

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97118468

C12N 7/01 (2006.01)

※ 申請日期：

97. 5. 20

※IPC 分類：

C12N 15/46 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

突變的呼腸弧病毒與製造及使用方法

A61K35/46 (2006.01)

MUTANT REOVIRUSES AND METHODS OF MAKING AND USING

A61P35/00 (2006.01)

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

腫瘤防治生化科技公司

Oncolytics Biotech Inc.

代表人：(中文/英文)

瑪莉 安 迪拉亨悌

DILLAHUNTY, MARY ANN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

加拿大 T2N 1X7 亞伯他省 卡加瑞市 肯辛頓西北路 1167 號 210 棟

Suite 210, 1167 Kensington Crescent NW, Calgary, Alberta T2N 1X7,

CANADA

國 籍：(中文/英文)

加拿大 / CANADA

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 麥修 C. 卡非 / COFFEY, MATTHEW C.

2. 布萊德里 G. 湯普森 / THOMPSON, BRADLEY G.

國 籍：(中文/英文)

1.2. 加拿大 / CANADA

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國、2007.05.21、60/939,255

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

相關申請案的交互參照

本發明主張於 2007 年 5 月 21 日提出申請之美國臨時申請案第 60/939,255 號的優惠。

【發明所屬之技術領域】

本申請案係關於突變的呼腸弧病毒、包括突變的呼腸弧病毒的組成物和使用如此突變的呼腸弧病毒的方法。

【先前技術】

背景

呼腸弧病毒要建立有效的感染能力則必須將其外表的蛋白殼 (capsid) 蛋白質水解。蛋白質水解會將病毒體 (virion) 轉換成稱為中間體亞病毒體 (infectious subviral particle, ISVP) 的形式，其具有穿過細胞膜的能力，因而有得到病毒基因表現所需之細胞質成分的機會。也可以在試管內對完整的呼腸弧病毒病毒體進行局部的蛋白質水解來產生 ISPV，其係使用蛋白酶例如胰凝乳蛋白酶或胰蛋白酶。參見例如 Golden et al. (2002, J. Virol., 76:7430-43) 以及 Chandran & Nibert (1998, J. Virol., 72:467-75)。

【發明內容】

概要

本揭示描述了突變的呼腸弧病毒，該病毒缺少或展現出表現降低之西格馬 3 (sigma3) 多肽或缺少有功能性的西格馬 3 多肽。本文所描述的突變的呼腸弧病毒可用來產生以及穩定增殖 ISPV。

所描述的突變的呼腸弧病毒含有降低西格馬 3 多肽表現、實質上消除了西格馬 3 多肽的表現、或導致缺少有功能性的西格馬 3 多肽之第一個突變。該第一個突變可以是在編碼有西格馬 3 多肽的核酸中，或是在調控西格馬 3 多肽表現之核酸中。在一些例子中，該核酸是 S4 基因。代表性的突變包括基因工程改造的取代和基因工程改造的插入或剔除一或更多核苷酸。典型的，該第一個突變會降低西格馬 3 多肽的表現至少 30%。

本文所描述的突變的呼腸弧病毒可包括一或更多進一步的突變。該或該些進一步的突變可以是減少繆 1 (mu1) 多肽表現、實質上消除了繆 1 多肽的表現、或者會導致有功能的繆 1 多肽缺少的突變；減少拉目達 2 (lambda2) 多肽表現、實質上消除了拉目達 2 多肽的表現、或者會導致有功能的拉目達 2 多肽缺少的突變；及/或減少西格馬 1 (sigma1) 多肽表現、實質上消除了西格馬 1 多肽的表現、或者會導致有功能的西格馬 1 多肽缺少的突變。

本發明也提供了經基因工程改造的呼腸弧病毒感染性亞病毒顆粒 (ISVP)。這種呼腸弧病毒 ISVP 可以被基因工程改造而展現出降低的西格馬 3 多肽的表現、缺乏西格馬 3 多肽的表現、或表現無功能的西格馬 3 多肽。本文所描述的呼腸弧病毒 ISVP 可以被基因工程改造而含有第一個突變。該第一個突變可以是在編碼有西格馬 3 多肽的核酸中，或是在調控西格馬 3 多肽表現的核酸中。在一些例子中，該核酸是 S4 基因。代表性的突變包括取代和插入

或剔除一或更多核苷酸。典型的，該第一個突變會減少西格馬 3 多肽的表現至少 30%。

本文所述的突變的呼腸弧病毒可包括一或更多進一步的突變。該或該些進一步的突變可以是減少繆 1 多肽表現、實質上消除了繆 1 多肽的表現、或者會導致有功能的繆 1 多肽缺少的突變；減少拉目達 2 多肽表現、實質上消除了拉目達 2 多肽的表現、或者會導致有功能的拉目達 2 多肽缺少的突變；及/或減少西格馬 1 多肽表現、實質上消除了西格馬 1 多肽的表現、或者會導致有功能的西格馬 1 多肽缺少的突變。

本發明提供了製造具有增強之感染性的呼腸弧病毒的方法。此種呼腸弧病毒的製造可以藉由將最初的呼腸弧病毒突變來產生突變的呼腸弧病毒，其中該突變的呼腸弧病毒展現出西格馬 3 多肽的表現減少、缺乏西格馬 3 多肽的表現、或表現無功能的西格馬 3 多肽，並且分離該突變的呼腸弧病毒，其中該突變的呼腸弧病毒比最初的呼腸弧病毒具有增強的感染性。感染性增強可以藉由可被突變的呼腸弧病毒所感染之瘤細胞範圍增加（其係相較於最初的呼腸弧病毒），或者藉由被突變的呼腸弧病毒所感染之細胞數目增加（其係相較於最初的呼腸弧病毒）而證明。

本發明也提供了得到經基因工程改造之呼腸弧病毒感染性亞病毒顆粒（ISVP）的方法。此方法包含將最初的呼腸弧病毒基因工程改造以展現出降低的西格馬 3 多肽的表現、缺乏西格馬 3 多肽的表現、或表現無功能的西格馬 3

多肽；培養該基因工程改造之呼腸弧病毒，以及分離 ISVP，因此得到經基因工程改造的呼腸弧病毒 ISVP。

本發明進一步提供的是治療個體的增殖性病症的方法。此治療方法包含給藥給該個體本文所描述的突變的呼腸弧病毒或本文所描述之經基因工程改造的呼腸弧病毒 ISVP。此方法也可以包含至少一個選自手術、化學治療、放射線治療、以及免疫抑制治療的程序。

本發明提供了醫藥組成物，其包含本文所描述的突變的呼腸弧病毒或本文所描述之經基因工程改造的呼腸弧病毒 ISVP。此醫藥組成物可進一步包含一或更多化學治療劑及/或一或更多免疫抑制劑。

本發明也提供了西格馬 3 多肽，其包含了會造成西格馬 3 多肽不會併入病毒蛋白殼或是會使併入蛋白殼的量減少的突變。

除非另有定義，否則本文所用的專門和科學術語是與在本領域中具有一般知識的人所通常理解的該方法和組成物所屬的意義相同。雖然在本方法和組成物實施或實驗時也可以使用與本文所述相似或均等的方法和材料，但是適合的方法和材料描述如下。此外，該材料、方法、和例子係僅作為說明，並非作為限制。所有的出版品、專利申請案、專利、以及其他本文所提及的參考資料都以其全文被併入作為參考。

【實施方式】

發明詳述

本文係描述缺乏或展現出西格馬 3 多肽的表現降低、或缺少功能性西格馬 3 多肽的突變的呼腸弧病毒。除了在編碼或調控西格馬 3 多肽的核酸中有突變，本文所述的突變的呼腸弧病毒也在一或更多其他的外蛋白殼蛋白質中有進一步的突變。本文所述的突變的呼腸弧病毒可用來製造中間體亞病毒體（ISVP），其可穩定的多重繼代培養增殖成 ISVP。相較於呼腸弧病毒本身，ISVP 典型的展現了增加的感染性及/或降低的致免疫性，但是 ISVP 典型的缺乏穩定的繁殖能力。相反的，藉由突變的呼腸弧病毒所產生的 ISVP 證明了有多重複製的穩定繁殖，不像酵素處理或類似方式所製造的 ISVP。

突變的呼腸弧病毒以及製造方法

本文所述的突變的呼腸弧病毒可含有會降低或實質上消除西格馬 3 多肽表現、或導致缺乏功能性西格馬 3 多肽的第一突變。消除西格馬 3 多肽表現、或導致缺乏功能性西格馬 3 多肽的突變可以是在編碼西格馬 3 多肽（即 S4 基因）的核酸中，或是在編碼調控西格馬 3 多肽表現或功能的多肽的核酸中。

該西格馬 3 多肽的長度是 365 個胺基酸，以及分子量是 41 kDa。完整的病毒體含有 600 個複本的西格馬 3 多肽。西格馬 3 多肽很可能與其他的外蛋白殼蛋白質作用，包括例如繆 1、拉目達 2、和西格馬 1，而且也在 RNA 選取或 RNA 包裝中扮演一角。呼腸弧病毒病毒體的影像顯示該西格馬 3 多肽就像是手指突出於病毒體的表面，並且係貢獻

了大多數的病毒體密度。參見圖 1。

在本文中，降低西格馬 3 多肽表現的突變是指會導致西格馬 3 多肽含量減少至少 30% 的突變（例如至少 40%、50%、60%、70%、80%、90%、或 95%），係相較於表現野生型含量之西格馬 3 多肽的呼腸弧病毒。在本文中，實質上消除西格馬 3 多肽表現的突變是指會導致西格馬 3 多肽含量減少至少 95% 的突變（例如 96%、97%、98%、99%、或 100%），係相較於野生型呼腸弧病毒所產生的西格馬 3 多肽含量。在本文中，會導致減少或缺乏功能性西格馬 3 多肽的突變是指可以表現西格馬 3 多肽的突變，但是該西格馬 3 多肽無法組裝或併入病毒蛋白殼中。吾人可理解該西格馬 3 多肽保留其他功能（例如與 RNA 結合的能力）是令人滿意或需要的，以使得突變的呼腸弧病毒保留繁殖的能力。

本文所述的西格馬 3 多肽中的突變會使得併入蛋白殼的西格馬 3 多肽含量比沒有該突變的西格馬 3 多肽（例如野生型的西格馬 3 多肽）少。本文所述的西格馬 3 多肽中的突變也會使得西格馬 3 多肽無法併入病毒蛋白殼中。不被任何特定機制所限制，西格馬 3 多肽可例如因為西格馬 3 多肽和繆 1 多肽不能適當的結合或因為構形改變而降低或抑制西格馬 3 多肽併入蛋白殼中而具有降低的功能或缺乏功能。

根據本揭示之突變的呼腸弧病毒可以是第 3 型哺乳動物正呼腸弧病毒（orthoreovirus）。第 3 型哺乳動物正呼

腸弧病毒包括（不限於）Dearing 和 Abney 株（分別是 T3D 或 T3A）。參見例如 ATCC 編號 VR-232 和 VR-824。本文所述的突變的呼腸弧病毒可含有自發產生的突變或經基因工程改造而產生的突變。例如，天然生成的呼腸弧病毒（例如分離自天然來源例如病患）可以被突變或可以產生不會表現西格馬 3 多肽或缺乏功能性西格馬 3 多肽的重組呼腸弧病毒（參見例如美國專利第 7,163,678 號）。應注意在 S4 基因帶有突變的呼腸弧病毒例如 Clark 等人(2006, *J. Virol.*, 80:671-81)、Ebert 等人(2001, *J. Virol.*, 75:3197-206)以及 Wetzel 等人(1997, *J. Virol.*, 71:1362-9)所述的並非本發明之突變株的一部分並且被排除在本發明的突變株之外，因為這些突變株被認為會表現出有功能性的西格馬 3 多肽。

本文所說的突變可以是取代或插入或刪除一或更多核苷酸。點突變包括例如單一核苷酸的轉換（嘌呤變嘌呤或嘧啶變嘧啶）或置換（嘌呤變嘧啶或反之亦然）以及單-或多-核苷酸刪除或插入。核酸中的突變會導致所編碼的多肽中有一或更多的保守性或非保守性胺基酸取代，因而可造成構形改變或缺少或部分缺少功能、轉譯讀框的移動（框架移動）導致從該點編碼產生完全不一樣的多肽、過早的停止密碼導致截短的多肽（截短）、或呼腸弧病毒核酸中的突變可能根本不會改變所編碼的多肽（沉默或無意義）。參見例如 Johnson & Overington, 1993, *J. Mol. Biol.*, 233:716-38; Henikoff & Henikoff, 1992, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 89:10915-19; 以及美國專利第 4,554,101 號揭示了保守性和非保守性胺基酸取代。

可以用技藝中已知的任何數量的方法在呼腸弧病毒的核酸中製造出突變。例如，可以用定點突變來改變呼腸弧病毒的核酸序列。最常見的定點突變的方法之一是寡核苷酸定點突變。在寡核苷酸定點突變中，將編碼有想要的改變序列的寡核苷酸黏合到感興趣的 DNA 單股上並且作為起始 DNA 合成的引子。用這個方法，則含有改變序列的寡核苷酸會被併入新合成的股中。參見例如 Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488; Kunkel et al., 1987, Meth. Enzymol., 154:367; Lewis & Thompson, 1990, Nucl. Acids Res., 18:3439; Bohnsack, 1996, Meth. Mol. Biol., 57:1; Deng & Nickoloff, 1992 Anal. Biochem., 200:81; 以及 Shimada, 1996, Meth. Mol. Biol., 57:157。技藝中常用其他的方法來改變蛋白質或多肽的序列。例如，可以用 PCR 或化學合成來產生含有突變的核酸，或者可以化學合成出具有想要之胺基酸序列改變的多肽。參見例如 Bang & Kent, 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:5014-9 及其中的參考資料。

除了會破壞或減少西格馬 3 多肽表現的突變或者會產生無功能性或功能降低之西格馬 3 多肽的突變，本文所述之突變的呼腸弧病毒也可以在其他的呼腸弧病毒蛋白殼多肽（例如繆 1、拉目達 2、及/或西格馬 1）之一中包含一或更多進一步的突變（例如第二、第三、或第四個突變）。

含有會影響西格馬 3 多肽之突變以及視需要的在任何或所有其他外蛋白殼蛋白中有進一步突變的呼腸弧病毒可以藉由此種突變的呼腸弧病毒有感染和造成細胞溶解的能力來篩選出。例如，不會被野生型呼腸弧病毒溶解的瘤細胞可被用來篩選本文所述的突變的呼腸弧病毒。

例如，進一步的突變可以降低或實質上消除繆 1 多肽的表現或造成功能性繆 1 多肽缺乏。該繆 1 多肽是由 M2 基因所編碼的，很可能涉及細胞穿透並且在轉錄酶活化中扮演一角。各個病毒體含有約 600 個複本的繆 1 多肽，是與西格馬 3 多肽以 1:1 的複合物形式存在。該繆 1 多肽在其 N 端有被豆蔻酸醯化，然後豆蔻酸醯化的 N 端 42 個殘基被切除，得到 C 端的片段（繆 1C）。此外或或者，進一步的突變可以減少或實質上消除拉目達 2 多肽的表現或造成功能性拉目達 2 多肽缺乏，及/或進一步的突變可減少或實質上消除西格馬 1 多肽的表現或造成功能性西格馬 1 多肽缺乏。拉目達 2 多肽是由 L2 基因所編碼的且涉及顆粒的組裝，以及展現了鳥苷酸基轉移酶和甲基轉移酶的活性。西格馬 1 多肽是由 S1 基因所編碼的並且涉及細胞附著以及作為病毒血球凝集素。

來自呼腸弧病毒顆粒的核酸可以用標準的市售核酸方法分離。也參見例如 Schiff et al., "Orthoreoviruses and Their Replication," Ch 52, in Fields Virology, Knipe & Howley, eds., 2006, Lippincott Williams & Wilkins。在本文中，分離的核酸是指分離自它們原本連接的其他核酸的核酸。所

以，分離的核酸包括（不限於）實質上沒有非呼腸弧病毒（例如宿主細胞）核酸的呼腸弧病毒核酸，或實質上沒有與其他基因片段相關之核酸的呼腸弧病毒基因片段。此外，分離的核酸可包含經工程改造的核酸例如重組或合成的核酸。

本文所述的突變的呼腸弧病毒可以用技藝中已知的方法藉由重新構成基因片段來產生，其含有至少第一個會影響西格馬 3 多肽的突變，會產生有感染性的亞病毒顆粒（ISVP；例如經基因工程改造的 ISVP）。參見例如 Schiff et al., “Orthoreoviruses and Their Replication,” Ch 52, in Fields Virology, Knipe & Howley, eds., 2006, Lippincott Williams & Wilkins; Smith et al., 1969, Virology, 39(4):791-810; 以及美國專利第 7,186,542、7,049,127、6,808,916、和 6,528,305 號。也可以藉由表現呼腸弧病毒的基因片段來產生突變的呼腸弧病毒，其係用質體反向基因系統來產生 ISPV。參見例如 Kobayashi et al., 2007, Cell Host & Microbe, 1:147-57。在本文中，經基因工程改造或突變的 ISVP 是突變的呼腸弧病毒，且係指由呼腸弧病毒所產生的 ISVP，其帶有經基因工程改造或自發產生的會影響至少西格馬 3 多肽的突變。本文所述的 ISVP 是穩定的而且可以增殖成 ISVP 進行多重（例如大於一，例如 2、3、4、5、10、20、50、或更多）繼代培養。

經由基因工程改造 ISVP 或經由質體反向基因系統產生的本文所述的突變的呼腸弧病毒可被培養在例如人類瘤

細胞或 L929 鼠纖維母細胞中。本文所述的突變的呼腸弧病毒可以被培養在只容許缺少西格馬 3 多肽的呼腸弧病毒株的細胞中。利用此種細胞系來繼代培養本文之突變的呼腸弧病毒可容許選取突變以及也可以用來減少或防止突變回復。

可以用標準方法來純化突變的呼腸弧病毒。參見例如 Schiff et al., "Orthoreoviruses and Their Replication," Ch 52, in Fields Virology, Knipe & Howley, eds., 2006, Lippincott Williams & Wilkins; Smith et al., 1969, Virology, 39(4):791-810; 以及美國專利第 7,186,542、7,049,127、6,808,916、和 6,528,305 號。可以使用親和層析法，用例如針對西格馬 3 多肽的抗體來移除含有西格馬 3 多肽的呼腸弧病毒，以及讓缺乏西格馬 3 多肽的突變株流出。在本文中，純化的突變呼腸弧病毒係指從天然伴隨之細胞成分中分離出來的呼腸弧病毒。典型的，當呼腸弧病毒至少是 70%（例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、或 99%）的乾重時，則認為呼腸弧病毒被純化了，不含它們天然相關之蛋白質或其他細胞成分。

相較於未突變的呼腸弧病毒（例如對照組呼腸弧病毒），本文所述的突變的呼腸弧病毒展現了增加的感染性及/或降低的致免疫性，並且可以根據這個特性來選取。增加的感染性可藉由被突變的呼腸弧病毒感染的瘤細胞範圍增加及/或細胞數目增加來證明，其係相較於表現功能性西格馬 3 多肽的呼腸弧病毒（例如完整的病毒體；例如野生

型呼腸弧病毒)。突變的呼腸弧病毒之降低的致免疫性可以藉由此種突變的呼腸弧病毒無法引發個體顯著的免疫反應來證明。本文中突變的呼腸弧病毒也可以篩選或選取其他想要的特性，包括但不限於較快的複製速度、較快的組裝速度、引發細胞死亡的能力、影響溶解和有效殺死人類腫瘤細胞系的能力、釋放有效的腫瘤抗原決定基的能力、與標準化學治療的交互作用、以及病毒後代數量增加。此外，突變的呼腸弧病毒可以用溶解受感染之瘤細胞的能力來做選取（例如哺乳動物細胞具有活化的 Ras 路徑）。參見例如美國專利第 7,052,832 號。

使用具有經改造之序列的呼腸弧病毒的方法

如先前所述（參見例如美國專利第 6,110,461、6,136,307、6,261,555、6,344,195、6,576,234、以及 6,811,775 號），呼腸弧病毒利用宿主細胞的 Ras 路徑機制來向下調控雙股 RNA 活化的蛋白質激酶（PKR）並因此在細胞中複製。基於這些發現，開發出了使用呼腸弧病毒來治療哺乳動物例如鼠、狗、貓、綿羊、山羊、牛、馬、豬、非人類靈長動物、以及人類增殖性病症的方法。本文所述的突變的呼腸弧病毒可用來治療個體的增殖性病症。

增殖性病症是細胞增殖快於正常組織生長的任何細胞病症。因此增殖細胞是指增殖快於正常細胞的細胞。增殖性病症包括但不限於瘤，又稱為腫瘤。瘤可包含但不限於胰臟癌、乳癌、腦癌（例如神經膠母細胞瘤）、肺癌、前列腺癌、結腸直腸癌、甲狀腺癌、腎臟癌、腎上腺癌、肝

癌、神經纖維瘤病 1、以及白血病。瘤可以是固態瘤（例如肉瘤或癌）或是影響造血系統的癌生長（例如淋巴瘤或白血病）。其他的增殖性病症包括但不限於神經纖維瘤病。

通常，用呼腸弧病毒來治療的增殖性病症至少都有一些增殖細胞具有突變，使得 Ras 基因（或 Ras 訊息傳導路徑成分）活化，直接（例如藉由活化突變 Ras）或間接（例如藉由活化 Ras 路徑的上游或下游成分）的。活化 Ras 路徑的上游成分包含例如用表皮生長因子受體或 Sos 來轉換。參見例如 Wiessmuller & Wittinghofer, 1994, Cellular Signaling, 6(3):247-267；以及 Barbacid, 1987, Ann. Rev. Biochem., 56, 779-827。活化 Ras 路徑的下游成分包含例如在 B-Raf 突變。參見例如 Brose et al. (2002, Cancer Res., 62:6997-7000)。此外，呼腸弧病毒可用來治療 PKR 突變或調控不良所造成的增殖性病症。參見例如 Strong et al. (1998, EMBO J., 17:3351-62)。

本文所述的突變的呼腸弧病毒可以被投藥給患有增殖性病症的哺乳動物。在本文中，投藥是指遞送突變的呼腸弧病毒（例如 ISVP），使得突變的呼腸弧病毒與增殖細胞接觸。投藥突變的呼腸弧病毒的途徑是取決於病症的種類和增殖細胞的位置。有許多投藥的途徑可以被使用，而下面所提供的只是作為例示並非作為限制。

對固態瘤來說，例如，可以藉由包含直接注射到腫瘤或注射、注入或類似方法全身性投藥（例如經靜脈）的方法投藥。對於造血瘤，例如，可以靜脈或血管內投藥突變

的呼腸弧病毒。對於轉移瘤或者像是腦癌的瘤來說，例如，可以用使突變的呼腸弧病毒全身性運送（例如腦脊髓膜內、靜脈、或肌肉內）的方法來投藥。突變的呼腸弧病毒也可以經由皮下、腹膜內（例如卵巢癌）、局部（例如黑色素瘤）、經口（例如口腔癌或食道癌）、直腸（例如結腸直腸癌）、陰道（例如子宮頸癌或陰道癌）、經鼻或藉由吸入噴霧（例如肺癌）投藥。突變的呼腸弧病毒也可以藉由大於一種途徑及/或大於個體一處投藥。

本文所述的突變的呼腸弧病毒是投藥足以治療增殖性病症的量（例如有效量）。當投藥突變的呼腸弧病毒到增殖細胞會影響細胞溶解，使得增殖細胞數目降低、瘤尺寸變小、及/或與增殖性病症有關的症狀（例如疼痛）減少或消除，則增殖性病症被治療。在本文中，瘤崩解（oncolysis）係指至少 10% 的增殖細胞溶解（例如至少約 20%、30%、40%、50%、或 75% 的細胞溶解）。溶解的比例可以藉由例如測量瘤尺寸的減少或哺乳動物中增殖細胞數目減少、或測量試管內細胞溶解的量（例如增殖細胞的生物檢體）來決定。

突變的呼腸弧病毒的有效量係依照個體來決定的，而且可以取決於（至少部分）所用的特定突變呼腸弧病毒；個體大小、年齡、性別；以及增殖細胞的尺寸和其他特性。例如，治療人類時，可以使用大約 10^3 到 10^{12} 個菌斑生成單位（PFU）的突變的呼腸弧病毒，取決於當時增殖細胞或瘤的種類、尺寸、和數目。有效量可以是例如從約 1.0 PFU/

公斤體重到約 10^{15} PFU/公斤體重（例如從約 10^2 PFU/公斤體重到約 10^{13} PFU/公斤體重）。突變的呼腸弧病毒可以單一劑量或多重劑量（例如二、三、四、六、或更多劑量）投藥。多重劑量可以同時或先後（例如在數天或數週的期間內）投藥。用突變的呼腸弧病毒可以維持數天到數個月或直到達成該疾病減輕。

本發明涵蓋了本文所述的突變的呼腸弧病毒可以與手術或移除增殖細胞（例如瘤）合併投藥。也涵蓋了突變的呼腸弧病毒可以與放射線治療合併投藥。進一步涵蓋了突變的呼腸弧病毒可以與抗癌化合物、化學治療劑、及/或免疫抑制劑合併投藥。這些藥劑包括但不限於 5-氟尿嘧啶、絲裂黴素 C、甲氨喋呤、羥基尿素、吉西他濱、環磷醯胺、達卡巴嗪、米托蒽醌、蒽環類（例如表柔比星和多柔比星）、微管蛋白安定劑（例如長春花生物鹼（vinca alkaloids））、受體例如 HERCEPTIN®（加州南舊金山的 Genentech）的抗體、依托泊甙（etoposide）和 pregnasome、鉑化合物例如卡鉑和順鉑、紫杉醇類例如 TAXOL®（紐約州紐約的 Bristol-Myers Squibb）和 TAXOTERE®（法國安東尼的 Rhone-Poulenc Rorer SA）、荷爾蒙治療例如他莫昔芬（tamoxifen）和抗雌激素、干擾素、芳香酶抑制劑、助孕劑和 LHRH 類似物。也涵蓋了本文所述的突變的呼腸弧病毒可以與血管通透劑例如（不限於）IL-2、TNF- α 、VEGF、AVASTIN®（Genentech）、和鬆弛素合併給藥。

醫藥組成物

提供了含有本文所述之突變的呼腸弧病毒的醫藥組成物。參見例如美國專利第 6,576,234 號。除了一或更多突變的呼腸弧病毒之外，醫藥組成物典型的還包含醫藥可接受的載劑。醫藥可接受的載劑可以是能作為突變的呼腸弧病毒的基礎物、載劑、或媒質的固體、半固體、或液體物質。所以，含有突變的呼腸弧病毒的組成物可以是錠劑、藥丸、粉末、菱形錠、小袋、膠囊、酏劑、懸浮劑、乳劑、溶液、糖漿、氣霧劑（固體或在液體媒質中）、含有例如高達 10 重量%的活性化合物的軟膏、軟或硬明膠膠囊、栓劑、無菌可注射溶液、和無菌包裝的粉末的形式。

合適的載劑的一些例子包含磷酸緩衝鹽類或另一種生理可接受的緩衝液、乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露糖醇、澱粉、阿拉伯樹膠、磷酸鈣、褐藻酸、黃蓍樹膠、白明膠、矽酸鈣、微晶纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、纖維素、無菌水、糖漿、和甲基纖維素。醫藥組成物可額外包含但不限於潤滑劑例如滑石、硬脂酸鎂、和礦物油；濕潤劑；乳化劑和懸浮劑；防腐劑例如羥苯甲酸甲酯和羥苯甲酸乙酯；甜味劑；以及風味劑。使用技藝中已知的方法，醫藥組成物可以被調配成提供在投藥後可快速、持續、或延遲釋放突變的呼腸弧病毒。除了下述代表性的調配物之外，其他用於醫藥組成物中的適合的調配物可以在 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003, Gennaro & Gennaro, eds., Lippincott Williams & Wilkens)中找到。

製造例如錠劑的固體組成物時，可以將突變的呼腸弧病毒與醫藥載劑混合形成固體組成物。視需要的，可以將錠劑或藥丸塗覆或用其他方式混合得到可提供長效作用優點的劑量形式。例如，錠劑或藥丸可包含內劑和外劑成分，後者是在前者的外層。這兩種成分可以被腸衣分開，腸衣是用來避免在胃中瓦解的，並且使內部成分能完整通過進入十二指腸或延遲釋放。有許多物質可被用來作為此腸衣或塗覆物，這類物質包含一些聚合酸以及聚合酸與例如蟲膠、鯨蠟醇、和醋酸纖維素的混合物。

用於口服或注射的包含突變的呼腸弧病毒液體組成物通常包含水溶液、適當調味的糖漿、水或油懸浮物、以及含食用油像玉米油、棉花籽油、芝麻油、椰子油、或花生油之經調味的乳劑，還有酏劑和相似的醫藥基礎劑。

吸入或吹氣組成物包含溶液和懸浮液，係在醫藥可接受的、水或有機溶劑或其混合物、以及粉末中。這些液體或固體組成物可包含本文所述的適合的醫藥可接受的賦形劑。這些組成物可藉由口或鼻呼吸的途徑投藥產生局部或全身性影響。在醫藥可接受之溶劑中的組成物可以用惰性氣體噴霧化。噴霧化的溶液可以直接從噴霧器中被吸入，或者可以將該噴霧器接到面罩或週期性正壓呼吸器上。溶液、懸浮液、或粉末組成物可以從可適當遞送調配物的裝置中經口或鼻投藥。

另一個可以用在本發明方法中的調配物係利用了皮膚遞送裝置（例如貼片）。這種皮膚貼片可用來提供持續或

間斷的注入本文所述之突變的呼腸弧病毒。用來遞送藥劑的皮膚貼片的製造和使用是技藝中所熟知的。參見例如美國專利第 5,023,252 號。這些貼片可以被製造用於持續、脈衝、或一經要求的遞送突變的呼腸弧病毒。

若需要的話，突變的呼腸弧病毒可以被包圍在脂質體或微胞中，以降低或防止在會對呼腸弧病毒產生免疫性的哺乳動物中的免疫反應。這些組成物被稱為免疫保護的呼腸弧病毒。參見例如美國專利第 6,565,831 和 7,014,847 號。此外，本文所述的突變的呼腸弧病毒（例如西格馬 3 多肽或功能缺乏或不足的呼腸弧病毒）可以用酵素來蛋白質水解以移除或部分移除任何出現的其他的蛋白殼蛋白。

突變的呼腸弧病毒或包含此突變的呼腸弧病毒的醫藥組成物可以被包裝成套組。本發明涵蓋了該套組也可包含一或更多化學治療劑、一或更多免疫抑制劑、及/或一或更多抗-抗呼腸弧病毒抗體。醫藥組成物可以被調配成單位劑量形式。術語「單位劑量形式」是指可用在人類個體或其他哺乳動物的作為單一劑量的完全分開的單位，各單位包含已經計算可產生想要的醫療效果之預先定量的突變的呼腸弧病毒還有合適的醫藥可接受的載劑。

根據本發明，可能有使用技藝中習知的分子生物學、微生物學、生化學、和重組 DNA 技術。這些技術在文獻中都有完整說明。主題的方法和組成物會進一步在下面的實施例中描述，但並不限制申請專利範圍中所述的本發明的範疇。

實施例

實施例 1-產生突變的呼腸弧病毒

產生受到本質或可誘發之啟動子控制而會表現突變形式之 S4 基因的構築體，使得正股 RNA 轉錄。在一例子中，S4 基因的轉譯起始密碼被刪除、插入、或取代而突變了。然後用該構築體來轉染可受呼腸弧病毒感染的細胞系。

經轉染的細胞系被呼腸弧病毒所感染，而且若需要的話，誘發 S4 基因的表現。含有突變的正股 S4 RNA 是病毒 RNA 依賴 RNA 聚合酶的反應物，會產生能組裝但沒有功能的雙股的突變 S4 RNA，至少係關於所編碼的西格馬 3 多肽併入蛋白殼中。

來自經轉染的細胞的後代病毒包含會表現西格馬 3 多肽的野生型呼腸弧病毒以及不會表現西格馬 3 多肽的突變呼腸弧病毒。不會表現西格馬 3 多肽的突變呼腸弧病毒有時被稱為赤裸呼腸弧病毒。

赤裸呼腸弧病毒是例如用菌斑滴定分析篩選的，利用在去塗覆步驟證明有被阻斷的細胞系。在這種細胞系中，野生型的病毒無法有效複製。選取最大的菌斑並且展開之。或者，可以用親和層析把野生型呼腸弧病毒純化出來，係用針對西格馬 3 多肽的抗體。用西方點墨法及/或免疫沉澱法偵測西格馬 3 多肽的有或無。

應了解，雖然已經詳細說明了材料和方法，但是前述的說明是用來描述而非限制申請專利範圍中所定義的材料和方法的範圍。其他方面、優點、和改造係落在後述申請

專利範圍的範疇中。

所揭露的是可被使用、可被合併使用、可用來製造的方法和組成物，或者是所揭露之方法和組成物的產物。本文揭露了這些和其他材料，吾人應可理解也揭露了這些方法和組成物的組合、子集、交互作用、分組等等。即，當特定涉及這些組成物和方法可能無法明確被揭露出各個不同的個別和集合的組合與變換時，各是明確被包含和描述在本文中了。例如，若呼腸弧病毒中特定的突變或特定的方法被揭露和討論了，則許多可以產生的呼腸弧病毒突變或是對於方法的改造就被討論了。除非有相反的指明，否則就明確涵蓋了呼腸弧病毒和方法的各種及每個組合與變換。相同的，也明確的涵蓋和揭露了任何這些的子集或組合。

【圖式簡單說明】

圖 1 概要的顯示呼腸弧病毒病毒體和呼腸弧病毒 ISVP 的突變的呼腸弧病毒結構組成。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

本發明提供了突變的呼腸弧病毒（例如經基因工程改造的 ISVP）。也提供了包含突變之呼腸弧病毒的組成物和使用此突變的呼腸弧病毒的方法。

六、英文發明摘要：

Provided herein is a mutant reovirus (e.g., a genetically-engineered ISVP). Compositions including mutant reoviruses and methods of using such mutant reoviruses are also provided.

十、申請專利範圍：

1.一種突變的呼腸弧病毒，其中該突變的呼腸弧病毒包含第一個突變，其中該第一個突變會減少西格馬 3 ($\sigma 3$) 多肽的表現、實質上消除西格馬 3 多肽的表現、或導致功能性西格馬 3 多肽缺乏。

2.根據申請專利範圍第 1 項的突變的呼腸弧病毒，其中該第一個突變是在編碼有西格馬 3 多肽的核酸中或在調控西格馬 3 多肽表現的核酸中。

3.根據申請專利範圍第 2 項的突變的呼腸弧病毒，其中該核酸是 S4 基因。

4.根據申請專利範圍第 1 項的突變的呼腸弧病毒，其中該第一個突變是基因工程改造的取代。

5.根據申請專利範圍第 1 項的突變的呼腸弧病毒，其中該第一個突變是基因工程改造的插入或刪除一或更多核苷酸。

6.根據申請專利範圍第 1 項的突變的呼腸弧病毒，其進一步包含一或更多進一步的突變。

7.根據申請專利範圍第 6 項的突變的呼腸弧病毒，其中該或該些進一步的突變是選自由下列者所組成的群組中：

會減少繆 1 ($\mu 1$) 多肽表現、實質上消除繆 1 多肽表現、或導致功能性繆 1 多肽缺乏的突變；

會減少拉目達 2 ($\lambda 2$) 多肽表現、實質上消除拉目達 2 多肽表現、或導致功能性拉目達 2 多肽缺乏的突變；

及/或

會減少西格馬 1 (sigma1) 多肽表現、實質上消除西格馬 1 多肽表現、或導致功能性西格馬 1 多肽缺乏的突變。

8.根據申請專利範圍第 1 項的突變的呼腸弧病毒，其中該第一個突變會減少西格馬 1 多肽表現至少 30%。

9.一種經基因工程改造的呼腸弧病毒感染性亞病毒顆粒 (infectious subviral particle, ISVP)。

10.根據申請專利範圍第 9 項的呼腸弧病毒 ISVP，其中該呼腸弧病毒 ISVP 是經基因工程改造而展現出降低的西格馬 3 多肽的表現、缺乏西格馬 3 多肽的表現、或表現無功能的西格馬 3 多肽。

11.根據申請專利範圍第 10 項的呼腸弧病毒 ISVP，其中該呼腸弧病毒 ISVP 是經基因工程改造而包含第一個突變。

12.根據申請專利範圍第 11 項的呼腸弧病毒 ISVP，其中該第一個突變是在編碼有西格馬 3 多肽的核酸中或在調控西格馬 3 多肽表現的核酸中。

13.根據申請專利範圍第 12 項的呼腸弧病毒 ISVP，其中該核酸是 S4 基因。

14.根據申請專利範圍第 11 項的呼腸弧病毒 ISVP，其中該第一個突變是取代。

15.根據申請專利範圍第 11 項的呼腸弧病毒 ISVP，其中該第一個突變是插入或刪除一或更多核苷酸。

16.根據申請專利範圍第 11 項的呼腸弧病毒 ISVP，其

進一步包含一或更多進一步的突變。

17.根據申請專利範圍第 16 項的呼腸弧病毒 ISVP，其中該或該些進一步的突變是選自下列者所組成的群組中：

會減少繆 1 多肽表現、實質上消除繆 1 多肽表現、或導致功能性繆 1 多肽缺乏的突變；

會減少拉目達 2 多肽表現、實質上消除拉目達 2 多肽表現、或導致功能性拉目達 2 多肽缺乏的突變；及/或

會減少西格馬 1 多肽表現、實質上消除西格馬 1 多肽表現、或導致功能性西格馬 1 多肽缺乏的突變。

18.根據申請專利範圍第 10 項的呼腸弧病毒 ISVP，其中該西格馬 3 多肽表現至少減少 30%。

19.一種製造具有增加之感染性的呼腸弧病毒的方法，該方法包含

將最初的呼腸弧病毒突變以產生突變的呼腸弧病毒，其中該突變的呼腸弧病毒展現出降低的西格馬 3 多肽的表現、缺乏西格馬 3 多肽的表現、或表現無功能的西格馬 3 多肽，以及

分離出該突變的呼腸弧病毒，其中相較於該最初的呼腸弧病毒，該突變的呼腸弧病毒具有增加的感染性。

20.根據申請專利範圍第 19 項的方法，其中該增加的感染性是藉由相較於最初的呼腸弧病毒，可被該突變的呼腸弧病毒所感染之瘤細胞範圍增加，或相較於最初的呼腸弧病毒，被該突變的呼腸弧病毒所感染之細胞數目增加來證明。

21.一種得到經基因工程改造之呼腸弧病毒感染性亞病毒顆粒（ISVP）的方法，該方法包含

將最初的呼腸弧病毒基因工程改造以展現出降低的西格馬 3 多肽的表現、缺乏西格馬 3 多肽的表現、或表現無功能的西格馬 3 多肽；

培養該經基因工程改造的呼腸弧病毒；以及

分離出 ISVP 以得到經基因工程改造的呼腸弧病毒 ISVP。

22.一種治療個體之增殖性病症的方法，該方法包含將根據申請專利範圍第 1 項的突變的呼腸弧病毒或根據申請專利範圍第 9 項的經基因工程改造的呼腸弧病毒 ISVP 投藥給該個體。

23.根據申請專利範圍第 22 項的方法，其進一步包含至少一種選自手術、化學治療、放射線治療、以及免疫抑制治療所組成之族群的程序。

24.一種醫藥組成物，其包含根據申請專利範圍第 1 項的突變的呼腸弧病毒或根據申請專利範圍第 9 項的經基因工程改造的呼腸弧病毒 ISVP。

25.根據申請專利範圍第 24 項的醫藥組成物，其進一步包含一或更多化學治療劑及/或一或更多免疫抑制劑。

26.一種含有突變的西格馬 3 多肽，其中該突變會導致該西格馬 3 多肽不會併入病毒的蛋白殼（capsid）中或併入病毒蛋白殼中的量減少。

200909581

十一、圖式：

如次頁

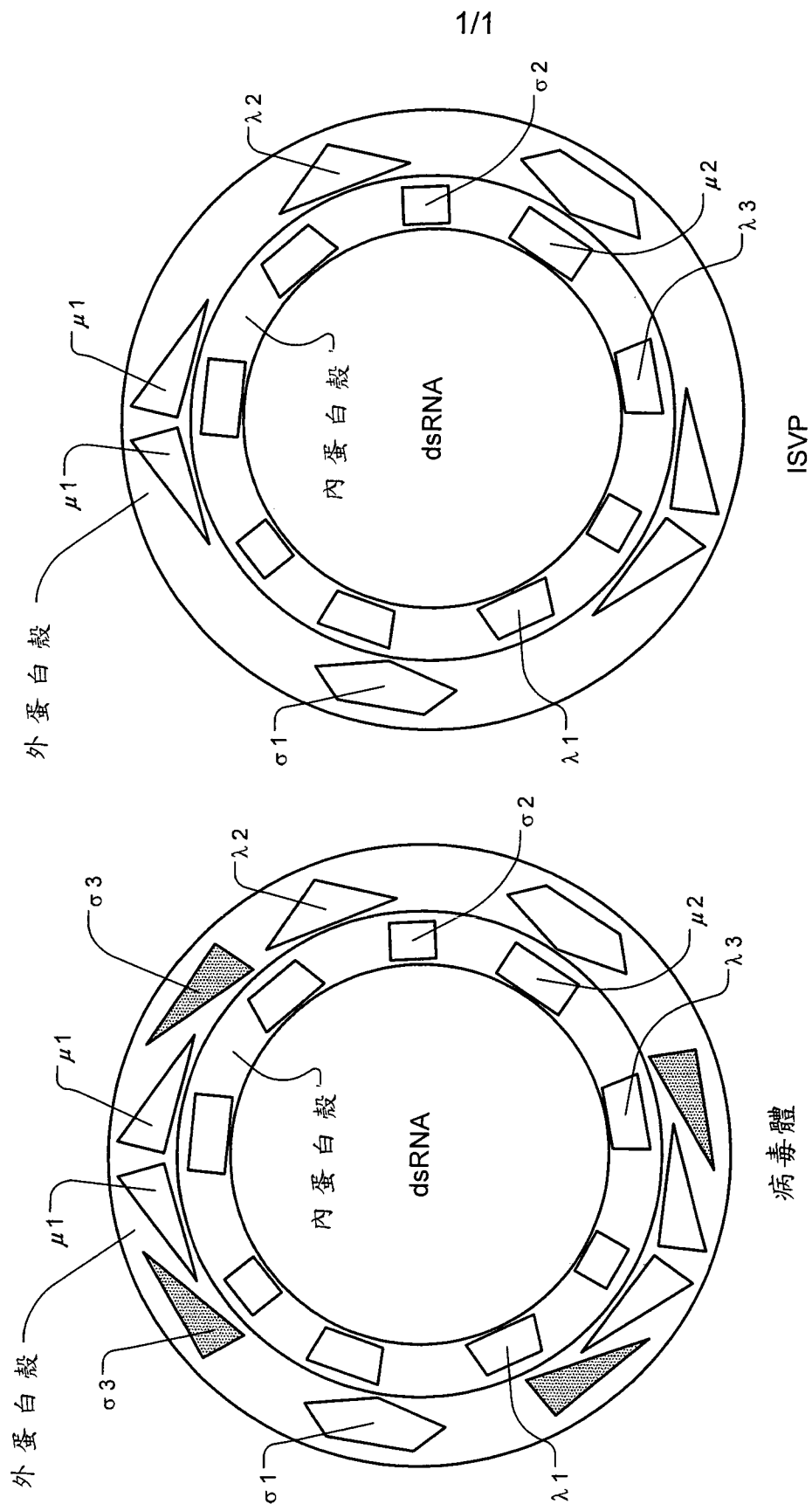


圖 1

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無