



(21) 申請案號：110143069

(22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 11 月 18 日

(51) Int. Cl. :

*C12N7/01 (2006.01)**C12N15/33 (2006.01)**A61K35/76 (2015.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2020/11/19

美國

63/116,004

(71) 申請人：美商凱立凡爾免疫治療股份有限公司 (美國) KALIVIR IMMUNOTHERAPEUTICS, INC. (US)

美國

(72) 發明人：索爾 史蒂芬 哈華德 THORNE, STEPHEN HOWARD (US)；張明睿 ZHANG, MINGRUI (CN)；伯德 丹尼爾 J BYRD, DANIEL J. (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：74 項 圖式數：5 共 98 頁

(54) 名稱

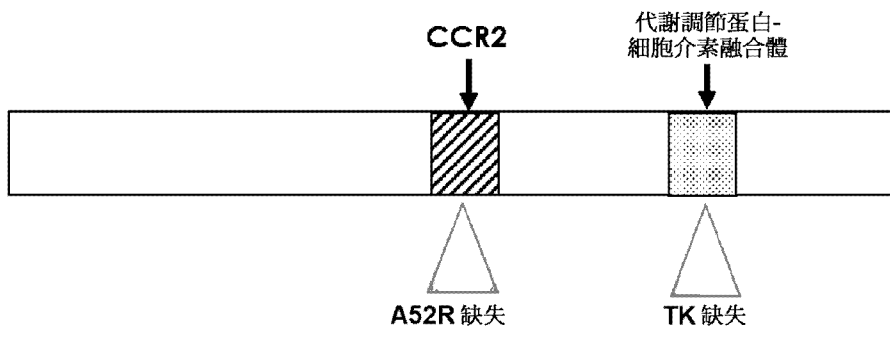
重塑腫瘤微環境的溶瘤免疫療法

(57) 摘要

本揭示案係關於經修飾之溶瘤病毒。本揭示案的經修飾之溶瘤病毒包含位於編碼外源核酸之病毒基因體中的修飾，以便藉由重塑腫瘤微環境及增強全身遞送來增強溶瘤免疫療法。本揭示案進一步關於包含經修飾之溶瘤病毒的組合物、含有該等溶瘤病毒的套組，及使用該等溶瘤病毒的方法。

The disclosure relates to modified oncolytic viruses. The modified oncolytic viruses of the disclosure comprise modification in the viral genome encoding exogenous nucleic acids to enhance the oncolytic immunotherapy by remodeling the tumor microenvironment and with enhanced systemic delivery. The disclosure further relates to compositions comprising the modified oncolytic viruses, kits containing the same, and methods of using the oncolytic viruses.

指定代表圖：



【圖1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

重塑腫瘤微環境的溶瘤免疫療法

【英文發明名稱】

ONCOLYTIC IMMUNOTHERAPY BY TUMOR MICRO-
ENVIRONMENT REMODELING

【中文】

本揭示案係關於經修飾之溶瘤病毒。本揭示案的經修飾之溶瘤病毒包含位於編碼外源核酸之病毒基因體中的修飾，以便藉由重塑腫瘤微環境及增強全身遞送來增強溶瘤免疫療法。本揭示案進一步關於包含經修飾之溶瘤病毒的組合物、含有該等溶瘤病毒的套組，及使用該等溶瘤病毒的方法。

【英文】

The disclosure relates to modified oncolytic viruses. The modified oncolytic viruses of the disclosure comprise modification in the viral genome encoding exogenous nucleic acids to enhance the oncolytic immunotherapy by remodeling the tumor microenvironment and with enhanced systemic delivery. The disclosure further relates to compositions comprising the modified oncolytic viruses, kits containing the same, and methods of using the oncolytic viruses.

【指定代表圖】

圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

重塑腫瘤微環境的溶瘤免疫療法

【英文發明名稱】

ONCOLYTIC IMMUNOTHERAPY BY TUMOR MICRO-
ENVIRONMENT REMODELING

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 近年來，免疫療法已作為極其有效的癌症治療工具出現。使用單株抗體介導計劃性死亡1 (PD-1)及細胞毒性T淋巴球相關抗原(CTLA-4)發生「檢查點」阻斷的免疫療法已對實體腫瘤產生持久反應，由此已獲美國食品及藥物管理局(FDA)批准用於多種適應症(La-Beck等人, 2015；Mahoney等人, 2015)。此等單藥免疫療法對大多數患者未產生長期持久的好處(Herbst等人, 2014；Weber等人, 2015)，原因在於限制T細胞在腫瘤微環境中發揮功能的免疫抑制機制更占主導優勢(Sharma等人, 2015)。需要開發出一種改良的溶瘤免疫療法以重塑腫瘤微環境，從而增強T細胞功能及分化且能夠增強病毒的全身遞送。

【發明內容】

【0002】 本文提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其包含：編碼包含代謝調節蛋白或其功能片段或變異體的融合蛋白的外源核酸，其中編碼該融合蛋白的外源核酸包含：包含IL-2或其功能片段的多肽，及包含瘦素或其功能片段的多肽；編碼趨化因子受體或其功能片段或變異體

的外源核酸，其中該趨化因子受體為CCR2；及經修飾之溶瘤病毒之病毒基因體中的基因修飾。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中編碼趨化因子受體的外源核酸包含趨化因子受體之人類編碼序列的密碼子優化變異體。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中該融合蛋白進一步包含細胞介素或其功能片段或變異體。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中病毒骨架中的基因修飾為A52R基因之突變或缺失。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中該缺失為完全或部分缺失。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒進一步包含胸苷激酶基因缺失。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒包含麻疹病毒、脊髓灰白質炎病毒、痘病毒、牛痘病毒、腺病毒、腺相關病毒、單純疱疹病毒、水泡性口炎病毒、里奧病毒(reovirus)、新城雞瘟病毒(Newcastle disease virus)、塞內卡病毒(Seneca virus)、慢病毒、門戈病毒(mengovirus)或黏液瘤病毒。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒為痘病毒。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中痘病毒為牛痘病毒。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中牛痘病毒為西方儲備株(Western Reserve strain)牛痘病毒、哥本哈根株(Copenhagen strain)、IHD株、惠氏株(Wyeth strain)、NYCBOH株、天壇株(Tian Tan strain)、李斯特株(Lister strain)、安卡拉株(Ankara strain)、USSR株、ACAM2000株、巴黎株(Paris strain)、伯恩株(Bern strain)、天壇株(Temple of Heaven strain)、戴爾倫株(Dairen strain)、EM-63株、伊凡氏株(Evans strain)、肯恩株(King strain)、帕瓦丹加株(Patwadangar strain)或撻什肯株(Tash Kent strain)。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中將

編碼融合蛋白的外源核酸選殖入胸苷激酶基因的基因座中。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中將編碼趨化因子受體的外源核酸選殖入A52R基因的基因座中。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中編碼IL-2或其功能片段的多肽包含與序列SEQ ID NO: 4至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中編碼瘦素或其功能片段的多肽包含與序列SEQ ID NO: 5至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中編碼包含代謝調節蛋白或其功能片段或變異體之融合蛋白的外源核酸包含與序列SEQ ID NO: 1至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中編碼趨化因子受體或其功能片段或變異體的外源核酸包含與序列SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其進一步包含編碼玻璃醛酸酶的外源核酸。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中該玻璃醛酸酶為PH-20或HysA。

【0003】 本文提供經修飾之溶瘤病毒，其包含編碼瘦素-介白素(IL)-2融合蛋白的外源核酸；編碼CCR2的外源核酸；及A52R基因缺失。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒包含麻疹病毒、脊髓灰白質炎病毒、痘病毒、牛痘病毒、腺病毒、腺相關病毒、單純疱疹病毒、水泡性口炎病毒、里奧病毒、新城雞瘟病毒、塞內卡

病毒、慢病毒、門戈病毒或黏液瘤病毒。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒為痘病毒。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中痘病毒為牛痘病毒。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中牛痘病毒為西方儲備株牛痘病毒、哥本哈根株、IHD株、惠氏株、NYCBOH株、天壇株(Tian Tan strain)、李斯特株、安卡拉株、USSR株、ACAM2000株、巴黎株、伯恩株、天壇株(Temple of Heaven strain)、戴爾倫株、EM-63株、伊凡氏株、肯恩株、帕瓦丹加株或撻什肯株。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒進一步包含胸苷激酶基因缺失。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中將編碼瘦素-介白素(IL)-2融合蛋白的外源核酸選殖入胸苷激酶基因的基因座中。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其中將編碼CCR2的核酸選殖入A52R基因的基因座中。本文提供任一前述揭示內容的經修飾之溶瘤病毒，其進一步包含選自由以下組成之群之病毒基因的突變或缺失：A1、A2、VH1、A33、I7、K7R、B8R、C12L、B15R、B14R、K1L、N1L、M2L、A49R、A46R、E3L、C4、C16，及其功能域或片段或變異體，或其任何組合。本文進一步提供經修飾之溶瘤病毒，其進一步包含編碼以下至少一者的外源核酸：HMGB1、PIAS3、LIGHT、神經趨化蛋白(fractalkine)、ITAC、IL15、IL15R α 、CCL5、其功能域或片段或變異體，或其任何組合。

【0004】 本文提供醫藥組合物，其包含根據任一前述揭示內容的經修飾之溶瘤病毒。本文進一步提供醫藥組合物，其進一步包含以下至少一者：增溶劑、賦形劑或醫藥學上可接受之載劑。本文進一步提供醫藥組合物，其中賦形劑包含以下一者或多者：緩衝劑、穩定劑、

抗氧化劑、黏合劑、稀釋劑、分散劑、速率控制劑、潤滑劑、助滑劑、崩解劑、塑化劑、防腐劑或其任何組合。本文進一步提供醫藥組合物，其中該賦形劑包含二水合磷酸氫二鈉、二水合磷酸二氫鈉、氯化鈉、肌醇、山梨糖醇或其任何組合。本文進一步提供不包含防腐劑的醫藥組合物。本文進一步提供醫藥組合物，其進一步包含防腐劑、稀釋劑及載劑中的一者或多者。本文進一步提供醫藥組合物，其進一步包含另一種活性成分或其鹽。本文進一步提供醫藥組合物，其中增溶劑為無菌水。本文進一步提供醫藥組合物，其進一步包含另一種活性成分，其中該另一種活性成分為抗癌劑或另一種溶瘤病毒。

【0005】 本文提供包含任一前述揭示內容之經修飾之溶瘤病毒的套組。本文提供包含任一前述揭示內容之醫藥組合物的套組。本文進一步提供套組，其進一步包含抗癌劑或另一種溶瘤病毒中的至少一者。

【0006】 本文提供在向個體全身遞送經修飾之溶瘤病毒後，相對於包含TK突變但不包含編碼融合蛋白之外源核酸或編碼趨化因子受體之外源核酸之參考病毒的全身投與，增強該經修飾之溶瘤病毒之治療作用的方法，其包含全身投與根據任一前述揭示內容的經修飾之溶瘤病毒，或如任一前述揭示內容中所定義的醫藥組合物。

【0007】 本文提供治療方法，其包含向個體投與根據任一前述揭示內容的溶瘤病毒，或任一前述揭示內容的醫藥組合物，其中該投與相對於向個體投與參考溶瘤病毒，使得該個體的全身免疫反應增強，所述參考溶瘤病毒包含胸腺嘧啶核苷激酶基因缺失(TK-)且不包含編碼含有代謝調節蛋白或其功能性片段或變體之融合蛋白之外源核酸或

編碼趨化因子受體或其功能性片段或變體之外源核酸。本文進一步提供方法，其中該投與為全身投與。本文進一步提供方法，其中全身投與包含以下至少一者：瘤內、靜脈內、非經腸、皮內、肌肉內、經皮、直腸、尿道內、陰道內、鼻內、鞘內、腹膜內、牙內、皮下、經皮、氣管內、動脈內、膀胱內、吸入、經口或其任何組合。本文進一步提供方法，其中投與為瘤內投與。本文進一步提供方法，其中投與為靜脈內投與。本文進一步提供方法，其中個體患有癌症。

【0008】 本文提供治療個體之癌症的方法，該方法包含向該個體投與治療有效量之任一前述揭示內容的經修飾之溶瘤病毒。本文進一步提供方法，其中癌症為以下至少一者：黑色素瘤、肝細胞癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、腹膜癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、白血病、淋巴瘤、腎細胞癌、胰臟癌、上皮癌、胃/胃食管結合部腺癌、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、十二指腸癌、胰臟腺癌、腺樣囊性癌、肉瘤、間皮瘤、多形性神經膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、多發性骨髓瘤、前列腺瘤癌、肝細胞癌、膽管癌、胰臟腺癌、頭頸部鱗狀細胞癌、子宮頸鱗狀細胞癌、骨肉瘤、上皮性卵巢癌、急性淋巴母細胞性淋巴瘤、骨髓增生性腫瘤或其任何組合。本文進一步提供方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物係以包含約 10^6 PFU/mL至約 10^{10} PFU/mL溶瘤病毒之劑量投與。本文進一步提供方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物係以包含約 5×10^9 PFU/mL溶瘤病毒之劑量投與。本文進一步提供方法，其中在第一時段以初始劑量、在第二時段以中等劑量及在第三時段以高劑量獨立地投與經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物。本文進一步提供方法，其包含獨立地投與初始劑量、中

等劑量及高劑量，其中初始劑量低於中等劑量且中等劑量低於高劑量。本文進一步提供方法，其中第一、第二及第三時段各為約1週至約3週。本文進一步提供方法，其中經修飾之溶瘤病毒及醫藥組合物獨立地包含以如下體積投與的液體劑型：約1 mL至約5 mL、約5 mL至10 mL、約15 mL至約20 mL、約25 mL至約30 mL、約30 mL至約50 mL、約50 mL至約100 mL、約100 mL至150 mL、約150 mL至約200 mL、約200 mL至約250 mL、約250 mL至約300 mL、約300 mL至約350 mL、約350 mL至約400 mL、約400 mL至約450 mL、約450 mL至500 mL、約500 mL至750 mL，或約750 mL至1000 mL。本文進一步提供方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物係以液體劑型、固體劑型、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。本文進一步提供方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物投與的持續時間為約1週、約2週、約3週、約4週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週或約12週。本文進一步提供方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物每天一次、每天兩次、每週一次、每兩週一次或每三週一次投與。本文進一步提供方法，其中藉由靜脈內、腹膜內或瘤內注射來投與經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物。本文進一步提供方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物以彈丸注射或緩慢輸注方式投與。本文進一步提供方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物的投與在第一次劑量投與的約1小時至約3天之後引起第一峰值病毒負荷且在約3天至約10天之後引起第二峰值病毒負荷。本文進一步提供方法，其包含投與另一種療法，其中該另一種療法投與的持續時間為約1週、約2週、約3週、

約4週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週或約12週。本文進一步提供方法，其中另一種療法每天一次、每週一次、每兩週一次或每三週一次投與。本文進一步提供方法，其中另一種療法係以液體劑型、固體劑型、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。本文進一步提供方法，其中另一種療法投與的持續時間為約1週、約2週、約3週、約4週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週或約12週。本文進一步提供方法，其中另一種療法每天一次、每週一次、每兩週一次或每三週一次投與。本文進一步提供方法，其中另一種療法係以液體劑型、固體劑型、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。本文進一步提供方法，其中另一種療法係經口、靜脈內、藉由瘤內注射或藉由放射投與。本文進一步提供方法，其中個體為人類。本文進一步提供方法，其中在經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物投與之前，個體已診斷患有癌症。本文進一步提供方法，其中在經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物或另一種療法投與之前，個體已診斷患有癌症。本文進一步提供方法，其中另一種療法包含化學療法、放射、使用另一種病毒的溶瘤病毒療法、使用免疫調節蛋白的療法、CAR T細胞療法、抗癌劑，或其任何組合。本文進一步提供方法，其中另一種療法包含投與免疫調節劑，其包含抗CD33抗體及其可變區、抗CD11b抗體及其可變區、COX2抑制劑、細胞介素、趨化因子、抗CTLA4抗體或其抗原結合片段、抗PD-1抗體或其抗原結合片段、抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，或TLR促效劑。本文進一步提供方

法，其包含投與另一種療法，其中該另一種療法包含投與抗癌劑，其中該抗癌劑為化學治療劑。

【圖式簡單說明】

【0009】 本揭示案之新穎特徵具體闡述於隨附申請專利範圍中。參考以下實施方式及其附圖將更好地瞭解本揭示案的特徵及優點，該實施方式闡述說明性實施例，其中利用本揭示案之原理：

【0010】 **圖1**展示為了對本揭示案之例示性的經修飾之牛痘病毒(縮寫為「MMC」)進行工程改造而自牛痘病毒骨架中缺失之基因及各別基因座處經取代之外源基因的圖示。

【0011】 **圖2A-2D**展示被修飾成缺失A52R及TK基因及插入CCR2及瘦素-IL-2的例示性的經修飾之牛痘病毒(縮寫為「MMC」)，其在LLC(路易斯肺癌)腫瘤模型中展示增強的治療作用及全身遞送。

【0012】 **圖3A-3B**展示例示性的經修飾之牛痘病毒(縮寫為「MMC」)，其在免疫接種前的小鼠中對LLC腫瘤模型展示增強的治療作用及全身遞送。

【0013】 **圖4**展示例示性的經修飾之牛痘病毒(縮寫為「MMC」)，其對RENCA腫瘤模型展示增強的治療作用。

【0014】 **圖5A-5B**展示例示性的經修飾之牛痘病毒(縮寫為「NT428N」)的生物分佈研究，其展示較高的腫瘤選擇性且在正常組織中的聚集較低。

【實施方式】

交叉引用

【0015】 本申請案主張2020年11月19日提申的美國臨時申請案第

63/116,004號的權益，所述臨時申請案以引用的方式併入本文中。

以引用的方式併入

【0016】 本說明書中提及的所有公開案、專利及專利申請案皆以引用的方式併入本文中，其程度如同各個別公開案、專利或專利申請案經具體且個別指示以引用的方式併入一般且如同全文闡釋一般。在如本文所用的術語與併入之參考文獻中所定義的術語之間存在衝突的情況下，以本揭示案的定義為準。

序列表

【0017】 本申請案含有序列表，該序列表已以ASCII格式透過電子方式提交且以全文引用的方式併入本文中。該ASCII複本於2021年11月15日創建，名稱為199249_703851_SL.txt且大小為10,425個位元組。

定義

【0018】 本文所用之術語僅出於描述特定個案之目的且不希望具有限制性。如本文所用，除非上下文另外明確指出，否則單數形式「一(a/an)」及「該(the)」亦可包括複數形式。此外，就實施方式及/或申請專利範圍中使用術語「含有(contains/containing)」、「包括(including/includes)」、「具有(having/has/with)」或其變化形式而言，此類術語意欲為包括性的，其方式類似於術語「包含」。

【0019】 術語「約」或「大約」可意謂如一般技術者所確定，在特定值之可接受的誤差範圍內，該範圍部分地取決於如何量測或測定該值，例如量測系統的侷限。舉例而言，根據指定值之實務，「約」可意謂在1或大於1個標準差內。在特定值描述於申請案及申請專利範

圍中的情況下，除非另有說明，否則術語「約」應設想意謂特定值的可接受之誤差範圍，諸如經術語「約」修飾之該值的 $\pm 10\%$ 。

【0020】 術語「個人」、「患者」或「個體」可互換使用。該等術語均不需要或不受限於以健康照護工作者(例如醫生、註冊護士、護士從業者、醫師助理、護理員或臨終關懷工作者)之監督(例如持續或間歇監督)為特徵的情形。在一些實施例中，患者、個體或個人可處於健康照護工作人員的監督下。

【0021】 如本文針對特定病毒所用的術語「異源核酸序列」或「外源核酸序列」可指源自除指定病毒之外的來源的核酸序列。「異源」基因、核酸、抗原或蛋白質應理解為不存在於野生型痘病毒基因體(例如MVA或MVA-BN)中的核酸或胺基酸序列。「異源基因」當存在於牛痘病毒(諸如MVA或MVA-BN)中時，可併入痘病毒基因體中，以使得經修飾之牛痘病毒在投與宿主細胞後，以相應的異源基因產物(諸如「異源抗原」及/或「異源蛋白質」)形式表現。可藉由使異源基因可操作地連接至允許其在牛痘病毒感染細胞中表現的調控元件來達成表現。調控元件包括天然或合成的牛痘病毒啟動子。

【0022】 如本文所用，可互換使用的術語「表現(expressed/express/expression)」及其類似形式可表示所關注之序列的單獨轉錄以及轉錄與轉譯。因此，在提及以DNA形式存在之核苷酸序列之表現時，由此表現產生的產物可為RNA(由欲表現之序列單獨轉錄而產生)或多肽序列(由欲表現之序列轉錄與轉譯而產生)。術語「表現」亦可包括RNA與多肽產物均可能來源於該表現且一起留在同一共享環境中。舉例而言，當mRNA在轉譯成多肽產物之後存留時，情況

即如此。如本文所用，術語「表現卡匣」可定義為典型地用於選殖及/或轉型之載體或重組病毒的一部分。表現卡匣可包含a)一種或多種編碼序列(例如開放閱讀框架(ORF)、基因、編碼蛋白質及/或抗原的核酸)，及b)控制一種或多種編碼序列表現的序列(例如啟動子)。另外，表現卡匣可包含3'非轉譯區(例如轉錄終止子，諸如牛痘轉錄終止子)。「表現卡匣」可與術語「轉錄單元」互換使用。

【0023】 如本文所用，術語「突變」可指缺失、異源核酸的插入、逆轉或取代，包括切除開放閱讀框的突變，如此項技術中通常所瞭解。

【0024】 如本文所用，術語「基因」可指編碼個別蛋白質或RNA的核酸區段(亦稱為「編碼序列」或「編碼區」)，其視情況具有相關調控區域，諸如啟動子、操縱子、終止子及其類似物，該等調控區域可位於編碼序列的上游或下游。

【0025】 如本文中可互換使用的術語「突變型病毒」與「經修飾之病毒」可指基因體中包含一個或多個突變的病毒，包括(但不限於)缺失、異源核酸的插入、逆轉、取代或其組合。

【0026】 提及病毒時，如本文所用的術語「天然存在」可表示該病毒可在自然界中發現，亦即，其可自自然界中的來源分離且尚未有意地經修飾。

【0027】 本文所提及的術語「抑制」、「減少」或「預防」或此等術語的任何變化形式可包括為了達成所需結果而實現的任何可量測的降低或完全抑制。

【0028】 如本文所用，「啟動子」可為控制序列，其為控制轉錄

起始及轉錄速率的核酸序列區域。在某些實施例中，啟動子可以含有可被調控蛋白及分子結合的基因元件，諸如RNA聚合酶及其他轉錄因子。術語「可操作地定位」、「可操作地連接」、「能夠作地連接」、「處於控制下」及「處於轉錄控制下」可意謂相對於控制該序列轉錄起始及/或表現的核酸序列，啟動子處於正確的功能位置及/或取向。在某些實施例中，啟動子可以聯合或可以不聯合「增強子」使用，「增強子」係指參與核酸序列轉錄活化的順式作用調控序列。

【0029】 如本文所用，術語「啟動子」可表示位於欲表現之核酸序列上游的核酸調控區域，通常為DNA，該核酸調控區域含有特定的DNA序列元件，該等元件被例如負責自所啟動之基因編碼區合成RNA的蛋白質轉錄因子及聚合酶識別及結合。由於啟動子典型地緊鄰於所討論之基因，因此啟動子的位置相對於轉錄起始位點標示，其中DNA轉錄始於特定基因(亦即，上游位置為自-1反向計數的負數，例如-100為上游100個鹼基對的位置)。因此，啟動子序列可包含直至位置-1的核苷酸。然而，始於位置+1的核苷酸不為啟動子的一部分，亦即，就此而言，須注意轉譯起始密碼子(ATG或AUG)不為啟動子的一部分。

「天然牛痘病毒啟動子」可為牛痘病毒基因體的內源啟動子。「合成的牛痘病毒啟動子」可意謂一種重組工程化啟動子，其具有引導欲被牛痘病毒(例如CEF細胞中的經修飾之牛痘病毒)表現之核酸發生轉錄的活性。

【0030】 如本文所用，「能夠操作地連接」意謂所述組件處於允許其以其預定方式發揮功能的關係，例如轉錄欲表現之核酸的啟動子。當第一核酸序列與第二核酸序列以功能關係置放時，該第一核酸

序列能夠操作地連接至該第二核酸序列。舉例而言，若啟動子置於其可引導編碼序列轉錄之位置，則該啟動子能夠操作地連接至該編碼序列。一般而言，能夠操作地連接的DNA序列為鄰接的，且必要時使兩個蛋白質編碼區接合於同一個閱讀框架中。

【0031】 術語「核酸」、「核苷酸序列」、「核酸序列」及「聚核苷酸」可互換地使用且係指線性或分支、單股或雙股RNA或DNA，或其雜合體。該術語亦涵蓋RNA/DNA雜合體。以下為聚核苷酸之非限制性實例：基因或基因片段、外顯子、內含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重組聚核苷酸、分支聚核苷酸、質體、載體、任何序列之經分離DNA、任何序列之經分離RNA、核酸探針及引子。聚核苷酸可包含經修飾之核苷酸(諸如甲基化核苷酸及核苷酸類似物)、尿嘧啶、其他糖類及連接基團(諸如氟核糖及硫醇鹽)，及核苷酸分支。核苷酸序列可在聚合之後進一步修飾，諸如與標記組分結合。此定義中所包括之其他類型的修飾為帽、一個或多個天然存在之核苷酸經類似物取代，及引入使聚核苷酸連接至蛋白質、金屬離子、標記組分、其他聚核苷酸或固體載體的手段。聚核苷酸可藉由化學合成獲得或衍生自微生物。

【0032】 術語「開放閱讀框」(ORF)係指可轉譯成胺基酸的核苷酸序列。典型地，此類ORF含有起始密碼子，即通常具有3個核苷酸之倍數長度、但指定閱讀框架中不含有終止密碼子(TAG、TAA、TGA、UAG、UAA或UGA)的後續區域。典型地，ORF係天然存在的或人工構築的，諸如藉由基因技術手段構築。ORF可編碼蛋白質，其中該蛋白質可轉譯成的胺基酸形成肽連接的鏈。

【0033】如本文所用，術語「必需ORF」可意謂當例如在經修飾之牛痘病毒中以實驗方法部分或完全缺失時，該經修飾之牛痘病毒之複製、生長或複製與生長均減少(例如相較於不含缺失的經修飾牛痘病毒，突變體的複製、生長或複製與生長減少至少15倍)的ORF。測定MVA病毒複製及病毒生長的方法已為熟習此項技術者所熟知。舉例而言，方法描述於牛痘病毒及痘病毒學、方法及方案(*Vaccinia Virus and Poxvirology, Methods and Protocols*)第269卷，Stuart N. Isaacs編(*Humana Press (2004)*)中，參見例如第8章：生長的痘病毒及測定病毒效價(Chapter 8, *Growing Poxviruses and determining Virus Titer*)，Kotwal及Abrahams)。MVA的病毒生長速率可藉由例如Orubu等人(2012) *PLOS One 7:e40167*中所述的GFP螢光使用例如CEF細胞測定，或藉由如Hornemann等人(2003)，*病毒學雜誌 (Journal of Virology)* 77:8394-8407中所述的方法測定。

【0034】密碼子優化為藉由增加所關注基因之轉譯效率而可用於使有機體中之蛋白質表現最大化的技術。不同有機體由於突變偏差及天然選擇而對編碼相同胺基酸的若干密碼子之一展示特定偏好。舉例而言，在快速生長的微生物(諸如大腸桿菌)中，最佳密碼子反映了其相應基因體tRNA池的組成。因此，在快速生長的微生物中，胺基酸的低頻率密碼子可用同一胺基酸的高頻率密碼子置換。從而改良優化DNA序列在快速生長微生物中的表現。如本文所提供，聚核苷酸序列可進行密碼子優化，以在特定有機體(諸如人類)中達成最佳的多肽表現。本揭示案之聚核苷酸可包括作為遺傳密碼的結果(例如優化密碼子使用或密碼子使用適應)而簡併的序列，以在特定宿主中達成表

現，特定而言，哺乳動物表現。如本文所用，「優化 optimized/optimization」可以指一種聚核苷酸經基因工程改造以增強其在指定物種中的表現。為了提供編碼由本揭示案之經修飾之牛痘病毒表現的蛋白質(例如趨化因子受體蛋白)的優化聚核苷酸，可對趨化因子受體蛋白基因的DNA序列進行修飾以便1)包含特定物種中之高度表現基因所偏好的密碼子；2)在核苷酸鹼基組成方面包含基本上發現於該物種中的A+T或G+C含量；3)形成該物種的起始序列；或4)排除導致RNA不穩定、不當聚腺苷酸化、降解及終止的序列，或排除形成二級結構髮夾或RNA剪接位點的序列。可利用真核生物及原核生物或特定物種中的密碼子使用分佈頻率來達成趨化因子受體蛋白在該物種中的表現增強。術語「偏好密碼子使用頻率」可以指特定宿主細胞在使用核苷酸密碼子指明給定胺基酸方面所展現的偏好。存在20種天然胺基酸，其中大部分由超過一個密碼子指示。因此，本揭示案可包括所有簡併的核苷酸序列，只要核苷酸序列所編碼之蛋白質(例如趨化因子受體蛋白)的胺基酸序列在功能上不變。

【0035】 術語「重組」當應用於核酸、載體(例如經修飾之牛痘病毒載體及其類似物)時，可以指藉由對核酸序列之兩個或更多個原本異源的區段進行人工組合而製備的核酸、載體，或者可以指包含核酸序列之兩個或更多個原本異源的區段的此類人工組合的核酸、載體。人工組合最常藉由使用公認的基因工程技術對分離的核酸區段進行人工操縱來完成。一般而言，如本文所述的經修飾之「重組」牛痘病毒可以指可藉由標準基因工程方法產生的經修飾之牛痘病毒。舉例而言，在一些範疇內，本揭示案的經修飾之牛痘病毒由此可為經基因

工程改造或經基因修飾之牛痘病毒。術語「重組MVA」由此可包括經修飾之牛痘病毒(例如MVA-BN)，其基因體中具有穩定整合之重組核酸，例如呈轉錄單元之形式。轉錄單元可以包括啟動子、增強子、終止子及/或緘默子。本揭示案的經修飾之重組牛痘病毒可在調控元件誘導後表現異源抗原決定子、多肽或蛋白質(抗原)。

【0036】如本文所用，「轉錄終止子」可包含參與RNA聚合酶特異性終止RNA轉錄的DNA序列。包括MVA RNA聚合酶的牛痘病毒終止新生RNA在RNA信號(DNA層面上的UUUUUNU、TTTTTNT或T5NT)下游的轉錄(Earl等人(1990), *J. Virol.* 64:2448-2451)。「轉錄終止子」有時在文獻中可稱為「終止信號」且因此可互換使用。

【0037】術語「蛋白質」、「肽」、「多肽」及「多肽片段」在本文中可互換使用，且可指任何長度之胺基酸殘基聚合物。聚合物可呈線性或分支，其可包含經修飾之胺基酸或胺基酸類似物，且其可間雜有除胺基酸之外的化學部分。該術語亦涵蓋已經天然修飾或藉由干預而經修飾的胺基酸聚合物；例如二硫鍵形成、糖基化、脂質化、乙醯化、磷酸化或任何其他操縱或修飾，諸如與標記或生物活性組分結合。

【0038】如本文所用，術語「同源性」可為兩種或更多種核苷酸或胺基酸序列之間「同源性」或「同源性百分比」的計算，其可藉由將序列對齊以達成最佳比較目的而測定(例如可將空位引入第一序列的序列中)。接著可比較相應位置的核苷酸，且兩種序列之間的一致性百分比可為序列所共用之一致位置數的函數(亦即，同源性% = 一致位置數/位置總數×100)。舉例而言，第一序列中的位置可被與第二

序列中之對應位置相同的核苷酸佔據，則分子在該位置一致。考慮到兩種序列的最佳對齊需要引入的空位數目及各空位長度，兩種序列之間的同源性百分比可為序列所共有之一致位置數目的函數。在一些實施例中，為了比較目的而對齊的序列長度可為參考序列長度的至少約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或95%。BLAST®搜尋可測定兩種序列之間的同源性。兩種序列之整個長度之間或兩種序列之整個長度的部分之間可具有同源性。兩種序列可為基因、核苷酸序列、蛋白質序列、肽序列、胺基酸序列或其片段。兩種序列的實際比較可藉由熟知方法完成，例如使用數學算法。此類數學算法的非限制性實例可描述於Karlin, S.及Altschul, S., 美國國家科學院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 90-5873-5877 (1993)中。此類算法可併入NBLAST及XBLAST程式(2.0版)中，如Altschul, S.等人，核酸研究(Nucleic Acids Res.), 25:3389-3402 (1997)中所述。使用BLAST及空位式BLAST程式時，可使用相應程式(例如NBLAST)的任何相關參數。舉例而言，用於序列比較的參數可設定為分數=100，字長=12，或可變化(例如W=5或W=20)。其他實例包括邁爾斯(Myers)與米勒(Miller)的算法、CABIOS (1989)、ADVANCE、ADAM、BLAT及FASTA。在另一個實施例中，兩種胺基酸序列之間的一致性百分比可使用例如GCG套裝軟體(Accelrys，英國劍橋(Cambridge, UK))中的GAP程式完成。

【0039】 術語「個體」可以指動物，包括(但不限於)靈長類動物(例如人類)、奶牛、綿羊、山羊、馬、犬、貓、兔、大鼠或小鼠。在

提及例如哺乳動物個體(諸如人類個體)時，術語「個體」與「患者」在本文中可互換使用。

【0040】 如本文所用，「動物」可包括哺乳動物、鳥及其類似物。動物或宿主可以包括哺乳動物及人類。動物可選自由以下組成之群：馬科動物(例如馬)、犬類動物(例如犬、狼、狐狸、郊狼、胡狼)、貓科動物(例如獅、虎、家貓、野貓、其他大貓及其他貓科動物，包括獵豹及山貓)、綿羊科動物(例如綿羊)、牛科動物(例如牛)、豬科動物(例如豬)、山羊科動物(例如山羊)、禽類(例如雞、鴨、鵝、火雞、鸕鶿、雉雞、鸚鵡、雀、鷹、烏鴉、鴛鴦、鵪鶉及食火雞)、靈長類動物(例如原猴、眼鏡猴、猴、長臂猿、猿)及魚。

【0041】 術語「治療(treat/treating/treatment)」可意欲包括緩解或消除病症、疾病或病狀，或與病症、疾病或病狀相關的一種或多種症狀；或緩解或根除病症、疾病或病狀本身的起因。所需治療作用可包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理學後果、預防轉移、降低疾病惡化速率、改善或緩和疾病狀態，及緩解或改善預後。

【0042】 術語「治療有效量」可以指當投與時，足以阻止或在一定程度上緩解所治療之病症、疾病或病狀之一種或多種症狀的發展的化合物的量。術語「治療有效量」亦可指研究人員、獸醫、醫生或臨床醫師正尋求之足以引起細胞、組織、系統、動物或人發生生物學或醫學反應的化合物的量。

【0043】 術語「醫藥學上可接受之載劑」、「醫藥學上可接受之賦形劑」、「生理學上可接受之載劑」或「生理學上可接受之賦形劑」可

以指醫藥學上可接受之材料、組合物或媒劑，諸如液體或固體填充劑、稀釋劑、賦形劑、溶劑或囊封材料。在與醫藥調配物之其他成分相容的意義上，組分可為「醫藥學上可接受的」。其亦可適於與人類及動物之組織或器官接觸使用而無過度的毒性、刺激、過敏反應、免疫原性或其他問題或併發症，滿足合理的益處/風險比。參見：雷明頓：藥學科學與實務 (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*), 第21版；Lippincott Williams及Wilkins: Philadelphia, PA, 2005；醫藥賦形劑手冊 (*Handbook of Pharmaceutical Excipients*), 第5版；Rowe等人編，英國醫藥出版社(The Pharmaceutical Press)及美國醫藥學會(the American Pharmaceutical Association): 2005；及醫藥添加劑手冊 (*Handbook of Pharmaceutical Additives*), 第3版；Ash及Ash編，Gower出版公司：2007；醫藥預調配物及調配物 (*Pharmaceutical Preformulation and Formulation*), Gibson編，CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2004)。

【0044】 術語「醫藥組合物」可以指本文所揭示之化合物與其他化學組分(諸如稀釋劑或載劑)之混合物。醫藥組合物可促進化合物投與有機體。存在於此項技術中之投與化合物的多種技術包括(但不限於)經口、注射、氣溶膠、非經腸及局部投與。醫藥組合物亦可藉由使化合物與無機或有機酸(諸如氫氯酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、對甲苯磺酸、水楊酸及其類似物)反應而獲得。

【0045】 「調配物」可以指含有活性醫藥或生物學成分(例如本揭示案的經修飾之牛痘病毒)以及一種或多種其他組分的組合物。在

本文中，術語「調配物」可與術語「醫藥組合物」、「疫苗組合物」及「疫苗調配物」互換地使用。調配物可為液體或固體(例如凍乾)。

【0046】 術語「免疫原性組合物」或「免疫組合物」可涵蓋可能會引起針對所關注之抗原之免疫反應的組合物，該抗原由如本文所述的經修飾之牛痘病毒表現。術語「疫苗或疫苗組合物」可涵蓋可能會誘導針對所關注之抗原之保護免疫反應或可有效防禦所關注之抗原的任何組合物；例如在投與或注射至動物或人之後，引發針對抗原的保護免疫反應，或對由經修飾之牛痘病毒載體表現的抗原提供有效的防禦。組合物可單獨投與，或可與其他組合物或治療組合物依序投與，藉此提供兩種或更多種(諸如三種、四種、五種或六種)組合物的組合物組合、混合液或多價混合物。

【0047】 如本文所用，「抗癌劑」可以指一種藥劑或療法，其能夠對個體的癌症產生負面影響，例如殺死癌細胞、誘導癌細胞發生細胞凋亡、降低癌細胞生長速率、降低轉移的發生或數目、減小腫瘤尺寸、抑制腫瘤生長、減少對腫瘤或癌細胞的血液供應、促進針對癌細胞或腫瘤的免疫反應、預防或抑制癌症惡化，或延長患有癌症之個體的壽命。抗癌劑之非限制性實例可包括生物藥劑(生物療法)、化學治療劑及放射治療劑。

【0048】 術語「初打-加打疫苗接種」可以指一種疫苗接種策略，其首先使用靶向特定抗原之疫苗的初打注射，隨後在間隔時間進行相同疫苗的一次或多次加打注射。初打-加打疫苗接種可為同質的或異質的。初打-加打同質疫苗接種可使用包含相同免疫原及載體的疫苗進行初打注射與一次或多次加打注射。初打-加打異質疫苗接種

係使用包含相同免疫原的疫苗進行初打注射與一次或多次加打注射，但初打注射與一次或多次加打注射所用的載體不同。舉例而言，初打-加打同質疫苗接種的初打注射與一次或多次加打注射均可使用包含相同的表現所關注之抗原之核酸的經修飾之牛痘病毒載體。相比之下，初打-加打異質疫苗接種可使用包含表現一種抗原性蛋白質之核酸的經修飾之牛痘病毒載體進行初打注射，以及初打注射中未包含之表現另一種抗原性蛋白質的另一種經修飾之牛痘病毒載體，或反之亦然。初打-加打異質疫苗接種亦可涵蓋不同的組合，諸如使用編碼免疫原之質體進行初打注射且使用編碼相同免疫原之經修飾牛痘病毒進行一次或多次加打注射，或使用重組蛋白免疫原進行初打注射且使用編碼相同蛋白質免疫原的經修飾之牛痘病毒載體進行一次或多次加打注射。

病毒

【0049】 本文提供的方法及系統可適用於製造多種不同的病毒，例如溶瘤病毒，例如重組溶瘤病毒。在一些情況下，本文提供的方法及系統可適用於製造牛痘病毒，例如重組牛痘病毒。

【0050】 本文所提供之方法及系統適用的例示性溶瘤病毒包括麻疹病毒、脊髓灰白質炎病毒、痘病毒、牛痘病毒、腺病毒、腺相關病毒、單純疱疹病毒、水泡性口炎病毒、里奧病毒、新城雞瘟病毒、塞內卡病毒、慢病毒、門戈病毒及黏液瘤病毒。在一些實施例中，經修飾之溶瘤病毒可以包含痘病毒。在某些實例中，溶瘤病毒可為牛痘病毒。在一些實施例中，經修飾之溶瘤病毒可適於全身遞送。

經修飾之牛痘病毒

【0051】如本文所用，術語「經修飾之牛痘病毒」或「重組牛痘病毒」可指一種牛痘病毒，其已藉由例如修飾而被修飾，諸如引入病毒骨架突變，以表現病原體(導致感染性疾病的病毒、細菌或寄生病原體)的基因/抗原決定基，表現增強T細胞反應(諸如TRIF表現、TRIF路徑上游及下游之其他分子的表現)的基因。在一些實施例中，引入病毒骨架突變包含：一種或多種致病性基因完全缺失或部分缺失，或經一種或多種病毒致病性基因取代(非限制性實例包括已知可抑制細胞介素參與Th1免疫反應或參與先天性免疫信號傳導的基因，或免疫反應之其他組分的抑制因子，或牛痘致病性基因被來自其他痘病毒之具有等效功能的更強或更弱基因交換)。

【0052】在一些實施例中，本揭示案的經修飾之牛痘病毒可選自由以下組成之群：野生型牛痘病毒株及減毒型牛痘病毒株。牛痘病毒株之非限制性實例可包括牛痘病毒西方儲備株(ATCC VR-1354)、胸苷激酶陰性西方儲備牛痘病毒、哥本哈根株、IHD株、惠氏(NYCBOH)株(ATCC VR-1536)、天壇株(Tian Tan strain)、李斯特株、NYVAC株、經修飾之安卡拉牛痘病毒(MVA) (ATCC VR-1508或ATCC VR-1566)、USSR株、ACAM2000株、巴黎株、伯恩株、天壇株(Temple of Heaven strain)、戴爾倫株、EM-63株、伊凡氏株、肯恩株、帕瓦丹加株或撻什肯株。

【0053】在一些實施例中，為了開發出顯示增強的全身遞送和腫瘤微環境之免疫重塑以增強T細胞功能及分化的經修飾之溶瘤牛痘病毒，藉由使基因體中的兩個非必需區域缺失及藉由添加外來基因體以表現融合蛋白及趨化因子受體來修飾牛痘病毒的西方儲備株。為了接

收外來基因體，亦對缺失非必需基因體之牛痘病毒的病毒骨架中的基因座進行工程改造。

對牛痘病毒骨架的修飾

【0054】 相應基因座處所缺失的區域及所添加的外來基因詳細示於圖1中。病毒骨架缺失的非必需基因清單包括胸苷激酶基因(圖示為「TK-」)及A52R基因(圖示為「A52R-」)。因此，在一些實施例中，經修飾之溶瘤牛痘病毒可以包含異源核酸序列，該異源核酸序列展現增強的全身遞送及腫瘤微環境的免疫重塑以增強T細胞功能及分化。因此，在一些實例中，異源核酸可編碼一種或多種融合蛋白。可將編碼肽或蛋白質的異源核酸選殖入病毒之胸苷激酶(TK)基因的基因座中。

【0055】 美國食品及藥物管理局(U.S. Food and Drug administration)已充分認識到病毒骨架中完全缺失胸苷激酶基因係已知的靶向腫瘤的安全修飾，原因在於其將病毒複製侷限於表現細胞胸苷激酶的細胞，該胸苷激酶在大部分腫瘤中上調。

【0056】 病毒骨架中缺失A52R基因(NF-kB抑制因子)增強了記憶T細胞反應，從而使免疫反應增強(Di Pilato M等人, J Virol 91:e00575-17)。不同於許多其他缺失，A52R基因缺失作為癌症療法高效之處在於，其不減少試管內的病毒複製。

【0057】 TK基因缺失與A52R基因缺失組合存在於同一牛痘病毒骨架中產生了雙重安全機制及高效溶瘤載體。

【0058】 在一些情況下，牛痘骨架上之A52R基因的缺失基因座可經編碼趨化因子受體的外源核酸取代。更特定而言，趨化因子受體

可為可靶向腫瘤上所表現之CCL2的CCR2受體。病毒上的趨化因子受體表現引起基於原位細胞的靶向全身遞送增強。

【0059】 在一些情況下，牛痘骨架上之TK基因的缺失基因座可經編碼融合蛋白的外源核酸取代。更特定而言，融合蛋白可為瘦素-介白素(IL)-2融合蛋白。瘦素-IL-2融合蛋白增強活性的方式為使瘦素更有效地靶向T細胞(以增強活性)及調控性T細胞(以抑制其活性)及遠離腫瘤中的基質瘦素受體。此外，IL-2與瘦素的融合經由共同刺激IL-2受體而產生額外的治療活性。融合蛋白進一步產生更有效地滯留於腫瘤中且阻止全身作用的大分子。融合蛋白的結構及特徵描述於WO2019148109中(其全部揭示內容特此以引用的方式明確併入本文中)。

其他多重修飾

【0060】 在一些實施例中，本文提供包含經修飾之牛痘病毒的疫苗，其中病毒基因體(在本文中亦稱為病毒骨架)中具有插入、突變或缺失。牛痘病毒經修飾或經選擇而具有低毒性且在靶組織中累積。在一些實施例中，病毒骨架/病毒基因體中的修飾為使得牛痘病毒不複製或具有不良複製能力的修飾。此類修飾之非限制性實例可包括以下病毒基因的突變：A1、A2、VH1、A33及I7。

【0061】 在一些實施例中，病毒骨架突變選自由以下組成之群：B15R基因的完全或部分缺失；K7R基因的完全或部分缺失；B14R基因的完全或部分缺失；N1L基因的完全或部分缺失；K1L基因的完全或部分缺失；M2L基因的完全或部分缺失；A49R基因的完全或部分缺失；VH1基因的完全或部分缺失；A33基因的完全或部分缺失；A1

的完全或部分缺失；A2基因的完全或部分缺失；I7基因的完全或部分缺失，及A46R基因的完全或部分缺失。如本文所用，可藉由提及基因編碼之蛋白質來提及病毒基因(例如A33基因可意謂編碼A33蛋白之基因)。

【0062】 在一些實施例中，包括取代、插入及缺失的任何組合的病毒骨架突變可產生與病毒基因或由該基因編碼之病毒蛋白的野生型序列具有小於100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%或更小的序列同源性的序列。在一些實施例中，病毒基因及其編碼的蛋白質選自由以下組成之群：B15R、K7R、B14R、N1L、K1L、M2L、A49R、VH1、A33、A1、A2、I7及A46R。

【0063】 在一些實施例中，病毒骨架可在病毒蛋白(例如病毒抗原)的胺基酸序列中包含1、2、3、4、5個或更多個突變。在一些實施例中，病毒抗原選自由以下組成之群：B15R、K7R、B14R、N1L、K1L、M2L、A49R、VH1、A33、A1、A2、I7及A46R。

【0064】 在一些實施例中，本發明提供經修飾之牛痘病毒，其病毒基因體(病毒骨架)中含有一個以上突變，使得突變增強T細胞提供的免疫反應。突變可為病毒基因體(野生型或減毒型天然牛痘病毒株)中之一個或多個核酸的添加、缺失或取代。

【0065】 在非限制性實例中，突變可為已知抑制細胞介素參與Th1免疫反應之基因的完全或部分缺失。作為非限制性實例，突變可為編碼B8R(干擾素 γ (IFN- γ)結合蛋白)、C12L(介白素-18(IL-18)結合蛋白)之核酸的缺失。

【0066】在另一個非限制性實例中，突變可為先天性免疫信號傳導基因的完全或部分缺失。作為非限制性實例，突變可為編碼B18R (I型干擾素(IFN)-結合蛋白)、A52R (核因子 κ B (NF- κ B)抑制蛋白)、E3L (蛋白激酶(PKR)抑制因子)、C4、C16 (STING路徑抑制因子)之核酸的缺失。

【0067】在另一個非限制性實例中，突變可為編碼用於抑制免疫反應之其他組分之蛋白質的基因的完全或部分缺失。作為非限制性實例，突變可為編碼B15、K7、B14、N1、K1、M2、A49、VH1、A46或其組合之核酸的完全或部分缺失。病毒骨架突變亦可包括牛痘致病性基因經來自其他痘病毒的具有同等功能的最強力基因取代。

【0068】本揭示案之多肽的胺基酸序列變異體可為取代型、插入型或缺失型變異體。相較於野生型，編碼病毒多肽之基因的突變可影響多肽的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500個或更多個非鄰接或鄰接胺基酸。

【0069】缺失型變異體可缺乏天然或野生型蛋白質的一個或多個

殘基。可缺失個別殘基或可缺失結構域(諸如催化或結合域)的全部或一部分。可將終止密碼子引入(藉由取代或插入來引入)編碼核酸序列中以產生截斷的蛋白質。插入型突變體典型地涉及在多肽的非末端點處添加材料。此可包括插入免疫反應性抗原決定基或僅插入一個或多個殘基。亦可產生末端添加，稱為融合蛋白。

【0070】 取代型變異體典型地含有在蛋白質內的一個或多個位點處，一個胺基酸與另一個胺基酸的交換，且可設計成調節多肽的一種或多種特性，而其他功能或特性存在損失或不存在損失。取代可為保守型，亦即，一個胺基酸經具有類似形狀及電荷的胺基酸置換。保守型取代可包括例如：丙胺酸變成絲胺酸；精胺酸變成離胺酸；天冬醯胺變成麩醯胺或組胺酸；天冬胺酸變成麩胺酸；半胱胺酸變成絲胺酸；麩醯胺酸變成天冬醯胺；麩胺酸變成天冬胺酸；甘胺酸變成脯胺酸；組胺酸變成天冬醯胺或麩醯胺酸；異白胺酸變成白胺酸或纈胺酸；白胺酸變成纈胺酸或異白胺酸；離胺酸變成精胺酸；甲硫胺酸變成白胺酸或異白胺酸；苯丙胺酸變成酪胺酸、白胺酸或甲硫胺酸；絲胺酸變成蘇胺酸；蘇胺酸變成絲胺酸；色胺酸變成酪胺酸；酪胺酸變成色胺酸或苯丙胺酸；及纈胺酸變成異白胺酸或白胺酸。或者，取代可為非保守型，使得多肽的功能或活性受到影響。非保守型變化典型地涉及一個殘基經化學上不相似的殘基取代，諸如用極性或帶電胺基酸取代非極性或不帶電胺基酸，且反之亦然。

【0071】 本文提供的牛痘病毒在病毒基因體中含有其他插入、突變、缺失或取代。本揭示案的牛痘病毒可以含有外源核酸的一個或多個其他插入或部分插入，該等外源核酸編碼趨化因子受體、TRIF蛋

白或其功能域中的一者或多者，或瘦素、介白素-2 (IL2)、介白素-15/介白素-15Ra (IL15/IL15Ra)、介白素-7 (IL-7)、瘦素-介白素融合蛋白(例如實例1中作為L2展示的瘦素-IL2融合蛋白)中的一者或多者。諸如趨化因子受體之插入等修飾可為野生型及/或突變型CXCR4、CCR2、CCL2的插入。牛痘病毒可進一步含有來自A52R、B15R、K7R、A46R、N1L、E3L、K1L、M2L、C16、N2R、B8R、B18R、VH1及其功能域或片段或變異體或其任何組合之一個或多個基因的一個或多個其他缺失或部分缺失。在一些實例中，修飾包含編碼趨化因子受體(諸如CXC受體、CC受體、CX3C受體、XC受體、其功能片段或其變異體，或其任何組合)的外源核酸。趨化因子受體的實例包括(但不限於) CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CX3CR1、XCR1、其功能片段或其變異體，或其任何組合。在一些情況下，編碼趨化因子受體的外源核酸包含編碼超過一種趨化因子受體。舉例而言，核酸可編碼CXCR4及CCR2受體、CXCR2及CCR3受體、CXCR4及CCR10受體，或其任何其他組合。在一些情況下，編碼趨化因子受體的外源核酸包含用於增強病毒表現的密碼子優化核酸序列，例如人類趨化因子受體編碼序列(諸如人類CCR2編碼序列)的密碼子優化變異體。編碼趨化因子受體之核酸的非限制性實例提供於SEQ ID NO: 2及3中，且在一些實施例中，如本文所述的編碼趨化因子受體的外源核酸可以包含與序列SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。在一些實施例

中，編碼如本文所述之融合蛋白(例如瘦素-IL2融合蛋白)的外源核酸包含與序列SEQ ID NO: 1至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。

【0072】 在一些實施例中，編碼本文所述之融合蛋白的外源核酸包含瘦素多肽及IL-2多肽。在一些實施例中，瘦素多肽包含與序列SEQ ID NO: 4至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。在一些實施例中，IL-2多肽包含與序列SEQ ID NO: 5至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。

經修飾之溶瘤病毒的遞送

【0073】 本文提供藉由投與如本文所述之經修飾之溶瘤牛痘病毒來治療病狀的方法。

【0074】 在一些實施例中，投與個體的本揭示案之經修飾之溶瘤牛痘病毒的量可在約 10^3 個與 10^{12} 個感染性病毒粒子或空斑形成單位(PFU)之間，或在約 10^5 與 10^{10} PFU之間，或在約 10^5 與 10^8 PFU之間，或在約 10^8 與 10^{10} PFU之間。在一些實施例中，投與個體的本揭示案之經修飾之溶瘤牛痘病毒的量可在約 10^3 個與 10^{12} 個病毒粒子或空斑形成單位(PFU)之間，或在約 10^5 與 10^{10} PFU之間，或在約 10^5 與 10^8 PFU之間，或在約 10^8 與 10^{10} PFU之間。在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以以下劑量投與，該劑量可包含約 10^3 PFU/劑量至約 10^4 PFU/劑量、約 10^4 PFU/劑量至約 10^5 PFU/劑量、約 10^5 PFU/劑量至約 10^6 PFU/劑量、約 10^7 PFU/劑量至約 10^8 PFU/劑量、約 10^9 PFU/劑量至

約 10^{10} PFU/劑量、約 10^{10} PFU/劑量至約 10^{11} PFU/劑量、約 10^{11} PFU/劑量至約 10^{12} PFU/劑量、約 10^{12} PFU/劑量至約 10^{13} PFU/劑量、約 10^{13} PFU/劑量至約 10^{14} PFU/劑量，或約 10^{14} PFU/劑量至約 10^{15} PFU/劑量。

在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以以下劑量投與，該劑量可包含約 2×10^3 PFU/劑量、 3×10^3 PFU/劑量、 4×10^3 PFU/劑量、 5×10^3 PFU/劑量、 6×10^3 PFU/劑量、 7×10^3 PFU/劑量、 8×10^3 PFU/劑量、 9×10^3 PFU/劑量、約 10^4 PFU/劑量、約 2×10^4 PFU/劑量、約 3×10^4 PFU/劑量、約 4×10^4 PFU/劑量、約 5×10^4 PFU/劑量、約 6×10^4 PFU/劑量、約 7×10^4 PFU/劑量、約 8×10^4 PFU/劑量、約 9×10^4 PFU/劑量、約 10^5 PFU/劑量、 2×10^5 PFU/劑量、 3×10^5 PFU/劑量、 4×10^5 PFU/劑量、 5×10^5 PFU/劑量、 6×10^5 PFU/劑量、 7×10^5 PFU/劑量、 8×10^5 PFU/劑量、 9×10^5 PFU/劑量、約 10^6 PFU/劑量、約 2×10^6 PFU/劑量、約 3×10^6 PFU/劑量、約 4×10^6 PFU/劑量、約 5×10^6 PFU/劑量、約 6×10^6 PFU/劑量、約 7×10^6 PFU/劑量、約 8×10^6 PFU/劑量、約 9×10^6 PFU/劑量、約 10^7 PFU/劑量、約 2×10^7 PFU/劑量、約 3×10^7 PFU/劑量、約 4×10^7 PFU/劑量、約 5×10^7 PFU/劑量、約 6×10^7 PFU/劑量、約 7×10^7 PFU/劑量、約 8×10^7 PFU/劑量、約 9×10^7 PFU/劑量、約 10^8 PFU/劑量、約 2×10^8 PFU/劑量、約 3×10^8 PFU/劑量、約 4×10^8 PFU/劑量、約 5×10^8 PFU/劑量、約 6×10^8 PFU/劑量、約 7×10^8 PFU/劑量、約 8×10^8 PFU/劑量、約 9×10^8 PFU/劑量、約 10^9 PFU/劑量、約 2×10^9 PFU/劑量、約 3×10^9 PFU/劑量、約 4×10^9 PFU/劑量、約 5×10^9 PFU/劑量、約 6×10^9 PFU/劑量、約 7×10^9 PFU/劑量、約 8×10^9 PFU/劑量、約 9×10^9 PFU/劑量、約 10^{10} PFU/劑量、約 2×10^{10} PFU/劑量、約 3×10^{10} PFU/劑量、約

4×10^{10} PFU/劑量、約 5×10^{10} PFU/劑量、約 6×10^{10} PFU/劑量、約 7×10^{10} PFU/劑量、約 8×10^{10} PFU/劑量、約 9×10^{10} PFU/劑量、約 10^{10} PFU/劑量、約 2×10^{10} PFU/劑量、約 3×10^{10} PFU/劑量、約 4×10^{10} PFU/劑量、約 5×10^{10} PFU/劑量、約 6×10^{10} PFU/劑量、約 7×10^{10} PFU/劑量、約 8×10^{10} PFU/劑量、約 9×10^{10} PFU/劑量、約 10^{11} PFU/劑量、約 2×10^{11} PFU/劑量、約 3×10^{11} PFU/劑量、約 4×10^{11} PFU/劑量、約 5×10^{11} PFU/劑量、約 6×10^{11} PFU/劑量、約 7×10^{11} PFU/劑量、約 8×10^{11} PFU/劑量、約 9×10^{11} PFU/劑量、或 10^{12} PFU/劑量、約 10^{12} PFU/劑量至約 10^{13} PFU/劑量、約 10^{13} PFU/劑量至約 10^{14} PFU/劑量，或約 10^{14} PFU/劑量至約 10^{15} PFU/劑量。在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以可包含 5×10^9 PFU/劑量的劑量投與。在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以可包含至多 5×10^9 PFU/劑量的劑量投與。

【0075】 在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以以下劑量投與，該劑量可包含約 10^3 個病毒粒子/劑量至約 10^4 個病毒粒子/劑量、約 10^4 個病毒粒子/劑量至約 10^5 個病毒粒子/劑量、約 10^5 個病毒粒子/劑量至約 10^6 個病毒粒子/劑量、約 10^7 個病毒粒子/劑量至約 10^8 個病毒粒子/劑量、約 10^9 個病毒粒子/劑量至約 10^{10} 個病毒粒子/劑量、約 10^{10} 個病毒粒子/劑量至約 10^{11} 個病毒粒子/劑量、約 10^{11} 個病毒粒子/劑量至約 10^{12} 個病毒粒子/劑量、約 10^{12} 個病毒粒子/劑量至約 10^{13} 個病毒粒子/劑量、約 10^{13} 個病毒粒子/劑量至約 10^{14} 個病毒粒子/劑量，或約 10^{14} 個病毒粒子/劑量至約 10^{15} 個病毒粒子/劑量。

【0076】 在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以以下劑量投與，該劑量可包含約 10^3 PFU/kg至約 10^4 PFU/kg、約 10^4

PFU/kg至約 10^5 PFU/kg、約 10^5 PFU/kg至約 10^6 PFU/kg、約 10^7 PFU/kg至約 10^8 PFU/kg、約 10^9 PFU/kg至約 10^{10} PFU/kg、約 10^{10} PFU/kg至約 10^{11} PFU/kg、約 10^{11} PFU/kg至約 10^{12} PFU/kg、約 10^{12} PFU/kg至約 10^{13} PFU/kg、約 10^{13} PFU/kg至約 10^{14} PFU/kg，或約 10^{14} PFU/kg至約 10^{15} PFU/kg。在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以下列劑量投與，該劑量可包含約 2×10^3 PFU/kg、 3×10^3 PFU/kg、 4×10^3 PFU/kg、 5×10^3 PFU/kg、 6×10^3 PFU/kg、 7×10^3 PFU/kg、 8×10^3 PFU/kg、 9×10^3 PFU/kg、約 10^4 PFU/kg、約 2×10^4 PFU/kg、約 3×10^4 PFU/kg、約 4×10^4 PFU/kg、約 5×10^4 PFU/kg、約 6×10^4 PFU/kg、約 7×10^4 PFU/kg、約 8×10^4 PFU/kg、約 9×10^4 PFU/kg、約 10^5 PFU/kg、 2×10^5 PFU/kg、 3×10^5 PFU/kg、 4×10^5 PFU/kg、 5×10^5 PFU/kg、 6×10^5 PFU/kg、 7×10^5 PFU/kg、 8×10^5 PFU/kg、 9×10^5 PFU/kg、約 10^6 PFU/kg、約 2×10^6 PFU/kg、約 3×10^6 PFU/kg、約 4×10^6 PFU/kg、約 5×10^6 PFU/kg、約 6×10^6 PFU/kg、約 7×10^6 PFU/kg、約 8×10^6 PFU/kg、約 9×10^6 PFU/kg、約 10^7 PFU/kg、約 2×10^7 PFU/kg、約 3×10^7 PFU/kg、約 4×10^7 PFU/kg、約 5×10^7 PFU/kg、約 6×10^7 PFU/kg、約 7×10^7 PFU/kg、約 8×10^7 PFU/kg、約 9×10^7 PFU/kg、約 10^8 PFU/kg、約 2×10^8 PFU/kg、約 3×10^8 PFU/kg、約 4×10^8 PFU/kg、約 5×10^8 PFU/kg、約 6×10^8 PFU/kg、約 7×10^8 PFU/kg、約 8×10^8 PFU/kg、約 9×10^8 PFU/kg、約 10^9 PFU/kg、約 2×10^9 PFU/kg、約 3×10^9 PFU/kg、約 4×10^9 PFU/kg、約 5×10^9 PFU/kg、約 6×10^9 PFU/kg、約 7×10^9 PFU/kg、約 8×10^9 PFU/kg、約 9×10^9 PFU/kg、約 10^{10} PFU/kg、約 2×10^{10} PFU/kg、約 3×10^{10} PFU/kg、約 4×10^{10} PFU/kg、約 5×10^{10} PFU/kg、約 6×10^{10}

PFU/kg、約 7×10^{10} PFU/kg、約 8×10^{10} PFU/kg、約 9×10^{10} PFU/kg、約 10^{10} PFU/kg、約 2×10^{10} PFU/kg、約 3×10^{10} PFU/kg、約 4×10^{10} PFU/kg、約 5×10^{10} PFU/kg、約 6×10^{10} PFU/kg、約 7×10^{10} PFU/kg、約 8×10^{10} PFU/kg、約 9×10^{10} PFU/kg、約 10^{11} PFU/kg、約 2×10^{11} PFU/kg、約 3×10^{11} PFU/kg、約 4×10^{11} PFU/kg、約 5×10^{11} PFU/kg、約 6×10^{11} PFU/kg、約 7×10^{11} PFU/kg、約 8×10^{11} PFU/kg、約 9×10^{11} PFU/kg、或約 10^{12} PFU/kg、約 10^{12} PFU/kg至約 10^{13} PFU/kg、約 10^{13} PFU/kg至約 10^{14} PFU/kg，或約 10^{14} PFU/kg至約 10^{15} PFU/kg。在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以包含 5×10^9 PFU/kg的劑量投與。在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以包含至多 5×10^9 PFU/kg的劑量投與。

【0077】 在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以以下劑量投與，該劑量可包含約 10^3 個病毒粒子/kg至約 10^4 個病毒粒子/kg、約 10^4 個病毒粒子/kg至約 10^5 個病毒粒子/kg、約 10^5 個病毒粒子/kg至約 10^6 個病毒粒子/kg、約 10^7 個病毒粒子/kg至約 10^8 個病毒粒子/kg、約 10^9 個病毒粒子/kg至約 10^{10} 個病毒粒子/kg、約 10^{10} 個病毒粒子/kg至約 10^{11} 個病毒粒子/kg、約 10^{11} 個病毒粒子/kg至約 10^{12} 個病毒粒子/kg、約 10^{12} 個病毒粒子/kg至約 10^{13} 個病毒粒子/kg、約 10^{13} 個病毒粒子/kg至約 10^{14} 個病毒粒子/kg，或約 10^{14} 個病毒粒子/kg至約 10^{15} 個病毒粒子/kg。

【0078】 在某些實施例中，如本文所述之經修飾之溶瘤牛痘病毒的液體劑型可包含約 10^3 PFU/mL至約 10^4 PFU/mL、約 10^4 PFU/mL至約 10^5 PFU/mL、約 10^5 PFU/mL至約 10^6 PFU/mL、約 10^7 PFU/mL至約 10^8

PFU/mL、約 10^9 PFU/mL至約 10^{10} PFU/mL、約 10^{10} PFU/mL至約 10^{11} PFU/mL、約 10^{11} PFU/mL至約 10^{12} PFU/mL、約 10^{12} PFU/mL至約 10^{13} PFU/mL、約 10^{13} PFU/mL至約 10^{14} PFU/mL、或約 10^{14} PFU/mL至約 10^{15} PFU/mL的病毒劑量。在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以以下劑量投與，該劑量可包含約 2×10^3 PFU/mL、 3×10^3 PFU/mL、 4×10^3 PFU/mL、 5×10^3 PFU/mL、 6×10^3 PFU/mL、 7×10^3 PFU/mL、 8×10^3 PFU/mL、 9×10^3 PFU/mL、約 10^4 PFU/mL、約 2×10^4 PFU/mL、約 3×10^4 PFU/mL、約 4×10^4 PFU/mL、約 5×10^4 PFU/mL、約 6×10^4 PFU/mL、約 7×10^4 PFU/mL、約 8×10^4 PFU/mL、約 9×10^4 PFU/mL、約 10^5 PFU/mL、 2×10^5 PFU/mL、 3×10^5 PFU/mL、 4×10^5 PFU/mL、 5×10^5 PFU/mL、 6×10^5 PFU/mL、 7×10^5 PFU/mL、 8×10^5 PFU/mL、 9×10^5 PFU/mL、約 10^6 PFU/mL、約 2×10^6 PFU/mL、約 3×10^6 PFU/mL、約 4×10^6 PFU/mL、約 5×10^6 PFU/mL、約 6×10^6 PFU/mL、約 7×10^6 PFU/mL、約 8×10^6 PFU/mL、約 9×10^6 PFU/mL、約 10^7 PFU/mL、約 2×10^7 PFU/mL、約 3×10^7 PFU/mL、約 4×10^7 PFU/mL、約 5×10^7 PFU/mL、約 6×10^7 PFU/mL、約 7×10^7 PFU/mL、約 8×10^7 PFU/mL、約 9×10^7 PFU/mL、約 10^8 PFU/mL、約 2×10^8 PFU/mL、約 3×10^8 PFU/mL、約 4×10^8 PFU/mL、約 5×10^8 PFU/mL、約 6×10^8 PFU/mL、約 7×10^8 PFU/mL、約 8×10^8 PFU/mL、約 9×10^8 PFU/mL、約 10^9 PFU/mL、約 2×10^9 PFU/mL、約 3×10^9 PFU/mL、約 4×10^9 PFU/mL、約 5×10^9 PFU/mL、約 6×10^9 PFU/mL、約 7×10^9 PFU/mL、約 8×10^9 PFU/mL、約 9×10^9 PFU/mL、約 10^{10} PFU/mL、約 2×10^{10} PFU/mL、約 3×10^{10} PFU/mL、約 4×10^{10} PFU/mL、約 5×10^{10} PFU/mL、約 6×10^{10} PFU/mL、

約 7×10^{10} PFU/mL、約 8×10^{10} PFU/mL、約 9×10^{10} PFU/mL、約 10^{10} PFU/mL、約 2×10^{10} PFU/mL、約 3×10^{10} PFU/mL、約 4×10^{10} PFU/mL、約 5×10^{10} PFU/mL、約 6×10^{10} PFU/mL、約 7×10^{10} PFU/mL、約 8×10^{10} PFU/mL、約 9×10^{10} PFU/mL、約 10^{11} PFU/mL、約 2×10^{11} PFU/mL、約 3×10^{11} PFU/mL、約 4×10^{11} PFU/mL、約 5×10^{11} PFU/mL、約 6×10^{11} PFU/mL、約 7×10^{11} PFU/mL、約 8×10^{11} PFU/mL、約 9×10^{11} PFU/mL、或約 10^{12} PFU/mL、約 10^{12} PFU/mL 至約 10^{13} PFU/mL、約 10^{13} PFU/mL 至約 10^{14} PFU/mL、或約 10^{14} PFU/mL 至約 10^{15} PFU/mL。在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以可包含 5×10^9 PFU/mL 的劑量投與。在一些實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以可包含至多 5×10^9 PFU/mL 的劑量投與。

【0079】 在經修飾之溶瘤牛痘病毒可藉由注射投與的一些情況下，劑量可包含每次注射約 10^3 個病毒粒子、每次注射 10^4 個病毒粒子、每次注射 10^5 個病毒粒子、每次注射 10^6 個病毒粒子、每次注射 10^7 個病毒粒子、每次注射 10^8 個病毒粒子、每次注射 10^9 個病毒粒子、每次注射 10^{10} 個病毒粒子、每次注射 10^{11} 個病毒粒子、每次注射 10^{12} 個病毒粒子、每次注射 2×10^{12} 個病毒粒子、每次注射 10^{13} 個病毒粒子、每次注射 10^{14} 個病毒粒子，或每次注射 10^{15} 個病毒粒子。在經修飾之溶瘤牛痘病毒藉由注射投與的其他情況下，劑量可包含每次注射約 10^3 個感染性病毒粒子、每次注射 10^4 個感染性病毒粒子、每次注射 10^5 個感染性病毒粒子、每次注射 10^6 個感染性病毒粒子、每次注射 10^7 個感染性病毒粒子、每次注射 10^8 個感染性病毒粒子、每次注射 10^9 個感染性病毒粒子、每次注射 10^{10} 個感染性病毒粒子、每次注射 10^{11} 個感

性病毒粒子、每次注射 10^{12} 個感染性病毒粒子、每次注射 2×10^{12} 個感染性病毒粒子、每次注射 10^{13} 個感染性病毒粒子、每次注射 10^{14} 個感染性病毒粒子，或每次注射 10^{15} 個感染性病毒粒子。在其他實施例中，本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒可以以下劑量投與，該劑量可為約 10^3 個組織培養物50%抑制劑量(TCID₅₀)/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 10^4 TCID₅₀/kg、 3×10^8 TCID₅₀/kg、 4×10^8 TCID₅₀/kg、 5×10^8 TCID₅₀/kg、 3×10^9 TCID₅₀/kg、 4×10^9 TCID₅₀/kg、 5×10^9 TCID₅₀/kg、 3×10^{10} TCID₅₀/kg、 4×10^{10} TCID₅₀/kg、或 4×10^{10} TCID₅₀/kg。應注意，在本文中， 10^x 可替代地表示為 1 eX 。在某些實施例中，經修飾之溶瘤牛痘病毒可以一次或多次劑量投與。在某些實施例中，病毒投與的量足以誘導腫瘤中的至少約20%細胞發生瘤崩解，誘導腫瘤中的至少約30%細胞發生瘤崩解，誘導腫瘤中的至少約40%細胞發生瘤崩解，誘導腫瘤中的至少約50%細胞發生瘤崩解，誘導腫瘤中的至少約60%細胞發生瘤崩解，誘導腫瘤中的至少約70%細胞發生瘤崩解，誘導腫瘤中的至少約80%細胞發生瘤崩解，或誘導腫瘤中的至少約90%細胞發生瘤崩解。

【0080】 在某些實施例中，病毒的單次劑量可以指在1、2、5、10、15、20或24個小時期間投與個體或腫瘤的量。在某些實施例中，劑量可隨時間展開或依據各別注射展開。在某些實施例中，可向個體投與牛痘病毒的多次劑量(例如2、3、4、5、6次或更多次劑量)，例如其中第二次治療可發生於第一次治療的1、2、3、4、5、6、7天或

週內。在某些實施例中，經修飾之溶瘤病毒的多次劑量可在1、2、3、4、5、6、7天或週或更長時間的期間投與個體。在某些實施例中，如本文所述的溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物可在約1週至約2週、約2週至約3週、約3週至約4週、約4週至約5週、約6週至約7週、約7週至約8週、約8週至約9週、約9週至約10週、約10週至約11週、約11週至約12週、約12週至約24週、約24週至約48週、約48週或約52週、或更長時間的期間內投與。在某些情況下，如本文所述之溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物的投與頻率可為每天一次、每天兩次、每週一次、每三週一次、每四週一次(或一月一次)、每8週一次(或每2個月一次)、每12週一次(或每3個月一次)、或每24週一次(每6個月一次)。在本文所揭示之方法的一些實施例中，可在第一時段以初始劑量、在第二時段以中等劑量且在第三時段以高劑量獨立地投與溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物。在一些實施例中，初始劑量可低於中等劑量且中等劑量可低於高劑量。在一些實施例中，第一、第二及第三時段可獨立地為約1週至約2週、約2週至約3週、約3週至約4週、約4週至約5週、約6週至約7週、約7週至約8週、約8週至約9週、約9週至約10週、約10週至約11週、約11週至約12週、約12週至約24週、約24週至約48週、約48週或約52週、或更長時間。在一些實施例中，如本文所述的經修飾之溶瘤牛痘病毒可利用初打-加打療法投與。

【0081】 在一些實例中，根據本文所述之任一種治療方法，個體可在如本文所述的經修飾之溶瘤牛痘病毒或包含其之醫藥組合物投與之前、與其同時及在投與之後，攝入還原性碳水化合物膳食(例如酮原性膳食)。在某些實施例中，個體攝入的膳食可包含消耗每天小於

500公克碳水化合物、每天小於450公克碳水化合物、每天小於450公克碳水化合物、每天小於400公克碳水化合物、每天小於350公克碳水化合物、每天小於300公克碳水化合物、每天小於250公克碳水化合物、每天小於200公克碳水化合物、每天小於150公克碳水化合物、每天小於100公克碳水化合物、每天小於90公克碳水化合物、每天小於80公克碳水化合物、每天小於70公克碳水化合物、每天小於60公克碳水化合物、每天小於50公克碳水化合物、每天小於40公克碳水化合物、每天小於30公克碳水化合物、每天小於20公克碳水化合物、或每天小於10公克碳水化合物。

【0082】 本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒或包含其之醫藥組合物遞送至癌細胞或腫瘤細胞的例示性方法可為瘤內注射。然而，亦可使用替代投與方法，例如靜脈內、經由輸注、非經腸、靜脈內、皮內、肌肉內、經皮、舌下、直腸、尿道內、陰道內、鼻內、鞘內或腹膜內。投與途徑可隨腫瘤的位置及性質而變化。在某些實施例中，投與途徑可為牙內、經皮、非經腸、腹膜內、靜脈內、肌肉內、鼻內、皮下、局部(例如腫瘤附近，特定言之，腫瘤血管或鄰近血管)、經皮、鞘內、氣管內、腹膜內、動脈內、膀胱內、瘤內、吸入、灌注、灌洗或經口。經修飾之溶瘤牛痘病毒的可注射劑量可以彈丸注射或緩慢輸注形式投與。在某些實施例中，經修飾之溶瘤牛痘病毒可自植入患者的來源投與患者。在某些實施例中，經修飾之溶瘤牛痘病毒可藉由在所選時段期間連續輸注來投與。在一些情況下，如本文所述的溶瘤牛痘病毒或含有其的醫藥組合物可以治療有效劑量藉由輸注投與約15分鐘、約30分鐘、約45分鐘、約50分鐘、約55分鐘、約60分鐘、約

75分鐘、約90分鐘、約100分鐘或約120分鐘或更長的時段。本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物可以液體劑型投與，其中總投與體積為約1 mL至約5 mL、約5 mL至10 mL、約15 mL至約20 mL、約25 mL至約30 mL、約30 mL至約50 mL、約50 mL至約100 mL、約100 mL至150 mL、約150 mL至約200 mL、約200 mL至約250 mL、約250 mL至約300 mL、約300 mL至約350 mL、約350 mL至約400 mL、約400 mL至約450 mL、約450 mL至500 mL、約500 mL至750 mL，或約750 mL至1000 mL。

組合療法

【0083】 在一些範疇內，本揭示案的方法包含在一種或多種另一種療法之前、之後或與一或多種另一種療法組合投與如本文中所揭示的經修飾之溶瘤病毒或含有其的醫藥組合物。另一種療法的實例可包括(但不限於)化學療法、放射、利用另一種病毒的溶瘤病毒療法、免疫調節蛋白治療、抗癌劑或其任何組合。另一種療法的投與可與經修飾之病毒(諸如溶瘤牛痘病毒)的投與同時或依序進行。在某些實施例中，本揭示案的方法可包含在一種或多種抗癌劑或癌症療法之前、之後或與一種或多種抗癌劑或癌症療法組合投與如本文所揭示的經修飾之溶瘤病毒。抗癌劑可包括(但不限於)化學治療劑、放射治療劑、細胞介素、免疫檢查點抑制劑、抗血管生成劑、細胞凋亡誘導劑、抗癌抗體及/或抗週期素依賴性激酶劑。在某些實施例中，癌症療法可包括化學療法、生物療法、放射療法、免疫療法、激素療法、抗血管療法、冷凍療法、毒素療法及/或手術或其組合。在某些實施例中，本揭示案的方法可包括在本揭示案的經修飾之溶瘤病毒之前、之後或與

本揭示案的經修飾之溶瘤病毒組合投與本文所揭示的經修飾之病毒。經修飾之溶瘤牛痘病毒與化學療法的組合達成協同效應，對於經修飾之溶瘤病毒中不包含修飾的經修飾之溶瘤病毒，未發現此協同效應。上述組合的協同效應可有利地用於降低化學療法(諸如Taxol®)的劑量。因此，本文針對經修飾之病毒所揭示的治療方法可使與化學療法相關的毒性降低，例如對化學療法有反應、但罹受治療劑量之副作用的患者。在某些情況下，相較於單獨的化學療法或單獨的溶瘤牛痘病毒，協同效應可使得腫瘤生長減小。腫瘤生長的例示性減小可為約2%至約50%，諸如約5%、約10%、約20%、約25%、約35%、約45%或約50%。

【0084】 在某些實施例中，使用經修飾之溶瘤病毒的療法可單獨或與一種或多種免疫調節劑組合使用。免疫調節劑可包括能夠抑制與腫瘤或癌症相關之抗病毒免疫的任何化合物、分子或物質。在某些實施例中，免疫調節劑能夠抑制針對經修飾之病毒的先天性免疫或後天性免疫。免疫調節劑之非限制性實例包括抗CD33抗體或其可變區、抗CD11b抗體或其可變區、COX2抑制劑(例如塞內昔布(celecoxib))、細胞介素(諸如IL-12、GM-CSF、IL-2、IFN β 及IFN γ)，及趨化因子(諸如MIP-1、MCP-1及IL-8)。在某些實施例中，免疫調節劑可包括免疫檢查點調節劑，諸如(但不限於)抗CTLA4、抗PD-1及抗PD-L1及TLR促效劑(例如聚I:C)。在一些實例中，免疫調節劑可包括免疫檢查點抑制劑，諸如PD-1拮抗劑(例如結合至PD-1的拮抗劑抗體)、PD-L1拮抗劑(例如結合至PD-L1的拮抗劑抗體)、CTLA-4拮抗劑(例如結合至CTLA-4的拮抗劑抗體)、A2AR拮抗劑(例如結合至A2AR的拮抗劑抗

體)、B7-H3拮抗劑(例如結合至B7-H3的拮抗劑抗體)、B7-H4拮抗劑(例如結合至B7-H4的拮抗劑抗體)、BTLA拮抗劑(例如結合至BTLA的拮抗劑抗體)、IDO拮抗劑(例如結合至IDO的拮抗劑抗體)、KIR拮抗劑(例如結合至KIR的拮抗劑抗體)、LAG3拮抗劑(例如結合至LAG3的拮抗劑抗體)、TIM-3拮抗劑(例如結合至TIM3的拮抗劑抗體)。在一些實施例中，另一種療法可包含投與免疫檢查點調節劑。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為TGN1412。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為NKTR-214。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為MEDI0562。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為MEDI6469。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為MEDI6383。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為JTX-2011。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為吉舒達(Keytruda) (帕博利珠單抗(pembrolizumab))。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為歐狄沃(Opdivo) (納武單抗(nivolumab))。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為益伏(Yervoy) (伊匹單抗(ipilimumab))。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為曲美木單抗(tremelimumab)。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為泰聖奇(Tecentriq) (阿替利珠單抗(atezolizumab))。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為MGA271。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為吡喹莫德(indoximod)。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為艾帕斯塔(Epacadostat)。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為利瑞路單抗(lirilumab)。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為BMS-986016。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為MPDL3280A。在一個實施例中，免疫檢查點調節劑可為阿維魯單抗(avelumab)。在一個實施例中，免疫

檢查點調節劑可為德瓦魯單抗(durvalumab)。在一個實例中，免疫檢查點調節劑可為MEDI4736。在一個實例中，免疫檢查點調節劑可為MEDI4737。在一個實例中，免疫檢查點調節劑可為TRX518。在一個實例中，免疫檢查點調節劑可為MK-4166。在一個實例中，免疫檢查點調節劑可為優瑞路單抗(urelumab) (BMS-663513)。在一個實例中，免疫檢查點調節劑可為PF-05082566 (PF-2566)。

【0085】 在某些實例中，在另一種療法為放射的情況下，例示性劑量可為5,000 Rads (50 Gy)至100,000 Rads (1000 Gy)，或50,000 Rads (500 Gy)，或所述範圍內的其他適當劑量。或者，放射劑量可為約30至60 Gy、約40至約50 Gy、約40至48 Gy，或約44 Gy，或所述範圍內的其他適當劑量，該劑量係藉由例如如上文所述的劑量測定研究確定。如本文所用，「Gy」可以指放射等於100 Rads之吸收劑量比值的單位。Gy為「戈雷(Gray)」的縮寫。

【0086】 在某些實例中，在另一種療法為化學療法的情況下，例示性化學治療劑可包括(不限於)烷基化劑(例如氮芥衍生物、伸乙亞胺、烷基磺酸鹽、胍及三嗪、亞硝基脲及金屬鹽)、植物鹼(例如長春花生物鹼、紫杉烷、鬼臼毒素(podophyllotoxin)及喜樹鹼類似物)、抗腫瘤抗生素(例如蒽環黴素(anthracycline)、色黴素(chromomycin)及其類似物)、抗代謝物(例如葉酸拮抗劑、嘧啶拮抗劑、嘌呤拮抗劑，及腺苷去胺酶抑制劑)、拓撲異構酶I抑制劑、拓撲異構酶II抑制劑，及其他抗腫瘤藥(例如核糖核苷酸還原酶抑制劑、腎上腺皮質類固醇抑制劑、酶、抗微管劑及類視黃素)。例示性化學治療劑可包括(不限於)阿那曲唑(anastrozole) (Arimidex®)、比卡魯胺(bicalutamide)

(Casodex®)、硫酸博萊黴素(bleomycin sulfate) (Blenoxane®)、白消安(busulfan) (Myleran®)、白消安注射劑(Busulfex®)、卡培他濱(capecitabine) (Xeloda®)、N4-戊氧基羰基-5-去氧-5-氟胞苷、卡鉑(carboplatin) (Paraplatin®)、卡莫司汀(carmustine) (BiCNU®)、苯丁酸氮芥(chlorambucil) (Leukeran®)、順鉑(cisplatin) (Platinol®)、克拉屈濱(cladribine) (Leustatin®)、環磷醯胺(cyclophosphamide) (Cytoxan®或Neosar®)、阿糖胞苷(cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂質體注射劑(DepoCyt®)、達卡巴嗪(dacarbazine) (DTIC-Dome®)、放線菌素(dactinomycin) (放線菌素D、克斯美(Cosmegen))、鹽酸道諾黴素(daunorubicin hydrochloride) (Cerubidine®)、檸檬酸道諾黴素脂質體注射劑(DaunoXome®)、地塞米松(dexamethasone)、多西他賽(docetaxel) (Taxotere®)、鹽酸阿黴素(doxorubicin hydrochloride) (Adriamycin®、Rubex®)、依託泊苷(etoposide) (Vepesid®)、磷酸氟達拉濱(fludarabine phosphate) (Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(flutamide) (Eulexin®)、替紮他濱(tezacitibine)、吉西他濱(Gemcitabine) (二氟去氧胞苷)、羥脲(hydroxyurea) (Hydrea®)、艾達黴素(Idarubicin) (Idamycin®)、異環磷醯胺(ifosfamide) (IFEX®)、伊立替康(irinotecan) (Camptosar®)、L-天冬醯胺酶(ELSPAR®)、亞葉酸鈣、美法侖(melphalan) (Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲胺喋呤(methotrexate) (Folex®)、米托蒽醌(mitoxantrone) (Novantrone®)、麥羅塔(mylotarg)、紫杉醇(paclitaxel) (Taxol®)、菲尼克斯(phoenix) (鈹90/MX-DTPA)、噴司他汀(pentostatin)、聚苯丙生20聯合卡莫司汀植

入(Gliadel®)、檸檬酸他莫昔芬(tamoxifen citrate) (Nolvadex®)、替尼泊昔(teniposide) (Vumon®)、6-硫鳥嘌呤、噻替派(thiotepa)、替拉紫明(tirapazamine) (Tirazone®)、注射用的鹽酸鹽拓朴替康(topotecan hydrochloride) (Hycamptin®)、長春鹼(vinblastine) (Velban®)、長春新鹼(vincristine) (Oncovin®)，及長春瑞賓(vinorelbine) (Navelbine®)、依魯替尼(Ibrutinib)、艾德昔布(idelalisib)，及本妥昔單抗維多汀(brentuximab vedotin)。

【0087】 例示性烷基化劑可包括(不限於)氮芥、伸乙亞胺衍生物、烷基磺酸鹽、亞硝基脲及三氮烯)：尿嘧啶氮芥(Aminouracil Mustard®、Chlorethaminacil®、Demethyldopan®、Desmethyldopan®、Haemanthamine®、Nordopan®、Uracil nitrogen Mustard®、Uracillost®、Uracilmostaza®、Uramustin®、Uramustine®)、甲川氯(chlormethine)(Mustargen®)、環磷醯胺(Cytoxan®、Neosar®、Clafen®、Endoxan®、Procytox®、Revimmune™)、異環磷醯胺(Mitoxana®)、美法侖(Alkeran®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、哌泊溴烷(Amedel®、Vercyte®)、三伸乙基蜜胺(Hemel®、Hexalen®、Hexastat®)、三伸乙基硫代磷胺、替莫唑胺(Temozolomide) (Temodar®)、噻替派(thiotepa) (Thioplex®)、白消安(busulfan) (Busilvex®、Myleran®)、卡莫司汀(carmustine) (BiCNU®)、洛莫司汀(lomustine) (CeeNU®)、鏈脲菌素(streptozocin) (Zanosar®)，及達卡巴嗪(Dacarbazine) (DTIC-Dome®)。其他例示性烷基化劑包括(但不限於)奧沙利鉑(Oxaliplatin) (Eloxatin®)；替莫唑胺(Temodar®及 Temodal®)；放線菌素(亦稱為放線菌素-D、

Cosmegen®)；美法侖(亦稱為L-PAM、L-溶肉瘤素，及苯丙胺酸芥末 Alkeran®)；六甲蜜胺(亦稱為六甲三聚氰胺(HMM)、Hexalen®)；卡莫司汀(Carmustine) (BiCNU®)；苯達莫司汀(Bendamustine) (Treanda®)；白消安(Busulfex®及Myleran®)；卡鉑(Paraplatin®)；洛莫司汀(亦稱為CCNU、CeeNU®)；順鉑(亦稱為CDDP、Platinol®及Platinol®-AQ)；苯丁酸氮芥(Leukeran®)；環磷醯胺(Cytosan®及Neosar®)；達卡巴嗪(亦稱為DTIC、DIC及咪唑甲醯胺、DTIC-Dome®)；六甲蜜胺(亦稱為六甲三聚氰胺(HMM)、Hexalen®))；異環磷醯胺(Ifex®)；普莫司汀(Prednumustine)；丙卡巴肼(Procarbazine) (Matulane®)；甲氮芥(亦稱為氮芥、氮化芥子氣及二氮甲基二乙胺鹽酸鹽，Mustargen®)；鏈脲菌素(Zanosar®)；噻替派(亦稱為硫代磷醯胺、TESPA及TSPA，Thioplex®)；環磷醯胺(Endoxan®、Cytosan®、Neosar®、Procytox®、Revimmune®)；及苯達莫司汀鹽酸鹽(Treanda®)。

【0088】例示性蒽環黴素可包括(不限於)例如小紅莓(doxorubicin) (Adriamycin®及Rubex®)；博萊黴素(bleomycin) (Lenoxane®)；道諾黴素(daunorubicin) (鹽酸道諾黴素、柔紅黴素(daunomycin)，及紅比黴素鹽酸鹽，Cerubidine®)；脂質體道諾黴素(檸檬酸道諾黴素脂質體，DaunoXome®)；米托蒽醌(mitoxantrone) (DHAD、Novantrone®)；表柔比星(epirubicin) (Ellence™)；艾達黴素(idarubicin) (Idamycin®、Idamycin PFS®)；絲裂黴素C (Mutamycin®)；格爾德黴素(geldanamycin)；除莠黴素(herbimycin)；灰黴素(ravidomycin)；及去乙酰基灰黴素(desacetylraavidomycin)。

【0089】 例示性長春花生物鹼可包括(但不限於)酒石酸長春瑞賓(vinorelbine tartrate) (Navelbine®)、長春新鹼(Vincristine) (Oncovin®)及長春地辛(Vindesine) (Eldisine®)；長春鹼(vinblastine) (亦稱為硫酸長春鹼(vinblastine sulfate)、長春花鹼(vincal leukoblastine)及 VLB，Alkaban-AQ®及 Velban®)；及長春瑞賓(vinorelbine) (Navelbine®)。

【0090】 例示性蛋白酶體抑制劑可為(但不限於)硼替佐米(bortezomib) (Velcade®)；卡非佐米(carfilzomib) (PX-171-007，(S)-4-甲基-N-((S)-1-(((S)-4-甲基-1-((R)-2-甲基環氧乙烷-2-基)-1-側氧基戊-2-基)胺基)-1-側氧基-3-苯基丙-2-基)-2-((S)-2-(2-嗎啉基乙醯胺基)-4-苯基丁醯胺基)-戊醯胺)；馬瑞佐米(marizomib) (NPI-0052)；檸檬酸依薩佐米(ixazomib citrate) (MLN-9708)；迪蘭佐米(delanzomib) (CEP-18770)；及O-甲基-N-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基]-L-絲胺醯基-O-甲基-N-[(1S)-2-[(2R)-2-甲基-2-環氧乙烷基]-2-側氧基-1-(苯基甲基)乙基]-L-絲胺醯胺(ONX-0912)。

【0091】 如本文所用，「與…組合」可意謂經修飾之病毒(諸如如本文所述的溶瘤牛痘病毒或包含其之醫藥組合物)與另一種療法(諸如包含一種或多種藥劑的另一種療法)作為治療方案或計劃的一部分投與個體。在某些實施例中，組合使用可以不要求經修飾之溶瘤病毒與一種或多種藥劑在實體上合併後再投與，或其在同一時間範圍內投與。舉例而言，而非作為限制，經修飾之溶瘤病毒與一種或多種藥劑可同時投與所治療之個體，或可同時投與或以任何次序依序投與或在不同的時間點投與。

【0092】 在各種實施例中，另一種療法可以液體劑型、固體劑

型、栓劑、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。在某些實施例中，另一種療法投與約1週至約2週、約2週至約3週、約3週至約4週、約4週至約5週、約6週至約7週、約7週至約8週、約8週至約9週、約9週至約10週、約10週至約11週、約11週至約12週、約12週至約24週、約24週至約48週、約48週或約52週、或更長的時段。在某些情況下，另一種療法的投與頻率可為每天一次、每天兩次、每週一次、每三週一次、每四週一次(或一月一次)、每8週一次(或每2個月一次)、每12週一次(或每3個月一次)，或每24週一次(每6個月一次)。在某些實施例中，治療患有癌症之個體的方法可包括將有效量的本揭示案之經修飾之溶瘤病毒(例如經修飾之牛痘病毒)投與個體。在某些實施例中，本揭示案的方法可進一步包括向個體投與有效量的一種或多種藥劑。舉例而言，而非為了限制，藥劑可為如上文所述的抗癌劑、免疫調節劑或其任何組合。

經修飾之牛痘病毒的表徵

【0093】 如上文所論述，在一些實施例中，本揭示案提供包含經修飾之牛痘病毒的疫苗組合物，該牛痘病毒不複製或複製不充分。在一些實施例中，為了確定指定病毒在細胞類型(例如纖維母細胞的細胞系)中是否為複製勝任型或複製缺乏型，用已知量的測試病毒感染該細胞類型，表示「輸入」效價。評估複製特性之前，使用用於滴定輸入病毒的容許病毒感染細胞，藉由諸如TCID₅₀方法之類的方法測定輸入效價。適當地稀釋病毒接種體以獲得所需的輸入效價。所選細胞類型保持感染總共約4天，隨後藉由溶解感染細胞來製備病毒樣

品。接著如下文所述將此等病毒樣品滴定於CEF指示劑細胞上。此為「輸出」效價。輸出效價對輸入效價的比率低於1表明測試病毒在測試條件下為複製非勝任型，而輸出效價對輸入效價的比率等於或大於1表明測試病毒在測試條件下為複製勝任型。

【0094】 就TCID₅₀方法而言，為了測定測試病毒複製特性，可將所選細胞以每孔約 5×10^5 個細胞的濃度接種於6孔盤且在適當培養基(諸如DMEM (Gibco，目錄號61965-026) + 2% FCS)中在37°C及5% CO₂下培育隔夜。可移除細胞培養基，且可將細胞與病毒接種體一起在37°C及5% CO₂氛圍下培育一小時。每次感染不同細胞類型使用的病毒量可為約 5×10^4 TCID₅₀。此可為上文提及之病毒「輸入」效價。在37°C下歷時一小時之後，可藉由抽吸移除接種體且細胞接著用DMEM洗滌3次，最後用1 ml DMEM洗滌，添加2% FCS，且將培養盤在37°C及5% CO₂下培育約96小時(4天)。藉由將培養盤在-80°C下冷凍來終止感染，準備用於滴定分析。包含剩餘感染細胞及培養基的所得細胞溶解物為待滴定的病毒樣品，用於輸出效價的測定。因此，樣品含有細胞內以及細胞外病毒。

【0095】 得自複製分析之病毒樣品的滴定分析(使用牛痘病毒特异性抗體的免疫染色)：為了滴定病毒輸出效價，將CEF細胞於RPMI (Gibco，目錄號61870-010)、7% FCS、1%抗生素/抗黴菌素(Gibco，目錄號15240-062)中以每孔 1×10^4 個細胞之濃度接種於96孔盤中且在37°C及5% CO₂下培育隔夜。可將含有實驗感染物的6孔盤冷凍/解凍3次且可使用RPMI生長培養基製備 10^{-1} 至 10^{-12} 的稀釋度。可將病毒稀釋液分配於測試細胞上，重複8次，且在37°C及5% CO₂下培育五天以允

許病毒複製。可將測試細胞固定(例如使用丙酮/甲醇1:1) 10分鐘，風乾，用洗滌緩衝液(PBS/0.05% Tween20)洗滌一次且在室溫下與1:1000於培育緩衝液(PBS/3% FCS)中稀釋的多株牛痘病毒特異性抗體(例如 Quartett Berlin，目錄號9503-2057)一起培育一小時。用洗滌緩衝液洗滌兩次之後，可在室溫下添加1:1000於培育緩衝液中稀釋的辣根過氧化酶(HRP)偶聯二級抗兔IgG抗體(Promega Mannheim，目錄號W4011)維持一小時。細胞可再次用洗滌緩衝液洗滌兩次且在室溫下與染色溶液(1:2經PBS稀釋的3,3',5,5'-四甲基-聯苯胺顯色受質(1.2 mM；Seramun Diagnostic GmbH，目錄號S-002-5-TMB/))一起培育15分鐘。培養盤可用洗滌緩衝液洗滌一次。使用顯微鏡，可對培養盤中的出現紫色之感染細胞進行評分(參看附錄3中的評分表)。染色呈紫色的每個孔可標記為對於病毒複製呈陽性且使用 Spearman-Kaerber 方法(TCID50分析)計算效價。此為「輸出」效價。使用由此獲得的輸入與輸出效價值，可計算輸出:輸入的放大比率以便指示指定病毒在指定細胞類型中複製的程度。使用上述程序可容易確定特定病毒在所選細胞株(例如人類纖維母細胞、雞纖維母細胞、MRC-5細胞)中是否為複製勝任型及複製勝任至何種程度。

【0096】 為了評估如本文所述之經修飾之牛痘病毒之複製能力而可執行的其他例示性方法可包括使用感染經修飾之牛痘病毒之哺乳動物或啮齒動物之血清進行的PCR分析、病毒空斑分析，或其任何組合。

【0097】 本文提供一種用於病毒空斑分析的例示性方法。用牛痘病毒感染組織培養瓶中的敏感細胞匯合單層。培育之後，觀測到細胞

病變效應(CPE)且可經由形成清空細胞單層的光環或環形而被可視化。細胞培養基可用增大黏度的溶液置換。置換的溶液可包括(但不限於)明膠或羧甲基纖維素。敏感細胞包括(但不限於) HeLa、BS-C-1、HuTK- CEF或BHK。病毒空斑分析可藉由增強細胞對比度之試劑染色而被眼或顯微鏡看見。感染之後，可培育4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、36、48個或更多個小時，隨後可觀測到空斑。染色劑可為結晶紫。空斑可具有至少0.05 mm直徑。病毒可作為接種體製備，其中接種體為原液病毒在不同濃度或稀釋度下的製劑。可使用10、100、1000、10000、1000000、10000000倍或更多倍稀釋度進行稀釋。病毒效價或濃度可用空斑形成單位/mL (pfu/mL)量度。

【0098】 本文提供用於基於PCR之分析的一種例示性方法。牛痘病毒含量可使用基於qPCR的方法定量。為了偵測牛痘病毒基因體的存在，使用qPCR擴增DNA。為了偵測該牛痘病毒基因體之表現產物的存在，可使用RT-qPCR擴增RNA。qPCR引子可設計成擴增牛痘病毒基因體的一個區域。對於RT-qPCR而言，引子可設計成偵測牛痘基因體的特定表現產物。RT-qPCR與qPCR引子可相同或可不同。該區域可由5、10、100、200、500、1000、5000個或更多個連續鹼基對組成。DNA及RNA可使用熟習此項技術者已知的方法分離。對於基於qPCR的方法而言，使用已知標準測定存在於輸入中的病毒的濃度或效價。

【0099】 病毒製造可能需要對病毒組合物(諸如包含如本文所述之經修飾之牛痘病毒的疫苗組合物)中的病毒含量進行定量。病毒定量可包括(但不限於)基於發光、螢光、蛋白質或PCR的分析。可使用

流式細胞術進行基於螢光之定量分析。基於PCR的病毒定量分析可包括基於PCR的方法。為了測定存在於組合物中的病毒的量，可定量及量測病毒基因體的存在。分離核酸基因體之前，可將輸入病毒溶解或滅活。病毒定量可藉由量測蛋白質含量達成。在一些情況下，可藉由層析分析、ELISA、定量免疫墨點法或其他適合的蛋白質定量分析來量測蛋白質含量。所測蛋白質可為微生物病原性抗原或腫瘤相關抗原。

例示性實施例

【0100】 本文提供一種經修飾之溶瘤牛痘病毒，其包含：(a)編碼包含代謝調節蛋白或其功能片段或變異體的融合蛋白的外源核酸；(b)編碼趨化因子受體或其功能片段或變異體的外源核酸；及(c)病毒骨架的基因修飾。本文進一步提供其中編碼趨化因子受體的外源核酸包含趨化因子受體之人類編碼序列的密碼子優化變異體。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中該融合蛋白進一步包含細胞介素或其功能片段或變異體。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中趨化因子受體包含以下至少一者：CXC受體、CC受體、CX3C受體、XC受體、其功能片段或其變異體，或其任何組合。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中趨化因子受體包含以下至少一者：CXCR1、CXCR2、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CX3CR1、XCR1、其功能片段或其變異體，或其任何組合。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中趨化因子受體包含CXC受體，且其中CXC受體包含CXCR4。本文進一步提供

經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中趨化因子受體為CCR2。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中趨化因子受體包含密碼子優化CCR2。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中病毒骨架中的基因修飾為A52R基因之突變或缺失。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中該缺失為完全或部分缺失。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中該溶瘤牛痘病毒進一步包含胸苷激酶基因缺失。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中該牛痘病毒為牛痘病毒西方儲備株(ATCC VR-1354)、哥本哈根株、IHD株、惠氏株(ATCC VR-1536)、NYCBOH株、天壇株(Tian Tan strain)、李斯特株、安卡拉株(ATCC VR-1508或ATCC VR-1566)、USSR株、ACAM2000株、巴黎株、伯恩株、天壇株(Temple of Heaven strain)、戴爾倫株、EM-63株、伊凡氏株、肯恩株、帕瓦丹加株或撻什肯株。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中將編碼融合蛋白的外源核酸選殖入胸苷激酶基因的基因座中。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中將編碼趨化因子受體的外源核酸選殖入A52R基因的基因座中。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中編碼包含代謝調節蛋白或其功能片段或變異體之融合蛋白的外源核酸包含與序列SEQ ID NO: 1至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中編碼趨化因子受體或其功能片段或變異體的外源核酸包含與序列SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其進一步包含編碼玻糖

醛酸酶的外源核酸。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中該
玻糖醛酸酶為PH-20或HysA。

【0101】 本文提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其包含(a)編碼瘦素-
介白素(IL)-2融合蛋白的外源核酸；(b)編碼CCR2的外源核酸；及(c)
A52R基因缺失。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中牛痘
病毒為牛痘病毒西方儲備株(ATCC VR-1354)。本文進一步提供經修飾
之溶瘤牛痘病毒，其中該溶瘤牛痘病毒進一步包含胸苷激酶基因缺
失。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中將編碼瘦素-介白
素(IL)-2融合蛋白的外源核酸選殖入胸苷激酶基因的基因座中。本文
進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其中將編碼CCR2的核酸選殖入
A52R基因的基因座中。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其
進一步包含選自由以下組成之群之病毒基因的突變或缺失：A1、
A2、VH1、A33、I7、K7R、B8R、C12L、B15R、B14R、K1L、
N1L、M2L、A49R、A46R、E3L、C4、C16，及其功能域或片段或變
異體，或其任何組合。本文進一步提供經修飾之溶瘤牛痘病毒，其進
一步包含編碼以下至少一者的外源核酸：HMGB1、PIAS3、LIGHT、
不規則趨化因子、ITAC、IL15、IL15R α 、CCL5、其功能域或片段或
變異體，或其任何組合。

【0102】 本文提供包含根據本發明之經修飾之溶瘤病毒的醫藥組
合物。本文進一步提供醫藥組合物，其進一步包含以下至少一者：增
溶劑、賦形劑或醫藥學上可接受之載劑。本文進一步提供醫藥組合
物，其中賦形劑包含以下一者或多者：緩衝劑、穩定劑、抗氧化劑、
黏合劑、稀釋劑、分散劑、速率控制劑、潤滑劑、助滑劑、崩解劑、

塑化劑、防腐劑或其任何組合。本文進一步提供醫藥組合物，其中該賦形劑包含二水合磷酸氫二鈉、二水合磷酸二氫鈉、氯化鈉、肌醇、山梨糖醇或其任何組合。本文進一步提供不包含防腐劑之醫藥組合物。本文進一步提供醫藥組合物，其進一步包含防腐劑、稀釋劑及載劑中的一者或多者。本文進一步提供醫藥組合物，其進一步包含另一種活性成分或其鹽。本文進一步提供醫藥組合物，其中增溶劑為無菌水。本文進一步提供醫藥組合物，其進一步包含另一種活性成分，其中該另一種活性成分為抗癌劑或另一種溶瘤病毒。

【0103】 本文提供一種套組，其包含本揭示案的經修飾之溶瘤牛痘病毒。

【0104】 本文提供一種套組，其包含本揭示案之醫藥組合物。本文進一步提供該套組，其進一步包含以下至少一者：抗癌劑或另一種溶瘤病毒。

【0105】 本文提供一種在經修飾之溶瘤牛痘病毒全身遞送至個體後，相對於包含TK突變、但不包含編碼融合蛋白之外源核酸或編碼趨化因子受體之外源核酸的參考牛痘病毒全身投與，使經修飾之溶瘤牛痘病毒之治療作用增強的方法，其包含根據本揭示案之經修飾之溶瘤牛痘病毒或根據本揭示案之醫藥組合物的全身投與。

【0106】 本文提供一種治療方法，其包含將根據本揭示案的溶瘤牛痘病毒或本揭示案的醫藥組合物投與個體，其中該投與相對於將包含胸腺嘧啶核苷激酶基因缺失(TK-)、不包含(a)及(b)中之任一者的參考溶瘤牛痘病毒投與個體，使得個體的全身免疫反應增強。本文進一步提供該方法，其中該投與為全身投與。本文進一步提供該方法，其

中全身投與包含以下至少一者：經口投與、靜脈內投與、鼻內投與、舌下投與、直腸投與、經皮投與，或其任何組合。本文進一步提供該方法，其中個體患有癌症。

【0107】 本文提供一種治療個體之癌症的方法，該方法包含向該個體投與治療有效量的本揭示案之經修飾之溶瘤牛痘病毒。本文進一步提供本揭示案之該方法，其中癌症為以下至少一者：黑色素瘤、肝細胞癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、腹膜癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、白血病、淋巴瘤、腎細胞癌、胰臟癌、上皮癌、胃/胃食管結合部腺癌、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、十二指腸癌、胰臟腺癌、腺樣囊性癌、肉瘤、間皮瘤、多形性神經膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、多發性骨髓瘤、前列腺癌、肝細胞癌、膽管癌、胰臟腺癌、頭頸部鱗狀細胞癌、子宮頸鱗狀細胞癌、骨肉瘤、上皮性卵巢癌、急性淋巴母細胞性淋巴瘤、骨髓增生性腫瘤或其任何組合。本文進一步提供本揭示案之該方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物係以包含約 10^6 PFU/mL至約 10^{10} PFU/mL溶瘤牛痘病毒之劑量投與。本文進一步提供本揭示案之該方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物係以包含約 5×10^9 PFU/mL溶瘤牛痘病毒之劑量投與。本文進一步提供本揭示案之該方法，其中第一時段以初始劑量、第二時段以中等劑量且第三時段以高劑量獨立地投與經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物。本文進一步提供該方法，其包含獨立地投與初始劑量、中等劑量及高劑量，其中初始劑量低於中等劑量且中等劑量低於高劑量。本文進一步提供該方法，其中第一、第二及第三時段各自為約1週至約3週。本文進一步提供該方法，其中經修飾之溶瘤病毒及醫藥組合物獨立地包含

液體劑型，該液體劑型投與的體積為約1 mL至約5 mL、約5 mL至10 mL、約15 mL至約20 mL、約25 mL至約30 mL、約30 mL至約50 mL、約50 mL至約100 mL、約100 mL至150 mL、約150 mL至約200 mL、約200 mL至約250 mL、約250 mL至約300 mL、約300 mL至約350 mL、約350 mL至約400 mL、約400 mL至約450 mL、約450 mL至500 mL、約500 mL至750 mL，或約750 mL至1000 mL。本文進一步提供該方法，其中經修飾之溶瘤病毒、溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物係以液體劑型、固體劑型、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。本文進一步提供該方法，其中經修飾之溶瘤病毒、溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物投與的持續時間為約1週、約2週、約3週、約4週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週或約12週。本文進一步提供該方法，其中經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物每天一次、每天兩次、每週一次、每兩週一次或每三週一次投與。本文進一步提供該方法，其中藉由靜脈內、腹膜內或瘤內注射來投與經修飾之溶瘤病毒或醫藥組合物。本文進一步提供該方法，其中經修飾之溶瘤病毒、溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物以彈丸注射或緩慢輸注形式投與。本文進一步提供該方法，其中經修飾之溶瘤病毒、溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物的投與在第一次劑量投與的約1小時至約3天之後引起第一峰值病毒負荷且在約3天至約10天之後引起第二峰值病毒負荷。本文進一步提供該方法，其包含投與另一種療法，其中該另一種療法投與的持續時間為約1週、約2週、約3週、約4週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週或約12週。本文進一步提供該方法，其中另一種療法每天一次、每週一次、每兩週一

次或每三週一次投與。本文進一步提供該方法，其中另一種療法係以液體劑型、固體劑型、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。本文進一步提供該方法，其中投與另一種療法的持續時間為約1週、約2週、約3週、約4週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週或約12週。本文進一步提供該方法，其中另一種療法每天一次、每週一次、每兩週一次或每三週一次投與。本文進一步提供該方法，其中另一種療法係以液體劑型、固體劑型、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。本文進一步提供該方法，其中另一種療法係經口、靜脈內、藉由瘤內注射或藉由放射投與。本文進一步提供該方法，其中個體為人類。本文進一步提供該方法，其中在經修飾之溶瘤病毒、溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物投與之前，個體已診斷患有癌症。本文進一步提供該方法，其中在經修飾之溶瘤病毒、溶瘤牛痘病毒或醫藥組合物或另一種療法投與之前，個體已診斷患有癌症。本文進一步提供該方法，其中另一種療法包含化學療法、放射、使用另一種病毒的溶瘤病毒療法、免疫調節蛋白治療、CAR T細胞療法、抗癌劑或其任何組合。本文進一步提供該方法，其中另一種療法包含投與免疫調節劑，該免疫調節劑包含抗CD33抗體及其可變區、抗CD11b抗體及其可變區、COX2抑制劑、細胞介素、趨化因子、抗CTLA4抗體或其抗原結合片段、抗PD-1抗體或其抗原結合片段、抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，或TLR促效劑。本文進一步提供該方法，其包含投與另一種療法，其中另一種療法包含投與抗癌劑，其中抗癌劑為化學治

療劑。

【0108】 雖然本文已顯示及描述本發明之較佳實施例，但對於熟習此項技術者顯而易見的是，此類實施例僅為了舉例而提供。熟習此項技術者現將想到諸多變化、變更及取代而不背離本發明。應瞭解，本文所述之本發明實施例的各種替代方案可用於實施本發明。希望以下申請專利範圍限定本發明之範圍，且從而涵蓋此申請專利範圍及其等效物之範圍內的方法及結構。

實例

【0109】 為了更好地瞭解本揭示案及其許多優點，以說明的方式提供以下實例，其不限制本揭示案的範圍。

【0110】 實例1：被修飾成缺失A52R及TK基因及插入CCR2及瘦素-IL-2的例示性的經修飾之牛痘病毒對LLC腫瘤模型展示增強的治療作用及全身遞送

【0111】 此研究的目標為探究如本文所述之經修飾之牛痘病毒的治療作用及全身遞送。藉由缺失A52R基因及胸苷激酶(TK)基因且插入編碼CCR2的外源核酸及編碼瘦素-介白素(IL)-2融合蛋白(在本文中稱為WR.Tk-.A52R-.CCR2.瘦素-IL2；亦縮寫為「MMC」)的外源核酸而將修飾引入牛痘病毒西方儲備株(WR)的基因體中。

【0112】 使用LLC腫瘤模型進行一項研究，以便對例示性的經修飾之牛痘病毒與作為參考病毒的具有TK缺失之牛痘病毒西方儲備株(稱為WR.TK-)及作為對照的媒劑(緩衝鹽水)進行比較。當腫瘤達到50-100 MM³的尺寸時，靜脈內投與 2×10^7 PFU的劑量，以治療第0天及第3天皮下植入LLC腫瘤的小鼠(C57/B6) [結果展示於圖2A、圖2B及圖

2C中]。應注意，相較於對照及參考病毒，靜脈內投與的例示性的經修飾之牛痘病毒使得腫瘤體積生長顯著延遲，如圖2A中所示。另外，圖2B亦表明，例示性的經修飾之牛痘病毒的投與亦顯著提高小鼠的存活概率。結果表明例示性的經修飾之牛痘病毒的治療作用有所增強。另外，病毒投與之後的第28天量測接受例示性的經修飾之牛痘病毒或參考病毒WR.TK-病毒或對照之各組的腫瘤體積[圖2C]。圖2A、2B及2C中所示的結果顯示，例示性的經修飾之牛痘病毒的投與使得治療活性顯著增強。

【0113】 使用LLC腫瘤模型進行另一項研究，以便對例示性的經修飾之牛痘病毒與參考病毒(WR.TK-牛痘病毒株)對腫瘤的全身遞送進行比較。向皮下植入LLC腫瘤的小鼠(C57/B6)靜脈內投與 1×10^7 PFU的劑量。靜脈內遞送之後的第24小時，收集腫瘤，且藉由qPCR定量每毫克腫瘤的病毒基因體數目[圖2D]。如圖2D中所示的結果指示例示性的經修飾之牛痘病毒的全身遞送相較於參考WR.TK-病毒顯著增強。

【0114】 上述實例明確指明例示性的經修飾之牛痘病毒對腫瘤展示顯著增強的治療活性且對腫瘤位點展示很高的全身遞送。

【0115】 實例2 - 本揭示案的例示性的經修飾之牛痘病毒對LLC腫瘤模型之預免疫接種小鼠展示增強的治療作用及全身遞送

【0116】 此研究的目標為探究根據本揭示案的例示性的經修飾之牛痘病毒對預免疫接種小鼠與非免疫接種小鼠的治療作用及全身遞送的比較。

【0117】 此研究中使用具有皮下LLC腫瘤的C57/B6小鼠。一組小

鼠在腫瘤植入之前的30天，經由一次注射，以 1×10^6 PFU的劑量投與參考病毒牛痘病毒株WR.TK-的免疫接種(圖3A中標記為「MMC免疫」)，且另一組不接受免疫接種(圖3A中標記為「MMC」)。

【0118】當在植入之後的大約第10天，腫瘤已達到 $50-100 \text{ mm}^3$ 時，向小鼠給予兩種病毒中任一種的兩次靜脈內注射(2次 1×10^7 PFU/mL劑量，相隔3天)。平均腫瘤體積研究結果展示於圖3A中。結果表明，相較於投與媒劑的小鼠，例示性的經修飾之牛痘病毒對免疫接種小鼠與非免疫接種小鼠的腫瘤均顯示良好的治療活性。

【0119】在另一研究中，對LLC腫瘤模型進行研究，以對全身遞送至免疫接種例示性的經修飾之牛痘病毒之小鼠與非免疫接種小鼠的腫瘤進行比較。選擇具有皮下腫瘤的兩組C57/B6小鼠。一組在腫瘤植入之前的第30天，以 1×10^6 PFU的劑量，經由一次注射投與參考病毒牛痘病毒株WR.TK-的免疫接種，且另一組為具有皮下LLC腫瘤的初始小鼠，且另一組不接受免疫接種。兩組均靜脈內投與 1×10^7 PFU的劑量，且靜脈內遞送之後的第24小時收集腫瘤。研究藉由qPCR定量之每毫克腫瘤的病毒基因體數目[圖3B]。如圖3B中所示的結果表明例示性的經修飾之牛痘病毒在預免疫接種組(「MMC免疫接種」)與非免疫接種組(「MMC」)中均達成良好的全身遞送。

【0120】上述研究表明，相對於對照病毒，例示性的經修飾之牛痘病毒在有預免疫接種與沒有預免疫接種之情況下均展示增強的遞送及治療功效。

【0121】**實例3 - 本揭示案的例示性的經修飾之牛痘病毒對RENCA腫瘤模型展示增強的治療作用**

【0122】 此研究的目標為探究根據本揭示案的例示性的經修飾之牛痘病毒(包含如前述實例中所述的修飾)對RENCA腫瘤模型的治療作用。

【0123】 使用RENCA腫瘤模型進行研究，以便對例示性的經修飾之牛痘病毒的治療活性與作為參考病毒的具有TK缺失之牛痘病毒西方儲備株(稱為WR.TK-)及作為對照的媒劑(緩衝鹽水)進行比較。當腫瘤達到50-100 MM³尺寸時，靜脈內投與 2×10^7 PFU劑量的病毒或對照以治療植入有皮下RENCA腫瘤的BALB/c小鼠[圖4]。首次治療後第14天的個別小鼠腫瘤尺寸結果展示於圖4中。圖4中的結果表明，相較於參考牛痘病毒株WR.TK-及對照，靜脈內投與的例示性的經修飾之牛痘病毒使得腫瘤尺寸顯著更小。

【0124】 **實例4 - 本揭示案之例示性的經修飾之牛痘病毒的生物分佈研究展示較高的腫瘤選擇性以及在正常組織中的低聚集**

【0125】 此研究的目標為使用LLC腫瘤模型研究例示性的經修飾之牛痘病毒(圖5A及圖5B中標記為NT428N，其包含如上文在實例1中所述的修飾)相較於參考病毒(WR.TK-A52R-)牛痘病毒株(圖5A及圖5B中以NT202N所示)在腫瘤中的生物分佈(相較於所有其他組織)。

【0126】 在此研究中，經由尾靜脈向兩組小鼠遞送劑量為 1×10^7 PFU的例示性的經修飾之牛痘病毒(NT428N)或缺失TK及A52R基因且不表現CCR2或瘦素的牛痘病毒(對照病毒，稱為NT202N)。一組小鼠為無腫瘤的C57/B6小鼠[圖5A]且另一組小鼠為具有皮下LLC腫瘤的C57/B6小鼠[圖5B]。在遞送之後的第72小時處死小鼠且收集器官(肝臟、脾臟、腦、心臟、腎臟、胃腸道、骨髓、肺及腫瘤)且根據qPCR

標示無腫瘤組及LLC腫瘤組的病毒基因體[圖5A及圖5B]。隨後，在遞送之後的第10天處死小鼠且收集器官(肝臟、脾臟、腦、心臟、腎臟、胃腸道、骨髓、肺及腫瘤)進行H&E染色。運行H&E染色劑，且獲得完整病理學報告[表1]。

【0127】圖5A及圖5B的生物分佈研究表明，與對照病毒(NT202N)相比，例示性的經修飾之牛痘病毒(NT428N)在所有組織中均展示更低的效價，且組織在表現CCR2時均未展示病毒負荷增加。在荷瘤小鼠中，腫瘤中的病毒基因體顯著高於任何其他組織或器官。

【0128】表1中的病理學研究表明，例示性的經修飾之牛痘病毒具有良好耐受性且預期比目前用於臨床配置中的類似病毒更安全。

【0129】表1 - 治療後第10天的病理學報告

器官	報告
腦	無明顯發現
心臟	對照病毒(202)組(6隻)中的一隻小鼠顯示局灶性心肌變性；NT428N組中未見
肺	無明顯發現
肝臟	所有病毒治療組均出現一些脂肪變化及小囊泡性脂肪沈積，NT428N無增加。未發現血液的AST/ALT發生變化。
腎臟	無明顯發現
脾臟	LLC+NT202N組出現骨髓外造血及淋巴增生；對於LLC+NT428N未發現。
胃腸道	無明顯發現
腫瘤	發現兩種病毒療法均出現壞死及發炎，但LLC+NT428N的平均分數最高。亦評估有絲分裂速率，但在LLC+NT428N組中由於沒有足夠的活腫瘤細胞保留下來而不可行，由此說明NT428N病毒在摧毀腫瘤細胞方面比對照病毒NT202N更有效。

序列

SEQ ID NO: 1 (瘦素-IL2融合體核酸序列)

ATGCATTGGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTTGGCCCTATCTTT
TCTATGTCCAAGCTGTGCCCATCCAAAAAGTCCAAGATGACACCAAAACC
CTCATCAAGACAATTGTCACCAGGATCAATGACATTTACACACGCAGTCA
GTCTCCTCCAAACAGAAAGTCACCGGTTTGGACTTCATTCCTGGGCTCCAC
CCCATCCTGACCTTATCCAAGATGGACCAGACACTGGCAGTCTACCAACAG
ATCCTCACCAGTATGCCTTCCAGAAACGTGATCCAAATATCCAACGACCTG
GAGAACCTCCGGGATCTTCTTCACGTGCTGGCCTTCTCTAAGAGCTGCCAC
TTGCCCTGGGCCAGTGGCCTGGAGACCTTGGACAGCCTGGGGGGTGTCTT
GGAAGCTTCAGGCTACTCCACAGAGGTGGTGGCCCTGAGCAGGCTGCAGG
GGTCTCTGCAGGACATGCTGTGGCAGCTGGACCTCAGCCCTGGGTGCGGA
GGTGGCGGATCCGGCGGAGGTGGCTCAGGTGGCGGTGGATCAGGAGGAG
GTGGATCAGCTAGCGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTA
CAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATA
ATTACAAGAATCCCAAACCTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGC
CCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAATC
AAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTTCACTT
AAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAA
GGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCAT
TGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACA
CTGACTTGA

SEQ ID NO: 2 (編碼CCR2變異體467的核酸序列)：

ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAGC
GGTGAAGAAGTCACCACCTTTTTTGATTATGATTACGGTGCTCCCTGTCATA
AATTTGACGTGAAGCAAATTGGGGCCCAACTCCTGCCTCCGCTCTACTCGC
TGGTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCGTCCTCATCTTAAT
AAACTGCAAAAAGCTGAAGTGCTTGACTGACATTTACCTGCTCAACCTGG
CCATCTCTGATCTGCTTTTTCTTATTACTCTCCCATTTGTGGGCTCACTCTGCT
GCAAATGAGTGGGTCTTTGGGAATGCAATGTGCAAATTATTCACAGGGCTG
TATCACATCGGTTATTTTGGCGGAATCTTCTTCATCATCCTCCTGACAATCG
ATAGATACCTGGCTATTGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGT
CACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACCTGGTTGGTGGCTGTGTTTGC
TTCTGTCCCAGGAATCATCTTTACTAAATGCCAGAAAGAAGATTCTGTTTAT
GTCTGTGGCCCTTATTTTCCACGAGGATGGAATAATTTCCACACAATAATGA
GGAACATTTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTCATCATGGTCATCTGCTACTC
GGGAATCCTGAAAACCCTGCTTCGGTGTCGAAACGAGAAGAAGAGGCATA
GGGCAGTGAGAGTCATCTTCACCATCATGATTGTTTACTTTCTCTTCTGGAC
TCCCTATAATATTGTCATTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTCGGCCTG
AGTAACTGTGAAAGCACCAGTCAACTGGACCAAGCCACGCAGGTGACAG
AGACTCTTGGGATGACTCACTGCTGCATCAATCCCATCATCTATGCCTTCGT
TGGGGAGAAGTTCAGAAGCCTTTTTTACATAGCTCTTGGCTGTAGGATTGC
CCCCTCCAAAAACCAGTGTGTGGAGGTCCAGGAGTGAGACCAGGAAAG
AATGTGAAAGTGACTACACAAGGACTCCTCGATGGTCGTGGAAAAGGAAA
GTCAATTGGCAGAGCCCCTGAAGCCAGTCTTCAGGACAAAGAAGGAGCCT
AG

SEQ ID NO: 3 (編碼CCR2變異體502的核酸序列)：

ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAGC
GGTGAAGAAGTCACCACCTTTTTTGATTATGATTACGGTGCTCCCTGTCATA
AATTTGACGTGAAGCAAATTGGGGCCCAACTCCTGCCTCCGCTCTACTCGC
TGGTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCGTCCTCATCTTAAT
AAACTGCAAAAAGCTGAAGTGCTTGACTGACATTTACCTGCTCAACCTGG
CCATCTCTGATCTGCTgTTcCTTATTACTCTCCCATTGTGGGCTCACTCTGCT
GCAAATGAGTGGGTCTTTGGGAATGCAATGTGCAAATTATTCACAGGGCTG
TATCACATCGGTTATTTTGGCGGAATCTTCTTCATCATCCTCCTGACAATCG
ATAGATACCTGGCTATTGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGT
CACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACCTGGTTGGTGGCTGTGTTTGC
TTCTGTCCCAGGAATCATCTTTACTAAATGCCAGAAAGAAGATTCTGTTTAT
GTCTGTGGCCCTTATTTTCCACGAGGATGGAATAATTTCCACACAATAATGA
GGAACATTTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTCATCATGGTCATCTGCTACTC
GGGAATCCTGAAAACCCTGCTTCGGTGTCGAAACGAGAAGAAGAGGCATA
GGGCAGTGAGAGTCATCTTCACCATCATGATTGTTTACTTTCTCTTCTGGAC
TCCCTATAATATTGTCATTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTCGGCCTG
AGTAACTGTGAAAGCACCAGTCAACTGGACCAAGCCACGCAGGTGACAG
AGACTCTTGGGATGACTCACTGCTGCATCAATCCCATCATCTATGCCTTCGT
TGGGGAGAAGTTCAGAAGCCTTTTTTACATAGCTCTTGGCTGTAGGATTGC
CCCCTCCAAAAACCAGTGTGTGGAGGTCCAGGAGTGAGACCAGGAAAG
AATGTGAAAGTGACTACACAAGGACTCCTCGATGGTCGTGGAAAAGGAAA
GTCAATTGGCAGAGCCCCTGAAGCCAGTCTTCAGGACAAAGAAGGAGCCT
AG

SEQ ID NO: 4 (編碼瘦素的核酸序列)

GTAGGAATCGCAGCGCCAGCGGTTGCAAGGCCCAAGAAGCCCATCCT
GGGAAGGAAAATGCATTGGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTTGGC
CCTATCTTTTCTATGTCCAAGCTGTGCCCATCCAAAAGTCCAAGATGACA
CCAAAACCCTCATCAAGACAATTGTCACCAGGATCAATGACATTTACACA
CGCAGTCAGTCTCCTCCAAACAGAAAGTCACCGGTTTGGACTTCATTCCTG
GGCTCCACCCCATCCTGACCTTATCCAAGATGGACCAGACACTGGCAGTCT
ACCAACAGATCCTCACCAGTATGCCTTCCAGAAACGTGATCCAAATATCCA
ACGACCTGGAGAACCTCCGGGATCTTCTTCACGTGCTGGCCTTCTCTAAGA
GCTGCCACTTGCCCTGGGCCAGTGGCCTGGAGACCTTGGACAGCCTGGGG
GGTGTCTGGAAGCTTCAGGCTACTCCACAGAGGTGGTGGCCCTGAGCAG
GCTGCAGGGGTCTCTGCAGGACATGCTGTGGCAGCTGGACCTCAGCCCTG
GGTGCTGAGGCCTTGAAGGTCACTCTTCCTGCAAGGACTACGTTAAGGGA
AGGAACTCTGGCTTCCAGGTATCTCCAGGATTGAAGAGCATTGCATGGACA
CCCCTTATCCAGGACTCTGTCAATTTCCCTGACTCCTCTAAGCCACTCTTCC
AAAGGCATAAGACCCTAAGCCTCCTTTTGCTTGAAACCAAAGATATATACA
CAGGATCCTATTCTCACCAGGAAGGGGGTCCACCCAGCAAAGAGTGGGCT
GCATCTGGGATTCCCACCAAGGTCTTCAGCCATCAACAAGAGTTGTCTTGT
CCCCTCTTGACCCATCTCCCCCTCACTGAATGCCTCAATGTGACCAGGGGT
GATTCAGAGAGGGCAGAGGGGTAGGCAGAGCCTTTGGATGACCAGAAC
AAGGTTCCCTCTGAGAATTCCAAGGAGTTCCATGAAGACCACATCCACAC
ACGCAGGAACTCCCAGCAACACAAGCTGGAAGCACATGTTTATTTATTCTG
CATTTTATTCTGGATGGATTTGAAGCAAAGCACCAGCTTCTCCAGGCTCTTT
GGGGTCAGCCAGGGCCAGGGGTCTCCCTGGAGTGCAGTTTCCAATCCCAT

AGATGGGTCTGGCTGAGCTGAACCCATTTTGAGTGACTCGAGGGTGGGT
TCATCTGAGCAAGAGCTGGCAAAGGTGGCTCTCCAGTTAGTTCTCTCGTAA
CTGGTTTCATTTCTACTGTGACTGATGTTACATCACAGTGTTTGCAATGGTG
TTGCCCTGAGTGGATCTCCAAGGACCAGGTTATTTTAAAAAGATTTGTTTT
GTCAAGTGTCATATGTAGGTGTCTGCACCCAGGGGTGGGGAATGTTTGGGC
AGAAGGGAGAAGGATCTAGAATGTGTTTTCTGAATAACATTTGTGTGGTGG
GTTCTTTGGAAGGAGTGAGATCATTTTCTTATCTTCTGCAATTGCTTAGGAT
GTTTTTCATGAAAATAGCTCTTTCAGGGGGGTTGTGAGGCCTGGCCAGGCA
CCCCCTGGAGAGAAGTTTCTGGCCCTGGCTGACCCCAAAGAGCCTGGAGA
AGCTGATGCTTTGCTTCAAATCCATCCAGAATAAAACGCAAAGGGCTGAA
AGCCATTTGTTGGGGCAGTGGTAAGCTCTGGCTTTCTCCGACTGCTAGGGA
GTGGTCTTTCCTATCATGGAGTGACGGTCCCACACTGGTGACTGCGATCTT
CAGAGCAGGGGTCCTTGGTGTGACCCTCTGAATGGTCCAGGGTTGATCAC
ACTCTGGGTTTATTACATGGCAGTGTTCCATTTGGGGCTTGCATGCCAAAT
TGTAGTTCTTGTCTGATTGGCTCACCCAAGCAAGGCCAAAATTACCAAAAA
TCTTGGGGGGTTTTTACTCCAGTGGTGAAGAAAACCTTTAGCAGGTGGT
CCTGAGACCTGACAAGCACTGCTAGGCGAGTGCCAGGACTCCCCAGGCCA
GGCCACCAGGATGGCCCTTCCCCTGGAGGTCACATTCAGGAAGATGAAA
GAGGAGGTTTGGGGTCTGCCACCATCCTGCTGCTGTGTTTTTTGCTATCACA
CAGTGGGTGGTGGATCTGTCCAAGGAACTTGAATCAAAGCAGTTAACTT
TAAGACTGAGCACCTGCTTCATGCTCAGCCCTGACTGGTGCTATAGGCTGG
AGAAGCTCACCCAATAAACATTAAGATTGAGGCCTGCCCTCAGGGATCTTG
CATTCCCAGTGGTCAAACCGCACTCACCCATGTGCCAAGGTGGGGTATTTA
CCACAGCAGCTGAACAGCCAAATGCATGGTGCAGTTGACAGCAGGTGGG

AAATGGTATGAGCTGAGGGGGGCCGTGCCCAGGGGGCCCACAGGGAACCCT
GCTTGCACTTTGTAACATGTTTACTTTTCAGGGGCATCTTAGCTTCTATTATAG
CCACATCCCTTTGAAACAAGATAACTGAGAATTTAAAAATAAGAAAATACA
TAAGACCATAACAGCCAACAGGTGGCAGGACCAGGACTATAGCCCAGGTC
CTCTGATACCCAGAGCATTACGTGAGCCAGGTAATGAGGGACTGGAACCA
GGGAGACCGAGCGCTTTCTGGAAAAGAGGAGTTTCGAGGTAGAGTTTGA
AGGAGGTGAGGGATGTGAATTGCCTGCAGAGAGAAGCCTGTTTTGTTGGA
AGGTTTGGTGTGTGGAGATGCAGAGGTAAAAGTGTGAGCAGTGAGTTACA
GCGAGAGGCAGAGAAAGAAGAGACAGGAGGGCAAGGGCCATGCTGAAG
GGACCTTGAAGGGTAAAGAAGTTTGATATTAAGGAGTTAAGAGTAGCAA
GTTCTAGAGAAGAGGCTGGTGCTGTGGCCAGGGTGAGAGCTGCTCTGGAA
AATGTGACCCAGATCCTCACAACCACCTAATCAGGCTGAGGTGTCTTAAGC
CTTTTGCTCACAAAACCTGGCACAATGGCTAATCCCAGAGTGTGAAACTT
CCTAAGTATAAATGGTTGTCTGTTTTTGTAACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAG
TTTGGCCGGGTGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGC
CAAGGTGGGGGGATCACAAGGTCAGTAGATGGCGAGCATCCTGGCCAACA
TGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAACACAAAAGTTAGCTGAGCGTGGTG
GCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCCACTCGGGAGGCTGAGACAGGAGAATCG
CTTAAACCTGGGAGGCGGAGAGTACAGTGAGCCAAGATCGCGCCACTGCA
CTCCGGCCTGATGACAGAGCGAGATTCCGTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AGTTTGTTTTTTAAAAAATCTAAATAAAATAACTTTGCCCCCTGCAAAAAA
AAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 5 (編碼IL-2的核酸序列)(ENA第E00257.1號)

AATTCTATGGCTCCGACTTCAAGTTCTACCAAGAAGACCCAGCTTCAA
TTAGAACATTTACTTCTAGATTTACAAATGATTCTGAATGGTATCAACAATTA
TAAGAATCCAAAGCTTACTCGTATGTTGACCTTTAAATTCTATATGCCTAAG
AAGGCTACTGAATTA AACACCTGCAGTGTTTAGAAGAAGAGCTCAAACC
GTTAGAAGAAGTTCTGAATCTGGCTCAATCTAAAACTTCCATTTACGTCC
ACGAGATCTTATCTCTAATATTAACGTAATCGTTTTGGA ACTTAAAGGATCC
GAAACTACCTTCATGTGTGAATATGCTGACGAAACCGCTACGATCGTAGAA
TTTCTTAATCGATGGATTACTTTCTGTCAATCTATTATCTCTACCTTAACTTG
AGTCGACG

【序列表】

<110> 美商凱立凡爾免疫治療股份有限公司(KALIVIR IMMUNOTHERAPEUTICS, Inc.)

<120> 重塑腫瘤微環境的溶瘤免疫療法

<130> 199249-703851

<140> TW 110143069

<141> 2022-11-18

<150> US 63/116,004

<151> 2020-11-19

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 969

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成聚核苷酸

<400> 1

atgcattggg gaacctgtg cggattcttg tggctttggc cctatctttt ctatgtccaa	60
gctgtgcccc tccaaaaagt ccaagatgac accaaaaccc tcatcaagac aattgtcacc	120
aggatcaatg acatttcaca cacgcagtea gtctcctcca aacagaaagt caccggtttg	180
gacttcattc ctgggtccca ccccatcctg accttatcca agatggacca gacactggca	240
gtctaccaac agatcctcac cagtatgcct tccagaaacg tgatccaaat atccaacgac	300
ctggagaacc tccgggatct tcttcacgtg ctggccttct ctaagagctg ccacttgccc	360
tgggccagtg gcctggagac cttggacagc ctgggggggtg tcttgggaagc ttcaggctac	420
tccacagagg tgggtggcct gagcaggctg caggggtctc tgcaggacat gctgtggcag	480
ctggacctca gccctgggtg cggagggtggc ggatccggcg gaggtggctc aggtggcggc	540
ggatcaggag gaggtggatc agctagcga cctacttcaa gtcttacaaa gaaaacacag	600
ctacaactgg agcatttact gctggattta cagatgattt tgaatggaat taataattac	660

aagaatccca aactcaccag gatgctcaca ttaagtttt acatgccca gaaggccaca 720
gaactgaaac atcttcagt tctagaagaa gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat 780
ttagctcaaa gcaaaaactt tcaacttaaga cccagggact taatcagcaa tatcaacgta 840
atagttctgg aactaaagg atctgaaaca acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca 900
gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg attacctttt gtcaaagcat catctcaaca 960
ctgacttga 969

<210> 2

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成聚核苷酸

<400> 2

atgctgtcca catctcgttc tcggtttatc agaaatacca acgagagcgg tgaagaagtc 60
accacctttt ttgattatga ttacggtgct cctctcata aatttgacgt gaagcaaatt 120
ggggcccaac tctgcctcc gctctactcg ctggtgttca tctttggttt tgtgggcaac 180
atgctggtcg tctctatctt aataaactgc aaaaagctga agtgcttgac tgacatttac 240
ctgctcaacc tggccatctc tgatctgctt tttcttatta ctctccatt gtgggctcac 300
tctgctgcaa atgagtggggt ctttgggaat gcaatgtgca aattattcac agggctgtat 360
cacatcggtt attttggcgg aatcttcttc atcatctcc tgacaatcga tagatactg 420
gctattgtcc atgctgtgtt tgctttaaaa gccaggacgg tcaccttgg ggtggtgaca 480
agtgatgatca cctggttgggt ggctgtgttt gcttctgtcc caggaatcat ctttactaaa 540
tgccagaaag aagattctgt ttatgtctgt ggcccttatt ttccacgagg atggaataat 600
ttccacacaa taatgaggaa cttttgggg ctggtcctgc cgctgctcat catggtcatc 660
tgctactcgg gaatcctgaa aaccctgctt cgggtgtcga acgagaagaa gaggcatagg 720
gcagtgagag tcatcttcac catcatgatt gtttactttc tcttctggac tcctataat 780
attgtcattc tctgaacac cttccaggaa ttcttcggcc tgagtaactg tgaagcacc 840

agtcaactgg accaagccac gcaggtgaca gagactcttg ggatgactca ctgctgcatc 900
 aatcccatca tctatgcctt cgttggggag aagttcagaa gcctttttca catagctctt 960
 ggctgtagga ttgccccact ccaaaaacca gtgtgtggag gtccaggagt gagaccagga 1020
 aagaatgtga aagtgactac acaaggactc ctcgatggtc gtggaaaagg aaagtcaatt 1080
 ggcaagagccc ctgaagccag tcttcaggac aaagaaggag cctag 1125

<210> 3

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成聚核苷酸

<400> 3

atgctgtcca catctcgttc tcggtttatc agaaatacca acgagagcgg tgaagaagtc 60
 accacctttt ttgattatga ttacgggtct cctgtcata aatttgacgt gaagcaaatt 120
 ggggccccaac tctgcctcc gctctactcg ctggtgttca tctttggtt tgtgggcaac 180
 atgctggtcg tctcatctt aataaactgc aaaaagctga agtgcttgac tgacatttac 240
 ctgctcaacc tggccatctc tgatctgctg ttcttatta ctctccatt gtgggctcac 300
 tctctgcaa atgagtggtt ctttgggaat gcaatgtgca aattattcac agggctgtat 360
 cacatcggtt attttggcgg aatcttcttc atcatctcc tgacaatcga tagatactg 420
 gctattgtcc atgctgtgtt tgctttaaaa gccaggacgg tcacctttgg ggtggtgaca 480
 agtgtgatca cctggttggt ggctgtgttt gcttctgtcc caggaaatcat ctttactaaa 540
 tgccagaaag aagattctgt ttatgtctgt ggccttatt ttccacgagg atggaataat 600
 ttccacacaa taatgaggaa cttttgggg ctggtcctgc cgctgctcat catggctcatc 660
 tgctactcgg gaatcctgaa aaccctgctt cgtgtctgaa acgagaagaa gaggcatagg 720
 gcagtgagag tcatcttcac catcatgatt gttactttc tcttctggac tcctataat 780
 attgtcattc tctgaacac cttccaggaa ttcttcggcc tgagtaactg tgaaagcacc 840
 agtcaactgg accaagccac gcaggtgaca gagactcttg ggatgactca ctgctgcatc 900

aatcccatca tctatgcctt cgttggggag aagttcagaa gcctttttca catagctctt 960
 ggctgttagga ttgccccact ccaaaaacca gtgtgtggag gtccaggagt gagaccagga 1020
 aagaatgtga aagtgactac acaaggactc ctcgatggtc gtggaaaagg aaagtcaatt 1080
 ggcaagagccc ctgaagccag tcttcaggac aaagaaggag cctag 1125

<210> 4

<211> 3444

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成聚核苷酸

<400> 4

gtaggaatcg cagcgcaccg ggttgcaagg cccaagaagc ccatcctggg aaggaaaatg 60
 cattggggaa ccctgtgctg attcttgtgg ctttggccct atcttttcta tgtccaagct 120
 gtgcccatcc aaaaagtcca agatgacacc aaaacctca tcaagacaat tgtcaccagg 180
 atcaatgaca ttccacacac gcagtcagtc tcttccaaac agaaagtcac cggtttggac 240
 ttcatctctg ggctccacc cactctgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 300
 taccaacaga tctcaccag tatgccttcc agaaacgtga tccaaatata caacgacctg 360
 gagaacctcc gggatcttct tcacgtgctg gccttcteta agagctgcca cttgccctgg 420
 gccagtggcc tggagacctt ggacagcctg ggggggtgtcc tggaaagcttc aggctactcc 480
 acagaggtgg tggccctgag caggctgcag gggctctctgc aggacatgct gtggcagctg 540
 gacctcagcc ctgggtgctg aggccttgaa ggtcactctt cctgcaagga ctacgttaag 600
 ggaaggaact ctggcttcca ggtatctcca ggattgaaga gcattgcatg gacaccctt 660
 atccaggact ctgtcaatth ccctgactcc tctaagccac tcttccaaag gcataagacc 720
 ctaagcctcc ttttcttga aaccaaagat atatacacag gatcctattc tcaccaggaa 780
 ggggggtccac ccagcaaaga gtgggctgca tctgggatcc ccaccaaggt cttcagccat 840
 caacaagagt tgtcttctcc cctcttgacc catctcccc tcaactgaatg cctcaatgtg 900
 accaggggtg atttcagaga gggcagaggg gtaggcagag ctttggatg accagaacaa 960

ggttccctct gagaattcca aggagtcca tgaagaccac atccacacac gcaggaactc 1020
ccagcaacac aagctggaag cacatgttta tttattctgc atttattctt ggatggattt 1080
gaagcaaagc accagcttct ccaggctctt tggggtcagc cagggccagg ggtctccctg 1140
gagtgcaatt tccaatccca tagatgggtc tggctgagct gaaccattt tgagtgactc 1200
gagggttggg ttcactgag caagagctgg caaaggtggc tctccagtta gttctctcgt 1260
aactggtttc atttctactg tgaactgatgt tacatcacag tgtttgcaat ggtgttgccc 1320
tgagtggatc tccaaggacc aggttatattt aaaaagattt gttttgtcaa gtgtcatatg 1380
taggtgtctg caccagggg tggggaatgt tgggcagaa gggagaagga tctagaatgt 1440
gttttctgaa taacatttgt gtgggtgggt ctttggagg agtgagatca ttttcttacc 1500
ttctgcaatt gcttaggatg ttttcatga aatagctct ttcagggggg ttgtgaggcc 1560
tggccaggca cccctggag agaagttct ggccctggct gaccccaaag agcctggaga 1620
agctgatgct ttgcttcaaa tccatccaga ataaaacgca aagggtgaa agccatttgt 1680
tggggcagtg gtaagctctg gctttctccg actgctaggg agtggctttt cctatcatgg 1740
agtacggtc ccacactggt gactgcgac ttcagagcag gggtccttgg tgtgaccctc 1800
tgaatggtcc aggggtgac acactctggg tttattacat ggcagtgttc ctatttgggg 1860
cttgcagcc aaattgtagt tcttctgta ttggctcacc caagcaaggc caaaattacc 1920
aaaaatcttg gggggttttt actccagtgg tgaagaaaac tcctttagca ggtggtcctg 1980
agacctgaca agcactgcta ggcgagtgcc aggactcccc aggccaggcc accaggatgg 2040
cccttccac tggaggtcac attcaggaag atgaaagagg aggtttgggg tctgccacca 2100
tctgctgct gtgtttttgc taccacacag tgggtggtgg atctgtcca ggaaacttga 2160
atcaaagcag ttaactttaa gactgagcac ctgcttcag ctcagccctg actggtgcta 2220
taggctggag aagctcacc aataaacatt aagattgagg cctgccctca gggatcttgc 2280
attcccagtg gtcaaaccgc actcaccat gtgccaagg ggggtattta ccacagcagc 2340
tgaacagcca aatgcatggt gcagttgaca gcaggtggga aatggtatga gctgaggggg 2400
gccgtgcca ggggccca ggggaaccctg ctgcacttt gtaacatgtt tacttttcag 2460

ggcatcttag cttctattat agccacatcc ctttgaaca agataactga gaatttaaaa 2520
 ataagaaaat acataagacc ataacagcca acaggtggca ggaccaggac tatagcccag 2580
 gtcctctgat acccagagca ttacgtgagc caggtaatga gggactggaa ccaggagagac 2640
 cgagcgcttt ctggaaaaga ggagtttcga ggtagagttt gaaggagggtg agggatgtga 2700
 attgcctgca gagagaagcc tgttttgttg gaaggtttgg tgtgtggaga tgcagaggta 2760
 aaagtgtgag cagtgagtta cagcgagagg cagagaaaaga agagacagga gggcaagggc 2820
 catgctgaag ggaccctgaa gggtaaagaa gtttgatatt aaaggagtta agagtagcaa 2880
 gttctagaga agaggctggt gctgtggcca gggtgagagc tgctctggaa aatgtgacct 2940
 agatcctcac aaccacctaa tcaggctgag gtgtcttaag ccttttgctc acaaaacctg 3000
 gcacaatggc taattcccag agtgtgaaac ttctaagta taaatggttg tctgtttttg 3060
 taacttaaaa aaaaaaaaaa aagtttggcc ggggtcgggtg gctcacgcct gtaatcccag 3120
 cactttggga ggccaagggtg gggggatcac aaggtcacta gatggcgagc atcctggcca 3180
 acatggtgaa acccctctc tactaaaaac acaaaagtta gctgagcgtg gtggcgggcg 3240
 cctgtagtcc cagccactcg ggaggctgag acaggagaat cgcttaaacc tgggaggcgg 3300
 agagtacagt gagccaagat cgcgccactg cactccggcc tgatgacaga gcgagattcc 3360
 gtcttaaaaa aaaaaaaaaa aaagtttgtt tttaaaaaa tctaaataaa ataactttgc 3420
 ccctgcaaa aaaaaaaaaa aaaa 3444

<210> 5

<211> 418

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成聚核苷酸

<400> 5

aattctatgg ctccgacttc aagttctacc aagaagacc agcttcaatt agaacattta 60
 cttctagatt tacaatgat tctgaatggt atcaacaatt ataagaatcc aaagcttact 120
 cgtatgttga cctttaaatt ctatatgcct aagaaggcta ctgaattaaa acacctgcag 180

tgtttagaag aagagctcaa accgtagaa gaagttctga atctggctca atctaaaaac	240
ttccatttac gtccacgaga tcttatctct aatattaacg taatcgtttt ggaacttaaa	300
ggatccgaaa ctacctcat gtgtgaatat gctgacgaaa ccgctacgat cgtagaattt	360
cttaatcgat ggattacttt ctgtcaatct attatctcta ccttaacttg agtcgacg	418

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種經修飾之溶瘤病毒，其包含：

編碼包含代謝調節蛋白或其功能片段或變異體的融合蛋白的外源核酸，其中編碼該融合蛋白的該外源核酸包含：

包含IL-2或其功能片段的多肽，及

包含瘦素或其功能片段的多肽；

編碼趨化因子受體或其功能片段或變異體的外源核酸，其中該趨化因子受體為CCR2；以及

該經修飾之溶瘤病毒之病毒基因體中的基因修飾。

【請求項2】

如請求項1之經修飾之溶瘤病毒，其中編碼該趨化因子受體的該外源核酸包含該趨化因子受體之人類編碼序列的密碼子優化變異體。

【請求項3】

如請求項1之經修飾之溶瘤病毒，其中該融合蛋白進一步包含細胞介素或其功能片段或變異體。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中該基因修飾為A52R基因之突變或缺失。

【請求項5】

如請求項4之經修飾之溶瘤病毒，其中該缺失為完全或部分缺失。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒進一步包含胸苷激酶基因缺失。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒包含麻疹病毒、脊髓灰白質炎病毒、痘病毒、牛痘病毒、腺病毒、腺相關病毒、單純疱疹病毒、水泡性口炎病毒、里奧病毒(reovirus)、新城雞瘟病毒、塞內卡病毒(Seneca virus)、慢病毒、門戈病毒(mengovirus)或黏液瘤病毒。

【請求項8】

如請求項7之經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒為痘病毒。

【請求項9】

如請求項8之經修飾之溶瘤病毒，其中該痘病毒為牛痘病毒。

【請求項10】

如請求項9之經修飾之溶瘤病毒，其中該牛痘病毒為西方儲備株(Western Reserve strain)牛痘病毒、哥本哈根株(Copenhagen strain)、IHD株、惠氏株(Wyeth strain)、NYCBOH株、天壇株(Tian Tan strain)、李斯特株(Lister strain)、安卡拉株(Ankara strain)、USSR株、ACAM2000株、巴黎株(Paris strain)、伯恩株(Bern strain)、天壇株(Temple of Heaven strain)、戴爾倫株(Dairen strain)、EM-63株、伊凡氏株(Evans strain)、肯恩株(King strain)、帕瓦丹加株(Patwadangar strain)或撻什肯株(Tash Kent strain)。

【請求項11】

如請求項10之經修飾之溶瘤病毒，其中編碼該融合蛋白的該外

源核酸被選殖入胸苷激酶基因的基因座中。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中編碼該趨化因子受體的該外源核酸被選殖入A52R基因的基因座中。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中編碼IL-2或其功能片段的多肽包含與序列SEQ ID NO: 4至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。

【請求項14】

如請求項1至12中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中編碼瘦素或其功能片段的多肽包含與序列SEQ ID NO: 5至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中編碼包含代謝調節蛋白或其功能片段或變異體的該融合蛋白的該外源核酸包含與序列SEQ ID NO: 1至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中編碼該趨化因子受體或其功能片段或變異體的該外源核酸包含與序列SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約

96%、約97%、約98%、約99%或約100%同源的序列。

【請求項17】

如請求項1至16中任一項之經修飾之溶瘤病毒，進一步包含編碼
玻糖醛酸酶的外源核酸。

【請求項18】

如請求項17之經修飾之溶瘤病毒，其中該玻糖醛酸酶為PH-20或
HysA。

【請求項19】

一種經修飾之溶瘤病毒，其包含：

編碼瘦素-介白素(IL)-2融合蛋白的外源核酸；

編碼CCR2的外源核酸，及

A52R基因缺失。

【請求項20】

如請求項19之經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒包含麻疹病
毒、脊髓灰白質炎病毒、痘病毒、牛痘病毒、腺病毒、腺相關病毒、
單純疱疹病毒、水泡性口炎病毒、里奧病毒、新城雞瘟病毒、塞內卡
病毒、慢病毒、門戈病毒或黏液瘤病毒。

【請求項21】

如請求項20之經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒為痘病毒。

【請求項22】

如請求項21之經修飾之溶瘤病毒，其中該痘病毒為牛痘病毒。

【請求項23】

如請求項22之經修飾之溶瘤病毒，其中該牛痘病毒為西方儲備

株牛痘病毒、哥本哈根株、IHD株、惠氏株、NYCBOH株、天壇株 (Tian Tan strain)、李斯特株、安卡拉株、USSR株、ACAM2000株、巴黎株、伯恩株、天壇株(Temple of Heaven strain)、戴爾倫株、EM-63株、伊凡氏株、肯恩株、帕瓦丹加株或撻什肯株。

【請求項24】

如請求項19至23中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中該溶瘤病毒進一步包含胸苷激酶基因缺失。

【請求項25】

如請求項24之經修飾之溶瘤病毒，其中編碼該瘦素-介白素(IL)-2融合蛋白的該外源核酸被選殖入該胸苷激酶基因的該基因座中。

【請求項26】

如請求項19至25中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其中編碼CCR2的該核酸被選殖入A52R基因的基因座中。

【請求項27】

如請求項1至26中任一項之經修飾之溶瘤病毒，其進一步包含選自由以下組成之群之病毒基因的突變或缺失：A1、A2、VH1、A33、I7、K7R、B8R、C12L、B15R、B14R、K1L、N1L、M2L、A49R、A46R、E3L、C4、C16，及其功能域或片段或變異體，或其任何組合。

【請求項28】

如請求項27之經修飾之溶瘤病毒，其進一步包含編碼以下至少一者的外源核酸：HMGB1、PIAS3、LIGHT、神經趨化蛋白(fractalkine)、ITAC、IL15、IL15R α 、CCL5、其功能域或片段或變異

體，或其任何組合。

【請求項29】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至28中任一項之經修飾之溶瘤病毒。

【請求項30】

如請求項29之醫藥組合物，其進一步包含以下至少一者：增溶劑、賦形劑或醫藥學上可接受之載劑。

【請求項31】

如請求項30之醫藥組合物，其中該賦形劑包含以下一者或多者：緩衝劑、穩定劑、抗氧化劑、黏合劑、稀釋劑、分散劑、速率控制劑、潤滑劑、助滑劑、崩解劑、塑化劑、防腐劑或其任何組合。

【請求項32】

如請求項30之醫藥組合物，其中該賦形劑包含二水合磷酸氫二鈉、二水合磷酸二氫鈉、氯化鈉、肌醇、山梨糖醇或其任何組合。

【請求項33】

如請求項29至32中任一項之醫藥組合物，其不包含防腐劑。

【請求項34】

如請求項29至32中任一項之醫藥組合物，其進一步包含防腐劑、稀釋劑及載劑中的一者或多者。

【請求項35】

如請求項29至34中任一項之醫藥組合物，其進一步包含另一種活性成分或其鹽。

【請求項36】

如請求項30至35中任一項之醫藥組合物，其中該增溶劑為無菌水。

【請求項37】

如請求項29至36中任一項之醫藥組合物，其進一步包含另一種活性成分，其中該另一種活性成分為抗癌劑或另一種溶瘤病毒。

【請求項38】

一種套組，其包含如請求項1至28中任一項之經修飾之溶瘤病毒。

【請求項39】

一種套組，其包含如請求項29至37之醫藥組合物。

【請求項40】

如請求項38或39之套組，其進一步包含抗癌劑或另一種溶瘤病毒中的至少一者。

【請求項41】

一種在向個體全身遞送經修飾之溶瘤病毒後，相對於包含TK突變但不包含編碼融合蛋白之外源核酸或編碼趨化因子受體之外源核酸之參考病毒的全身投與，增強該經修飾之溶瘤病毒之治療作用的方法，其包含全身投與如請求項1至28中任一項之經修飾之溶瘤病毒或如請求項29至37中任一項之醫藥組合物。

【請求項42】

一種治療方法，其包含向個體投與如請求項1至28中任一項之溶瘤病毒或如請求項29至37中任一項之醫藥組合物，其中該投與相對於向該個體投與參考溶瘤病毒，使得該個體的全身免疫反應增強，所述

參考溶瘤病毒包含胸腺嘧啶核苷激酶基因缺失(TK-)且不包含編碼含有代謝調節蛋白或其功能片段或變異體之融合蛋白之外源核酸或編碼趨化因子受體或其功能片段或變異體之外源核酸。

【請求項43】

如請求項42之方法，其中該投與為全身投與。

【請求項44】

如請求項41至43中任一項之方法，其中該全身投與包含以下至少一者：瘤內、靜脈內、非經腸、皮內、肌肉內、經皮、直腸、尿道內、陰道內、鼻內、鞘內、腹膜內、牙內、皮下、經皮、氣管內、動脈內、膀胱內、吸入、經口或其任何組合。

【請求項45】

如請求項44之方法，其中該投與為瘤內投與。

【請求項46】

如請求項44之方法，其中該投與為靜脈內投與。

【請求項47】

如請求項41至46中任一項之方法，其中該個體患有癌症。

【請求項48】

一種治療個體之癌症的方法，該方法包含向該個體投與治療有效量之如請求項1至28中任一項之經修飾之溶瘤病毒。

【請求項49】

如請求項47或48之方法，其中該癌症為以下至少一者：黑色素瘤、肝細胞癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、腹膜癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、白血病、淋巴瘤、腎細胞癌、胰臟癌、上皮癌、胃/

胃食管結合部腺癌、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、十二指腸癌、胰臟腺癌、腺樣囊性癌、肉瘤、間皮瘤、多形性神經膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、多發性骨髓瘤、前列腺癌、肝細胞癌、膽管癌、胰臟腺癌、頭頸部鱗狀細胞癌、子宮頸鱗狀細胞癌、骨肉瘤、上皮性卵巢癌、急性淋巴母細胞性淋巴瘤、骨髓增生性腫瘤或其任何組合。

【請求項50】

如請求項41至49中任一項之方法，其中該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物係以包含約 10^6 PFU/mL至約 10^{10} PFU/mL之該溶瘤病毒的劑量投與。

【請求項51】

如請求項41至49中任一項之方法，其中該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物係以包含約 5×10^9 PFU/mL之該溶瘤病毒的劑量投與。

【請求項52】

如請求項41至51中任一項之方法，其中第一時段以初始劑量、第二時段以中等劑量且第三時段以高劑量獨立地投與該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物。

【請求項53】

如請求項52之方法，其包含獨立地投與該初始劑量、該中等劑量及該高劑量，其中該初始劑量低於該中等劑量且該中等劑量低於該高劑量。

【請求項54】

如請求項52或53之方法，其中該第一、第二及第三時段各自為約1週至約3週。

【請求項55】

如請求項41至54中任一項之方法，其中該經修飾之溶瘤病毒及該醫藥組合物獨立地包含液體劑型，該液體劑型投與的體積為約1 mL至約5 mL、約5 mL至10 mL、約15 mL至約20 mL、約25 mL至約30 mL、約30 mL至約50 mL、約50 mL至約100 mL、約100 mL至150 mL、約150 mL至約200 mL、約200 mL至約250 mL、約250 mL至約300 mL、約300 mL至約350 mL、約350 mL至約400 mL、約400 mL至約450 mL、約450 mL至500 mL、約500 mL至750 mL，或約750 mL至1000 mL。

【請求項56】

如請求項41至55中任一項之方法，其中該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物係以液體劑型、固體劑型、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。

【請求項57】

如請求項41至56中任一項之方法，其中該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物投與的持續時間為約1週、約2週、約3週、約4週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週或約12週。

【請求項58】

如請求項41至57中任一項之方法，其中該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物每天一次、每天兩次、每週一次、每兩週一次或每三週一次投與。

【請求項59】

如請求項41至58中任一項之方法，其中該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物係靜脈內、腹膜內或藉由瘤內注射投與。

【請求項60】

如請求項41至59中任一項之方法，其中該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物係以彈丸注射或緩慢輸注形式投與。

【請求項61】

如請求項41至60中任一項之方法，其中該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物的投與在第一次劑量投與的約1小時至約3天之後引起第一峰值病毒負荷且在約3天至約10天之後引起第二峰值病毒負荷。

【請求項62】

如請求項41至61中任一項之方法，其包含投與另一種療法，其中該另一種療法投與的持續時間為約1週、約2週、約3週、約4週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週或約12週。

【請求項63】

如請求項62之方法，其中該另一種療法每天一次、每週一次、每兩週一次或每三週一次投與。

【請求項64】

如請求項62或63之方法，其中該另一種療法係以液體劑型、固體劑型、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。

【請求項65】

如請求項62至64中任一項之方法，其中該另一種療法投與的持續時間為約1週、約2週、約3週、約4週、約6週、約7週、約8週、約9

週、約10週或約12週。

【請求項66】

如請求項62至65中任一項之方法，其中該另一種療法每天一次、每週一次、每兩週一次或每三週一次投與。

【請求項67】

如請求項62至66中任一項之方法，其中該另一種療法係以液體劑型、固體劑型、可吸入劑型、鼻內劑型、脂質體調配物、包含奈米粒子之劑型、包含微米粒子之劑型、聚合物劑型或其任何組合投與。

【請求項68】

如請求項62至67中任一項之方法，其中該另一種療法係經口、靜脈內、藉由瘤內注射或藉由放射投與。

【請求項69】

如請求項41至68中任一項之方法，其中該個體為人類。

【請求項70】

如請求項41至69中任一項之方法，其中在該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物投與之前，該個體已診斷患有癌症。

【請求項71】

如請求項41至70中任一項之方法，其中在該經修飾之溶瘤病毒或該醫藥組合物或該另一種療法投與之前，該個體已診斷患有癌症。

【請求項72】

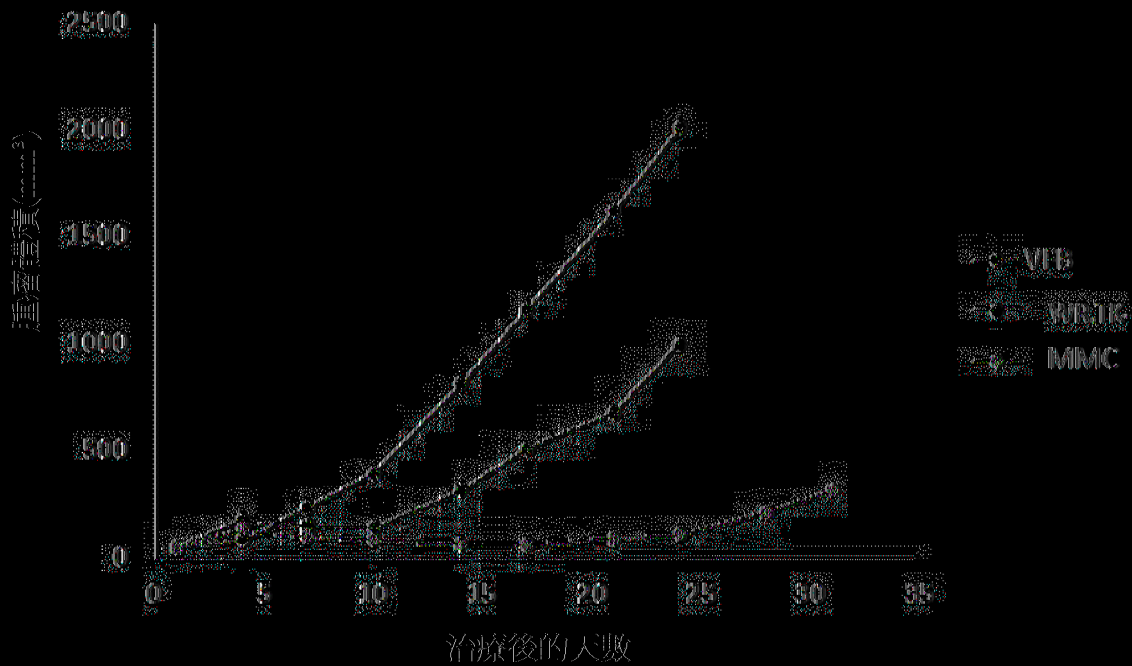
如請求項62至71中任一項之方法，其中該另一種療法包含化學療法、放射、使用另一種病毒的溶瘤病毒療法、免疫調節蛋白治療、CAR T細胞療法、抗癌劑或其任何組合。

【請求項73】

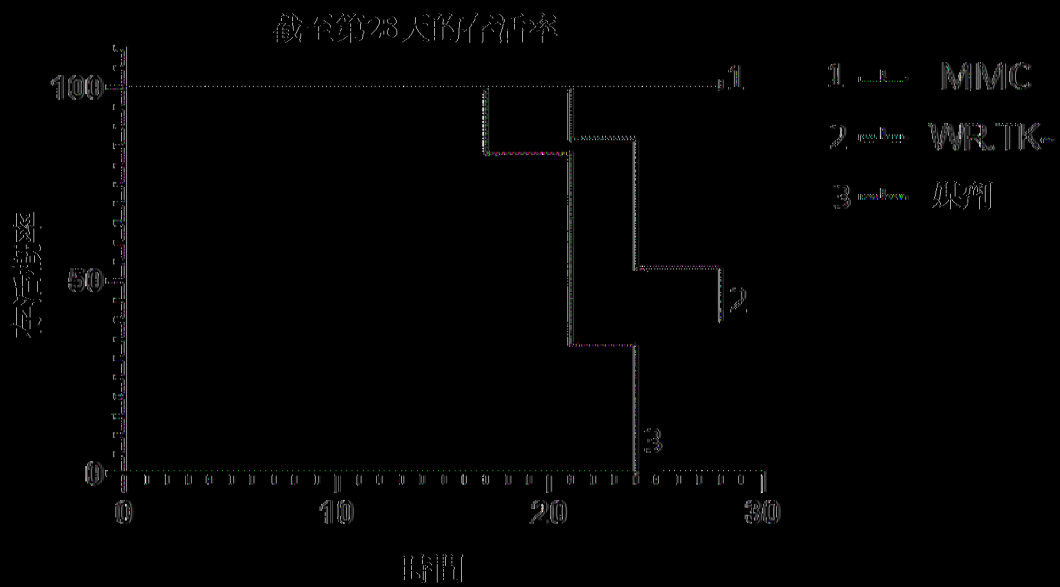
如請求項72之方法，其中該另一種療法包含投與免疫調節劑，其包含抗CD33抗體及其可變區、抗CD11b抗體及其可變區、COX2抑制劑、細胞介素、趨化因子、抗CTLA4抗體或其抗原結合片段、抗PD-1抗體或其抗原結合片段、抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，或TLR促效劑。

【請求項74】

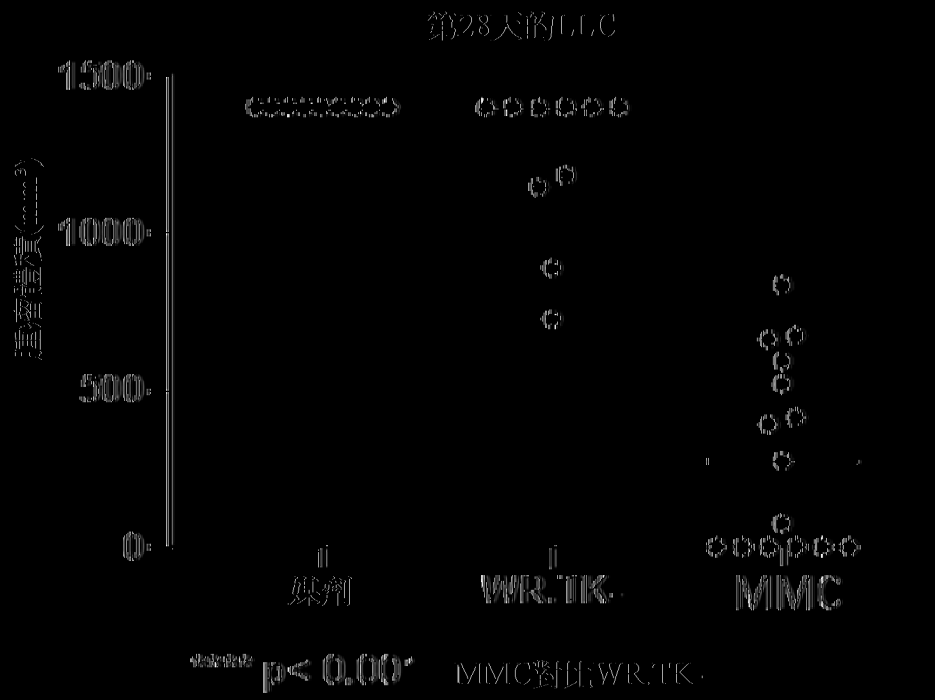
如請求項73之方法，其包含投與該另一種療法，其中該另一種療法包含投與該抗癌劑，其中該抗癌劑為化學治療劑。



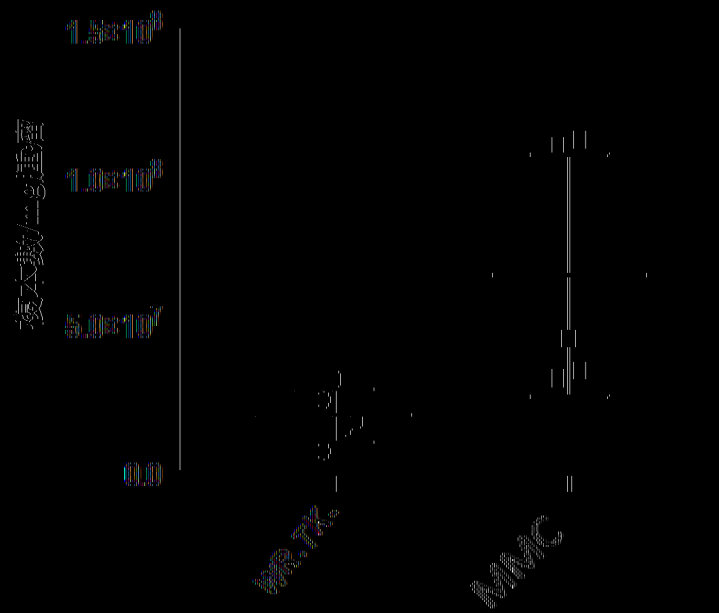
【圖2A】



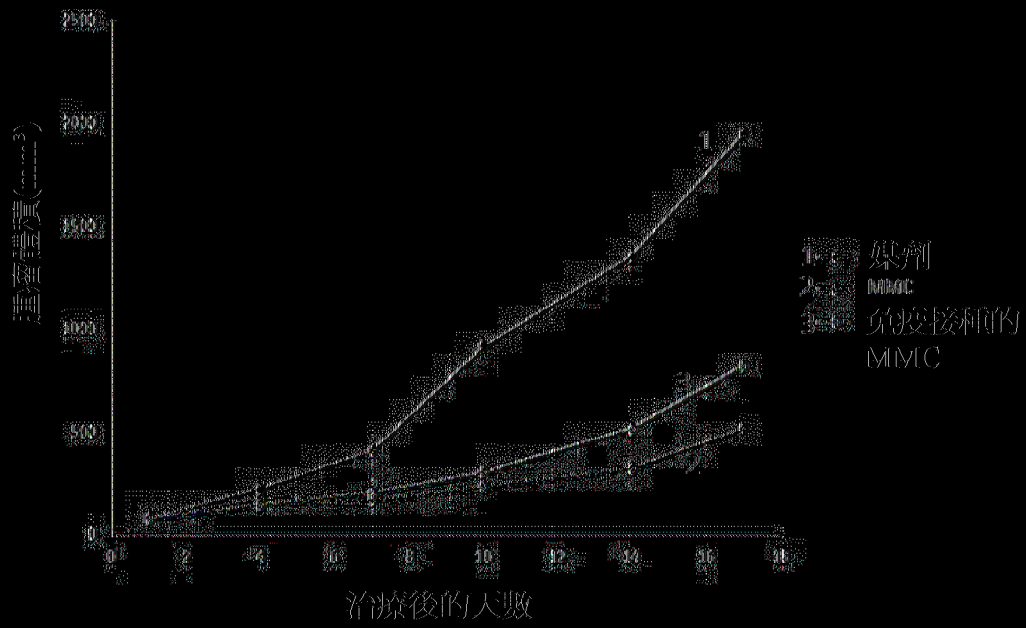
【圖2B】



|(圖2C)|



|(圖2D)|



(圖3A)



(圖3B)

