空 MVA (63.9×10^4 個細胞)及未經治療小鼠(36.6×10^4 個細胞)而言特異性誘導此等單核球強烈且顯著地增加(185.5×10^4 個細胞)。3 組中之此等 Ly6C^{高}單核球數目在第 9 天及第 29 天再次變得相當。對於 Ly6C^{中等}單核球,MVA-hIL-7-Fc 亦在以下時間誘導強烈且顯著地增加:第 3 天

(106.4 × 10^4 個細胞)及第 9 天(192.5 × 10^4 個細胞)，此係相較於空 MVA 及未經治療小鼠(在第 3 天各別地 42.3 × 10^4 個細胞及 23.3 × 10^4 個細胞以及在第 9 天各別地 53.2 × 10^4 個細胞及 8.8 × 10^4 個細胞)而言。值得注意地，在第 9 天，相較於未經治療小鼠而言，空 MVA 亦誘導此等細胞增加。各組中之此等單核球數目在第 29 天再次變得相當。對於 Ly6C ^{低}單核球，MVA-hIL-7-Fc 亦在以下時間特異性誘導此等單核球顯著地增加：第 3 天(61.1 × 10^4 個細胞)及第 9 天(68.54 × 10^4 個細胞)，此係相較於空 MVA 及未經治療小鼠(在第 3 天各別地 28.5 × 10^4 個細胞及 29.1 × 10^4 個細胞以及在第 9 天各別地 17.4 × 10^4 個細胞及 11.7 × 10^4 個細胞)而言。類似於其他單核球亞群，各組中之此等亞群數目在第 29 天變得相當。

【0289】 此等資料表明，MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)對單核球具有活性，該活性似乎主要由裝臂 IL-7 介導(似乎亦因空 MVA 而增加、但達到比 MVA-hIL-7-Fc 低之含量的 Ly6C ^{中等}單核球除外)。其在注射後第 3 天第一次誘導 Ly6C ^{高}單核球(「不成熟單核球」)，此情況在後續時間點消失。其他單核球 Ly6C ^{中等}及 Ly6C ^{低}亦在第 3 天立即增加，但在第 9 天展現等效或甚至更強烈的增加，而 Ly6C ^{高}單核球返回至在未經治療小鼠中觀測到之「正常」值。此觀測結果可表明，MVA-hIL-7-Fc 誘導單核球，該等單核球隨後在第 3 天與第 9 天之間分化成 Ly6C ^{中等}及 Ly6C ^{低}單核球。所有群組在第 29 天再次相當，此指示此誘導為短暫的。關於在敗血症誘發之免疫抑制期間單核球之經更改特點，所觀測到之 MVA-hIL-7-Fc 對單核球之作用特別為人感興趣。

2.2.3 實驗3：健康C57BL6/J小鼠之肺細胞上之MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)及空MVA (MVATGN33.1)活性

2.2.3.1 肺細胞數目

【0290】 在肺製備之後，使用 Muse 細胞分析儀對總體回收細胞進行計數(圖 27A)。在注射後第 3 天，與未經治療小鼠相比，MVATGN33.1 顯著地增加肺

細胞數目。與未經治療小鼠相比，MVA-hIL-7-Fc 亦顯著地增加此細胞數目。另外，經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠中之肺細胞數目增加顯著地高於針對經 MVATGN33.1 治療之小鼠觀測到之肺細胞數目增加，此表明裝臂 MVA 之活性更強。在注射後第 9 天，與未經治療小鼠相比，經 MVATGN33.1 治療之小鼠不展現細胞肺數目之任何增加，而經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠仍展現細胞肺數目之顯著增加，該增加顯著地高於未經治療或經 MVATGN33.1 治療之小鼠之細胞肺數目增加。

2.2.3.2 肺中之經活化 NK 細胞、CD8+ T 細胞及 CD4+ T 細胞數目

【0291】 藉由流式細胞量測術評估肺細胞中之經活化 NK 細胞、CD8+ T 細胞及 CD4+ T 細胞(例如：展現 CD69 標記物)數目。

【0292】 當與未經治療小鼠中之經活化 NK 細胞數目相比時，MVATGN33.1 及 MVA-hIL-7-Fc 均在注射後第 3 天顯著地增加經活化 NK 細胞數目(圖 27B)。當與 MVATGN33.1 相比時，MVA-hIL-7-Fc 甚至顯著地增加經活化 NK 之此等數目，此表明裝臂之作用顯著。在注射後第 9 天，所有 3 組之 CD69+ NK 細胞數目均等效。

【0293】 當與未經治療小鼠相比時，MVATGN33.1 及 MVA-hIL-7-Fc 亦在注射後第 3 天顯著地增加經活化 CD8+ T 細胞數目(圖 27C)。MVA-hIL-7-Fc 誘導之增加顯著地強於 MVATGN33.1 誘導之增加，此再次表明 hIL-7-Fc 裝臂對此參數之活性顯著。在注射後第 9 天，與未經治療小鼠相比，經 MVATGN33.1 或 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠仍展現顯著較高數目之 CD69+ CD8+ T 細胞。儘管如此，經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠與經 MVATGN33.1 治療之小鼠之間不存在統計學上顯著之差異。

【0294】 對於經活化 CD4+ T 細胞，與未經治療小鼠及經 MVATGN33.1 治療之小鼠相比，僅 MVA-hIL-7-Fc 展現該等細胞數目之顯著增加，此表明此時間

點之裝臂作用。在注射後第 9 天，與未經治療小鼠相比，MVATG18897 及 MVATGN33.1 經顯示為增加 CD69+ CD4+ T 細胞數目，且 MVATGN33.1 與 MVA-hIL-7-Fc 之間的差異亦為顯著的，其中經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠中細胞數目較高。

2.2.4 實驗 4：健康 C57BL6/J 小鼠之脾及肺細胞上之 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)及 hIL-7-Fc 蛋白活性

2.2.4.1 肺細胞數目

【0295】 在肺製備之後，使用 Muse 細胞分析儀對總體回收細胞進行計數(圖 28A)。在注射後第 3 天，hIL-7-Fc 及 MVATG18897 均顯著地增加肺中之總細胞數目。儘管如此，經 MVATG18897 治療之小鼠中之數目更大程度且顯著地較高。在注射後第 9 天，未經治療或經治療之 3 組展現類似數目之肺細胞。

2.2.4.2 肺中之經活化(CD69+) NK 細胞、CD8+ T 細胞及 CD4+ T 細胞數目

【0296】 與未經治療小鼠相比，經 MVATG18897 治療之小鼠之肺中經活化(CD69+) NK 細胞數目在注射後第 3 天強烈且顯著地增加(圖 28B)。此等數目返回至與在注射後第 9 天未經治療小鼠之位準相當之位準。平行地，hIL-Fc 蛋白對此等經活化細胞不展現任何活性，此係因為該等細胞數目與未經治療小鼠在注射後第 3 天及第 9 天的細胞數目類似。

【0297】 關於 CD69+ CD8+ T 細胞，hIL-7-Fc 蛋白傾向於在第 3 天增加該等細胞數目(儘管此增加不顯著) (圖 28C)。此等數目等效於未經治療小鼠在注射後第 9 天之數目。平行地，與未經治療小鼠及經 hIL-7-Fc 治療之小鼠相比，MVATG18897 在注射後第 3 天強烈且顯著地增加該等細胞數目。在注射後第 9 天，當與未經治療小鼠及經 hIL-7-Fc 蛋白治療之小鼠相比時，經 MVATG18897 治療之小鼠仍展現顯著較高數目之 CD69+ CD8+ T 細胞。

【0298】 關於 CD69+ CD4+ T 細胞，當與未經治療小鼠相比時，hIL-7-Fc 在

注射後 3 天顯著地增加該等細胞數目(圖 28D)。在注射後 9 天不再觀測到 hIL-7-Fc 對此等細胞有作用。當與未經治療小鼠相比時以及當與經 hIL-7-Fc 治療之小鼠相比時，MVATG18897 在注射後第 3 天強烈且顯著地增加該等細胞數目。在注射後第 9 天，當與未經治療小鼠及經 hIL-7-Fc 治療之小鼠相比時，MVATG18897 仍誘導 CD69+ CD4+ T 細胞數目顯著地增加。

【0299】 在肺中之此等 3 個細胞群體上，MVATG18897 活性明顯顯著地高於 hIL-7-Fc 蛋白中之一者，此表明對使此類病毒載體中之 hIL-7-Fc 載體化感興趣。此特別為人感興趣，此係因為免疫抑制敗血性患者中之大部分繼發性感染為肺繼發性感染，且此等經誘導之經活化免疫細胞將直接在感染部位上迅速引發免疫反應。

2.2.4.3 脾及肺中 CD8+ T 細胞產生細胞介素之能力.

【0300】 在 TCR 刺激之後，經由 ICS 監測脾及肺中之 CD8+ T 細胞之功能性。

【0301】 在脾中，在第 3 天，當與未經治療小鼠(0.6%之平均值)相比時，僅產生 IFN-γ 之 CD8+ T 細胞百分比(圖 29A)因 hIL-7-Fc 蛋白及 MVATG18897 而顯著地增加。MVATG18897 誘導之增加(6.5%之平均值)顯著且大大地高於 hIL-7-Fc 誘導之增加(2%之平均值)。在第 9 天，經 hIL-7-Fc 蛋白治療之小鼠展現類似於未經治療小鼠之百分比(約 0.6%至 0.9%之平均值)，而經 MVATG18897 治療之小鼠仍展現顯著較高百分比之產生 IFNγ 之 CD8+ T 細胞(7.5%之平均值)。可針對產生 IFNγ 及 TNFα 之 CD8+ T 細胞進行類似觀測(圖 29C)。與未經治療小鼠相比(0.2%之平均值)，hIL-7-Fc 在注射後第 3 天略微但顯著地增加該等細胞百分比(2.3%之平均值)，且在注射後第 9 天不再存在作用。當與未經治療小鼠及經 hIL-7-Fc 治療之小鼠相比時，MVATG18897 在其一方面在第 3 天強烈且顯著地增加此等細胞百分比(8.5%之平均值)。儘管不太重要，但此作用在注射後第 9 天仍明

顯顯著。對於產生 3 種細胞介素(IFNγ 及 TNFα 以及 IL2)之 CD8+ T 細胞(圖 29E)，當與未經治療小鼠(0.5%之平均值)相比時，hIL-7-Fc 蛋白在注射後第 3 天顯著地增加該等細胞百分比(1.2%之平均值)，且在注射後第 9 天不再觀測到此作用。MVATG18897 在注射後第 3 天及第 9 天各別地以 2.6%及 1.5%之平均值誘導此等多功能細胞百分比強烈且顯著地增加。在脾中，MVATG18897 顯著地優於 hIL-7-Fc 蛋白以在 TCR 刺激之後誘導能夠產生細胞介素之 CD8+ T 細胞。MVAtG18897 誘導之此等功能性 T 細胞將能夠顯著地促進對未來潛在的繼發性感染之控制。

【0302】 在肺中，儘管在脾中具有活性，但當與未經治療小鼠相比時，hIL-7-Fc 在注射後第 3 天及第 9 天不能夠增加產生僅 IFNγ、或 IFNγ 及 TNFα、或 IFNγ、TNFα 及 IL2 之 CD8+ T 細胞百分比(圖 29B、29D 及 29F)。對於產生 IFNγ 之 CD8+ T 細胞，在注射後 3 天僅可觀測到輕微趨勢(2.8%之平均值，此係相較於未經治療小鼠之 1.8%而言)。相反地，當與未經治療小鼠及經 hIL-7-Fc 治療之小鼠相比時，MVATG18897 能夠在注射後第 3 天及第 9 天強烈且顯著地增加肺中之產生 IFNγ、IFNγ/TNFα 及 IFNγ/TNFα/IL2 之 CD8+ T 細胞百分比。

【0303】 在肺中，MVATG18897 能夠加強 CD8+ T 細胞產生細胞介素之能力，而 hIL-7-Fc 蛋白對此器官中之 CD8+ T 細胞之功能性僅具有極差活性。在肺繼發性感染之情況下，預見肺中之功能性 CD8+ T 細胞之存在為明顯優點，此係因為此等功能性細胞將能夠經由至少產生細胞介素而直接在潛在感染部位上迅速控制感染。

【0304】 總體而言，MVATG18897 與 hIL-7-Fc 之比較顯示，hIL-7-Fc 對脾中之一些細胞具有活性，但 MVATG18897 在此器官中展現明顯較強活性。由於 MVATG18897 而在脾中存在許多經活化及功能性免疫細胞表明，在繼發性感染之情況下，總體免疫系統將能夠更快速地對抗繼發性感染。另外，僅

MVATG18897 對肺中之免疫細胞，特定而言 T 細胞之功能性具有強烈且顯著的活性。準備好直接在潛在繼發性感染部位上引發快速且強烈的免疫反應之該等細胞之存在為 MVATG18897 的額外有利特點。此等情況表明健康小鼠中 MVATG18897 對 hIL-7-Fc 之差異及優越性。

2.3 活體內評估 CLP 小鼠中之 MVATG18897

2.3.1 存活

【0305】 自第 0 天至第 4 天，亦即在第 4 天之 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897) 治療之前追蹤所有 CLP 小鼠及對照經 Sham 操作小鼠中之小鼠存活(圖 11A)。與其中未觀測到死亡之對照 Sham 組(5/5 隻小鼠)相比，33 隻 CLP 小鼠中之二十五隻(76%)在第 4 天仍存活。在第 4 天，隨後，將存活 CLP 小鼠分成二組：在第 4 天投與 MVA-hIL-7-Fc 之 CLP 小鼠(n=15)及保持未經治療之對照 CLP 小鼠(n=10)。在第 7 天，儘管 7/10 隻未經治療 CLP 小鼠(70%)仍存活，但所有經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠均存活(圖 11B)。

【0306】 此結果顯示，MVA-hIL-7-Fc 具有活性且顯著地延長 CLP 誘發之敗血性小鼠之存活，此表明 MVA-hIL-7-Fc 可改進宿主免疫系統以對抗感染。

2.3.2. 循環 hIL-7-Fc

在第7天，亦即在MVA-hIL-7-Fc治療之後3天，藉由hIL-7特異性ELISA測定經MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之CLP小鼠中產生之循環hIL-7-Fc的含量。在經MVA-hIL-7-Fc治療之CLP小鼠之血清中量測到大量人類IL-7 (9600 pg/mL) (圖12)。如所預期，在未經治療CLP小鼠及Sham小鼠之血清中觀測到不可偵測含量之hIL-7。此情況表明，MVA-hIL-7-Fc可轉導免疫抑制CLP小鼠中之細胞且hIL-7-Fc轉殖基因由MVA充分表現且在血液中釋放至可偵測含量。

2.3.3 CLP 小鼠中之 MVATG18897 之生物學活性

【0307】 隨後，評估 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)恢復或加強 CLP 誘發之

免疫抑制敗血性小鼠之免疫系統之能力。在 MVA-hIL-7-Fc 投與後三天，評估與未經治療 CLP 小鼠及對照 Sham 小鼠相比經治療 CLP 小鼠中之總體發炎性狀態及免疫細胞區室。

2.3.3.1.總體發炎性狀態

【0308】 藉由在經 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療之敗血性 CLP 操作小鼠之血清中給藥促炎性細胞介素及抗炎性細胞介素來測定動物之整體發炎性狀態。

【0309】 在手術後七天及 MVA-hIL-7-Fc 治療後 3 天，評估 Sham 小鼠、未經治療 CLP 小鼠及經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之血清中之 IFNγ 含量(圖 13)。儘管 IFNγ 含量在 Sham 小鼠中低於偵測下限值且在未經治療 CLP 組中係在低值下(各別地 0.6 pg/mL 及 1.9 pg/mL)，但在經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之血清中量測到顯著較高含量之 IFNγ (12.4 pg/mL)。因為已在危重病敗血性患者中報導 IFNγ 治療之治療作用，故在改善此等患者之免疫系統中特別對 MVA-hIL-7-Fc 治療誘導循環 IFNγ 感興趣。

【0310】 此等結果表明，MVA-hIL-7-Fc 在敗血症誘發之後 4 天投與時不加重顯示其免疫效能之敗血性動物之總體發炎性狀態，且在血清中量測之細胞介素無重大變化，IFNγ 除外。引起關注地，MVA-hIL-7-Fc 促進血液中 IFNγ 之生產，此舉可有助於改進受損宿主免疫系統。

2.3.3.2.表徵脾中之免疫細胞子集

2.3.3.2.1.細胞表型分型

【0311】 藉由流式細胞量測術測定 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療對免疫抑制 CLP 小鼠之脾中受損細胞區室之恢復的作用。圖 14 顯示脾中之不同細胞子集之組成。如文獻中所觀測，在手術後七天，CLP 小鼠呈現脾腫大。CLP 小鼠中之總脾細胞實際上比 Sham 小鼠中之總脾細胞多 2.2 倍(各別地 144 × 10^6 個細

胞及 73 × 10^6 個細胞；圖 14A)。MVA-hIL-7-Fc 治療產生與 Sham 小鼠中類似數目之總脾細胞(70 × 10^6 個細胞)。此結果引起關注，此係因為其表明，MVA-hIL-7-Fc 幫助敗血性 CLP 小鼠之免疫系統恢復正常生理條件。

【0312】 CLP 小鼠中之總 T 細胞($CD3^+$)與 Sham 小鼠相比大大地減少(各別地 7 × 10^6 個細胞及 25 × 10^6 個細胞)，此為敗血性 CLP 小鼠中誘發之免疫抑制之標誌(圖 14B)。在投與 MVA-hIL-7-Fc 之 CLP 小鼠中，顯著且部分地回收 T 細胞區室(12 × 10^6 個細胞)，此表明 MVA-hIL-7-Fc 在 CLP 小鼠中有效，此係因為 IL-7 之主要已知作用中之一者即使在免疫抑制受試者中亦誘導 T 細胞增殖。

【0313】 與 Sham 小鼠相比，在未經治療 CLP 小鼠中，集中於作為 C8+ T 細胞及 CD4+ T 細胞之 CD3+亞群，二者均強烈地減少(圖 14C 及圖 14D)。MVA-hIL-7-Fc 與未經治療 CLP 小鼠相比顯著地增加 CD8+ T 細胞數目，從而與 Sham 小鼠相比部分地恢復該等細胞數目(圖 14D)。MVA-hIL-7-Fc 對 CD4+ T 細胞群體之作用不太明顯，不管增加此等細胞群體之趨勢如何(圖 14C)。

【0314】 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)能夠恢復與此模型以及人類中之敗血症誘發之發病機制有關之 CLP 小鼠之脾內的正常細胞數目。更具體而言，其亦能夠部分地恢復脾中之 T 細胞(CD3+ T 細胞整體且特定而言此群體內之 CD8+ T 細胞)數目，該等數目在未經治療 CLP 小鼠中強烈地減少。總體而言，裝臂 MVA 經顯示為至少部分地恢復免疫抑制敗血性小鼠內之脾中 T 細胞的免疫體內恆定。

2.3.3.2.2.細胞活化

【0315】 經由利用流式細胞量測術定量表現 CD69 之細胞來研究 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療對免疫細胞活化之作用。圖 15 顯示脾之不同細胞子集中之 $CD69^+$細胞數目及百分比。

【0316】 當與 Sham 小鼠(0.9 × 10^6 個細胞)及未經治療 CLP 小鼠(1.9 × 10^6 個細胞)相比時，經 MVA-IL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之脾中 $CD69^+$ B 細胞之絕對計

數(圖 15A)顯著地增加(4 × 10^6 個細胞)。

【0317】 關於 $CD69^+$ CD4 T 細胞，儘管其數目在 Sham 小鼠及未經治療 CLP 小鼠中類似(各別地 1.1 × 10^6 個細胞及 0.8 × 10^6 個細胞)，但與未經治療 CLP 小鼠相比，經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠中之 $CD69^+$ CD4 T 細胞計數顯著地增加(1.3 × 10^6 個細胞；圖 15B)。

【0318】 儘管 Sham 小鼠與 CLP 小鼠之間的 $CD69^+$ CD8 T 細胞數目類似(各別地 0.35 × 10^6 個細胞及 0.25 × 10^6 個細胞；圖 15C)，但在經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠中量測到經活化 $CD69^+$ CD8 T 細胞數目重要地增加(1.04 × 10^6 個細胞)。

【0319】 Sham 小鼠及未經治療 CLP 小鼠中之表現活化標記物 CD69 之 NK 細胞數目再次類似(各別地 0.2 × 10^6 個細胞及 0.3 × 10^6 個細胞；圖 15D)，且在 MVA-hIL-7-Fc 治療之後顯著地增加(0.8 × 10^6 個細胞)。

【0320】 總而言之，此等資料表明，在誘發敗血症之後 4 天的 MVA-hIL-7-Fc 治療誘導敗血性免疫抑制 CLP 小鼠之脾中 CD4 T 細胞及 CD8 T 細胞區室之部分恢復，對於後者而言，該部分恢復為顯著的。此結果至關重要，此係因為危重病敗血性患者中之主要問題中之一者為 T 細胞區室之恢復。此外，CLP 小鼠中之 MVA-hIL-7-Fc 投與增加包括 T 細胞、NK 細胞及 B 細胞之各種細胞子集中之經活化細胞數目，此舉可促進對抗腹腔感染。

2.3.3.3.表徵血液中之免疫細胞子集

2.3.3.3.1.細胞表型分型

【0321】 關於脾，亦研究與未經治療 CLP 小鼠相比經治療 CLP 小鼠中 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)對恢復血液中之免疫細胞區室之作用。圖 16 顯示經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠或未經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠中每微升血液之不同細胞子集之絕對計數。

【0322】 在投與 MVA-hIL-7-Fc 之 CLP 小鼠中量測到相較於未經治療 CLP 小鼠而言顯著較高濃度之總 $CD3^+$細胞(各別地 1310 個細胞/微升及 794 個細胞/微升；圖 16A)。

【0323】 在 $CD3^+$細胞中，CD4 T 細胞濃度在 MVA-hIL-7-Fc 治療後相較於未經治療 CLP 小鼠而言顯著地增加(各別地 577 個細胞/微升及 336 個細胞/微升；圖 16B)。

【0324】 儘管不顯著，但經治療 CLP 小鼠中之血液中之 CD8 T 細胞濃度相較於未經治療小鼠而言亦增加(各別地 595 個細胞/微升及 396 個細胞/微升；圖 16C)。

【0325】 關於 NKT 細胞，儘管在血液中在低數目下可偵測，但在投與 MVA-hIL-7-Fc 之 CLP 小鼠中量測到相比於未經治療 CLP 小鼠而言顯著較高濃度之此細胞子集群體(各別地 29 個細胞/微升及 18 個細胞/微升；圖 16D)。

【0326】 關於血液中之 NK 細胞，注意到相同觀測結果。在一微升經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之血液中量測到相比於未經治療 CLP 小鼠而言更多的 NK 細胞(各別地 272 個細胞/微升及 154 個細胞/微升；圖 16E)。

【0327】 在經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之血液中觀測到相較於對照 CLP 小鼠而言某種程度上增加之 B 細胞濃度(各別地 1951 個細胞/微升及 1318 個細胞/微升；圖 16F)。

【0328】 亦在經治療 CLP 小鼠中觀測到相較於未經治療 CLP 小鼠而言某種程度上增加之 $CD11c^+$細胞(各別地 36 個細胞/微升及 14 個細胞/微升；圖 16G)。

【0329】 最後，在經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠中觀測到當與未經治療 CLP 小鼠相比時特別地強烈增加之 $CD11b^+$細胞計數(各別地 2514 個細胞/微升及 1068 個細胞/微升；圖 16H)。

2.3.3.3.2.細胞活化

【0330】 經由利用流式細胞量測術定量表現CD69之細胞來研究MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療對循環免疫細胞子集活化之作用。圖 17 顯示不同血細胞子集中之 $CD69^+$細胞數目。MVA-hIL-7-Fc 投與引起 CLP 小鼠中之 $CD69^+$ CD4 T 細胞相較於未經治療 CLP 小鼠而言增加 4 倍(各別地 18.5 個細胞/微升及 4.7 個細胞/微升；圖 17A)。

【0331】 經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠中之血液中之經活化 CD8 T 細胞亦顯著地增加。在經治療 CLP 小鼠中觀測到相較於對照 CLP 小鼠而言多五倍之 $CD69^+$細胞/微升血液(各別地 69 個細胞/微升及 14 個細胞/微升；圖 17B)。

【0332】 關於 B 細胞，每微升經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠血液之 $CD69^+$ B 細胞數目相較於未經治療 CLP 小鼠而言增加 3.7 倍(各別地 77 個細胞/微升及 21 個細胞/微升；圖 17C)。

【0333】 圖 17D 繪示循環 NK 細胞之活化狀態。經治療 CLP 小鼠中之血液中之 $CD69^+$NK 細胞濃度增加相較於未經治療 CLP 小鼠而言多 3.8 倍(各別地 180 個細胞/微升及 48 個細胞/微升)。

【0334】 總體而言，吾等表明，MVA-hIL-7-Fc 顯著地增加敗血性免疫抑制小鼠之血液中之 T 細胞隔室，特定而言 CD4 T 細胞計數。此結果為臨床上相關的，此係因為敗血性患者之血液中之 T 細胞數目高度消減。此外，在 MVA-hIL-7-Fc 投與後 CLP 小鼠中包括 T 細胞、B 細胞及 NK 細胞之數個細胞子集之活化增強。此結果為人感興趣，此係因為 MVA-hIL-7-Fc 治療可經由活化循環免疫細胞來加強危重病敗血性患者之受損免疫系統以便加速對新感染之控制及/或預防新感染。

2.3.3.4.MVA-hIL-7-Fc 治療對 T 細胞功能之作用

【0335】 免疫細胞之功能在對導致高死亡率之繼發性感染變得高度敏感之敗血性免疫抑制患者中強烈減弱。因此，恢復或加強敗血性患者中之免疫細胞之

功能至關重要。隨後，研究 CLP 誘發之敗血性小鼠中 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療對免疫功能，特定而言適應性免疫之改進。

2.3.3.4.1 IFNγ ELISpot 分析

【0336】圖 18A 顯示響應於抗 CD3 抗體刺激總脾細胞之 IFNγ ELISpot 分析之結果。MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療相較於 Sham 小鼠組及未經治療 CLP 小鼠組(各別地 17 個斑點/10^5 個細胞及 48 個斑點/10^5 個細胞)而言引起 CLP 小鼠之脾中產生 IFNγ 之 T 細胞頻率極大地增加(1314 個斑點/10^5 個細胞)。

【0337】圖 18B 繪示三組中之各者中之斑點尺寸(平均值)。儘管 Sham 組及未經治療 CLP 組中之平均斑點尺寸類似(各別地 5×10^{-3} mm^2及 7×10^{-3} mm^2)，但所獲得之經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之細胞之平均值顯著地增加 2.6 倍(18×10^{-3} mm^2)，此反映來自經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之各產生 IFNγ 之細胞產生較大量 IFNγ 的能力(斑點尺寸與各細胞所產生之 IFNγ 之量成比例)。

【0338】此結果至關重要，此係因為敗血性患者中之 T 細胞 IFNγ 反應描述為受損的。MVA-hIL-7-Fc 治療可實際上加強免疫抑制敗血性受試者之適應性免疫系統以預防或對抗感染，因此提高其存活。

2.3.3.4.2 三重胞內細胞介素染色分析

【0339】亦藉由測定在經抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體刺激之後產生 IFNγ、IL2 及/或 TNFα 之 CD4 T 細胞及 CD8 T 細胞百分比來評估 T 細胞功能性。

【0340】圖 19A 顯示在總 CD4 T 細胞中表現細胞介素中之一者、二者或三者之 CD4 T 細胞的總百分比。引起關注地，MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)治療能夠加強 CD4 反應。在經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之脾細胞之情況下量測到相較於未經治療 CLP 小鼠而言顯著較高百分比之產生細胞介素之 CD4 T 細胞(各別地 27%及 20%)。

【0341】關於 CD8 T 細胞反應(圖 19B)，投與 MVA-hIL-7-Fc 之 CLP 小鼠

中產生細胞介素之 CD8 T 細胞百分比當相較於未經治療 CLP 小鼠而言時令人印象深刻地加倍(各別地 63%及 32%)。

【0342】 圖 20 繪示在所執行之 ICS 分析中藉由 MVA-hIL-7-Fc 治療顯著地改進之總 CD4 T 細胞群體中雙或三細胞介素陽性 CD4 T 細胞子集中之各者的百分比。當相較於未經治療 CLP 小鼠而言時，MVA-hIL-7-Fc 顯著地增強 $IFN\gamma^+$ $TNF\alpha^+$ (各別地 0.2%及 0.9%)及 $IL2^+$ $TNF\alpha^+$ (各別地 6.9%及 9.4%) CD4 T 細胞子集(圖 20A-B)。平行地，投與 MVA-hIL-7-Fc 之 CLP 小鼠中之三 $IFN\gamma^+IL2^+TNF\alpha^+$ CD4 T 細胞百分比相比於未經治療 CLP 小鼠而言較高(各別地 2.3%及 1.0%；圖 20C)。

【0343】 圖 21 繪示藉由 MVA-hIL-7-Fc 顯著地改進之總 CD8 T 細胞群體中單、雙或三細胞介素陽性 CD8 T 細胞子集之百分比。在單細胞介素陽性 CD8 T 細胞當中，經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠中之 $IFN\gamma^+$ CD8 T 細胞子集百分比相較於未經治療 CLP 小鼠而言顯著地增加 2.2 倍(各別地 7.0%及 3.2%) (圖 21A)。關於雙細胞介素陽性 CD8 T 細胞，在 MVA-hIL-7-Fc 治療後在 CLP 小鼠中誘導相較於未經治療 CLP 小鼠而言大大增加的 $IFN\gamma^+$ $TNF\alpha^+$ CD8 T 細胞子集(各別地 18.8%及 2.3%) (圖 21B)。值得注意地，儘管三細胞介素陽性 CD8 T 細胞在 Sham 小鼠中幾乎不可偵測，但經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之脾細胞獲得相較於未經治療 CLP 小鼠之細胞而言重要的三 $IFN\gamma^+$ $IL2^+$ $TNF\alpha^+$ CD8 T 細胞之誘導(各別地 7.7%及 1.7%) (圖 21C)。

【0344】 綜合而言，來自 ELISPOT 及 ICS 分析之資料顯示 MVA-hIL-7-Fc 提高 CLP 小鼠中之 CD4 T 細胞及 CD8 T 細胞之功能性的能力。因此，MVA-hIL-7-Fc 治療可促進藉由增加快速產生細胞介素之 T 細胞百分比來幫助危重病患者之免疫系統對抗或預防感染。

2.3.3.4.3. T 細胞釋放之細胞介素

【0345】 亦藉由測定活體外活化 T 細胞受體後產生之促炎性細胞介素及抗炎性細胞介素之含量來評估 T 細胞功能性。在經抗 CD3 抗體塗佈之 96 孔盤中培養總脾細胞 24 小時且收取上清液用於給藥細胞介素。

【0346】 所量測之細胞介素為 IL-1β、IL-6、TNFα、IFNγ 及 IL-10 (圖 22)。除了相較於 Sham 小鼠而言在來自未經治療 CLP 小鼠之細胞上清液中已顯著地較高之 IL6 (圖 22B)之外，來自 Sham 小鼠及未經治療 CLP 小鼠之細胞上清液展現類似量之細胞介素(圖 22A；C-E)。明顯地，來自經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之細胞上清液始終展現相比於未經治療 CLP 小鼠及 Sham 小鼠而言顯著地較大量之所有測試細胞介素(圖 22A-E)。值得注意地，IL1β 之含量總體低於其他細胞介素中之一者。儘管如此，MVA-hIL-7-Fc 使經刺激脾細胞上清液中之此細胞介素生產增加了 6.4 倍。對於 IL6、TNFα、IFNγ 及 IL10，相較於未經治療 CLP 小鼠之細胞而言，在來自經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之細胞上清液中偵測到之量各別地增加 4 倍、3 倍、5.5 倍及 2.5 倍。

【0347】 此額外讀數清楚地表明當與未經治療敗血性小鼠相比時 MVA-hIL-7-Fc 提高來自敗血性小鼠之脾細胞產生及分泌促炎性細胞介素及抗炎性細胞介素之能力的能力。吾人可預期 MVA-hIL-7-Fc 可藉此促進藉由提高 T 細胞功能性來幫助宿主免疫系統預防或對抗感染。

2.4 活體內比較 CLP 小鼠中之空 MVA 與 MVATG18897

【0348】 為了界定 MVA 載體對一側之作用及 hIL-7-Fc 裝臂之作用，執行一項用於比較經空 MVA (單獨的載體活性)及 MVATG18897 (IL-7 活性+載體活性)治療之 CLP 小鼠的實驗。值得注意地，健康未經治療小鼠用作用於免疫學分析之陽性對照，但在此處未示出。

【0349】 在第 0 天在 25 隻小鼠中 CLP 誘發敗血症。在第 4 天仍存活之一半小鼠經空 MVA 治療且另一半經 MVATG18897 治療。追蹤小鼠直至第 7 天且

將其處死以執行免疫分析。

2.4.1 存活

【0350】 在所有 CLP 小鼠中自第 0 天至第 4 天，亦即在第 4 天之 MVA-hIL-7-Fc (MVATG18897)或 MVATGN33.1 (空 MVA)治療之前追蹤小鼠之存活(圖 23A)。25 隻 CLP 小鼠中之十八隻(72%)在第 4 天仍存活。在第 4 天，隨後，將存活 CLP 小鼠分成二組：在第 4 天投與 MVA-hIL-7-Fc 之 CLP 小鼠(n=9)及經空 MVA 治療之 CLP 小鼠(n=9)。在第 7 天，儘管 6/9 隻經空 MVA 治療之 CLP 小鼠(67%)仍存活，但所有經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠(9/9 隻)均存活(圖 23B)。

【0351】 此結果顯示，與空 MVA 相比，MVA-hIL-7-Fc 提高 CLP 誘發之敗血性小鼠之存活，此表明存活不僅歸因於 MVA 活性，且歸因於至少 IL-7 裝臂或甚至歸因於 MVA 載體與 IL-7 裝臂之組合。

2.4.2.MVA-hIL-7-Fc 相較於空 MVA 而言對血細胞子集之作用

【0352】 藉由流式細胞量測術評估經空 MVA 及 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠之血液內的細胞子集。圖 24 顯示相較於空 MVA 而言由 MVA-hIL-7-Fc 顯著地增加之細胞群體。當與空 MVA 治療相比時，CLP 小鼠中之循環 CD8+ T 細胞之平均數目因 MVA-hIL-7-Fc 治療而幾乎加倍(圖 24A)，NKT 細胞亦如此(圖 24B)。值得注意地，MVA-hIL-7-Fc 治療相較於空 MVA 治療而言強烈地增加血液中之 CD11b+細胞數目且增加超過 3 倍(圖 24C)。

【0353】 總體而言，此等資料證實在敗血性小鼠中 IL-7 在此等免疫細胞群體上裝臂之能力。此等細胞數目在敗血性情形下更改，此表明 MVA-hIL-7-Fc 引起該等 T 細胞數目增加之能力。

【0354】 2.4.3. CLP小鼠中MVA-hIL-7-Fc相較於空MVA而言對T細胞功能之比活性。

【0355】 使用三重 ICS 分析(IFNγ、TNFα 及 IL2)評估經抗 CD3 及抗 CD28

刺激之脾細胞之功能性。

【0356】圖 25 顯示二組中用 ICS 偵測到之產生 1、2 或 3 種細胞介素之 CD4+ T 細胞百分比。圖 25A 顯示產生至少一種細胞介素之 CD4+ T 細胞總百分比。MVA-hIL-7-Fc 誘導相較於空 MVA 而言顯著較高百分比之產生至少 1 種細胞介素之 CD4+ T 細胞(各別地 44%相對於 26%)。圖 25B 顯示所有產生 IFNγ 之 CD4+ T 細胞、所有產生 TTNFα 之 CD4+ T 細胞及所有產生 IL2 之 CD4+ T 細胞。資料明顯地證實 MVA-hIL-7-Fc 相較於空 MVA 而言增加此等產生細胞介素之群體中之各者的百分比的能力(對於經空 MVA 治療之小鼠，各別地為 2,6%、10,1%及 15,4%；且對於經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠，各別地為 5,6%、38,7%及 28,8%)。關於產生雙細胞介素及三細胞介素之細胞，圖 25C 顯示相較於空 MVA 而言由 MVA-hIL-7-Fc 顯著地改進之此等群體中之一者。相較於空 MVA 而言，MVA-hIL-7-Fc 強烈地增加產生 IFNγ/TNFα (1,22%相對於 0,53%)、IFNγ/IL2 (0,45%相對於 0,34%)、IL2/TNFα (20,2%相對於 8,7%)及 IFNγ/IL2/TNFα (3,6%相對於 1,7%)之 CD4+ T 細胞。

【0357】圖 26 顯示二組中用 ICS 偵測到之產生 1、2 或 3 種細胞介素之 CD8+ T 細胞百分比。圖 26A 顯示產生至少一種細胞介素之 CD8+ T 細胞總百分比。MVA-hIL-7-Fc 誘導相較於空 MVA 而言顯著較高百分比之產生至少 1 種細胞介素之 CD8+ T 細胞(各別地 64%相對於 28%)。圖 26B 顯示所有產生 IFNγ 之 CD8+ T 細胞、所有產生 TTNFα 之 CD8+ T 細胞及所有產生 IL2 之 CD8+ T 細胞。資料明顯地證實 MVA-hIL-7-Fc 相較於空 MVA 而言增加此等產生細胞介素之群體中之各者的百分比的能力(對於經空 MVA 治療之小鼠，各別地為 8,7%、17,5%及 4,3%；且對於經 MVA-hIL-7-Fc 治療之小鼠，各別地為 29,6%、60,5%及 15,1%)。相較於空 MVA 而言歸因於 MVA-hIL-7-Fc 之一定顯著增加亦針對僅產生 IFNγ 之 CD8+ T 細胞(4,6%相對於 2,2%)及針對僅產生 TNFα 之 CD8+ T 細胞

(27,9%相對於 17,5%)偵測到且示於圖 26C 上。關於產生雙細胞介素及三細胞介素之細胞，圖 26C 顯示相較於空 MVA 而言由 MVA-hIL-7-Fc 顯著地改進之此等群體中之一者。相較於空 MVA 而言，MVA-hIL-7-Fc 強烈地增加產生 IFNγ/TNFα (16,8%相對於 4,3%)、IL2/TNFα (6,5%相對於 1,6%)及 IFNγ/IL2/TNFα (7,9%相對於 2%)之 CD8+ T 細胞。

【0358】 總體而言，比較 MVA-hIL-7-Fc 與空 MVA 之作用之此實驗明顯地證實 MVA 表現之 hIL-7-Fc 之比活性，此係因為其在 CLP 小鼠中 IV 注射一次之後提高小鼠存活、增加血液中之 CD8+ T 細胞、NKT 細胞及 CD11b+細胞計數及提高脾中之 CD4+ T 細胞及 CD8+ T 細胞功能性。

2.5 比較 CLP 小鼠中之 MVATG18897 與重組 hIL-7-Fc 蛋白

【0359】 在 CLP 小鼠模型中，平行地測試 MVATG18897 及 hIL-7-Fc 蛋白。二者均在 CLP 後 4 天靜脈內注射一次，且追蹤存活直至 CLP 後第 7 天為止(對應於產品注射後 3 天)，且在 CLP 後第 7 天監測來自脾之一定免疫細胞。

2.5.1 存活

【0360】 在對在第 4 天仍存活之小鼠(5 隻在原始組中，5 隻在 MVA-IL-7-Fc 或重組 IL-7-Fc 組中，且 4 隻在未經治療 CLP 小鼠中)進行隨機分組之後，觀測到所有注射 MVA-hIL-7-Fc 之小鼠(5/5 隻)在 CLP 後第 7 天存活，此類似於在原始小鼠(5/5 隻，無任何治療之非敗血性小鼠，亦即：存活之陽性對照)中觀測到之存活(圖 30)。相比之下，各別地僅 3/4 隻及 3/5 隻未經治療 CLP 小鼠及經重組 hIL-7-Fc 治療之小鼠存活，此指示與 MVA-hIL-7-Fc 治療相關且與重組可溶性對應體治療不相關之存活優點。

2.5.2 CLP 小鼠中之免疫活性

2.5.2.1 經活化 CD8+ T 細胞及 B 細胞

【0361】 監測來自未經治療或經 MVA-hIL-7-Fc 或重組 hIL-7-Fc 治療之

CLP 小鼠之脾的展現 CD69 活化標記物之經活化 CD8+ T 細胞及 B 細胞(圖 31)。對於 CD69+ CD8+ T 細胞(圖 31A)，經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠當與未經治療 CLP 小鼠相比(增加約 3 倍)及與經 hIL-7-Fc 蛋白治療之 CLP 小鼠相比(增加約 2 倍)時展現顯著較高數目之此等經活化細胞。此結果表明，當與重組 hIL-7-Fc 蛋白相比時，MVA-hIL-7-Fc 誘導在新感染之情況下應更具反應性之經活化 CD8+ T 細胞的能力更強。對於 CD69+ B 細胞，經 MVA-hIL-7-Fc 治療之 CLP 小鼠展現數目顯著高於未經治療小鼠之此等細胞(增加約 2 倍)。經 hIL-7-Fc 蛋白治療之 CLP 小鼠傾向於展現相比於未經治療 CLP 小鼠而言略微較高數目之經活化 B 細胞，但此數目並不顯著，與 MVA-hIL-7-Fc 相反。當相較於 hIL-7-Fc 蛋白而言時，MVA-hIL-7 誘導之 CD69+ B 細胞數目比蛋白質自身高約 1.5 倍。此表明 MVA-hIL-7-Fc 相較於蛋白 hIL-7-Fc 誘導該等細胞之優越性，該優越性將能夠在繼發性感染之情況下迅速引發免疫反應。

2.5.2.2 CD8+ T 細胞之功能性

【0362】 評估 3 組小鼠之脾之 CD8+ T 細胞在 TCR 刺激之後產生 IFNγ 及/或 TNFα 及/或 IL-2 之能力(圖 32)。相較於未經治療 CLP 小鼠而言，MVA-hIL-7-Fc 誘導顯著較高百分比之產生 IFNγ 之 CD8+ T 細胞(圖 32A)，且此情況係針對所有類型之產生 IFNγ 之 CD8+ T 細胞、僅產生 IFNγ 之 CD8+ T 細胞(圖 32B)、產生 IFNγ 及 TNFα 之 CD8+ T 細胞(圖 32C)及產生 IFNγ 及 TNFα 以及 IL2 之 CD8+ T 細胞(圖 32D)來加以驗證。蛋白 hIL-7-Fc 傾向於亦增加所有此等細胞類型，但僅對於產生 IFNγ 及 TNFα 之 CD8+ T 細胞及產生 IFNγ、TNFα 及 IL2 之 CD8+ T 細胞，百分比顯著高於未經治療小鼠。因此，hIL-7-Fc 之作用不如 MVA-hIL-7-Fc 中之一者重要，此表明 MVA-hIL-7-Fc 誘導功能性 CD8+ T 細胞之優越性。

2.6.經最佳化 MVA-hIL-7-Fc

【0363】設計、構築且生產二種編碼 hIL-7-Fc、MVATG18897 及 MVATG19791 之 MVA。其均在相同啟動子(pH5R)下但在 MVATG19791 中編碼 hIL-7-Fc，密碼子經最佳化以在人類細胞中表現蛋白質。活體外比較 MVATG18897 與 MVATG19791 之 hIL-7-Fc 表現。如圖 33 A 及 B 上所示，CEF 或 A549 細胞感染 MVATG18897 或 MVATG19791。藉由西方墨點法使用抗 IL-7 抗體偵測細胞或上清液中之經表現 hIL-7-Fc。在二種類型之細胞中、在細胞中及在上清液中，當相較於 MVATG18897 而言時，在 MVATG19791 之情況下偵測到較高量之 hIL-7-Fc，如經由較大及較強頻帶所觀測。

【0364】藉由 ELISA 測定經感染細胞之上清液上 2 種細胞類型在感染 MVATG18897 或 MVATG19791 時產生 hIL-7-Fc 之量。如圖 33C 中所示，在 MVATG19791 之情況下偵測到之 hIL-7-Fc 之量優於在 MVATG18897 之情況下偵測到之量(在二種細胞類型中在 MVATG19791 之情況下偵測到之蛋白質多約 1.5 倍)，從而確認經由經最佳化 MVATG19791 進行之蛋白 hIL-7-Fc 表現更強。

【0365】在健康小鼠中，比較 MVATG18897 與 MVATG19791，且其展現如所預期之相當 hIL-7-Fc 藥物動力學及免疫活性(資料未示出)。

2.7 MVA-hIL-7-Fc 所產生之 IL-7 接合相關免疫路徑且恢復免疫抑制患者中之免疫活性之能力，其中該免疫抑制不由敗血症誘發

【0366】為了說明 MVA-hIL-7-Fc 在不同免疫抑制臨床環境中恢復免疫活性時之有益值，使用自不同患者群組獲得之全血及/或 PBMC 執行一系列分析。

【0367】要被測試之 IL-7-Fc 之來源通常在原代人類肝細胞以 5 之 MOI 感染 MVATG18897 感染之後獲得，且上清液係在感染之後 24 小時收取。使用 ELISA hIL-7 套組執行於上清液中之 hIL-7-Fc 之定量且將其儲存於-70℃下。陰性對照-上清液包括在感染空 MVA (MVATGN33.1)之後收集之上清液及/或在與 MVA-hIL-7-Fc 相同之條件下收集之未經感染細胞。

2.7.1. ICU Covid-19 免疫抑制患者

2.7.1.1 CD3+ T 細胞中之 pSTAT5 表現

【0368】 細胞介素 IL-7 辨識介導信號傳導路徑之 IL-7 受體。IL-7 信號傳導係經由 Janus 激酶 1,3 及磷酸肌醇 3 (PI3k)引發，從而引起信號轉導子及轉錄活化子 5 (STAT5)磷酸化。此初期路徑與 IL-7 之接合最終引起 T 細胞存活延長及增殖增加。在經來自 MVA-hIL-7-Fc 感染之上清液刺激之後，評估經由 STAT5 磷酸化進行之信號轉導，從而證實所產生之 IL-7-Fc 之活性。圖 34 顯示在用來自感染 MVATG18897 或 MVATGN33.1 細胞或未經感染細胞之上清液離體刺激 COVID19+患者全血 10 分鐘之後在 CD3+ T 細胞中偵測到之表示為比率之 pSTAT5 表現(以未經刺激條件之值標準化在 MVATG18897 或 MVATGN33.1 感染或未經感染細胞之上清液之情況下獲得的值)。測試來自 MVA 感染之三種不同的上清液稀釋度(1/2.5、1/5 及 1/10)及未經感染細胞之一種上清液稀釋度(1/2.5)。如圖中所示，MVA-hIL-7-Fc 上清液誘導強烈地增加之 pSTAT5 表現伴稀釋效應(對於 1/2.5 稀釋度、1/5 稀釋度及 1/10 稀釋度，各別地乘以 6.5、5.7 及 4.9)，而在經空 MVA 或未經感染上清液刺激之後未觀測到 pSTAT5 表現增加。

【0369】 此等資料表明，MVA-hIL-7-Fc 所產生之 hIL-7-Fc 由 IL-7 受體辨識且可經由 STAT5 磷酸化引發 IL-7 信號傳導。預期所觀測到之 hIL-7-Fc 介導之信號傳導會增加 COVID19+患者之 T 淋巴球之增殖且提高其存活。

2.7.1.2 CD4+ T 細胞所產生之總 IFNγ+及 IFNγ+ TNFα+ IL-2+

【0370】 藉由在經 Duractive 1 及來自 MVA-hIL-7-Fc 感染之上清液刺激之後由 CD4+ T 細胞產生之 IFNγ 或 IFNγ TNFα IL-2 之胞內染色來評估 CD4+ T 細胞之功能性。

【0371】 圖 35A 及圖 35B 顯示各別地在用 MVATG18897 或 MVATGN33.1 或未經感染細胞之上清液離體刺激 COVID19+患者全血 3 小時之後產生總 IFNγ+

或 IFNγ+ TNFα+ IL-2+之 CD4+ T 細胞的表示為比率之百分比(以 Duractive 1 條件之值標準化 Duractive 1 + MVATG18897 或 MVATGN33.1 感染或未經感染細胞之上清液的值)。含有 hIL-7-Fc 之上清液增加產生總 IFNγ 之 CD4+ T 細胞百分比(圖 35A)伴稀釋效應(對於 1/2 稀釋度，1.4 比率，且對於 1/10 稀釋度，1.1 比率)。觀測到來自空 MVA 感染之上清液在第一稀釋度(對於 1/2 稀釋度，1.18 比率，且對於 1/10 稀釋度，1.0 比率)中之貢獻，此表明病毒載體自身之作用。相較於其他上清液而言，觀測到未經感染細胞上清液之少量作用(1.09 比率)。於上清液中之 hIL-7-Fc 增加由 CD4+ T 細胞進行之 IFNγ+ TNFα+ IL-2+生產(圖 35B)伴稀釋效應(對於 1/2 稀釋度，1.65 比率，且對於 1/10 稀釋度，1.18 比率)。在用呈二分之一稀釋度之來自空 MVA 及未經感染細胞之上清液刺激全血細胞之後觀測到類似作用(二者比率為 1.3)，此表明經培養細胞所產生之可溶性分子的作用。在 1/10 稀釋度下未觀測到空 MVA 上清液之作用。

【0372】 T 細胞產生 IFNγ 之能力描述為在 ICU 中之 COVID19+病患中減弱。所收集之資料指示，MVA-hIL-7-Fc 所產生之 IL-7-Fc 促進 IFN-γ 生產且因此預期會加強免疫抑制 COVID19+患者之適應性免疫反應以對抗感染且提高其存活。

2.7.2 衰老創傷患者

2.7.2.1 CD8 T 細胞中之 CD57 表現

【0373】 吾等分析作為熟知 T 細胞衰老標記物之 CD57 在研究 HIPAGE 群組中之存在。如所預期且示於圖 36 中，來自衰老對照以及髖部骨折患者之 CD8 T 細胞高度表現 CD57。此外，在髖部骨折患者中觀測到此標記物略微增加。

2.7.2.2 CD3+ T 細胞中之 pSTAT5 表現

【0374】 在經來自感染 MVA-hIL-7-Fc 之細胞之上清液刺激之後，評估經由 STAT5 磷酸化進行之信號轉導。圖 37A 顯示在用 MVATG19791 (SN IL-7-Fc)或

MVATGN33.1 (SN N33)之上清液離體刺激經解凍 PBMC 10 分鐘之後或在無刺激之後於 CD3+細胞中的 pSTAT5 表現。

【0375】 儘管 pSTAT5 不由未經刺激 CD3+細胞表現，但在髖部骨折患者中僅經空 MVA 之上清液刺激之 CD3+細胞不存在輕微增加。相反地，MVA-hIL-7-Fc 上清液誘導二個患者組之 CD3+細胞中之 pSTAT5 表現的大得多的增加。

【0376】 此等資料表明，在上清液中產生之 hIL-7-Fc 由 IL-7 受體辨識且可經由 STAT5 磷酸化引發 IL-7 信號傳導。因此，預期 hIL-7-Fc 介導之信號傳導會增加 T 細胞增殖。

2.7.2.3 T 細胞增殖

【0377】 在經來自感染 MVA-hIL-7-Fc 之細胞之上清液刺激之後評估增殖性 CD3+細胞比例。圖 37B 顯示在用 MVATG19791 或 MVATGN33.1 之上清液離體刺激經解凍 PBMC 5 天之後或在無刺激之後於 CD3+細胞中的增殖誘導。

【0378】 儘管 T 細胞增殖在未經刺激 CD3+細胞中及在經空 MVA 之上清液刺激之 CD3+細胞中未經誘導，但 MVA-hIL-7-Fc 上清液強烈地誘導 T 細胞增殖，尤其在髖部骨折患者組中。

【0379】 於上清液中產生之 hIL-7-Fc 增加 T 細胞增殖，且因此預期參與手術後衰老髖部骨折患者中之免疫恢復。

2.7.3. ICU 創傷患者

【0380】 藉由在經 PMA/離子黴素或抗 CD3/CD28 抗體及來自 MVA-hIL-7-Fc 感染之上清液刺激之後由 CD4+ T 細胞產生之 IFNγ 或 IFNγ TNFα IL-2 之胞內染色來評估來自重大多創傷患者之 CD4+ T 細胞之功能性。

【0381】 圖 38A 及圖 38B 顯示各別地在用強活化(PMA/離子黴素)或中等活化(抗 CD3/CD28)離體刺激來自創傷患者之 PBMC 5 小時之後產生總 IFNγ+或 IFNγ+ TNFα+ IL-2+之 CD4+ T 細胞百分比。在來自感染 MVATG19791 或

MVATGN33.1 之原代肝細胞之上清液存在之情況下執行刺激。

【0382】 含有 hIL-7-Fc 之上清液高度增加產生總 IFNγ 之 CD4+ T 細胞百分比(圖 38A)。在用 PMA/離子黴素進行強烈 T 細胞活化之後，與對照組中 10,5%相比，在 MVA-hIL7 上清液存在之情況下 18% CD4+ T 細胞表現 IFNγ。量測空 MVA 感染對上清液之貢獻(13.7%)。在 SN IL7 與對照組之間用抗 CD3/CD28 進行中等活化之後進行相同觀測(各別地 3,8%及 2,2%)。在未經刺激細胞中未觀測到 IFNγ 表現。

【0383】 更具體而言，於上清液中之 hIL-7-Fc 增加表現 IFNγ+、TNFα+及 IL-2+之多功能 CD4+ T 細胞百分比(圖 38B)。在用 PMA/離子黴素進行強烈 T 細胞活化之後，與對照組中 8%相比，在 MVA-hIL7 上清液存在之情況下 13,5% CD4+ T 細胞表現 IFNγ。量測空 MVA 感染對上清液之貢獻(10,5%)。在 SN IL7 與對照組之間用抗 CD3/CD28 進行中等活化之後進行相同觀測(各別地 2%及 0,9%)。在未經刺激細胞中未觀測到 IFNγ 表現。

【0384】 此等資料表明，於上清液中產生之 hIL-7-Fc 增強 T 細胞產生 IFNγ 之能力，且因此預期會參與重大多創傷性休克之後的免疫抑制患者中之適應性免疫反應之恢復。

2.7.3. ICU 重大手術患者

【0385】 藉由在經 PMA/離子黴素或抗 CD3/CD28 抗體及來自 MVA-hIL-7-Fc 感染之上清液刺激之後由 CD4+ T 細胞產生之 IFNγ 或 IFNγ TNFα IL-2 之胞內染色來評估來自重大手術患者之 CD4+ T 細胞之功能性。

【0386】 圖 39A 及圖 39B 顯示各別地在用強活化(PMA/離子黴素)或中等活化(抗 CD3/CD28)離體刺激來自重大手術患者之 PBMC 5 小時之後產生總 IFNγ+或 IFNγ+ TNFα+ IL-2+之 CD4+ T 細胞百分比。在來自感染 MVATG19791 或 MVATGN33.1 之原代肝細胞之上清液存在之情況下執行刺激。

【0387】 含有 hIL-7-Fc 之上清液高度增加產生總 IFNγ 之 CD4+ T 細胞百分比(圖 39A)。在用 PMA/離子黴素進行強烈 T 細胞活化之後，與對照組中 5,5%相比，在 MVA-hIL7 上清液存在之情況下 12,7% CD4+ T 細胞表現 IFNγ。在 SN IL7 與對照組之間用抗 CD3/CD28 進行中等活化之後觀測到相同觀測結果(各別地 3,8%及 2,2%)。在未經刺激細胞中未觀測到 IFNγ 表現。

【0388】 更具體而言，於上清液中之 hIL-7-Fc 增加表現 IFNγ+、TNFα+及 IL-2+之多功能 CD4+ T 細胞百分比(圖 39B)。在用 PMA/離子黴素進行強烈 T 細胞活化之後，與對照組中 2,5%相比，在 MVA-hIL7 上清液存在之情況下 8,2% CD4+ T 細胞表現 IFNγ。在 SN IL7 與對照組之間用抗 CD3/CD28 進行中等活化之後觀測到相同觀測結果(各別地 1,5%及 0,6%)。在未經刺激細胞中未觀測到 IFNγ 表現。

【0389】 此等資料表明，於上清液中產生之 hIL-7-Fc 增強 T 細胞產生 IFNγ 之能力，且因此預期會參與重大手術操作之後的免疫抑制患者中之適應性免疫反應之恢復，對抗繼發性感染且提高其存活。

2.8 關於結果之一般結論

【0390】 測試產品之主要作用可如下概述：

【0391】 MVA-hIL-7-Fc 誘導循環 hIL-7 產生，該循環 hIL-7 在注射之後在血液中迅速清楚地偵測到且在 1 次靜脈內注射之後至多 4 天仍偵測到。此注射亦誘導循環 IFNγ 短暫產生，該循環 IFNγ 在注射之後不久偵測到。此 IFNγ 生產係由 MVA 載體自身誘導。

【0392】 在原始小鼠中，在 IV 注射一次 MVA-hIL-7 之後觀測到脾細胞數目增加，特定而言 CD4+ T 細胞、CD8+T 細胞、嗜中性球、骨髓樹突狀細胞(mDC)及單核球(全部三個亞群 $LyC^{高}$、$Ly6C^{中等}$及 $Ly6C^{低}$)數目。在來自脾之 CD4+ T 細胞及 CD8+ T 細胞當中，MVA-hIL-7-Fc 特別地增加效應記憶 CD4+ T 細胞及中

樞記憶 CD4+ T 細胞以及效應記憶 CD8+ T 細胞、中樞記憶 CD8+ T 細胞及急性效應 CD8+ T 細胞之數目。在此等 CD4+ T 細胞及 CD8+ T 細胞內，在 IV 注射一次 MVA-hIL-7-Fc 之後，抗細胞凋亡蛋白 Bcl2 之表現亦得到改進。在 MVA-hIL-7-Fc 注射之後亦觀測到胸腺細胞中之 Bcl2 表現增加及胸腺比例修改(雙陽性 CD4+/CD8+減少及單陽性 CD4+或 CD8+增加)，此作用主要由 MVA 載體自身介導(在空 MVA 之情況下的類似觀測結果)。原始小鼠中所描述之所有此等活性均明顯地證實與經表現 IL-7 及空 MVA 主鏈中之任一者之貢獻有關的 MVA-hIL-7-Fc 藉由增加包括成熟免疫細胞之參與對抗感染之免疫細胞數目及改進此等關鍵細胞中之基因存活表現來活化免疫系統的能力。

【0393】 在原始小鼠中，MVA-hIL-7-Fc 顯示為誘導肺中之免疫活性，此活性部分歸因於主鏈且部分歸因於裝臂 hIL-7-Fc。MVA-hIL-7-Fc 增加經活化 T 細胞及 NK 細胞數目。

【0394】 另外，在敗血性小鼠模型中，相較於未經治療小鼠以及經空 MVA 治療之小鼠而言，MVA-hIL-7 顯示為提高存活，此表明 MVA 裝上 hIL-7-Fc 臂以達到保護之絕對必要性。在此相同模型中，證明 MVA-hIL-7-Fc 恢復正常脾細胞計數且至少部分恢復 T 細胞計數，特定而言 CD8+ T 細胞計數。在血液中，其增加數個免疫細胞之細胞計數。另外，其顯示為亦活化敗血性小鼠之脾及血液中之數個免疫細胞群體，此等細胞隨後準備好對抗新的感染性攻擊。MVA-hIL-7-Fc 亦顯示為能夠加強 T 細胞之功能性，特定而言藉由提高產生 IFNγ 之細胞頻率來進行，各細胞亦能夠產生較高量之 IFNγ。其亦加強能夠產生 TNFα、IL2 或在 IFNγ、TNFα 及 IL2 當中之 2 或 3 種細胞介素之細胞頻率。對免疫細胞活化之作用似乎主要由 MVA 載體自身介導，而所有其他活性似乎主要對編碼 hIL-7-Fc 之 MVA 具有特異性。

【0395】 當與類似於 MVA-hIL-7-Fc 內經編碼之重組 hIL-7-Fc 的重組 hIL-

7-Fc 之活性相比時，MVA-hIL-7-Fc 顯示為優異的。作為實例，在原始健康小鼠中，MVA-hIL-7-Fc 在肺中誘導顯著較高數目之經活化 T 細胞及 NK 細胞，且其亦在脾及肺中在 TCR 刺激之後誘導顯著較高百分比之產生細胞介素之 CD8+ T 細胞。在 CLP 小鼠中，MVA-hIL-7-Fc 負責比 hIL-7-Fc 蛋白高之存活率且在脾中誘導更強的免疫活性。作為一實例，MVA-hIL-7-Fc 誘導較高數目之經活化 CD8+ T 細胞及 B 細胞且優於 hIL-7-Fc 蛋白以誘導產生 IFNγ (+/-其他細胞介素)之 CD8+ T 細胞。

【0396】 另外，吾等已使用以來自三組免疫抑制臨床情境(ICU Covid-19 免疫抑制患者、衰老創傷患者及 ICU 創傷患者)之全血及/或 PBMC 為主的離體分析證實，MVA-hIL-7-Fc 所產生之 IL-7-Fc 可恢復多種免疫學減損。

【0397】 總體而言，諸如使用 MVA-hIL-7-Fc 獲得之 IL-7 之載體化形式誘導寬陣列之免疫調節，該等免疫調節能夠恢復及/或改進各種 ICU-臨床情境(敗血症、創傷、燒傷、大手術及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制)中或老年群體(衰老誘發之免疫抑制)中的多個免疫抑制路徑及功能。免疫反應之恢復及/或改進幫助患者對抗及/或預防感染且加速整體恢復。此等結果明顯地表明在免疫抑制之情形下投與表現 IL-7 之非複製型病毒載體之興趣。

書目參考文獻

【0398】

Adra et al., 1987, Gene 60: 65-74

Antoine et al., 1998, Virol. 244: 365-96

Capasso et al., 2014, Viruses, 6, 832-855

Cervasi et al., 2015, J. of Virology, 87(17):9420–9430

Chakrabarti et al. (1997, Biotechniques 23: 1094-7

Chen et al., 2000, J Immunol, 165:6496-6503

Chen et al., 2015, J. of Virology, 84(20): 10522–10532

Choi et al., 2016, Clin Cancer Res; 22(23): 5898-5908

Chroboczek et al., 1992, Virol. 186:280

Chu et al., 1997, J. Exp. Med., 186: 1623

Dicks et al., 2012, PLoS One.; 7(7): e40385

Dudareva et al., 2009, Vaccine 27: 3501

Erbs et al., 2008, Cancer Gene Ther. 15(1): 18-28

Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9: 1909-1917

François et al., 2018, JCI Insight.;3(5):e98960

Gao et al., 2015, Int J Mol Sci.; 16(5): 10267–10280

Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36: 59-72

Hamers et al., 2015, Minerva Anestesiol., 81(4):426-439

Hammond et al, 1997, J. Virol Methods 66: 135-8

Heftrig et al., 2017, Mediat Inflamm, article ID 2608349

Jia et al., 2019, Eur J Trauma Emerg S, https://doi.org/10.1007/s00068-019-01271-6

Kared et al., 2016, J Immunol Immunother, 65(4):441-52

Kovac et al., 2005, Exp Gerontol., 40(7):549-55

Kritsch et al., 2005, J. Chromatogr. Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 822: 263-70

Kumar and Boyle, 1990, Virology 179: 151-8

Lusky et al., 1998, J. Virol 72: 2022

Maniatis et al., 1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY or subsequent editions

Mayr et al., 1975, Infection 3: 6-14

Meisel et al., 2009, Am J Respir Crit Care Med., 180(7):640-8

Monneret et al., 2020, Intensive Care Med, 46:1764–1765

N'Guyen et al., 2016, Molecular Therapy Oncolytics, 3, 15021

Nam et al., 2010, Eur. J. Immunol., 40: 351–358

Olivier et al., 2010, mAbs 2(4): 405-15

PCR protocols – A guide to methods and applications, 1990, Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press

Peruzzi et al., 2009, Vaccine 27: 1293

Peters van Ton et al., 2018, Front Immunol, 9: 1926

Ponchel et al., 2011 Clinica Chimica Acta 412, 7–16

Restagno et al., 2016, PLoS One, 11(8):e0162109

Seo et al., 2014 J. of Virology 88(16): 8998–9009

Shindo et al., 2015; 43(4): 334–343

Sutter and Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10847-51

Takeyama et al., 2004, Critical Care 20048 (Suppl 1):P207

Tartaglia et al., 1992, Virol. 188(1):217-32

Tesfay et al., 2013, J. of Virology, 87(7): 3752–3759

The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins

Thomson et al., 2019, Military Medical Research, 6:11

Tritel et al., 2003, J. Immunol., 171: 2358

Unsinger et al., 2010, J Immunol; 184:3768-3779

Vanloan et al., 2017, J. Immunol.Res., Article ID 4807853

Venet and Monneret, 2017, Nat Rev Nephrol., 14(2):121-137

Venet et al., 2012, J Immunol November 15, 189 (10) 5073-5081

Yamamoto et al., 2017, Cancer Sci 108 (2017) 831–837

US5,168,062

US5,879,924

WO94/28152

WO97/00326

WO98/02522

WO98/10088

WO01/66137

WO03/000283

WO03/046124

WO03/053463

WO03/104467

WO2005/007840

WO2005/042728

WO2005/071093

WO2007/056847

WO2007/077256

WO2007/147528

WO2007/147529

WO2008/114021

WO2008/129058

WO2008/138533

WO2009/004016

WO2009/073103

WO2009/073104

WO2009/100521

WO2009/105084

WO2009/136977

WO2010/086189

WO2010/130753

WO2010/130756

WO2012/001075

WO2013/022764

WO2017/037523

【符號說明】

(無)

序列表

<110> 法商傳斯堅公司 (TRANSGENE SA)

<120> 免疫抑制之治療

<140> TW 110125715
<141> 2021-07-13

<150> EP 20305798.9
<151> 2020-07-13

<160> 4

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 154
<212> PRT
<213> 家鼷鼠

<400> 1

```
Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
1               5                  10                  15

Leu Val Leu Leu Pro Val Thr Ser Ser Glu Cys His Ile Lys Asp Lys
            20                  25                  30

Glu Gly Lys Ala Tyr Glu Ser Val Leu Met Ile Ser Ile Asp Glu Leu
        35                  40                  45

Asp Lys Met Thr Gly Thr Asp Ser Asn Cys Pro Asn Asn Glu Pro Asn
    50                  55                  60

Phe Phe Arg Lys His Val Cys Asp Asp Thr Lys Glu Ala Ala Phe Leu
65                  70                  75                  80

Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
                85                  90                  95

Glu Glu Phe Asn Val His Leu Leu Thr Val Ser Gln Gly Thr Gln Thr
            100                 105                 110
```

Leu Val Asn Cys Thr Ser Lys Glu Glu Lys Asn Val Lys Glu Gln Lys
115 120 125

Lys Asn Asp Ala Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Arg Glu Ile Lys Thr
130 135 140

Cys Trp Asn Lys Ile Leu Lys Gly Ser Ile
145 150

<210> 2
<211> 177
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
50 55 60

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala

115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175

His

<210> 3
<211> 381
<212> PRT
<213> 家鼷鼠

<400> 3

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Thr Ser Ser Glu Cys His Ile Lys Asp Lys
20 25 30

Glu Gly Lys Ala Tyr Glu Ser Val Leu Met Ile Ser Ile Asp Glu Leu
35 40 45

Asp Lys Met Thr Gly Thr Asp Ser Asn Cys Pro Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

Phe Phe Arg Lys His Val Cys Asp Asp Thr Lys Glu Ala Ala Phe Leu
65 70 75 80

Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
85 90 95

Glu Glu Phe Asn Val His Leu Leu Thr Val Ser Gln Gly Thr Gln Thr
100 105 110

Leu Val Asn Cys Thr Ser Lys Glu Glu Lys Asn Val Lys Glu Gln Lys
115 120 125

Lys Asn Asp Ala Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Arg Glu Ile Lys Thr
130 135 140

Cys Trp Asn Lys Ile Leu Lys Gly Ser Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
165 170 175

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
180 185 190

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
195 200 205

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
225 230 235 240

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
245 250 255

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
260 265 270

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
275 280 285

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
290 295 300

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
305 310 315 320

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
325 330 335

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
340 345 350

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
355 360 365

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 4
<211> 405
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
50 55 60

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser

85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175

His Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
180 185 190

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
195 200 205

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
210 215 220

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
225 230 235 240

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
245 250 255

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
260 265 270

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
275 280 285

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
290 295 300

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
305 310 315 320

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
325 330 335

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
340 345 350

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ser Pro Gly Lys
405

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種非繁殖病毒載體，其包含編碼至少一具有一 IL-7 活性之多肽之一核酸分子，其中該非繁殖病毒載體係使用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制。

【請求項2】 如請求項 1 所用之非繁殖病毒載體，其中該病毒載體選自由以下組成之群：痘病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒、水皰性口炎病毒、麻疹病毒、脊髓灰白質炎病毒、馬拉巴病毒(Maraba Virus)及病毒樣粒子。

【請求項3】 如請求項 1 至 2 中任一項所用之非繁殖病毒載體，其中該病毒載體為一非繁殖痘病毒、較佳地一非繁殖痘瘡病毒且更佳地一 MVA。

【請求項4】 如請求項 1 至 2 中任一項所用之非繁殖病毒載體，其中該病毒載體為一腺病毒、較佳地一人類腺病毒、甚至更佳地諸如血清型 5、11、26 及 35 之腺病毒的選自由物種 B、C 及 D 組成之群之一人類腺病毒。

【請求項5】 如請求項 1 至 4 中任一項所用之非繁殖病毒載體，其中該多肽選自由以下組成之群：鼠類 IL-7、人類 IL-7、與一 Fc 域融合之鼠類 IL-7 及與一 Fc 域融合之人類 IL-7。

【請求項6】 如請求項 5 所用之非繁殖病毒載體，其中該鼠類 IL-7 包含與示於 SEQ ID NO: 1 中之胺基酸序列具有至少 70%、較佳地至少 80%、更佳地至少 90%且甚至更佳地至少 95%一致性之一胺基酸序列。

【請求項7】 如請求項 5 所用之非繁殖病毒載體，其中該人類 IL-7 包含與示於 SEQ ID NO: 2 中之胺基酸序列具有至少 70%、較佳地至少 80%、更佳地至少 90%且甚至更佳地至少 95%一致性之一胺基酸序列。

【請求項8】 如請求項 5 所用之非繁殖病毒載體，其中該與一 Fc 域融合之鼠類 IL-7 包含與示於 SEQ ID NO: 3 中之胺基酸序列具有至少 70%、較佳地至少 80%、更佳地至少 90%且甚至更佳地至少 95%一致性之一胺基酸序列。

【請求項9】 如請求項 5 所用之非繁殖病毒載體，其中該與一 Fc 域融合之人類 IL-7 包含與示於 SEQ ID NO: 4 中之胺基酸序列具有至少 70%、較佳地至少 80%、更佳地至少 90%且甚至更佳地至少 95%一致性之一胺基酸序列。

【請求項10】如請求項 1 至 9 中任一項所用之非繁殖病毒載體，其中該病毒載體包含具有一 IL-7 活性之一多肽在一宿主細胞或受試者中之表現所需的調節要素。

【請求項11】一種組合物，其包含如請求項 1 至 10 中任一項之非繁殖病毒載體及一可接受之醫藥媒劑，該組合物係使用於治療敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之免疫抑制。

【請求項12】如請求項 11 所用之組合物，其中該組合物包含一劑量包含於約 10^6 pfu 與約 10^{12} pfu 之間、更佳地約 10^7 pfu 與約 10^{11} pfu 之間、甚至更佳地約 10^8 pfu 與約 10^{10} pfu 之間的非繁殖痘病毒，其中一劑量較佳地為 10^9 pfu。

【請求項13】如請求項 11 所用之組合物，其中該組合物包含一劑量包含於約 10^6 vp 與約 10^{14} vp 之間、較佳地約 10^7 vp 與約 10^{13} vp 之間、更佳地約 10^8 vp 與約 10^{12} vp 之間、更佳地約 10^9 vp 與約 10^{11} vp 之間的非繁殖腺病毒。

【請求項14】如請求項 11 至 13 中任一項所用之組合物，其中該組合物係經由非經腸途徑、更佳地經由靜脈內、皮下或肌內途徑且甚至更佳地經由靜脈內途徑投與。

【請求項15】如請求項 11 至 14 中任一項所用之組合物，其中該組合物較佳地在以下時間投與：(i)較佳地在該免疫抑制階段開始之後第一個月內之一初期，(ii)在該免疫抑制階段開始之後約 1 個月至約 6 個月範圍內變化之一時間段內，或(iii)在該免疫抑制階段開始之後 6 個月至 6 年內之一後期，或(iv)其任何組合。

【請求項16】如請求項 1 至 15 中任一項所用之非繁殖病毒載體或組合物，

其中該使用包含在該免疫抑制階段開始之後 1 次與 10 次之間、較佳地在該免疫抑制階段開始之後 1 次與 5 次之間、更佳地在該免疫抑制階段開始之後 1 次與 3 次之間、甚至更佳地在該免疫抑制階段開始之後一次投與該非繁殖病毒載體或組合物。

【請求項17】如請求項 11 至 16 中任一項所用之組合物，其中該免疫抑制係由敗血症誘發。

【請求項18】如請求項 11 至 16 中任一項所用之組合物，其中該免疫抑制係由冠狀病毒誘發，較佳地由 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV2、229E、NL63、OC43 或 HKU1 誘發。

【請求項19】如請求項 1 至 18 中任一項所用之非繁殖病毒載體或組合物，其中與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之一受試者相比，該使用增強投與該非繁殖病毒載體或組合物之一受試者之功能性先天性及/或適應性免疫系統。

【請求項20】如請求項 1 至 18 中任一項所用之非繁殖病毒載體或組合物，其中與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之一受試者相比，該使用增加投與該非繁殖病毒載體或組合物之一受試者之選自由 CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、B 細胞、NKT 細胞、NK 細胞、樹突狀細胞、單核球及嗜中性球組成之群之至少一種類型的免疫相關細胞的含量。

【請求項21】如請求項 1 至 18 中任一項所用之非繁殖病毒載體或組合物，其中與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之一受試者相比，該使用增加投與該非繁殖病毒載體或組合物之一受試者之選自由經活化 CD4 T 細胞、經活化 CD8 T 細胞、經活化 B 細胞及經活化 NK 細胞組成之群之至少一種類型的經活化免疫相關細胞的含量及/或百分比。

【請求項22】如請求項 1 至 18 中任一項所用之非繁殖病毒載體或組合物，其中與未投與該非繁殖病毒載體或組合物之一受試者相比，該使用增加投與該

非繁殖病毒載體或組合物之一受試者之選自由 IFNγ、TNFα、IL-6 及 IL-1β 組成之群之至少一種類型的細胞介素的含量。

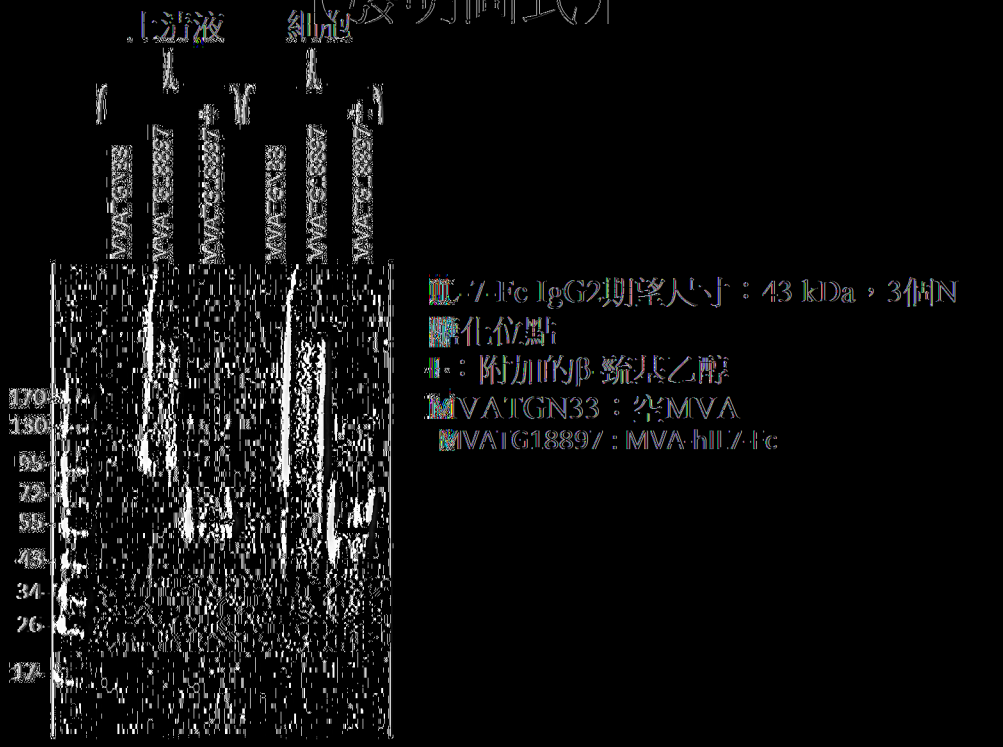
【請求項23】如請求項 1 至 18 中任一項所用之非繁殖病毒載體或組合物，其中該使用係用於治療展現與免疫相關細胞數目及/或經活化免疫相關細胞含量減少相關之一或多種生物標記物的一免疫抑制受試者。

【請求項24】如請求項 23 所用之非繁殖病毒載體或組合物，其中該一或多種生物標記物選自由以下組成之群：於循環單核球上之 HLA-DR 表現、循環 IL-10、絕對 CD3 T 細胞計數、包括調節性 T 細胞之數個免疫抑制性淋巴球亞群量測結果以及如 PD-1、PD-L1、CTLA-4、Lag3 及 BTLA 之抑制受體的表現。

【請求項25】一種用於治療一有需要之受試者之敗血症、燒傷、創傷、大手術、衰老及/或冠狀病毒誘發之一免疫抑制的方法，其包含一或多次投與如請求項 1 至 10 中任一項之非繁殖病毒載體或如請求項 11 至 18 中任一項之組合物。

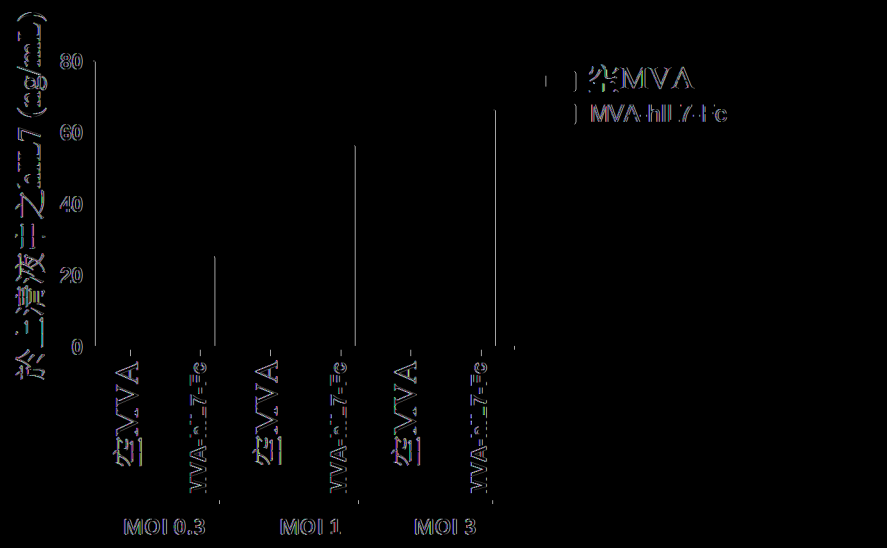
(發明圖式)

1A

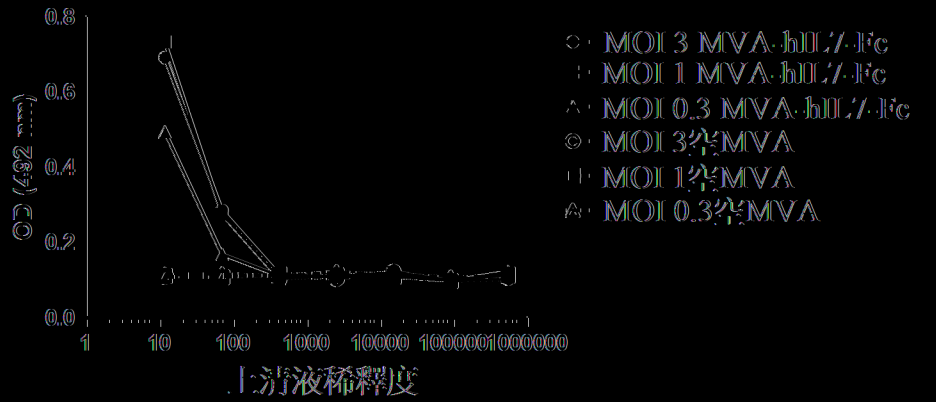


hIL7-Fc IgG2期望大小：43 kDa，3個N醣化位點
H：附加的β-巰基乙醇
MVATGN33：空MVA
MVA1G18897：MVA-hIL7-Fc

1B

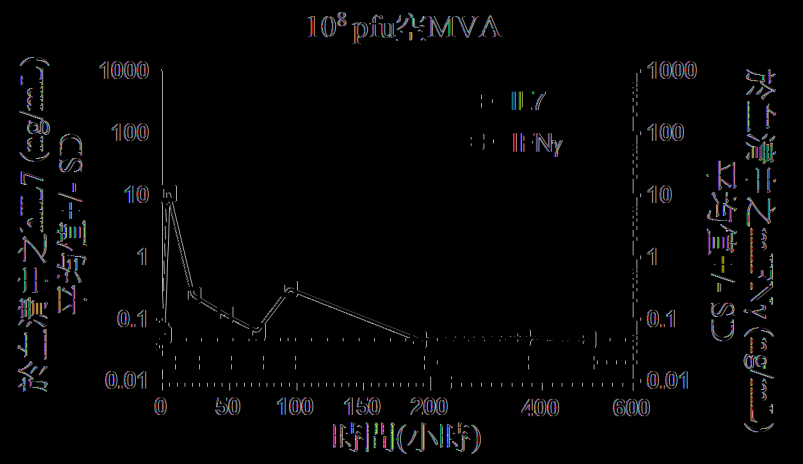


1C

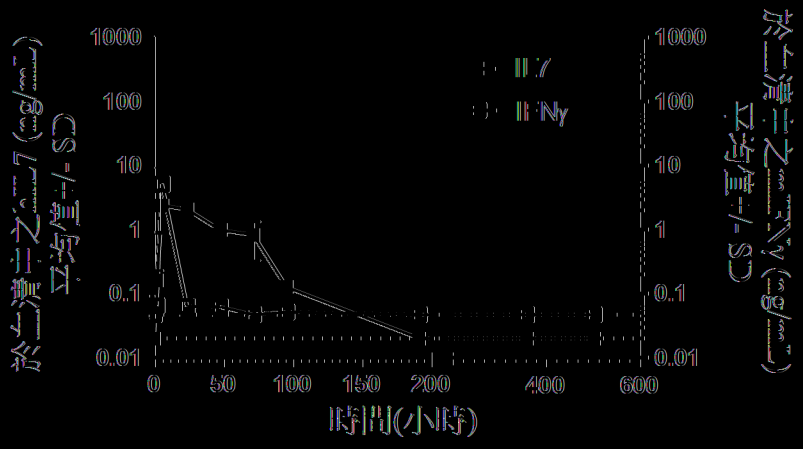


(圖1)

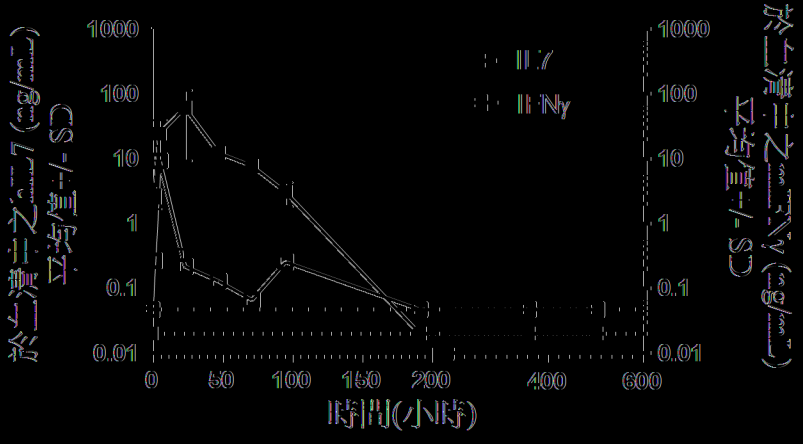
2A


10⁸ pfu空MVA
IL7
IFNγ
時間(小時)
0
50
100
150
200
400
600
0.01
0.1
1
10
100
1000

2B

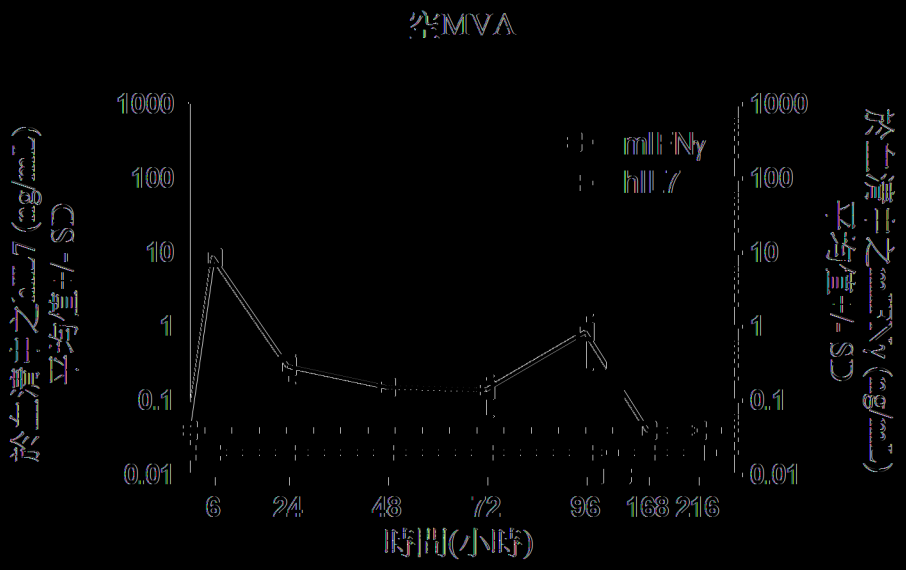

10⁷ pfu MVA-hIL7-Fc
IL7
IFNγ
時間(小時)
0
50
100
150
200
400
600
0.01
0.1
1
10
100
1000

2C

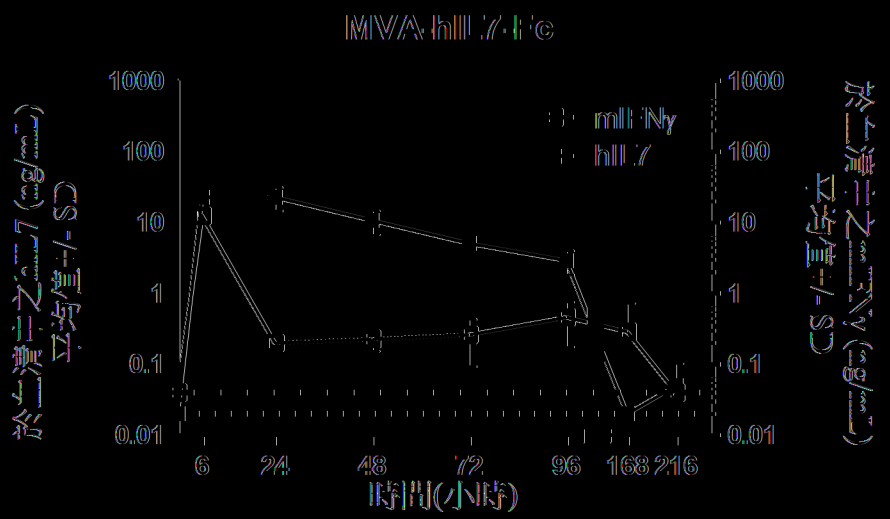

MVA-hIL7-Fc 10⁸pfu
IL7
IFNγ
時間(小時)
0
50
100
150
200
400
600
0.01
0.1
1
10
100
1000

圖(圖2)

3A


分MVA
1000
100
10
1
0.1
0.01
6
24
48
72
96
168
216
時間(小時)
mIL-Ny
hIL-7

3B


MVA-hIL-7-Fc
1000
100
10
1
0.1
0.01
6
24
48
72
96
168
216
時間(小時)
mIL-Ny
hIL-7

|(圖3)|

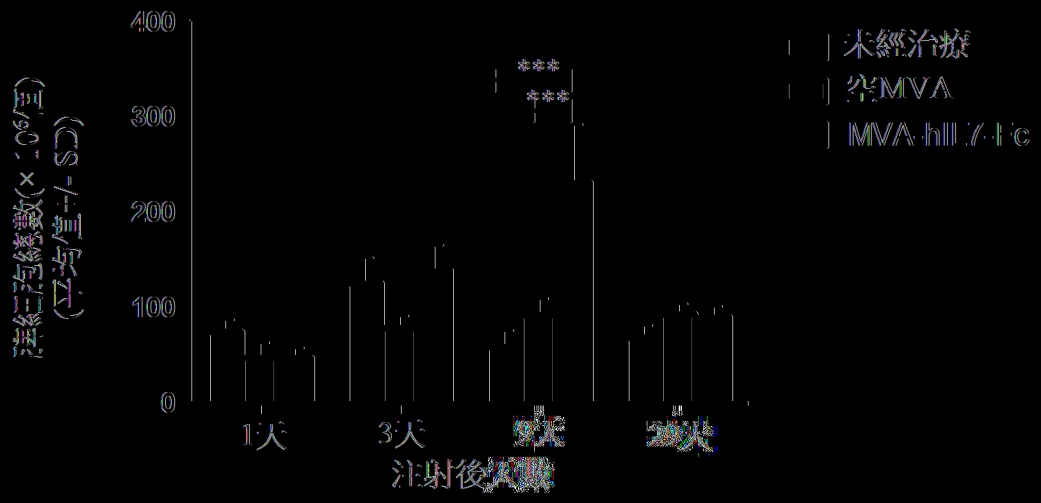
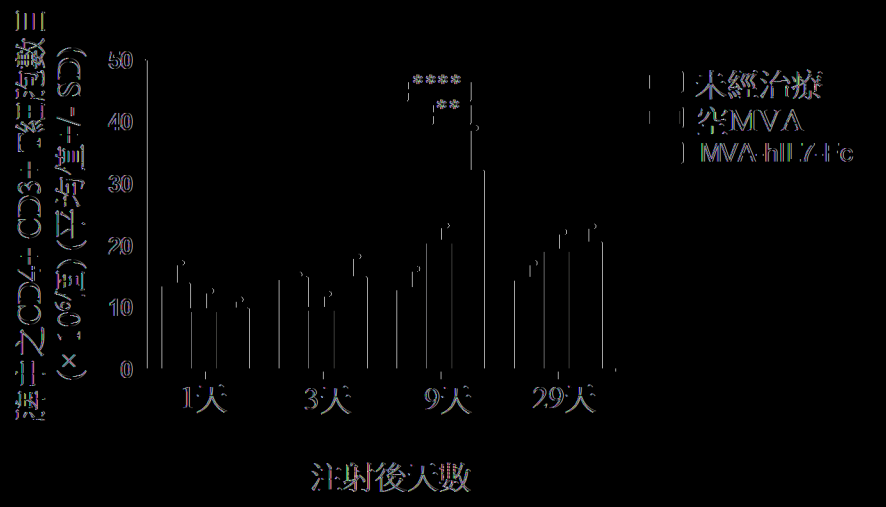
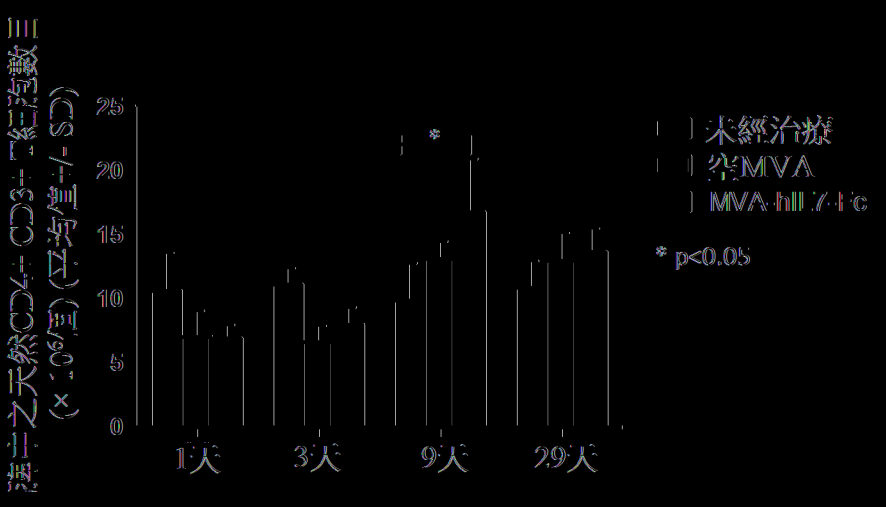


圖4

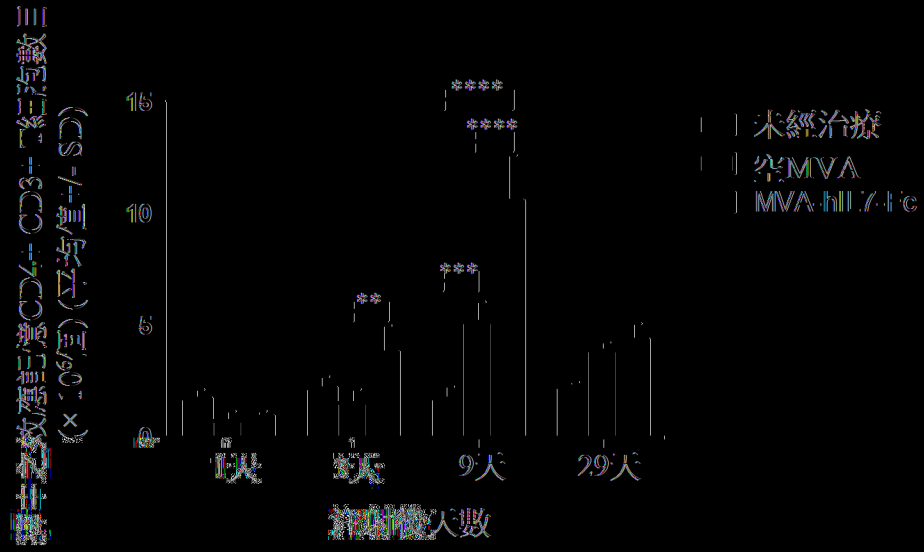
5A


注射後天數
1天
3天
9天
29天
0
10
20
30
40
50
****
**
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc

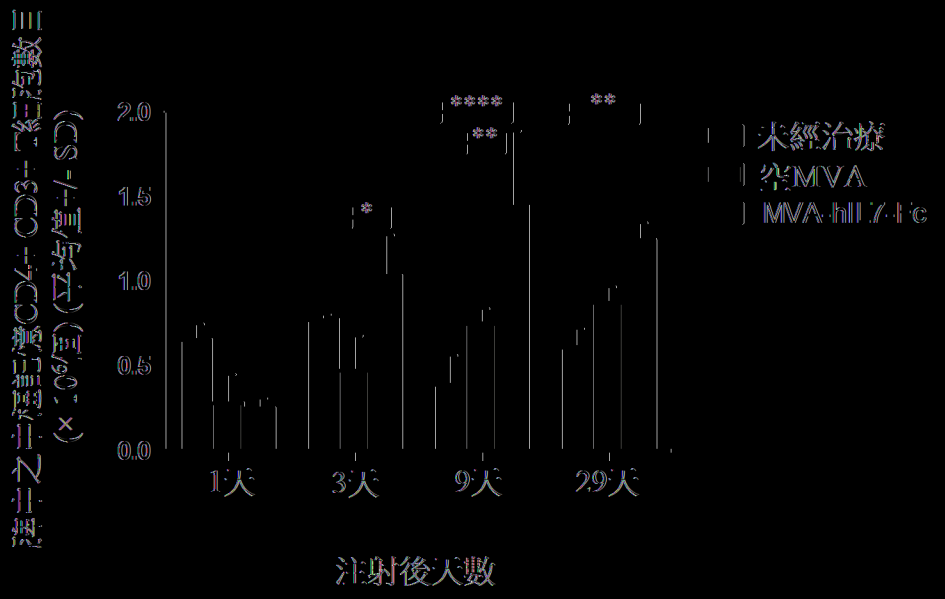
5B


注射後天數
1天
3天
9天
29天
0
5
10
15
20
25
*
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc
* p<0.05

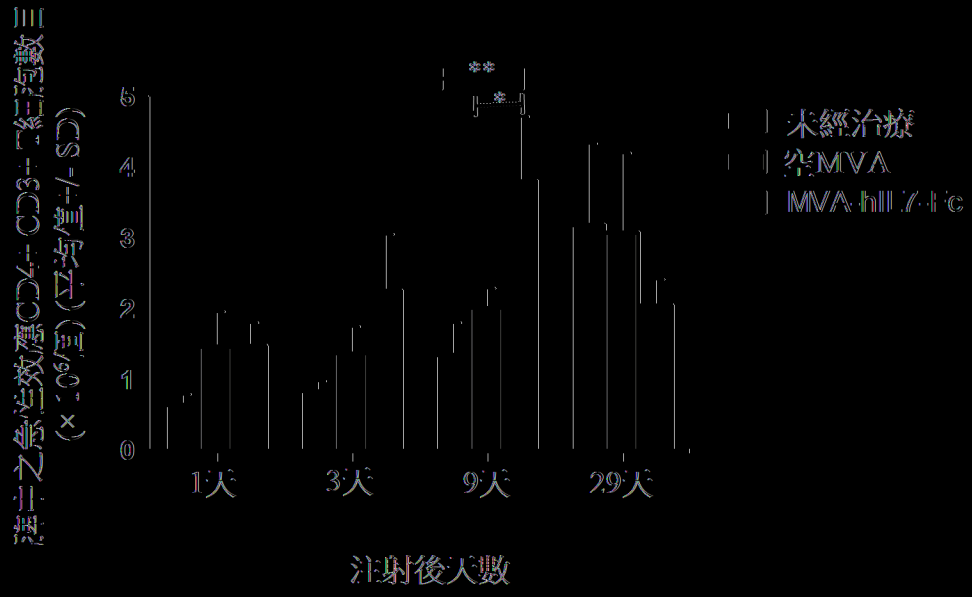
5C


注射後天數
1天
3天
9天
29天
0
5
10
15
**
***
****
****
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc

5D

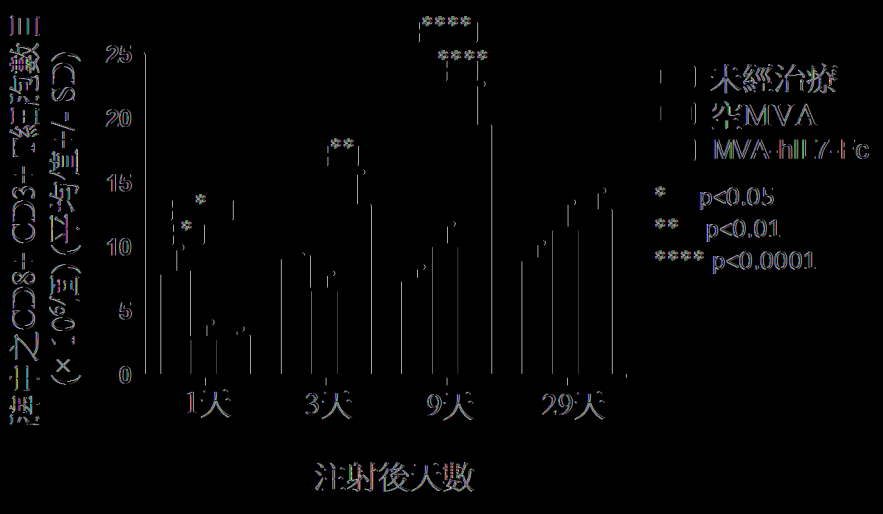

抗原特異性CD4+ CD3+ T細胞數目 (x 10^6/毫升) (平均值 +/- SD)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1天
3天
9天
29天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA hIL7-Fc

5E

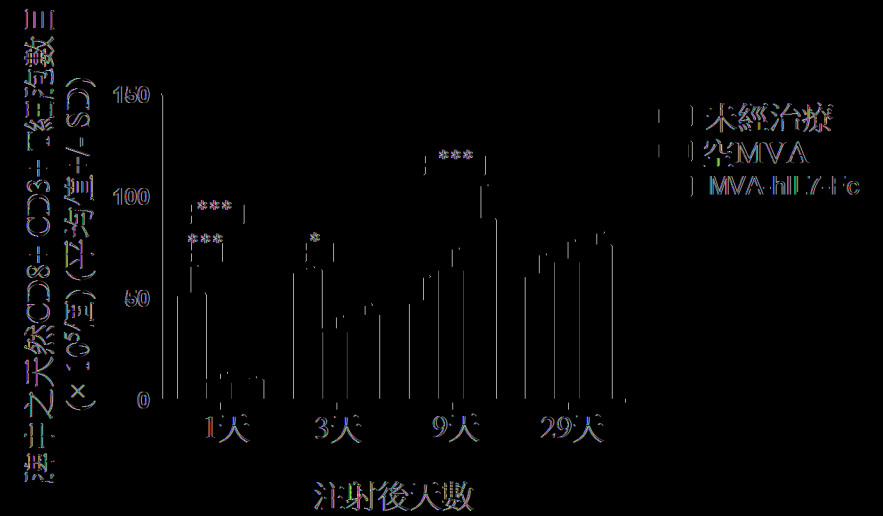

抗原特異性CD4+ CD3+ T細胞數目 (x 10^6/毫升) (平均值 +/- SD)
5
4
3
2
1
0
1天
3天
9天
29天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA hIL7-Fc

圖(圖5)續

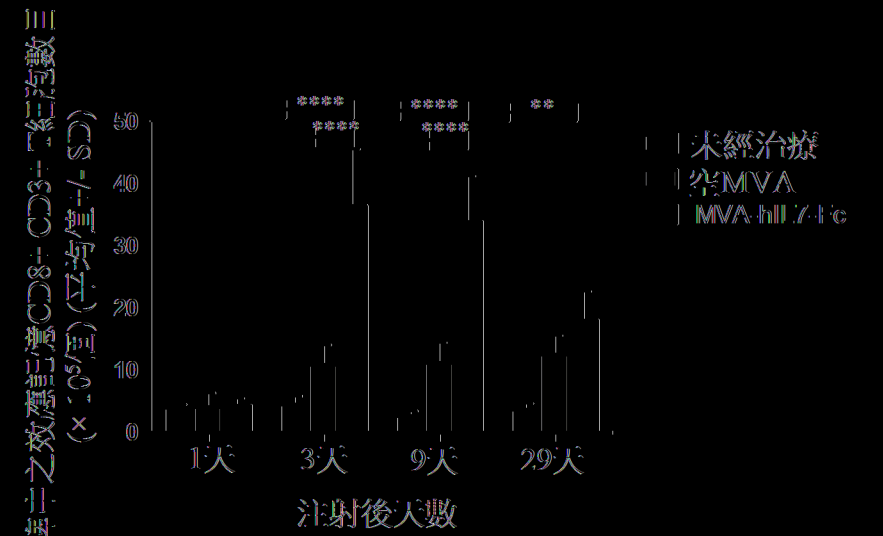
6A


抗原特異的CD8+ CD3+ 細胞數
(cells/mL) (平均值 +/- 標準偏差)
(×10³)
25
20
15
10
5
0
1天
3天
9天
29天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc
* p<0.05
** p<0.01
**** p<0.0001

6B

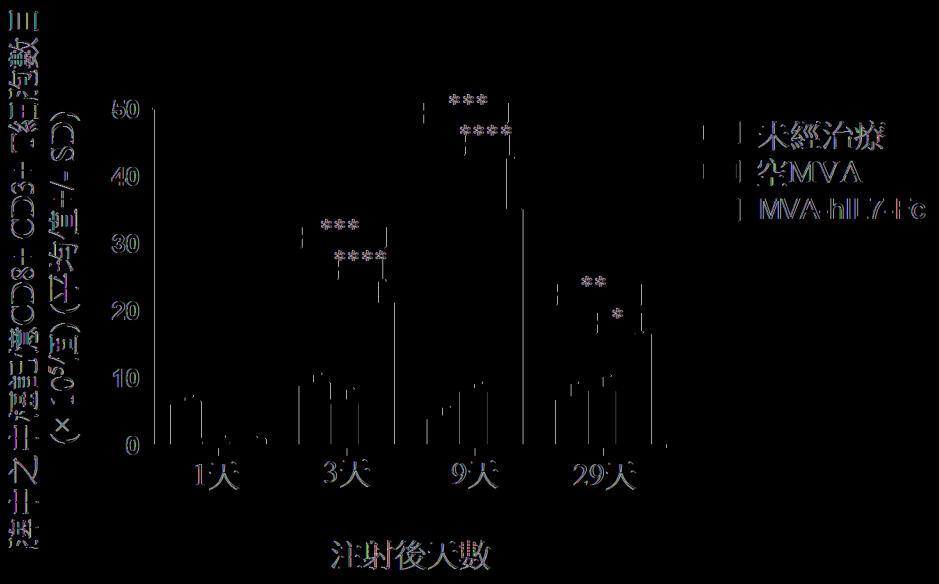

抗原特異的CD8+ CD3+ 細胞數
(cells/mL) (平均值 +/- 標準偏差)
(×10³)
150
100
50
0
1天
3天
9天
29天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc

6C

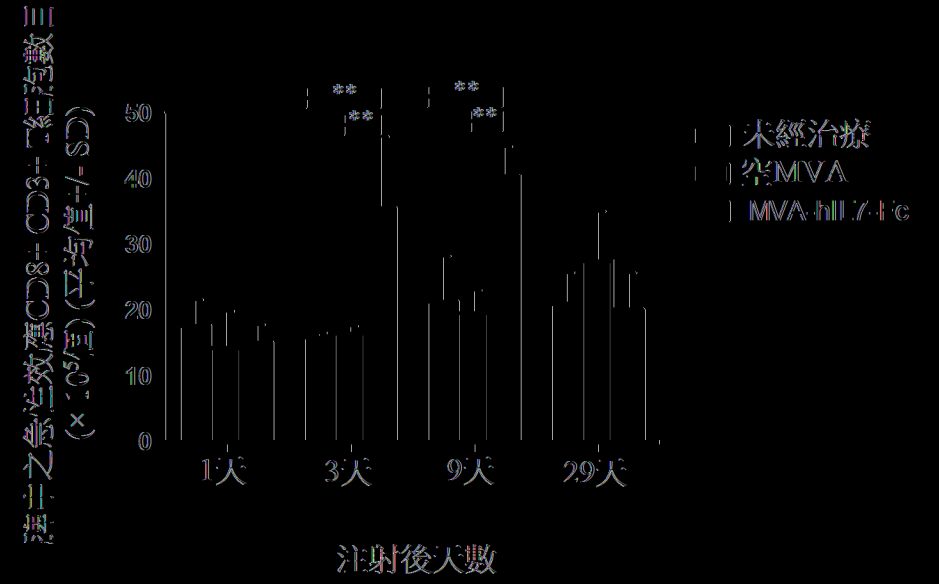

抗原特異的CD8+ CD3+ 細胞數
(cells/mL) (平均值 +/- 標準偏差)
(×10³)
50
40
30
20
10
0
1天
3天
9天
29天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc

（圖6）

6D

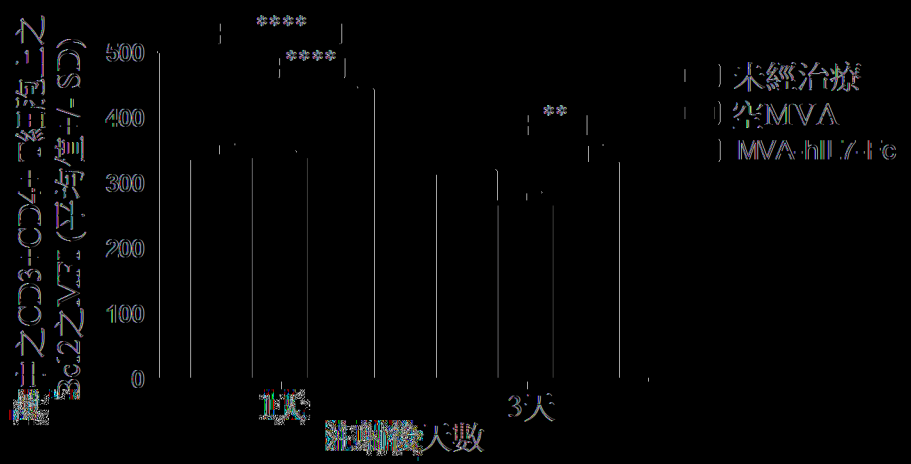

抗原特異性CD8+ CD3+ 細胞毒性T細胞 N 中位數 (CS -/- 對照組) (log10, x)
50
40
30
20
10
0
1天
3天
9天
29天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc

6E

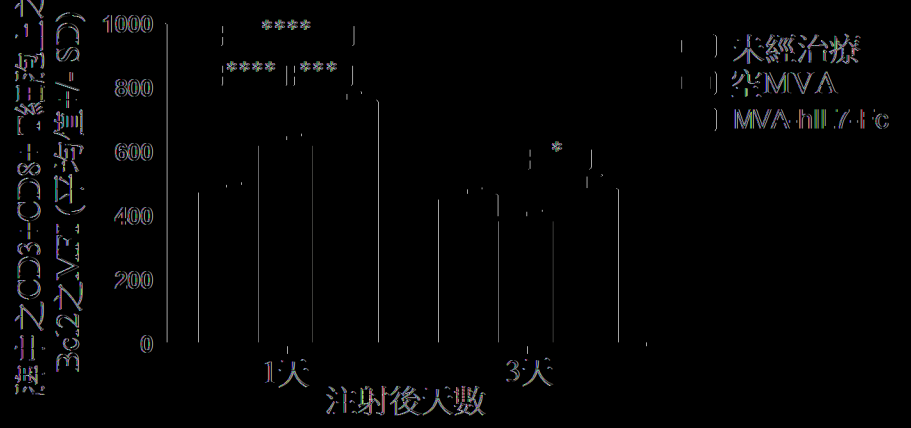

抗原特異性CD8+ CD3+ 細胞毒性T細胞 N 中位數 (CS -/- 對照組) (log10, x)
50
40
30
20
10
0
1天
3天
9天
29天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc

(圖6) 續

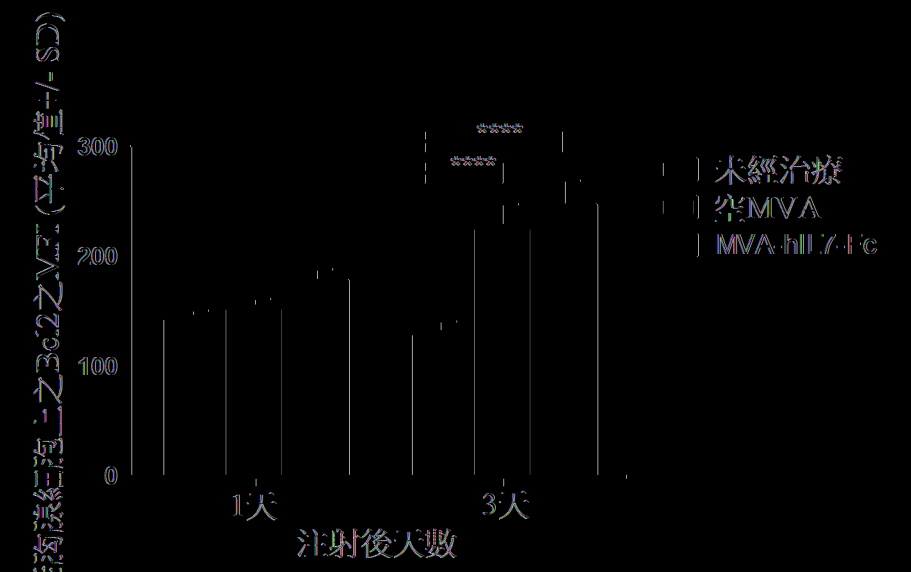
7A


CD3+CD4+ T細胞中Ki-67+細胞之數目 (平均值+/- SD)
500
400
300
200
100
0
****
****
**
1天
3天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc

7B

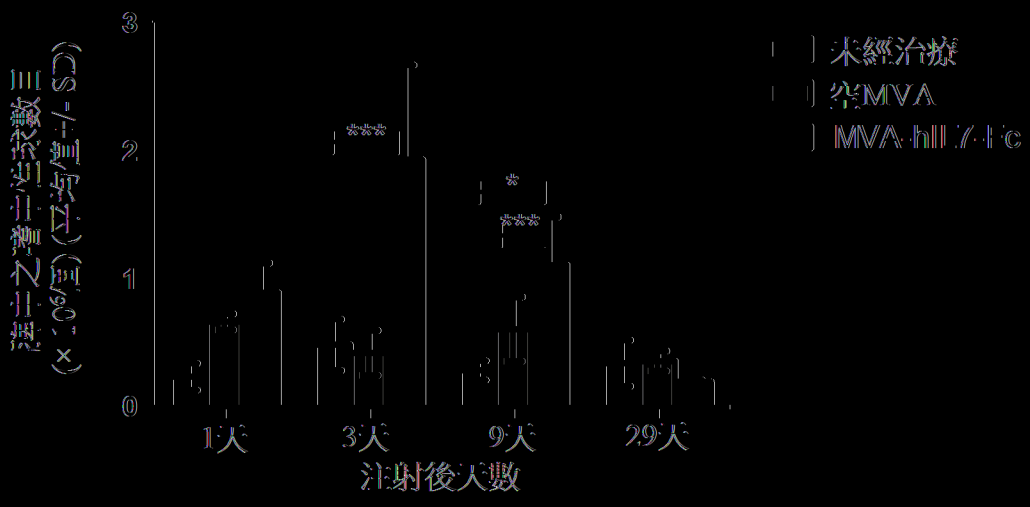

CD3+CD8+ T細胞中Ki-67+細胞之數目 (平均值+/- SD)
1000
800
600
400
200
0
****
****
***
*
1天
3天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc

7C


CD3+CD8+ T細胞中Ki-67+細胞之數目 (平均值+/- SD)
300
200
100
0
****
****
1天
3天
注射後天數
未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc

(圖7)

9A


未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc
注射後天數
1天
3天
9天
29天
0
1
2
3
*
***

9B

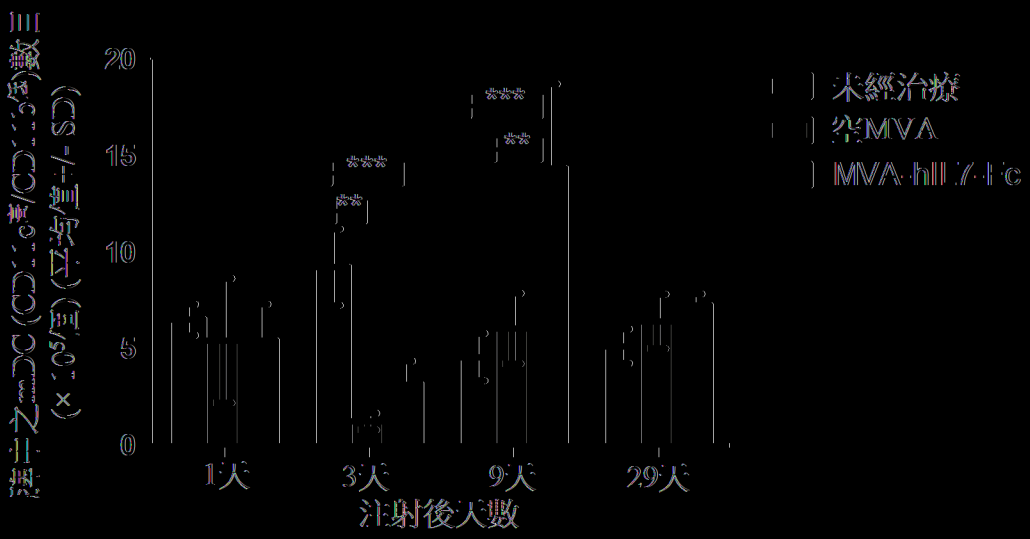
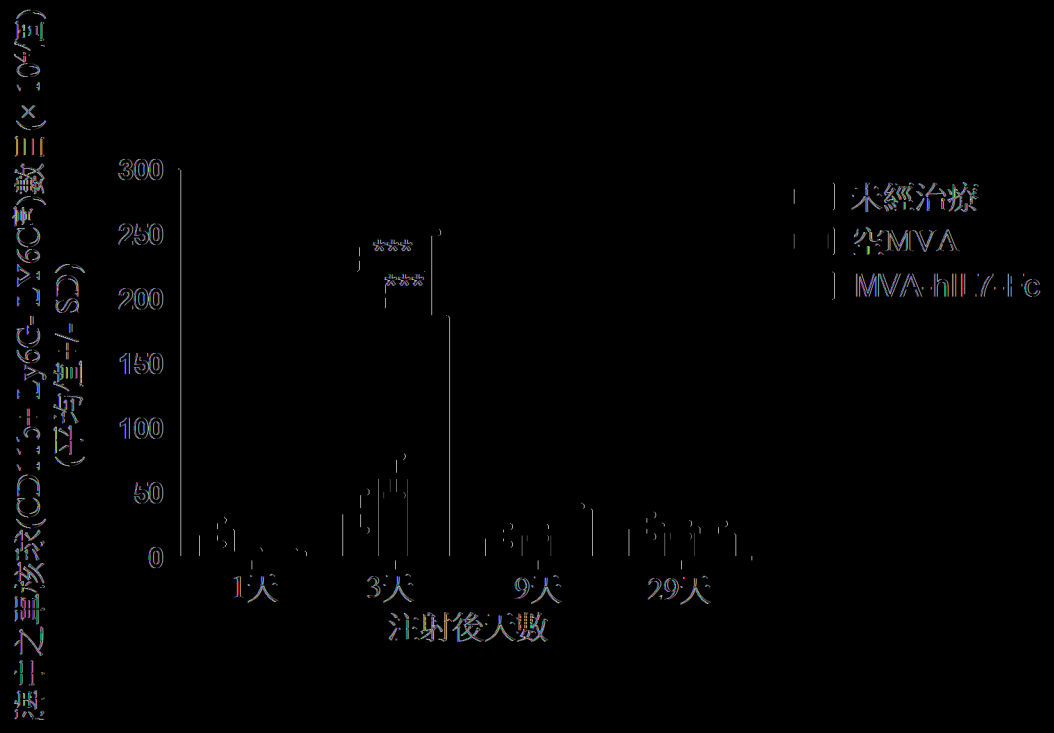
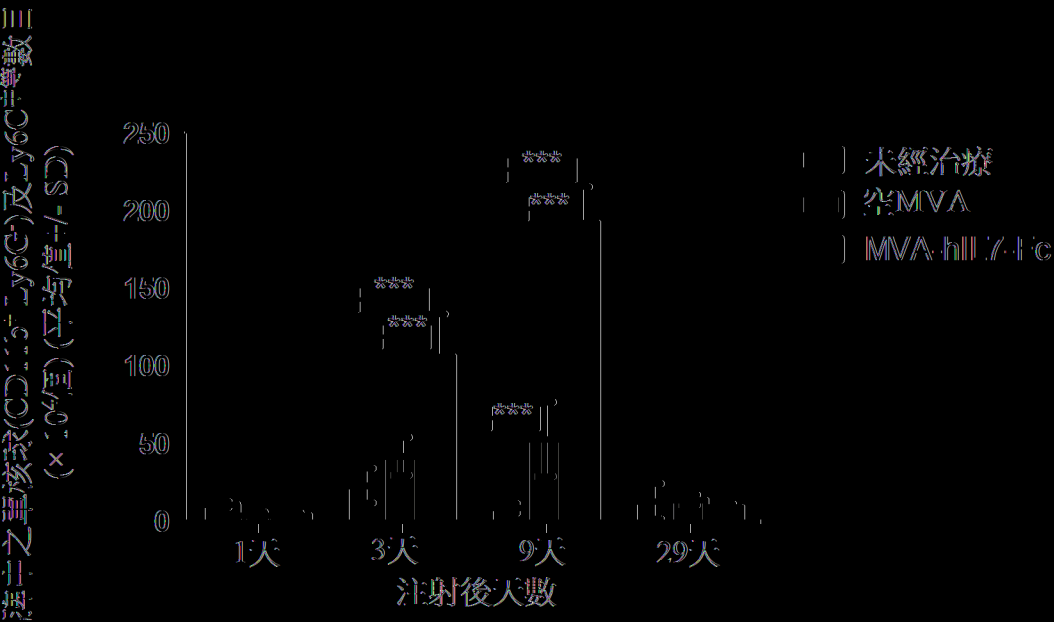

未經治療
空MVA
MVA-hIL7-Fc
注射後天數
1天
3天
9天
29天
0
5
10
15
20
**
***

圖9

10A


未經治療
空MVA
MVA-hIL-7-Fc
1天
3天
9天
29天
注射後天數
CS-/-小鼠肝臟CD8+ T細胞浸潤(細胞數/40倍視野)

10B


未經治療
空MVA
MVA-hIL-7-Fc
1天
3天
9天
29天
注射後天數
CS-/-小鼠肝臟CD8+ T細胞浸潤(細胞數/40倍視野)

圖(10)

10C

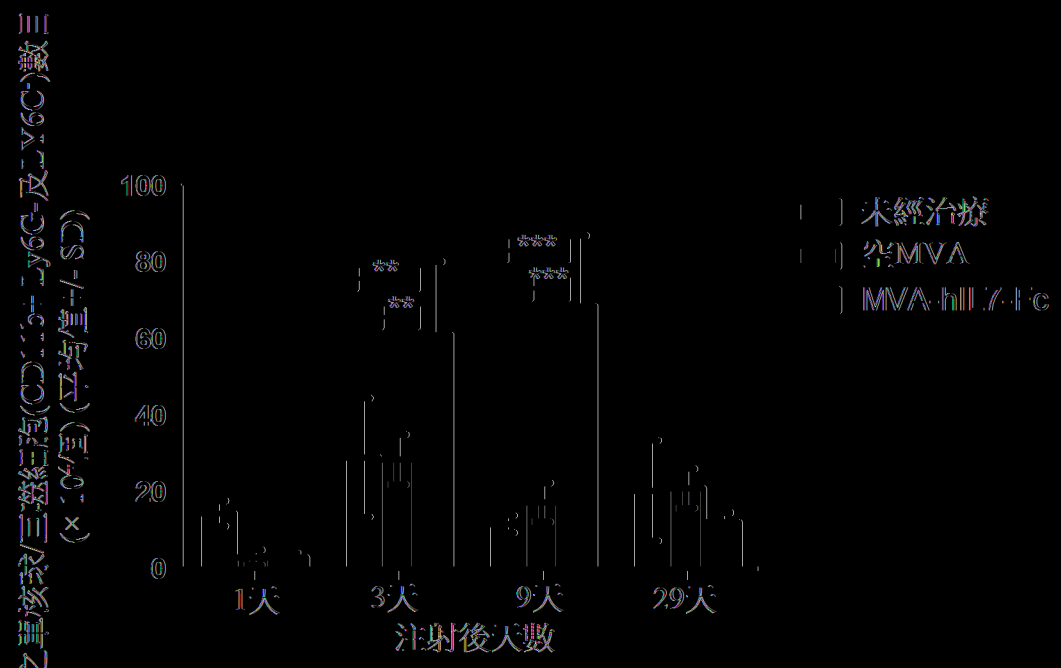
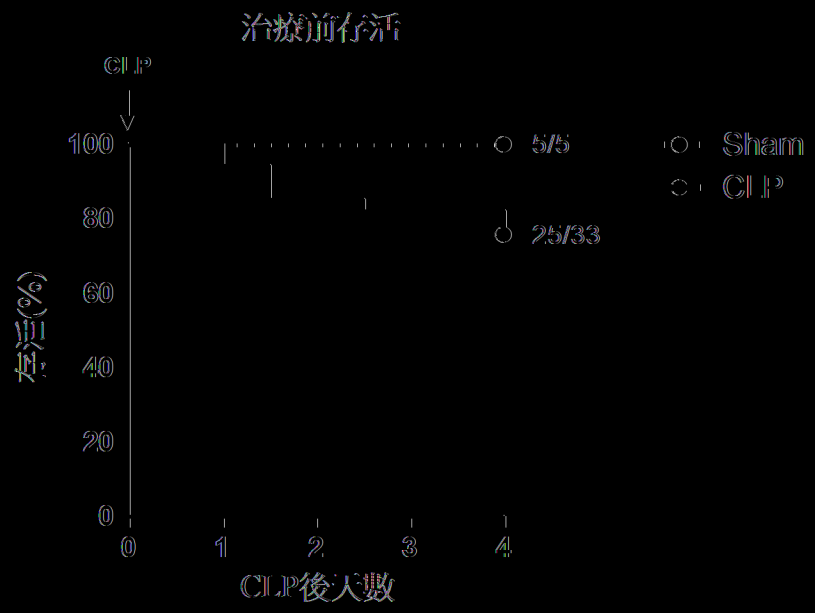
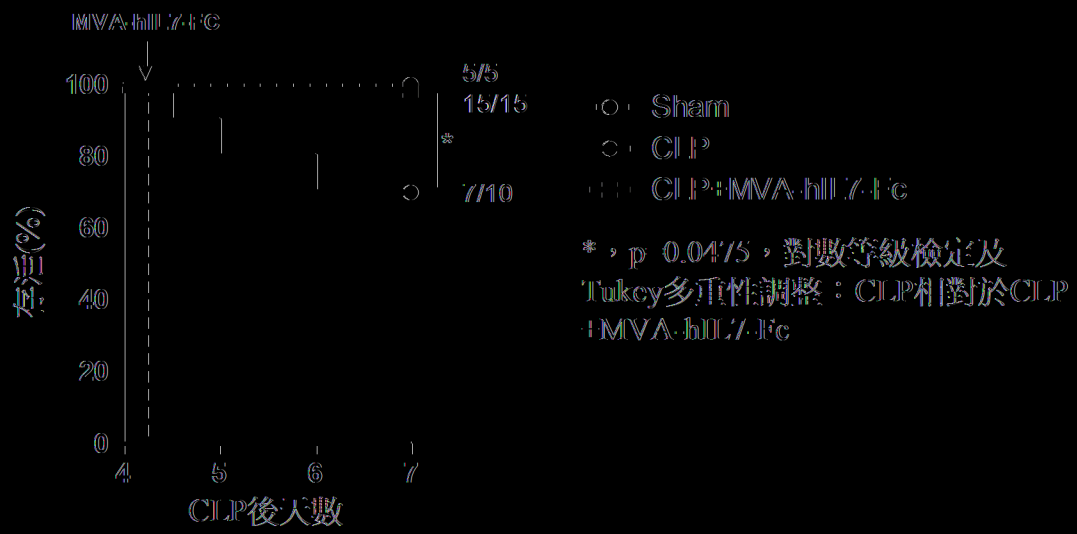


圖10 續

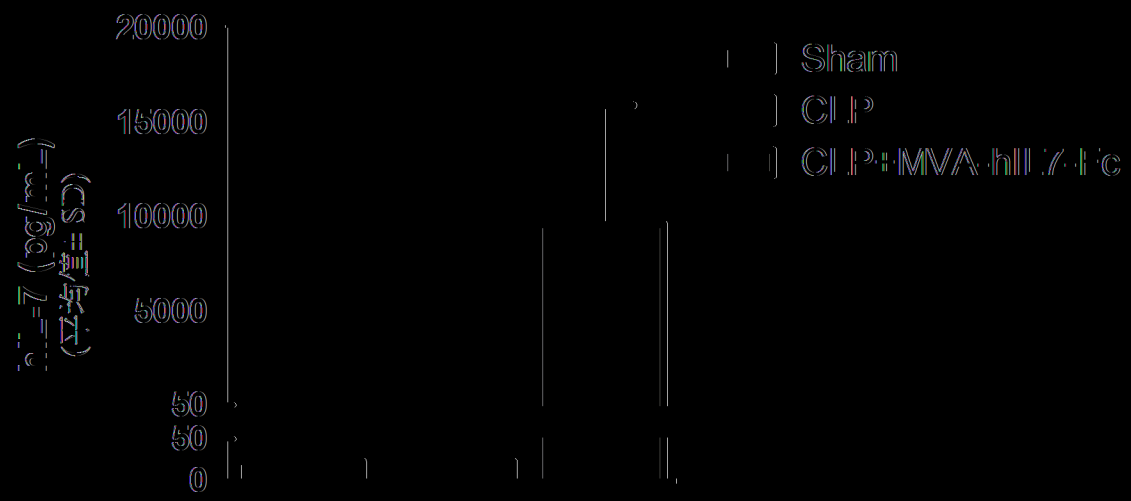
11A


治療前存活
CLP
100
80
60
40
20
0
存活(%)
0
1
2
3
4
CLP後天數
5/5
25/33
Sham
CLP

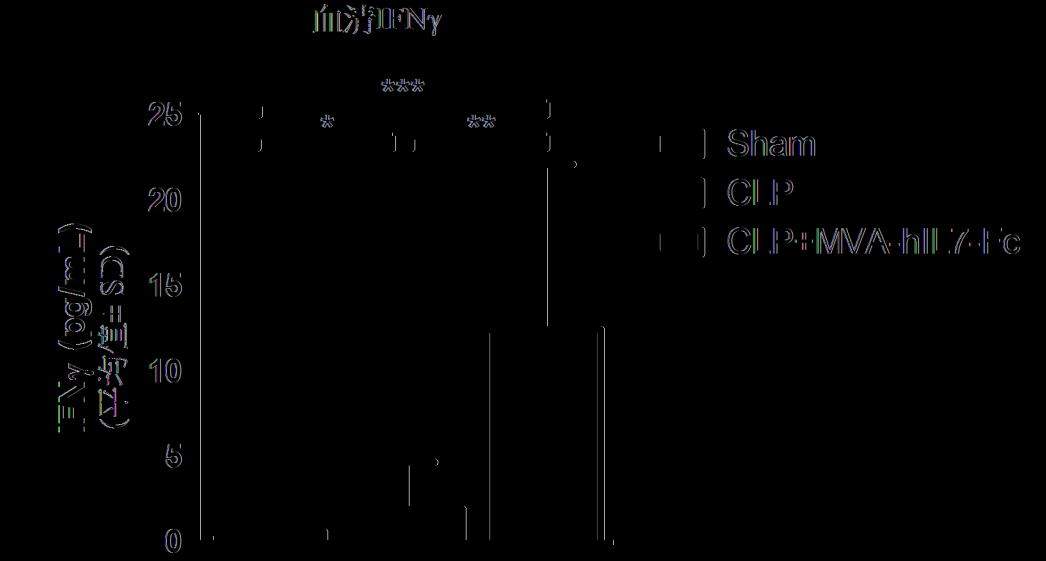
11B


MVA-hIL7-Fc治療後存活
MVA-hIL7-Fc
100
80
60
40
20
0
存活(%)
4
5
6
7
CLP後天數
5/5
15/15
7/10
*
Sham
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc
*，p 0.0475，對數等級檢定及Tukey多重性調整：CLP相對於CLP+MVA-hIL7-Fc

（圖11）

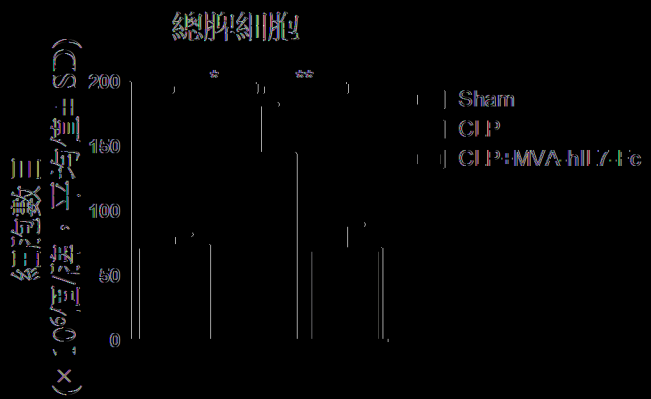

20000
15000
10000
5000
50
50
0
Sham
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc

圖(12)

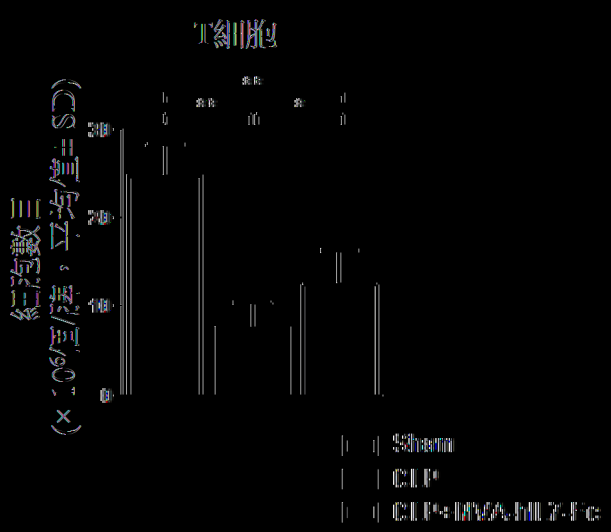

血清IFNγ
25
20
15
10
5
0
Sham
CLP
CLP+MVA-hIL7-Fc

圖(13)

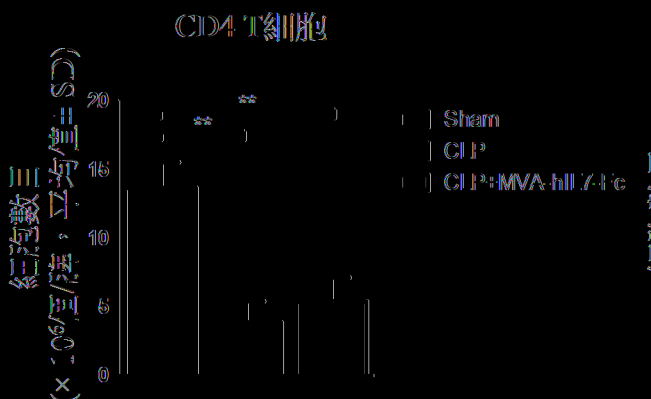
14A



14B



14C



14D

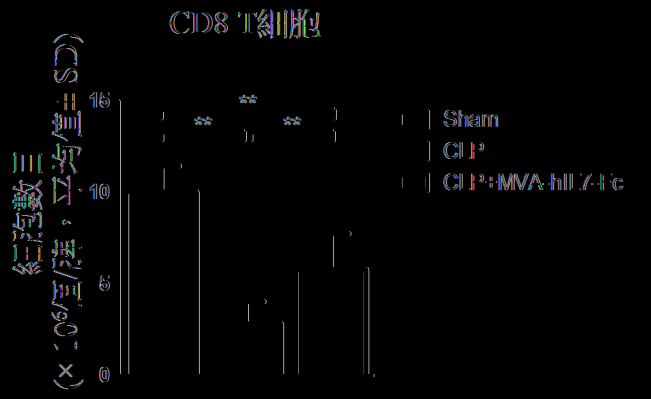
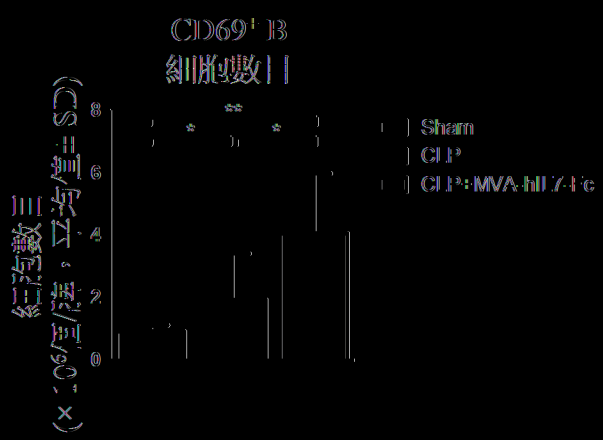
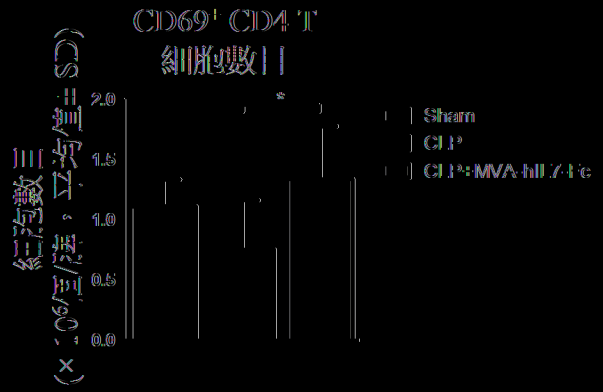


圖14

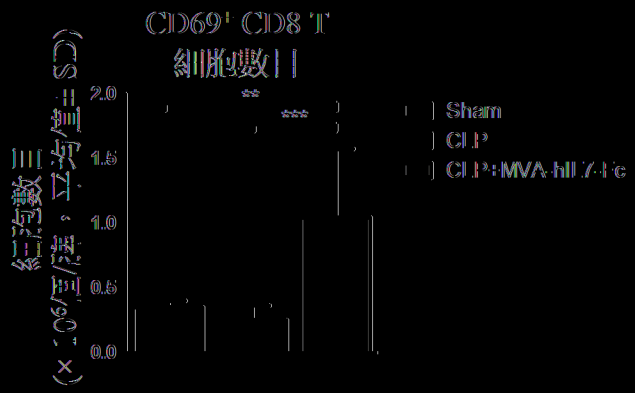
15A



15B



15C



15D

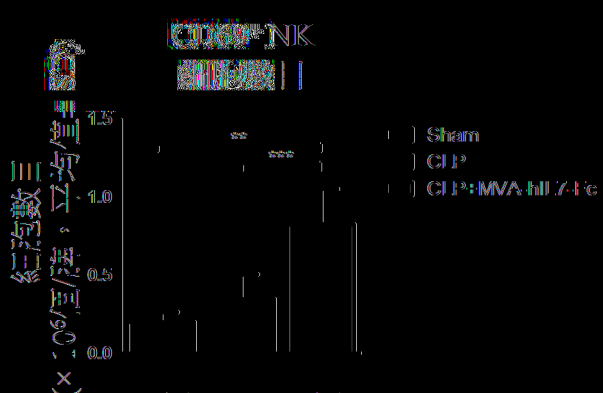
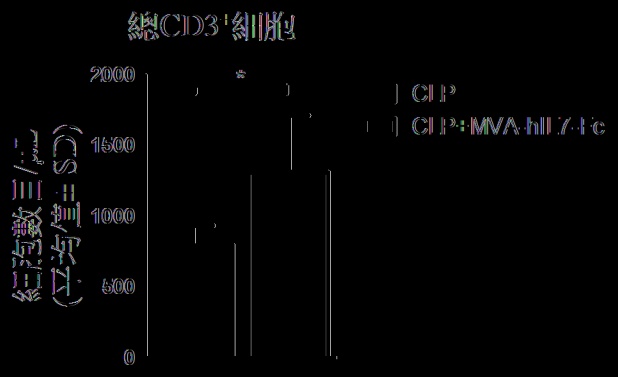
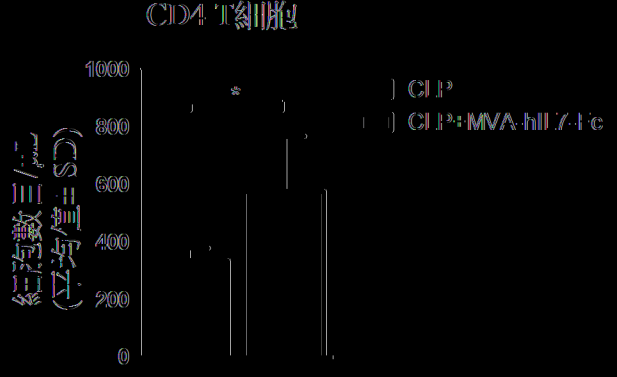


圖15

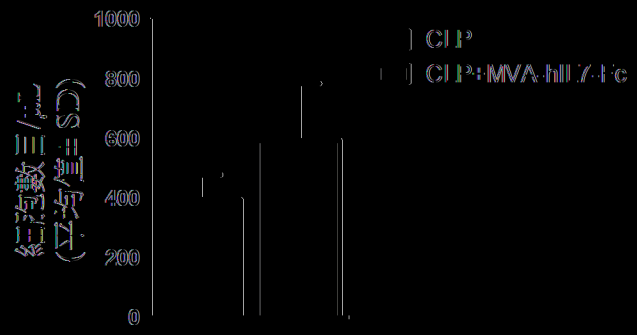
16A



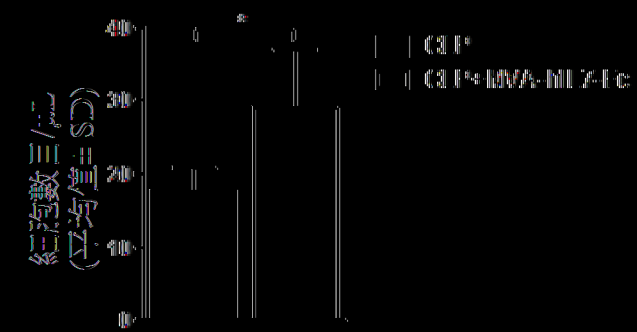
16B



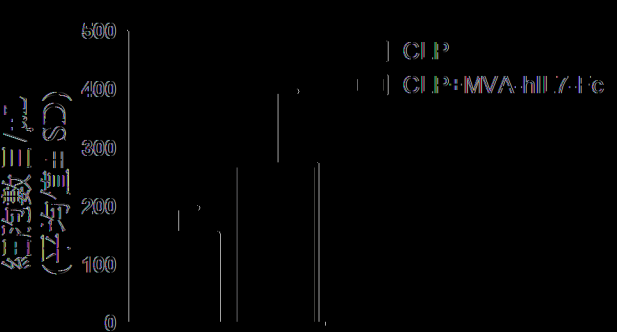
16C



16D

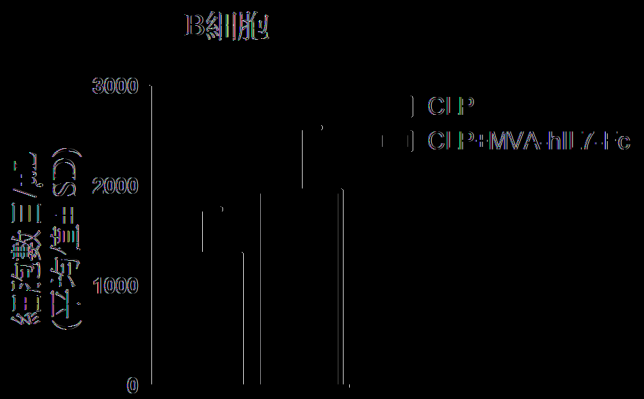


16E

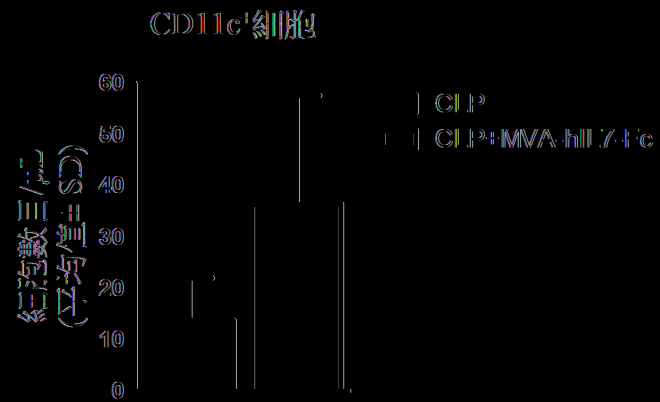


(圖16)

16F



16G



16H

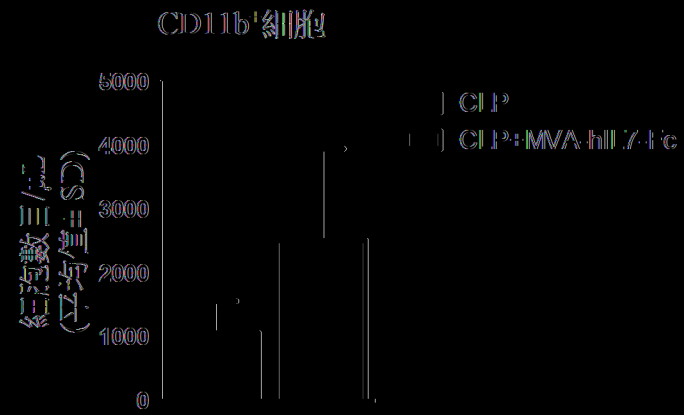
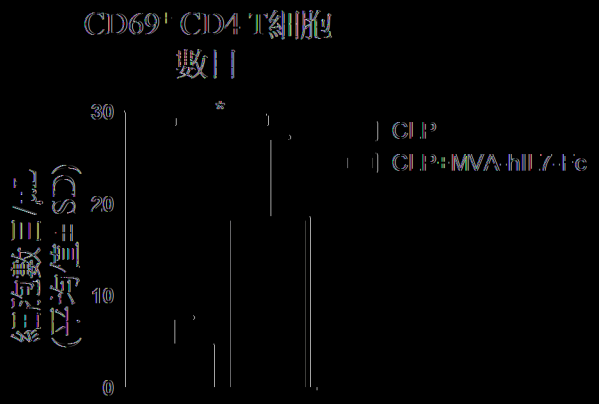
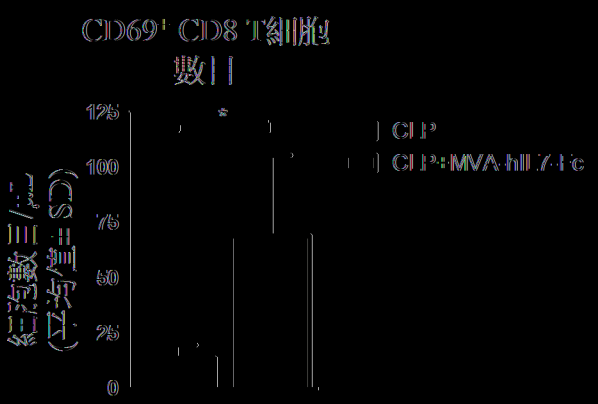


圖16

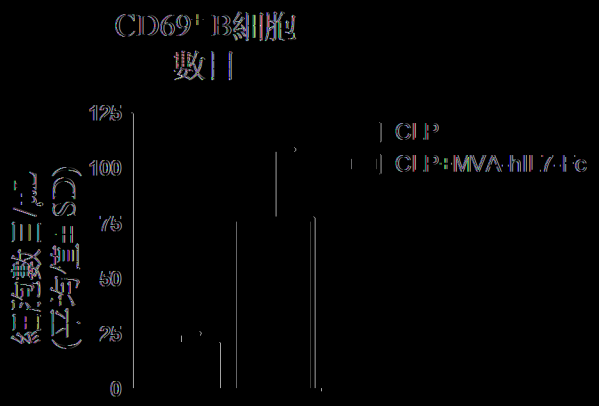
17/A



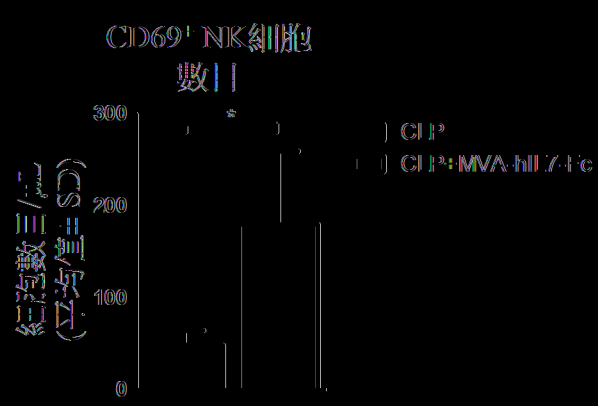
17/B



17/C

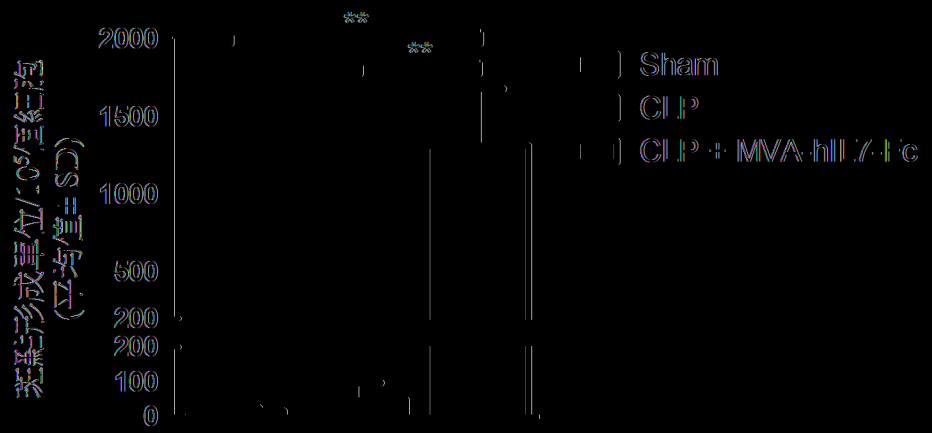


17/D



(圖17)

18A


***
***
2000
1500
1000
500
200
200
100
0
Sham
CLP
CLP + MVA-hIL7-Fc

18B

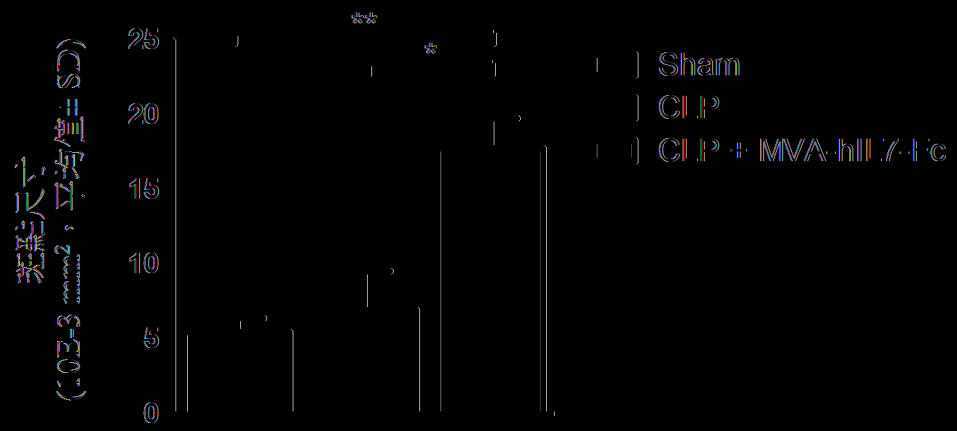
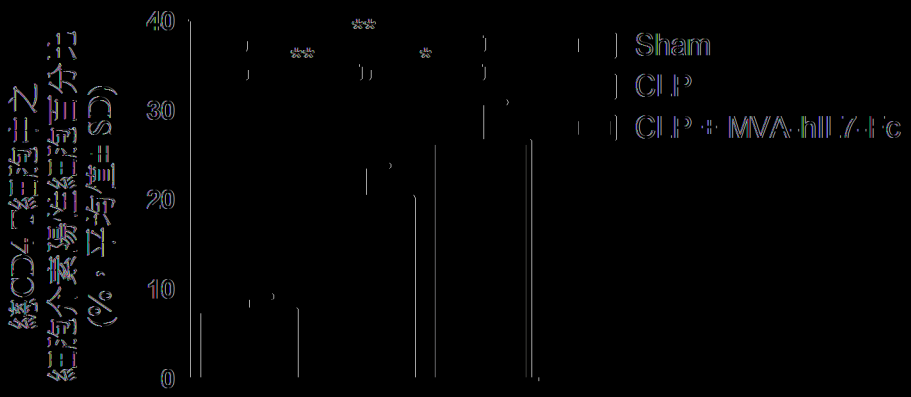

***
*
25
20
15
10
5
0
Sham
CLP
CLP + MVA-hIL7-Fc

圖18

19A


CD4 T細胞反應
經CD4+細胞中
產生IFN-γ細胞激素的
活化人類CD4+細胞百分比
(%，平均值 ± SD)
40
30
20
10
0
Sham
CLP
CLP + MVA-hIL7-Fc

19B

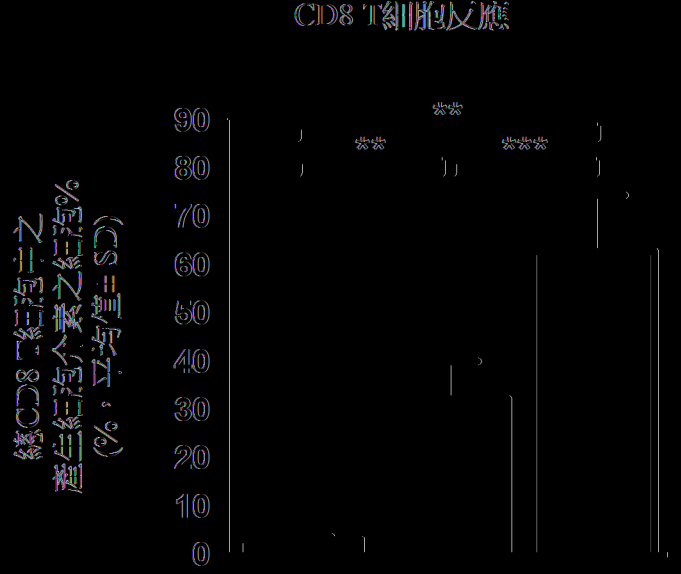

CD8 T細胞反應
經CD8+細胞中
產生IFN-γ細胞激素的
活化人類CD8+細胞%
(%，平均值 ± SD)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

圖19

20A

20B

20C

（圖20）

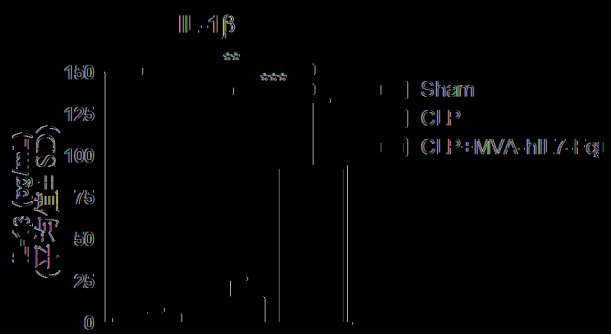
21A

21B

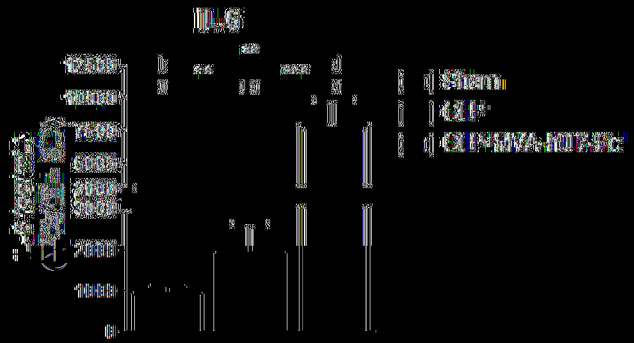
21C

圖21

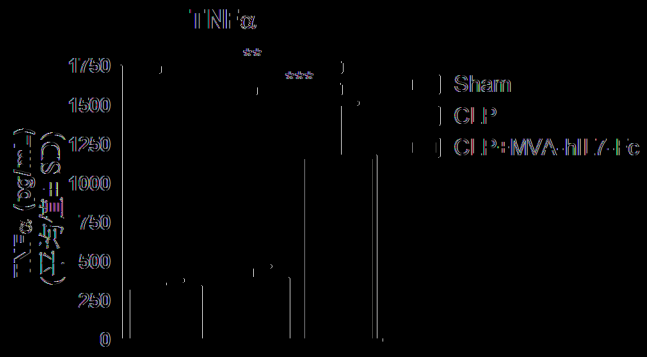
22A



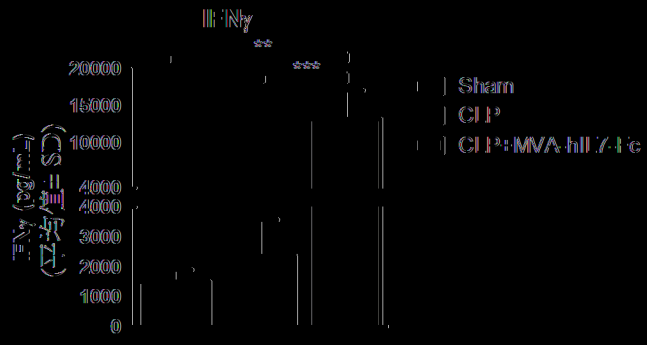
22B



22C



22D



22E

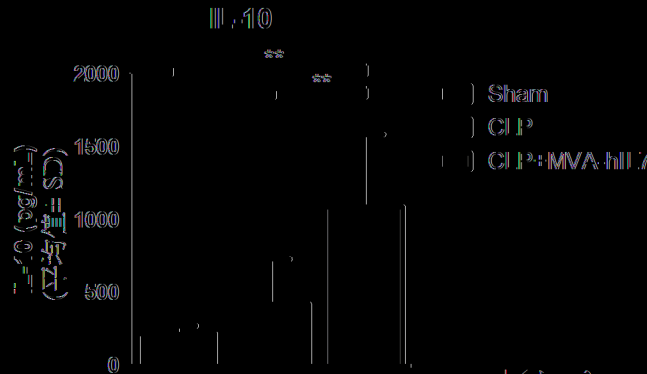
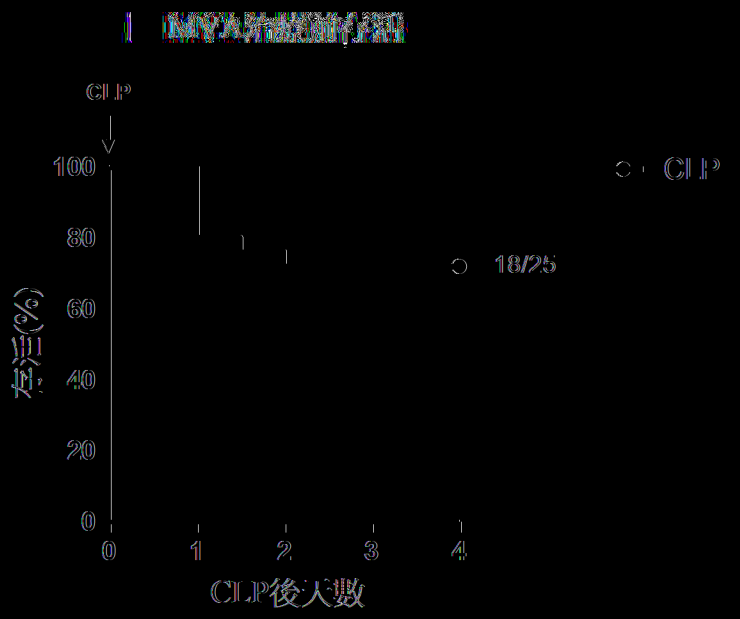


圖 22

23A


MVA治療後存活
CLP
100
80
60
40
20
0
存活(%)
0
1
2
3
4
CLP後天數
CLP
18/25

23B

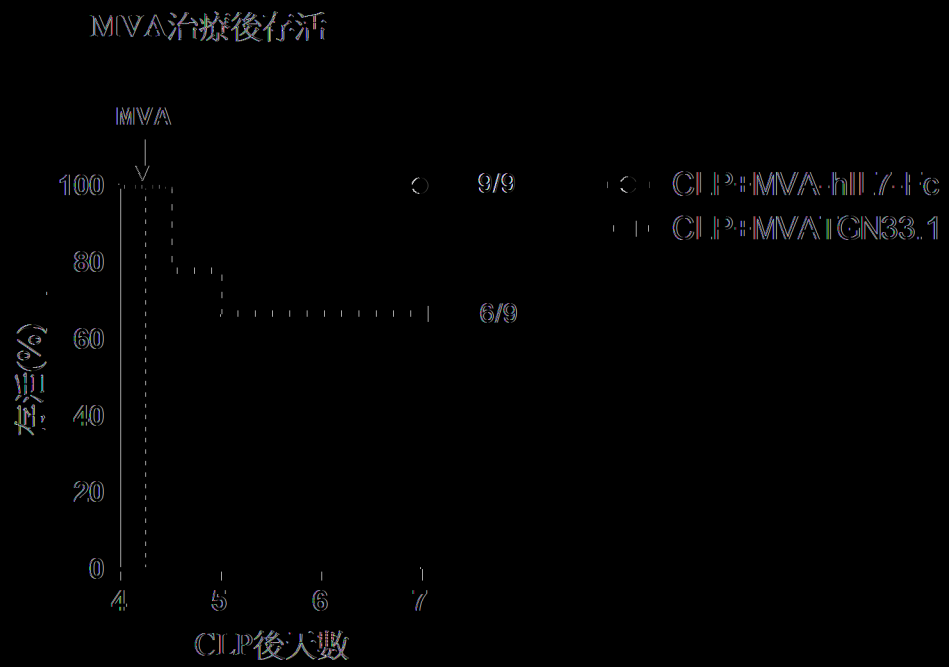
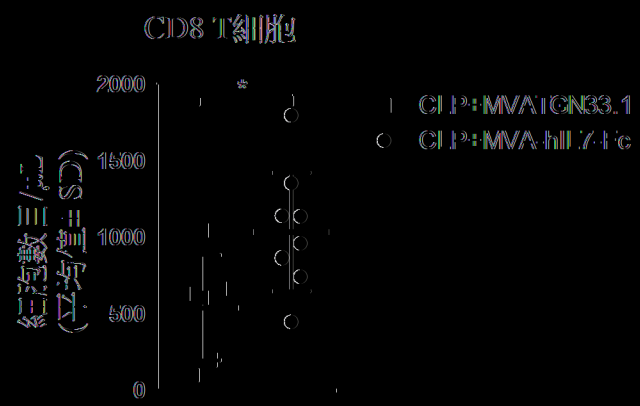
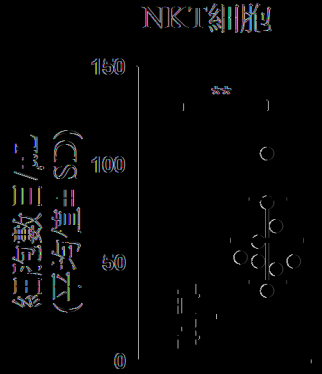

MVA治療後存活
MVA
100
80
60
40
20
0
存活(%)
4
5
6
7
CLP後天數
9/9
6/9
CLP+MVA-hIL7-Fc
CLP+MVA1GN33.1

圖23

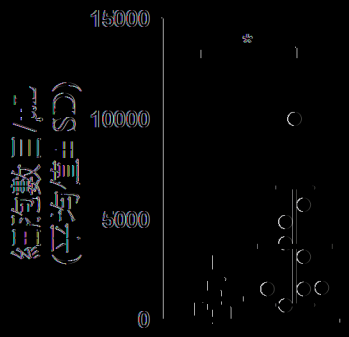
24A



24B



24C



（圖24）

25A

所有細胞介素+
CD4+T細胞
CLP+MVA1GN33.1
CLP+MVA-hIL7-Fc
表現細胞介素之總活化
CD4+T細胞之總活性百分比(%，立方毫
米+/- SD)
60
40
20
0

25B

所有IFNγ+
CD4+T細胞
所有TNFα+
CD4+T細胞
腫瘤抗原
CD4+T細胞
6
4
2
0
40
30
20
10
0

25C

IFNγ+TNFα+
CD4+T細胞
IFNγ+IL2+
CD4+T細胞
IL2+TNFα+
CD4+T細胞
IFNγ+IL2+TNFα+
CD4+T細胞
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.6
0.4
0.2
0.0
25
20
15
10
5
0
5
4
3
2
1
0

26A

26B

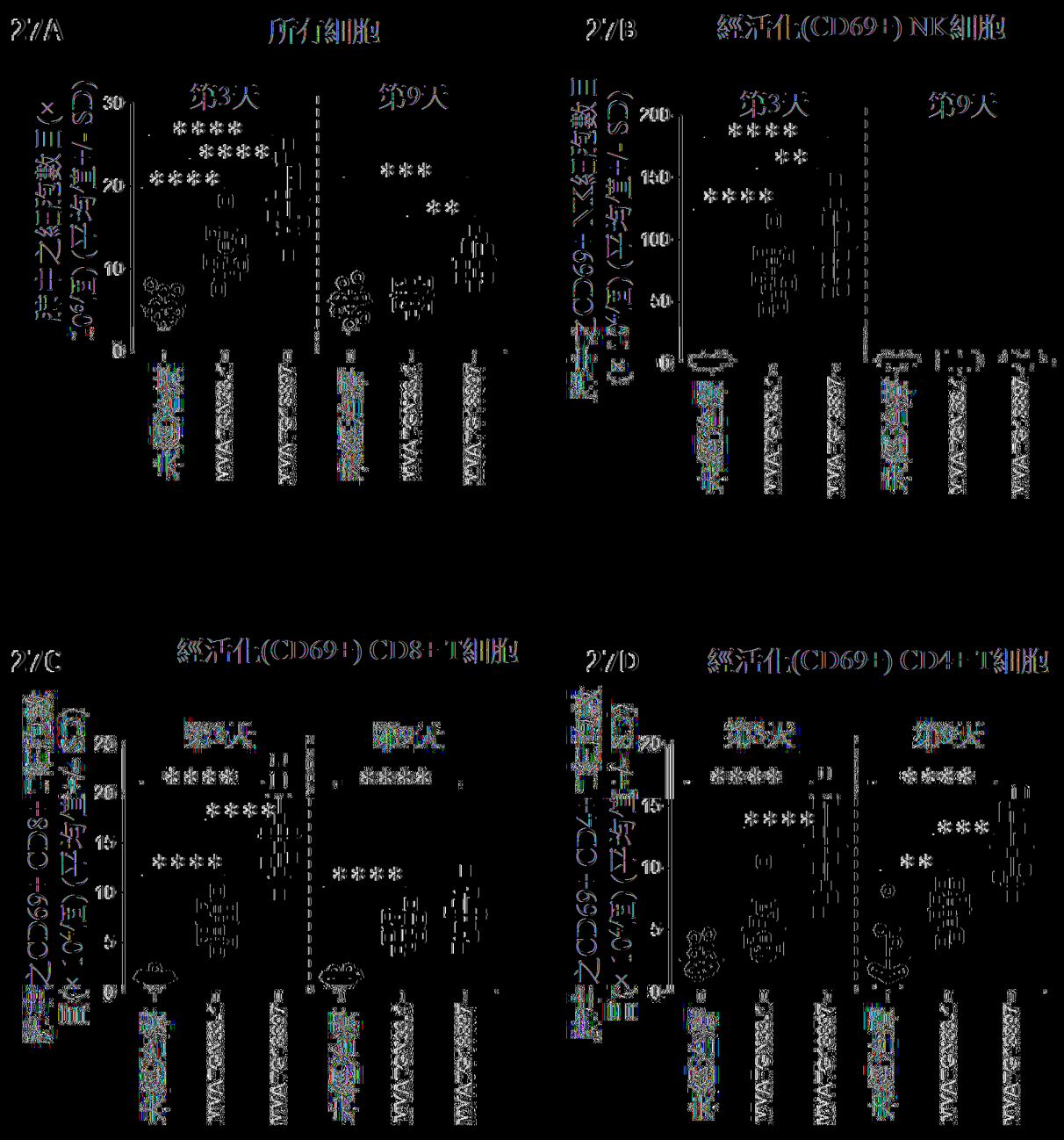
26C

(圖26)

26D

IFNγ+TNFα+
CD8 T細胞
**
表現CD8 T細胞中IFNγ+TNFα+細胞之百分比(%，平均+/- SD)
25
20
15
10
5
0
IL2+TNFα+
CD8 T細胞
**
表現CD8 T細胞中IL2+TNFα+細胞之百分比(%，平均+/- SD)
10
8
6
4
2
0
IFNγ+IL2+TNFα+
CD8 T細胞
**
表現CD8 T細胞中IFNγ+IL2+TNFα+細胞之百分比(%，平均+/- SD)
15
10
5
0

圖(圖26)續


27/A
所有細胞
第3天
第9天
27/B
經活化(CD69+) NK細胞
第3天
第9天
27/C
經活化(CD69+) CD8+ T細胞
第3天
第9天
27/D
經活化(CD69+) CD4+ T細胞
第3天
第9天

圖(圖27)

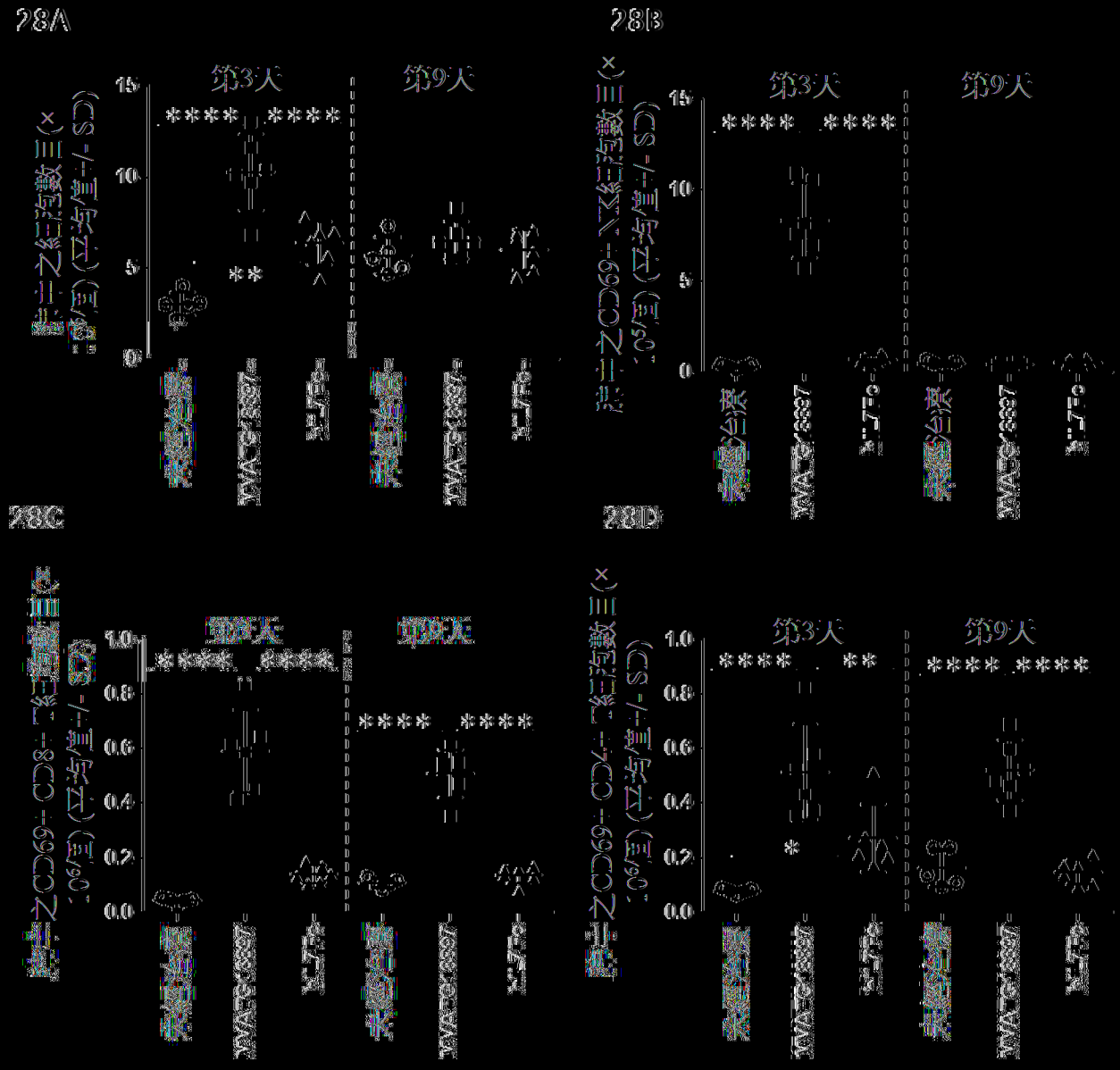
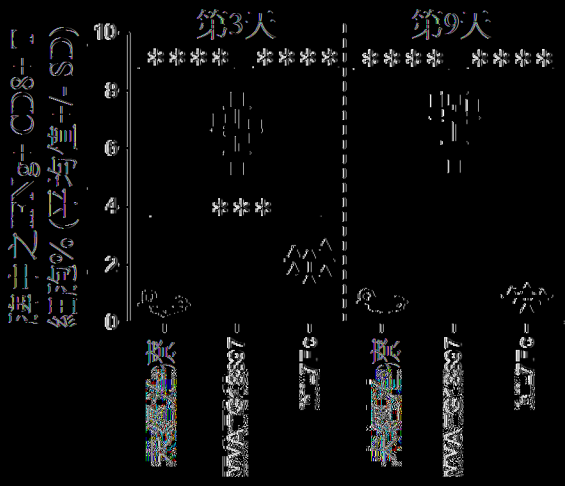


圖28

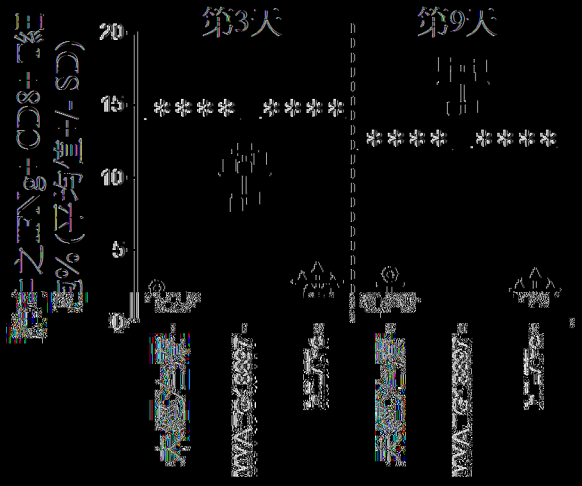
脾

29A IFNγ CD8+ T細胞

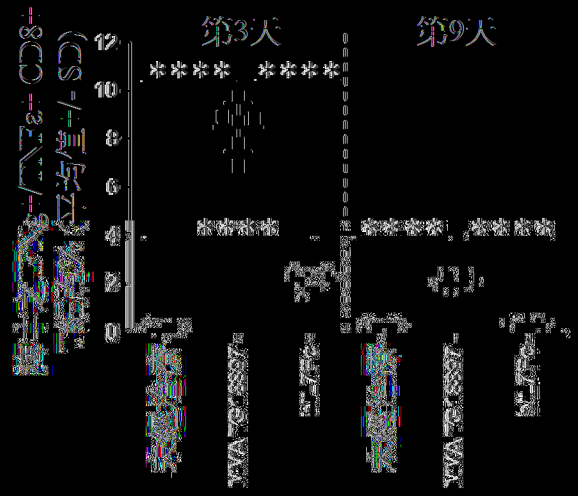


肺

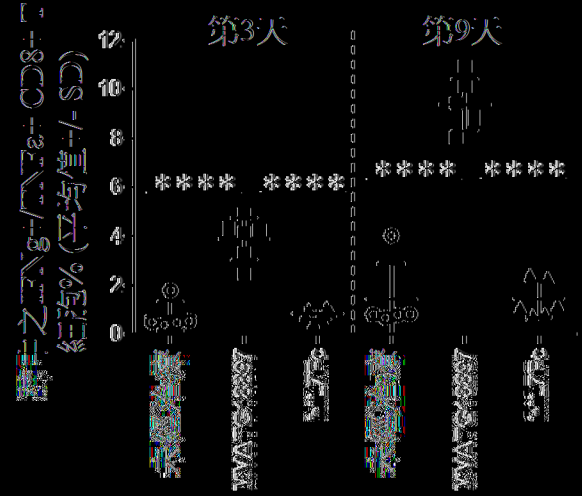
29B IFNγ CD8+ T細胞



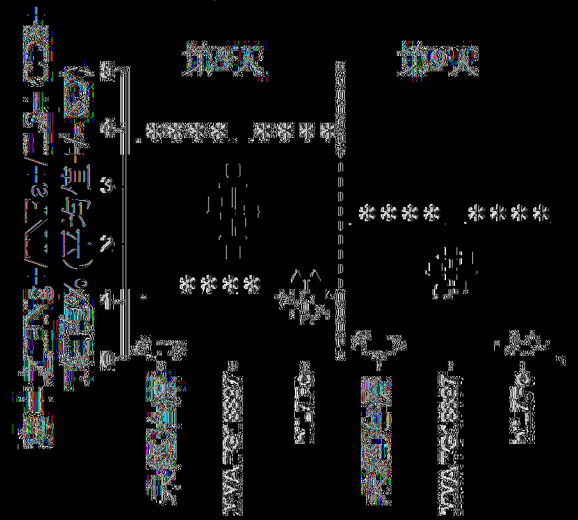
29C IFNγ/TNFα CD8+ T細胞



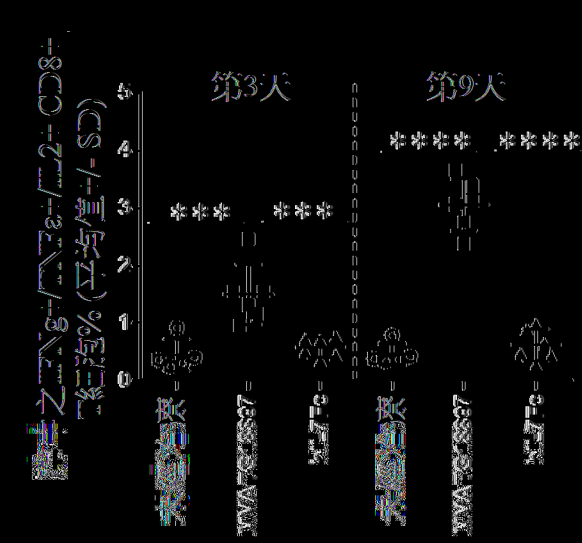
29D IFNγ/TNFα CD8+ T細胞



29E IFNγ/TNFα/IL2 CD8+ T細胞



29F IFNγ/TNFα/IL2 CD8+ T細胞



[圖29]

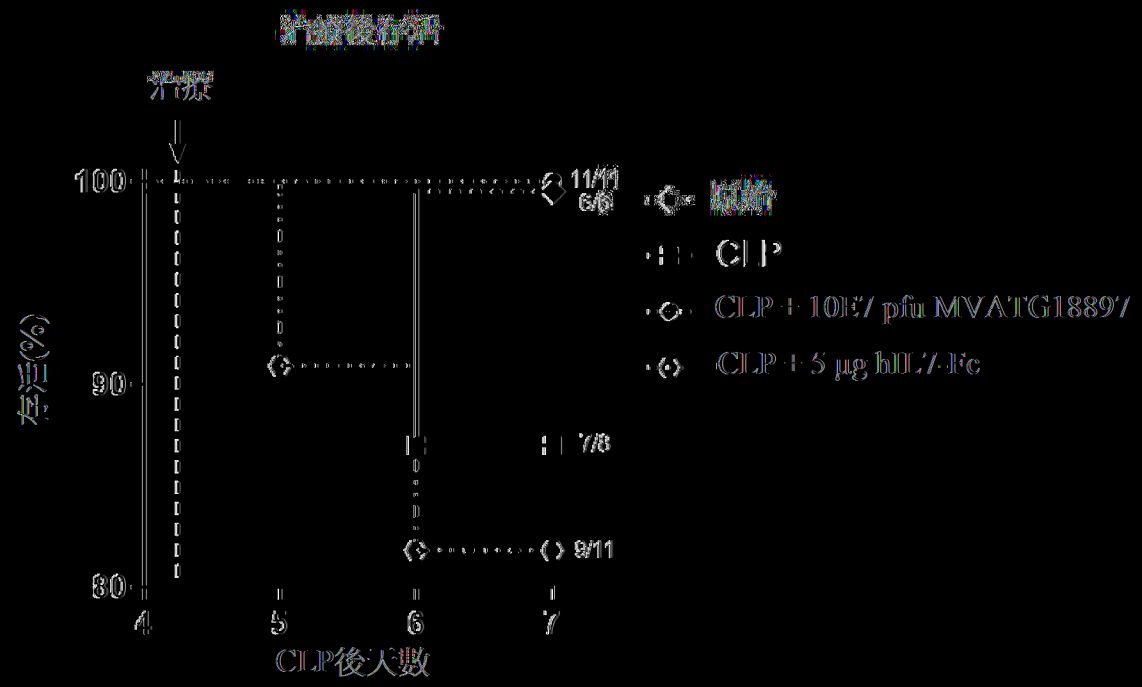
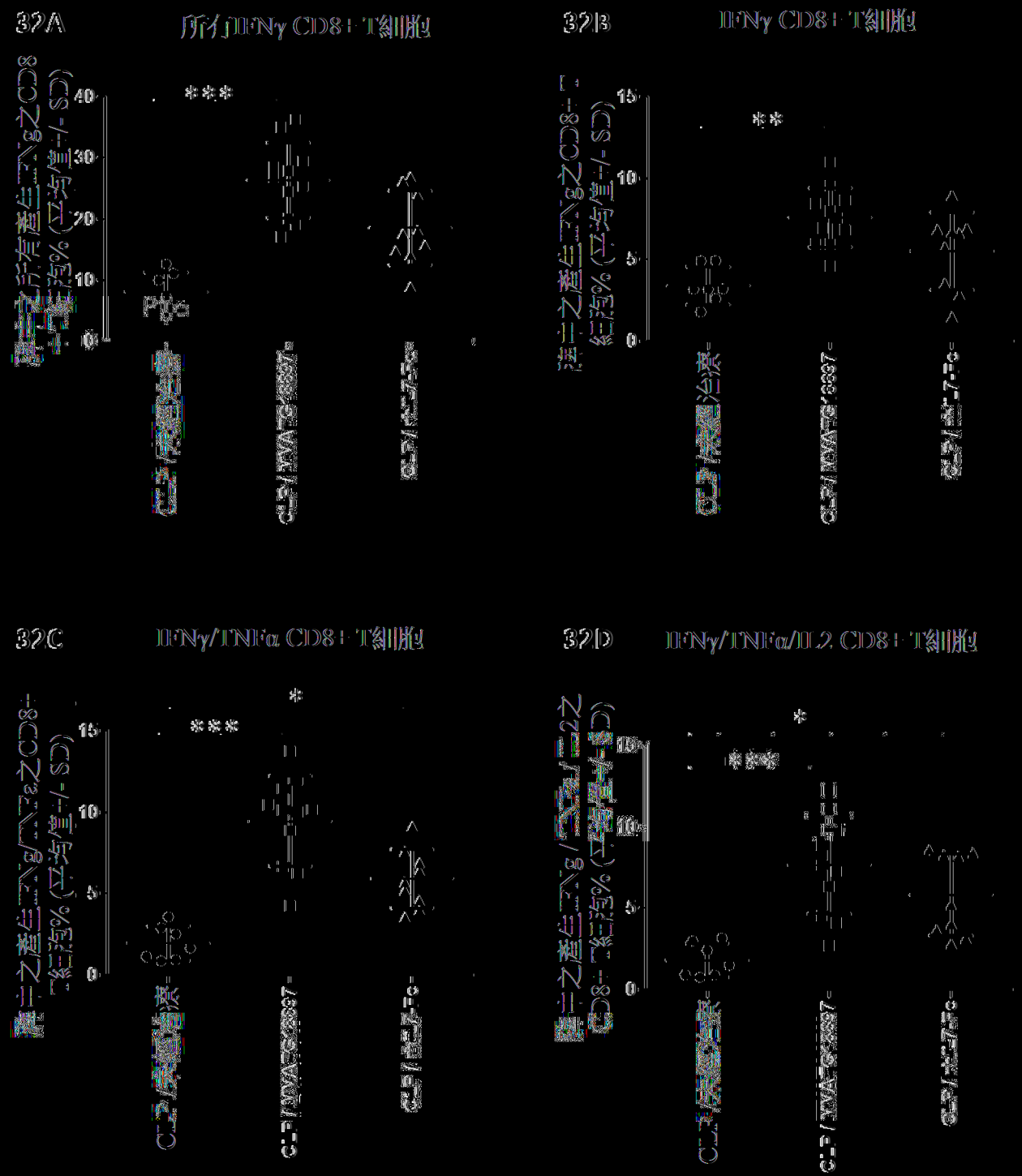

治療後存活
不治療
100
90
80
存活(%)
11/11
6/6
7/8
9/11
4
5
6
7
CLP後天數
假治療
CLP
CLP + 10E7 pfu MVATG18897
CLP + 5 μg hIL7-Fc

圖30

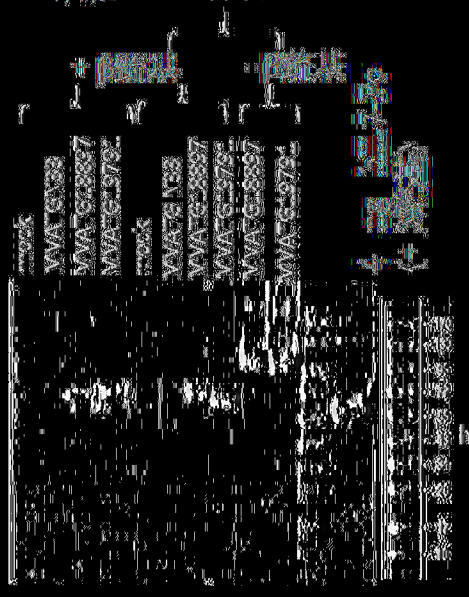
31A
CD69+ CD8+ T細胞中CD69+ 表現量 (GS 平均螢光強度)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
*
CD8 / 對照組
CD8 / IMA942 + 化療
CD8 / IMA942
31B
CD69+ CD4+ T細胞中CD69+ 表現量 (GS 平均螢光強度)
3
2
1
0
**
CD4 / 對照組
CD4 / IMA942 + 化療
CD4 / IMA942

圖31


32A
所有IFNγ CD8+ T細胞
***
32B
IFNγ CD8+ T細胞
**
32C
IFNγ/TNFα CD8+ T細胞
***
*
32D
IFNγ/TNFα/IL2 CD8+ T細胞
***
*

（圖32）

33A- CEF


細胞
上清液
+酶标二
-酶标二
MVA-GX
MVA-GX
MVA-GX

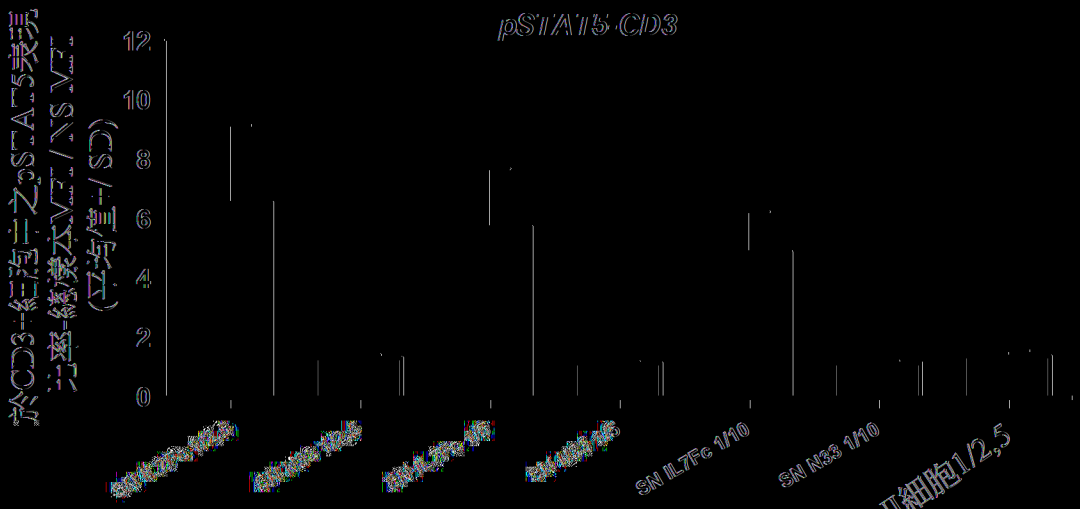

pSTAT5-CD3
抗CD3-結合ドメインによるSTAT5発現
(正常値 +/- SD)
12
10
8
6
4
2
0
SN IL7Fc 1/10
SN N33 1/10
SN NT細胞1/2.5

図34

35A

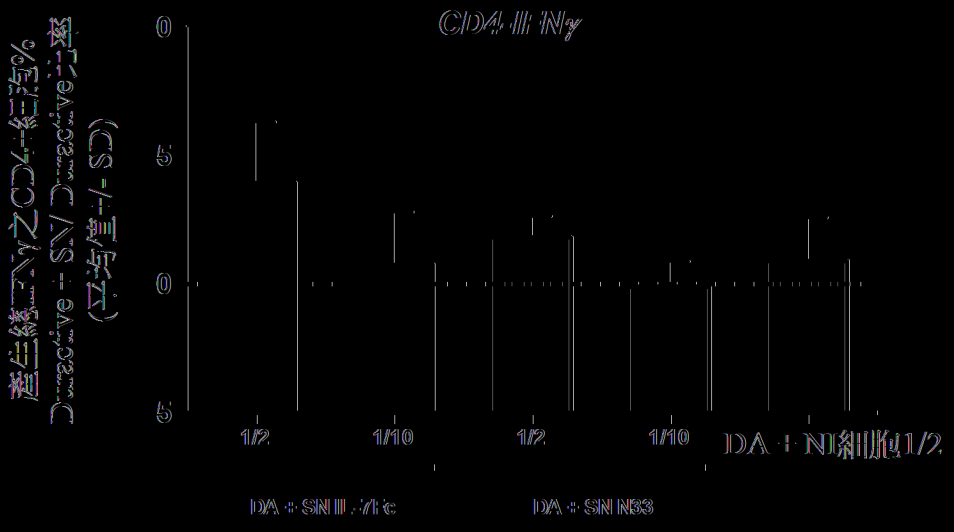
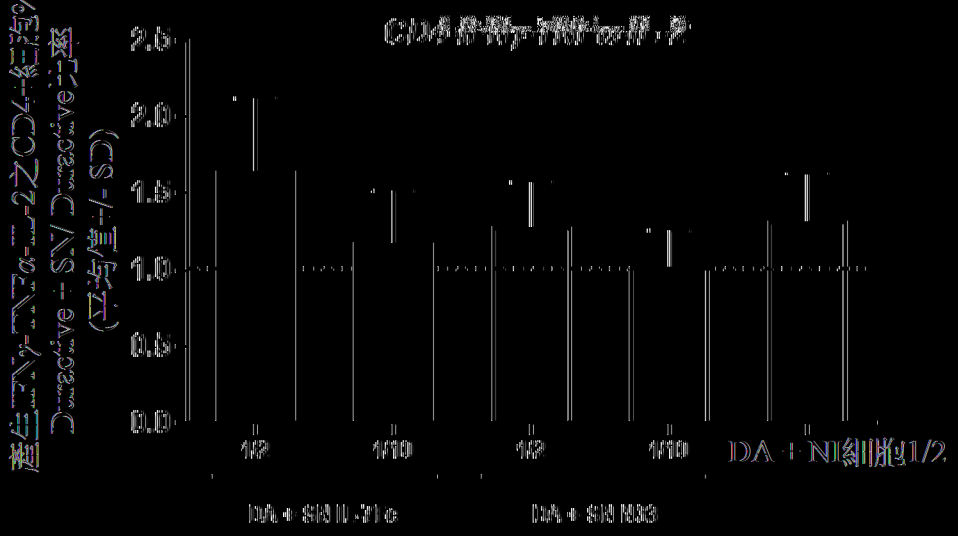
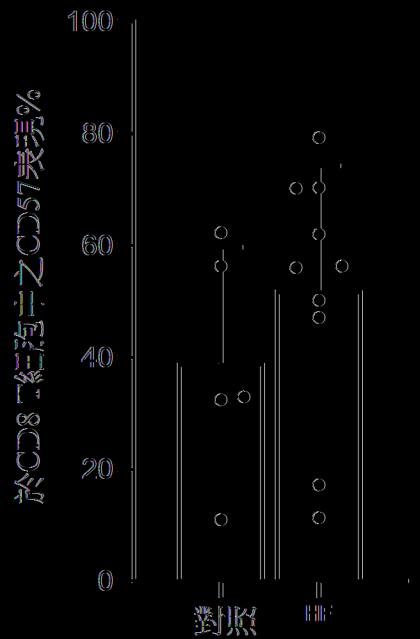

CD4-IFNγ
産生性IFNγ+ CD4+細胞%
Dysfunctive + SN/ Dysfunctive 正常
(CS +/- 正常値 SD)
0
5
0
5
1/2
1/10
1/2
1/10
DA + NT細胞1/2
DA + SN IL-7Fc
DA + SN N33

図35

35B

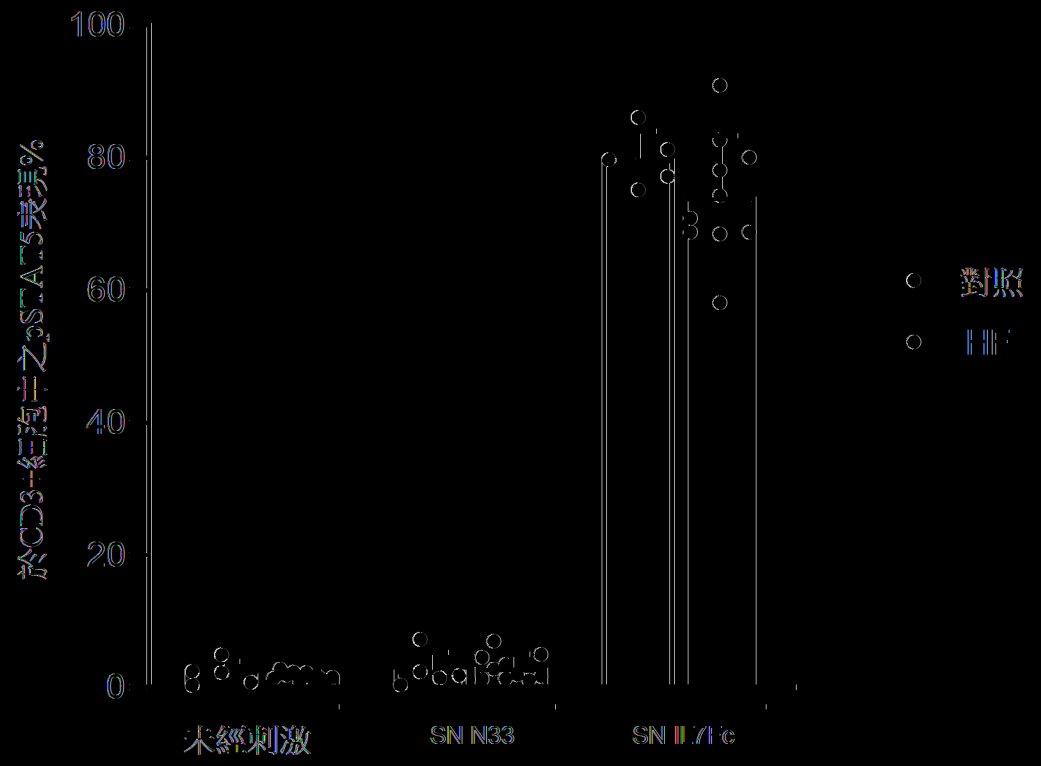


（図35）結

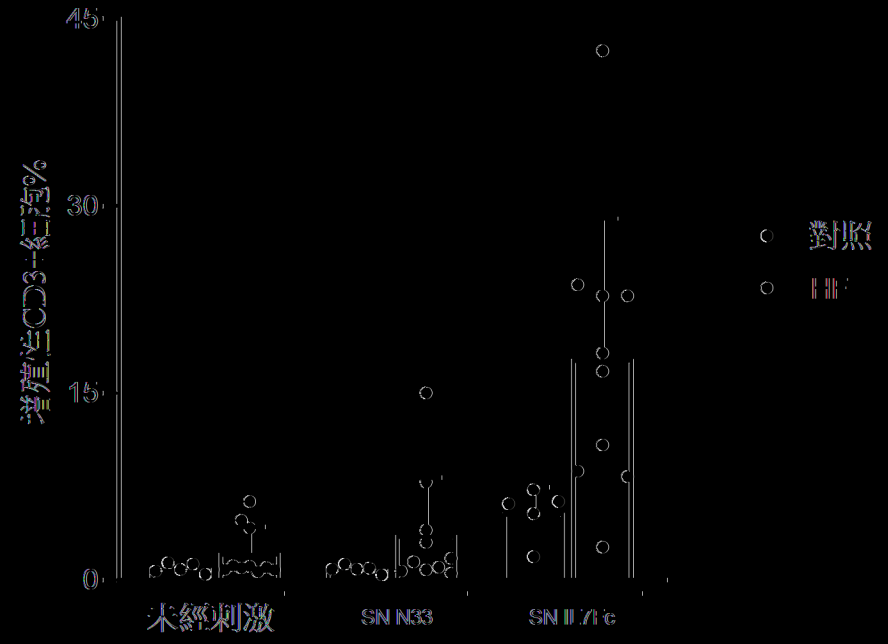


（図36）

3'/A

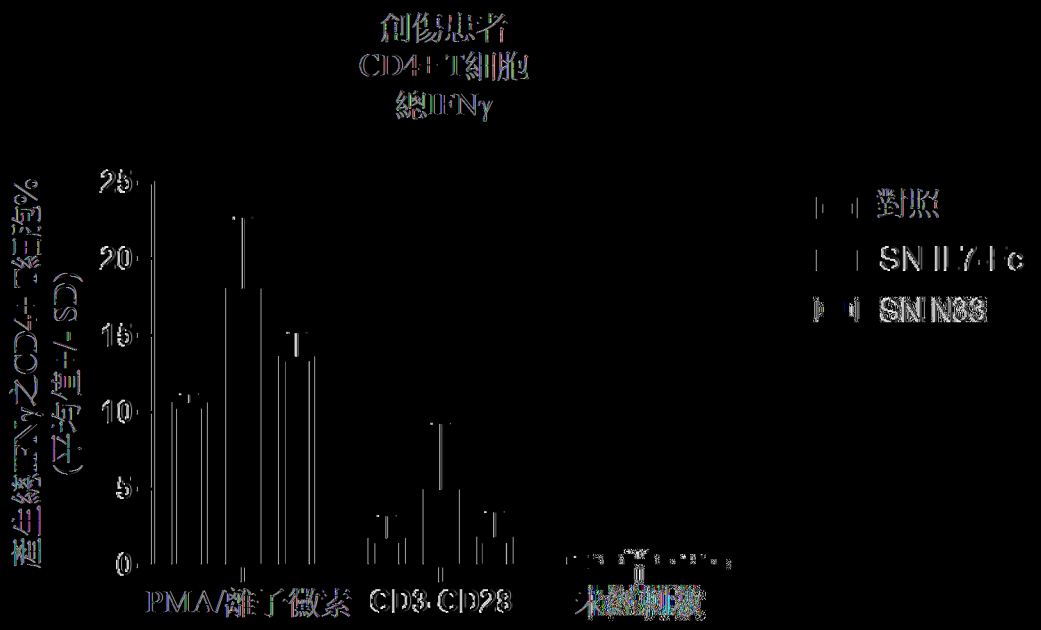


3'/B

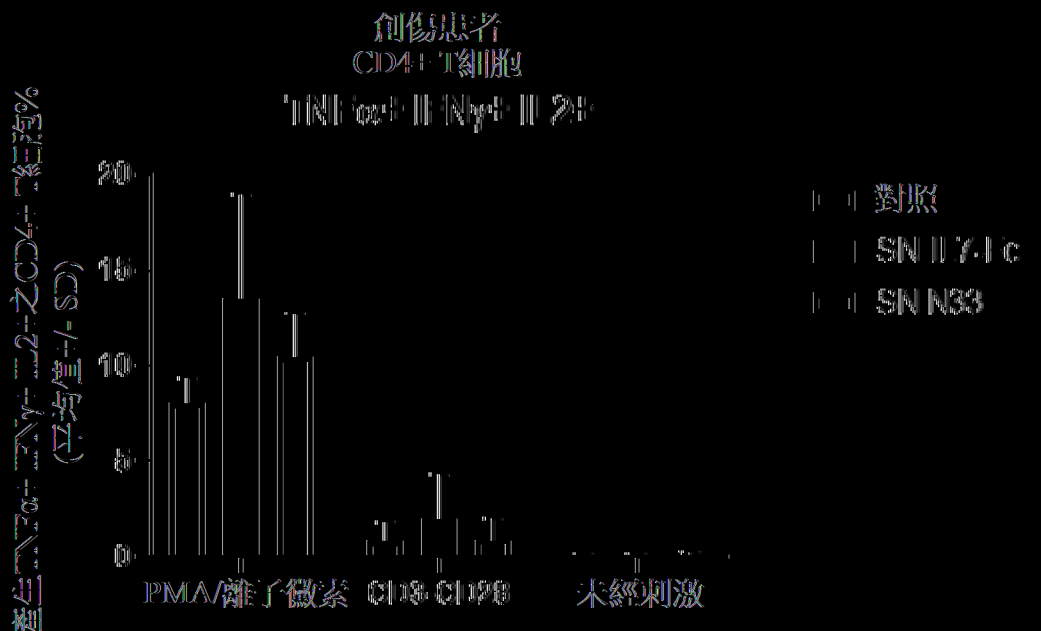


(圖3')

38A

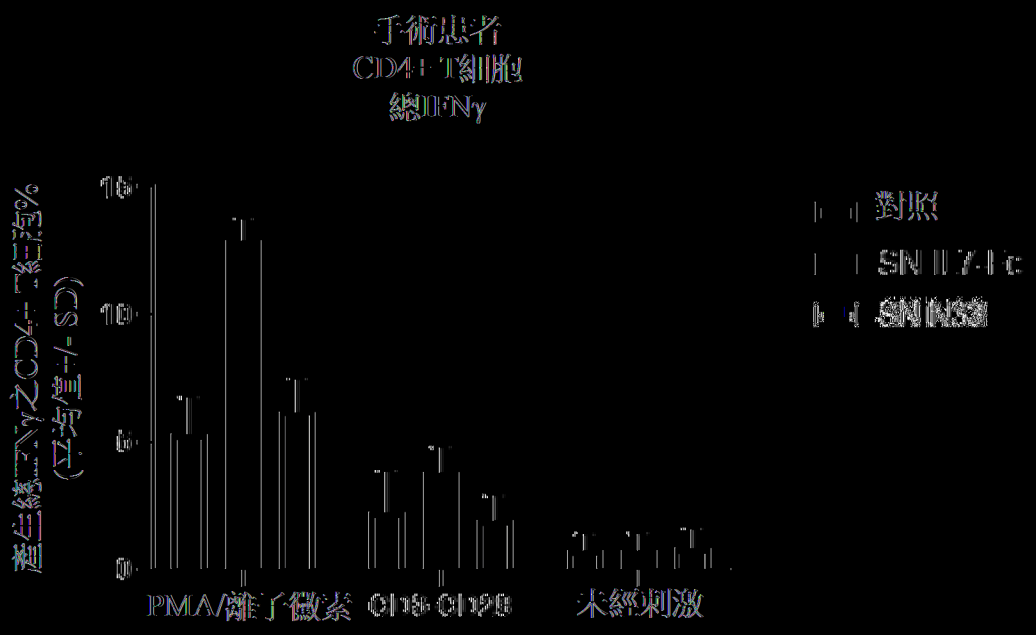

創傷患者
CD4+ T細胞
總IFNγ
細胞總IFNγ之CD4+ T細胞% (平均值+/- SD)
25
20
15
10
5
0
PMA/離子霉素
CD3-CD28
未經刺激
對照
SN II 7-1c
SN N33

38B

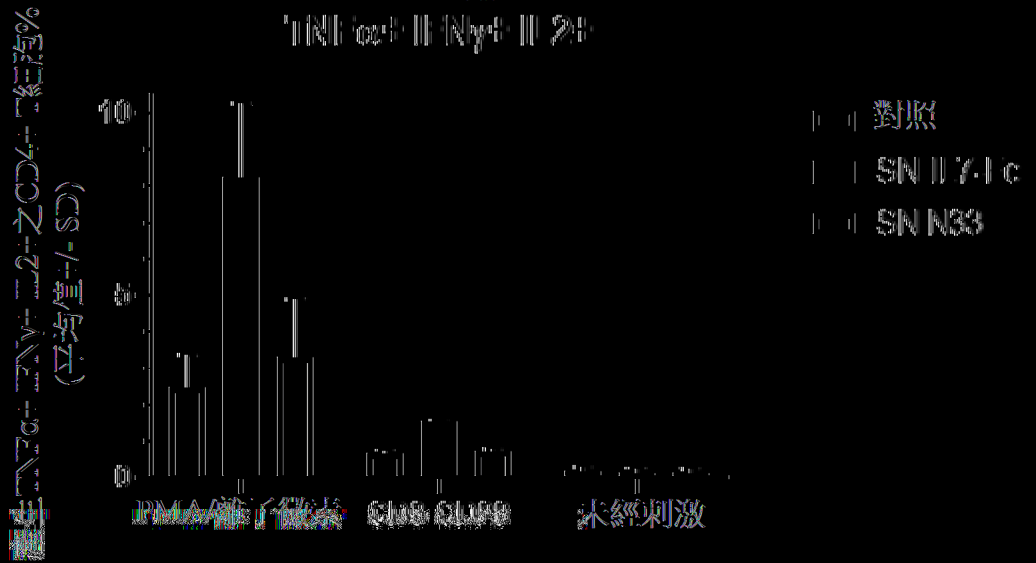

創傷患者
CD4+ T細胞
TNFα+ IFNγ+ IL2+
細胞TNFα+ IFNγ+ IL2+之CD4+ T細胞% (平均值+/- SD)
20
15
10
5
0
PMA/離子霉素
CD3-CD28
未經刺激
對照
SN II 7-1c
SN N33

圖(圖38)

39A


手術患者
CD4+ T細胞
總IFNγ
對照
SNI17-1c
SNN33
PMA/離子霉素
CD3-CD28
未經刺激

39B


手術患者
CD4+ T細胞
TNF-α+ IFNγ+ IL2+
對照
SNI17-1c
SNN33
PMA/離子霉素
CD3-CD28
未經刺激

（圖39）