

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

美國 國(地區) 申請專利，申請日期： 1999 年 2 月 24 日 案號： 09/256,824

，☐有 ☐無主張優先權
☐有 ☒無主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明（1）

本申請案為 1997 年 8 月 13 日申請之美國專利案系列 No. 08/911,383 之部份連續申請案，該案已以提及之方式完全併入本文中。

發明背景

發明範圍

本發明係有關使用呼腸病毒治療哺乳動物受 ras 調節之增生疾病。

參考文獻

本申請案中摘錄下列報告、專利申請案及專利案：

U.S. Patent No. 5,023, 252

Armstrong, G.D. et al. (1984), Virology 138:37;

Aronheim, A., et al., (1994) Cell, 78:949-961

Barbacid, M., Annu. Rev. Biochem., 56:779-827 (1987)

Berrozpe, G., et al. (1994), Int. J. Cancer, 58:185-191

Bischoff, J.R. and Samuel, C.E., (1989) Virology, 172:106-115

Cahill, M.A., et al., Curr. Biol., 6:16-19 (1996);

Chandron and Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mul and mulC is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle", J. of Virology 72(1):467-75 (1998)

Chaubert, P. et al. (1994), Am. J. Path. 144:767; Bos, J. (1989) Cancer Res. 49:4682

Cuff et al., "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract" Toxicological

五、發明說明(2)

Sciences 42(2):99-108 (1998)

Der, S.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3279-3283 (1997)

Dudley, D.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7686-7689 (1995)

Duncan et al., "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein" Virology 182(2):810-9 (1991)

Fields, B.N. et al. (1996), Fundamental Virology, 3rd Edition, Lippincott-Raven;

Gentsch, J.R.K. and Pacitti, A.F. (1985), J. Virol. 56:356;

E. Harlow and D. Lane, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)

Helbing, C.C. et al., Cancer Res. 57:1255-1258 (1997)

Hu, Y. and Conway, T.W. (1993), J. Interferon Res., 13:323-328

Laemmli, U.K., (1970) Nature, 227:680-685

Lee, J.M. et al. (1993) PNAS 90:5742-5746;

Lee, P.W.K. et al (1981) Virology, 108:134-146

Levitzki, A. (1994) Eur. J. Biochem. 226:1; James, P.W., et al. (1994) Oncogene 9:3601; Bos, J. (1989) Cancer Res. 49:4682

Lowe, S.W. et al. (1994) Science, 266:807-810;

Lyon, H., Cell Biology, A Laboratory Handbook, J.E. Celis, ed., Academic Press, 1994, p. 232

Mah et al., "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function"

五、發明說明 (3)

Virology 179(1):95-103 (1990)

McRae, M.A. and Joklik, W.K., (1978) Virology, 89:578-593

Millis, NE et al. (1995) Cancer Res. 55:1444;

Mundschau, L.J. and Faller, D.V., (1992) J. Biol. Chem.,
267:23092-23098

Nagata, L., et al., (1984) Nucleic Acids Res., 12:8699-8710

Paul R.W. et al. (1989) Virology 172:382-385

Raybaud-Diogene. H. et al. (1997) J. Clin. Oncology, 15(3):1030-
1038;

Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company,
Philadelphia PA 17th ed. (1985)

Robinson, M.J. and Cobb, M.H., Curr. Opin. Cell. Biol. 9:180-186
(1997);

Rosen, L. (1960) Am. J. Hyg. 71:242;

Sabin, A.B. (1959), Science 130:966

Samuel, C.E. and Brody, M., (1990) Virology, 176:106-113;

Smith, R.E. et al., (1969) Virology, 39:791-800

Stanley, N.F. (1967) Br. Med. Bull. 23:150

Strong, J.E. et al., (1993) Virology, 197:405-411;

Strong, J.E. and Lee, P.W.K., (1996) J. Virol., 70:612-616

Trimble, W.S. et al. (1986) Nature, 321:782-784

Turner and Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal
portion of reovirus protein sigma: evidence for a conformation-
dependent receptor binding domain" Virology 186(1):219-27 (1992);

五、發明說明(4)

Waters, S.D. et al., J. Biol. Chem. 270:20883-20886 (1995)

Wiessmuller, L. and Wittinghofer, F. (1994), Cellular Signaling 6(3):247-267;

Wong, H., et al., (1994) Anal. Biochem., 223:251-258

Yang, Y.L. et al. EMBO J. 14:6095-6106 (1995)

Yu, D. et al. (1996) Oncogene 13:1359

所有上述報告、專利申請案及專利案在本文中均以相同之程度，以提及之方式併入本文中，如同各報告、專利申請案或專利案明確且分別指示已以提及之方式完全併入本文中。

相關技藝

正常細胞之增殖作用係由促進生長之原生致癌基因及限制生長之腫瘤抑制基因之間之平衡來調節。腫瘤之形成可能由基因組之遺傳變化所致，造成主宰細胞訊號解譯之細胞元素發生突變，如：原生致癌基因活性加強或腫瘤抑制作用不活化。咸信，此等訊號之解譯最終會影響細胞之生長與分化，而錯譯了此等訊號，以致造成贅瘤生長(贅瘤形成)。

咸信原生致癌基因 Ras 之遺傳變化佔所有人類腫瘤約 30% (L. 威 斯 慕 勒 (Wiessmuller) 與 F. 威 丁 赫 夫 (Wittinghofer)(1994), Cellular Signaling 6(3):247-267 ; M. 巴 帕 希 (Barbacid)(1987), A Rev. Biochem. 56, 779-827)。Ras 在人類腫瘤之病原學上扮演之角色對腫瘤型態有專一性。大多數人類惡性病型態中發現 Ras 本身有活化突變作用，

五、發明說明(5)

最具代表性者為胰癌(80%)、散發性結腸直腸癌(40-50%)、人類肺部腺癌(15-24%)、甲狀腺腫瘤(50%)及脊髓性白血病(30%)(NE 米利斯(Millis)等人(1995) Cancer Res. 55:1444 ; P. 蕭伯特(Chaubert)等人(1994), Am. J. Path. 144:767 ; J. 伯斯(Bos)(1989) Cancer Res. 49:4682)。由上游有絲分裂訊號元素(尤指酪胺酸受體激酶(RTKs))亦可證實 Ras 活化作用。此等上游元素若經過擴增或過度表現時,最後會由 Ras 之訊號轉導活性提高 Ras 活性。其實例包括以某些神經膠質母細胞瘤形式,及在乳癌之 c-erbB-2/neu 中過度表現 PDGFR (A. 李維茲基(Levitzki)(1994), Eur. J. Biochem. 226:1 ; P.W. 等人詹姆斯(James)等人(1994) Oncogene 9:3601 ; J. 伯斯(Bos)(1989) Cancer Res. 49:4682)。

目前治療贅瘤之方法包括手術、化療及照射。手術主要用於早期癌症之初次治療;然而,許多腫瘤並無法由手術方法完全排除,此外,贅瘤之轉移生長可能無法利用手術完全治療癌症。化療法包括投與具有抗腫瘤活性之化合物,如:烷化劑、抗代謝物、及抗腫瘤抗生素。化療法之效力經常受限於嚴重副作用,包括噁心及嘔吐,抑制骨髓、腎臟受損,及中樞神經系統受抑制。放射療法依賴正常細胞在接受放射線處理後有較大能力修補本身細胞,而贅瘤細胞則相反。然而,由於腫瘤周圍組織很敏感,因此放射療法不能用於治療許多種贅瘤。此外,某些腫瘤已證實對放射療法有抗性,而此點則可能與細胞之致癌基因或抗致癌基因狀態有關(J.M. 李(Lee)等人(1993) PNAS 90:5742-

五、發明說明(6)

7546 ; S.W. 洛威(Lowe)等人(1994), Science 266:807-810 ; H. 雷包德-狄歐金(Raybaud-Diogene)等人(1997) J. Clin. Oncology, 15(3):1030-1038)在目前治療贅瘤生長之方法之相關缺點方面，仍需要改善治療大多數癌症型態之方法。

發明概要

本發明係有關為選自：狗、貓、綿羊、山羊、牛、馬、豬、人類及非人類靈長類之哺乳動物治療受 ras 調節之增生疾病之方法，其包括在不含 BCNU 下，於可使增生細胞實質溶解之條件下，對增生細胞投與有效量之一種或多種呼腸病毒。呼腸病毒可為哺乳動物呼腸病毒或禽類呼腸病毒。呼腸病毒可經過修飾，使之排除衣殼，使病毒粒子包裝在微脂粒或膠束中，或使外衣殼之蛋白質突變。呼腸病毒可投與單劑量或多劑量。增生疾病可為贅瘤。固體贅瘤與造血性贅瘤均可作為其目標。

亦提供一種治療人類受 ras 調節之贅瘤之方法，其包括對贅瘤投與足使贅瘤細胞實質溶解之呼腸病毒量。呼腸病毒可注射至固體贅瘤中或附近。

亦提供一種為哺乳動物抑制贅瘤轉移之方法，其包括對哺乳動物投予足使贅瘤細胞實質溶解之呼腸病毒量。

亦提供一種為哺乳動物治療疑似 ras 調節之贅瘤之方法，其包括手術排除實質上所有贅瘤，並在手術部位或附近投與有效量呼腸病毒，使任何殘留之贅瘤細胞溶解。

亦提供一種醫藥組合物，其包含呼腸病毒，化療劑及醫藥上可接受之賦形劑，但其限制條件為該化療劑不為

五、發明說明(7)

BCNU。

亦提供一種醫藥組合物，其包含經修飾之呼腸病毒及醫藥上可接受之賦形劑。

本發明之方法與醫藥組合物提供一種治療贅瘤形成之有效方法，不會出現與其他癌症療法形式相關之副作用。此外，由於呼腸病毒與疾病之相關性未知，因此任何與審慎投與病毒有關之安全性考量已降至最低。

本發明上述及其他目的、特色與優點將由下列本發明較佳具體實施例之更特別說明中了解，且於附圖中說明。

圖示之簡要說明

圖 1 說明呼腸病毒瘤細胞溶解之分子階段圖解，其中呼腸病毒侵入宿主細胞 Ras 訊號途徑。

圖 2 圖解說明活化(空心圓)或不活化(實心圓)呼腸病毒血清型 3 (狄林(Dearing)菌株)對患有嚴重組合免疫缺乏症(SCID)小白鼠中生長之鼠類 THC-11 腫瘤大小之影響隨時間之變化。各點數值代表測定平均值，亦出示平均值之標準偏差。

圖 3 圖解說明活化(空心圓)或不活化(實心圓)呼腸病毒血清型 3 (狄林菌株)對 SCID 小白鼠中生長之人類神經膠質母細胞瘤 U-87 異種移植物之影響隨時間之變化。各點數值代表測定值之平均值，亦出示平均值之標準偏差。

圖 4 圖解說明活化(空心圓，空心方形)或不活化(實心圓，實心方形)呼腸病毒血清型 3 (狄林菌株)對生長在 SCID 小白鼠中之已注射/已處理(空心圓與實心圓)或未處

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(8)

理(空心方形及實心方形)之兩側人類神經膠質母細胞瘤 U-87 異種移植物大小之影響隨時間之變化。各點數值代表測定值之平均值，亦出示平均值之標準偏差。

圖 5 圖解說明活化(空心圓)或不活化(實心圓)呼腸病毒血清型 3 (狄林菌株)對免疫活性 C3H 小白鼠中 C3H 轉形細胞小白鼠腫瘤大小之影響隨時間之變化。

圖 6 圖解說明活化(空心圓，空心方形)或不活化(實心圓)呼腸病毒血清型 3 (狄林菌株)對已先接觸(空心方形)或未接觸(空心圓)呼腸病毒之免疫活性 C3H 小白鼠中生長之 C3H 轉形細胞小白鼠腫瘤大小之影響隨時間之變化。

本發明之詳細說明

本發明係有關一種為哺乳動物治療 ras 調節之增生疾病之方法，其係對增生細胞投與呼腸病毒。

"呼腸病毒"(呼吸與腸部孤病毒)名詞係以頭字語方式說明此等病毒，但不與人類任何已知疾病相關，其可自呼吸道及腸道單離(A.B. 沙賓(Sabin)(1959), Science 130:966)。“呼腸病毒”一詞指呼腸病毒屬分類中之所有病毒。

呼腸病毒為雙股分段 RNA 基因組之病毒。病毒粒子直徑為 60 至 80 毫微米，且具有二個同心圓衣殼，其分別為二十面體。該基因組包括雙股 RNA，含 10 至 12 個分開節段，基因組大小共 16-27 kbp。個別 RNA 節段大小有變化。現已自許多物種中回收三種不同但相關之呼腸病毒型態。所有這三種型態之共通點為固定補體之抗原。

人類呼腸病毒包括三種血清型：1 型(蘭恩菌株或

五、發明說明（9）

T1L)，2型（強斯型，T2J）及3型（狄林菌株或阿伯尼菌株，T3D）。這三種血清型很容易根據中和法及血球凝集素抑制分析法判別（A.B.沙賓（1959），Science 130:966；B.N.菲德（Fields）等人（1996），基礎病毒學（Fundamental Virology），第3版，李平科特-拉文出版社（Lippincott-Raven）；L.洛森（Rosen）（1960），Am. J. Hyg. 71:242；N.F.史坦利（Stanley）（1967），Br. Med. Bull. 23:150）。

雖然尚未知呼腸病毒與任何特定疾病相關，但許多人在長成大人時即已接觸過呼腸病毒（亦即5歲以下兒童25%以下，而20至30歲成人則超過50%）（G.G.傑克森（Jackson）與R.L.慕頓（Muldoon）（1973）J. Infect. Dis. 128:811；N.F.史坦利（Stanley）（1974）"病毒性疾病之比較診斷學"（Comparative Diagnosis of Viral Diseases），E.庫史塔克（Kurstak）及K.庫史塔克編輯，385-421，紐約學院出版社（Academic Press, New York）。

在哺乳動物之呼腸病毒中，細胞表面辨識訊號為唾液酸（G.D.阿姆斯壯（Armstrong）等人，（1984）Virology 138:37；J.R.K.根奇（Gentsch）及A.F.帕希狄（Pacitti）（1985），J. Virol. 56:356；R.W.保羅（Paul）（1989）Virology 172:382-385）。由於唾液酸普遍存在，呼腸病毒與眾多細胞株有效結合，因此有可能以多種不同組織為目標；然而，細胞株之間對呼腸病毒之敏感性仍有顯著差異。

如本文所述，申請已發現抗拒呼腸病毒感染之細胞當經Ras途徑中之基因轉形時，變得容易受到呼腸病毒感染。

五、發明說明（10）

細胞對呼腸病毒感染之"抗性"係指經病毒感染之細胞不會有顯著病毒產量或收量。"容易感染"之細胞則經證實會誘發細胞病理效果、病毒蛋白質合成、及/或病毒產生。對呼腸病毒感染之抗性出現在基因轉譯階段，而非早期轉錄階段：此時產生病毒轉錄本，但未表現病毒蛋白質。在不受理論限制下，咸認為抗性細胞中病毒基因轉錄作用與約 65 kDa 細胞蛋白質之磷酸化作用相關，其係雙股 RNA-活化蛋白質激酶(PKR)之重要蛋白質，但未出現在轉形細胞中。PKR 之磷酸化作用會抑制轉譯作用。當磷酸化作用受到 2-氨基嘌呤(其係一種 PKR 之已知抑制劑)抑制時，使未轉形細胞中呼腸病毒蛋白質合成作用大幅加強。此外，在嚴重組合免疫缺乏症(SCID)小白鼠模式中，使腫瘤長在右側與左側後腹，當呼腸病毒直接注射至右邊腫瘤時，可顯著縮小腫瘤大小；此外，未直接注射呼腸病毒之左側腫瘤之大小亦顯著縮小，此表示呼腸病毒之溶解腫瘤細胞能力為全身性，也是局部性。

此等結果顯示呼腸病毒利用宿主細胞之 Ras 途徑機轉向下調節 PKR 而再生。圖 1 說明呼腸病毒侵入宿主細胞 Ras 訊號途徑。如圖 1 所示，對未轉形(呼腸病毒抗性)及 EGFR-、Sos- 或 ras-轉形(呼腸病毒敏感性)細胞而言，病毒之結合作用、內化作用、脫除包衣及病毒基因之早期轉錄作用均仍正常進行。若為未轉形細胞時，早期病毒轉錄本之二級結構不可避免地會啟動 PKR 之磷酸化作用，藉以活化，並使轉譯作用起始因子 eIF-2 α 磷酸化，因此抑制

五、發明說明(11)

病毒基因轉譯。若為經 EGFR-、Sos- 或 ras- 轉形之細胞時，PKR 磷酸化步驟即被 Ras 或其一個下游元素防止或逆轉，藉以使病毒基因繼續進行轉譯。可利用 2-氨基嘌呤(2-AP)來模擬 Ras (或下游元素)之作用，其藉由封阻 PKR 磷酸化作用而促進未轉形細胞之病毒基因轉譯作用(及進而促進其呼腸病毒感染)。

在 SCID 小白鼠體內植入人類腫瘤細胞之作用已公認為測試各種不同抗腫瘤劑在人類體內有效性之習知模式系統。過去已知可有效對抗植入 SCID 小白鼠內人類腫瘤之醫藥可用於預測其對人體內相同腫瘤之有效性。

根據此等發現，申請者已發展出治療哺乳動物之 ras 調節之增生疾病之方法。代表性哺乳動物包括狗、貓、綿羊、山羊、牛、馬、豬、非類靈長類及人類。在較佳具體實施例中，該哺乳動物為人類。

在本發明方法中，呼腸病毒係投與各個哺乳動物之受 ras 調節之增生細胞中。可使用之代表型人類呼腸病毒包括 1 型(例如：蘭恩菌株或 T1L)；2 型(例如：強斯菌株或 T2J)；及 3 型(例如：狄林菌株或阿伯尼菌株，T3D 或 T3A)；亦可使用其他呼腸病毒菌株。在較佳具體實施例中，呼腸病毒為人類呼腸病毒血清型 3，更佳者，呼腸病毒為人類呼腸病毒血清型 3，狄林菌株。或者，呼腸病毒可為非人類哺乳動物呼腸病毒(例如：非人類靈長類呼腸病毒，如：狒狒呼腸病毒；馬或犬呼腸病毒)，或非哺乳動物呼腸病毒(例如：禽類呼腸病毒)。可使用不同血清型

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(12)

及/或不同菌株之呼腸病毒組合，如：來自不同動物品種之呼腸病毒。

呼腸病毒可為天然或經修飾。當呼腸病毒自天然來源中單離且未刻意於實驗室經人工修飾時，則為"天然"呼腸病毒。例如：呼腸病毒可來自"現場"(field source)，亦即來自人類患者。

呼腸病毒可經修飾，但仍可溶胞感染具有活性 ras 途徑之哺乳動物細胞。呼腸病毒可經化學或生化前處理(例如：以蛋白酶處理，如：胰凝乳蛋白酶或胰蛋白酶)，然後再投與增生細胞。以蛋白酶前處理排除病毒外套或衣殼，且可提高病毒之感染力。呼腸病毒可包覆在微脂粒或膠束(甘卓(Chandron)與尼柏特(Nibert)，"以烷基硫酸酯清潔劑封阻呼腸病毒衣殼蛋白質 mul 與 mulC 之蛋白酶裂解作用，產生新型態之傳染性亞病毒粒子"(Protease cleavage of reovirus capsid protein mul1 and mulC is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviriion particle), J. of Virology 72(1):467-75 (1998))，以降低或預防已對呼腸病毒發展出免疫性之哺乳動物出現免疫反應。例如，可於形成烷基硫酸酯清潔劑之濃縮物之膠束存在下，以胰凝乳蛋白酶處理病毒粒子；產生新的感染性亞病毒粒子。

呼腸病毒可為具有不同病原性表型之二種或多種呼腸病毒之重組呼腸病毒，使其包含不同抗原決定子，藉以降低或防止事前接觸過呼腸病毒亞型之哺乳動物出現免疫反

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（13）

應。此等重組病毒粒子可由具有不同呼腸病毒亞型之哺乳動物細胞共同感染產生，經過再分類，及將不同亞型包衣蛋白質納入所得之病毒粒子衣殼中。

呼腸病毒之修飾可將突變之包衣蛋白質（如，例如： $\sigma 1$ ）納入病毒粒子外衣殼中。蛋白質可經過置換、嵌插或刪除進行突變。置換作用包括嵌插不同胺基酸置換天然胺基酸。嵌插包括在一個或多個位置嵌插外加胺基酸殘基至蛋白質中。刪除包括在蛋白質中刪除一個或多個胺基酸殘基。此等突變法可利用相關技藝已知之方法產生。例如：編碼一種包衣蛋白質之基因之寡核苷酸位置主導性誘變作用可產生所需之突變包衣蛋白質。感染呼腸病毒之哺乳動物細胞中突變蛋白質於活體外（如：COS1 細胞）之表現將會使突變蛋白質納入呼腸病毒病毒粒子中（杜納（Turner）與鄧肯（Duncan），"呼腸病毒蛋白質 $\delta 1$ C-末端部份之位置主導性誘變作用：依賴構型之受體結合區之證據（Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma 1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain" Virology 186(1):219-27 (1992)；鄧肯（Duncan）等人，"呼腸病毒細胞附著蛋白質之 C-末端球狀端之構形與功能分析。（Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein), Virology 182(2)810-9 (1991)；馬（Mah）等人，"具有本質性病毒粒子固定功能之呼腸病毒細胞附接蛋白質 $\delta 1$ 之 N-末端部份"（The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses

五、發明說明(14)

intrinsic virion-anchoring function) Virology 179(1):95-103 (1990))。

呼腸病毒最好為經修飾可降低或消除對呼腸病毒之免疫反應之呼腸病毒。此等經修飾之呼腸病毒稱為"具免疫保護性之呼腸病毒"。此等修飾法可包括由呼腸病毒包裝在微脂粒、膠束或其他載劑中，以遮蔽來自哺乳動物免疫系統之呼腸病毒。或者，由於外衣殼中蛋白質為宿主體液及細胞反應之主要決定子，因此可排除呼腸病毒粒子之外衣殼。

"增生疾病"指細胞增生比正常組織生長更快之任何細胞病變。因此"增生細胞"為增生速度比正常細胞快之細胞。增生疾病包括(但不限於)：贅瘤。贅瘤為異常組織生長，通常形成獨特物質，由細胞增生造成之生長比正常組織生長更快。贅瘤展現部份或完全缺乏與正常組織之結構組織性與功能協調性。其可大致分為三大類。由表皮結構形成之惡性贅瘤稱為癌瘤，由結締組織(如：肌肉、軟骨、脂肪或骨骼)形成之惡性贅瘤稱為肉瘤，及影響造血結構(與形成紅血球有關之結構)，包括免疫系統成份之惡性腫瘤稱為白血病與淋巴瘤。腫瘤為癌症之贅生細胞生長。本文中採用之"贅瘤"亦稱為"腫瘤"，意指涵括造血性贅瘤及固體贅瘤。其他增生疾病包括(但不限於)神經纖維瘤病變。

至少有些增生疾病之細胞出現突變，其中 Ras 基因(或 Ras 訊號途徑之元素)直接活化(例如：被 Ras 中活化突變作用活化)或間接活化(例如：被 Ras 途徑中上游元素之活

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(15)

化作用活化)。Ras 途徑中上游元素之活化作用包括例如：經表皮生長因子受體(EGFR)或 Sos 轉形。由 Ras，Ras 之上游元素，或 Ras 訊號途徑中之元素之活化作用至少部份造成之增生疾病本文中稱為 Ras 調節之增生疾病。

特別適合使用本發明方法治療之一種贅瘤為胰癌，因為 Ras 調節之贅瘤普遍與胰癌有關。特別適合利用本發明方法治療之其他贅瘤包括乳癌、中樞神經系統癌症(例如：神經胚細胞瘤與神經膠質母細胞瘤)、周邊神經系統癌症、肺癌、攝護腺癌、結腸直腸癌、甲狀腺癌、腎癌、腎上腺癌、肝癌、淋巴瘤及白血病。其他特別適合利用本發明方法處理之增生疾病包括因 ras 途徑活化作用引起之神經纖維瘤病變 1。

"投至增生細胞或贅瘤"係指投與呼腸病毒之方式使其與增生細胞或贅瘤細胞接觸。投與呼腸病毒之途徑及調配物、載體或載劑依贅瘤之位置與型態而定。有許多種投藥途徑可以使用。例如：對固體贅瘤可直接注射呼腸病毒至贅瘤中，例如：對造血性贅瘤，可經靜脈內或血管內投與呼腸病毒。對在體內不易觸及之贅瘤而言，如：轉移腫瘤或腦瘤，呼腸病毒之投與方式使之通過哺乳動物體內全身傳送，而到達贅瘤(例如：經椎管內、經靜脈內或經肌內)。或者，呼腸病毒可直接投與單一固體贅瘤，然後經過身體全身送至轉移腫瘤。呼腸病毒亦可經皮下、腹膜內、局部(例如：用於黑色素瘤)、經口(例如：用於口腔或食道贅瘤)、直腸(例如：用於結腸直腸贅瘤)、陰道(例

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

如：用於子宮頸或陰道贅瘤)、鼻部或利用吸入噴液投藥(例如：肺贅瘤)。

呼腸病毒可全身投與免疫受損或未對呼腸病毒抗原決定基發展出免疫性之哺乳動物。這種情況下，全身投與(亦即經靜脈注射)之呼腸病毒將會與增生細胞接觸，導致細胞溶解。

過去曾接觸過呼腸病毒亞型之免疫活性哺乳動物可能對該呼腸病毒亞型發展出體液及/或細胞免疫反應。儘管如此，已發現直接注射呼腸病毒至免疫活性哺乳動物體內固體腫瘤中時，仍會使贅瘤細胞溶解。

另一方面，當全身投與呼腸病毒至免疫活性哺乳動物時，哺乳動物可能對該呼腸病毒產生免疫反應。若該呼腸病毒為哺乳動物尚未發展出免疫性之亞型時，或該呼腸病毒已如本文前述之方式經過修飾而具免疫保護性時，例如：以蛋白酶分解外衣殼或包裝在膠束內，則可避免免疫反應。

或者，哺乳動物對抗呼腸病毒之免疫能力可因共同投與相關技藝已知可抑制一般免疫系統之醫藥(克夫(Cuff)等人，"以腸呼腸病毒感染作為探針探討胃腸道免疫毒性"(Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract) Toxicological Sciences 42(2):99-108 (1998))。或投與抗-抗呼腸病毒抗體。由哺乳動物血液進行血漿除去法，以排除抗呼腸病毒抗體，亦可暫時減低或抑制哺乳動物對抗呼腸病毒之體液免疫性。另可經靜脈內

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（17）

對哺乳動物投與非專一性免疫球蛋白，暫時降低或抑制哺乳動物對抗呼腸病毒之體液免疫性。

呼腸病毒可配合抗-抗呼腸病毒抗體投與對呼腸病毒已具免疫性之免疫活性哺乳動物。"抗-抗呼腸病毒抗體"為針對抗呼腸病毒抗體之抗體。此等抗體可依相關技藝已知之方法製造。參見例如："抗體：實驗室手冊"Antibodies: A laboratory manual)，E. 哈咯(Harlow)與 D. 蘭恩(Lane)，冷泉港實驗室(Cold Spring Harbor Laboratory)(1988)。此等抗-抗呼腸病毒抗體可在投與呼腸病毒之前，同時或之後不久投與。有效量之抗-抗呼腸病毒抗體最好投與充份時間，以降低或消除哺乳動物對所投與呼腸病毒之免疫反應。

"實質溶解細胞"一詞係指溶解至少 10% 增生細胞，更佳者溶解至少 50% 細胞，最佳者，至少 75%。腫瘤細胞溶解百分比可經由測定哺乳動物之腫瘤大小縮小程度或腫瘤細胞於試管內之溶解程度決定。

"疑似患有增生疾病之哺乳動物"意指哺乳動物可能患有增生疾病或腫瘤，或經診斷患有增生疾病或腫瘤，或過去曾診斷患有增生疾病或腫瘤，已利用手術排除過腫瘤或實質上所有腫瘤，及哺乳動物疑似仍殘留一些腫瘤細胞。

本發明亦包括醫藥組合物，其包含作為活性成份之一種或多種呼腸病毒，與"醫藥上可接受之載體或賦形劑"組合。在製造本發明組合物時，活性成份/呼腸病毒通常與賦形劑混合，經賦形劑稀釋或包埋在載體中，載體可呈膠囊、藥包、紙包或其他容器形式。當醫藥上可接受之賦形

五、發明說明（18）

劑作為稀釋劑時，其可為固體、半固體、或液體材料，作為活性成份之載劑、載體或介質。因此，組合物可呈錠劑、丸劑、散劑、口含錠、藥囊、扁囊劑、酏劑、懸浮液、乳液、溶液、糖漿、氣溶膠（呈固體或含於液體介質）、含例如：至多 10 重量% 活性化合物之軟膏、軟性與硬性明膠囊、塞劑、無菌注射溶液、及無菌包裝散劑。

一些合適賦形劑實例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、澱粉、阿拉伯膠、磷酸鈣、藻酸鹽、黃耆膠、明膠、矽酸鈣、微晶纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、纖維素、無菌水、糖漿、及甲基纖維素。調配物可另包括：潤滑劑如：滑石、硬脂酸鎂、及礦物油；濕化劑；乳化劑及懸浮劑；防腐劑如：羥基苯甲酸甲酯與丙酯；甜味劑；及調味劑。本發明組合物可調配，使之採用相關技藝已知之方法投與患者後可以迅速、持續或緩釋活性成份。

製備固體組合物如：錠劑時，由主要活性成分/呼腸病毒與醫藥賦形劑混合，形成含有本發明化合物之均勻混合物之固體預調配組合物。當提及此等預調配組合物為均勻時，意指活性成份勻散在組合物中，使得組合物容易再分成等量有效單位劑型如：錠劑、丸劑與膠囊。

本發明錠劑或丸劑可包覆包衣或化合形成具有長效性優點之劑型。例如：錠劑或丸劑可包含內劑量及外劑量成份，後者係以外套形式罩在前者上。二種成份可利用膠溶性層分隔，以阻隔在胃內分解並使內成分完整通過，進入十二指腸，或延遲釋出。這種腸溶性層或包衣可使用多種

五、發明說明 (19)

材料，這種材料包括許多種聚合性酸類及聚合性酸類與如：蟲膠、鯨蠟醇、及纖維素乙酸酯之混合物。

可包含本發明新穎組合物供口服或注射用之液體形式包括水溶液、適當調味之糖漿、水性或活性懸浮液、及使用食用油(如：玉米油、棉籽油、芝麻油、椰子油、或花生油)之調味乳液，及配劑與類似醫藥載劑。

供吸入或吹入用之組合物包括含於醫藥上可接受之水性或有機溶劑或其混合物中之溶液與懸浮液，及散劑。液體或固體組合物可包含本文說明之合適之醫藥上可接受之賦形劑。組合物最好經口或鼻呼吸途徑投藥，供產生局部或全身效果。最好含於醫藥上可接受之溶劑中之組合物可利用惰性氣體氣霧化。氣霧化溶液可直接利用氣霧化裝置吸入，或氣霧化裝置可附在面罩中或利用間歇式正壓呼吸器吸入。溶液、懸浮液、或散劑組合物可由依適當方式傳送調配物之裝置，最好經口或鼻投藥。

另一種較適用於本發明方法之調配物採用穿皮式傳送裝置("貼布")。這種穿皮式貼布可用於提供控制量之本發明呼腸病毒之連續或不連續輸液。用於傳送藥劑之穿皮式貼布之構築法與用法係相關技藝習知者。參見例如：美國專利案 5,023,252，已以提及之方式納入本文中。構築這種貼布供連續、依脈衝、或依需要傳送藥劑。

其他適用於本發明之調配物可參見"雷氏醫藥學"(Remington's Pharmaceutical Sciences)。

呼腸病毒或含呼腸病毒之醫藥組合物可包裝成方便套

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

組，將必要材料包裝在合適容器內。該套組亦包括化療劑及/或抗-抗呼腸病毒抗體。

呼腸病毒之投藥量為足以治療增生疾病之量(例如："有效量")。當投與呼腸病毒至增生細胞中，使增生細胞溶解時，則係"治療"該增生疾病。其結果可以縮小贅瘤，可完全消除贅瘤。縮小贅瘤或完全消除贅瘤通常係由呼腸病毒溶解贅瘤細胞("瘤細胞溶解作用")所造成。有效量最好指該用量可以抑制腫瘤細胞生長。有效量最好約 1.0 pfu/公斤體重至約 10^{15} pfu/公斤體重，更佳約 10^2 pfu/公斤體重至約 10^{13} pfu/公斤體重。例如：治療人類時，可使用約 10^2 至 10^{17} 個呼腸病毒之溶菌斑形成單位(pfu)，依所出現腫瘤型態、大小及數量而定。有效量將依個別條件而定，且至少部份考量呼腸病毒型態；選擇之投藥途徑；個體之體型大小、年齡與性別；患者症狀之嚴重性；贅瘤大小及其他特性，等等。療程可持續數天或數月，或直到減輕疾病為止。

呼腸病毒可投與單一劑量，或多重劑量(亦即一個以上劑量)。多重劑量可同時投藥或依序投藥(例如：在數天或數週內)。呼腸病毒亦可在同一位個體內投與一種以上之贅瘤。

組合物最好調配成單位劑型，各劑型包含約 10^2 pfu 至約 10^{13} pfu 呼腸病毒。"單位劑型"指適合人類或其他哺乳類之單位劑型之物理性分離單位，各單位包含經計算可產生所需療效之預定量呼腸病毒，與合適之醫藥賦形劑。

五、發明說明 (21)

現已發現，呼腸病毒可在免疫活性哺乳動物中有效治療固體贅瘤。對贅瘤直接投與未修飾之呼腸病毒可造成贅瘤細胞溶解，並縮小腫瘤。

呼腸病毒可配合手術或摘除贅瘤進行投藥。因此，並提供治療固體腫瘤之方法，其包括手術摘除贅瘤及在贅瘤位置或其附近投與呼腸病毒。

呼腸病毒可配合或增加放射療法投藥。

此外，本發明呼腸病毒尚可組合或外加已知抗癌化合物或化療劑投藥。化療劑為可抑制腫瘤生長之化合物。此等製劑包括(但不限於)：5-氟尿嘧啶、絲裂黴素 C、胺甲喋呤、羥基脲、環磷醯胺、大卡巴吡(dacarbazine)、米特散(Mitoxantrone)、蒽環型藥(Epirubicin 與 Doxorubicin)、受體之抗生素，如：赫希普丁(herceptin)、伊普賽(etoposide)、普拿松(pregnasome)、鉑化合物如：卡布拉丁(carboplatin)與希布拉丁(cisplatin)、紅豆杉素(taxanes)如：紅豆杉醇與 taxotere，激素療法如：塔希芬(tamoxifen)及抗雌激素、干擾素、芳構酶抑制劑、孕酮劑及 LHRH 類似物。

呼腸病毒最好在不含 1,3-雙(2-氯乙基)-1-亞硝基脲(BCNU)下投藥。例如：1,3-雙(2-氯乙基)-1-亞硝基脲(BCNU)不可在哺乳動物接受呼腸病毒之前、期間或之後投藥。

已發現本發明呼腸病毒可減少轉移之腫瘤之生長。本發明較佳具體實施例中，提供一種為哺乳動物降低轉移之腫瘤生長之方法，其包括為哺乳動物投與有效量之呼腸病

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

毒。

用途

本發明呼腸病毒可用於多種目的。其可用於為哺乳動物治療 ras 調節增生疾病之方法。呼腸病毒可用於縮小或消除贅瘤，其可用於治療轉移贅瘤之方法。其可用於配合已知之癌症治療法，包括手術、化療及放射法。

為了進一步說明本發明及其優點，出示下列明確實例，但無意以任何方式限制其申請專利範圍。

實例

下列實例中，所有溫度均為攝氏度數(除非另有說明)且所有百分比均為重量百分比(亦除非另有說明)。

下列實例中，下列縮寫之定義如下。若縮寫未加定義，則如其一般已接受之定義：

μM	=	微莫耳濃度
mM	=	毫莫耳濃度
M	=	莫耳濃度
ml	=	毫升
μl	=	微升
mg	=	毫克
μg	=	微克
PAGE	=	聚丙烯醯胺凝膠電泳
rpm	=	每分鐘轉數
FBS	=	胎牛血清
DTT	=	二硫異赤蘚糖醇

五、發明說明 (23)

SDS	=	十二烷基硫酸鈉
PBS	=	磷酸鹽緩衝食鹽水
DMEM	=	杜氏改良伊格氏培養基
α -MEM	=	α -改良伊格氏培養基
β -ME	=	β -氫硫基乙醇
MOI	=	感染比例
PFU	=	溶菌斑形成單位
MAPK	=	MAP 激酶
phosph-MAPK	=	磷酸基化-MAP 激酶
HRP	=	辣根過氧化酶
PKR	=	雙股 RAN 活化蛋白質激酶
RT-PCR	=	逆轉錄酶-聚合酶鏈反應
GAPDH	=	甘油醛-3-磷酸酯去氫酶
EGFR	=	表皮生長因子受體
MEK 激酶	=	有絲分裂原活化細胞外訊號調節激酶
DMSO	=	甲磺醯胺
SCID	=	嚴重組合免疫缺乏症

一般方法

細胞與病毒

以哈維(Harvey)-ras (H-ras) 及 EJ-ras 致癌基因轉感染之母系 NIH-3T3 及 NIH-3T3 細胞為 D. 弗洛(Douglas Faller) 博士的慷慨贈與(波士頓大學醫學院)。NIH-3T3 細胞與其 Sos-轉形之相對部份(稱為 TNIH#5)為 M. 卡林博士(Dr. Michael Karin)(聖地牙哥加州大學)之慷慨贈與。H. J. 甘(Kung)(凱斯西方預備大學(Case Western Reserve University))好心贈與

五、發明說明 (24)

母系 NIH-3T3 細胞及經 v-erbB 致癌基因轉感染之 NIH-3T3 細胞(稱為 THC-11)。自 Nobumichi Hozumi 博士(西奈山醫院研究所)取得含在受小白鼠金屬硫新質-I 發動子轉錄控制之哈維-ras 基因之 2H1 細胞,其係 C3H 10T1/2 鼠類纖維母細胞株之衍生物。此等 2H1 細胞為在 50 μ M $ZnSO_4$ 之存在下表現 H-ras 致癌基因之有條件 ras 轉形體。所有細胞株均於含 10% 胎牛血清(FBS)之杜氏改良伊格氏培養基(DMEM)中生長。

NIH-3T3 tet-myc 細胞來自 R.N. 強斯頓(Johnston)博士(卡加利大學(University of Calgary), 於含 10% 熱去活性之 FBS 與抗生素之 DMEM 中,於含或不含 2 微克/毫升四環素(C.C. 赫炳(Helbing)等人, Cancer Res. 57:1255-1258 (1997))下生長。當含有四環素時,抑制人類 c-myc 基因之表現。排除四環素時,使此等細胞之 c-myc 表現提高至高達 100 倍,此等細胞亦展現轉形之表型。

PKR^{+/+} 與 PKR^{0/0} 小白鼠胚胎纖維母細胞(MEFs)得自 B.R.G. 威廉斯(Williams)博士(克里夫蘭臨床基金會)(the Cleveland Clinic Foundation),於含胎牛血清與如上述抗生素之 α -MEM 中生長(Y.L. 楊(Yang)等人, EMBO J. 14:6095-6106 (1995)); S.D. 德爾(Der)等人, Natl. Acad. Sci. USA 94:3279-3283 (1997)。

此等試驗中使用之呼腸病毒血清型 3 之狄林菌株係根據史密斯(Smith)之方法(R.E. 史密斯等人, (1969), Virology, 39:791-800),於 L 細胞之懸浮培養物中繁殖,並純化,但

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (25)

萃取緩衝液中省略不用 β -氫硫基乙醇(β -ME)。標記 $[^{35}\text{S}]$ 甲硫胺酸之呼腸病毒依麥克瑞(McRae)與傑克里克(Joklik)所述之方法生長及純化(M.A. 麥克瑞與 W.K. 傑克里克(1978), Virology 89:578-593)。用於純化呼腸病毒之粒子/PFU 比例典型為 100/1。

呼腸病毒感染之免疫螢光分析法

進行免疫螢試驗時，使 NIH-3T3，TNIH#5，H-ras，EJ-ras，2H1 (+/- ZnSO_4) 及 THC-11 細胞於蓋玻片上生長，以感染比例(MOI)約 10 PFU 進行感染或依病毒投與細胞之相同方式，施用載體試劑(磷酸鹽緩衝食鹽水，PBS)至細胞中，作為假感染。感染後 48 小時，細胞於乙醇/乙酸(20/1)混合物中固定 5 分鐘後，依序於 75%、50% 及 25% 乙醇中洗滌，使之再水合，然後以磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)洗滌，經固定及再水合之細胞隨後於室溫下接觸初次抗體(兔子多株抗體 3 型血清，於 PBS 中稀釋 1/100)(抗血清製法為以含於弗氏(Freund's)完全輔劑中之呼腸病毒血清型 3 注射兔子，隨後抽血)，歷時 2 小時。以 PBS 洗滌 3 次後，細胞再接觸二次抗體[山羊抗兔子 IgG (全分子)-螢光素異硫氰酸酯共軛物(FITC)[希格馬免疫化學 F-0382]，於含 10% 山羊血清與 0.005% 伊凡士藍(Evan's Blue)之 PBS 中稀釋 1/100，於室溫下 1 小時。最後，再以 PBS 洗滌經固定及處理之細胞 3 次，再以雙蒸餾水洗滌 1 次，乾燥，架於載玻片上，含在含 0.1% 苯二胺之 90% 甘油中，於加裝蔡司相機(Carl Zeiss camera)之蔡司顯微鏡(Zeiss Axiophot

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (26)

microscope) 觀察(所有相片之放大倍數均為 200 倍)。

檢測 MAP 激酶(ERK) 活性

根據製造商之指示，採用加磷(PhosphoPlus) p44/42 MAP 激酶(Thr202/Tyr204) 抗體套組(新英格蘭生物實驗室) 檢測細胞溶胞物中之 MAP 激酶。簡言之，使用建議之含 SDS- 樣本緩衝液溶解次融合單層培養物，進行 SDS-PAGE，然後於硝基纖維素紙上進行電點墨試驗。依製造商之指示手冊，以初次抗體(抗總 MAPK 或抗-磷 MAPK) 為探針，然後以與辣根過氧化酶(HRP) 共軛之二次抗體檢測膜。

放射性標記感染呼腸病毒之細胞及製備溶胞物

以呼腸病毒(MOI 約 10 PFU/細胞) 感染 NIH-3T3，TNIH#5，H-ras，EJ-ras，2H1 (+/- ZnSO₄) 之融合單層，及 THC-11 細胞。感染後 12 個小時，培養基換成不含甲硫胺酸，但含有 10% 透析之 FBS 及 0.1 毫居禮/毫升 [³⁵S] 甲硫胺酸之 DMEM。再於 37 °C 下培養 36 小時後，以磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS) 洗滌細胞，於含 1% Triton X-100，0.5% 去氧胆酸鈉與 1 mM EDTA 之相同緩衝液中溶解細胞。利用低速離心法排除細胞核，上澄液保存在 -70 °C 直到使用時為止。

用於試管內激酶分析法之細胞質萃物之製法

各種不同細胞株之融合單層於 96 孔細胞培養板上生長。在感染後適當時間點吸出培養基，以含 20 mM HEPES [pH 7.4]，120 mM KCl，5 mM MgCl₂，1 mM 二硫異赤蘚糖醇，0.5% Nonidet P-40，2 微克/毫升抗纖維蛋白溶酶肽與

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (27)

50 微克/毫升抗蛋白酶肽之緩衝液溶解細胞。利用低速離心法排除細胞核，上澄液保存在 -70°C 下直到使用時為止。

細胞質萃物在使用前利用 Bio-Rad 蛋白質微分析法，使蛋白質濃度標準化。每次試管內激酶反應含有 20 微升細胞萃物，7.5 微升反應緩衝液 (20 mM HEPES [pH 7.4]，120 mM KCl，5 mM MgCl_2 ，1 mM 二硫異赤蘚糖醇，及 10% 甘油) 及 7.0 微升 ATP 混合物 (1.0 $\mu\text{Ci}[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 含於 7 微升反應緩衝液中)，於 37°C 下培養 30 分鐘 (L.J. 孟蕭 (Mundschau) 及 D.V. 弗勒 (Faller), J. Biol. Chem., 267:23092-23098 (1992))。培養後，有標記之萃物立即於蘭里 (Laemmli) SDS-樣本緩衝液中煮沸或使用瓊脂糖-聚 (I) 聚 (C) 小珠沈澱，或與抗 PKR 抗體進行免疫沈澱。

瓊脂糖聚 (I) 聚 (C) 沈澱法。

在各試管內激酶反應混合物中，添加 30 微升 50% Ag 聚 (I) 聚 (C) 6 型漿物 (法馬藥廠 LKB 生物技術 (Pharmacia LKB Biotechnology))，混合物於 4°C 下培養 1 小時，於室溫下，以洗滌緩衝液 (20 mM HEPES [7.5 pH]，90 mM KCl，0.1 mM EDTA，2 mM 二硫異赤蘚糖醇，10% 甘油) 洗滌已吸附有標記之蛋白質之 Ag 聚 (I) 聚 (C) 小珠 4 次，與 2 倍蘭里 SDS 樣本緩衝液混合。小珠再煮沸 5 分鐘，以 SDS-PAGE 分析釋出之蛋白質。

聚合酶鏈反應

在感染後不同時間收集細胞，再懸浮於冰冷 TNE 中 (10

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (28)

mM Tris [pH 7.8], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA), 然後添加 NP-40 至終濃度 1%。5 分鐘後, 細胞核離心集結成塊, 採用苯酚: 氯仿法萃取上澄液中之 RNA。根據製造商指示之方法, 採用隨機六核苷酸引子(法馬藥廠)及 RTase (GIBCO-BRL), 使來自各樣本之等量總細胞進行 RT-PCR (H. 翁(Wong) 等人(1994), Anal. Biochem., 223:251-258)。來自 RT-PCR 步驟之 cDNA 則使用引子 5'-AATTCGATTTAGGTGACACTATAGCTATTGGTCGGATG-3' (SEQ ID NO:1) 與 5'-CCCTTTTGACAGTGATGCTCCGTTATCACTCG-3' (SEQ ID NO:2) (其擴增預估之 116 bp 片段) 選擇性擴增呼腸病毒 S1 cDNA。此等引子序列衍生自事先測得之 S1 序列 (L. 納加塔(Nagata) 等人(1984), Nucleic Acids Res., 12:8699-8710)。採用 GAPDH 引子 (H. 翁(Wong) 等人, (1994), Anal. Biochem., 223:251-258), 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' (SEQ ID NO:3) 及 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' (SEQ ID NO:4) 擴增預估之 306 bp GAPDH 片段, 作為 PCR 與添加凝膠時之控制物質。根據製造商指示之方法, 使用柏金艾瑪(Perkin Elmer) 基因擴增 PCR 系統 9600, 使用 Tag DNA 聚合酶(GIBCO-BRL) 進行 s1 與 GAPDH cDNA's 之選擇性擴增法。PCR 進行 28 次循環, 其包括於 97 °C 下變性 30 秒, 於 55 °C 下黏合 45 秒, 及於 72 °C 下聚合 60 秒。利用浸泡過溴化乙啶之 TAE-2% 瓊脂糖凝膠進行電泳法分析 PCR 產物, 於紫外線照光下, 使用拍立得 57 底片照相。

免疫沈澱法與 SDS-PAGE 分析法

五、發明說明 (29)

依過去曾說明之方法，使用抗呼腸病毒血清型 3 血清與感染標記 ^{35}S 之呼腸病毒之細胞溶胞物進行免疫沈澱法 (P.W.K. 李 (Lee) 等人，1981, Virology, 108:134-146)。同樣採用抗 -PKR 抗體 (來自冷泉港 M. 馬休博士 (Dr. Michael Mathews)) 與標記 ^{32}P 之細胞溶胞物進行免疫沈澱法。根據蘭里之方法 (U.K. 蘭里，(1970), Nature, 227:680-685)，利用不連續式 SDS-PAGE 分析免疫沈澱物。

實例 1 以 Ras 訊號途徑中之活化中間物增加呼腸病毒感染效率

過去曾顯示 3T3 細胞及其缺乏表皮生長因子受體 (EGFR) 之衍生物不容易受呼腸病毒感染，而經 EGFR 或 V-erb B 轉形之相同細胞則很容易感染，此點可由細胞病理效應、病毒蛋白質合成法及病毒產量測得 (J.E. 史強 (Strong) 等人 (1993), Virology, 197:405-411；J.E. 史強與 P.W.K. 李 (Lee), (1996), J. Virol., 70:612-616)。

爲了鄰斷是否涉及 EGFR 訊號轉導途徑之下游調節劑，分析經 EGFR 結構性活化之致癌基因下游轉形衍生之多種不同 NIH 3T3 對呼腸病毒感染之相對敏感性。特別值得注意的是 ras 訊號途徑中之中間物 (M. 巴布希德 (Barbacid), Annu. Rev. Biochem., 56:779-827 (1987)；M.A. 卡希爾 (Cahill) 等人，Curr. Biol., 6:16-19 (1996)。爲了探討 Ras 訊號途徑，使經 Sos (A. 阿諾海姆 (Aronheim) 等人 (1994) Cell, 78:949-961) 或 ras (L.J. 孟德蕭 (Mundschau) 與 D.V. 弗勒 (Faller) (1992), J. Biol. Chem., 267:23092-23098) 致癌基因之活

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (30)

化型轉感染之 NIH 3T3 母系細胞株與 NIH 3T3 細胞株與呼腸病毒接觸，並比較其促進病毒蛋白質合成作用之能力。

先依上述使用間接免疫螢光顯微鏡觀察檢測病毒蛋白質。結果顯示當 NIH 3T3 細胞呈典型扁平向外伸展之外形且具顯著接觸抑制作用時，轉形之細胞則均長成紡錘狀細胞，接觸抑制作用大幅降低。當比較未感染之母系細胞株與各種不同轉形細胞株時，細胞外形顯然與轉形時不同。當接觸到呼腸病毒時，轉成澄清，母系 NIH 3T3 細胞株不容易感染(<5%)，不論母系 NIH 3T3 細胞株之來源為何。反之，轉感染之細胞株在感染後 48 小時即展現相當顯著之免疫螢光(未出示數據)。

爲了證實病毒蛋白質合成作用在 Sos-或 Ras 轉形細胞株中較有效率，於感染後 12 至 48 小時，爲細胞連續標記 [³⁵S]-甲硫胺酸，並依上述，使用十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳法(SDS-PAGE)分析蛋白質。

結果清楚地顯示，Sos-或 Ras-轉形細胞中之病毒蛋白質合成作用程度顯著高於母系 NIH 3T3 細胞。使用多株抗呼腸病毒抗體與有標記之蛋白質進行免疫沈澱法，來判別病毒條帶。由於未感染之 NIH 3T3 細胞與其轉形之相對物質展現程度相當之細胞蛋白質合成作用及數量加倍時所需之時間(未出示數據)，因此病毒蛋白質合成作用上所見到之差異可能不來自此等細胞株在生長速率或轉譯效率上之本質差異。

使此等細胞生長至少 4 週，追蹤已感染之 NIH 3T3 細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（31）

之長期結果。其生長正常且外觀健康，沒有細胞溶解或持續感染之跡象；此時間點之後，培養基中不再見到病毒（未出示數據）。

實例 2 由活化之致癌基因造成之可感染率提高並不歸因於長期轉形作用或細胞之一般化轉形狀態

爲了測定敏感性之差異是否因轉形作用之長期影響造成，或係活化之致癌基因本身造成，依上述測試表現鉅可誘發細胞哈維-ras (c-H-ras) 基因之細胞株對感染呼腸病毒之敏感性。此等稱爲 2H1 之細胞來自不容易受呼腸病毒感染之 C3H 10T 1/2 細胞株（未出示數據），且帶有受小白鼠金屬硫新質-I 發動子控制之 c-H-ras 基因 (W.S. 金寶 (Trimble) 等人 (1986), Nature, 321:782-784)。

細胞經過假處理或以 50 μ M ZnSO₄ 前處理 18 小時後，才進行感染或假感染（投與載體試劑），此等細胞於感染後或假感染後 48 小時進行間接免疫螢光分析法，或假感染。

結果（未出示）證明未經誘發之細胞不容易感染 (<5%)，而僅誘發 18 小時之細胞則很容易感染 (>40%)。進一步利用 [³⁵S] 甲硫胺酸進行代謝性標記，然後由病毒專一性蛋白質進行 SDS-PAGE 分析法，證明 Zn-誘發之 2H1 細胞中加強了病毒蛋白質合成作用（未示出）。

根據此等觀察，轉形細胞中呼腸病毒感染效率之加強係活化之致癌基因產物之直接結果，且不由其他如：經常與長期轉形作用有關之非整倍體，或其他可能在慢性轉形狀態下（例如：p53 或 myc 活化作用）造成之累積突變作用等

五、發明說明 (32)

因素造成。

爲了進一步證實對感染呼腸病毒之敏感性不由轉形作用本身造成(亦即宿主細胞之轉形狀態所造成)，檢視含有四環素控制之人類 c-myc 基因之 NIH-3T3 細胞(tet-myc 細胞)(C.C. 赫柄 (Helbing) 等人，Cancer Res. 57:1255-1258 (1997))。此等細胞通常保持在抑制 c-myc 表現之四環素(2 微克/毫升)中。在正常生長條件下(10%胎牛血清)排除四環素，會造成 c-Myc 蛋白質累積，使細胞展現轉形之表型。吾等發現這些細胞在含或不含四環素下，均無法支持病毒生長(未出示數據)，此表示對感染病毒之敏感性不因宿主細胞之一般轉形狀態造成，反而需要利用 Ras 訊號途徑之元素進行專一性轉形作用造成。

Ras 訊號途徑之活化作用之良好指標爲 MAP 激酶 ERK1 與 ERK2 之活化作用(其概論請參見 M.J. 羅賓森(Robinson)與 M.H. 考伯(Cobb), Curr. Opin. Cell. Biol. 9:180-186 (1997))。在這一方面，當與未轉形細胞比較時，發現 Ras-轉形細胞具有顯著較高之 ERK 1/2 活性(未出示數據)。此外檢視多種人類癌細胞株顯示，ERK 1/2 活性程度與感染呼腸病毒之敏感性之間有極佳相關性(未出示數據)，但 ERK1/2 本身似乎未在其中扮演任何角色。小白鼠 L 細胞與人類 HeLa 細胞中，呼腸病毒生長情形極佳，均展現高度 ERK1/2 活性(未出示數據)。

實例 3 於呼腸病毒抗性 NIH 3T3 細胞中產生但未轉譯之病毒轉錄本

五、發明說明 (33)

亦判別在非敏感性 NIH 3T3 細胞中封阻呼腸病毒感染之步驟。由於非敏感性細胞之病毒結合作用及病毒內化作用與敏感性細胞所觀察到之結果相當 (J.E. 史強等人 (1993), Virology, 197:405-411)，因此探討病毒基因之轉錄作用。

依上述在利用聚合酶鏈反應 (PCR) 擴增此等轉錄本後，比較感染後第一個 12 小時內，NIH 3T3 細胞中與 Ras 轉形細胞中產生之呼腸病毒 S1 轉錄本之相對量。結果證明二種細胞株中累積 S1 轉錄本之速率相似，至少長達感染後 12 小時。當比較其他呼腸病毒轉錄本之累積速率時，亦得到類似結果 (未出示數據)。此等結果證明阻斷非敏感性細胞感染之過程不在病毒基因之轉感染階段，而在轉錄本之轉譯階段。

稍後，未轉形之 NIH 3T3 細胞中病毒轉錄本含量顯著減少，而轉形之細胞中轉錄本則持續累積 (未出示數據)。此等轉錄本無法在 NIH 3T3 細胞中轉譯可能造成其降解。如所預期者，感染之 L 細胞中病毒轉錄本含量至少相當於感染之 Ras 轉形細胞中之含量 (未出示數據)。

實例 4 65 kDa 蛋白質於呼腸病毒處理之 NIH 3T3 細胞中磷酸化，而不在感染呼腸病毒之轉形細胞中磷酸化

由於 NIH 3T3 細胞中產生未轉譯病毒轉錄本，因此探討雙股 RNA (dsRNA) 活化之蛋白質激酶 PKR 是否在此等細胞中活化 (磷酸化) (例如：被經證實為 PKR 之強效活化劑之 S1 mRNA 轉錄本活化) (J.R. 必修夫 (Bischoff) 與 C.E. 山繆 (Samuel), (1989) Virology, 172:106-115)，進而抑制病毒基因

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（34）

轉譯。若為轉形細胞時，這種情節必然結果為防止了此活化作用，必定合成病毒蛋白質。

以呼腸病毒處理 NIH 3T3 細胞及 V-erbB- 或 Ras 轉形細胞（分別稱為 THC-11 及 H-ras）（亦即感染）或假感染（如上述），處理 48 小時後，進行試管內激酶反應，然後依上述進行自動放射照相。

其結果清楚地證明僅在 NIH 3T3 細胞中，而且僅在接觸呼腸病毒後，有獨特之磷蛋白質在約 65 kDa 處移動，其係 PKR 預估之大小。此蛋白質未標記在未感染之轉形細胞株或感染之轉形細胞株之溶胞物中。反而在感染病毒後之轉形細胞株中發現標記了於約 100 kDa 處移動之蛋白質。此蛋白質不存在於 NIH 3T3 細胞株感染前或感染後之溶胞物中，而且不是一種呼腸病毒蛋白質，因為不會與使所有呼腸病毒蛋白質反應之抗呼腸病毒血清反應（未出示數據）。在 Sos 轉形之細胞株感染後溶胞物之試管內激酶反應中亦發現一種類似之 100 kDa 蛋白質標記了 ^{32}P （未出示數據）。

進一步利用含有 Zn 可誘發之 Ras 致癌基因之 2H 細胞證實 Ras 訊號途徑中之中間物為 65 kDa 蛋白質缺乏磷酸化作用之原因。未經誘發之 2H1 細胞（相當抗拒呼腸病毒感染，如上述）僅在接觸病毒後可產生 65 kDa 磷蛋白質。然而，受到 H-Ras 致癌基因之 Zn-誘發作用之 2H1 細胞在生產此磷蛋白質方面出現顯著受損情形。此受損情形與病毒合成作用加強之情形一致。因此此等結果消除了 65 kDa 磷

五、發明說明 (35)

蛋白質之誘發作用為一種 NIH 3T3 專一事件之可能性，且清楚確立 Ras 在預防(或逆轉)誘發此磷蛋白質生產上之角色。Zn-誘發之 2H1 細胞不會在受感染之慢性轉形 H-Ras 細胞中產生 100 kDa 磷蛋白質。

實例 5 誘發 65 kDa 蛋白質之磷酸化作用需要活性病毒轉錄作用

由於 65 kDa 磷蛋白質之生產僅出現在抗拒呼腸病毒感染之細胞中，且僅在細胞接觸呼腸病毒之後，因此探討是否需要活性病毒轉錄作用供生產 68 kDa 磷蛋白質。呼腸病毒經 UV 處理，使其基因組不活化後才投與呼腸病毒至 NIH 3T3 細胞中。進行 UV 處理時，使呼腸病毒懸浮於 DMEM 中，至濃度約 4×10^8 PFU/毫升，並曝露在短波(254 nm) UV 光下 20 分鐘。依上述 [^{35} S] 甲硫胺酸標記法，由對小白鼠 L-929 纖維母細胞缺乏細胞病症效果及缺少病毒蛋白質合成之現象判斷經 UV 去活性之病毒不具感染性。此等 UV 處理破壞病毒基因轉錄作用(由 RCR 分析得知)，因而破壞病毒感染力(未出示數據)。細胞培養 48 小時，依上述製備溶胞物，並於試管內標記 ^{32} P。結果顯示感染未處理之呼腸病毒之 NIH 3T3 細胞所產生之獨特 65 kDa ^{32} P-標記條帶並未出現在未感染之細胞中。接觸過 UV 處理之呼腸病毒之細胞之表現類似未感染之對照組細胞，其 65 kDa 蛋白質之磷酸化程度不高。因此，誘發 65 kDa 磷蛋白質之磷酸化作用並未因所添加呼腸病毒中之 dsRNA 所致；反而需要病毒基因更新轉錄，因此判別 65 kDa 磷蛋白質為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (36)

PKR 。

實例 6 判別 65 kDa 磷蛋白質為 PKR

爲了判斷 65 kDa 磷蛋白質是否爲 PKR，進行 dsRNA 結合性實驗，其中依上述添加聚(I)-聚(C)瓊脂糖小珠至標記³²P 之溶胞物中。於 4 °C 下培養 30 分鐘後，洗滌小珠，釋出結合之蛋白質，以 SDS-PAGE 分析。結果顯示，於感染後之 NIH 3T3 細胞溶胞物中產生之 65 kDa 磷蛋白質可以結合 dsRNA；這種結合作用係 PKR 公認之特性。反之，在感染之 H-ras-轉形細胞株中檢測之 100 kDa 磷蛋白質則不結合聚(I)-聚(C)瓊脂糖。65 kDa 磷蛋白質亦會與 PKR-專一性抗體(由 M.馬休博士(Dr. Mike Mathews)，冷泉港實驗室提供)進行免疫沈澱，證實其的確是 PKR。

實例 7 未轉形細胞加強感染力之 PKR 去活性或刪除結果

若 PKR 磷酸化作用爲造成 NIH 3T3 細胞中病毒基因轉譯作用關閉之原因時，且若轉形細胞中活化致癌基因產物之功能之一爲預防此磷酸化作用發生時，則利用其他方法(例如：藥物)抑制 NIH 3T3 細胞中 PKR 磷酸化作用，應可加強此等細胞中病毒蛋白質合成，因而加強感染。爲了試驗此想法，採用 2-胺基嘌呤。此藥物已經證實對 PKR 自體磷酸化作用具有相當專一抑制活性(C.E.山膠(Samuel)與 M.布洛迪(Brody)(1990), Virology, 176:106-113；Y.胡(Hu)與 T.W.康威(Conway)(1993), J. Interferon Res., 13:323-328)。因此，由 NIH 3T3 細胞接觸 5 mM 2-胺基嘌呤，並同時與呼腸病毒接觸。感染後 12 至 48 小時，以 [³⁵S] 甲硫胺酸標記

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（37）

細胞，收集溶胞物，並以 SDS-PAGE 分析。

結果證明接觸到 2-胺基嘌呤時，NIH 3T3 細胞中病毒蛋白質合成作用程度顯著提高（未出示數據）。當溶胞物與抗呼腸病毒血清進行疫沈澱時，此加強程度特別明顯，此等結果證明 PKR 磷酸化作用會抑制病毒基因轉譯，而抑制此磷酸化作用會釋出轉譯阻斷劑。因此，Ras 訊號途徑之中間物負向調節 PKR，進而加強 Ras 轉形細胞之感染力。

已知可誘發 PKR 表現之干擾素 β 已發現可在 Ras 轉形細胞中顯著減少呼腸病毒複製（未出示數據）。

界定 PKR 在呼腸病毒感染中之角色之更直接方法為使用缺乏 PKR 之細胞。因此，比較來自野生型 $PKR^{+/+}$ 與 $PKR^{0/0}$ 小白鼠之原生胚胎纖維母細胞（Y.L. 楊 (Yang) 等人，EMBO J. 14:6095-6106 (1995)）在感染呼腸病毒敏感性上之差異。結果清楚地顯示 $PKR^{0/0}$ 細胞中合成呼腸病毒蛋白質之程度顯著高於 $PKR^{+/+}$ 細胞。此等實驗證明 PKR 去活性或刪除作用加強宿主細胞對呼腸病毒感染之方式與 Ras 或 Ras 訊號途徑之元素所進行之轉形作用之加強方式相同，因此此點強烈地支持 Ras 訊號途徑之元素在負向調整 PKR 上之角色。

實例 8 轉形細胞中 PKR 之去活性作用不涉及 MEK

已知受體酪胺酸激酶（如：EGFRs）利用 Ras 刺激受有絲分裂原活化或受細胞外訊號調節之激酶（ERK1/2）（參見 M.J. 羅賓森 (Robinson) 與 M.H. 考柏 (Cobb), Curr. Opin. Cell Biol. 9:180-186 (1997)）。此刺激作用需要利用有絲分裂原活化之

五、發明說明 (38)

細胞外訊號調節激酶，激酶 MEK (其本身被 Raf (係 Ras 之絲胺酸-蘇胺酸激酶下游)活化(磷酸化))進行 ERK1/2 磷酸化。爲了判斷轉形細胞中是否需要 MEK 活性進行 PKR 去活性作用，而探討最近方鑑別出來之 MEK 抑制劑 PD 98059 (D.T. 杜得里(Dudley)等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7686-7689 (1995)；S.D. 華特斯(Waters)等人，J. Biol. Chem. 270:20883-20886 (1995))對受感染之 Ras-轉形細胞之影響。

使 H-Ras 轉形細胞生長至 80% 融合度，以 MOI 約 10 p.f.u./細胞之呼腸病毒感染。PD98059 (卡爾生化藥廠(Calbiochem)溶於二甲亞砜(DMSO)中，與病毒同時加至細胞中(PD98059 終濃度爲 50 μ M)。對照組細胞接受等體積之 DMSO。在感染後 12 至 48 小時，爲細胞標記 ^{35} S-甲硫胺酸。然後製備溶胞物，與單株抗呼腸病毒血清型 3 血清進行免疫沈澱，以 SDS-PAGE 分析。

結果(未出示數據)顯示 PD98059 在有效抑制 ERK1/2 磷酸化作用之濃度下，不會在轉形細胞中抑制呼腸病毒蛋白質合成。反之，PD98059 處理則一致地在此等細胞中稍微加強病毒蛋白質合成；此反應之原因仍在探討中。在 PD98059 之存在下，由於一致缺少抑制病毒蛋白質之合成作用，因此此等細胞中之 PKR 保持未磷酸化(未出示數據)。如所預期者，PD98059 在未轉形之 NIH 3T3 細胞中，對呼腸病毒誘發之 PKR 磷酸化作用沒有影響(未出示數據)。此等結果顯示 MEK 與 ERK1/2 未涉及 PKR 活化作

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (39)

用。

實例 9 呼腸病毒之活體內瘤細胞溶解能力

採用嚴重組合免疫缺乏症(SCID)宿主腫瘤模式來分析利用呼腸病毒縮小腫瘤之效力。為雄性與雌性 SCID 小白鼠(加拿大查理士李佛公司(Charles River))注射 v-erbB- 轉形 NIH 3T3 小白鼠纖維母細胞(稱為 THC-11 細胞)至後腹部二個皮下位置。第一項試驗中，採用含 2.3×10^5 個細胞之 100 微升無菌 PBS 注射大丸劑。第二項試驗中，採用含 4.8×10^6 個細胞之 100 微升 PBS 注射大丸劑。注射後約 2 至 3 週有顯著可觸知之腫瘤。

在右側腫瘤塊("經處理之腫瘤塊")注入呼腸病毒血清型 3 (狄林菌株)，體積 20 微升，濃度 1.0×10^7 溶菌斑形成單位(PFU)/毫升。左側腫瘤塊("未處理腫瘤塊")則未處理。注射呼腸病毒後 7 天內觀察小白鼠。每二天使用量徑器測量腫瘤大小，殺死動物後測量腫瘤重量。所有小白鼠均於第 7 天殺死。結果示於表 1。

表 1 以呼腸病毒處理後之腫瘤塊

試驗 1 (n=8)	未處理腫瘤塊平均值	602 毫克
	經處理腫瘤塊平均值	284 毫克
試驗 2 (n=12)	對照組腫瘤塊平均值	1523.5 毫克
	未處理腫瘤塊平均值	720.9 毫克
	經處理腫瘤塊平均值	228.0 毫克

五、發明說明（40）

試驗 1 中，經處理腫瘤塊為未處理腫瘤塊之 47%，於試驗 2 中，則為未處理腫瘤塊之 31.6%。此等結果顯示，經病毒處理之腫瘤實質上小於未處理之腫瘤，且病毒可能對未處理之腫瘤塊另具有全身效應。

亦在單側引入腫瘤細胞，進行類似實驗。在 SCID 小白鼠後腹部單側，經皮下投與 v-erbB-轉形之 NIH 3T3 小白鼠纖維母細胞(THC-11 細胞)。2 週後確定有可觸知之腫瘤(平均面積 0.31 平方公分)。然後對 8 隻動物在腫瘤內投與一劑含於磷酸鹽緩衝食鹽水(PBD)中之 1.0×10^7 個 PFU 呼腸病毒血清型 3 (狄林菌株)。以等量 UU 去活性病毒注射對照組腫瘤(n=10)。追蹤腫瘤生長 12 天，此期間不再投與呼腸病毒處理。

示於圖 2 之結果顯示，以單一劑量活性呼腸病毒處理此等腫瘤(空心圓)，在第 13 天時(終點)大幅抑制腫瘤生長，而對照組接受單一劑量去活性呼腸病毒注射時(實心圓)，其腫瘤量則超過可接受之負荷量。此實驗重覆數次，且發現再現性高，因此進一步證實呼腸病毒在抑制腫瘤生長上之效力。

實例 10 呼腸病毒對抗人類衍生自乳癌之細胞株之活體內溶解瘤細胞之能力

亦於 SCID 小白鼠模式中，使用人類乳癌癌瘤細胞進行活體內試驗。在雌性 SCID 小白鼠後腹部兩個皮下位置注射 1×10^6 個人類乳房癌瘤 MDA-MB468 細胞。注射後約 2 至 4 週時，出現可觸知之腫瘤。在右側腫瘤塊注射未稀釋

五、發明說明 (41)

之呼腸病毒血清型 3 (狄林菌株)，體積 20 微升，濃度 1.0×10^7 個 PFU/毫升。得到下列結果：

表 2：以呼腸病毒處理後之腫瘤塊

處理	未處理腫瘤塊 平均值(左側)	經處理腫瘤塊 平均值(右側)
呼腸病毒(n=8)	29.02 克	38.33 克
對照組(n=8)	171.8 克	128.54 克

* 註：其中一隻對照組小白鼠在處理期中死亡，而呼腸病毒處理組小白鼠則均未死亡。

雖然此等實驗為預備實驗，但呼腸病毒處理組動物之腫瘤大小顯然遠小於未處理組動物。然而，呼腸病毒處理組動物之右側(處理)腫瘤大小則平均略大於左側(未處理)。此係未預期之結果，但可能的解釋為腫瘤塊的組成份被發炎細胞吸收，而發纖維變性，且此等腫瘤在右側時原來大小平均值即大於左側。因此探討了腫瘤塊之組織學組成份。此等結果亦支持呼腸病毒對注射過呼腸病毒之對側上未處理腫瘤之大小有全身性影響。

實例 11 其他人類腫瘤對呼腸病毒溶解瘤細胞之敏感性

就上文提出之活體內結果而言，於衍生自其他人類腫瘤之細胞株中探討在鼠類細胞中觀察到之溶解瘤細胞能力。

細胞與病毒

所有細胞株均於含 10% 胎牛血清(FBs)之杜氏改良伊格

五、發明說明 (42)

氏培養基(DMEM)中生長。

此等實驗中採用之呼腸病毒血清型 3 之狄林菌株係根據史密斯 (Smith, R.E. 等人 (1969), Virology, 39:791-800) 於 L 細胞之懸浮培養物中繁殖及純化，但萃取緩衝液中省略不用 β - 氫硫基乙醇 (β -NE)。依麥克瑞 (McRae) 與傑克里克 (Joklik) (M.A. McRae 與 W.K. Joklik (1978), Virology, 89:578-593) 所述，使標記 [^{35} S] 甲硫胺酸之呼腸病毒生長及純化。用於純化呼腸病毒之粒子/PFU 比例典型為 100/1。

呼腸病毒對細胞之細胞病理效應

以呼腸病毒血清型 3 (狄林菌株) 感染融合之單層細胞，感染比例 (MOI) 為每個細胞約 40 個溶菌斑形成單位 (PFU)。感染後 36 小時，為感染呼腸病毒及假感染之細胞照相。

呼腸病毒感染之免疫螢光法分析

用於免疫螢光試驗之細胞係於蓋玻片上生長，並依上述感染呼腸病毒，感染比例 (MOI) 為約 10 PFU/細胞或假感染。在感染後不同時間點，取細胞固定在乙醇/乙酸 (20/1) 混合物中 5 分鐘，然後依序以 75%，50% 及 25% 乙醇洗滌進行再水合，然後以磷酸鹽緩衝食鹽水 (PBS) 洗滌 4 次。經固定及再水合之細胞再接觸初次抗體 (兔子多株抗呼腸病毒 3 型血清，於 PBS 中稀釋 1/100)，於室溫下 2 小時。以 PBS 洗滌 3 次後，細胞再接觸二次抗體 (山羊抗兔子 IgG (全分子)。螢光素異硫氰酸酯共軛物 (FITC)。於含 10% 山羊血清與 0.005% 伊凡士藍 (Evan's Blue) 之 PBS 中稀釋

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（43）

1/100，於室溫下 1 小時。最後，再以 PBS 洗滌經固定及處理之細胞 3 次，再以雙蒸餾水洗滌 1 次，乾燥，架於載玻片上，含在含 0.1% 苯二胺之 90% 甘油中，於加裝蔡司相機 (Carl Zeiss camera) 之蔡司顯微鏡 (Zeiss Axiophot microscope) 觀察 (所有相片之放大倍數均為 200 倍)。

細胞之感染與病毒之定量

於 24 孔板中生長之融合單層細胞經呼腸病毒感染，預估感染比例為 10 PFU/個細胞。於 37 °C 下培養 1 小時後，以溫熱 DMEM-10% FBS 洗滌單層細胞，然後在相同培養基中培養。在感染後不同時間點，直接添加 NP-40 與去氧胆酸鈉之混合物至培養基中已感染之單層細胞上，終濃度分別為 1% 與 0.5%。隨後收集溶胞物，並於 L-929 細胞上進行溶菌斑滴定法，測定病毒收量。

感染呼腸病毒之細胞之放射性標記法及溶胞物之製法

以呼腸病毒 (MOI 約 10 PFU/細胞) 感染融合之單層細胞。在感染後不同時間點，以含 10% 透析過之 PBS 與 0.10 毫居禮/毫升 [³⁵S] 甲硫胺酸之不含甲硫胺酸之 DMEM 置換培養基。再於 37 °C 下培養 1 小時後，於磷酸鹽緩衝食鹽水 (PBS) 中洗滌細胞，於含 1% Triton X-100，0.5% 去氧胆酸鈉及 1 mM EDTA 之相同緩衝液中溶解細胞。然後利用低速離心法去除細胞核，上澄液保存在 -70 °C 下直到使用時為止。

免疫沈澱法與 SDS-PAGE 分析法

依過去曾說明之方法 (P.W.K. 李 (Lee) 等人，(1981)，

五、發明說明（44）

Viology, 108:134-146) 由標記 [^{35}S] 之感染呼腸病毒細胞溶胞物與抗呼腸病毒血清型 3 血清進行免疫沈澱法。根據蘭里之方法 (U.K. Laemmli, (1970), Nature, 227:680-685)，採用不連續式 SDS-PAGE 分析免疫沈澱物。

乳癌

c-erbB-2/neu 基因編碼一種與 EGFR 具高度同質性之穿膜蛋白質，20% 至 30% 乳癌患者會過度表現此蛋白質 (D. 尤 (Yu) 等人，(1996), Oncogene 13:1359)。由於本文中已確立 Ras 活化作用不論係經由點突變或經由增加 Ras 之訊號連串反應元素上游 (包括 c-erbB-2/neu 同系物 EGFR)，最後均為呼腸病毒之複製作用建立一個合適的環境，分析一系列衍生自人類乳癌之細胞株對呼腸病毒之敏感性。該等細胞株包括 MDA-MD-435SD (ATCC 寄存 HTB-129)，MCF-7 (ATCC 寄存 HTB-22)，T-27-D (ATCC 寄存 HTB-133)，BT-20 (ATCC 寄存 HTB-19)，HBL-100 (ATCC 寄存 HTB-124)，MDA-MB-468 (ATCC 寄存 HTB-132) 及 SKBR-3 (ATCC 寄存 HTB-30)。

根據細胞病理效應之誘發作用，及依上述，以放射活性代謝標記法及免疫螢光法測定之病毒蛋白質合成作用，發現七株試驗乳癌細胞中有五株可以感染呼腸病毒：MDA-MB-435S，MCF-7，T-27-D，MDA MB-468 及 SKBR-3 對感染之敏感度極高，而 BT-20 與 HBL-100 則證實沒有感染力。

五、發明說明 (45)

腦神經膠質母細胞瘤

其次探討衍生自人類腦部神經膠質母細胞瘤之多種細胞株。細胞株包括 A-172 , U-118 , U-178 , U-563 , U-251 , U-87 及 U-373 。(此等細胞為卡加利大學 Dr. Wee Yong 之慷慨贈與)。

7 株神經膠質母細胞株中有五株證明對呼腸病毒感染具敏感性，包括 U-118 , U-178 , U-563 , U-251 , U-87 及 U-373 , 而 A-172 則未展現任何感染力，此係由呼腸病毒蛋白質之細胞病理效應，免疫螢光法及 [^{35}S] 甲硫胺酸標記法來測定。

進一步探討 U-87 神經膠質母細胞瘤細胞株。為了分析 U-87 細胞對呼腸病毒之敏感性，使 U-87 細胞(得自卡加利大學 Dr. Wee Yong)生長至 80% 融合度，然後接受感染比例 (MOI) 為 10 之呼腸病毒挑戰。在 48 小時內，出現戲劇性之普遍分佈之細胞病理效應(未出示數據)。為了進一步證明此等細胞之溶胞作用係由呼腸病毒之複製作用造成，在感染後 3 小時內不同時間點，以 [^{35}S] 甲硫胺酸進行脈衝標記細胞，依上述，利用十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳法 (SDS-PAGE) 分析蛋白質。結果(未出示數據)清楚地證明感染後 24 小時，此等細胞進行有效之呼腸病毒複製，並封閉了宿主蛋白質合成。

亦以人類腫瘤異種移植物形式引進 U-87 細胞至 10 隻 SCID 小白鼠之後腹中。U-87 細胞依上述，於含 10% 胎牛血清之杜氏改良伊格氏培養基中生長。收集細胞，洗滌，

五、發明說明 (46)

再懸浮於無菌 PBS 中；取含於 100 微升中之 2.0×10^6 個細胞經皮下注射至 5 至 8 週大雄性 SCID 小白鼠(加拿大查理士李佛公司)後腹部位置。每週測量腫瘤生長 2 次，共 4 週。示於圖 3 之結果證明以 1.0×10^7 PFU 之活呼腸病毒在腫瘤內注射一次處理 U-87 腫瘤(空心圓， $n=5$)時，與在腫瘤內注射一次同量 UV- 去活性呼腸病毒處理腫瘤(實心圓， $n=5$)時比較，前者大幅抑制腫瘤生長，包括在處理後第 4 週出現腫瘤退化之現象($P=0.008$)。

依文獻所述(H. 李昂(Lyon), Cell Biology, 實驗室手冊, J.E. 希里斯(Celis)編輯, 學院出版社(Academic Press), 1994, p. 232), 為經活性病毒處理之腫瘤剩餘之微灶點進行蘇木紫/伊紅(HE)染色, 顯示剩餘之腫瘤塊大多由正常基質組成, 有活力之腫瘤細胞數量不多, 亦無任何證據證實腫瘤細胞滲濾至下面之結構肌肉中(未出示數據)。腫瘤細胞之壞死歸因於病毒直接溶解細胞, 此機轉與試管內呼腸病毒殺死細胞之機轉相同。

為了判斷是否有病毒擴散至腫瘤塊以外, 依上述採用直接針對總呼腸病毒蛋白質之抗體, 於腫瘤與相鄰組織之石蠟切片上進行免疫螢顯微鏡觀察, 已發現呼腸病毒專一性蛋白質侷限在腫瘤塊; 下面的骨骼肌未檢測到病毒染色(未出示數據)。如所預期者, 注射過 UV 去活性病毒之腫瘤中未出現病毒蛋白質(未出示數據)。這些結果證明, 呼腸病毒在此等動物中之複製作用具高度腫瘤專一性, 僅在 U-87 目標細胞中進行病毒擴增。

五、發明說明（47）

由於大多數腫瘤為高度血管化，因此有些病毒可以在受感染之腫瘤細胞溶解後進入血流中。為了判斷病毒是否擴散到全身，可自處理組及對照組動物收集血液，進行一系列稀釋，供隨後滴定溶菌斑。發現傳染性病毒在血液中之濃度為 1×10^5 PFUs/毫升（未出示數據）。

病毒之高度腫瘤專一性配合全身性散播，表示呼腸病毒可以受初感染之病毒遙控，於神經膠質母細胞瘤中複製，如上述乳癌細胞所證明者。為了證明此假設。在 SCID 小白鼠兩側各後腹上面植入 U-87 人類腫瘤異種移植物。使此等腫瘤長至 0.5×0.5 公分。在處理組動物 (n=5) 之左側腫瘤注入單一劑量 (1×10^7 pfu) 呼腸病毒；對照組動物 (n=7) 則接受 UV- 去活性病毒假處理。每週 2 次再測量腫瘤，共 4 週。

示於圖 4 之結果證明只有活呼腸病毒處理組動物（空心圓與空心方形）之經處理/注射腫瘤塊（圓形）與未處理腫瘤塊（方形）二者均受到抑制，最後則退化，去活性呼腸病毒處理組動物（實心圓與方形）之結果則相反。隨後之免疫螢光分析法顯示呼腸病毒蛋白質出現在同側腫瘤（處理組）及對側腫瘤（未處理組）中，表示呼腸病毒溶解瘤細胞之作用結果使未處理一側腫瘤退化（未出示數據）。

胰癌瘤

探討衍生自胰癌之細胞株對感染呼腸病毒之敏感性。此等細胞株包括 Capan-1 (ATCC 寄存 HTB-79)，BxPC3 (ATCC 寄存 CLR-1687)，MIAPACA-2 (ATCC 寄存 CRL-

五、發明說明（48）

1420)，PANC-1（ATCC 寄存 CRL-1469），AsPC-1（ATCC 寄存 CRL-1682）與 Hs766T（ATCC 寄存 HTB-134）。

此六株細胞株中，有五株證明對感染呼腸病毒具有敏感性，包括 Capan-1、MIAPACA-2、PANC-1、AsPC-1 及 Hs766T，而 BxPC3 證明感染力低，其係由病毒誘發之細胞病理效應，免疫螢光法及 [³⁵S] 標記法測得。值得注意的是，五株經證明對呼腸病毒溶解瘤細胞之作用具有敏感性之細胞株中，有四株已於 K-ras 基因之字碼子 12 中展現轉形突變（Capan-1、MIAPACA-2、PANC-1 與 AsPC-1），而其中一種缺乏此敏感性之細胞株（BxPC3）則沒有這種突變（G. 貝洛普（Berrozpe）等人（1994），Int. J. Cancer, 58:185-191）。對 Hs766T 細胞株而言，其他 K-ras 字碼子之狀態目前仍未知。

實例 12 在免疫活性動物中，以呼腸病毒作為瘤細胞溶解劑之用法

發展一種同基因小白鼠模式來探討呼腸病毒在免疫活性動物中而不在上述 SCID 小白鼠中之用途。在 C3H 小白鼠（查理士李佛公司）皮下植入 1.0×10^6 PFUs ras-轉形 C3H 細胞（卡加利大學 D. 艾德華（Edwards）贈與）。建立腫瘤後，以活呼腸病毒（ 1.0×10^8 PFUs）或 UV-去活性呼腸病毒進行一系列腫瘤內注射，處理小白鼠。第一個系列之後（9 天內注射 6 次），每隔一天使試驗動物接受稀釋之呼腸病毒（ 1.0×10^7 PFUs）處理。假處理之動物則接受等量 UV-去活性病毒。

五、發明說明 (49)

圖 5 證明呼腸病毒在此等免疫活性動物中為有效之瘤細胞溶解劑。所有試驗動物之腫瘤均消退；9 隻試驗動物中有 5 隻在 22 天後腫瘤完全消退，此時間點為對照組動物超過可接受之腫瘤負擔之時間。此外，接受呼腸病毒處理之動物中沒有可判別之副作用。

為了分析先前接觸過腫瘤對抑制及消退腫瘤之影響，使試驗組半數動物在建立腫瘤之前，先接受呼腸病毒挑戰（肌肉注射 1.0×10^8 PFUs，3 型狄林菌株）。挑戰後 2 週，所有接觸過之動物均可檢測到中和抗體。建立腫瘤後，依上述，以活的或 UV 去活性之呼腸病毒進行一系列腫瘤內注射。

圖 6 證明對呼腸病毒具有循環之中和抗體之動物（亦即在建立腫瘤之前先接受呼腸病毒挑戰）展現之腫瘤抑制與消退情形類似未先接觸過呼腸病毒之動物。因此，呼腸病毒即使在已事先接觸過呼腸病毒之免疫活性動物中，亦為一種有效之瘤細胞溶解劑。

雖然本發明已參考其較佳具體實施例特別展示及說明，相關技藝專家咸了解，可在不偏離附錄之申請專利範圍所界定之本發明精神與內涵下對其形式及詳細內容進行各種改變。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

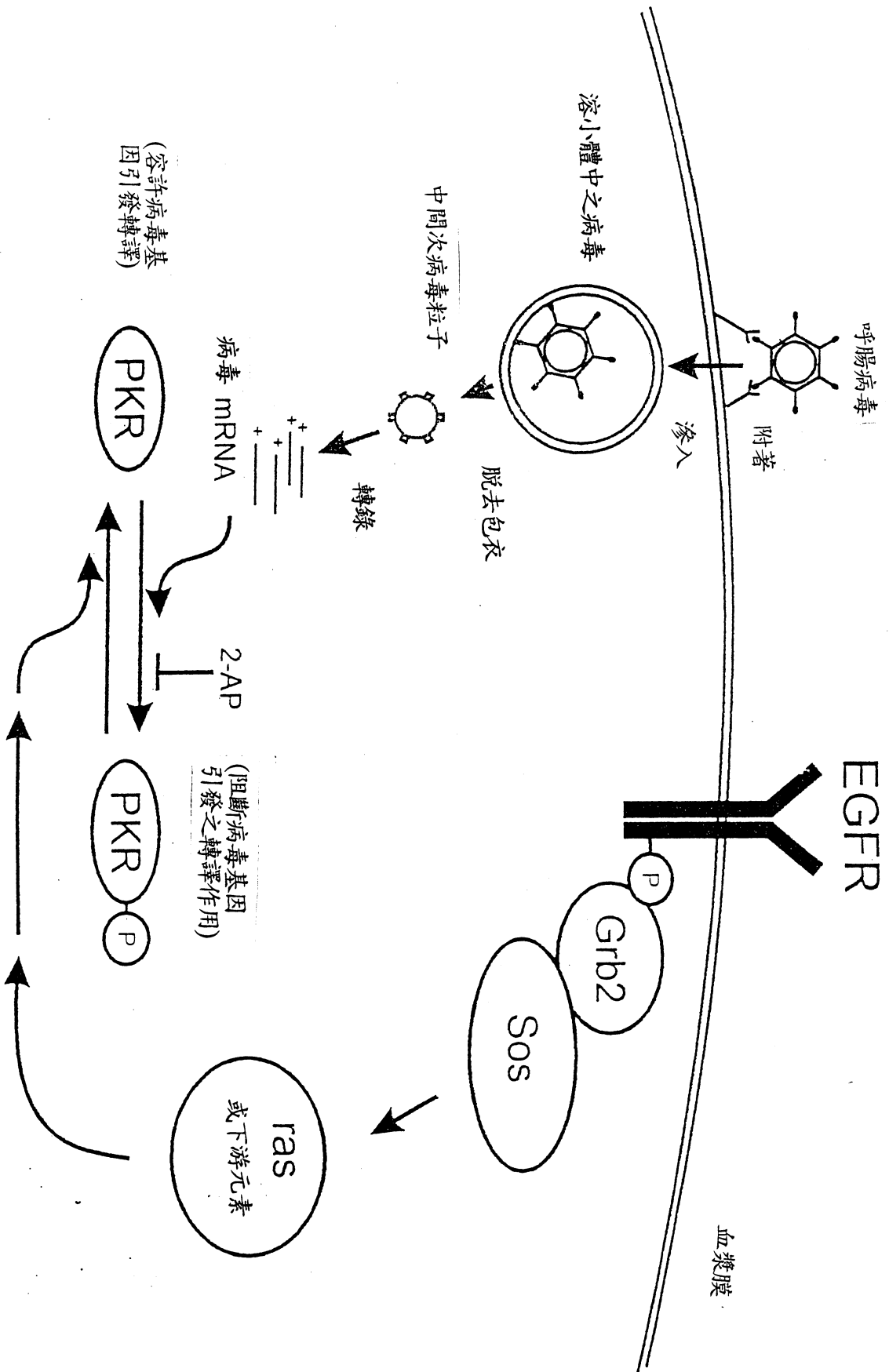


圖 1

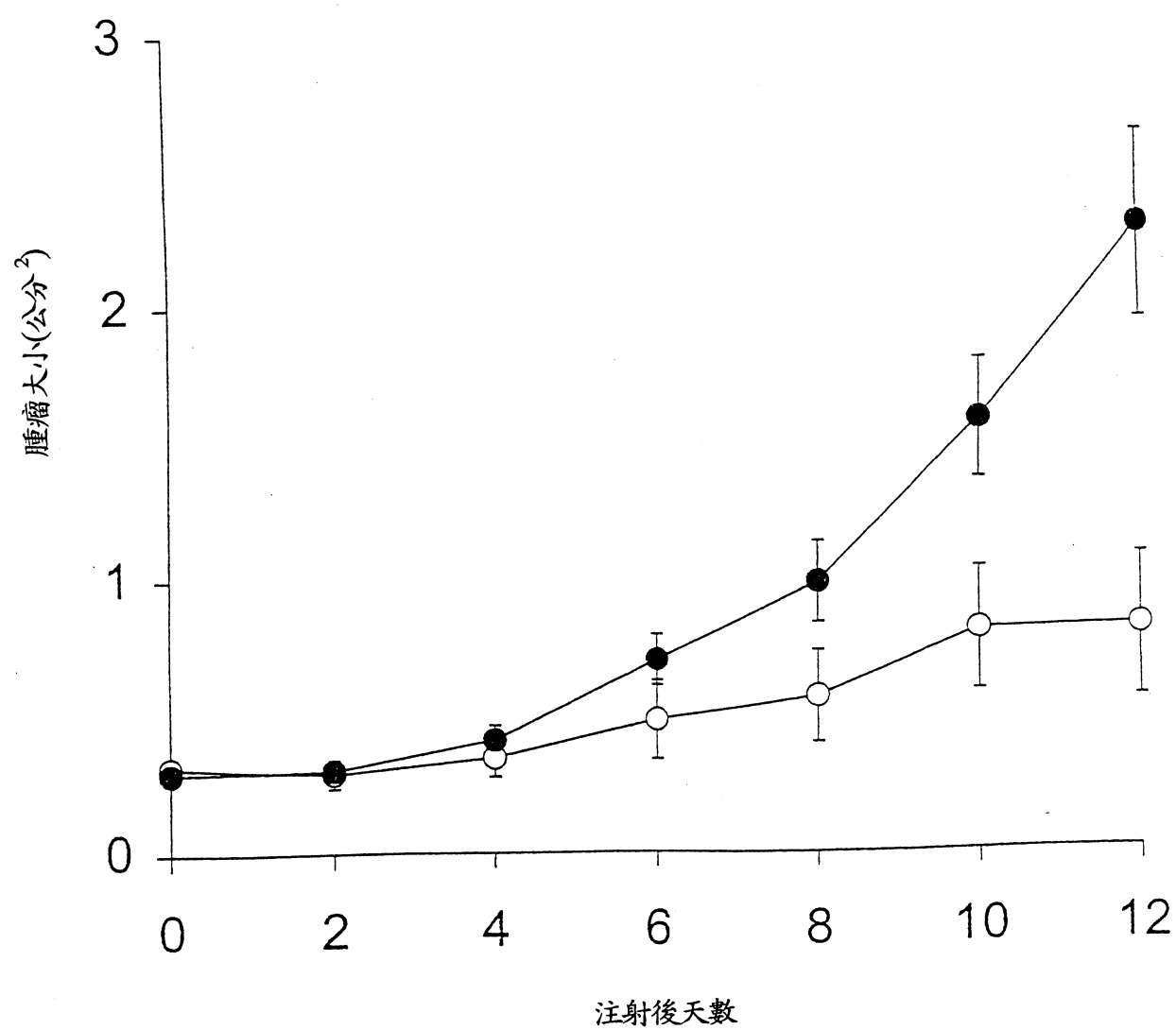


圖 2

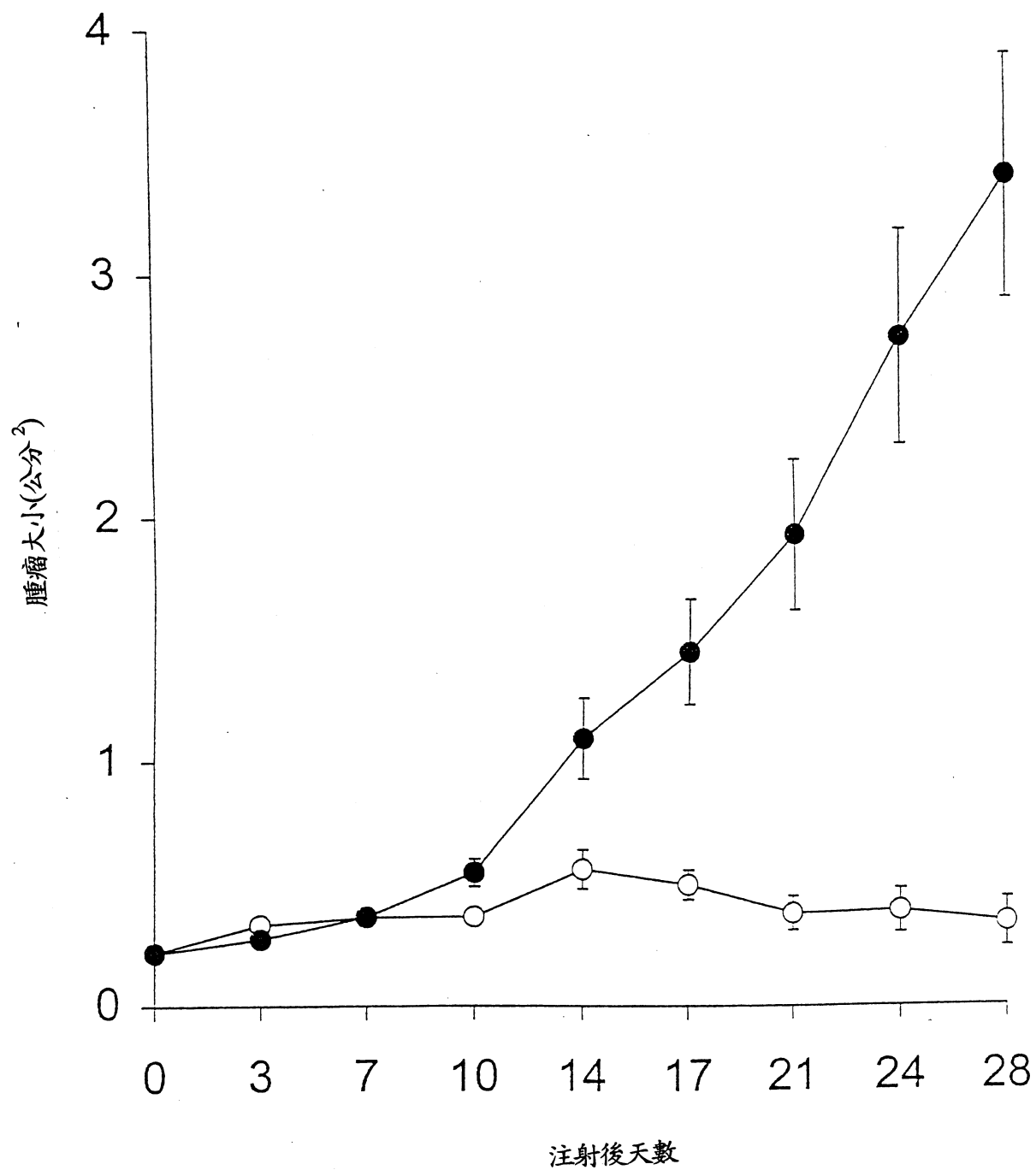


圖 3

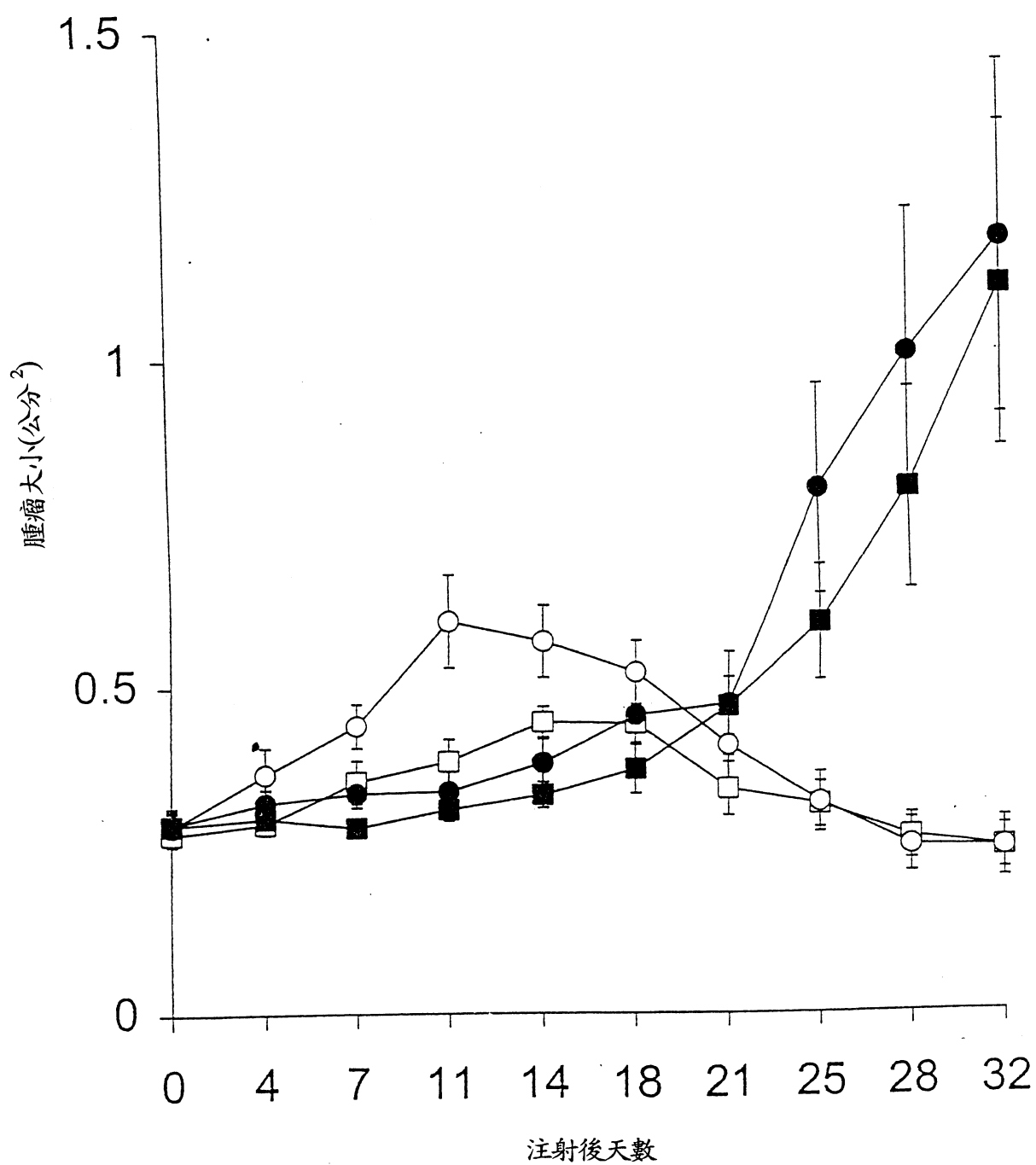


圖 4

呼腸病毒對具有免疫系統小白鼠
體內生長之小白鼠腫瘤之影響

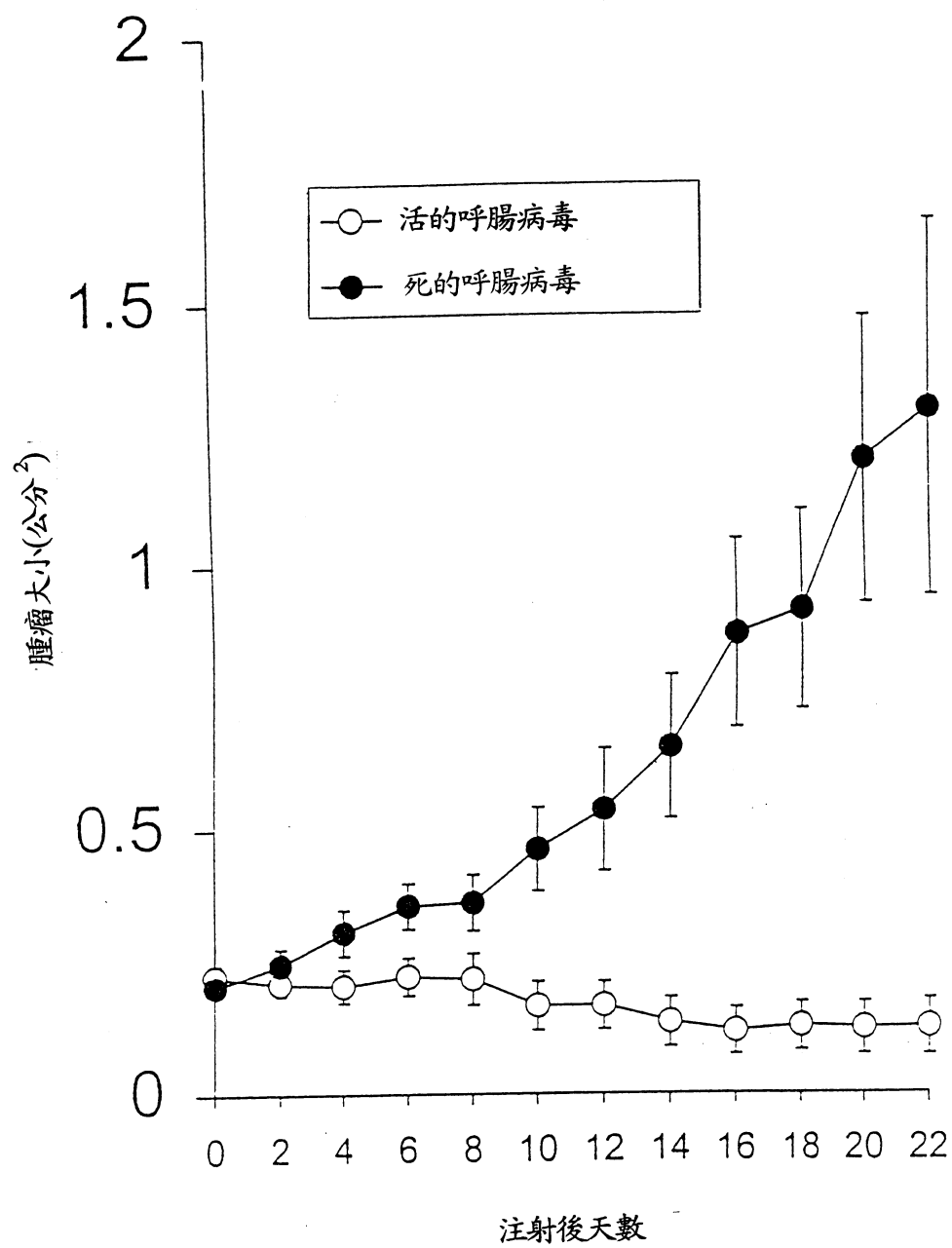
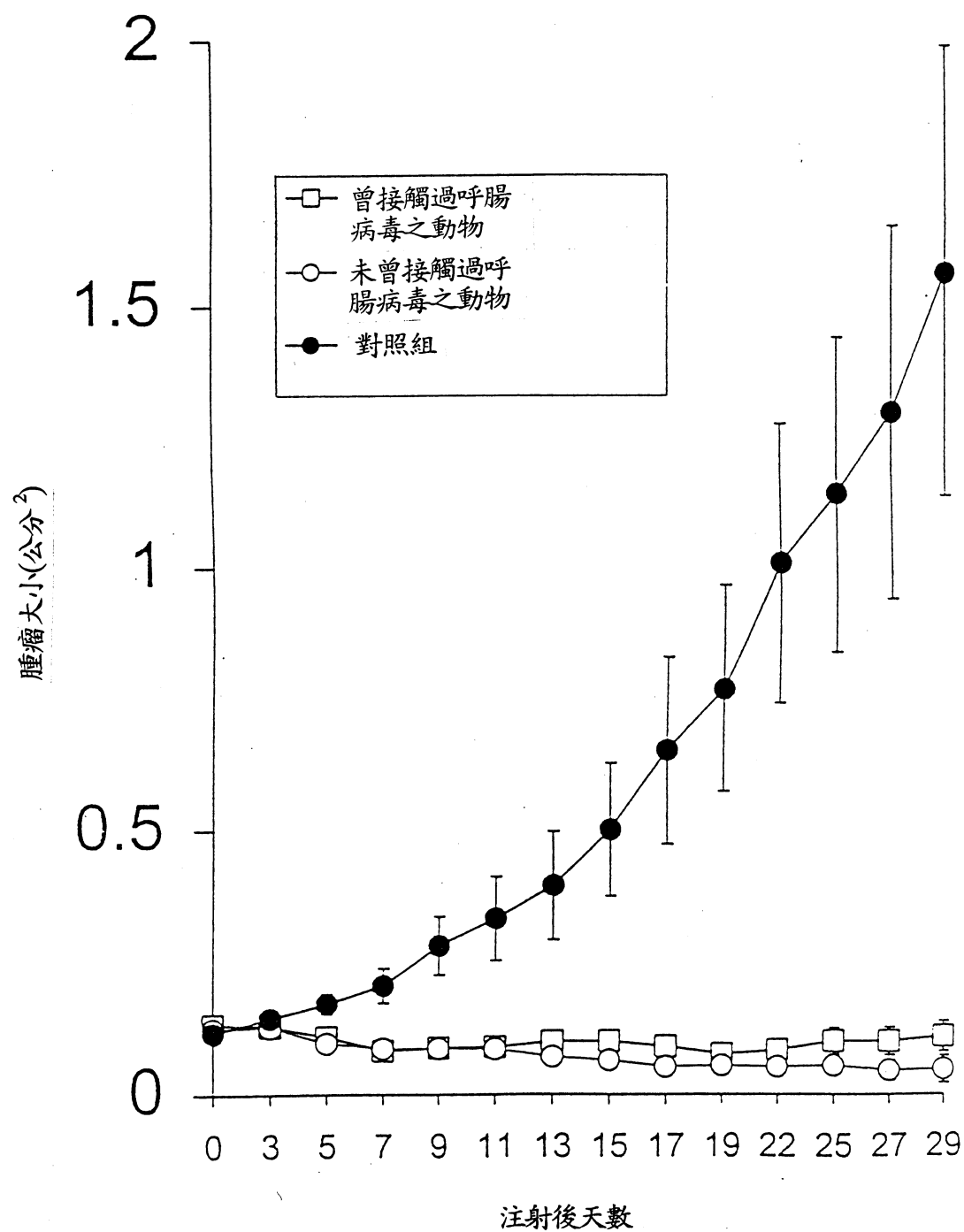


圖 5

呼腸病毒對具有免疫系統之小白鼠體內生長之小白鼠腫瘤之影響



公告本

I290467

96年3月3日修(×)正替換頁

申請日期	089104716
案 號	89.3.15
類 別	A61K35/76, A61P35/00

A4
C4

中文說明書替換頁(96年3月)

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	治療ras所調節之增生疾病之醫藥組合物
	英 文	"PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF RAS-MEDIATED PROLIFERATIVE DISORDERS"
二、發明人	姓 名	1. 派翠克 W.K. 李 2. 詹姆士 史東 3. 麥修 C. 考費
	國 籍	均加拿大
	住、居所	1. 加拿大亞伯特區克葛瑞市溫墨西北街22號 2. 加拿大亞伯特區克葛瑞市奈畢路5071號 3. 加拿大亞伯特區克葛瑞市第13西南街408 1111號
三、申請人	姓 名 (名稱)	加拿大商昂克里斯生物科技公司
	國 籍	加拿大
	住、居所 (事務所)	加拿大亞伯特區克葛瑞市坎辛頓路1211號301
	代 表 人 姓 名	馬修 C. 考費

62683-960313.DOC

- 1 -

四、中文發明摘要(發明之名稱: 治療ras所調節之增生疾病之醫藥組合物)

本發明係有關一種治療增生疾病之方法，其係對受Ras調節之增生疾病投與呼腸病毒。投與之呼腸病毒最後會直接接觸ras所調節之增生細胞。增生疾病包括(但不限於)：贅瘤。可使用人類呼腸病毒、非人類哺乳動物呼腸病毒，及/或禽類呼腸病毒。若呼腸病毒為人類呼腸病毒時，可使用血清型1(例如：蘭恩菌株(strain Lang))，血清型2(例如：強斯菌株(strain Jones))，血清型3(例如：狄林菌株(strain Dearing)或阿伯尼菌株(strain Abney))，及呼腸病毒之其他血清型或菌株。可組合使用一種以上呼腸病毒型態及/或菌株，因為菌株可能來自不同動物品種。其可治療固體贅瘤或造血性贅瘤。

英文發明摘要(發明之名稱: "PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF RAS-MEDIATED PROLIFERATIVE DISORDERS")

Methods for treating proliferative disorders, by administering reovirus to a Ras-mediated proliferative disorder, are disclosed. The reovirus is administered so that it ultimately directly contacts ras-mediated proliferating cells. Proliferative disorders include but are not limited to neoplasms. Human reovirus, non-human mammalian reovirus, and/or avian reovirus can be used. If the reovirus is human reovirus, serotype 1 (e.g., strain Lang), serotype 2 (e.g., strain Jones), serotype 3 (e.g., strain Dearing or strain Abney), as well as other serotypes or strains of reovirus can be used. Combinations of more than one type and/or strain of reovirus can be used, as can reovirus from different species of animal. Either solid neoplasms or hematopoietic neoplasms can be treated.

96年7月10日修(×)正本

六、申請專利範圍

1. 一種用於抑制哺乳動物之 ras 所調節增生疾病之醫藥組合物，其包括呼腸病毒及醫藥上可接受之賦形劑，其中該呼腸病毒為經過重組的或具免疫保護反應的呼腸病毒。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該經過重組的呼腸病毒係來自二種或多種之呼腸病毒株。
3. 根據申請專利範圍第 2 項之醫藥組合物，其中該二種或多種之呼腸病毒株係選自狄林株 (strain Dearing)、阿伯尼株 (strain Abney)、強斯株 (strain Jones) 及蘭恩 (strain Lang) 所組成之群。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該經過重組的呼腸病毒係以不同呼腸病毒亞型共同感染哺乳動物細胞而產生。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該經過重組的呼腸病毒係由選自血清型 1 呼腸病毒、血清型 2 呼腸病毒及血清型 3 呼腸病毒所組成之群之呼腸病毒之重新組合而產生。
6. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該經過重組的呼腸病毒包括天然發生之變異體包衣蛋白質編碼序列。
7. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該經過重組的呼腸病毒包括突變的包衣蛋白質編碼序列。
8. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該經過重組的呼腸病毒係天然發生。
9. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該經過重

六、申請專利範圍

組的呼腸病毒係非天然發生。

10. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該經過具免疫保護反應的呼腸病毒係包覆在微脂粒或膠束中之呼腸病毒。
11. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該 ras 所調節增生疾病為贅瘤。
12. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該 ras 所調節增生疾病為神經纖維瘤病變。
13. 根據申請專利範圍第 11 項之醫藥組合物，其中該贅瘤為固體贅瘤。
14. 根據申請專利範圍第 11 項之醫藥組合物，其中該贅瘤為選自肺癌、攝護腺癌、結腸直腸癌、甲狀腺癌、腎癌、腎上腺癌、肝癌、胰癌、乳癌及中樞與周邊神經系統癌症所組成之群。
15. 根據申請專利範圍第 11 項之醫藥組合物，其中該贅瘤為中樞神經系統癌症。
16. 根據申請專利範圍第 11 項之醫藥組合物，其中該贅瘤為乳癌。
17. 根據申請專利範圍第 11 項之醫藥組合物，其中該贅瘤為造血性贅瘤。
18. 根據申請專利範圍第 11 項之醫藥組合物，其中該贅瘤為轉移性。
19. 根據申請專利範圍第 13 項之醫藥組合物，其係經注射而投至該固體贅瘤中或附近。
20. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其係經選自血

六、申請專利範圍

管內、椎管內、靜脈內、肌肉內、皮下、腹膜內、局部、口服、直腸、陰道、鼻部及腫瘤內所組成之群之途徑投藥。

21. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其包括一種以上之呼腸病毒。
22. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該哺乳動物係選自狗、貓、綿羊、山羊、牛、馬、豬、人類及非人類靈長類所組成之群。
23. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該哺乳動物為人類。
24. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中係投與約 1 至 10^{15} 個溶菌斑形成單位之呼腸病毒/公斤體重。
25. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其係以單一劑量投藥。
26. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其係以一個以上劑量投藥。
27. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其係與化學療法、放射療法及/或手術一起投藥。
28. 根據申請專利範圍第 27 項之醫藥組合物，其中該用於化學療法之化療劑係選自 5-氟尿嘧啶、絲裂黴素 C、胺甲喋呤、羥基脲、環磷醯胺、大卡巴吡(dacarbazine)、米特散(mitoxantrone)、蒽環型藥、赫希普丁(herceptin)、伊普賽(etoposide)、普拿松(pregnasome)、卡布拉丁(carboplatin)、希布拉丁(cisplatin)、紅豆杉素(taxanes)、塔希芬(tamoxifen)

六、申請專利範圍

及干擾素所組成之群。

29. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其係與至少一種選自抗-抗呼腸病毒抗體及免疫抑制醫藥品所組成之群之成分一起投藥。
30. 一種呼腸病毒用於製備抑制哺乳動物之 ras 所調節增生疾病之藥物之用途，其中該藥物係與抑制該哺乳動物之免疫能力之藥劑一起投與 ras 所調節增生細胞以造成該增生細胞溶解，其中該呼腸病毒為經過重組的或具免疫保護反應的呼腸病毒。
31. 根據申請專利範圍第 30 項之用途，其中該藥劑係免疫抑制醫藥品。
32. 根據申請專利範圍第 30 項之用途，其中該藥劑係抗-抗呼腸病毒抗體。