



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：200936159

(43)公開日：中華民國98(2009)年9月1日

(21)申請案號：098103098

(22)申請日：中華民國98(2009)年1月23日

(51)Int. Cl.:

A61K39/17 (2006.01)

C12N15/45 (2006.01)

C12N7/04 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權主張：2008/01/29

歐洲專利局

08001643.9

2008/01/29

美國

61/024,333

(71)申請人：拜耳先靈製藥公司 BAYER SCHERING PHARMA AG

德國

(72)發明人：碧爾 盧朵夫 BEIER, RUDOLF；皮樂 弗羅倫思 PUEHLER, FLORIAN

(72)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：5 共 68 頁

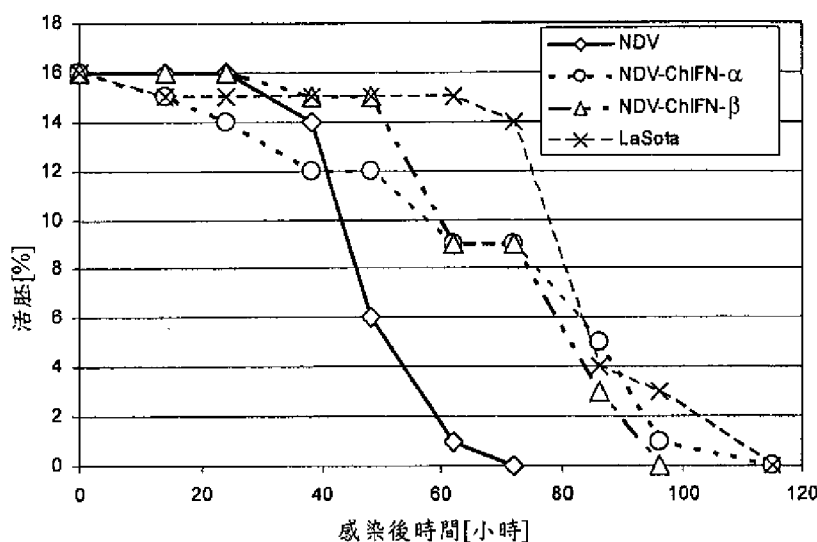
(54)名稱

編碼鳥類細胞激素之減毒溶瘤副粘液病毒

ATTENUATED ONCOLYTIC PARAMYXOVIRUSES ENCODING AVIAN CYTOKINES

(57)摘要

本發明係關於一種用於治療增生性疾病之重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒(Newcastle Disease Virus)，其包含至少一個編碼鳥類細胞激素之轉殖基因，其中該重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒可自強毒型(velogenic)或中間毒型(mesogenic)溶瘤RNA新城雞瘟病毒獲得。該細胞激素在天然宿主細胞中之病毒介導表現導致該病毒對鳥類之致病性降低。此外，該病毒基因組可編碼結合蛋白、前藥轉化酶或/及蛋白酶。此等分子在受病毒感染之腫瘤細胞中之選擇性表現增強該病毒之抗腫瘤作用。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：200936159

(43)公開日：中華民國98(2009)年9月1日

(21)申請案號：098103098

(22)申請日：中華民國98(2009)年1月23日

(51)Int. Cl.:

A61K39/17 (2006.01)

C12N15/45 (2006.01)

C12N7/04 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權主張：2008/01/29

歐洲專利局

08001643.9

2008/01/29

美國

61/024,333

(71)申請人：拜耳先靈製藥公司 BAYER SCHERING PHARMA AG

德國

(72)發明人：碧爾 盧朵夫 BEIER, RUDOLF；皮樂 弗羅倫思 PUEHLER, FLORIAN

(72)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：5 共 68 頁

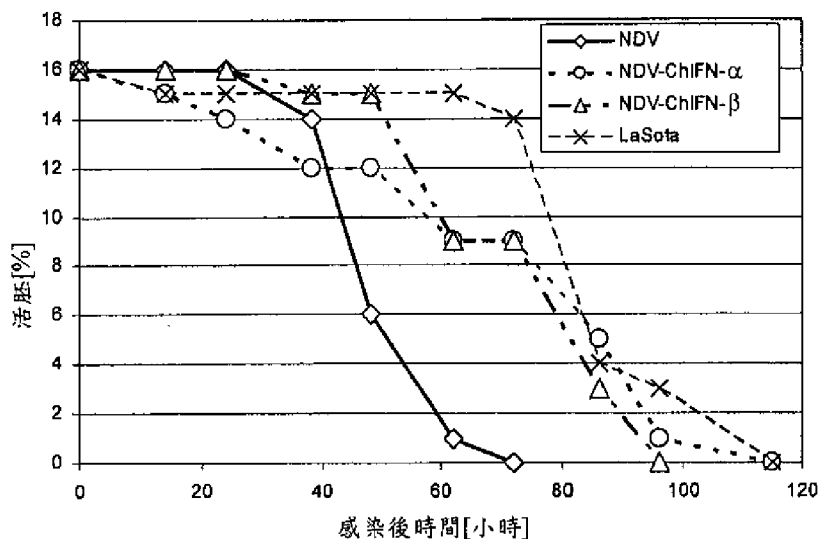
(54)名稱

編碼鳥類細胞激素之減毒溶瘤副粘液病毒

ATTENUATED ONCOLYTIC PARAMYXOVIRUSES ENCODING AVIAN CYTOKINES

(57)摘要

本發明係關於一種用於治療增生性疾病之重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒(Newcastle Disease Virus)，其包含至少一個編碼鳥類細胞激素之轉殖基因，其中該重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒可自強毒型(velogenic)或中間毒型(mesogenic)溶瘤RNA新城雞瘟病毒獲得。該細胞激素在天然宿主細胞中之病毒介導表現導致該病毒對鳥類之致病性降低。此外，該病毒基因組可編碼結合蛋白、前藥轉化酶或/及蛋白酶。此等分子在受病毒感染之腫瘤細胞中之選擇性表現增強該病毒之抗腫瘤作用。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒，其包含至少一個編碼鳥類細胞激素之轉殖基因，其中該重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒可自強毒型或中間毒型溶瘤RNA新城雞瘟病毒獲得。該細胞激素在天然宿主細胞中之病毒介導表現導致該病毒對鳥類物種之致病性降低。

本發明中之病毒適用於治療疾病，尤其適用於溶瘤性腫瘤治療。製得編碼鳥類細胞激素之重組病毒，其中該病毒對鳥類物種之致病性降低，從而減弱該病毒之環境毒性。該病毒之溶瘤活性不因所述致病性降低方法而受損。該病毒基因組可編碼其他治療性轉殖基因，較佳為結合蛋白(抗體、錨蛋白重複分子、肽等)、前藥轉化酶或/及蛋白酶。此等結合蛋白、前藥轉化酶及/或蛋白酶之活性增強該病毒之抗腫瘤作用。此外，本發明描述用於治療癌症之該等經修飾病毒之製造及用途。

【先前技術】

新城雞瘟病毒

一般用於治療腫瘤之溶瘤病毒評述於Chiocca(2002)中。新城雞瘟病毒(NDV)已作為實驗治療劑使用40多年且Sinkovics及Horvath(2000)已評述。Alexander(1988)在書中大體描述了新城雞瘟病毒。正在研發NDV病毒株PV701作為神經膠母細胞瘤之抗癌治療(Lorence等人，2003)。NDV病毒株MTH68已用於實驗性癌症治療且已投與人類30多年

(Csatary 等人，2004)。

Stojdl 等人(2003)在論文中描述，在所有經測試之腫瘤細胞株之80%範圍中，存在水泡性口炎病毒(VSV)感染後之干擾素反應不足。由於VSV與NDV均為單股負鏈病毒目(order mononegavirales)之成員，因此可假定類似百分比之腫瘤細胞株易感染NDV。亦已證明NDV在腫瘤細胞中之選擇性複製機制係基於抗該病毒之細胞干擾素反應不足(例如參見US 20030044384)。

副黏液病毒含有具有15-19 kb長之基因組(野生型)之負極性單股RNA基因組且該等基因組含有6-10個基因。病毒包膜係由表面醣蛋白及源自宿主細胞之膜部分形成。表面醣蛋白(F及HN或H或G)介導病毒自宿主細胞進出。核鞘位於包膜內且含有RNA基因組及負責細胞間病毒轉錄及複製的核鞘蛋白(NP)、磷蛋白(P)及大蛋白(L)。基質蛋白(M)連接病毒包膜與核鞘。除此等編碼結構蛋白之基因外，副黏液病毒科(Paramyxoviridae)亦可含有"附屬"基因，其可為散置有上述基因之其他轉錄單元。附屬基因主要為與P基因轉錄單元重疊之ORF。副黏液病毒之綜述可見於Lamb (2001)中。

NDV為屬於單股負鏈病毒目之副黏液病毒科中之禽副黏液病毒屬(genus Avulavirus)的原型成員。該病毒基因組為編碼以下6種主要蛋白質之單股負義RNA：核鞘蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基質蛋白(M)、融合蛋白(F)、血球凝集素蛋白(HN)及聚合酶蛋白(L)。藉由編輯P蛋白mRNA，可

轉譯一或兩種其他蛋白質V(及W)。

NDV詳細描述於Alexander (1988)及Lamb (2001)中。

作為鳥類病原體之新城雞瘟病毒

根據對雞的致病性將NDV病毒株分類為引起全齡雞急性致命性感染之強毒型病毒株(高毒性)、僅在幼雞中具有致命性之中間毒型分離株(中間毒性)及以疾病之輕微或不明顯形式顯現之弱毒型病毒株(無毒性)。NDV分離株之強毒型、中間毒型或弱毒型之分類係依據9日齡受精蛋(embryonated eggs)中之雞胚在接種殺死胚胎之最小致命劑量後的平均死亡時間(MDT)來判定。NDV毒性的決定因素之一似乎為前驅體F蛋白之分裂位點。

1926年在Newcastle-upon-Tyne, England及Java, Indonesia觀察到NDV的第一次爆發。自疾病首次出現以來已描述三種NDV廣泛性動物流行病。

NDV主要係經由易感鳥所吸入的煙塵或大飛沫傳播。在感染期間，新的感染性病毒顆粒自受感染呼吸道散發出或排泄於糞便中。經由健康鳥攝入此含有病毒的物質，可建立起新的感染且可維持一隻鳥向另一鳥的病毒傳播。

作為鳥類病原體之NDV詳細描述於Alexander (1997), Diseases of Poultry中。

新城雞瘟疫苗接種

在上世紀初已認識到NDV為家禽飼養的一種威脅且需要疫苗接種。Iyer及Dobson在二十世紀三十年代已進行關於毒性NDV病毒株減毒之研究，從而研發一些中間毒型NDV

疫苗株。活疫苗的研發因弱毒型疫苗株 Hitchner B1 及 LaSota 的建立而向前發展，該等疫苗株為目前最廣泛使用之 NDV 疫苗。此外，疫苗接種策略包括使用滅活 NDV 疫苗（例如，藉由福馬林(formalin)、 β -丙內酯滅活），其係與載劑佐劑（氫氧化銨、油乳液）一起給與。

NDV 疫苗研發的歷史及現狀詳細描述於 Alexander (1997) Diseases of Poultry 中。

基於藉由反向遺傳技術所產生之重組 NDV 的新一代獸醫用疫苗評述於 Huang 等人 (2003) 中且重組 NDV 疫苗描述於以下專利中。

US 6,699,479 B1 描述一種新城雞瘟病毒 (NDV) 突變體，其以減低之水準表現其 V 蛋白且用於孵化前胚胎之疫苗接種。

US 2004/0043035 係關於一種重組 NDV 突變體，其不能表現核蛋白 (NP) 之免疫顯性抗原決定基且適用作標記疫苗株。

US 2003/0224017 描述一種用於製造重組 NDV 疫苗之 NDV 的反向遺傳系統。此系統允許自 NDV 基因組表現轉殖基因，例如鳥類細胞激素（雞 IL-2、雞 IL-4），以產生 NDV 疫苗株。

EP 1 300 157 係關於一種適用於鳥類物種胚內疫苗接種之減毒突變型新城雞瘟病毒株，其包含編碼 HN 及 / 或 F 糖蛋白之基因序列中的突變。

US 6,719,979 係關於一種完全自經選殖之全長 cDNA 產生

感染性新城雞瘟病毒(NDV)之方法及使用該方法所產生或所獲得之疫苗及診斷檢定之用途。

WO 2007/025431描述一種製造重組減毒新城雞瘟 La Sota 病毒株之方法及其用於製備供預防由新城雞瘟病毒(NDV)所引起之疾病之用之疫苗的用途。

WO 2000/067786係關於用於製造減毒感染性新城雞瘟病毒(NDV)之cDNA。包含減毒感染性NDV之疫苗屬於該發明之範疇內。

重組副黏液病毒

EP-A-0 702 085係關於經遺傳操作之感染性複製型不分段負股RNA病毒突變體，其包含病毒基因組之開放閱讀框架、假基因區域或基因間區域中之插入及/或缺失。

WO 99/66045係關於自病毒基因組之全長cDNA分子獲得之經遺傳修飾之NDV病毒。

WO 00/62735係關於一種腫瘤治療方法，其包含投與干擾素敏感性、有複製能力之選殖RNA病毒，例如NDV。

在WO 01/20989(PCT/US00/26116)中，描述一種使用重組溶瘤副黏液病毒治療患有腫瘤之患者之方法。藉由投與有複製能力之副黏液病毒來減輕腫瘤。描述可用於工程化病毒基因組以改良溶瘤特性之各種方法。

WO 03/005964係關於重組VSV，其包含編碼細胞激素之核酸。

US 2004/0170607係關於藉由投與不為常見人類病原體之病毒來治療黑色素瘤。

NDV之遺傳操作

NDV可如(例如)EP-A-0 702 085中所述使用反向遺傳技術來遺傳操作。舉例而言，已知製造包含其他核酸之重組NDV構築體，該等核酸編碼分泌鹼性磷酸酶(Zhao及Peeters，2003)、綠色螢光蛋白(Engel-Herbert等人，2003)、感染性法氏囊病病毒(bursal disease virus)之VP2蛋白(Huang等人，2004)、流感病毒血球凝集素(Nakaya等人，2001)及氯黴素乙醯基轉移酶(chloramphenicol acetyl transferase)(Huang等人，2001)(Krishnamurthy等人，2000)。此等重組NDV尚未構築用於治療人類疾病。製造該等重組NDV可研究NDV之基本病毒學或研發家禽疫苗株。弱毒型NDV病毒株充當親代病毒株。此等病毒株不具有顯著溶瘤特性。

病毒之遺傳操作

遺傳操作RNA病毒之方法如上所述已熟知。此外，溶瘤病毒之遺傳操作評述於(例如)Bell等人(2002)中。作為病毒治療劑之RNA病毒評述於Russell (2002)中。任何此等文件之內容均以引用的方式併入本文中。

鳥類細胞激素

鳥類細胞激素評述於Staeheli等人(2001)中。雞細胞激素及趨化激素之基因組分析描述於Kaiser等人(2005)中。

【發明內容】

自二十世紀六十年代早期以來，對溶瘤NDV病毒株作為腫瘤治療劑一直在研究。大多數用於溶瘤性腫瘤療法之病

毒株屬於描述為家禽病原體之中間毒型病毒類別。為研發作為抗腫瘤生物藥之溶瘤NDV，應減低潛在的現有環境毒性，尤其是家禽致病性。然而，相對於家禽減毒之NDV必須具有持續的溶解腫瘤細胞之能力且保持其溶瘤潛力。現有的疫苗研發策略不適用，原因在於其集中在藉由施用完全滅活病毒顆粒或無致病性弱毒型病毒株來刺激鳥免疫系統。兩種疫苗類型均不能在癌細胞中複製且繼而喪失溶解腫瘤細胞之潛力。

在本發明中，可藉助於反向遺傳技術達成在不減弱病毒溶瘤活性的情況下使NDV相對於家禽減毒。藉由將編碼細胞激素(尤其是抗病毒或免疫刺激性細胞激素)之轉殖基因插入來製造重組減毒NDV。

此外，由於疫苗之目標係誘導具有長期持久免疫性之強免疫反應以保護動物免於繼發感染，因此NDV疫苗不適用於該方法。在本發明中，所述NDV減毒之主要目的在於允許動物控制(不良)原發感染且因此降低環境毒性且增加病毒在用於增生性疾病療法中時之安全性。

本發明之一目標係藉由溶瘤病毒溶解腫瘤細胞。該溶瘤病毒方法之適應症為人類癌症療法。相比而言，如US 2003/0224017中所揭示之家禽NDV疫苗係用於動物且因此屬於動物保健領域。

因此，本發明之一目標為一種重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒，其包含至少一個編碼鳥類細胞激素之轉殖基因，其中該重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒可自強毒型或中間毒型溶瘤

RNA新城雞瘟病毒獲得。

本發明之病毒可包含至少一個當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因。

該至少一個其他轉殖基因相對於宿主部分地為異基因或同基因。

在本發明之另一態樣中，本發明之病毒可為減毒病毒。

"減毒"包括減低病毒對鳥類物種之致病性及減低具有預測性之生物檢定系統對鳥類物種之致病性(參見實例5)。

本發明之另一態樣係一種相對於家禽減毒之重組溶瘤RNA病毒，其包含含有至少一個編碼細胞激素之轉殖基因的核酸。特定言之，病毒係相對於雞減毒。"編碼細胞激素之轉殖基因"尤其為如本文中所述之"編碼鳥類細胞激素之轉殖基因"。

此外，本發明係關於本發明之重組病毒之核鞘，其包含與衣殼蛋白複合之病毒RNA。此外，本發明係關於一種RNA，其為本發明之病毒之RNA。本發明亦係關於一種與本發明之病毒之RNA互補的RNA。

此外，本發明係關於一種DNA，例如編碼本發明之RNA之cDNA及/或與本發明之RNA互補之DNA。此外，本發明係關於預防或治療腫瘤疾病、癌症或/及增生性疾病。

本發明之RNA或/及DNA可以分離形式提供。

在本發明中，由如本文中所述之轉殖基因編碼之細胞激素可自感染本發明之病毒之鳥細胞分泌，且結合至鄰近細胞上之其適當干擾素受體後可在受體承載細胞中誘導抗病

毒狀態。因此，可至少部分地抑制本發明之病毒在經干擾素刺激之鳥細胞中的複製。雞I型干擾素與哺乳動物I型干擾素之間的相似性極低(在胺基酸水準上一致性小於25%)(Staeheli等人，2001)。因此，在鳥細胞中呈現該抗病毒作用之細胞激素在人類細胞中基本上不展示生物活性且可能對人類腫瘤細胞中之病毒複製基本上無影響。此外，預期此等細胞激素在人類生物體中基本上不引起不良反應。

如本文中所述之編碼細胞激素之轉殖基因之表現導致病毒對鳥類物種(尤其家禽，尤其雞)之致病性降低及因此減弱之環境毒性。如本文中所述之編碼細胞激素之轉殖基因之活性對病毒之治療作用基本上無不良影響。

【實施方式】

病毒

本發明大體係關於RNA病毒，較佳為負股RNA病毒，更佳為具有溶瘤特性且可經遺傳工程化之該等病毒。該等病毒為：

- 副黏液病毒，較佳為新城雞瘟病毒(NDV)、麻疹病毒、腮腺炎病毒、仙台病毒(Sendai virus)；
- 正黏液病毒，較佳為流感病毒；
- 桿狀病毒，較佳為水泡性口炎病毒。

較佳地，本發明之病毒為鳥類病原體，尤其為家禽之病原體，更尤其為雞之病原體。

亦較佳地，本發明之病毒為負股RNA病毒。本發明之重組RNA病毒可為副黏液病毒，較佳為新城雞瘟病毒

(NDV)。NDV可為中間毒型或強毒型病毒株。NDV較佳為中間毒型NDV。

本發明之病毒可自強毒型或中間毒型溶瘤RNA新城雞瘟病毒、尤其自病毒株MTH68獲得。

本發明之病毒較佳具有複製能力。

尤其相對於可產生重組病毒之病毒，本發明之病毒對鳥類物種可具有降低之致病性。

較佳地，在本發明之病毒中，致病性降低為以MOI 0.01感染約48 h後、藉由增加細胞存活率所量測之病毒降低鳥細胞溶解之能力，其中相對於可產生重組病毒之病毒，細胞存活率增加至至少約25%(諸如至少約25%至多達約50%)存活細胞，更佳增加至至少約50%(諸如至少約50%至多達約75%)存活細胞且最佳增加至至少約75%(諸如至少約75%至多達100%)存活細胞。

亦較佳地，在本發明之病毒中，致病性降低為藉由平均死亡時間(MDT)測定所量測、11日齡受精蛋中之病毒感染雞胚的存活時間延長，其中與可產生重組病毒之病毒相比，MDT延長至少約15 h(諸如至少約15 h至長達約20 h)，更佳至少約20 h(諸如至少20 h至長達約30 h)且最佳延長30 h以上。

在另一實施例中，本發明之病毒對於人類腫瘤細胞之溶瘤活性基本上不降低。

較佳地，在本發明之病毒中，在感染48 h後、藉由細胞存活率所量測之病毒對人類腫瘤細胞之溶瘤活性與可產生

重組病毒之病毒相比降低不超過50%且更佳相對於可產生重組病毒之病毒基本上不降低。

細胞激素

由至少一個如本文中所指示之轉殖基因編碼之細胞激素可為任何細胞激素。特定言之，細胞激素可為能夠至少部分地抑制鳥細胞、尤其家禽細胞、更尤其雞細胞中之病毒複製的細胞激素。較佳地，病毒複製基本被完全抑制。

細胞激素可為哺乳動物中、尤其人類中基本上無生物活性之細胞激素。在本上下文中，"生物活性"尤其係指細胞激素至少部分地抑制病毒複製、尤其本發明之病毒複製之能力。"生物活性"亦指細胞激素可在非哺乳動物細胞或/及非哺乳動物中呈現之任何其他活性。

細胞激素可為能夠至少部分地抑制鳥、尤其家禽、更尤其雞中之病毒複製的細胞激素，且可在哺乳動物中、尤其在人類中基本上無生物活性。

細胞激素可選自鳥類細胞激素，尤其選自家禽細胞激素，更尤其選自雞細胞激素。

細胞激素可選自干擾素，尤其選自鳥類干擾素，更尤其選自雞干擾素，更尤其選自雞I型干擾素。

干擾素可為干擾素- β 或干擾素- α 家族之成員。

在一較佳實施例中，重組溶瘤RNA病毒為包含含有編碼雞干擾素- α 或/及雞干擾素- β 之轉殖基因之核酸的NDV。

轉殖基因

在NDV基因組之情形下，轉殖基因定義為引入病毒基因

組中之其他核酸。核酸可選自不同基因組來源(例如，NDV基因組、不同病毒類別、原核或真核來源、哺乳動物或非哺乳動物物種)。來自兩種或兩種以上不同基因組來源之融合轉殖基因亦可。亦可基於核酸序列之重新合成構築合成轉殖基因。核酸必須位於至少一個轉錄匣內。較佳地，轉殖基因在受感染細胞中轉譯為蛋白質。因此，轉殖基因序列應包括轉譯起始及終止密碼子。

本發明之重組溶瘤病毒可包含編碼至少一個其他轉殖基因之核酸，該轉殖基因係獨立選自編碼結合蛋白、前藥轉化酶及蛋白酶之轉殖基因。

至少一個其他轉殖基因較佳編碼當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之結合蛋白。

在另一較佳實施例中，至少一個其他轉殖基因編碼當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之前藥轉化酶。

在另一較佳實施例中，至少一個其他轉殖基因編碼當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之蛋白酶。

除非另外說明，否則如本文中所用之"轉殖基因"或"至少一個轉殖基因"係指編碼鳥類細胞激素之轉殖基因，或至少一個當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因，或其組合。除非另外說明，否則，"轉殖基因"之此定義具體涉及如本文中所述之轉殖基因在病毒基因組內之位置及數目。

本發明之RNA病毒、基因組、反基因組、核鞘及/或DNA分子可包含可位於如本文中所述之轉錄匣內之如本文

中所述之轉殖基因。

本發明之重組溶瘤病毒可包含至少兩個、至少三個、至少四個或至少五個各自包含如本文中所述之轉殖基因之核酸。本發明之重組溶瘤病毒可包含最多5個各自包含如本文中所述之轉殖基因的核酸。特定言之，本發明之重組溶瘤病毒包含一個、兩個、三個、四個或五個各自包含如本文中所述之轉殖基因的核酸。若本發明之重組病毒包含至少兩個轉殖基因，則其可相同或不同。

包含至少一個轉殖基因之核酸可位於該病毒基因閱讀框架之間的任何位置。特定言之，包含至少一種轉殖基因之核酸可位於N基因之5'端、N基因與P基因之間、P基因與M基因之間、M基因與F基因之間、F基因與HN基因之間、HN基因與L基因之間，或/及L基因之3'端。該核酸較佳位於更靠近5'端之位置(諸如N基因之5'端)、N基因與P基因之間或/及P基因與M基因之間，因為與更靠近3'端之定位相比，該定位導致改良之表現。

較佳地，本發明之病毒呈現腫瘤選擇性感染，其導致如本文中所述之轉殖基因之腫瘤選擇性表現。

本發明之重組RNA病毒可包含總共多達五個轉殖基因、多達四個轉殖基因或多達三個轉殖基因。

在本發明中，編碼鳥類細胞激素之轉殖基因，或至少一個由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因，或其組合，較佳與本發明之重組RNA病毒所基於之溶瘤RNA病毒異源。本文中所用之術語"異源"係指完整基

因或其一部分，可為該基因之編碼區或其一部分。

異源核酸可為人造核酸，或可獲自天然來源，或可藉由至少兩個核酸(選自天然來源獲得之核酸及/或人造核酸)重組獲得。"天然來源"包括動物，諸如哺乳動物；植物；真菌；及微生物，諸如細菌、原生動物及病毒，其可不同於本發明之溶瘤RNA病毒。

轉殖基因亦可編碼融合蛋白。

在本發明之另一實施例中，編碼鳥類細胞激素之轉殖基因及至少一個由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因可位於至少兩個分離的轉錄單元上。

至少一個包含含有至少一個編碼鳥類細胞激素之轉殖基因之核酸的轉錄單元亦可轉錄於如本文中所述之腫瘤細胞中。

至少一個包含含有至少一個當由病毒感染之腫瘤表現時具有治療活性之第二轉殖基因之核酸的轉錄單元亦可轉錄於如本文中所述之鳥細胞中。

至少兩個分離的轉錄單元可各自轉錄於如本文中所述之腫瘤細胞中及在如本文中所述之鳥細胞中。

在一替代性較佳實施例中，至少一個編碼鳥類細胞激素之轉殖基因及至少一個當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因轉譯於如本文中所述之腫瘤細胞中及在如本文中所述之鳥細胞中。

結合蛋白

在本發明之溶瘤重組RNA病毒中，至少一個當由病毒感

染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因可編碼結合蛋白。

因此，本發明之目標為一種醫藥組合物，其包含本發明之重組溶瘤病毒、本發明之病毒基因組、本發明之病毒反基因組及/或本發明之DNA分子作為活性成份，以及視需要之醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或佐劑，該病毒、病毒基因組、反基因組及/或DNA分子包含至少一個編碼結合蛋白、當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因。

結合蛋白為當表現於靶細胞中時能夠結合至該細胞及/或鄰近細胞之組份的蛋白質。較佳地，結合蛋白為結合至細胞內組份之蛋白質。

在一較佳實施例中，結合蛋白選自由以下各物組成之群組：天然配體、經遺傳修飾之配體、天然受體及其經修飾型式之重組可溶性域、肽配體、多肽配體、抗體分子及其片段及衍生物，及抗體樣分子(如錨蛋白重複蛋白)及其片段及衍生物。

Ladner及Ley(2001)給出高親和力結合構架之不完全評述。

如本文中所述之結合蛋白可來源於人類、鼠科動物或密切相關者，或為嵌合型式，亦即可為包含來自不同物種(例如，人類及小鼠)之序列之融合蛋白的蛋白質。

基於以上說明之重組結合分子可為單體、二聚體、三聚體、四聚體或多聚體。基於以上說明之重組結合分子可具

單特異性、雙特異性或多特異性。

較佳結合蛋白係選自具有治療活性之結合蛋白。

如本文中所述之天然配體可為生長因子或肽。經遺傳修飾之配體可為天然存在之生長因子或肽之類似物。

如本文中所述之天然受體或其經修飾型式之重組可溶性域為細胞表面受體之重組表現可溶性細胞外域及/或其片段、細胞黏附分子之重組表現可溶性細胞外域及/或其片段。

如上文所提及之抗體分子可為具有任何已知特異性及同種型之單株免疫球蛋白抗體、其片段及/或融合至效應蛋白之其片段。抗體分子可為嵌合、人類化或人類抗體。抗體片段含有抗體之至少一個抗原結合域。抗體片段已詳盡描述於文獻中(評述於例如 Allen (2002)中，其以引用的方式併入本文中)。較佳實例為單鏈 Fv 片段、Fab 片段、F(ab2')、稱為微型抗體之域缺失型式及其他免疫活性蛋白、片段、區段，及其他更小或更大部分抗體結構，其中後者具有足夠的靶向特性或免疫刺激或抑制活性以在本發明之方法中具有治療實用性。

該等抗體可源自使用轉殖基因小鼠之融合瘤選殖實驗或源自噬菌體呈現選擇、核糖體呈現選擇或含有人類抗體序列之抗體文庫之集落過濾篩檢或相關方法。

具有如本文中所述之抗體樣特性之結合蛋白可為經遺傳修飾之蛋白質或其域，其中一或多個肽環在胺基酸水準上以一定方式隨機化以使得可藉由噬菌體呈現、核糖體呈

現、集落過濾篩檢或相關方法自該等分子之文庫中針對任何抗原富集具有高特異性之高親和力結合分子。所選蛋白質通常具有高的熱穩定性及熱力學穩定性且良好表現於重組表現系統中，諸如大腸桿菌(*E. coli*)、酵母、昆蟲及哺乳動物表現系統。該等具有抗體樣特性之結合蛋白之實例為如 Binz 等人(2004)所述之錨蛋白重複蛋白、如 Skerra (2000)所述之脂質運載蛋白、如 DE 199 32 688.6 中所述之 γ -晶體蛋白、如 Hogbom 等人(2003)或 Nord 等人(2000)所述之經修飾蛋白 A 骨架(親和蛋白)或纖維結合蛋白構架及其他蛋白。抗體樣分子可為構築為單鏈分子或多鏈分子之單體或重複分子，其中抗體樣分子具有足夠的靶向特性或免疫刺激或抑制活性以在本發明之方法中具有治療實用性。

本發明之另一目標為一種治療增生性疾病、尤其過度增生疾病(諸如腫瘤或癌症)之方法，其包含向有需要之個體投與醫藥學上有效量之本發明之重組溶瘤病毒、本發明之病毒基因組、本發明之病毒反基因組及/或本發明之 DNA 分子，該等物質包含至少一個如本文中所述之當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之編碼結合蛋白之其他轉殖基因。

具有其他功能之結合分子

結合蛋白可為包含至少一個結合域(例如，來自抗體)及至少一個異源域之融合蛋白。"異源"具有如上文在異源基因之情形下所討論之含義。

上述結合蛋白能夠作為所謂胞內抗體或作為細胞外可用

結合蛋白向疾病特異性位點(例如，腫瘤)傳遞有效負載。所傳遞之有效負載可為異源域，例如毒素，諸如人類核糖核酸酶(De Lorenzo等人，2004)(Zewe等人，1997)、假單胞菌外毒素(Chaudhary等人，1989)(Kreitman及Pastan，1995)(Batra等人，1992)、白喉毒素(Kreitman等人，1993)(Chaudhary等人，1990)(Batra等人，1991)；或酶，諸如具有治療功效之 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖苷酸酶(Roffler等人，1991)(Wang等人，1992)(Bosslet等人，1992)、 β -葡糖苷酶(Rowlinson-Busza，1992)、羧肽酶(Antoniw等人，1990)(Bagshawe等人，1998)、 β -內醯胺酶；或具有細胞激素活性之免疫刺激蛋白，諸如IL-2、IL-12、TNF- α 、IFN- β 或GM-CSF(例如參見Allen(2002)之評述)。

在另一實例中，上述結合蛋白本身具有有治療實用性之拮抗或激動功效。拮抗/阻斷型結合分子之實例為VEGF抑制性抗體阿瓦斯汀(Avastin)(Ferrara等人，2004)、HER2/neu受體阻斷抗體赫賽汀(Herceptin)(Noonberg及Benz，2000)或EGF受體阻斷抗體艾比特思(Erbitux)(Herbst及Langer，2002)。激動型結合蛋白可為誘導(例如)細胞凋亡(Georgakis等人，2005)或對DNA、RNA或蛋白質具有調控活性(例如，誘導轉錄、穩定蛋白質)之結合蛋白。Adams及Weiner (2005)之評述描述了亦可併入溶瘤病毒中之各種治療性抗體。

前藥轉化酶

在本發明之溶瘤重組RNA病毒中，至少一個當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因可編碼

前藥轉化酶。

前藥為治療活性化合物之衍生物或前驅體，其可經酶轉化為活性化合物。前藥轉化酶為能夠將前藥轉化為治療活性藥物之酶。

因此，本發明之目標為一種醫藥組合物，其包含本發明之重組溶瘤病毒、本發明之病毒基因組、本發明之病毒反基因組及/或本發明之DNA分子作為活性成份，以及視需要之醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或佐劑，該病毒、病毒基因組、反基因組及/或DNA分子包含至少一個當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之編碼前藥轉化酶之其他轉殖基因。

醫藥組合物可進一步包含可經由該病毒、病毒基因組、反基因組及/或DNA分子所編碼之前藥轉化酶轉化為治療活性化合物之前藥。醫藥組合物可適用於治療及/或減緩增生性病徵。

前藥可與作為活性成份之本發明之重組溶瘤病毒、本發明之病毒基因組、本發明之病毒反基因組及/或本發明之DNA分子調配於單一組合物中，或可調配於與溶瘤病毒調配物不同之組合物中。

若本發明之溶瘤重組RNA病毒編碼前藥轉化酶，則本發明之溶瘤病毒促使通常不表現或不充分表現前藥轉化酶之病毒感染靶細胞(尤其腫瘤細胞)選擇性表現前藥轉化酶。因此，在治療有需要之個體期間，前藥在靶細胞、尤其腫瘤細胞中特異性轉化為醫藥活性化合物，但在非靶細胞、

尤其所治療之個體之健康細胞中基本上不轉化為治療活性化合物。因此，與單獨治療活性化合物之治療相比，治療活性化合物之不良副作用降低。

在本發明之上下文下，前藥可為適用於治療及/或減緩增生性病徵、腫瘤或/及癌症之治療活性化合物的衍生物或前驅體，該前藥可由前藥轉化酶轉化。前藥可為熟習此項技術者已知之化合物。衍生物及/或前驅體為熟習此項技術者所知。

前藥較佳基本上無醫藥活性及/或無毒性。

本發明之前藥轉化酶之實例為 β -葡糖苷酸酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖苷酶、羧肽酶、 β -內醯胺酶、D-胺基酸氧化酶。其他實例為熟習此項技術者所知。

較佳地，前藥轉化酶基本上不表現於非腫瘤細胞中。

前藥轉化酶可獲自選自哺乳動物、植物、真菌及微生物(諸如細菌、原生動物及病毒)之生物體。

前藥轉化酶與前藥之最佳組合為大腸桿菌 β -葡糖苷酸酶與可藉由 β -葡糖苷酸酶轉化為活性細胞毒性化合物之前藥。實例為可轉化為阿黴素(doxorubicin)之HMR1826(阿黴素-葡糖苷酸)，阿黴素為用於治療癌症之已知化合物。

本發明之另一目標為一種治療增生性疾病、尤其過度增生疾病(諸如腫瘤或癌症)之方法，其包含向有需要之個體投與醫藥學上有效量之本發明之重組溶瘤病毒、本發明之病毒基因組、本發明之病毒反基因組及/或本發明之DNA分子，該等物質包含至少一個如本文中所述之編碼前藥轉

化酶之其他轉殖基因。

特定言之，本發明之目標為一種治療增生性疾病、尤其過度增生疾病(諸如癌症)之方法，其包含以醫藥學有效量向有需要之個體投與：

- (i) 包含至少一個編碼前藥轉化酶之轉殖基因的本發明之重組溶瘤病毒、本發明之病毒基因組、本發明之病毒反基因組及/或本發明之DNA分子，及
- (ii) 適用於治療增生性疾病之前藥，該前藥可藉由(i)之前藥轉化酶轉化為醫藥活性化合物。

該方法可包含投與包含組份(i)與(ii)之單一醫藥組合物，或可包含投與兩種不同醫藥組合物，其一者包含組份(i)且另一者包含組份(ii)。

蛋白酶

在本發明之溶瘤重組RNA病毒中，至少一個當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因可編碼蛋白酶。

因此，本發明之目標為一種醫藥組合物，其包含本發明之重組溶瘤病毒、本發明之病毒基因組、本發明之病毒反基因組及/或本發明之DNA分子作為活性成份，以及視需要之醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或佐劑，該病毒、病毒基因組、反基因組及/或DNA分子包含至少一個當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之編碼蛋白酶之其他轉殖基因。醫藥組合物可適用於治療及/或減緩增生性病徵。

若本發明之溶瘤重組RNA病毒編碼蛋白酶，則本發明之溶瘤病毒可促使通常不表現或不充分表現蛋白酶之病毒感染靶細胞(尤其腫瘤細胞)選擇性表現蛋白酶。因此，在治療有需要之個體期間，蛋白酶可使靶細胞中之靶多肽不可逆地分裂，從而抑制靶細胞之增殖及/或生長或殺死靶細胞，但在非靶細胞、尤其所治療之個體之健康細胞中基本上不使靶分子分裂。藉由此策略降低蛋白酶治療之不良副作用。

蛋白酶較佳為序列特異性蛋白酶。特異性分裂靶多肽的蛋白酶更佳。蛋白酶可為天然來源且可源自任何物種或其可經工程化。適用於特異性分裂預定靶多肽之胺基酸序列可由熟習此項技術者(例如)基於公開可獲得之序列資料庫來判定。US 2005-0175581及US 2004-0072276描述具有預定受質特異性之蛋白質工程化蛋白酶的產生。此兩份文件以引用的方式併入本文中。

蛋白酶之靶分子可為如下文針對結合蛋白之標靶所述之任何靶分子。

本發明之另一目標為一種治療增生性疾病、尤其過度增生疾病(諸如腫瘤或癌症)之方法，其包含以醫藥學有效量向有需要之個體投與本發明之重組溶瘤病毒、本發明之病毒基因組、本發明之病毒反基因組及/或本發明之DNA分子，該等物質包含至少一個當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之編碼蛋白酶之其他轉殖基因。

本發明之轉殖基因可編碼如上文所定義之前藥轉化酶、

如上文所定義之結合分子與/或如上文所定義之蛋白酶之融合蛋白。尤其較佳為前藥轉化酶與結合分子之融合蛋白或蛋白酶與結合分子之融合蛋白。

治療性應用

本發明係關於一種醫藥組合物，其包含如本文中所述之病毒、病毒核鞘、病毒基因組或編碼基因組之DNA分子或/及病毒反基因組作為活性成份，以及視需要之醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或佐劑。

醫藥組合物可以溶液、懸浮液、凍乾劑或任何其他合適形式提供。除活性成份之外，組合物亦可包含如此項技術中已知之載劑、緩衝劑、界面活性劑及/或佐劑。組合物可(例如)經口、局部、經鼻、經肺或藉由局部或靜脈內注射來投與。視病症類型、患者病況及體重、投藥途徑等而定，以醫藥學有效量投與醫藥組合物。較佳地，每次施用投與 10^9 至 10^{12} 個病毒顆粒， 10^8 至 10^{11} 、 10^7 至 10^{10} 或 10^6 至 10^9 個病毒顆粒。溶瘤療法可視情況與其他腫瘤療法組合，該等療法諸如手術、放射及/或化學療法(諸如環磷醯胺治療及/或高熱治療)。

另一態樣為一種治療增生性疾病或/及癌症之方法，其包含以醫藥學有效量向有需要之個體投與如本文中所述之重組溶瘤病毒、病毒核鞘、病毒基因組或編碼基因組之DNA分子或/及病毒反基因組，以及視需要之醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或佐劑。

根據本發明，重組溶瘤副黏液病毒可表現可保留於感染

細胞中或可被分泌的可溶性結合蛋白、前藥轉化酶及/或蛋白酶，諸如抗體、抗體片段、錨蛋白重複蛋白或如下文所說明之其他結合分子。

以NDV為例，本申請案中選擇病毒株MTH68的原因在於其具有固有溶瘤特性，具有來自患者實驗性臨床治療之令人期望之資料(Sinkovics及Horvath，2000)。然而，原則上大多數具有多鹼基融合蛋白分裂位點之NDV病毒株均可用作治療腫瘤之溶瘤劑。反向遺傳學技術適用於所有病毒株。

如本文中所述之結合蛋白已證明具有高治療潛力。

溶瘤NDV與具有上述特性之治療性結合蛋白、前藥轉化酶及/或蛋白酶之組合將具有兩種治療成份之相加或甚至協同功效。溶瘤性自我複製病毒使結合蛋白藥物、前藥轉化酶及/或蛋白酶靶向於其受高局部濃度原位表現之較佳作用位點。預期該蛋白質表現極具選擇性且具有各別作用模式之結合蛋白、前藥轉化酶及/或蛋白酶將增加NDV之固有治療溶瘤活性。基於所用病毒有複製能力之性質及在腫瘤細胞中之選擇性複製，預期經表現轉殖基因[結合蛋白、前藥轉化酶及/或蛋白酶]之量與腫瘤質量大致成比例。

抗體分子或抗體樣分子或其衍生物為與NDV系統一起使用之理想結合蛋白。抗體分子已為深入研究之目標且目前已有可用技術來產生無免疫原性、極具選擇性且具有高親和力之抗體分子。抗體分子受高濃度之局部表現導致極顯著的激動或拮抗功效或效應分子之有效靶向，與標準療法相比具有降低的毒性概況。

預期在NDV系統中使用抗體樣分子將更為優良。此等分子係針對選擇性高親和力結合來設計，與普通抗體相比具有極高熱穩定性及產率。在基於錨蛋白之抗體樣分子之情況下，可根據優化靶向、結合、抑制或活化之各別目標調整分子之重複性質。亦可在一個錨蛋白分子內組合不同結合特異性，從而開拓將具有不同結合特異性之數個單元接合於一個錨蛋白重複序列分子中的可能性。與可用於抗體之蛋白質表面相比，此模組化結構允許更大蛋白質表面之多價結合，此對於阻斷蛋白質-蛋白質相互作用極為重要。亦可開發僅以一個單阻斷性錨蛋白重複蛋白阻斷數個效應子的模組化結構。

由於錨蛋白重複分子甚至在還原條件下亦極為穩定，因此此等分子可設計成靶向細胞內蛋白質("胞內蛋白")。

亦可使用結合蛋白編碼序列之文庫與NDV進行活體內標靶識別。

結合分子或/及蛋白酶之可能標靶可為可由所述結合蛋白或/及蛋白酶識別且與特定類型之病理表現型相關的靶細胞或靶細胞周圍細胞外基質之所有結構。此等結構可為結構蛋白、酶、生長因子、生長因子受體、整合素、轉錄因子等。

本發明甚至可針對小分子不可藥化之標靶(蛋白質-蛋白質相互作用、DNA結合等)。

如本文中所述之溶瘤NDV與治療性結合蛋白、前藥轉化酶及/或蛋白酶之組合可望用於治療發炎性疾病(例如，風

濕性關節炎)及癌症。

對於治療癌症而言，可靶向造成癌症發展之所有路徑。此等路徑為：生長信號之自足、對生長抑制(抗生長)信號不敏感性、逃避細胞凋亡、無限複製潛力、持續血管新生及組織侵襲及轉移。此等路徑概述於Hanahan及Weinberg (2000)中。涉及腫瘤發生過程且可由所述方法靶向之信號傳導路徑為受體酪胺酸激酶路徑(RTK)、RB及p53路徑、細胞凋亡路徑、APC路徑、HIF1路徑、GLI路徑、PI3K路徑及SMAD路徑。此等信號傳導路徑詳細說明於Vogelstein及Kinzler (2004)中。

所述結合蛋白可干擾之其他信號傳導路徑為ras、Wnt及刺蝟因子(Hedgehog)路徑，其中例如可阻斷蛋白質-蛋白質相互作用。

有益干預癌細胞中上述路徑之結合蛋白之實例為：

- 自主活性生長因子受體(例如EGFR、Met)之阻斷蛋白
- 生長因子之競爭結合劑(拮抗劑)
- Rb-磷酸化之阻斷蛋白
- E2F依賴性轉錄之阻斷蛋白
- p53穩定劑
- 抗細胞凋亡蛋白(例如Bcl-2)之拮抗結合劑
- 細胞週期素(cyclins)之拮抗結合劑
- Ras效應子(例如GEFs)之拮抗結合劑
- 缺氧誘導蛋白(例如HIF1 α)之拮抗結合劑
- 干擾二聚化、DNA結合或/及輔助因子結合之轉錄因子

(例如 Myc/Max)之抑制劑

- 分化誘導劑
- smad信號傳導/易位之抑制劑
- 細胞黏附相互作用(鈣黏素(cadherins)、整合素，例如 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$)之抑制劑
- 降解細胞外基質之酶(例如 MMPs)之抑制劑
- 促血管新生(proangiogenic)配體(例如可溶性 VEGF-R)之拮抗結合劑
- 有絲分裂激酶(例如 Plk-1)之抑制劑
- 促血管新生受體之拮抗結合劑
- 骨架複合物形成(例如 KSR/Ras)之抑制劑
- 轉譯起始(eIF4E、EIF2a)之抑制劑。

本發明之蛋白酶、前藥轉化酶及/或由本發明之前藥經前藥轉化酶衍生的治療活性化合物亦可有益地干預癌細胞之上述路徑。

重組病毒

重組病毒意謂在基因組RNA序列中具有工程化限定改變之病毒。此改變可為一或多個插入、缺失、點突變或其組合。

本發明之重組RNA病毒可包含天然(未經修飾)RNA病毒之全長基因組序列或其衍生序列且可另外包含至少一個重組轉錄匣。該至少一個轉錄匣可位於病毒基因組之兩個基因(轉錄單元)之間。在此情況下，該至少一個轉錄匣側接轉錄起始及終止序列。該至少一個轉錄匣亦可位於病毒基

因組之轉錄單元內。在此情況下，不需要其他轉錄起始及終止序列。

該至少一個轉錄匣可包含可為單一的限制位點，諸如PacI或/及AscI。若存在兩個轉錄匣，則其可包含不同限制位點。

本發明之RNA病毒較佳包含一或兩個重組轉錄匣。

可編碼如本文中所述之結合蛋白、前藥轉化酶及/或蛋白酶之轉殖基因位於本發明之至少一個轉錄匣中。

病毒基因組中每兩個基因(轉錄單元)之間的任何基因間區域適於至少一個重組轉錄匣引入。若存在一個以上重組轉錄匣，則其可位於相同或不同的基因間區域中。至少一個重組轉錄匣較佳位於病毒F與HN基因之間，尤其本發明之RNA病毒為重組新城雞瘟病毒時。

對於副黏液病毒基因組之尺寸無已知上限。因此，對於引入本發明之重組RNA病毒中之轉殖基因之數目及尺寸無上限。轉殖基因(如本文中所述，編碼鳥類細胞激素之轉殖基因，或至少一個當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性之其他轉殖基因，或其組合)較佳獨立地具有至多約10 kb、更佳至多約5 kb、最佳至多約2 kb之尺寸。

在如本文中所述之轉殖基因之表現(包括病毒RNA轉錄為mRNA及mRNA之轉譯)中，使用表現控制序列，諸如轉錄起始及終止序列及控制轉譯之序列。可使用RNA病毒之表現控制序列，該RNA病毒可為本發明之重組RNA病毒所基於之RNA病毒。特定言之，轉錄起始及終止序列可獲自

RNA病毒。表現控制序列(尤其控制轉譯及/或蛋白質轉運之序列)亦可獲自靶細胞。

基因組或反基因組RNA因副黏液病毒之複製機制而一般不以裸RNA呈現。基因組及反基因組RNA係與核蛋白一起組裝。因此，本發明之另一目標為一種本發明之重組溶瘤RNA病毒之核鞘。核鞘包含編碼RNA病毒之基因組或/及反基因組之RNA分子及核鞘蛋白。核鞘亦可包含聚合酶蛋白L或/及磷蛋白P。

本發明之目標亦為如本文中所述之本發明之基因組之反基因組。

本發明之另一態樣為一種DNA分子，其編碼本發明之重組溶瘤RNA病毒之基因組或/及反基因組。DNA分子可為質體。本發明之DNA分子可用於本發明之RNA病毒之遺傳工程化。此外，DNA分子亦可用於製造本發明之RNA病毒。因此，DNA分子可經操作性地連接至轉錄控制序列，例如原核或真核轉錄控制序列。

本發明之另一態樣為一種製造由編碼本發明之重組溶瘤病毒(尤其本發明之重組溶瘤NDV)之基因組及/或反基因組之DNA分子所表現之重組溶瘤RNA病毒之方法。

本發明之另一態樣為一種細胞，其包含本發明之重組溶瘤病毒、本發明之病毒基因組、本發明之病毒反基因組及/或本發明之DNA分子。該細胞可為原核細胞或真核細胞。該細胞可為細胞株，尤其為哺乳動物細胞株，更尤其為人類或鼠科動物細胞株。該細胞可用於製造本發明之RNA病

毒的本發明之方法中。適用於轉錄DNA分子之系統為熟習此項技術者所知，例如原核系統(諸如大腸桿菌)或真核系統(諸如海拉細胞(HeLa)或CHO)。

另一態樣為一種溶瘤RNA病毒、其基因組或反基因組或DNA分子，該溶瘤RNA病毒、其基因組或反基因組或DNA分子包含副黏液病毒之全套基因或副黏液病毒之一組基因，其中至少一個基因或基因間區域經遺傳修飾，且進一步包含至少一個如本文中所述之重組轉錄匣。該病毒、基因組或反基因組或DNA分子可用於製造藥劑及/或治療癌症。該RNA病毒、基因組、反基因組或DNA分子適用於藉由遺傳工程化技術構築重組副黏液病毒，尤其重組新城雞瘟病毒，以將重組序列引入轉錄匣中。為此，至少一個轉錄匣可包含限制位點。若存在一個以上轉錄匣，則轉錄匣之單一限制位點可不同。一實例為WO 2006/050984之圖1之質體pflMTH68_Asc_Pac，該案之揭示內容以引用的方式併入本文中。另一實例為如WO 2006/050984之圖2中所揭示之pflMTH68鼠科IgG EDB，該案之揭示內容以引用的方式併入本文中。

治療相關性

癌症或/及腫瘤之治療包括抑制腫瘤生長，較佳藉由感染殺死腫瘤細胞或阻斷間隙期內之增殖。NDV選擇性複製於腫瘤細胞中。

本發明之病毒可用於治療增生性病變，尤其過度增生性病變。較佳地，可用所述病毒治療贅瘤，較佳選自由肺癌、

結腸癌、前列腺癌、乳癌及腦癌組成之群的癌症。

更佳可治療實體腫瘤。

更佳可治療具有低增生速率之腫瘤。具有低增生速率之腫瘤之實例為前列腺癌或乳癌。

更佳可治療腦腫瘤。

更佳可治療神經膠母細胞瘤。

哺乳動物包括人類、小鼠及大鼠。

重組RNA病毒之製造

本發明之重組RNA病毒、尤其重組NDV可如 Romer-Oberdorfer 等人(1999)所述來構築。在cDNA水準上構築新核酸序列，接著在真核細胞中使用以下起始質體將其轉譯為RNA：pCITE P、pCITE N、pCITE L、pX8δT flNDV。

NDV可為新城雞瘟病毒之任何病毒株，更佳為其野生型具有溶瘤性之病毒株。

質體pX8δT描述於EP 0 702 085(Conzelmann KK)中。

本發明之重組RNA病毒、尤其重組NDV最初可自T7聚合酶表現細胞(例如BHK T7細胞或經T7聚合酶瞬時轉染之CHO細胞)中回收。其可擴增於如293、CEC32、HT29或A431之細胞中。其亦可擴增於受精雞蛋之尿囊液中。

重組RNA病毒、尤其重組NDV在以下條件下儲存。重組RNA病毒、尤其NDV在5% D-甘露糖醇/1%(w/v)L-離胺酸/pH 8.0或標準細胞培養基中：

在-20°C下穩定長達1個月；

在-80°C下穩定長達10年。

本發明之重組RNA病毒可使用野生型病毒或重組病毒作為起始物質來製造。亦可使用核酸，諸如DNA，包括該野生型或重組序列。舉例而言，可使用如WO 2006/050984中所述之重組RNA病毒或/及DNA分子作為起始物質。一實例為WO 2006/050984之圖1之質體pflMTH68_Asc_Pac。另一實例為WO 2006/050984之圖2之pflMTH68鼠科IgG EDB。WO 2006/050984之揭示內容以引用的方式併入本文中。特定言之，WO 2006/050984中有關重組溶瘤RNA病毒及其構築之揭示內容以引用的方式併入本文中。

重組NDV作為藥劑之用途

本發明之重組RNA病毒、尤其本發明之經純化重組NDV因其展示藥理作用而可用作藥劑。

本發明之重組RNA病毒(尤其本發明之NDV)、病毒基因組、反基因組、核鞘及/或DNA分子可用於製造藥劑，該藥劑尤其用於預防、減緩或/及治療癌症、腫瘤或/及增生性疾病，尤其用於預防、減緩或/及治療癌症，諸如肺癌、前列腺癌、腦癌、結腸癌、乳癌。

本發明之醫藥組合物視情況包含醫藥學上可接受之載劑及稀釋劑。該等載劑及稀釋劑描述於Remington's Pharmaceutical Science，第15版，Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (1980)中。視治療適應症而定，該醫藥組合物中所用或/及本發明之治療方法中所用之病毒效價可在每劑 10^9 至 10^{12} pfu之範圍內，在 10^8 至 10^{11} pfu之範圍內，在 10^7 至 10^{10} pfu之範圍內或在 10^6 至 10^9 pfu之範圍內。

本發明之醫藥組合物可用於預防或/及治療增生性病
症，諸如癌症。

本發明之醫藥組合物可包含本發明之重組溶瘤RNA病
毒、尤其本發明之NDV之乳液且可藉由吸入、靜脈內輸
液、皮下注射、腹膜內注射或腫瘤內注射來投與。

在本發明之預防或/及治療增生性病(尤其癌症)之方法
中，醫藥學有效量為本發明之溶瘤RNA病毒(尤其本發明
之NDV)、本發明之病毒基因組或本發明之DNA分子預
防、減緩或/及抑制疾病之效價。

對於治療作用而言，可接受劑量可視(例如)構築體、患
者、投藥途徑及癌症類型而定。

個體(患者)較佳為哺乳動物，更佳為人類患者。

藉由以下圖式及實例進一步說明本發明。

實例1：

形成具有引起雞細胞激素之表現之鳥類源轉殖基因之重組
NDV

使用NDV之溶瘤病毒株MTH68獲得病毒RNA。使用RT-
PCR獲得數個cDNA片段且以多步選殖程序將其組裝為全
長基因組cDNA，將其選殖入載體pX8δT(Schnell等人，
1994)中而產生質體pflMTH68。此載體可用於轉染以自T7-
聚合酶表現細胞株中救出重組病毒。

另一轉錄匣選殖於NDV MTH68(pflMTH68)之全長基因
組質體內、編碼F蛋白與HN蛋白之基因之間、單一SfiI限
制位點內。將兩個DNA寡核苷酸：

Sfi 前 (5'-aggccttaattaaccgacaacttaagaaaaatacgggtagaacggcctgag-3', SEQ. ID. NO: 1)與

Sfi 後 (5'-aggccgttctaccgctatTTTTCTTAAGTTGTCGGTTAATTAAGGCCTCTC-3', SEQ. ID. NO: 2)

黏接且隨後接合於 pflMTH68之 SfiI位點內。

藉由 PCR 擴增編碼 ChIFN- α (NM_205427) 及 ChIFN- β (NM_001024836) 之兩個 DNA 轉殖基因。使用 Schultz 等人, 1995 及 Sick 等人, 1996 所述之 ChIFN- α 及 ChIFN- β 表現構築體作為聚合酶鏈反應之模板。對於擴增 ChIFN- α 轉殖基因而言, 使用以下引子對: ChIFN- α fw(5'-ccttaattaagcc accatggctgtgcctgcaagccc-3' SEQ. ID. NO: 3) 及 ChIFN- α -rev (5'-ccttaattaactaagtgcgcgtgttgccctgtg-3' SEQ. ID. NO: 4), 且對於擴增 ChIFN- β 編碼序列而言, 使用以下兩個引子: PacI ChIFN- β fw(5'-ccttaattaacgcacatgactgcaaaccatcagtctccagg-3' SEQ. ID. NO: 5) 及 ChIFN- β -rev(5'-ccttaattaatcactgggtgttgag acgtttggatg-3' SEQ. ID. NO: 6)。

將兩個 chIFN 轉殖基因之每一者分別選殖入質體 pflMTH68Pac 之 PacI 位點內。將基因組總長調整為 6 的倍數以遵循病毒基因組長度之 "6 位規則"。藉由核苷酸定序確認 ChIFN- β 插入物之序列一致性。在 ChIFN- α 插入物中, 與序列 NM_205427 相比, 偵測到位置 89 處之一核苷酸交換 (G 交換為 A)。藉由標準病毒拯救技術自經含有 ChIFN- α (圖 1) 或 ChIFN- β (圖 2) 基因之全長病毒基因組質體感染的 T7 表現細胞中救出重組病毒。將所得表現 ChIFN- α 之病毒命名為

NDV-ChIFN- α 且將表現ChIFN- β 之NDV命名為NDV-ChIFN- β 。將病毒在組織培養物或雞蛋之尿囊液中培養以產生高效價。

實例2：

由重組NDV所表現之ChIFN- α 及ChIFN- β 具有生物活性

材料及方法：

將CEC-32細胞(鳥類鵝鶉細胞株)或海拉細胞(子宮頸癌細胞株)以 1×10^5 個細胞/孔接種於6孔培養盤中。在黏附後，用表現GFP之對照病毒NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 、NDV-ChIFN- β 或MOCK使用MOI 0.01感染細胞。64 h後，收集上清液且藉由UV照射滅活感染性病毒顆粒。

為證明病毒感染之細胞之上清液中之ChIFN- α 或ChIFN- β 之生物活性，使用雞干擾素特異性生物檢定(Schwarz等人，JICR, 2005)。該檢定係基於載有由IFN反應性雞Mx啟動子所控制之螢光素酶基因的經穩定轉染之鵝鶉細胞株CEC-511。當將CEC-511指示細胞與ChIFN- α 或ChIFN- β 一起培育時，誘導螢光素酶活性。為執行此檢定，將15,000個CEC-511細胞接種於96孔培養盤中。接種24 h後，將細胞用具有病毒感染之海拉細胞或CEC-32細胞之經UV處理的上清液處理。將細胞用75 μ l經1:100稀釋的各別上清液培育。作為陽性對照，將細胞用經ChIFN- α 或ChIFN- β 之表現質體轉染之293T細胞之1:1000稀釋上清液(Sick等人，1996)培育或僅用培養基培育。6 h培育時間後，遵循製造商所提供之方案執行Steady-Glo[®]螢光素酶檢定(Promega)。

為測定平均值，各資料點重複量測三次。

結果：

感染 64 h 後，經 NDV-ChIFN- α 及 NDV-ChIFN- β 感染之 CEC-32 及海拉細胞之上清液對 CEC-511 細胞具有強螢光素酶誘導活性，從而表明病毒介導所感染之細胞表現 ChIFN- α 及 ChIFN- β 。相比而言，經 MOCK 感染之細胞或經表現 GFP 之對照病毒感染之細胞的上清液未展示針對 CEC-511 指示細胞株之螢光素酶誘導活性。含有重組 ChIFN- α 或 ChIFN- β 之 1:1000 稀釋上清液亦展示 ChIFN 依賴性 Mx 啟動子誘導活性。

表 1：經表現 ChIFN- α 或 ChIFN- β 之重組 NDV 感染之 CEC-32 及海拉細胞之上清液中之干擾素活性。量測載有 Mx 啟動子控制之螢光素酶報導基因的指示細胞中之 IFN 反應。量測值以相對螢光素酶計數給出。

	CEC-32			
	NDV-GFP	NDV-ChIFN- α	NDV-ChIFN- β	MOCK
平均值	308	11991	8033	246
標準偏差	86	283	423	27
	海拉細胞			
	NDV-GFP	NDV-ChIFN- α	NDV-ChIFN- β	MOCK
平均值	237	11739	5095	290
標準偏差	19	1835	78	39
	ChIFN- α	ChIFN- β	培養基	
平均值	4849	2128	237	
標準偏差	107	15	21	

實例 3：

經表現 ChIFN- α 或 ChIFN- β 之重組 NDV 感染之鳥類細胞免於病毒溶解而腫瘤細胞不免於病毒溶解

材料及方法：

3 a.) 將 CEC-32 細胞 (鳥類鵝鶉細胞株) 或海拉細胞 (子宮頸癌細胞株) 以 1×10^5 個細胞/孔接種於 6 孔培養盤中。在黏附後，用對照病毒 NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 、NDV-ChIFN- β 或 MOCK 使用 MOI 0.01 感染細胞。48 h 後，將細胞 4% 甲醛溶液固定且用吉姆沙 (Giemsa) 溶液染色。隨後使用 Zeiss Axiophot 成像系統執行攝像記錄。

3 b.) 將 CEC-32 細胞 (鳥類鵝鶉細胞株) 或海拉細胞 (子宮頸癌細胞株) 以 15,000 個細胞/孔接種於 96 孔培養盤中。在黏附後，用對照病毒 NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 、NDV-ChIFN- β 或 MOCK (= 未經感染) 使用 MOI 0.01 感染細胞。48 h 培育時間後，遵循製造商所提供之方案執行 CellTiter-Glo[®] 螢光素酶檢定 (Promega) 以量測細胞存活率。為測定平均值，各資料點由 6 個獨立值產生。

結果：

圖 3. a) 48 h 後，鳥類 CEC-32 細胞被表現 GFP 之 NDV (NDV-GFP) 溶解。相比而言，經表現 ChIFN- α 之病毒感染之細胞部分地免於溶解。經 NDV-ChIFN- α 感染之 CEC-32 單層 25-50% 完整。更強之保護見於表現 ChIFN- β 之 NDV。48 h 後，CEC-32 單層幾乎 90-100% 完整且免於病毒溶解。此單層之密度與經 MOCK 感染之 CEC-32 細胞之單層類似。

三種病毒對致瘤性海拉細胞株之感染展示病毒NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 與NDV-ChIFN- β 之間類似的溶瘤活性。48 h後，經NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 或NDV-ChIFN- β 感染之海拉細胞之單層幾乎被完全破壞。吉姆沙染色細胞之藍色指示，經MOCK感染之海拉細胞之細胞單層完整。

圖3 b)在第二個實驗中，在表現ChIFN之NDV感染48 h後量化細胞存活率。經NDV-GFP感染之鳥類CEC-32細胞展示僅3%剩餘細胞存活率。在經NDV-ChIFN- α 感染之CEC-32細胞中，剩餘細胞26%完整。CEC-32鵝鶉細胞株經NDV-ChIFN- β 感染48 h後，94%細胞存活且免於病毒溶解。

相比而言，致瘤性海拉細胞株經三種病毒NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 或NDV-ChIFN- β 感染後，觀察到細胞破壞幾乎無任何差異。48 h後，對於所有三種病毒，細胞存活率值均在3%-9%之間，表明腫瘤細胞幾乎完全破壞。

實例4：

表現ChIFN- α 或ChIFN- β 之重組NDV對腫瘤細胞而不對原代細胞選擇性溶瘤

材料及方法：

將5000個原代纖維母細胞或3000個海拉細胞接種於96孔培養盤之各孔中。接種16 h後，製備NDV-GFP病毒稀釋液(NDV-GFP)、NDV-ChIFN- α 病毒稀釋液(NDV-ChIFN- α)及NDV-ChIFN- β 病毒稀釋液(NDV-ChIFN- β)。將纖維母細胞用指定濃度病毒感染。作為陰性對照，纖維母細胞經

MOCK感染。1 h後，移除接種體，將細胞用PBS洗滌且在細胞培養恆溫箱中用200 μ l細胞培養基培育4天。隨後，將剩餘細胞用4%甲醛溶液固定且用結晶紫(crystal violet)染色。使用10%冰醋酸溶解色斑且以ELISA閱讀器、在595 nm下量測各孔之吸光度。

結果：

感染4天後，使用MOI 0.001至MOI 0.1之間的MOI、經三種病毒NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 及NDV-ChIFN- β 感染之原代纖維母細胞幾乎未展示增殖抑制(圖4)。增殖抑制之初始跡象僅在每個細胞使用1或10個病毒顆粒感染之MOI下觀察到。相比而言，在MOI 0.001與MOI 10之間的MOI下感染之致瘤性海拉細胞展示極強的增殖抑制。此結果表明重組NDV尤其在如MOI 0.1及MOI 0.001之低MOI下具有極佳治療窗，在該等MOI下量測到對原代細胞幾乎無溶解作用而量測到對致瘤性海拉細胞中具有極強的生長抑制作用。在腫瘤細胞及原代細胞之殺死曲線形狀方面，觀察到對照病毒NDV-GFP與表現ChIFN之病毒NDV-ChIFN- α 及NDV-ChIFN- β 之間無差異。

實例5：

經表現ChIFN- α 或ChIFN- β 之重組NDV感染之雞胚的存活時間延長

材料及方法：

分別用NDV-ChIFN- α 、NDV-ChIFN- β 、NDV-GFP或非致病性NDV病毒株LaSota感染15個11日齡受精雞蛋之群組。

使用經無菌PBS稀釋之尿囊液中之蛋生長病毒作為感染物質。施用200 μ l總體積中4000 PFU之感染劑量。將接種體注射入尿囊腔中。感染後，將蛋在蛋孵化箱(breeder)中、在37℃及50%-60%濕度下培育。每天兩次、在指定時點(圖5)對光檢查蛋且檢查胚胎的生命跡象。此檢定允許藉由比較受感染胚胎之存活時間來比較不同NDV病毒株之致病性。該方法係基於R.P. Hanson(1980)所述之"最小致死劑量之平均死亡時間(MDT/MLD)"測定。此方案修改成，將病毒原液之非連續稀釋液接種於蛋中，而非以高於最小致命劑量之濃度注射一劑限定病毒劑量。出於倫理原因，此檢定修改減少測試所用胚胎數目。MDT由下式測定：

$$MDT = ((X \text{ hr之死亡數}) \times (X \text{ hr}) + Y \text{ hr之死亡數}) \times (y \text{ hr}) \text{ 等} / \text{總死亡數}$$

結果：

與經NDV-GFP感染之胚胎相比，經NDV-ChIFN- α 及NDV-ChIFN- β 感染之雞胚的存活提高。經NDV-GFP感染之受精蛋在24 h與62 h之間喪失生命跡象，得到50 h之MDT(平均死亡時間)。經NDV-ChIFN- α 感染之胚胎存活長達96 h，具有69 h之MDT計算值。對經NDV-ChIFN- β 感染之胚胎量測到類似存活時間及74 h之MDT。經NDV-ChIFN- β 感染之胚胎大多數在48 h與96 h之間死亡。檢定靈敏度藉由使用無致病性或弱毒型病毒株LaSota指示。甚至經NDV LaSota病毒株接種之受精蛋在62 h至115 h之間死

亡，具有 85 h 之 MDT 計算值。此實驗展示中間毒型 NDV MTH68 之 MDT 向弱毒型 NDV 病毒株偏移。

參考文獻

- Adams, G.P. 及 Weiner, L.M. (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23, 1147-1157.
- Alexander, D.J. (1988) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- Allen, T.M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2, 750-763.
- Amstutz, P., Binz, H.K., Parizek, P., Stumpp, M.T., Kohl, A., Grutter, M.G., Forrer, P. 及 Pluckthun, A. (2005) Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem*, 280, 24715-24722.
- Antoniw, P., Springer, C.J., Bagshawe, K.D., Searle, F., Melton, R.G., Rogers, G.T., Burke, P.J. 及 Sherwood, R.F. (1990) Disposition of the prodrug 4-(bis(2-chloroethyl) amino) benzoyl-L-glutamic acid and its active parent drug in mice. *Br J Cancer*, 62, 909-914.
- Bagshawe, K.D., Springer, C.J., Searle, F., Antoniow, P., Sharma, S.K., Melton, R.G. 及 Sherwood, R.F. (1988) A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites. *Br J Cancer*, 58, 700-703.
- Batra, J.K., Fitzgerald, D.J., Chaudhary, V.K. 及 Pastan, I. (1991)

Single-chain immunotoxins directed at the human transferrin receptor containing *Pseudomonas* exotoxin A or diphtheria toxin: anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-anti-TFR(Fv). *Mol Cell Biol*, 11, 2200-2205.

Batra, J.K., Kasprzyk, P.G., Bird, R.E., Pastan, I. & King, C.R.

(1992) Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5867-5871.

Bell, J.C., Garson, K.A., Lichty, B.D. & Stojdl, D.F. (2002)

Oncolytic viruses: programmable tumor hunters. *Curr Gene Ther*, 2, 243-254.

Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C.,

Forrer, P., Grutter, M.G. & Pluckthun, A. (2004) High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol*, 22, 575-582.

Bosslet, K., Czech, J., Lorenz, P., Sedlacek, H.H., Schuermann,

M. & Seemann, G. (1992) Molecular and functional characterisation of a fusion protein suited for tumor specific prodrug activation. *Br J Cancer*, 65, 234-238.

Carnemolla, B., Borsi, L., Balza, E., Castellani, P., Meazza, R.,

Berndt, A., Ferrini, S., Kosmehl, H., Neri, D. & Zardi, L.

(2002) Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*, 99, 1659-1665.

- Chaudhary, V.K., Gallo, M.G., FitzGerald, D.J. 及 Pastan, I. (1990)
A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9491-9494.
- Chaudhary, V.K., Queen, C., Junghans, R.P., Waldmann, T.A., FitzGerald, D.J. 及 Pastan, I. (1989) A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature*, 339, 394-397.
- Chiocca, E.A. (2002) Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer*, 2, 938-950.
- Csatary, L.K., Gosztonyi, G., Szeberenyi, J., Fabian, Z., Liska, V., Bodey, B. 及 Csatary, C.M. (2004) MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol*, 67, 83-93.
- De Lorenzo, C., Arciello, A., Cozzolino, R., Palmer, D.B., Laccetti, P., Piccoli, R. 及 D'Alessio, G. (2004) A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res*, 64, 4870-4874.
- Engel-Herbert, I., Werner, O., Teifke, J.P., Mebatsion, T., Mettenleiter, T.C. 及 Romer-Oberdorfer, A. (2003) Characterization of a recombinant Newcastle disease virus expressing the green fluorescent protein. *J Virol Methods*, 108, 19-28.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. 及 Novotny, W. (2004)

Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 391-400.

Ford, K.G., Souberbielle, B.E., Darling, D.及Farzaneh, F. (2001) Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther*, 8, 1-4.

Georgakis, G.V., Li, Y., Humphreys, R., Andreeff, M., O'Brien, S., Younes, M., Carbone, A., Albert, V.及Younes, A. (2005) Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *Br J Haematol*, 130, 501-510.

Gerber, H.P. 及 Ferrara, N. (2005) Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*, 65, 671-680.

Hanahan, D.及Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

Hanson, R.P: (1980) Newcastle Disease.於Hitchner, S. B.(編). Isolation and identification of avian pathogens. College Station, Tex:American Association of Avian Pathologists中。

Herbst, R.S. 及 Langer, C.J. (2002) Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role

of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol*, 29, 27-36.

Hogbom, M., Eklund, M., Nygren, P.A. & Nordlund, P. (2003)

Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3191-3196.

Huang, Z., Elankumaran, S., Panda, A. & Samal, S.K. (2003)

Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Poult Sci*. 82, 899-906.

Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A.S. & Samal, S.K. (2004) A

recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol*, 78, 10054-10063.

Huang, Z., Krishnamurthy, S., Panda, A. & Samal, S.K. (2001)

High-level expression of a foreign gene from the most 3'-proximal locus of a recombinant Newcastle disease virus. *J Gen Virol*, 82, 1729-1736.

Kreitman, R.J., Chaudhary, V.K., Waldmann, T.A., Hanchard, B.,

Cranston, B., FitzGerald, D.J. & Pastan, I. (1993) Cytotoxic activities of recombinant immunotoxins composed of *Pseudomonas* toxin or diphtheria toxin toward lymphocytes from patients with adult T-cell leukemia. *Leukemia*, 7, 553-562.

Kaiser, P, Poh, T.Y., Rothwell, L., Avery, S., Balu, S., Pathania,

U.S., Hughes, S., Goodchild, M., Morrell, S., Watson, M.,

- Bumstead, N., Kaufman, J.及Young, J.R. (2005) A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J Interferon Cytokine Res.* 25: 467-484.
- Kreitman, R.J.及Pastan, I. (1995) Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of *Pseudomonas* exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J*, 307 (Pt 1), 29-37.
- Krishnamurthy, S., Huang, Z.及Samal, S.K. (2000) Recovery of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology*, 278, 168-182.
- Kuan, S.F., Byrd, J.C., Basbaum, C.B. 及 Kim, Y.S. (1987) Characterization of quantitative mucin variants from a human colon cancer cell line. *Cancer Res*, 47, 5715-5724.
- Ladner, R.C.及Ley, A.C. (2001) Novel frameworks as a source of high-affinity ligands. *Curr Opin Biotechnol*, 12, 406-410.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D. (2001) Paramyxoviridae: The Viruses And Their Replication. 於 Fields, B.N.(編),*Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 1305-1485頁。
- Lorence, R.M., Pecora, A.L., Major, P.P., Hotte, S.J., Laurie, S.A., Roberts, M.S., Groene, W.S. 及 Bamat, M.K. (2003) Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Curr Opin Mol Ther*, 5, 618-624.
- Mizukami, Y., Jo, W.S., Duerr, E.M., Gala, M., Li, J., Zhang, X.,

- Zimmer, M.A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L.R., Kohgo, Y., Lynch, M.P., Rueda, B.R. 及 Chung, D.C. (2005) Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med*, 11, 992-997.
- Nakaya, T., Cros, J., Park, M.S., Nakaya, Y., Zheng, H., Sagrera, A., Villar, E., Garcia-Sastre, A. 及 Palese, P. (2001) Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J Virol*, 75, 11868-11873.
- Noonberg, S.B. 及 Benz, C.C. (2000) Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs*, 59, 753-767.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Uhl inverted question mark, M. 及 Nygren, P.A. (2000) Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq DNA polymerase. *J Biotechnol*, 80, 45-54.
- Roffler, S.R., Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y. 及 Tung, E. (1991) Anti-neoplastic glucuronide prodrug treatment of human tumor cells targeted with a monoclonal antibody-enzyme conjugate. *Biochem Pharmacol*, 42, 2062-2065.
- Romer-Oberdorfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz, U.J. 及 Mettenleiter, T.C. (1999) Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol*, 80 (Pt 11), 2987-2995.

- Rowlinson-Busza, G., Bamias, A., Krausz, T. 及 Epenetos, A.A. (1992) Antibody guided enzyme nitrile therapy (Agent): in vitro cytotoxicity and in vivo tumor localisation. 於 Epenetos, a. (編), Monoclonal Antibodies 2. Applications in Clinical Oncology. Chapman and Hall, London, 111-118 頁。
- Russell, S.J. (2002) RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther*, 9, 961-966.
- Salgaller, M.L. (2003) Technology evaluation: bevacizumab, Genentech/Roche. *Curr Opin Mol Ther*, 5, 657-667.
- Schnell, M.J., Mebatsion, T. 及 Conzelmann, K.K. (1994) Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *Embo J*, 13, 4195-4203.
- Schultz, U., Rinderle, C., Sekellick, M.J., Marcus, P.I. 及 Staeheli, P. (1995) Recombinant chicken interferon from *Escherichia coli* and transfected COS cells is biologically active. *Eur J Biochem*. 229:73-76.
- Schwarz, H., Harlin, O., Ohnemus, A., Kaspers, B. 及 Staeheli, P. (2004) Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay. *J Interferon Cytokine Res*. 24:179-184.
- Sick, C., Schultz, U. 及 Staeheli, P. (1996) A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *J Biol Chem.*, 271, 7635-7639.
- Sinkovics, J.G. 及 Horvath, J.C. (2000) Newcastle disease virus

(NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol*, 16, 1-15.

Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-350.

Staeheli, P., Puehler, F., Schneider, K., Gobel, T.W. & Kaspers, B.

(2001) Cytokines of birds: conserved functions--a largely different look. *J Interferon Cytokine Res*. 2001 21:993-1010.

Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E.G., Durbin, R.K., Durbin, J.E., Hiscott, J. & Bell, J.C. (2003) VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*, 4, 263-275.

Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10, 789-799.

Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. & Heldin, C.H. (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 269, 26988-26995.

Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y., Ng, J.C., Tung, E. & Roffler, S.R. (1992) Specific activation of glucuronide prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy. *Cancer Res*, 52, 4484-4491.

Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Gillett, N.A. & Ferrara, N.

(1995) Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*, 95, 1789-1797.

Zewe, M., Rybak, S.M., Dubel, S., Coy, J.F., Welschhof, M., Newton, D.L.及Little, M. (1997) Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion. *Immunotechnology*, 3, 127-136.

Zhao, H.及Peeters, B.P. (2003) Recombinant Newcastle disease virus as a viral vector: effect of genomic location of foreign gene on gene expression and virus replication. *J Gen Virol*, 84, 781-788.

【圖式簡單說明】

圖 1 描述包含 NDV 之全基因組及一個包含雞干擾素- α (ChIFN- α)轉殖基因之轉錄匣的質體 pflMTH68 ChIFN- α 。

圖 2 描述包含 NDV 之全基因組及一個包含雞干擾素- β (ChIFN- β)轉殖基因之轉錄匣的質體 pflMTH68 ChIFN- β 。

圖 3a 展示鳥類 CEC-32 細胞株在 NDV-ChIFN- α 感染 48 h 後部分地免於溶解且在 NDV-ChIFN- β 感染後受到強保護。表現 GFP 之 NDV 感染完全破壞 CEC-32 單層。相比而言，在感染致瘤性海拉細胞株後，三種病毒 NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 與 NDV-ChIFN- β 之間未見溶解作用差異。與所用病毒無關，海拉細胞單層在感染 48 h 後完全破壞。

圖 3b 定量展示 CEC-32 及海拉細胞經病毒 NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 及 NDV-ChIFN- β 感染 48 h 後之細胞存活率。

經 NDV-GFP 感染後，觀察到 CEC-32 細胞幾乎被完全殺死，僅 3% 細胞存活。鵝鶉細胞經 NDV-ChIFN- α 感染後，感染細胞 26% 保持存活。經 NDV-ChIFN- β 病毒感染後觀察到最佳保護，CEC-32 細胞 96% 存活。相比而言，與所用重組 NDV 無關，感染 48 h 後致瘤性海拉細胞之存活率降低至 10% 以下。

圖 4 展示大治療窗存在於腫瘤細胞及纖維母細胞經 NDV-ChIFN- α 及 NDV-ChIFN- β 感染後。溶瘤病毒 NDV-ChIFN- α 及 NDV-ChIFN- β 對腫瘤細胞之增殖抑制作用極強且相比而言，原代纖維母細胞尤其在如 MOI 0.1 及 0.01 之低 MOI 下感染後，觀察到幾乎無生長抑制作用。

圖 5a 描述經四種病毒 NDV-GFP、NDV-ChIFN- α 、NDV-ChIFN- β 及無致病性病毒株 LaSota NDV 感染之受精雞蛋的存活曲線。經 NDV-ChIFN- α 或 NDV-ChIFN- β 感染之雞胚存活長於經 NDV-GFP 感染之胚胎。該等曲線明顯朝弱毒型 NDV LaSota 病毒株存活曲線之方向偏移。

圖 5b：根據存活曲線之結果，計算各感染組之 MDT(平均死亡時間)。與 NDV-GFP 相比，病毒 NDV-ChIFN- α 及 ChIFN- β 之 MDT 增加。對無致病性病毒株 LaSota 觀察到最高 MDT。

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：98103098

※申請日：98.1.23

※IPC 分類：~~C12N~~A61K^{39/17} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

編碼鳥類細胞激素之減毒溶瘤副黏液病毒

ATTENUATED ONCOLYTIC PARAMYXOVIRUSES ENCODING
AVIAN CYTOKINES

C12N^{15/45} (2006.01)
C12N^{7/04} (2006.01)
A61P^{35/00} (2006.01)
(2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種用於治療增生性疾病之重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒(Newcastle Disease Virus)，其包含至少一個編碼鳥類細胞激素之轉殖基因，其中該重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒可自強毒型(velogenic)或中間毒型(mesogenic)溶瘤RNA新城雞瘟病毒獲得。該細胞激素在天然宿主細胞中之病毒介導表現導致該病毒對鳥類之致病性降低。此外，該病毒基因組可編碼結合蛋白、前藥轉化酶或/及蛋白酶。此等分子在受病毒感染之腫瘤細胞中之選擇性表現增強該病毒之抗腫瘤作用。

三、英文發明摘要：

The invention refers to a recombinant oncolytic RNA Newcastle Disease Virus for the treatment of a proliferative disease, comprising at least one transgene coding for an avian cytokine, wherein the recombinant oncolytic RNA Newcastle Disease Virus is obtainable from a velogenic or mesogenic oncolytic RNA Newcastle Disease Virus. Virus-mediated expression of the cytokine in the natural host cells leads to a reduced pathogenicity of the virus for avian species. Furthermore the virus genome can encode binding proteins, prodrug-converting enzymes or/and proteases. The selective expression of these molecules in virus-infected tumor cells increases the anti-tumor effect of the virus.

七、申請專利範圍：

1. 一種重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒(Newcastle Disease Virus)，其包含至少一個編碼鳥類細胞激素之轉殖基因，其中該重組溶瘤RNA新城雞瘟病毒可自強毒型(velogenic)或中間毒型(mesogenic)溶瘤RNA新城雞瘟病毒獲得。
2. 如請求項1之病毒，其包含至少一個其他轉殖基因，當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性。
3. 如請求項2之病毒，其中該至少一個其他轉殖基因相對於宿主為部分異基因(allogene)或同基因(syngene)。
4. 如請求項1至3中任一項之病毒，其中該病毒對鳥類之致病性降低。
5. 如請求項4之病毒，其中該病毒對鳥類之致病性相對於可產生該重組病毒之病毒降低。
6. 如請求項4或5之病毒，其中該鳥類係選自家禽。
7. 如請求項4至6中任一項之病毒，其中該鳥類為雞。
8. 如請求項1至7中任一項之病毒，其為鳥類病原體，尤其為家禽之病原體，更尤其為雞之病原體。
9. 如請求項1至8中任一項之病毒，其可自中間毒型病毒株MTH68獲得。
10. 如請求項1至9中任一項之病毒，其中該至少一個其他轉殖基因編碼結合蛋白，當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性。
11. 如請求項10之病毒，其中該結合蛋白係選自由以下組成

之群：天然配體、經遺傳修飾之配體、天然受體及其修飾型式之重組可溶域、肽配體、多肽配體、抗體分子及其片段及衍生物，及如錨蛋白(ankyrin)重複蛋白之抗體樣分子及其片段及衍生物。

12. 如請求項10或11之病毒，其中該結合蛋白為哺乳動物(例如人類、鼠科動物)或密切相關來源之蛋白，或嵌合蛋白。
13. 如請求項10至12中任一項之病毒，其中該結合蛋白為單體、二聚體、三聚體、四聚體或多聚體蛋白。
14. 如請求項10至13中任一項之病毒，其中該結合蛋白具有單特異性、雙特異性或多特異性。
15. 如請求項10至14中任一項之病毒，其中該結合蛋白為包含至少一個結合域及至少一個異源域之融合蛋白。
16. 如請求項15之病毒，其中該結合蛋白為包含毒素(諸如人類核糖核酸酶(假單胞菌外毒素、白喉毒素))之融合蛋白，或包含酶(如 β -葡糖苷酸酶(glucuronidase)、 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖苷酶、羧肽酶、 β -內醯胺酶)之融合蛋白，或包含具有細胞激素活性之免疫刺激蛋白(如IL-2、IL-12、TNF- α 、IFN- β 或GM-CSF)之融合蛋白。
17. 如請求項10至16中任一項之病毒，其中該結合蛋白係選自由以下組成之群：自主活性生長因子受體(例如EGFR、Met)之阻斷蛋白；生長因子之競爭結合劑(拮抗劑)；Rb-磷酸化之阻斷蛋白；E2F依賴性轉錄之阻斷蛋白；p53穩定劑；抗細胞凋亡蛋白(例如Bcl-2)之拮抗結

合劑；細胞週期素(cyclins)之拮抗結合劑；Ras效應子(例如 GEFs)之拮抗結合劑；缺氧(hypoxia)誘導蛋白(例如 HIF1 α)之拮抗結合劑；干擾二聚化、DNA結合或/及輔助因子結合之轉錄因子(例如 Myc/Max)之抑制劑；分化誘導劑；smad信號傳導/易位之抑制劑；細胞黏附相互作用(鈣黏素(cadherins)、整合素，例如 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$)之抑制劑；降解細胞外基質之酶(例如 MMPs)之抑制劑；促血管新生(proangiogenic)配體(例如可溶性 VEGF-R)之拮抗結合劑；促血管新生受體之拮抗結合劑；骨架複合物形成(例如 KSR/Ras)之抑制劑；轉譯起始(例如 eIF4E、EIF2a)之抑制劑；及有絲分裂激酶(例如 Plk-1)之抑制劑。

18. 如請求項1至9中任一項之病毒，其中該至少一個其他轉殖基因編碼前藥轉化酶，當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性。
19. 如請求項1至9中任一項之病毒，其中該至少一個其他轉殖基因編碼蛋白酶，當由病毒感染之腫瘤細胞表現時具有治療活性。
20. 如前述請求項中任一項之病毒，其中該至少一個轉殖基因編碼之鳥類細胞激素係選自雞干擾素。
21. 如請求項20之病毒，其中該至少一個轉殖基因編碼之鳥類細胞激素係選自雞I型干擾素。
22. 如請求項5至21中任一項之病毒，其中該致病性降低為以 MOI 0.01 感染後約 48 h 該病毒降低鳥細胞溶解之能力，藉由增加細胞存活率所測量，其中相對於可產生該

重組病毒之病毒，該細胞存活率增加至至少約25%至多達約50%存活細胞，更佳增加至至少約50%至多達約75%存活細胞，且最佳增加至至少約75%至多達100%存活細胞。

23. 如請求項5至21中任一項之病毒，其中該致病性降低為11日齡受精蛋(embryonated eggs)中受病毒感染之雞胚的存活時間延長，藉由平均死亡時間(MDT)測定所測量，其中相對於可產生該重組病毒之病毒，該MDT延長至少約15 h至長達約20 h，更佳至少約20 h至長達約30 h，且最佳超過30 h。
24. 如請求項1至23中任一項之病毒，其中該病毒對人類腫瘤細胞之溶瘤活性基本上不降低。
25. 如請求項1至23中任一項之病毒，其中在感染後48 h後藉由細胞存活率所測量，該病毒對人類腫瘤細胞之溶瘤活性與可產生該重組病毒之病毒相比降低不超過50%，且更佳相對於可產生該重組病毒之病毒基本上不降低。
26. 一種如請求項1至25中任一項之重組溶瘤RNA病毒之核鞘(nucleocapsid)。
27. 一種如請求項1至25中任一項之重組溶瘤RNA病毒之基因組。
28. 一種DNA分子，其編碼如請求項1至25中任一項之重組溶瘤RNA病毒之基因組及/或反基因組。
29. 如請求項28之DNA分子，其係可操作地連接至一個轉錄控制序列。

30. 一種細胞，其包含如請求項1至25中任一項之重組溶瘤病毒、如請求項27之病毒基因組或/及如請求項28或29之DNA分子。
31. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至25中任一項之重組溶瘤病毒、如請求項27之病毒基因組或/及如請求項28或29之DNA分子作為活性成份，視需要與醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或佐劑。
32. 如請求項31之醫藥組合物，進一步包含一種前藥，其可經由該至少一個其他轉殖基因所編碼之前藥轉化酶轉化為治療活性化合物。
33. 一種治療增生性疾病之方法，該方法包含向需要之個體投與醫藥學有效量之如請求項1至25中任一項之重組溶瘤病毒、如請求項27之病毒基因組或/及如請求項28或29之DNA分子。
34. 如請求項33之方法，其包含以醫藥學有效量向需要之個體投與：
- (i) 包含至少一個編碼前藥轉化酶之轉殖基因的如請求項1至25中任一項之重組溶瘤病毒、如請求項27之病毒基因組或/及如請求項28或29之DNA分子，及
 - (ii) 適於治療該增生性疾病之前藥與該病毒組合，該前藥可藉由(i)之該前藥轉化酶轉化為醫藥活性化合物。
35. 如請求項33至34中任一項之方法，其中該個體為人類患者。

36. 一種對於家禽減毒之重組溶瘤RNA病毒，該病毒包含一種包含至少一個編碼細胞激素之轉殖基因的核酸。
37. 如請求項36之病毒，其對於雞減毒。

八、圖式：

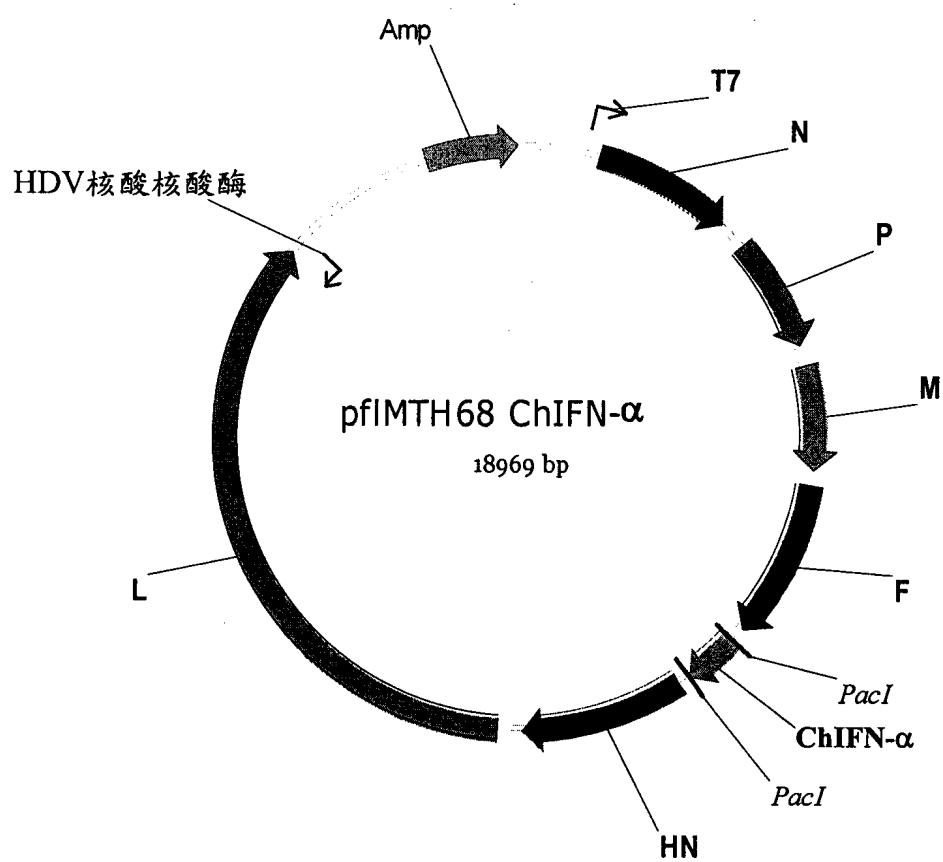
質體 pfIMTH68 ChIFN- α 

圖 1

質體 pflMTH68 ChIFN-β

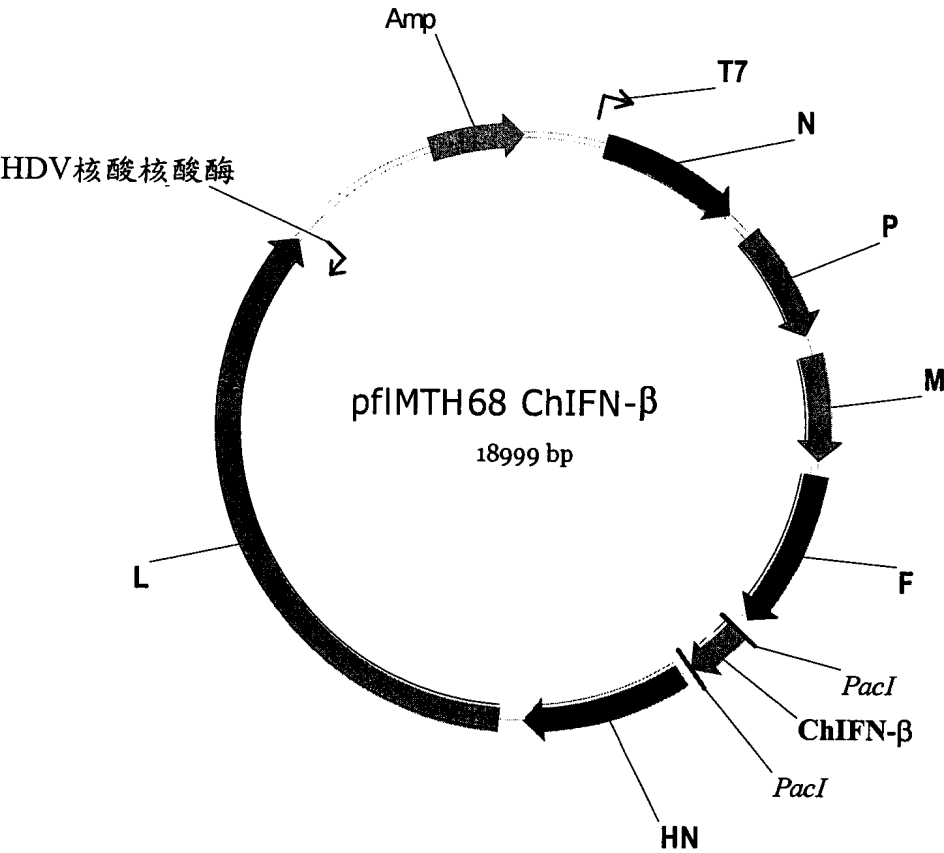


圖 2

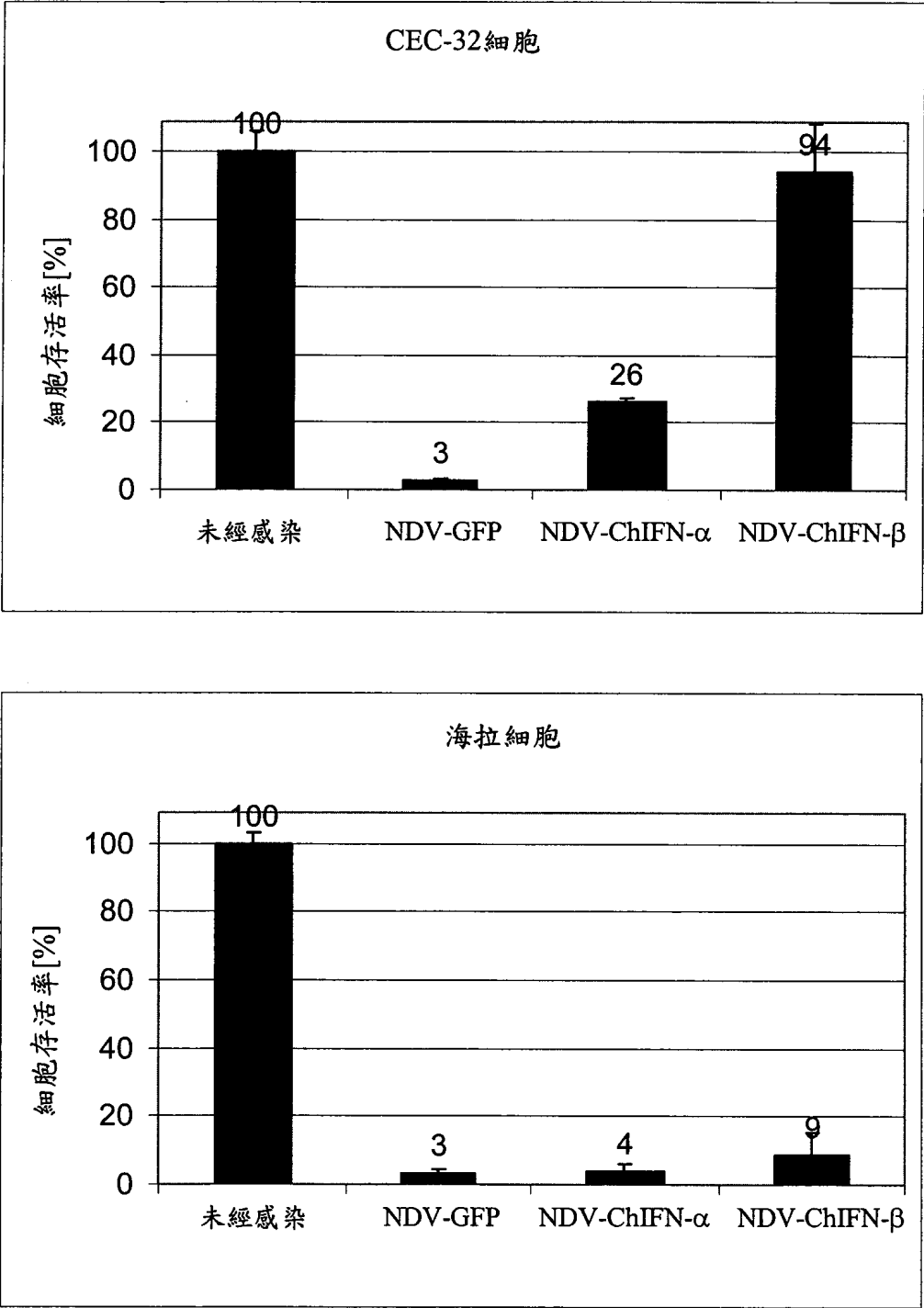


圖 3b

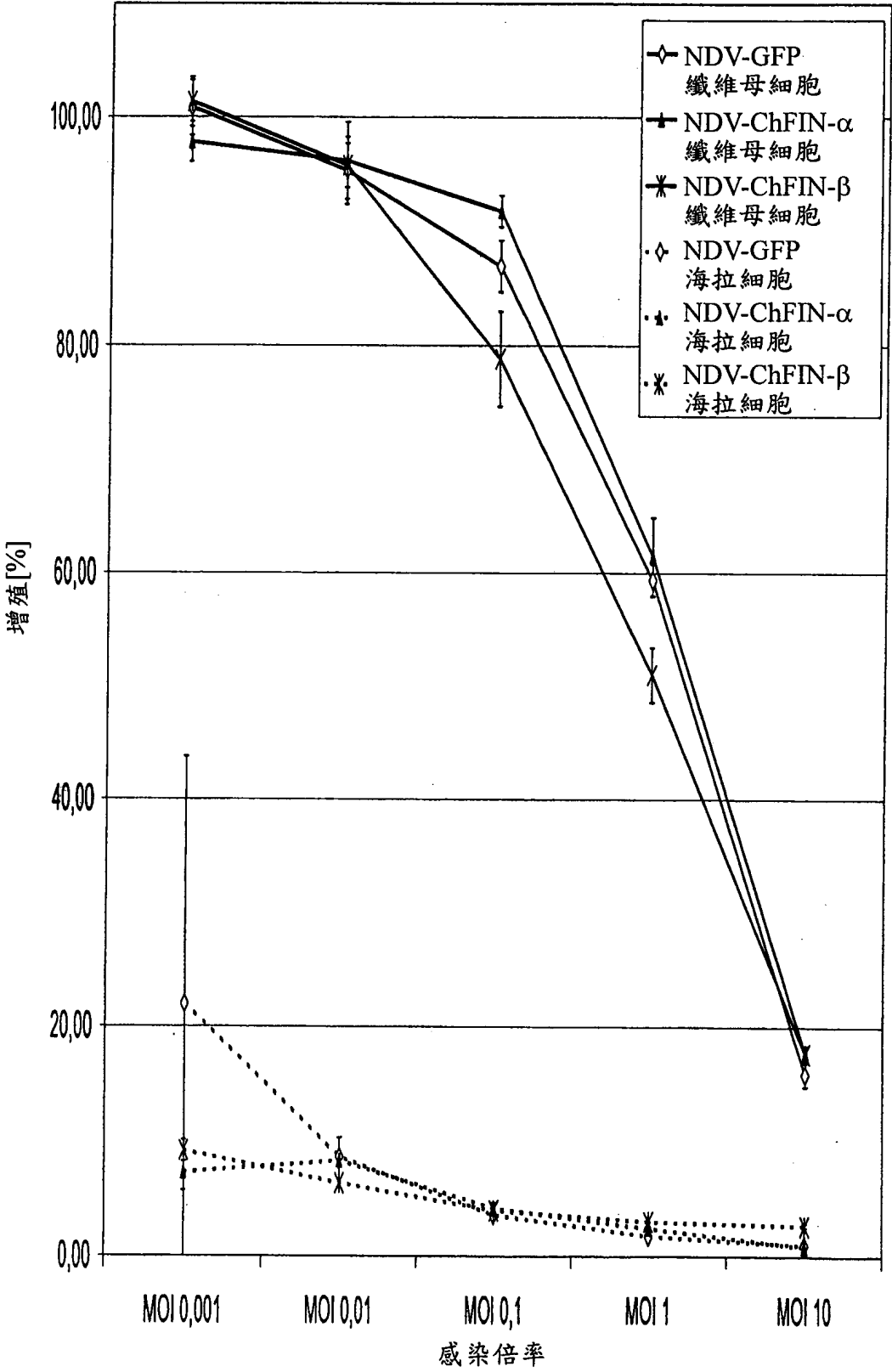


圖 4

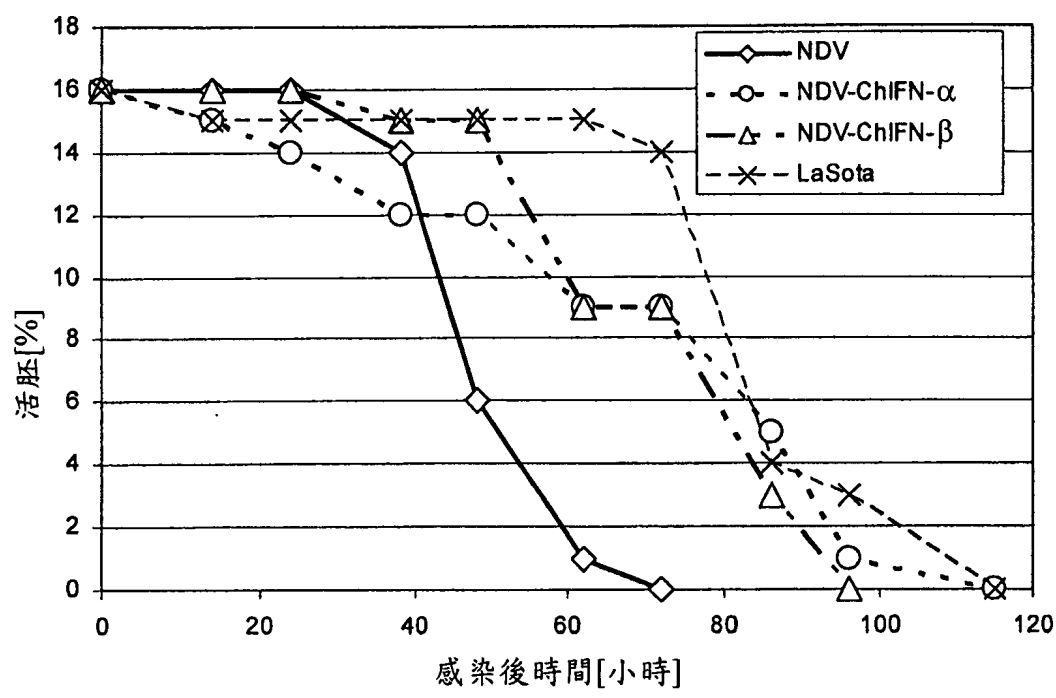


圖 5a

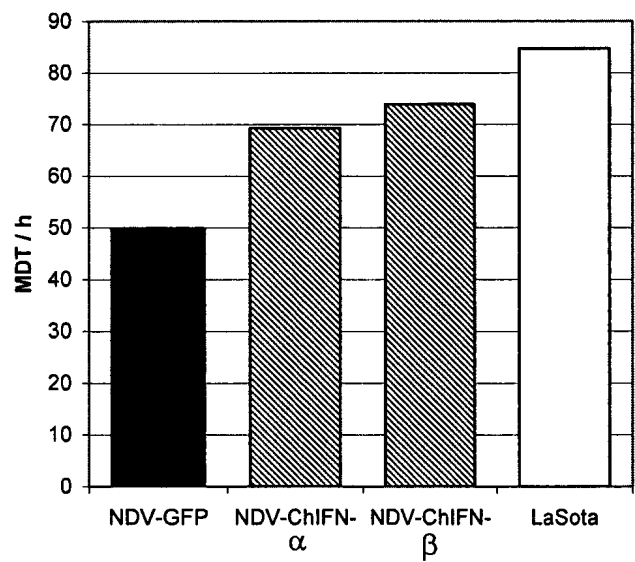


圖 5b

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (5a) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)