



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202024326 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：108124789

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 12 日

(51)Int. Cl.：

*C12N15/28 (2006.01)**C12Q1/70 (2006.01)**A61K35/15 (2015.01)**A61K35/28 (2015.01)**A61K35/768 (2015.01)**C12N7/00 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2018/07/13 美國

62/697,581

(71)申請人：美國亞利桑那州立大學亞利桑那州評議委員會 (美國) ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF ARIZONA STATE UNIVERSITY (US)
美國

(72)發明人：麥可法登 葛蘭 MCFADDEN, GRANT (US)；克里斯蒂 約翰 CHRISTIE, JOHN (US)；布萊門 喬瑟夫 BLATTMAN, JOSEPH (US)；萊門 默漢 瑪斯目德 RAHMAN, MOHAMMED MASMUDUR (US)；維拉 南西 洋尼 VILLA, NANCY YANETH (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：49 項 圖式數：15 共 67 頁

(54)名稱

以表現 TNF 之黏液瘤(MYXOMA)病毒治療癌症之方法

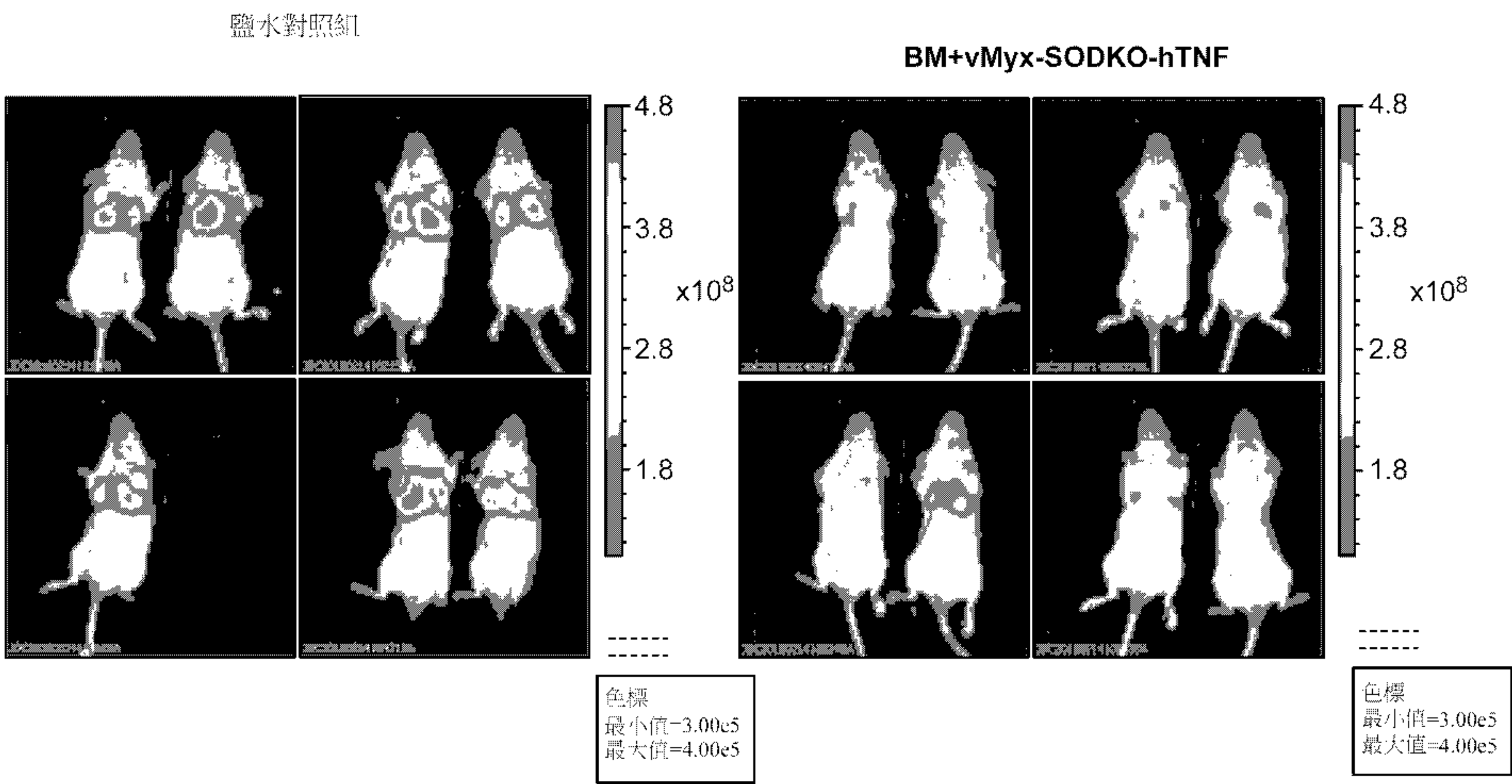
(57)摘要

在某些實施例中，本文揭示一種使用表現 TNF 之黏液瘤病毒抑制或治療癌症之方法。本文亦揭示使用以表現 TNF 之黏液瘤病毒處理之單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞抑制或治療癌症之方法。一些態樣係關於與一或多種本文所描述之方法一起使用的經改造之黏液瘤病毒及醫藥組合物。

Disclosed herein, in certain embodiments, is a method of inhibiting or treating a cancer with use of a TNF expressing myxoma virus. Also disclosed herein are methods of inhibiting or treating a cancer with use of a mononuclear peripheral blood cells and/or a bone marrow cells treated with a TNF-expressing myxoma virus. Some aspects relate to engineered myxoma virus and pharmaceutical compositions for use with one or more of the methods described herein.

指定代表圖：

vMyx-SODKO-hTNF動物在接種後2週具有明顯較小之腫瘤



【圖3】



202024326

【發明摘要】

【中文發明名稱】

以表現TNF之黏液瘤(MYXOMA)病毒治療癌症之方法

【英文發明名稱】

METHODS OF TREATING CANCER WITH TNF EXPRESSING
MYXOMA VIRUS

【中文】

在某些實施例中，本文揭示一種使用表現TNF之黏液瘤病毒抑制或治療癌症之方法。本文亦揭示使用以表現TNF之黏液瘤病毒處理之單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞抑制或治療癌症之方法。一些態樣係關於與一或多種本文所描述之方法一起使用的經改造之黏液瘤病毒及醫藥組合物。

【英文】

Disclosed herein, in certain embodiments, is a method of inhibiting or treating a cancer with use of a TNF expressing myxoma virus. Also disclosed herein are methods of inhibiting or treating a cancer with use of a mononuclear peripheral blood cells and/or a bone marrow cells treated with a TNF-expressing myxoma virus. Some aspects relate to engineered myxoma virus and pharmaceutical compositions for use with one or more of the methods described herein.

【指定代表圖】

圖3

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

以表現TNF之黏液瘤(MYXOMA)病毒治療癌症之方法

【英文發明名稱】

METHODS OF TREATING CANCER WITH TNF EXPRESSING
MYXOMA VIRUS

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 當前用於治療各種類型之癌症的治療方法傾向於藉由毒化或殺死癌細胞起作用。不幸地，對癌細胞有毒之治療方法通常亦傾向於對健康細胞有毒。此外，腫瘤之非均質性為仍然難以實現有效治療癌症之主要原因之一。諸如化學療法及放射線療法之當前主流療法傾向於在狹窄的治療毒性窗口內使用。將此等類型之療法視為具有有限適用性之鈍工具，此係由於腫瘤細胞之類型不同及可投與此等治療方法之窗口有限。

【發明內容】

【0002】 在某些實施例中，本文揭示使用經改造以表現TNF蛋白之黏液瘤病毒(MYXV)抑制或治療癌症之方法。在一些實施例中，本文亦描述一種使用以表現TNF之黏液瘤病毒處理之單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞抑制或治療癌症之方法。在額外實施例中，本文所描述之包含與一或多種本文所描述之方法一起使用的經改造之黏液瘤病毒及醫藥組合物。

【0003】 在某些實施例中，本文揭示一種經改造以表現腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF)蛋白之黏液瘤病毒(myxoma virus, MYXV)，其中該MYXV包含在一或多種與免疫細胞向性相關聯之基因處或

附近之修飾。在一些實施例中，TNF蛋白為TNF α 蛋白。在一些實施例中，TNF蛋白為表面TNF蛋白。在一些實施例中，TNF蛋白為可溶TNF蛋白。在一些實施例中，TNF蛋白為人類TNF蛋白。在一些實施例中，一或多種與兔細胞向性相關聯之基因包含M11L、M063、M135R、M136R、M-T2、M-T4、M-T5或M-T7。在一些實施例中，MYXV包含M135R基因之部分缺失或完全缺失。在一些實施例中，MYXV包含損害M135R基因之功能的M135R基因之修飾。在一些實施例中，TNF蛋白代替MYXV基因組內之M135R基因。在一些實施例中，將TNF蛋白插入MYXV基因組內之M135R基因與M136R基因之間。在一些實施例中，MYXV進一步包含螢光蛋白。在一些實施例中，MYXV為洛桑(*Lausanne*)病毒株。在一些實施例中，MYXV為vMyx-M135KO-hTNF。在一些實施例中，MYXV為vMyx-hTNF-M135-136。

【0004】 在某些實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包含本文所描述之黏液瘤病毒及醫藥學上可接受之賦形劑。在一些實施例中，醫藥組合物經調配以用於全身投與。在一些實施例中，醫藥組合物經調配以用於局部投與。在一些實施例中，醫藥組合物經調配以用於非經腸投與。

【0005】 在某些實施例中，本文揭示一種組合物，其包含藉由經改造以表現腫瘤壞死因子(TNF)蛋白之黏液瘤病毒(MYXV)離體處理之末梢血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、骨髓(bone marrow, BM)細胞或其組合。在一些實施例中，MYXV為本文所描述之黏液瘤病毒。在一些實施例中，MYXV為vMYX-SODKO-hTNF。在一些實施例中，PBMC、BM細胞或其組合包含自體細胞。在一些實施例中，PBMC、BM細胞或其組合獲自異源供體。

【0006】 在某些實施例中，本文揭示一種抑制或治療有需要個體之癌症的方法，其包含向該個體投與經改造以表現腫瘤壞死因子(TNF)蛋白之黏液瘤病毒(MYXV)。在一些實施例中，MYXV為本文所描述之黏液瘤病毒。在一些實施例中，MYXV為vMYX-SODKO-hTNF。在一些實施例中，癌症為實體腫瘤。在一些實施例中，癌症已轉移至個體中之第二位置。在一些實施例中，第二位置包含個體之肺、腦、肝臟及/或淋巴結。在一些實施例中，癌症包含骨肉瘤、三陰性乳癌或黑色素瘤。在一些實施例中，該方法進一步包含向個體投與額外治療劑。在一些實施例中，額外治療劑為免疫檢查點調節劑。在一些實施例中，在投與MYXV或組合物之前向個體投與額外治療劑。在一些實施例中，在投與MYXV或組合物之後向個體投與額外治療劑。在一些實施例中，額外治療劑以與MYXV或組合物之組合形式向個體投與。在一些實施例中，個體為人類。在一些實施例中，該方法進一步包含選擇患有或疑似患有癌症之個體。在一些實施例中，黏液瘤病毒能夠感染具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞。在一些實施例中，具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞包含癌細胞。在一些實施例中，感染黏液瘤病毒之細胞表現TNF。

【0007】 在某些實施例中，本文揭示一種抑制或治療有需要之個體之癌症的方法，其包含向該個體投與本文所描述之組合物。在一些實施例中，該方法進一步包含將黏液瘤病毒離體吸附至PBMC、BM細胞或其組合之表面上。在一些實施例中，將黏液瘤病毒吸附至PBMC、BM細胞或其組合之表面上包含在允許黏液瘤病毒結合至PBMC、BM細胞或其組合之表面的條件下，將PBMC、BM細胞或其組合暴露於黏液瘤病毒。在一些實施例中，條件包含約4℃至約37℃之溫度。在一些實施例中，條件包

含約20℃至約37℃、約20℃至約28℃、約24℃至約26℃、約30℃至約37℃或約35℃至約37℃之溫度。在一些實施例中，條件包含至少5分鐘、10分鐘、15分鐘、20分鐘、30分鐘、1小時、1.5小時、2小時、3小時、4小時、6小時、8小時、10小時、12小時或更長之培育時間。在一些實施例中，PBMC、BM細胞或其組合獲自個體或HLA相關供體。在一些實施例中，經病毒吸附之PBMC、BM細胞或其組合係全身性地向該個體投與。在一些實施例中，癌症為實體腫瘤。在一些實施例中，癌症已轉移至個體中之第二位置。在一些實施例中，第二位置包含個體之肺、腦、肝臟及/或淋巴結。在一些實施例中，癌症包含骨肉瘤、三陰性乳癌或黑色素瘤。在一些實施例中，該方法進一步包含向個體投與額外治療劑。在一些實施例中，額外治療劑為免疫檢查點調節劑。在一些實施例中，在投與MYXV或組合物之前向個體投與額外治療劑。在一些實施例中，在投與MYXV或組合物之後向個體投與額外治療劑。在一些實施例中，額外治療劑以與MYXV或組合物之組合形式向個體投與。在一些實施例中，個體為人類。在一些實施例中，該方法進一步包含選擇患有或疑似患有癌症之個體。在一些實施例中，黏液瘤病毒能夠感染具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞。在一些實施例中，具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞包含癌細胞。在一些實施例中，感染黏液瘤病毒之細胞表現TNF。

【0008】 在某些實施例中，本文揭示一種套組，其包含本文所描述之黏液瘤病毒、本文所描述之醫藥組合物或本文所描述之組合物。

【圖式簡單說明】

【0009】 本發明之某些實施例之新穎特徵在隨附申請專利範圍中細緻闡述。將參考闡述利用本發明原理之說明性實施例及其附圖的以下詳細

描述來獲得對本發明之特徵及優勢的更好理解：

【0010】 圖1顯示vMyx-SODKO-hTNF插入質體之基因圖譜及病毒建構之概述。此質體用於在用vMyx-LacZ病毒感染之前轉染RK-13細胞以便建構vMyx-SODKO-hTNF病毒。

【0011】 圖2A及圖2B顯示兩種例示性不同的經改造之MYXV的基因圖譜。圖2A顯示vMyx-135KO-hTNF插入質體之基因圖譜及重組型黏液瘤病毒之基因圖譜的概述。注意此病毒具有病毒M135R基因之基因剔除。圖2B顯示vMyx-hTNF-(M135-136)插入質體之基因圖譜及建構此重組型黏液瘤病毒之概述。注意此病毒具有野生型MYXV主鏈，因為TNF轉殖基因插入於病毒M135R與M136R基因之間的基因間基因座，且因此不具有基因剔除。各質體用於轉染RK-13細胞，隨後經親本野生型vMyx-LacZ感染以分別建構vMyx-M135KO-hTNF (圖2A)及vMyx-hTNF-(M135-136) (圖2B) 病毒。

【0012】 圖3為在K7M2-Luc腫瘤接種後2週的Balb/c小鼠之一組圖像。未經處理之動物在肺中顯示晚期腫瘤(左)，而經vMyx-SODKO-hTNF處理之動物顯示顯著較小腫瘤(右)。動物在第0天接種 2×10^6 個K7M2-luc細胞，且在處理之前用 4×10^6 個已感染vMyx-SODKO-hTNF之離體BM處理一小時。隨後用螢光素IP注射第2週之動物且使用IVIS成像系統成像。計算所有動物之腫瘤發光並標準化。

【0013】 圖4為顯示負載有表現hTNF之黏液瘤病毒(MYXV)之骨髓與其他MYXV構築體相比具有優良溶瘤能力的圖。卡本-麥爾(Kaplan-Meier)存活率曲線顯示與對照組相比，vMyx-SODKO-hTNF為經測試以顯著增加平均存活率的唯一MYXV構築體。動物在第0天接種 2×10^6 個

K7M2-luc細胞，且在處理之前用已感染各自MYXV構築體之離體骨髓處理一小時。隨後監測動物之疾病進展直至滿足安樂死標準。在接種後第8週，對所有存活動物實施安樂死。

【0014】 圖5為間隔2週採集之兩組影像，顯示未經處理之對照組(左影像)與用vMyx-SODKO-hTNF病毒處理之動物(右影像)之間的腫瘤進展差異。動物在第0天用 2×10^6 個K7M2-luc細胞接種且在處理之前用 4×10^6 個已感染vMyx-SODKO-hTNF之離體PBMC處理一小時。接著在第3週及第5週用螢光素IP注射動物且使用IVIS成像系統成像。計算所有動物之腫瘤發光且標準化。

【0015】 圖6為顯示經離體vMyx-SODKO-hTNF負載之PBMC劑量反應存活期之圖。用逐漸增加劑量之Balb/c PBMC負載vMyx-SODKO-hTNF處理之Balb/c小鼠存活顯著長於未經處理之對照組。動物在第0天接種 2×10^6 個K7M2-luc細胞，且在處理之前用已感染各自MYXV構築體的離體PBMC處理一小時。隨後監測動物之疾病進展直至滿足安樂死標準。

【0016】 圖7為一組流動式細胞測量術資料，其顯示感染vMyx-SODKO-hTNF之細胞在細胞表面(灰色及綠色) 48 hpi下表現hTNF，而對照組細胞對於hTNF為陰性的(粉紅色及紫色)。細胞以實驗方式經vMyx-SODKO-hTNF感染48小時。在48 hpi細胞使用非酶解離緩衝液提昇且計數。細胞隨後使用小鼠抗人類hTNF PE結合抗體染色且使用流式細胞儀分析。

【0017】 圖8為具有SYTOX橙(SYTOX orange)之細胞死亡分析之一組圖，確認相比於不表現hTNF之對照vMyx-M135KO病毒，來自vMyx-SODKO-hTNF之TNF表現不引起K7M2-luc骨肉瘤細胞株中之細胞死亡增

加。細胞以實驗方式感染vMyx-M135KO病毒或vMyx-SODKO-hTNF病毒，或用TNF處理。隨後使細胞在感染之後及處理後培育24及48小時。隨後細胞用SYTOX橙染色且計數螢光細胞之百分比。亦針對各時間點及處理計數各孔中之平均細胞數目。

【0018】 圖9說明使用流動式細胞測量術定量感染人類AML (THP1) 細胞之細胞死亡。藉由在具有活/死(Live/Dead)染色之細胞上閘控，自如所定義之為APC/Cy7⁺之細胞群體測定MYXV介導之總THP1細胞殺死。使用霍爾姆-西達克(Holm-Sidak)的t測試測定顯著性(* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)用於多重比較。結果顯示用vMyx-SODKO-hTNF-GFP感染THP-1細胞在感染後兩個時間(24及48小時)在3種所測試之感染倍率(MOI=10、1或0.1)下引起閘控型死亡細胞之數目的總體增加。

【0019】 圖10說明使用流動式細胞測量術定量經病毒感染之人類AML (THP1)細胞之MYXV介導之正中目標殺死。自為APC/Cy7⁺之細胞的比例測定THP1細胞之MYXV介導之「正中目標」殺死，自為GFP-陽性之病毒感染細胞群體閘控。使用霍爾姆-西達克的t測試測定顯著性(* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)用於多重比較。

【0020】 圖11說明使用流動式細胞測量術定量未感染人類AML (THP1)細胞之MYXV誘導之偏離目標殺死。自為APC/Cy7⁺之細胞的比例測定THP1細胞之MYXV介導之偏離目標殺死，自為GFP-陰性之細胞群體閘控。使用霍爾姆-西達克的t測試測定顯著性(* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)用於多重比較。

【0021】 圖12說明使用流動式細胞測量術定量感染之人類多發性骨髓瘤(U266)細胞之細胞死亡。自為APC/Cy7⁺之細胞群體測定MYXV介導

之總U266殺死。使用霍爾姆-西達克的t測試測定顯著性(* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)用於多重比較。

【0022】 圖13顯示經由離體負載之同基因型鼠骨髓白血球遞送之vMyx-SODKO-hTNF之測試，以消除免疫活性小鼠中預接種之鼠多發性骨髓瘤。圖13A顯示使用移植到C57/B1小鼠中之抗硼替佐米(bortezomib) VK*12598骨髓瘤細胞(其中其大部分遷移至骨髓及脾)之活體內資料。在癌症植入後100天產生存活率曲線(圖13B)。圖13C對應於存活率百分比。

【0023】 圖14顯示在具有SMAC模擬或免疫檢查點抑制劑之BM白血球上離體預負載vMyx-hTNF-(M135-M136)之組合療法。組合療法用SMAC模擬化合物LCL161 (50 mg/Kg)或檢查點抑制劑單株抗體(mAb) α -muPD-1，與經由離體預負載型自體鼠骨髓白血球遞送之vMyx-hTNF-(M135-M136)結合進行測試(圖14A)。圖14B顯示包括存活率曲線之活體內資料。圖14C描述存活率百分比。

【0024】 圖15顯示自vMyx-hTNF-(M135-136)感染之人類細胞之人類TNF蛋白表現及部分分泌。

【實施方式】

【0025】

交叉引用

本申請案主張2018年7月13日申請的美國臨時申請案第62/697,581號的權益，該申請案以引用的方式併入本文中。

【0026】

關於聯邦贊助之研究之申明

本發明在政府支持下在由美國國家衛生研究院(National Institutes of

Health)授予的P50 CA186781下進行。政府在本發明中具有某些權利。

【0027】 某些術語

【0028】 除非另外指出，否則根據習知用途使用技術術語。分子生物學中常見術語之定義可見於Benjamin Lewin, Genes V，由牛津大學出版社出版，1994 (ISBN 0-19-854287-9)；Kendrew等人(編)，The Encyclopedia of Molecular Biology，由Blackwell Science Ltd.出版，1994 (ISBN 0-632-02182-9)；及Robert A. Meyers (編)，Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference，由VCR Publishers, Inc.出版，1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

【0029】 除非另外解釋，否則本文中所用的所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域的一般技術者通常所理解相同的含義。儘管類似或等效於本文所述者之方法及材料可用於本發明的實施或測試，但下文描述適合之方法及材料。另外，本文所述之材料、方法及實例僅為說明性的且並不欲作為限制。

【0030】 本說明書中提及「一些實施例」、「一實施例」、「一個實施例」或「其他實施例」意謂結合實施例所描述之特定特性、結構或特徵包括於本發明之至少一些實施例中但不一定包括於所有實施例中。

【0031】 本文中所用之部分標題僅出於組織目的而不應理解為限制所述主題。

【0032】 提供術語及方法之以下解釋以更好地描述本發明化合物、組合物及方法，以及在本發明之實踐中指導一般技術者。亦應瞭解，本發明中所用之術語僅出於描述特定實施例及實例之優點之目的且並不意欲為限制性的。

【0033】如本文中所使用，除非上下文另外清楚地指示，否則單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該」意欲亦包括複數形式。

【0034】如本文所使用，範圍及量可表示為「約」特定值或範圍。約亦包括準確量。因此，「約5 μ L」意謂「約5 μ L」及亦「5 μ L」。一般而言，術語「約」包括預期在實驗誤差內的量。

【0035】如本文所用，術語「及/或」係指及涵蓋相關所列項目中之一或多個之任何及所有可能組合，以及當以替代性(「或」)解釋時缺少組合。

【0036】如本文所使用，「一或多個」或至少一個可意謂一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個或十個以上直至任何數目。

【0037】如本文所使用，術語「包含」意謂「包括」。因此，「包含A或B」意謂包括A、B或A及B。

【0038】「有效量」或「治療有效量」係指足以產生所需效果之本發明之化合物或組合物之量，該效果可為治療性及/或有益效果。有效量將隨以下而變化：個體之年齡、一般病症、所治療病症之嚴重程度、所投與之特定藥劑、治療持續時間、任何同時治療之性質、所用醫藥學上可接受之載劑及在熟習此項技術者之知識及專門知識內之類似因素。適當時，在任何個別情況下之有效量或治療有效量可由一般技術者參考相關文本及文獻及/或藉由使用常規實驗來確定。(參見例如Remington, The Science and Practice of Pharmacy (最新版本))。

【0039】如本文所用，術語「個體」及「患者」在本文中可互換使用且係指人類及非人類動物兩者。本發明之術語「非人類動物」包括所有

脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、綿羊、犬、貓、馬、牛、啮齒動物(例如小鼠、大鼠等)及其類似物。較佳地，個體為人類患者。在特定實施例中，本發明之個體為人類個體。

【0040】 如本文所使用之術語「細胞」包括單個細胞以及複數個細胞或細胞群體。投與藥劑或使藥劑暴露於細胞包括活體外及活體內投與。

【0041】 「有需要之個體(subject in need thereof)」或「有需要之個體(a subject in need of)」為已知患有或疑似患有癌症(諸如實體腫瘤)之個體。

【0042】 如本文所使用，術語「癌症」係指已經歷具有分化損失、生長速率增加、侵襲周圍組織之特徵退行發育且能夠進行癌轉移之惡性贅瘤。

【0043】 殘餘癌症為在向個體提供之任何治療形式之後留存於個體中以減少或根除癌症之癌症。轉移性癌症係在身體中之一或多個部位(例如，除產生轉移性癌症之原始(原發性)癌症之起源部位以外的第二部位)處之癌症。局部復發為與原始癌症處於或接近相同部位(諸如在相同組織中)之癌症的復發。

【0044】 諸如肉瘤及癌瘤之實體癌症之實例包括纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、骨肉瘤、骨原性肉瘤及其他肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、結腸癌、淋巴惡性病、胰臟癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝細胞癌、鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、髓性癌、支氣管癌、腎細胞癌、肝癌、膽管癌、絨毛膜癌、威爾姆斯瘤(Wilms'tumor)、子宮頸癌、睪丸腫瘤、膀胱癌及

CNS腫瘤(諸如神經膠質瘤、星形細胞瘤、神經管母細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果腺瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、黑色素瘤、神經母細胞瘤及視網膜母細胞瘤)。

【0045】 血液癌之實例包括骨髓瘤、淋巴瘤及白血病。在一些情況下，例示性血液癌包括B細胞或T細胞血液癌。在一些情況下，例示性血液癌包括霍奇金氏(Hodgkin's)淋巴瘤或非霍奇金氏淋巴瘤。

【0046】 如本文所使用，術語「化學治療劑」係指在治療特徵為異常細胞生長之疾病中具有治療有效性之任何化學劑。此類疾病包括腫瘤、贅瘤及癌症，以及特徵為諸如牛皮癬之增生性生長的疾病。在一個實施例中，化學治療劑為用於治療癌症之藥劑，諸如抗贅生劑。在一個實施例中，化學治療劑為放射性化合物。熟習此項技術者可容易地鑑別所使用的化學治療劑(參見例如Slapak及Kufe, *Principles of Cancer Therapy*, *Harrison's Principles of Internal Medicine*第86章, 第14版；Perry等人, *Chemotherapy, Abeloff, Clinical Oncology*第17章第2版, 2000 Churchill Livingstone, Inc；Baltzer及Berkery. (編): *Oncology Pocket Guide to Chemotherapy*, 第2版. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995；Fischer Knobf及Durivage (編): *The Cancer Chemotherapy Handbook*, 第4版. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993。組合化學療法為投與一種以上治療劑來治療癌症。諸如表現TNF之黏液瘤病毒及一或多種其他化學治療劑，其可同時投與或按任何次序適時地分開投與。

【0047】 如本文所用，術語「抑制或治療疾病」，諸如癌症，係指抑制疾病或病症之完全發展。「治療」係指改善疾病或病理性病症之病徵或症狀在其開始發展之後的治療性干預。關於疾病或病理性病症之術語

「改善」係指治療之任何可觀測的有益效果。可例如藉由易感個體之臨床症狀之發作延遲、疾病之一些或所有臨床症狀之嚴重程度降低、疾病(諸如癌轉移)之進展較慢、個體之整體健康或幸福改善或藉由特定疾病所特有之此項技術中所熟知之其他參數證明有益效果。「預防性」治療為出於降低產生病變，例如轉移性癌症的風險的目的，向未展現疾病的病徵或僅展現疾病的早期病徵的個體投與治療。

【0048】如本文所用，適用於與本文所揭示之治療化合物結合之「醫藥學上可接受之載劑」為習知的。*Remington's Pharmaceutical Sciences*，由E. W. Martin創作，Mack Publishing Co., Easton, Pa., 第19版(1995)描述適合於醫藥上遞送之治療劑之組合物及調配物。

【0049】一般而言，載劑之性質將視採用之特定投與模式而定。舉例而言，非經腸調配物通常包含包括醫藥學上及生理學上可接受之流體的可注射流體，諸如水、生理鹽水、平衡鹽溶液、葡萄糖水溶液、甘油或其類似物作為媒劑。對於固體組合物(例如散劑、丸劑、錠劑或膠囊形式)，習知無毒固體載劑可包括例如醫藥級之甘露醇、乳糖、澱粉或硬脂酸鎂。除生物學中性載劑以外，待投與之醫藥組合物可含有少量無毒輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑及pH緩衝劑及其類似物，例如乙酸鈉或脫水山梨醇單月桂酸酯。

【0050】如本文所使用，術語「醫藥」及「治療劑」係指當向個體或細胞適當投與時能夠誘發所需治療或預防效果之化合物或組合物。

【0051】如本文所用，術語「腫瘤」係指贅瘤形成產物，其為由過量細胞分裂造成之組織的異常生長。侵襲周圍組織及/或可轉移之腫瘤稱為「惡性的」。贅瘤形成為增生性病徵之一個實例。

【0052】如本文所使用之術語「可複製」係指能夠在特定宿主細胞內感染及複製之病毒。

介紹

【0053】轉移至肺及其他器官之癌症表示基本及臨床癌症研究中之主要挑戰。迄今治療肺癌轉移之能力一直具有挑戰性，其中諸如骨肉瘤、黑色素瘤及乳癌之癌症在當前療法中的5年存活率皆低於25%。當前治療範例為典型放射性療法、化學療法及靶向療法之混合，但不存在一種對所有腫瘤有效之治療。曾經被吹捧為癌症治療之潛在性「魔法子彈(magic bullet)」的一種療法為腫瘤壞死因子(TNF)。自從威廉科萊(William Coley)在一個多世紀前首次發現以及幾十年後的分子特性以來，TNF已被證明是一種誘人但費解的抗癌試劑和免疫調節劑。其在遠側單獨之腫瘤中局部治療中及作為全身治療之用途的研究中已揭露嚴重之毒性及低抗腫瘤反應率。實際上，一些研究亦發現全身投與單獨TNF甚至會促進某些癌症中之腫瘤生長。

【0054】TNF (亦稱為TNF α 、惡病質或惡病質素)為細胞介素，其為發炎免疫反應之整體部分(Coley, WB. 2015 The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. Am. J. Med. Sci. 105, 487-511 (1893))。其主要表現為細胞表面免疫配位體，但當在表現催化裂解及釋放可溶配位體之轉化酶之細胞，例如骨髓群系之細胞中表現時，TNF可以可溶細胞介素形式分泌。一種已記錄之TNF效應路徑為經由TNF受體-1 (TNFR1)路徑誘導細胞死亡，引起細胞凋亡或壞死性凋亡，其視特定目標細胞內之下游作用而定(Moriwaki K, Bertin J, Gough P, Orlowski G, Chan FK. 2016.

Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell death & disease* 6:e1636)。TNF亦為先天性及適應性免疫反應的活化劑，例如藉由激活抗腫瘤CD8⁺ T細胞及NK細胞發揮作用。(Kashii, Y, Giorda, R, Herberman, R. B., Whiteside, T. L. Vujanovic, N. L. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J. Immunol.* 163, 5358-5366 ; Prevost-Blondel, A, Roth, E., Rosenthal, F. Pircher, H. 2000 Crucial role of TNF- α in CD8 cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J. Immunol.* 164, 3645-3651)。最初認為TNF為潛在抗腫瘤神奇藥物。儘管在小鼠中全身注射TNF的初步實驗似乎支持此一樂觀觀點，但自實驗室以至臨床之轉變顯示TNF不僅為免疫系統之活化劑，而且其也會引起利用可溶配位體全身性治療之患者中之嚴重全身性毒性。研究亦顯示，此全身性TNF治療未在患者中誘發已在鼠模型中觀測到的可匹敵的抗腫瘤效果(Balkwill, F. Tumor necrosis factor and cancer. 2009 *Nature Reviews Cancer* 9, 361)。

【0055】溶瘤病毒療法已作為可行治療策略再度崛起(Russell SJ, Peng K-W, Bell JC. 2012. Oncolytic virotherapy. *Nature biotechnology* 30:658-670)。儘管採用溶瘤病毒療法以治療癌症之想法追溯到一個多世紀前，但僅在過去的二十年，其才變成治療難以用標準療法治療之人類腫瘤的逐漸更可行之方式(Kelly E, Russell SJ. 2007. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Molecular Therapy* 15:651-659)。

【0056】溶瘤病毒為針對其選擇性感染及殺死經轉型癌細胞之能力，以及藉由其不僅針對病毒而且針對腫瘤抗原的活化宿主免疫系統之能力而設計及/或選擇的哺乳動物病毒(Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. 2014. Going viral with cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 14:559-567)。黏液瘤病毒(MYXV)為家族痘病毒科及野兔痘病毒屬之成員(Chan WM, Rahman MM, McFadden G. 2013. Oncolytic Myxoma virus: the path to clinic. *Vaccine* 31:4252-4258; Chan WM, McFadden G. 2014. Oncolytic poxviruses. *Annual review of virology* 1:191-214)。在本質上，MYXV為兔特異性且不引起人類或小鼠之感染或疾病。然而，由於與癌發生相關聯之癌症路徑突變之性質，因此大多數(若非所有)來自小鼠及人類之癌細胞總是失去其抵抗許多病毒(包括MYXV)感染之先天性能力的要素(Chan WM, McFadden G. 2014. Oncolytic poxviruses. *Annual review of virology* 1:191-214; Sypula J, Wang F, Ma Y, Bell J, McFadden G. 2004. Myxoma virus tropism in human tumor cells. *Gene Ther Mol Biol* 8:103-114)。在此系統中生物學之另一特徵為大型及基因穩定之痘病毒基因組，其允許用多種治療性轉殖基因進行基因操作(Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced biomedical research* 1)。如本文所揭示，視情況去除調節不同形式之免疫調節及/或細胞死亡的MYXV基因，且引入治療性抗癌轉殖基因以誘導增加免疫原性及/或誘導較佳之癌細胞死亡形式。

經改造之黏液瘤病毒及使用方法

【0057】在某些實施例中，本文所揭示者包含編碼外源性TNF蛋白

之經改造之黏液瘤病毒。在一些情況下，黏液瘤病毒包含在一或多種與兔細胞向性相關聯之基因處或附近之修飾。在一些情況下，一或多種與兔細胞向性相關聯之基因包含M11L、M063、M135R、M136R、M-T2、M-T4、M-T5或M-T7。在一些情況下，一或多種與兔細胞向性相關聯之基因包含M135R、M136R或其組合。

【0058】 在一些情況下，本文所揭示者包含經改造以表現TNF蛋白之經改造之黏液瘤病毒(MYXV)，其中該MYXV包含M135R基因之修飾。在一些情況下，修飾為損害由M135R基因編碼之蛋白質之功能的缺失。在一些情況下，修飾為M135R基因之部分缺失(例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%缺失)。在其他情況下，修飾為M135R基因之完全缺失。在額外情況下，修飾為用TNF蛋白替代M135R基因。在其他情況下，經改造之MYXV為vMyx-M135KO-hTNF。在其他情況下，經改造之MYXV為如圖2A中所示之vMyx-M135KO-hTNF。

【0059】 在一些情況下，本文所揭示者包含經改造以表現TNF蛋白的經改造之黏液瘤病毒(MYXV)，其中該TNF蛋白插入於MYXV基因組內之M135R基因與M136R基因之間。在一些情況下，經改造之MYXV為vMyx-hTNF-M135-136。在一些情況下，經改造之MYXV為如圖2B中所示之vMyx-hTNF-M135-136。

【0060】 在一些情況下，TNF蛋白包含如UniProtKB-P01375中所示之序列的至少90%、95%、96%、97%、98%或99%，諸如95%與98%之間、95%與99%之間，包括90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性或包含如UniProtKB-P01375中所示之

序列，其在2019年7月3日(條目版本247)公佈，且以引用的方式併入本文中。在一些情況下，TNF蛋白為可溶TNF，其包含UniProtKB-P01375之殘基77-233的至少90%、95%、96%、97%、98%或99%，諸如95%與98%、95%與99%之間，包括90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性。在一些情況下，可溶TNF包含UniProtKB-P01375之殘基77-233。

【0061】 在一些情況下，包含TNF蛋白之經改造之MYXV進一步包含螢光蛋白。例示性螢光蛋白包括藍色/UV蛋白，諸如TagBFP、Azurite、Sirius或Sapphire；青色蛋白，諸如ECFP、cerulean或mTurquoise；綠色蛋白，諸如綠色螢光蛋白(GFP)、Emerald、mUKG、mWasabi或Clover；黃色蛋白，諸如EYFP、citrine、venus或SYFP2；橙色蛋白，諸如單體Kusabira-Orange、mKO2或mOrange；紅色蛋白，諸如mRaspberrym mCherry、mStrawberry、mTangerine、tdTomato、mApple或mRuby；光可活化蛋白，諸如PA-GFP、PAmCherry1或PATagRFP；及光可轉換蛋白，諸如Dropna。

【0062】 在某些實施例中，本文亦描述一種癌症治療方法，其使用與溶瘤黏液瘤病毒(MYXV)組合之誘導TNF表現(例如，跨膜TNF蛋白或可溶TNF蛋白)。如上文所論述，所分泌之TNF已顯示為抗腫瘤分子，但由於其較小的治療窗口及嚴重副作用而無法全身使用。此外，溶瘤MYXV已顯示為對多種腫瘤類型具有寬趨向性之腫瘤特異性抗腫瘤劑。在一些情況下，本文揭示經修飾以例如在病毒感染腫瘤細胞表面，亦即經感染細胞表面上；或以分泌形式表現hTNF之MYXV。為達成本文所揭示之效果，溶瘤MYXV可經改造以自重組型MYXV構築體表現人類TNF (一般稱為

vMyx-hTNF)作為免疫配位體，該免疫配位體在強病毒特異性啟動子下在經病毒感染之細胞中表現。基於MYXV之TNF表現之優點為配位體僅在經病毒感染之腫瘤組織中表現，且表現量為消除在可溶TNF配位體之全身性遞送中所觀測到之嚴重副作用的低量。

【0063】 在一些情況下，黏液瘤病毒基因組容易使用熟習此項技術者已知且描述於例如Sambrook等人((2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbour Laboratory Press)中之標準分子生物學技術修飾以表現一或多種治療性轉殖基因。熟習此項技術者將能夠容易確定黏液瘤病毒基因組中之哪些部分可缺失，使得病毒仍能夠生產性感染，例如以提供可複製病毒。舉例而言，自所公佈之病毒基因組序列與其他充分表徵病毒之基因組的比較可推論可缺失之病毒基因組之非必需區域(參見例如，C. Cameron, S. Hota-Mitchell, L. Chen, J. Barrett, J.-X. Cao, C. Macaulay, D. Willer, D. Evans, and G. McFadden, *Virology* (1999) 264: 298-318))。因此，本發明之態樣涉及一種用於抑制及/或治療有需要之個體之癌症的方法。在某些實施例中，該方法包括向諸如人類個體之個體投與表現腫瘤壞死因子(TNF) (例如跨膜TNF蛋白或可溶TNF蛋白)之MYXV，藉此治療及/或抑制有需要之個體之癌症。在某些實施例中，MYXV包含vMyx-M135KO-hTNF。在某些實施例中，MYXV包含vMyx-hTNF-M135-136。在某些實施例中，MYXV包含vMYX-SODKO-hTNF。在某些實施例中，個體為人類個體。在某些實施例中，該方法進一步包括選擇患有或疑似患有癌症之個體，諸如人類個體。在某些實施例中，全身性投與MYXV。在某些實施例中，在腫瘤及/或癌轉移部位投與MYXV。已顯示MYXV感染具有缺陷型先天性抗病毒

反應之細胞。如本文所使用，具有「缺陷型先天性抗病毒反應」係指當暴露於病毒時或當病毒侵襲時細胞不誘導抗病毒防禦機制，其包括抑制病毒複製、產生干擾素、誘導干擾素反應路徑及細胞凋亡。該術語包括諸如癌細胞之細胞，其在暴露於病毒或感染病毒後與正常細胞，例如未感染細胞或非癌細胞相比具有減少或缺陷型先天性抗病毒反應。此包括對干擾素無反應之細胞及具有減少或缺陷型細胞凋亡反應或誘導細胞凋亡路徑之細胞。該缺陷可由各種原因引起，包括感染、遺傳缺陷或環境應力。然而，應理解，當缺陷由預先存在之感染引起時，可不包括MYXV之重複感染且熟習此項技術者可容易地識別該等情況。熟習此項技術者可在無過度實驗之情況下容易地確定任何既定細胞類型是否具有缺陷型先天性抗病毒反應且因此經MYXV感染。因此，在該方法之某些實施例中，MYXV能夠感染具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞。在一個實施例中，細胞對干擾素無反應。在特定實施例中，細胞為哺乳動物癌細胞。在一個實施例中，細胞為包括人類實體腫瘤細胞之人類癌細胞。

【0064】 MYXV可為屬於可複製之痘病毒之野兔痘病毒物種的任何病毒。MYXV可為MYXV之野生型病毒株或其可為MYXV之經遺傳修飾之病毒株。在一些情況下，MYXV為洛桑(*Lausanne*) 病毒株。在一些情況下，MYXV為在南美森林兔(*Sylvilagus brasiliensis*)中循環之南美MYXV病毒株。在一些情況下，MYXV為在叢毛棉尾兔(*Sylvilagus bachmani*)中循環之加州MYXV病毒株。在一些情況下，MYXV為6918，一種減毒西班牙域病毒株，其包含基因M009L、M036L、M135R及M148R (Genbank寄存編號EU552530，其以引用之方式併入本文中，如GenBank在2019年7月11日所提供)之修飾。在一些情況下，MYXV為

6918VP60-T2 (GenBank寄存編號EU552531，其以引用的方式併入本文中，如GenBank在2019年7月11日所提供)。在一些情況下，MYXV為稱為標準實驗室病毒株(Standard laboratory Strain，SLS)之病毒株。

【0065】 在一些情況下，MYXV包含與Cameron等人，「The complete DNA sequence of Myxoma Virus,」 Virology 264: 298-318 (1999) (其以全文引用之方式併入本文中)中所揭示之序列之至少90%、95%或99%序列一致性。在一些情況下，MYXV包含在Cameron,等人，「The complete DNA sequence of Myxoma Virus,」 Virology 264: 298-318 (1999)中所揭示之序列。

【0066】 在某些實施例中，具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞包含癌細胞。在某些實施例中，感染MYXV之細胞表現TNF。在一些情況下，TNF在表面上表現。在一些情況下，TNF為可溶TNF。如本文所揭示，針對肺癌轉移所展現之功效結果相關地適用於其他實體癌症，即原發及轉移性兩者。TNF可係癌細胞之強力殺手，以及亦針對腫瘤細胞之先天性及適應性免疫反應之活化劑。基於已知之病毒及TNF之生物學，將此病毒應用於廣泛範圍之腫瘤類型，為治療不同癌症類型提供理想的候選物。癌症可使用此項技術中一般接受之標準來診斷，包括惡性腫瘤之存在。

【0067】 可根據所揭示之方法治療之癌症類型包括(但不限於)實體腫瘤，諸如肉瘤及癌瘤，包括(但不限於)纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、骨肉瘤、骨原性肉瘤及其他肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏肉瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、結腸癌、淋巴惡性病、胰臟癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝細胞癌、鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、髓癌

瘤、支氣管癌、腎細胞癌、肝癌、膽管癌、絨毛膜癌、威爾姆斯瘤、子宮頸癌、睪丸腫瘤、膀胱癌及CNS腫瘤(諸如神經膠質瘤、星形細胞瘤、神經管胚細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果腺瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、黑色素瘤、神經母細胞瘤及視網膜母細胞瘤)。在某些實施例中，癌症為實體腫瘤。在某些實施例中，癌症已轉移至個體中之第二位置。在某些實施例中，第二位置包含個體之肺、腦、肝臟及/或淋巴結。在某些實施例中，癌症包含骨肉瘤、三陰性乳癌或黑色素瘤。

【0068】 在一些實施例中，癌症類型進一步包括血液癌，諸如霍奇金氏淋巴瘤或非霍奇金氏淋巴瘤。

【0069】 當投與至個體時，表現TNF之MYXV (諸如細胞表面表現之TNF)或可溶形式的有效量為病毒緩解、改善、減輕、改進、穩定疾病、預防疾病擴散、減緩或延遲疾病進展或治癒疾病的劑量且持續足夠時間段所需之量，該疾病諸如癌症，例如已轉移至肺、腦、肝臟或任何其他器官之實體腫瘤。舉例而言，其可為足以達成以下效果的量：減少癌細胞或贅生性細胞之數目或破壞該等細胞，或減少慢性感染病毒之細胞的數目或破壞該等細胞，或抑制此類細胞的生長及/或增殖及/或減少癌轉移之數目及/或部位。

【0070】 待向個體投與之有效量可視許多因素而變化，諸如MYXV之藥力學特性、投與模式、個體之年齡、健康狀況及體重、疾病病況之性質及程度、治療頻率及並行治療(若存在)之類型，及病毒之毒性及效價。

【0071】 可視個體之臨床反應而定，以適合量最初投與MYXV，該適合量可視需要進行調整。病毒之有效量可憑經驗確定且視可安全投與之

MYXV的最大量及產生所需結果之病毒的最少量而定。

【0072】 可使用標準投與方法向個體投與MYXV，在一個實施例中，全身性投與病毒。在另一實施例中，病毒藉由在疾病部位注射來投與，在各種實施例中，病毒可經口或非經腸投與，或藉由此項技術中已知之任何標準方法投與。

【0073】 為在全身性投與病毒時產生與經由在疾病部位注射病毒達成之臨床效果相同的臨床效果，可能需要投與顯著較高量之病毒。然而，適當劑量水準應為將達成所需結果之最小量。

【0074】 待投與之病毒濃度將視待投與之特定MYXV病毒株之毒性及所靶向之細胞之性質而變化。在一個實施例中，將小於約 3×10^{10} 個病灶形成單位(focus forming unit, 「ffu」) (亦稱為「感染單位」)之劑量投與人類個體，在各種實施例中，可投與約 10^2 至約 10^9 pfu之間，約 10^2 至約 10^7 pfu之間，約 10^3 至約 10^6 pfu之間或約 10^4 至約 10^5 pfu之間的單次劑量。

【0075】 表現TNF之MYXV (諸如細胞表面表現之TNF或可溶形式)可作為唯一療法投與或可與其他療法(包括化學療法、免疫療法及/或放射療法)組合投與。舉例而言，表現TNF之MYXV可在原發性腫瘤之手術移除之前或之後，或在諸如放射療法或習知化學治療藥物之投與之治療之前、同時或之後投與。

【0076】 在一些實施例中，免疫療法包含免疫調節物。例示性免疫檢查點調節物包括(但不限於) PD-L1抑制劑，諸如來自AstraZeneca之德瓦魯單抗(durvalumab) (Imfinzi)、來自Genentech之阿特珠單抗(atezolizumab) (MPDL3280A)、來自EMD Serono/Pfizer之阿維魯單抗

(avelumab)、來自CytomX Therapeutics之CX-072、來自Novartis Pharmaceuticals之FAZ053、來自3D Medicine/Alphamab之KN035、來自Eli Lilly之LY3300054或來自EMD Serono之M7824 (抗PD-L1/TGFβ trap)；PD-L2抑制劑，諸如GlaxoSmithKline的AMP-224 (Amplimmune) 及rHIgM12B7；PD-1抑制劑，諸如來自Bristol-Myers Squibb之nivolumab (Opdivo)、來自Merck之pembrolizumab (Keytruda)、來自Agenus之AGEN 2034、來自BeiGene之BGB-A317、來自Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals之BI-754091、來自CBT Pharmaceuticals之CBT-501 (genolimzumab)、來自Incyte之INCSHR1210、來自Janssen Research & Development之JNJ-63723283、來自MedImmune之MEDI0680、來自MacroGenics之MGA 012、來自Novartis Pharmaceuticals之PDR001、來自Pfizer之PF-06801591、來自Regeneron Pharmaceuticals/Sanofi之REGN2810 (SAR439684)或來自TESARO之TSR-042；CTLA-4抑制劑，諸如來自Bristol Meyers Squibb之ipilimumab (亦稱作Yervoy®、MDX-010、BMS-734016及MDX-101)、來自Pfizer之tremelimumab (CP-675,206、ticilimumab)或來自Agenus之AGEN 1884；LAG3抑制劑，諸如來自Bristol-Myers Squibb之BMS-986016、來自Novartis Pharmaceuticals之IMP701、來自Novartis Pharmaceuticals之LAG525或來自Regeneron Pharmaceuticals之REGN3767；B7-H3抑制劑，諸如來自MacroGenics之恩布利妥珠單抗(enoblituzumab) (MGA271)；KIR抑制劑，諸如來自Innate Pharma之利麗單抗(Lirilumab) (IPH2101；BMS-986015)；CD137抑制劑，諸如烏瑞蘆單抗(urelumab) (BMS-663513、Bristol-Myers Squibb)、PF-05082566

(抗4-1BB、PF-2566、Pfizer)或XmAb-5592 (Xencor)；PS抑制劑，諸如巴維昔單抗(Bavituximab)；及以下抑制劑，諸如抗體或其片段(例如單株抗體、人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體)、RNAi分子或TIM3、CD52、CD30、CD20、CD33、CD27、OX40、GITR、ICOS、BTLA (CD272)、CD160、2B4、LAIR1、TIGHT、LIGHT、DR3、CD226、CD2或SLAM之小分子。

【0077】 在一些實施例中，表現TNF之MYXV經調配為醫藥組合物中之成分。因此，在另一實施例中，提供一種醫藥組合物，其包含表現TNF之黏液瘤病毒及醫藥學上可接受之賦形劑或稀釋劑。組合物可常規地含有醫藥學上可接受濃度之鹽、緩衝劑、防腐劑及各種相容載劑。

【0078】 醫藥組合物可另外含有額外治療劑，諸如額外抗癌劑。在一個實施例中，組合物包括化學治療劑。舉例而言，化學治療劑可為實質上任何藥劑，其展現針對個體之癌細胞或贅生性細胞之溶瘤效應且不抑制或減少表現TNF之MYXV的腫瘤殺死效應。舉例而言，化學治療劑可為(但不限於)蔥環黴素、烷化劑、烷基磺酸鹽、氮丙啶、乙烯亞胺、甲基亞胺、氮芥子氣、亞硝基脲、抗生素、抗代謝物、葉酸類似物、嘌呤類似物、嘧啶類似物、酶、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、含鉑藥劑或細胞介素。較佳地，化學治療劑為已知對癌性或贅生性之特定細胞類型有效的藥劑。

【0079】 在一些情況下，額外治療劑包含免疫檢查點調節劑，諸如上文所描述之彼等免疫檢查點調節劑。

【0080】 醫藥學上可接受之賦形劑或稀釋劑之比例及標識係藉由所選擇之投與途徑、與活病毒之相容性及標準醫藥實踐來確定。一般而言，

醫藥組合物將用不會顯著損害表現TNF之MYXV之生物特性的組分調配。醫藥組合物可藉由用於製備適合於向個體投與之醫藥學上可接受之組合物的已知方法製備，以使得有效量之一或多種活性物質與醫藥學上可接受之媒劑組合形成混合物。適合的媒劑描述於例如Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1995)中。在此基礎上，組合物包括(但不唯一地)與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、媒劑或稀釋劑結合之表現TNF之MYXV溶液，且含於具有適合pH及與生理學流體等滲透性之緩衝溶液中。

【0081】如熟習此項技術者將理解，醫藥組合物可視所選投與途徑而定以多種形式投與個體。在一些情況下，全身性投與醫藥組合物。在其他情況下，局部投與醫藥組合物。在一些情況下，經口投與醫藥組合物。在額外情況下，非經腸投與醫藥組合物。非經腸投與包括靜脈內、腹膜內、皮下、肌肉內、經上皮、經鼻、肺內、鞘內、經直腸及局部投與模式。可藉由在所選時間段內連續輸注來非經腸投予。

【0082】醫藥組合物可例如與惰性稀釋劑一起或與載劑一起經口投與，或其可封閉於硬殼或軟殼明膠膠囊中，或其可壓縮成錠劑。對於經口治療性投與，可將表現TNF之MYXV與賦形劑合併且以可吸收性錠劑、經腸錠劑、糖衣錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、粉片及其類似形式使用。

【0083】表現TNF之MYXV的溶液可在生理學上適合之緩衝液中製備。在儲存及使用之一般條件下，此等製備含有防腐劑以防止微生物生長，但不會使活病毒失活。熟習此項技術者將知道如何製備適合調配物。用於選擇及製備適合之調配物之習知程序及成分描述於例如Remington's

Pharmaceutical Sciences中及於1999年出版的The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19)中。待使用之醫藥組合物之劑量視待治療之特定病症、病症嚴重程度、個別個體參數(包括年齡、身體狀況、體型及體重)、治療持續時間、並行療法(若存在)之性質、特定投與途徑及在保健從業者之知識及專門知識範圍內之其他類似因素而定。在某些實施例中，可冷凍乾燥治療性病毒以便在室溫下儲存。

【0084】 表現TNF之MYXV或包含表現TNF之MYXV的醫藥組合物亦可封裝為套組，其含有使用表現TNF之黏液瘤病毒以治療癌症之說明。

【0085】 除TNF表現以外，MYXV可經修飾以運載將增強MYXV治療之抗癌效果的任何其他基因。此類基因可為參與觸發細胞凋亡，或為參與靶向受感染細胞之免疫破壞的基因，諸如修復對干擾素之反應缺乏或引起刺激抗體反應之細胞表面標記物，諸如細菌細胞表面抗原之表現的基因。MYXV亦可經修飾以表現參與關閉贅生性或癌細胞增殖及生長之基因，藉此防止細胞分裂。此外，病毒可經修飾以包括治療性基因，諸如參與化學治療劑合成之基因，或其可經修飾以在例如人類細胞之特定物種之細胞中具有增加之複製水準，從特定物種中衍生出待抑制或殺死之細胞。

【0086】 如上文所論述，MYXV能夠選擇性感染具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞，且可用作此類細胞缺陷之指示物。因此，自個體移除之細胞可使用本發明之方法分析先天性抗病毒反應之缺陷。此類判定可指示，當與其他指示物組合時，個體可能罹患特定疾病病況，例如癌症。細胞可使用已知活檢方法自個體(包括人類個體)移除。活檢方法將視待測試之細胞之位置及類型而定。細胞根據已知培養技術培養，且藉由向培養基中添加活MYXV暴露於MYXV。感染倍率(multiplicity of infection，

「MOI」)可使用已知在暴露於MYXV時感染之陽性對照細胞培養物改變以確定既定細胞類型、密度及培養技術之最佳MOI。

【0087】 添加至培養細胞中之MYXV之量可視細胞類型、培養方法及病毒之病毒株而變化。此類參數容易使用常規方法藉由最少測試來測試及調整。

【0088】 可藉由熟習此項技術者已知之各種方法測定MYXV對培養細胞之感染性，包括MYXV引起細胞死亡之能力。其亦可涉及向細胞培養物中添加試劑以完成與病毒表現產物的酶促或化學反應。病毒表現產物可自己插入至MYXV基因組中之報導基因表現。

【0089】 在一個實施例中，MYXV可經修飾以提高偵測感染狀態之簡易性。舉例而言，MYXV可經遺傳修飾以表現可容易地藉由相差顯微法、螢光顯微法或藉由放射成像偵測之標記物。標記物可為可參與比色或放射性標記反應之表現螢光蛋白或表現酶。在另一實施例中，標記物可為中斷或抑制所測試細胞之特定功能之基因產物。

【0090】 MYXV可使用此項技術中已知之標準技術製備。舉例而言，病毒可藉由用待使用之MYXV病毒株感染經培養兔細胞或永生化容許人類或靈長類動物細胞來製備，從而使感染進展，使得病毒在經培養細胞中複製，且可藉由此項技術中已知之用於破壞細胞表面且藉此釋放病毒粒子以供收集之標準方法釋放。在收集後，可藉由感染兔細胞之匯合菌苔且進行溶菌斑檢定法來測定病毒效價(參見Mossman等人(1996) Virology 215:17-30，其以全文引用之方式併入本文中)。

【0091】 進一步揭示一種遞送策略，其中治療性MYXV病毒在輸注(諸如再輸注回)癌症患者中之前首先自骨髓或末梢血液單核細胞，離體吸

附至混合白血球。在此策略中，經用病毒離體預感染之白血球遷移將表現人類TNF之MYXV遞送至轉移性癌症部位。此全身遞送方法有時稱為「離體病毒療法(*ex vivo virotherapy*)」或EVV (亦稱為EV2)，因為病毒在輸注至患者之前首先遞送至分離之白血球。MYXV構築體及此新穎遞送策略已顯示在鼠肺癌轉移模型中顯著降低腫瘤負荷且提高存活率之能力(參見實例1)。如本文所揭示，投與表現細胞表面人類TNF之黏液瘤病毒(MYXV)構築體經由攜有病毒之「載體」細胞有效地將MYXV病毒遞送至轉移性肺病部位。此外，如本文所揭示，本發明者已證實，此表現TNF之病毒(一般表示為vMyx-hTNF)的細胞輔助遞送能夠降低腫瘤負荷且提高患有肺癌轉移之小鼠的存活率(參見實例1)。此等結果證實，表現TNF之MYXV的經細胞介導之遞送提高目標肺癌轉移性腫瘤細胞之直接殺死水準，但(雖然不受理論束縛)充當宿主免疫系統之活化劑，此可導致癌症長期消退。此提供治療已轉移至肺、肝臟、腦、骨骼及/或淋巴結之實體癌症之新穎方法，已證明當前治療難以實現此舉。因此，在某些實施例中，該方法包括向個體投與單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞，其中該等單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞包括表現細胞表面腫瘤壞死因子(TNF)之MYXV，藉此治療及/或抑制有需要之個體之癌症。組合之「白血球/vMyx-hTNF」療法引起腫瘤床中細胞死亡增加，從而增強抗腫瘤免疫原性，但實質上僅在經病毒感染之轉移性腫瘤組織，諸如肺腫瘤組織中原位產生TNF，以限制偏離目標之全身性毒副作用。在以下實例1中在鼠骨肉瘤肺癌轉移模型中所呈現之測試結果顯示此策略可有效減少腫瘤負荷及延長中值存活時間。此外，白血球/vMyx-hTNF策略代表一種新的潛在治療方案，其藉由以癌症組織限制方式選擇性表現細胞表面TNF用於例如轉移

至肺的所有實體癌症，不考慮原始腫瘤類型。雖然不受理論束縛，但咸信此白血球/vMyx-hTNF策略與用於通常轉移至例如肺之實體癌症的其他既成癌症療法協同起作用。在某些實施例中，該方法包括將MYXV吸附至單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞之表面中。單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞的一些部分可能經感染；然而，在本文所揭示之方法中此當然不值得注意。在某些實施例中，將黏液瘤病毒吸附至單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞之表面上包括在允許黏液瘤病毒結合至單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞之表面之條件下，將單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞暴露於黏液瘤病毒。

【0092】 本發明之態樣係關於一種用於將任何種類之溶瘤MYXV構築體遞送至轉移性肺病的新穎方法，亦即藉由將治療性MYXV構築體預負載至來源於骨髓(BM)或末梢血液單核細胞(PBMC)之混合白血球上，諸如上文所描述。此類方法可用於治療特徵為存在具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞(例如癌細胞)的任何疾病病況。MYXV構築體可經修飾以包括任何治療性基因或「治療性轉殖基因」。如本文所使用之術語「治療性基因」或「治療性轉殖基因」意欲廣泛描述其實現所需結果(例如抗癌效果)之表現的任何基因。舉例而言，病毒可經修飾以攜帶將增強病毒治療之抗癌效果之基因。此類基因可為參與觸發細胞凋亡，或為參與靶向受感染細胞之免疫破壞的基因，諸如修復對干擾素之反應缺乏或引起刺激抗體反應之細胞表面標記物，諸如細菌細胞表面抗原之表現的基因。病毒亦可經修飾以表現參與關閉贅生性或癌細胞增殖及生長之基因，藉此防止細胞分裂。此外，病毒可經修飾以包括治療性基因，諸如參與化學治療劑合成之基因，或其可經修飾以在例如人類細胞之特定物種之細胞中具有增加之複

製水準，從特定物種中衍生出待抑制或殺死之細胞。

【0093】 在某些實施例中，BM或PBMC細胞離體用MYXV構築體吸附一小時，且隨後將負載MYXV之白血球輸注回接受者中。在某些實施例中，單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞獲自個體，例如作為自體細胞。在其他實施例中，單核末梢血液細胞及/或骨髓細胞獲自一或多種異源供體。獲得骨髓細胞及單核末梢血液細胞之方法為此項技術中已知。

【0094】 本發明之態樣係關於表現腫瘤壞死因子(TNF)，例如表面TNF或可溶TNF的MYXV，以及包括彼者之套組。在某些實施例中，表現TNF之MYXV包含vMyx-M135KO-hTNF。在某些實施例中，表現TNF之MYXV包含vMyx-hTNF-M135-136。表現TNF之黏液瘤病毒或包含表現TNF之MYXV的醫藥組合物亦可封裝為套組，其含有使用表現TNF之MYXV抑制對治療癌症具有缺陷型免疫反應之細胞的說明。

實例

【0095】 提供此等實例僅用於說明性目的且不限制本文所提供之申請專利範圍之範疇。

實例1

【0096】 此實例描述表現TNF之MYXV的建構及測試。

病毒之設計

【0097】 最初由Wang等人2008年(Wang F, Gao X, Barrett JW, Shao Q, Bartee E, Mohamed MR, Rahman M, Werden S, Irvine T, Cao J. Dekaban, GA, McFadden, G. 2008)設計及描述vMyx-hTNF病毒之第一型式(此處稱為vMyx-SODKO-hTNF)。RIG-I介導原發性人類巨噬細胞中由黏液瘤病毒引發之腫瘤壞死因子及I型干擾素之共誘導。PLoS pathogens

4:e1000099，其以引用之方式特定併入本文中)。簡而言之，出於與溶瘤病毒療法無關或用於任何癌症治療之目的，使用MYXV洛桑親本病毒株產生病毒。插入載體係基於pBluescript噬菌粒，且與eGFP一起選殖至131R ORF (稱為SOD)中，由離散的合成牛痘早期/晚期啟動子控制(參見圖1)。基於M135R基因剔除病毒平台產生表現第二hTNF之病毒(稱為vMyx-M135KO-hTNF)，該病毒平台為開發用於人類臨床試驗之溶瘤MYXV構築體之標準減毒基因背景。M135R基因剔除建構之策略完全由Bartee等人2009年(Bartee E, Mohamed MR, Lopez MC, Baker HV, McFadden G. 2009描述。。添加腫瘤壞死因子加 β 干擾素誘導原代人類纖維母細胞中針對痘病毒的新穎協同抗病毒狀態。Journal of virology 83:498-511 and Barrett JW, Sypula J, Wang F, Alston LR, Shao Z, Gao X, Irvine TS, McFadden G. 2007 M135R Is a Novel Cell Surface Virulence Factor of Myxoma Virus. Journal of Virology. 81(1):106-114，兩者均以全文引用之方式特定併入本文中)。簡言之，此vMyx-M135KO-hTNF病毒係使用多位點閘道三片段選殖程序產生。元素1含有M134 ORF之3'片段以及由合成早期/晚期啟動子控制之eGFP。元素2含有完整hTNF編碼序列，亦在合成早期/晚期啟動子之控制下。最終，元素3含有5'M136基因之片段。將此等三個片段合併成單一進入媒介質體，用於將eGFP-hTNF串聯卡匣插入至任何MYXV基因組主鏈之M135R基因座中。此隨後用於轉染/感染且使用至少3回合之溶菌斑純化來純化重組型病毒(最終質體用於圖2A中所示之轉染)。

動物研究

【0098】 使用免疫活性Balb/c小鼠中之同基因型鼠骨肉瘤模型確認

經由已離體預負載病毒之白血球遞送之vMyx-SODKO-hTNF病毒針對肺轉移性骨肉瘤之功效。動物在第0天經由側尾靜脈接種 2×10^6 個K7M2-FLuc鼠骨肉瘤細胞。在接種後四天，自對照Balb/c小鼠採集骨髓(BM)，計數且以每個有核細胞2-10個感染病毒單位之MOI (感染倍率)感染病毒。使細胞及病毒在 37°C 下吸附1小時。隨後以每隻動物 4×10^6 個細胞眶後(retro-orbitally)注入離體負載病毒之BM。隨後在腫瘤接種後第7天開始每週針對螢光素酶發光使用IVIS活體內成像系統對動物進行成像，作為腫瘤負荷之即時量測，其中大多數在受體肺中觀測到。對動物進行監測，直至其達到進行性疾病之預定臨床症狀，或直至感染後8週，以首先發生者為準。結果顯示用所有經測試之病毒構築體處理之動物展現與對照組相當之腫瘤負荷，vMyx-SODKO-hTNF構築體明顯除外。誘導單個較長期存活者之vMyx-M135KO病毒可能除外，其他測試病毒亦未顯示與對照組統計學上可區分之平均存活期。相比之下，如藉由來自腫瘤細胞的發光所量測，vMyx-SODKO-hTNF構築體組的腫瘤與所有成像時間點之對照組及其他構築體相比統計學上較小(圖3)。vMyx-SODKO-hTNF亦幾乎為對照組的兩倍平均存活時間(圖4)，且僅在此組中觀測到大量動物明顯不具有可論證的腫瘤負荷之。

【0099】 遵循此等結果，比較作為病毒「載體細胞」之BM白血球與作為載體細胞之採用主體PBMC將治療性MYXV構築體遞送至轉移性肺腫瘤部位。據推論，對於大多數實體癌症，PBMC為臨床上更相關之載體白血球來源。動物用如上文所描述之K7M2-Fluc細胞接種。腫瘤接種四天後，自對照Balb/c小鼠採集PBMC，且用vMyx-SODKO-hTNF (MOI=2)離體吸附一小時，如上文所描述。隨後將動物分成三個劑量組： 1×10^6 、

2×10^6 及 4×10^6 個 PBMC (各自用相同 MOI 之輸入病毒預吸附) 且注射相應之 PBMC/病毒劑量。隨後在第 7 天開始對動物進行成像。螢光素酶成像之結果顯示動物以劑量依賴性方式回應處理，其中使用 1×10^6 個劑量的動物反應最小，且動物 4×10^6 顯示腫瘤發光相比於對照組動物最顯著降低(圖 5 及圖 6)。

證實感染 vMyx-SODKO-hTNF 之細胞中之 TNF 表現

【0100】 為了證實藉由 vMyxv-SODKO-hTNF 構築體之 hTNF 表現，使用 MOI 為 10 之病毒以實驗方式感染 RK-13 細胞。在感染後使感染進展 48 小時，且隨後使用非酶促細胞解離緩衝液收集細胞以確保膜結合蛋白之完整性。隨後在對僅在細胞表面上表現之分子染色之非滲透條件下，使用結合至 PE 螢光團之小鼠抗人類 TNF 抗體染色細胞以用於流動式細胞測量術。隨後針對未感染之染色對照組及未感染之未染色對照組操作細胞。此分析之結果證實在感染後 48 小時，在 vMYX-SODKO-hTNF 感染細胞之表面上存在 TNF 表現且未感染之對照細胞不存在 TNF 表現之跡象(圖 7)。西方墨點法(Western blotting) (未顯示)未偵測到分泌之 TNF，表明經感染細胞不表現理論上可產生分泌形式之 TNF 的必需轉化/裂解酶。

活體外細胞死亡分析

【0101】 為了更好地理解在接受白血球/vMyxv-hTNF 病毒療法之負載腫瘤動物中觀測到的引起存活率提高及腫瘤負荷降低的機制，進行細胞死亡分析以量測骨肉瘤細胞對不同測試病毒之反應。此為確定腫瘤負荷降低是否由增加由病毒表現之 TNF 引起之直接腫瘤細胞死亡來驅動。使用流動式細胞測量術分析 K7M2-FLuc 細胞之 TNFR1 及 TNFR2 之細胞表面表現。此等細胞顯示為對於 TNFR1 及 TNFR2 之表現呈陽性，意謂有可能

TNF可與其在腫瘤細胞上之同源受體直接相互作用且引起TNF誘導之細胞死亡。為了確認此等細胞是否可由TNF直接殺死，使其以實驗方式生長且感染vMyx-M135KO、vMyx-SODKO-hTNF或與經純化鼠TNF一起培育。隨後使用SYTOX橙量測細胞之存活力，其僅在與各種形式之細胞死亡相關聯之細胞膜完整性缺失之後進入且染色細胞。在感染/接種後24或48小時，將細胞與SYTOX橙一起培育10分鐘，使用胰蛋白酶提昇，且將細胞與上清液組合在一起，離心以洗滌過量SYTOX。隨後將細胞再懸浮於100微升DMEM中且使用細胞計數器讀取。此分析之結果顯示，48小時時，鼠TNF與對照組相比僅引起20%細胞死亡增加，但在TNF後24小時不存在顯著差異。相反，相較於對照組，vMyx-SODKO-hTNF感染使24小時之生存力降低20%，且使48小時之生存力降低50%。此細胞生存力之降低與用不表現hTNF之對照vMyx-135KO病毒感染之後所觀測到的基本上相同。此顯示此等骨肉瘤細胞不會額外對hTNF之殺死敏感，且在動物研究中觀察到的增加之腫瘤減少可能由免疫相關機制引起，該機制獨立於表現TNF之病毒與骨肉瘤細胞上之TNFR1或TNFR2的直接相互作用(圖8)。

實例2

【0102】 此實例描述經離體預負載有病毒之白血球遞送之vMyx-M135KO-hTNF病毒對三陰性乳癌之功效的測定。

【0103】 使用免疫活性Balb/c小鼠中之同基因型鼠三陰性乳癌。動物在第0天經由側尾靜脈接種三陰性乳癌細胞。在接種後，自對照Balb/c小鼠採集骨髓(BM)，計數且用vMyx-M135KO-hTNF及/或對照病毒感染。使細胞及病毒在37°C下吸附1小時。隨後將離體負載病毒之BM眶後注入。隨後在腫瘤接種後每週針對螢光素酶發光使用IVIS活體內成像系統

對動物進行成像，作為腫瘤負荷之即時量測，其中大多數在受體肺中觀測到。監測動物直至其達到進行性疾病之預定臨床症狀。

實例3

【0104】 此實例描述經離體預負載有病毒之白血球遞送之vMyx-M135KO-hTNF病毒對轉移性黑色素瘤之功效的測定。

【0105】 使用免疫活性Balb/c小鼠中之同基因型鼠三陰性乳癌。動物在第0天經由側尾靜脈接種轉移性黑色素瘤細胞。在接種後，自對照Balb/c小鼠採集骨髓(BM)，計數且用vMyx-M135KO-hTNF及/或對照病毒感染。使細胞及病毒在37°C下吸附1小時。隨後將離體負載病毒之BM眶後注入。隨後在腫瘤接種後每週針對螢光素酶發光使用IVIS活體內成像系統對動物進行成像，作為腫瘤負荷之即時量測，其中大多數在受體肺中觀測到。監測動物直至其達到進行性疾病之預定臨床症狀。

實例4

【0106】 圖9說明使用流動式細胞測量術定量感染人類AML (THP1)細胞之細胞死亡。藉由在具有活/死(Live/Dead)染色之細胞上閘控，自如所定義之為APC/Cy7⁺之細胞群體測定MYXV介導之總THP1細胞殺死。使用霍爾姆-西達克的t測試測定顯著性(* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)用於多重比較。結果顯示用vMyx-SODKO-hTNF-GFP感染THP-1細胞在感染後兩個時間(24及48小時)在3種所測試之感染倍率(MOI=10、1或0.1)下引起閘控型死亡細胞之數目的總體增加。

【0107】 圖10說明使用流動式細胞測量術定量經病毒感染之人類AML (THP1)細胞之MYXV介導之正中目標殺死。自作為APC/Cy7⁺之細胞的比例測定THP1細胞之MYXV介導之「正中目標」殺死，自作為GFP-

陽性之病毒感染細胞群體閘控。使用霍爾姆-西達克的t測試測定顯著性(* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)用於多重比較。結果顯示，當THP1細胞經測試病毒感染時，對照病毒或表現TNF之構築體對經病毒感染死亡細胞之偵測非常類似。此結果符合以下一般觀測結果：MYXV殺死經感染細胞之能力大部分為病毒平台之結果，且相對不受包括TNF之大部分轉殖基因影響。

【0108】圖11說明使用流動式細胞測量術定量未感染人類AML (THP1)細胞之MYXV誘導之偏離目標殺死。自為APC/Cy7⁺之細胞的比例測定THP1細胞之MYXV介導之偏離目標殺死，自為GFP-陽性之細胞群體閘控。使用霍爾姆-西達克的t測試測定顯著性(* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)用於多重比較。結果顯示相較於未配備之MYXV對照感染，hTNF轉殖基因之表現誘導未感染之THP1細胞大量殺死。

【0109】圖12說明使用流動式細胞測量術定量感染之人類多發性骨髓瘤(U266)細胞之細胞死亡。自為APC/Cy7⁺之細胞群體測定MYXV介導之總U266殺死。使用霍爾姆-西達克的t測試測定顯著性(* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)用於多重比較。結果顯示用vMyx-SODKO-hTNF-GFP感染U266細胞在感染後兩個時間(24及48小時)在3種所測試之感染倍率(MOI=10、1或0.1)下引起閘控型死亡細胞之數目的總體增加。

【0110】圖13顯示經由離體負載之同基因型鼠骨髓白血球遞送之vMyx-SODKO-hTNF之測試，以消除免疫活性小鼠中預接種之鼠多發性骨髓瘤。因為多發性骨髓瘤之轉殖基因鼠VK*MYC模型為極具侵襲性及抗藥性模型，所以將MYXV病毒之病毒學療法與具有骨髓白血球之自體幹細胞移植(autologous stem cell transplantation, ASCT)結合使用以改良

無癌症存活率。圖13A顯示使用移植到C57/B1小鼠中之抗硼替佐米(bortezomib) VK*12598骨髓瘤細胞(其中其大部分遷移至骨髓及脾臟)之活體內資料。簡言之，將 1×10^6 個VK*12598骨髓瘤細胞經由尾靜脈靜脈內(i.v.)遞送至免疫活性C57BL/6小鼠中。癌症遞送四天後，如下處理小鼠：不接受骨髓(BM)移植之對照組；單獨的 2×10^6 個BM細胞；用未負載vMyx-M135KO之黏液瘤病毒(MOI=10)離體預處理的 2×10^6 個BM細胞；經由眶後(RO)注射用vMyx-SODKO-hTNF (MOI=10)離體處理的 2×10^6 個BM細胞。在癌症植入後100天產生存活率曲線(圖13B)。圖13C對應於存活率百分比。

【0111】 圖14顯示在具有SMAC模擬或免疫檢查點抑制劑之BM白血球上離體預負載vMyx-hTNF-(M135-M136)之組合療法。組合療法用SMAC模擬化合物LCL161 (50 mg/Kg)或檢查點抑制劑單株抗體(mAb) α -muPD-1與經由離體預負載型自體鼠骨髓白血球遞送之vMyx-hTNF-(M135-M136)之組合進行測試。簡言之，將 1×10^6 個VK*12598鼠骨髓瘤細胞經由尾靜脈靜脈內(i.v.)遞送至免疫活性C57BL/6小鼠中。四週後，吾人使用血清蛋白電泳(serum protein electrophoresis, SPEP)定量血清中骨髓瘤蛋白標記物(例如，M-尖峰)之含量。接著在第1天、第4天、第8天及第11天用vMyx-hTNF-(M135-M136)以MOI=10離體預處理之 2×10^6 個BM細胞處理小鼠。各自體移植之後為經由經口管飼遞送之具有50 mg/Kg LCL161之化學療法，或在第2天、第5天、第9天、第12天經由腹膜內(intraperitoneal, I.p.)注射具有10 mg/Kg mAb α -muPD-1之免疫療法。圖14B顯示包括存活率曲線之活體內資料。圖14C描述存活率百分比。

【0112】 圖15顯示自vMyx-hTNF-(M135-136)感染之人類細胞之人

類TNF蛋白表現及部分分泌。兩種人類細胞株：THP1（人類單核細胞性）及A549（人類肺癌）在三種不同感染倍率(MOI)下用vMYX-hTNF-(M135-136)及對照vMyx-GFP感染。感染後48小時之後，收集上清液且藉由ELISA（Biolegend）分析自經病毒感染細胞分泌之可溶性人類TNF之水準。

實例5

【0113】 使用MYXV洛桑親本病毒株產生vMyx-hTNF-M135-M136病毒。簡言之，vMyx-hTNF-M135-M136病毒係使用多位點閘道三片段選殖程序產生。元素1含有M134R部分及M135R ORF之3'片段，以及由合成早期/晚期啟動子控制之eGFP。元素2含有完整hTNF編碼序列，亦在合成早期/晚期啟動子之控制下。元素3含有5' M136R基因之片段。將此等三個片段合併成單一進口媒介質體，用於將eGFP-hTNF串聯卡匣插入至MYXV基因組主鏈中之M135R及M136R基因之間的基因間位置。此隨後用於轉染/感染且使用至少3回合之溶菌斑純化重組型病毒(最終質體用於圖2B中所示之轉染)。

【0114】 對應於本文所述之組合物及方法的例示性序列示於表1中。

表1

SEQ ID NO	名稱	序列
1	M134R部分及M135R (用於vMyx-hTNF-M135-136中)	ATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAG GCTCCAGGATTACCTGGTCTATATAGATAACAAAACC TACGTACGTATAAACGAGACCGTTGTACCGGAGAACG AGTATCTGGCAGCGAAGGCCCGCGAGTGACCTGTTT CCACACGGACTTGATCCCCATTACGGACGAAGAGACA CAACGACGTTTTGAGAAAATGATTGTACAGGCGGCGT TAGAGGACGCCCTAACGAGCATCTTTGAGGAGCACGA

		CAATAACGTAACCGATTACTTCGCGGAATACATGCGA TCCCTCCAAATGGCGAATAAAAGTCATACGAATAATA TTATCGCGGTCGCTTTAGCGGGGATAATCGTCATTGTA ACGACCTACGTGTTTACTAGATTACGCACTAAGCAAA AAAAAGGAAATTATAACGTACGTAATAAGATAGATAA TTCCATACAGAAAGAGATTTCAGTTGGACGGTGTATAT ACTACTGACAACGTTTTTTATATAAACATGGTGTTTATA TTTATTATCACCTGNGTATGTTTTGGTGACGAGATCCTG TGGGGGTGGGTTAGAAGACGATATAGATCGCATATTT CAAAAACGATACAACGAACCTGAGCCAGCCGATTAAGC GCAATATGCGTACACTGTGCAAGTTTAGAGGAATTAC CGCGACTATGTTTACGGAAGGAGAATCTTACCTTATTC AATGTCCCATAATTCACGATTACGTGCTACGGGCGCTG TATGACTTAGTGGAAGGAAGTTACACGGTACGCTGGG AACGCGAAACGGAAGACGATGTTGAGTCGGTAGATCC GAAGTTAGTCAAAGGGACGCTATTATACCTCCAACCT AACGCGTCCAGTATAGGAACGTATCTATGTACCTTAC ACGATAACCGAGGTATGTGTTATCAATCTGTCGCGCA CGTCATCCGACGTCCGAAGATGCAATGCGTGAAACAT GCACATACGACATCGGACAGCAACCTGTGGATATACC TCGCCATTTTAGCAGTTTTTGATATCcttaggcgtcctgtaa
2	M136R	acgacgtaactccgaacTatgaagtaacattttttaaaacaatttcgttatgttaaattATG GAACGGTCGCCCCACTTACACGGTACACGATAAACGCT TTTCTATCGTCGCACTAAACGGACAATACGACATGGT GGACGATTTTGGTCTTAGTTTTTTCTTACACAGCGATCG ACGATATTTCTAAAAATCATTCCATCAAACACGTTTTA GAAGAATACTTTTCATGGCGCGCGTATATAGGCCGGG TATGTATCATACCGAATCACGTGGGAAAGCTCTACAT CAAACCTTACAAAGTTGGACACCACGGCGAAGAACAAA CTAGGCAATCTAGATATATTGTTATGCGACGTGTTAAA AATAGACGAGGACGGAGGCAACGAGAAACTGTTTCA ATTCATACGGTCGCTGAACCTACACAAGAATAAAGAG AACACGTTGACGTTGATAGGATTACTAGCCTACGCGT GCAACTTCTGGGGCAGTCAAAAAATAAATAAATACAT TCCTTCCATCATGCCGTTTTTTCTTAAACAAACGACCG AGTCTATACTTTCCGAACCTGTGTGTTATTTTGAACAT AACAAATTGTATTAA
3	合成早期/晚期啟 動子	TTAAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTTTGGGAATATAA ATA

4	hTNF	ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGG CCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGGCCCC AGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCTCAGCCTCTTCTCC TTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCT GCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAG TTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCCA GGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAG CCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGG GGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGGCCAATGCCCT CCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTG GTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCA GGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCTCCACCCATG TGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCC TACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGA GCCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGGGGGGCTGAGG CCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGT CTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAG ATCAATCGGCCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGG GCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTGA
5	eGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGG TGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA CCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGT GACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGC TACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGT CCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCAT CTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCA TCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA CATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGC CACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG GCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGA GGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG AACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCG ACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAA AGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTG GAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGG ACGAGCTGTACAAGTAA

6	M134-部分及 M135R部分 (用於vMyx- M135KO- hTNF 中)	CGAGGATTACCTGGTCTATATAGATAACAAAACCTAC GTACGTATAAACGAGACCGTTGTACCGGAGAACGAGT ATCTGGCAGCGAAGGCCCCGCGAGTGACCTGTTTCCA CACGGACTTGATCCCCATTACGGACGAAGAGACACAA CGACGTTTTGAGAAAATGATTGTACAGGCGGCGTTAG AGGACGCCCTAACGAGCATCTTTGAGGAGCACGACAA TAACGTAACCGATTACTTCGCGGAATACATGCGATCC CTCCAAATGGCGAATAAAAGTCATACGAATAATATTA TCGCGGTCGCTTTAGCGGGGATAATCGTCATTGTAACG ACCTACGTGTTTACTAGATTACGCCTAAGCAAAAAA AAGGAAATTATAACGTACGTAATAAGATAGATAATTC CATACAGAAAGAGATTCAGTTGGACGGTGTATATACT ACTGACAACGTTTTTATATAAACATGGTGTTTATATTT ATTATCACCTGTGTATGTTTGGTGACGAGATCCTGTGG GGGTGGGTTAGAAGACGATATAGATCGC
---	---	--

【0115】 在一些情況下，MYXV(洛桑病毒株)包含如藉由GenBank: AF170726.2 (其以引用之方式併入本文中，如藉由GenBank在2019年7月11日提供)所說明之序列。

【0116】 在一些情況下，vMyx-hTNF-M135-136包含如圖2B中所示配置之SEQ ID NO: 1-5。在一些情況下，vMyx-hTNF-M135-136包含洛桑病毒株主鏈，視情況包含如藉由GenBank: AF170726.2所說明之序列。

【0117】 在一些情況下，vMyx-M135KO-hTNF包含如圖2A中所示配置之SEQ ID NO: 6、2、4及5。在一些情況下，vMyx-M135KO-hTNF包含洛桑病毒株主鏈，視情況包含如藉由GenBank: AF170726.2所說明之序列。

【0118】 雖然本文已展示及描述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者將明白，此等實施例僅藉助於實例提供。熟習此項技術者現將在不背離本發明之情況下想到許多變化、改變及取代。應理解，本文中所描述

之本發明實施例之各種替代方案可用於實踐本發明。以下申請專利範圍意欲限定本發明之範疇，且由此涵蓋此等申請專利範圍及其等效物之範疇內的方法及結構。

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種經改造以表現腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF)蛋白之黏液瘤病毒(myxoma virus, MYXV)，其中該MYXV包含在與兔細胞向性相關聯之一或多種基因處或附近之修飾。

【第2項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該TNF蛋白為TNF α 蛋白。

【第3項】

如請求項2之黏液瘤病毒，其中該TNF蛋白為表面TNF蛋白。

【第4項】

如請求項2之黏液瘤病毒，其中該TNF蛋白為可溶TNF蛋白。

【第5項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該TNF蛋白為人類TNF蛋白。

【第6項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中一或多種與兔細胞向性相關聯之基因包含M11L、M063、M135R、M136R、M-T2、M-T4、M-T5或M-T7。

【第7項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該MYXV包含M135R基因之部分缺失或完全缺失。

【第8項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該MYXV包含損害M135R基因之功能的M135R基因之修飾。

【第9項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該TNF蛋白代替該MYXV基因組內之該M135R基因。

【第10項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該TNF蛋白插入於該MYXV基因組內之M135R基因與M136R基因之間。

【第11項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該MYXV進一步包含螢光蛋白。

【第12項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該MYXV為洛桑(*Lausanne*) 病毒株。

【第13項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該MYXV為vMyx-M135KO-hTNF。

【第14項】

如請求項1之黏液瘤病毒，其中該MYXV為vMyx-hTNF-M135-136。

【第15項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至14之黏液瘤病毒及醫藥學上可接受之賦形劑。

【第16項】

如請求項15之醫藥組合物，其中該醫藥組合物經調配以用於全身投與。

【第17項】

如請求項15之醫藥組合物，其中該醫藥組合物經調配以用於局部投

與。

【第18項】

如請求項15至17中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物經調配以用於非經腸投與。

【第19項】

一種組合物，其包含藉由經改造以表現腫瘤壞死因子(TNF)蛋白之黏液瘤病毒(MYXV)離體處理的末梢血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell，PBMC)、骨髓(bone marrow，BM)細胞或其組合。

【第20項】

如請求項19之組合物，其中該MYXV為如請求項1至14之黏液瘤病毒。

【第21項】

如請求項19之組合物，其中該MYXV為vMYX-SODKO-hTNF。

【第22項】

如請求項19至21中任一項之組合物，其中該等PBMC、BM細胞或其組合包含自體細胞。

【第23項】

如請求項19至21中任一項之組合物，其中該等PBMC、BM細胞或其組合獲自異源供體。

【第24項】

一種抑制或治療有需要之個體之癌症的方法，其包含向該個體投與經改造以表現腫瘤壞死因子(TNF)蛋白之黏液瘤病毒(MYXV)。

【第25項】

如請求項24之方法，其中該MYXV為如請求項1至14之黏液瘤病毒。

【第26項】

如請求項24之方法，其中該MYXV為vMYX-SODKO-hTNF。

【第27項】

一種抑制或治療有需要之個體之癌症的方法，其包含向該個體投與如請求項15至23之組合物。

【第28項】

如請求項27之方法，其進一步包含將該黏液瘤病毒離體吸附至該等PBMC、BM細胞或其組合之表面上。

【第29項】

如請求項28之方法，其中將該黏液瘤病毒吸附至該等PBMC、BM細胞或其組合之該表面上包含在允許該黏液瘤病毒結合至該等PBMC、BM細胞或其組合之該表面的條件下，將該等PBMC、BM細胞或其組合暴露於該黏液瘤病毒。

【第30項】

如請求項29之方法，其中該條件包含約4℃至約37℃之溫度。

【第31項】

如請求項29或30之方法，其中該條件包含約20℃至約37℃、約20℃至約28℃、約24℃至約26℃、約30℃至約37℃或約35℃至約37℃之溫度。

【第32項】

如請求項29至31中任一項之方法，其中該條件包含至少5分鐘、10分鐘、15分鐘、20分鐘、30分鐘、1小時、1.5小時、2小時、3小時、4小

時、6小時、8小時、10小時、12小時或更長之培育時間。

【第33項】

如請求項27至32中任一項之方法，其中該等PBMC、BM細胞或其組合獲自該個體或HLA相關供體。

【第34項】

如請求項27至33中任一項之方法，其中該等經病毒吸附之PBMC、BM細胞或其組合係全身性地向該個體投與。

【第35項】

如請求項24至34中任一項之方法，其中該癌症為實體腫瘤。

【第36項】

如請求項24至35中任一項之方法，其中該癌症已轉移至該個體中之第二位置。

【第37項】

如請求項24至36中任一項之方法，其中該第二位置包含該個體之肺、腦、肝臟及/或淋巴結。

【第38項】

如請求項24至37中任一項之方法，其中該癌症包含骨肉瘤、三陰性乳癌或黑色素瘤。

【第39項】

如請求項24至38中任一項之方法，其進一步包含向該個體投與額外治療劑。

【第40項】

如請求項39之方法，其中該額外治療劑為免疫檢查點調節劑。

【第41項】

如請求項39或40之方法，其中在投與該MYXV或該組合物之前向該個體投與該額外治療劑。

【第42項】

如請求項39或40之方法，其中在投與該MYXV或該組合物之後向該個體投與該額外治療劑。

【第43項】

如請求項39至42中任一項之方法，其中該額外治療劑以與該MYXV或該組合物組合之形式向該個體投與。

【第44項】

如請求項24至43中任一項之方法，其中該個體為人類。

【第45項】

如請求項44之方法，其中該方法進一步包含選擇患有或疑似患有癌症之個體。

【第46項】

如請求項24至45中任一項之方法，其中該黏液瘤病毒能夠感染具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞。

【第47項】

如請求項46之方法，其中具有缺陷型先天性抗病毒反應之細胞包含癌細胞。

【第48項】

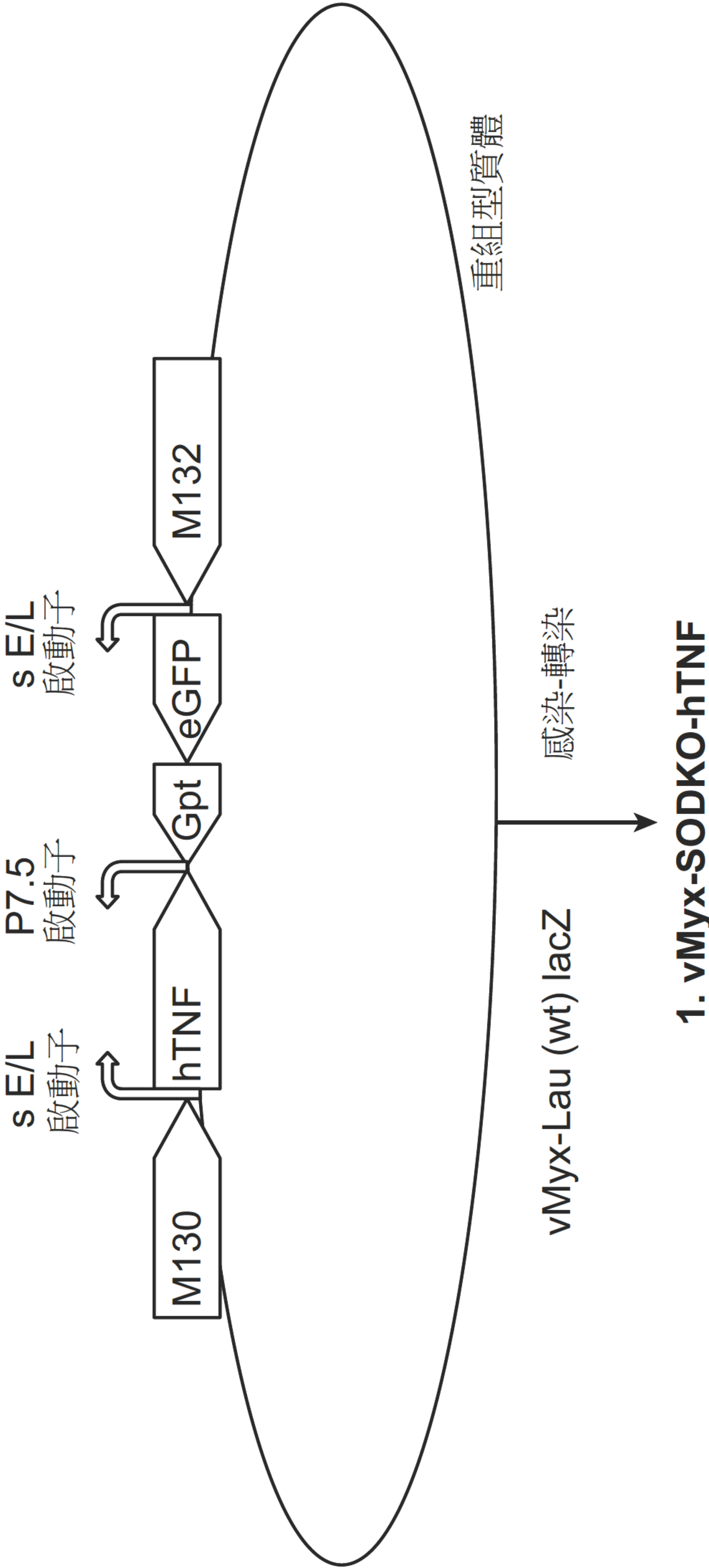
如請求項24至47中任一項之方法，其中感染該黏液瘤病毒之細胞表現TNF。

【第49項】

一種套組，其包含如請求項1至14之黏液瘤病毒、如請求項15至18之醫藥組合物或如請求項19至23之組合物。

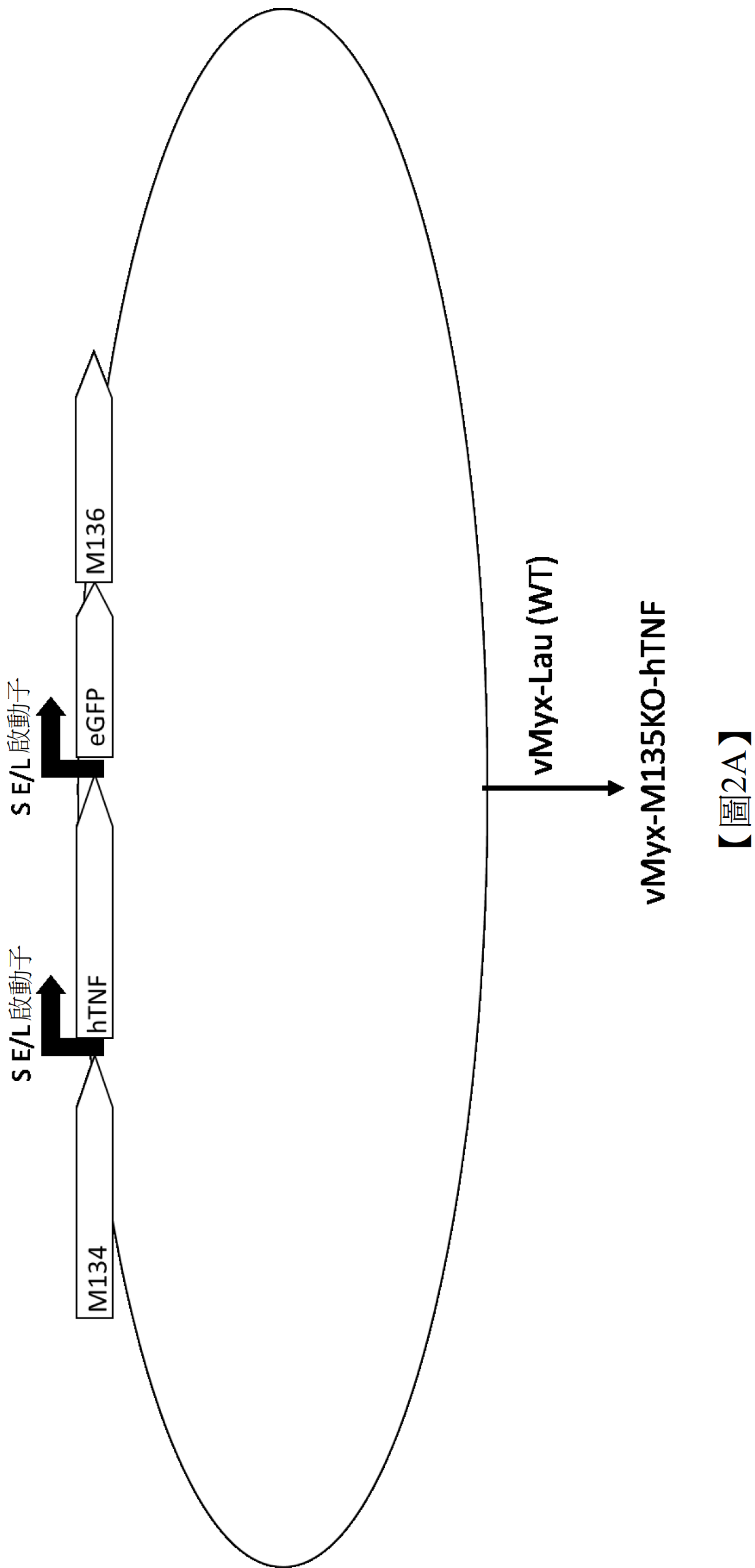
【發明圖式】

SOD樣基因座中人類TNF之基因圖譜：vMyx-SODKO-hTNF



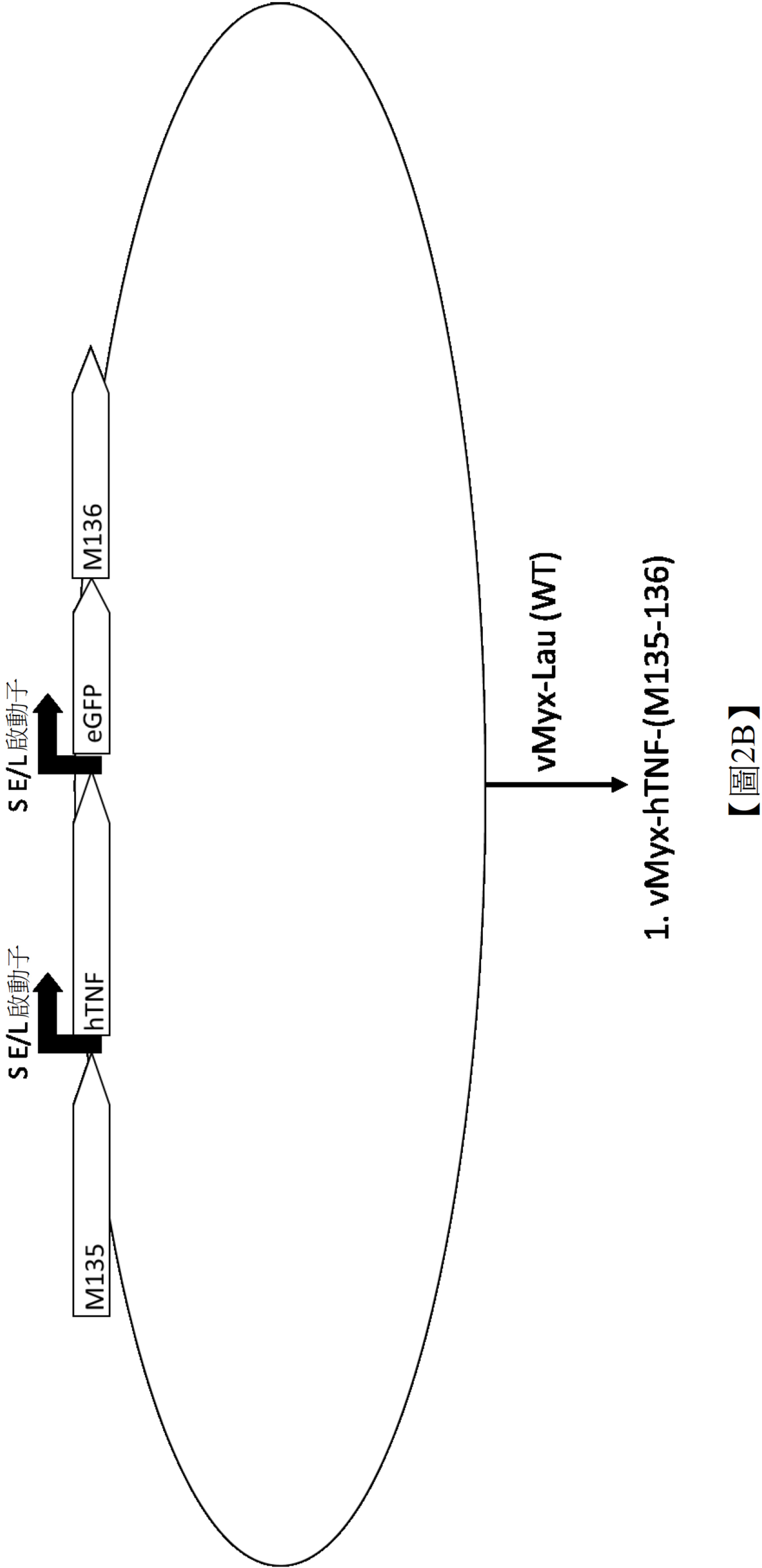
【圖1】

人類TNF M135KO黏液瘤病毒之基因圖譜：vMyx-M135KO-hTNF



【圖2A】

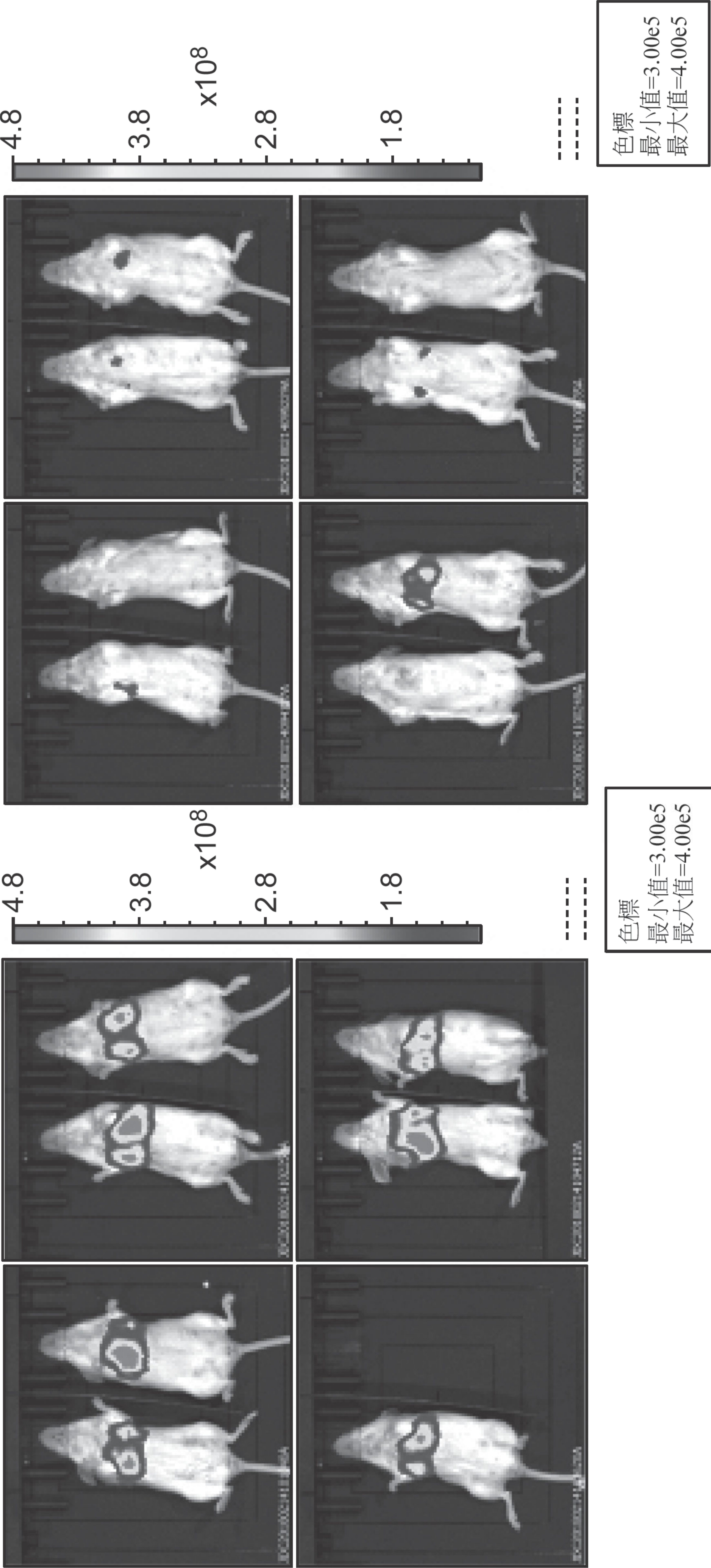
基因M135/136之間之人類TNF黏液瘤病毒之基因圖譜：vMyx-hTNF-(M135-136)



vMyx-SODKO-hTNF動物在接種後2週具有明顯較小之腫瘤

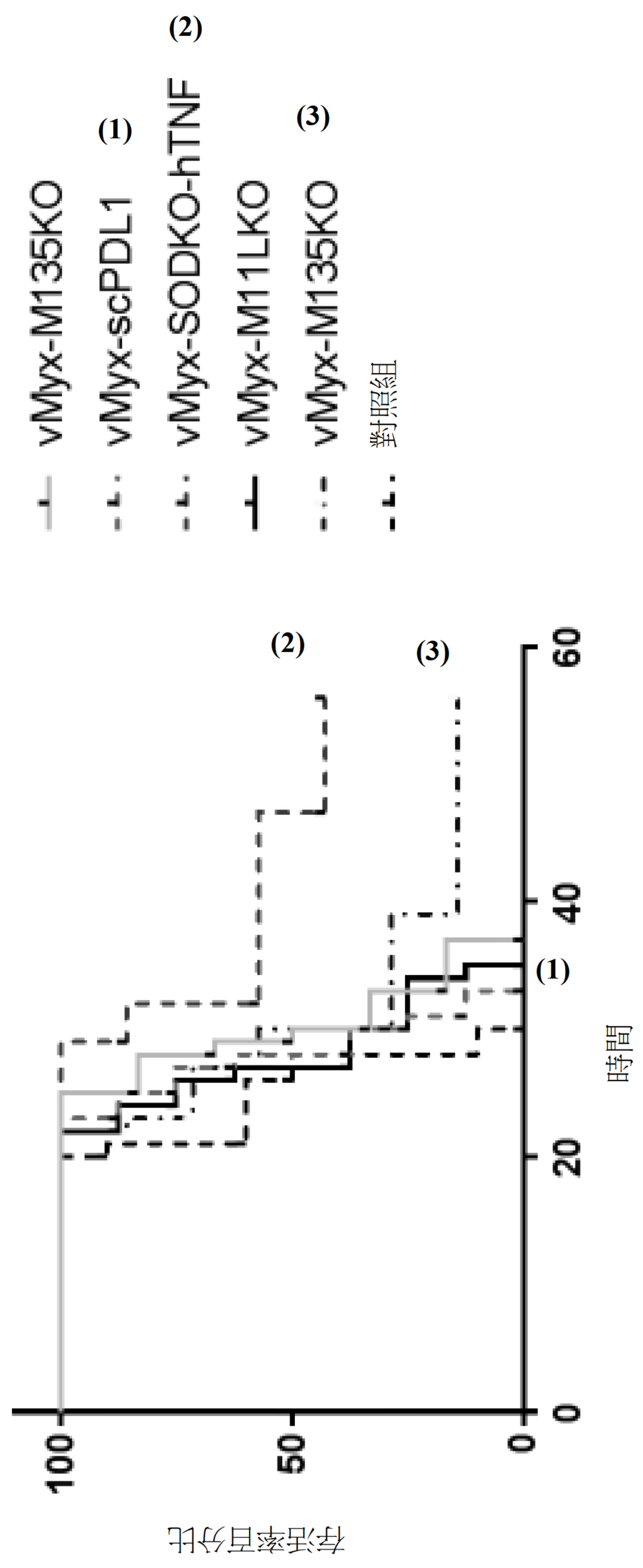
鹽水對照組

BM+vMyx-SODKO-hTNF



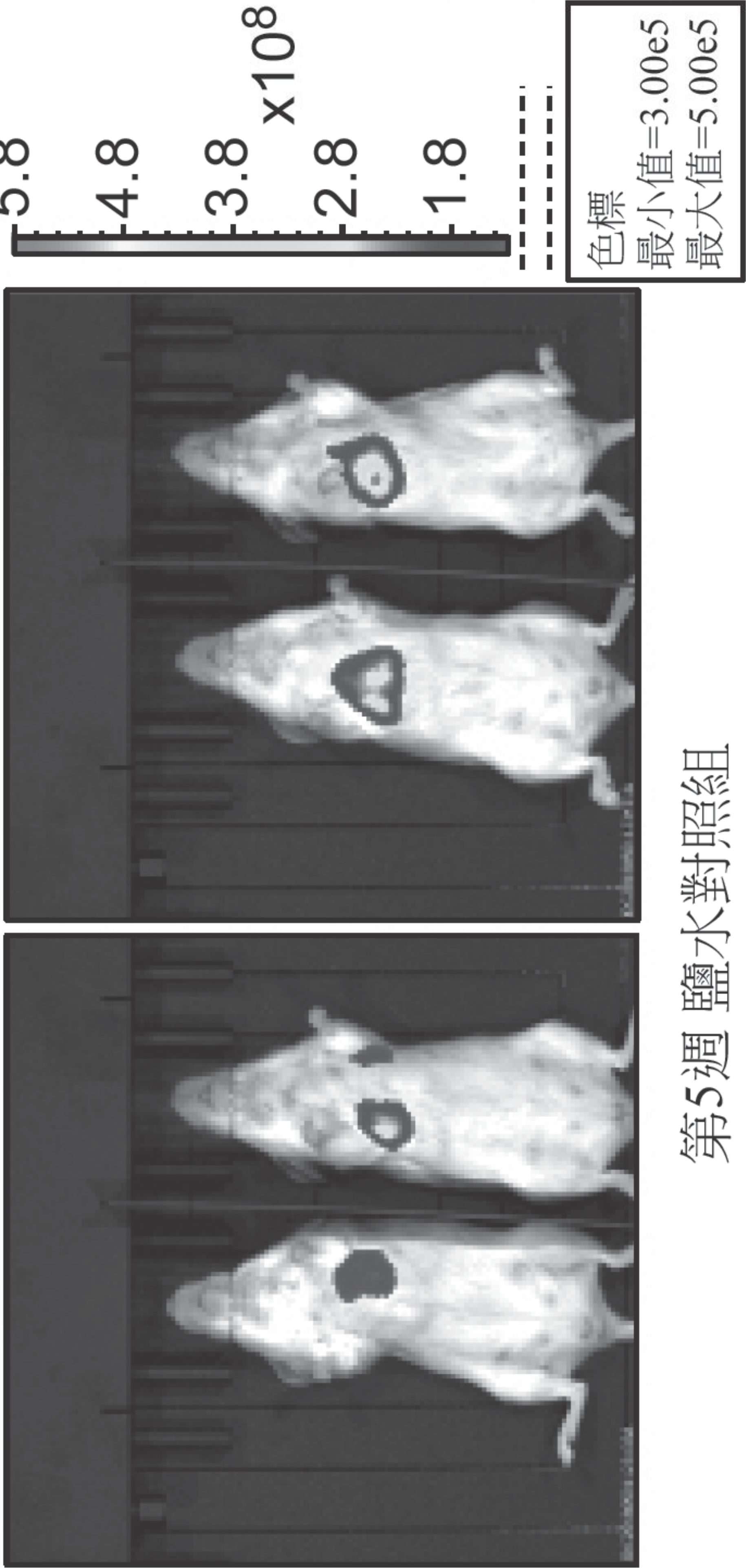
【圖3】

組5

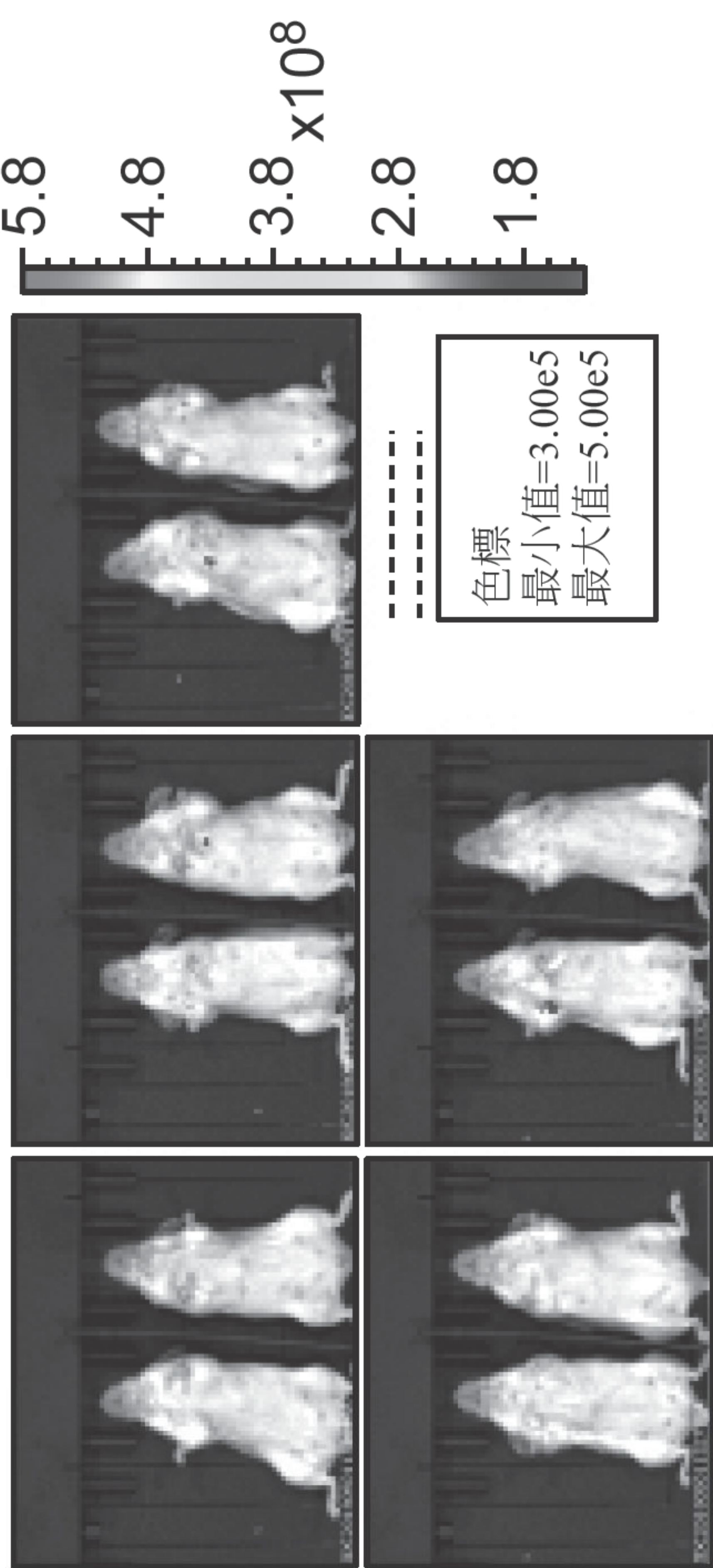


【圖4】

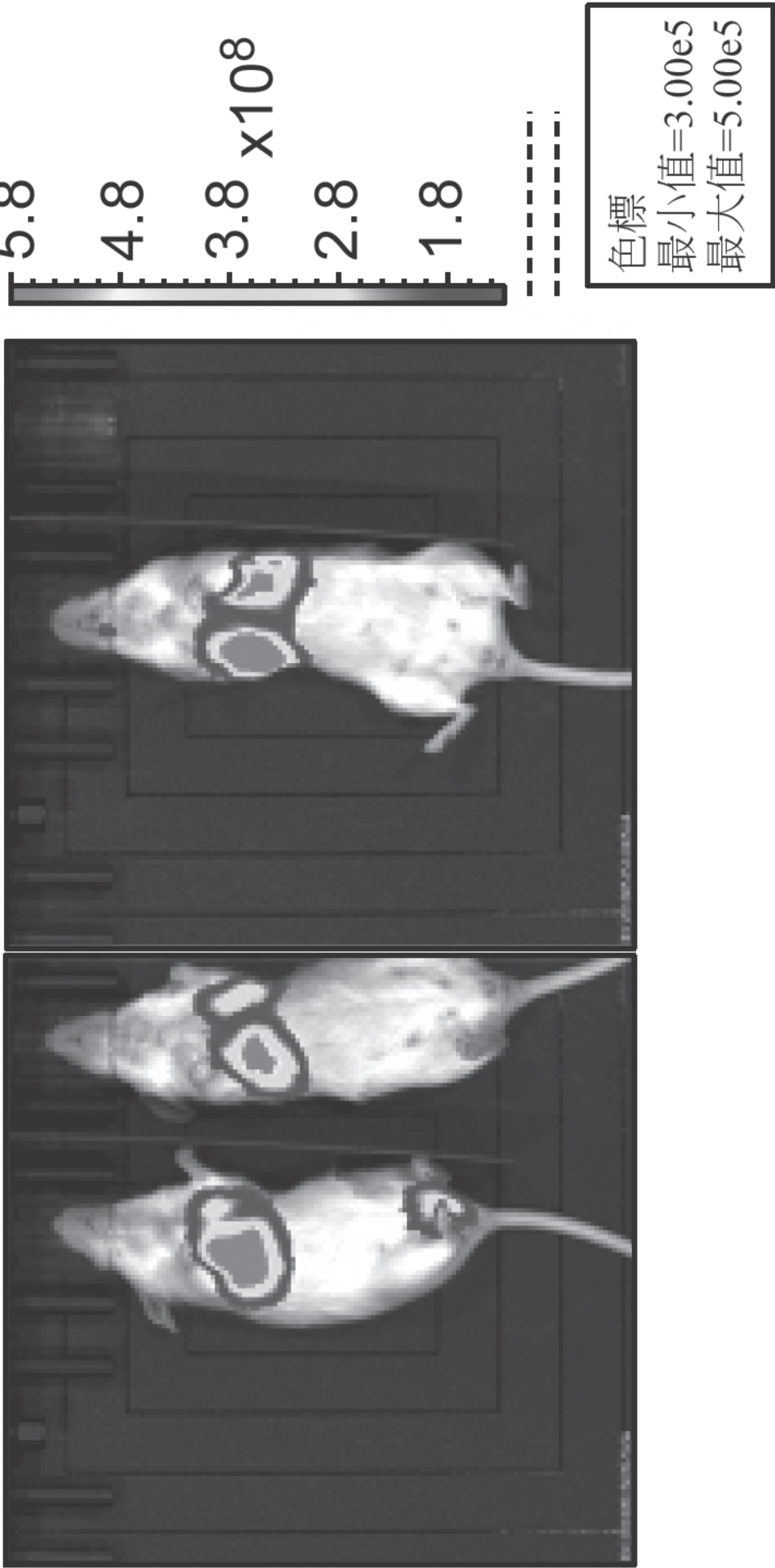
第3週 鹽水對照組



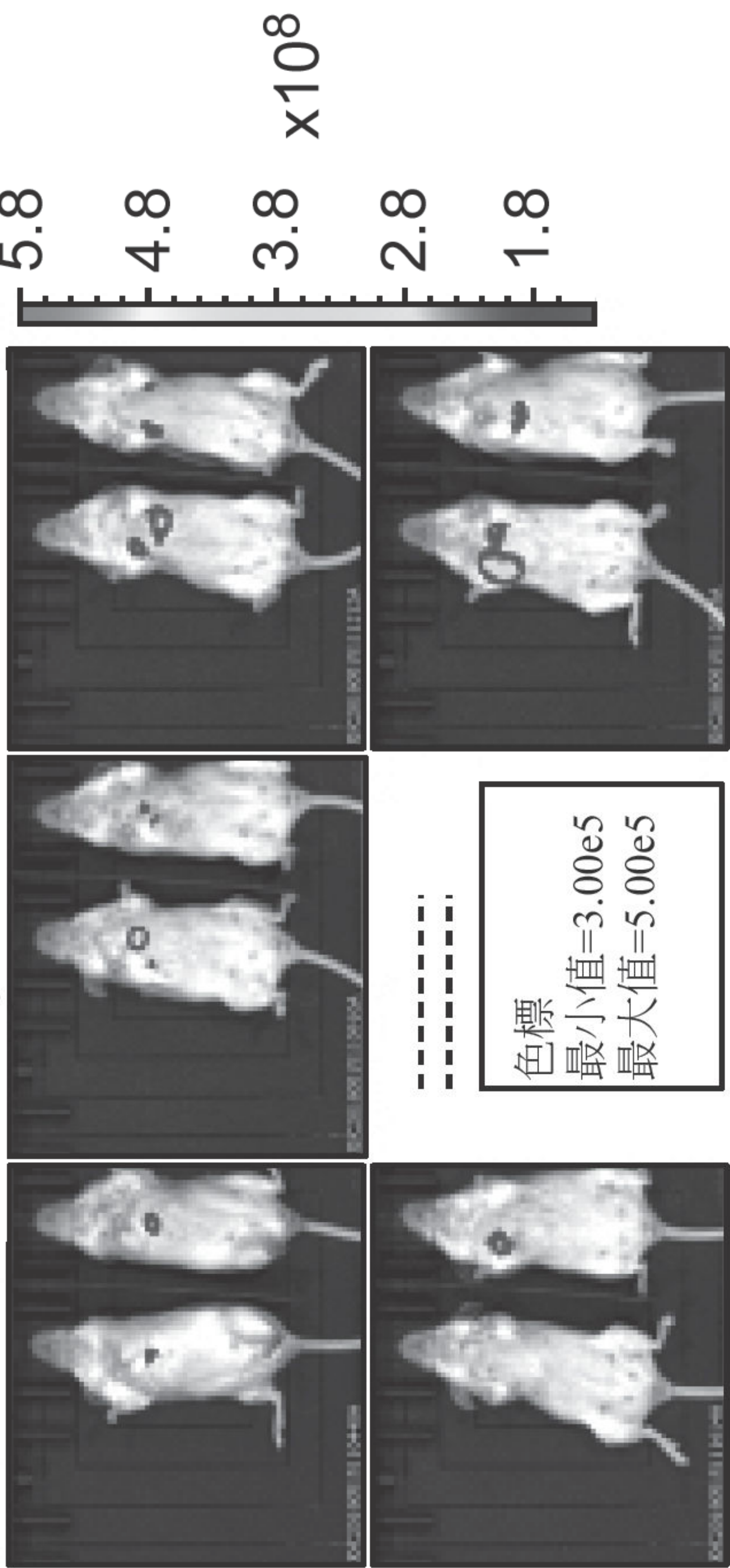
第3週 vMyx-SODKO-hTNF+PBMC



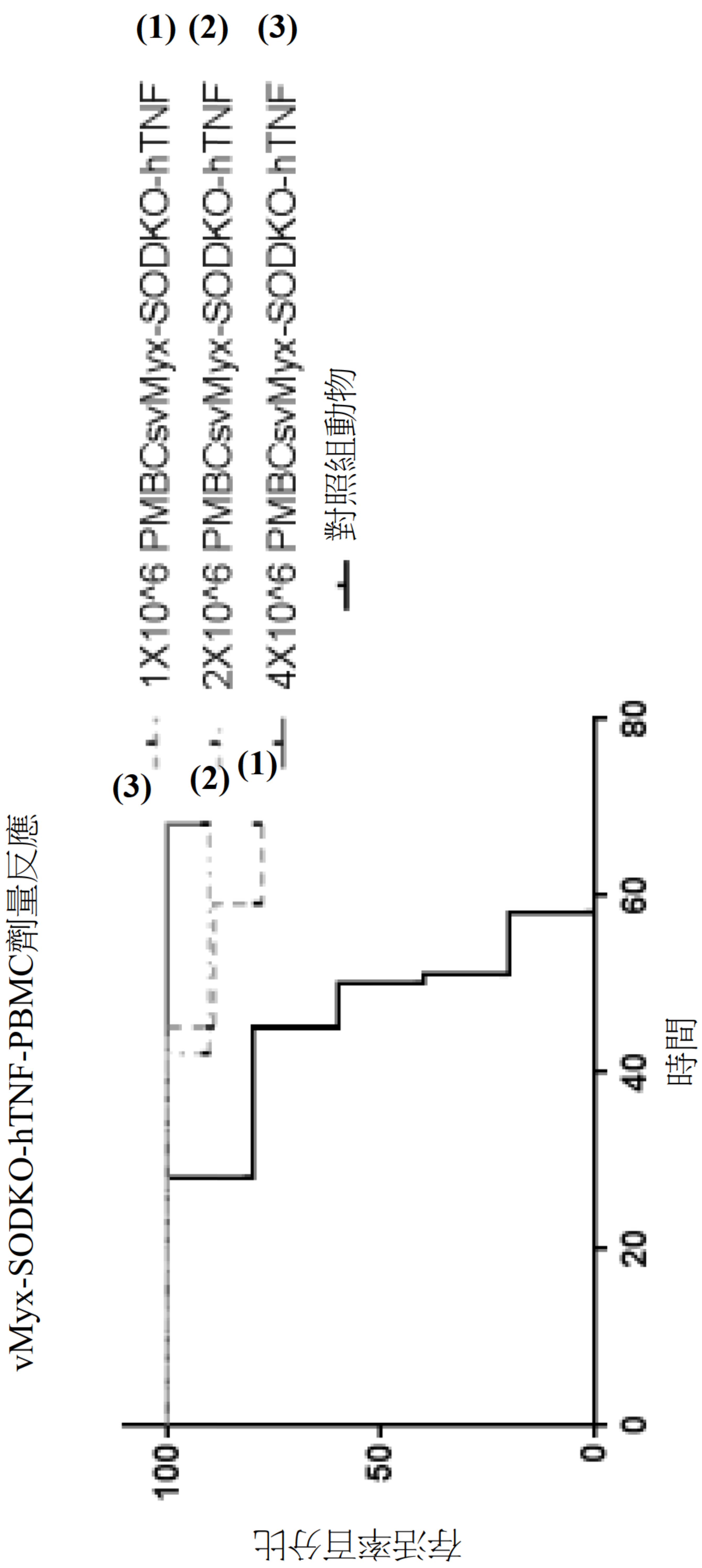
第5週 鹽水對照組



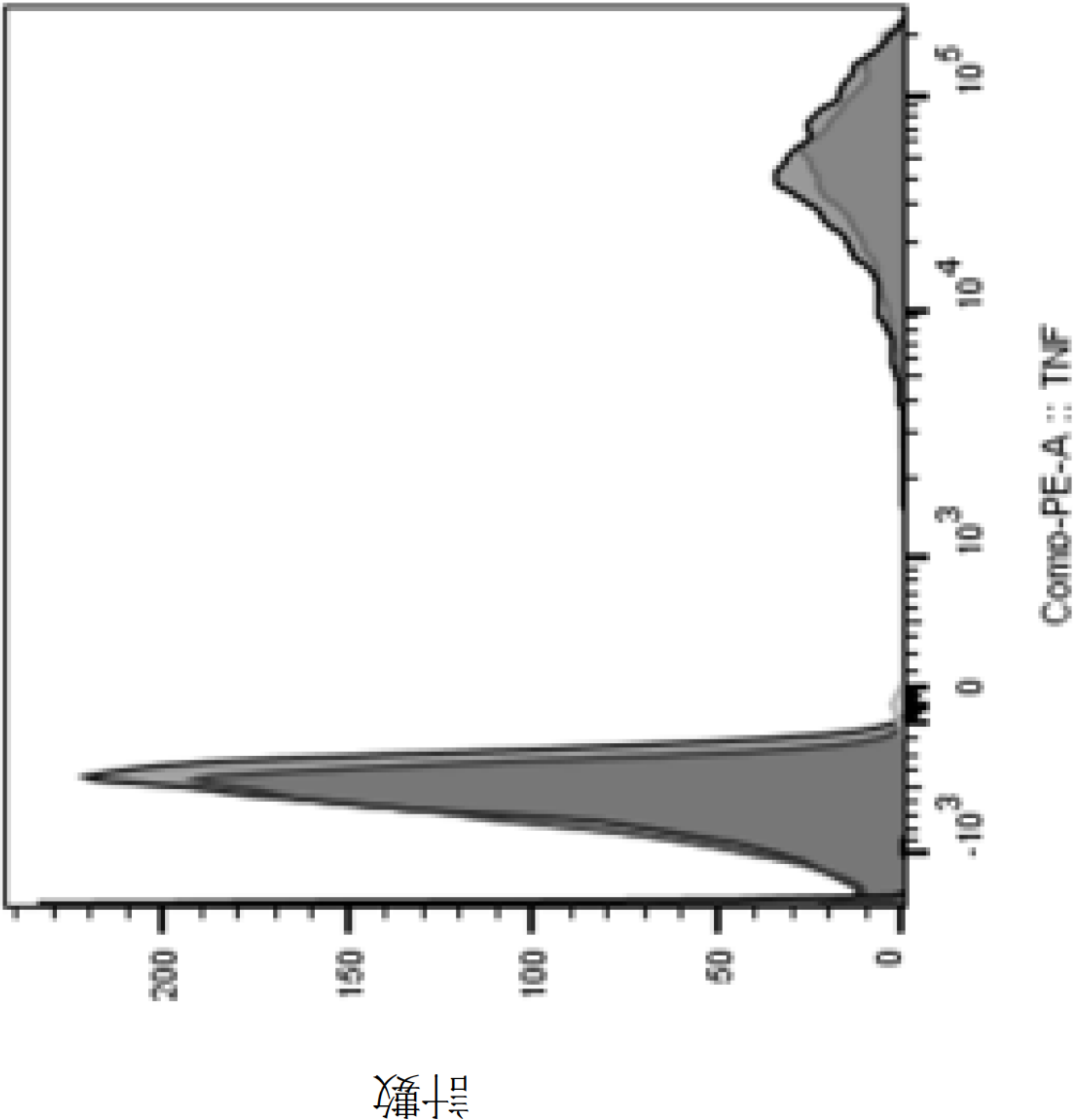
第5週 vMyx-SODKO-hTNF



【圖5】



【圖6】



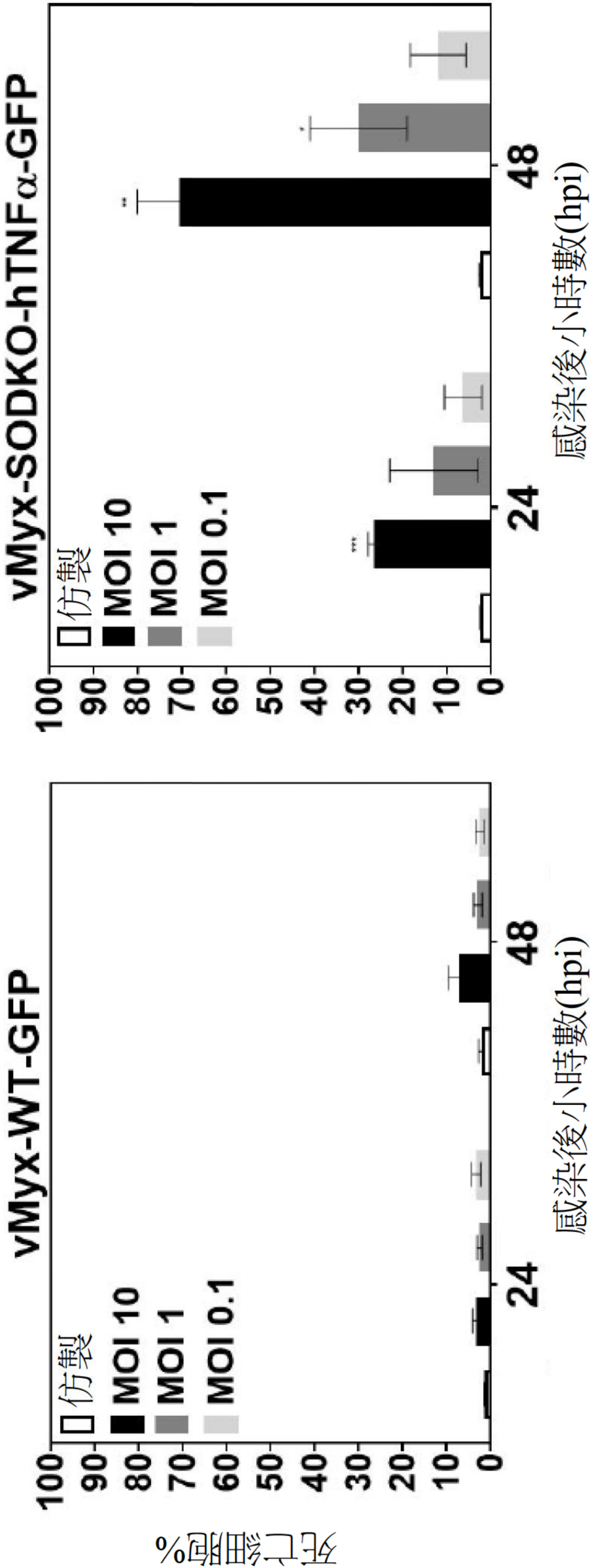
	樣品名稱	子集名稱	計數
■	TNF表現_2TNF.fcs	閘	2667
■	TNF表現_1TNF_a.fcs	閘	2124
■	TNF表現_uns_a.fcs	閘	4084
■	TNF表現_對照組-無病毒_a.fcs	閘	4766

【圖7】



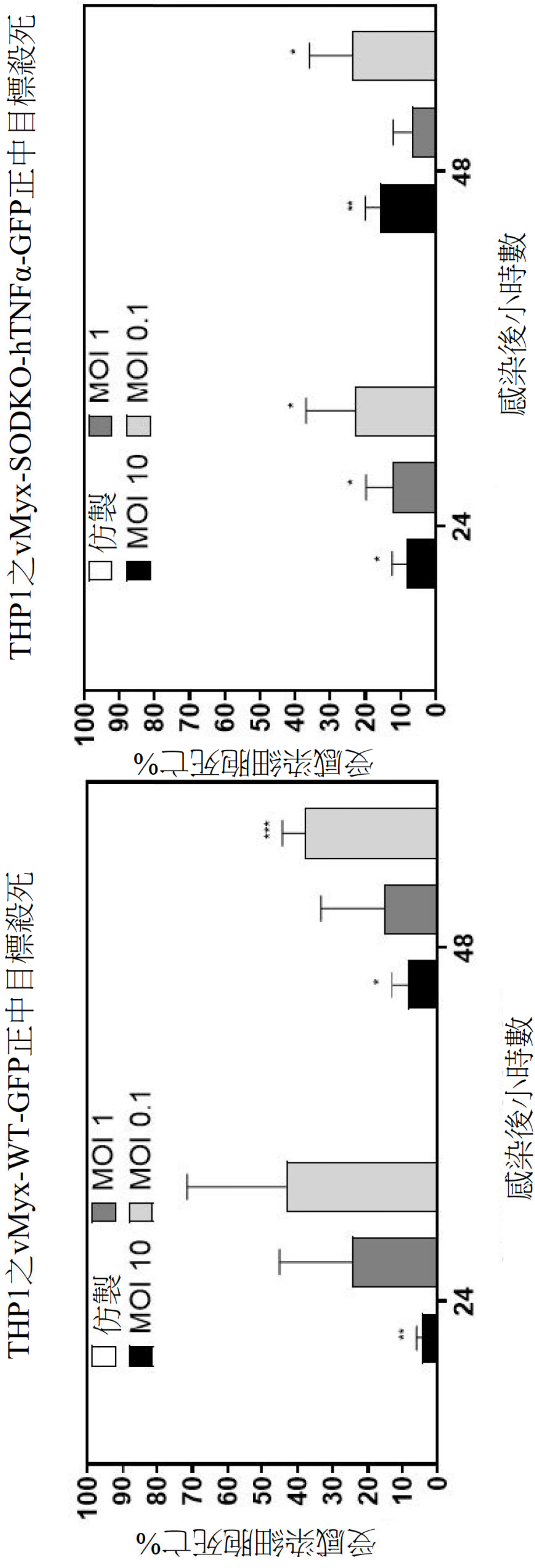
【圖8】

使用流動式細胞測量術定量受感染人類AML (THP1)細胞的細胞死亡



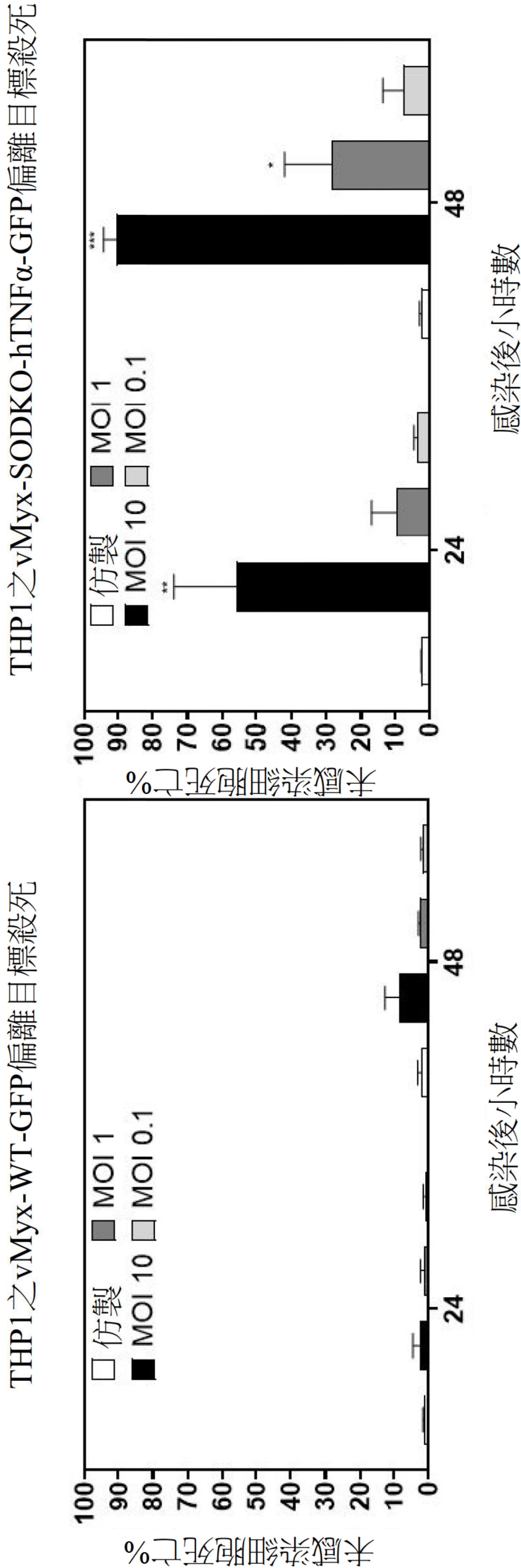
【圖9】

使用流動式細胞測量術定量受感染人類AML (THP1)細胞的正中目標殺死



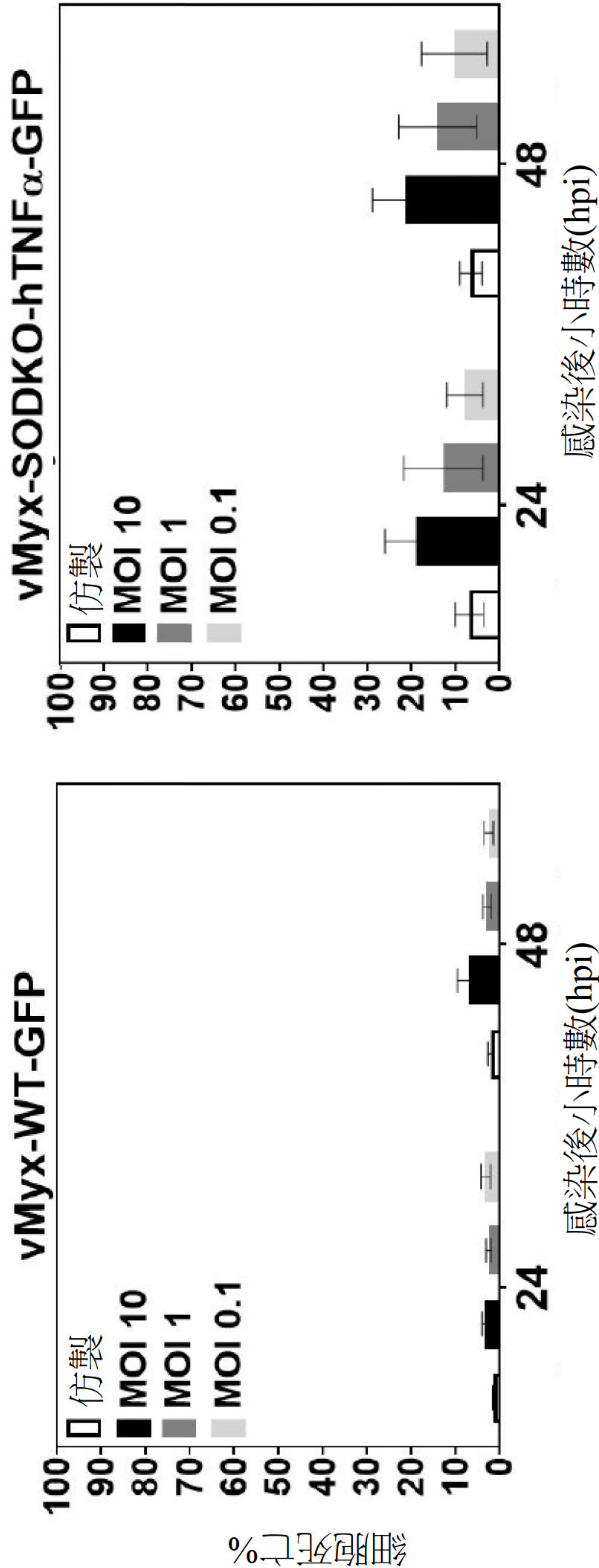
【圖10】

使用流動式細胞測量術定量未感染人類AML (THP1)細胞的偏離目標殺死

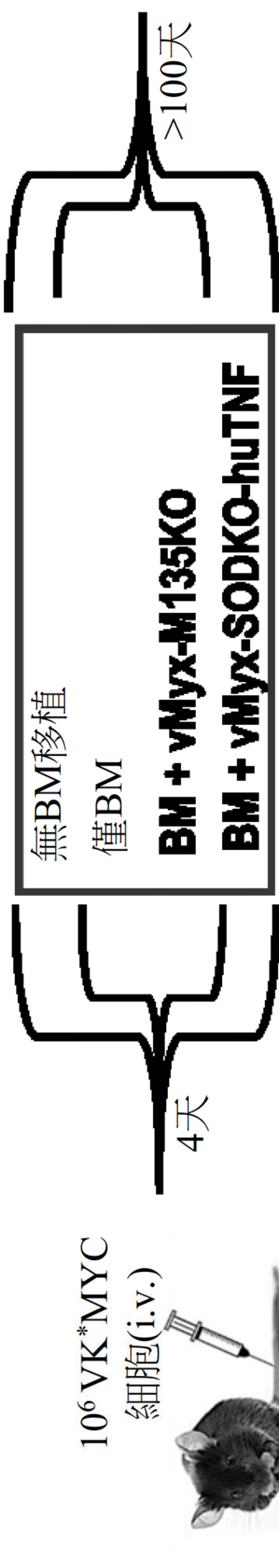


【圖11】

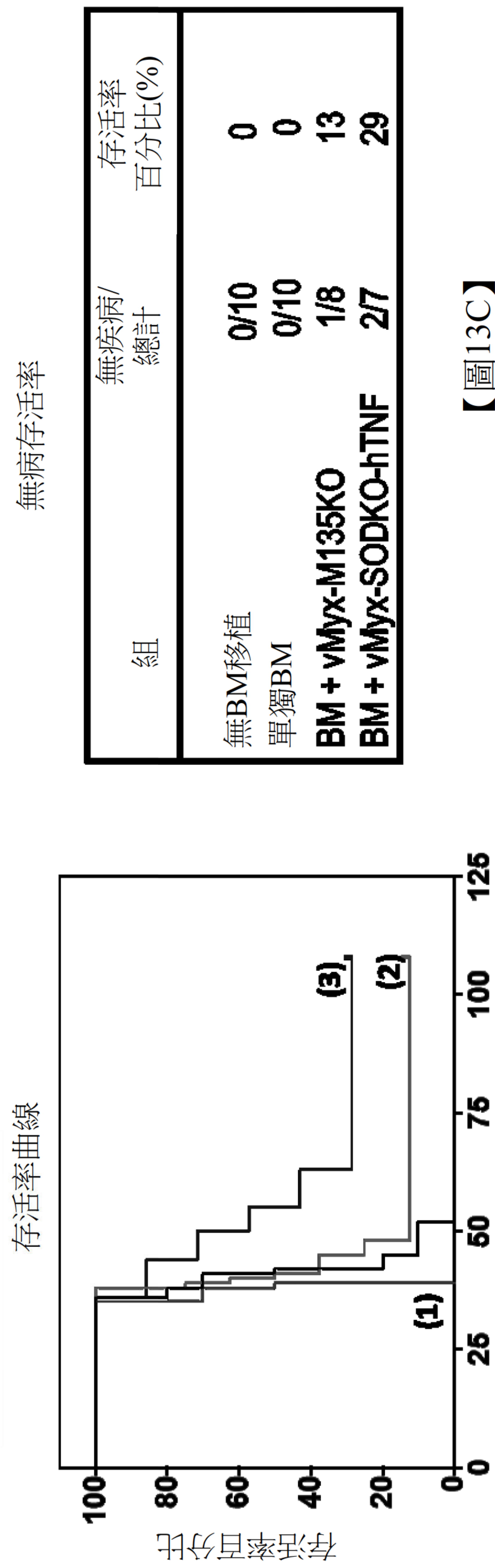
使用流動式細胞測量術定量受感染之人類MM (U266)細胞的細胞死亡



【圖12】

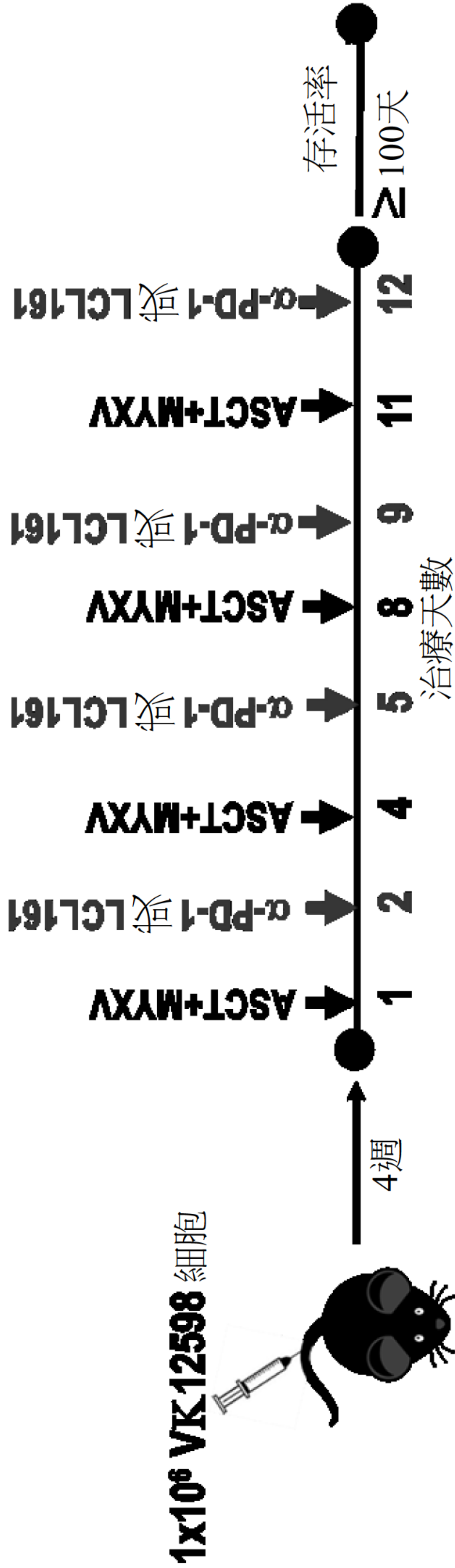


【圖13A】



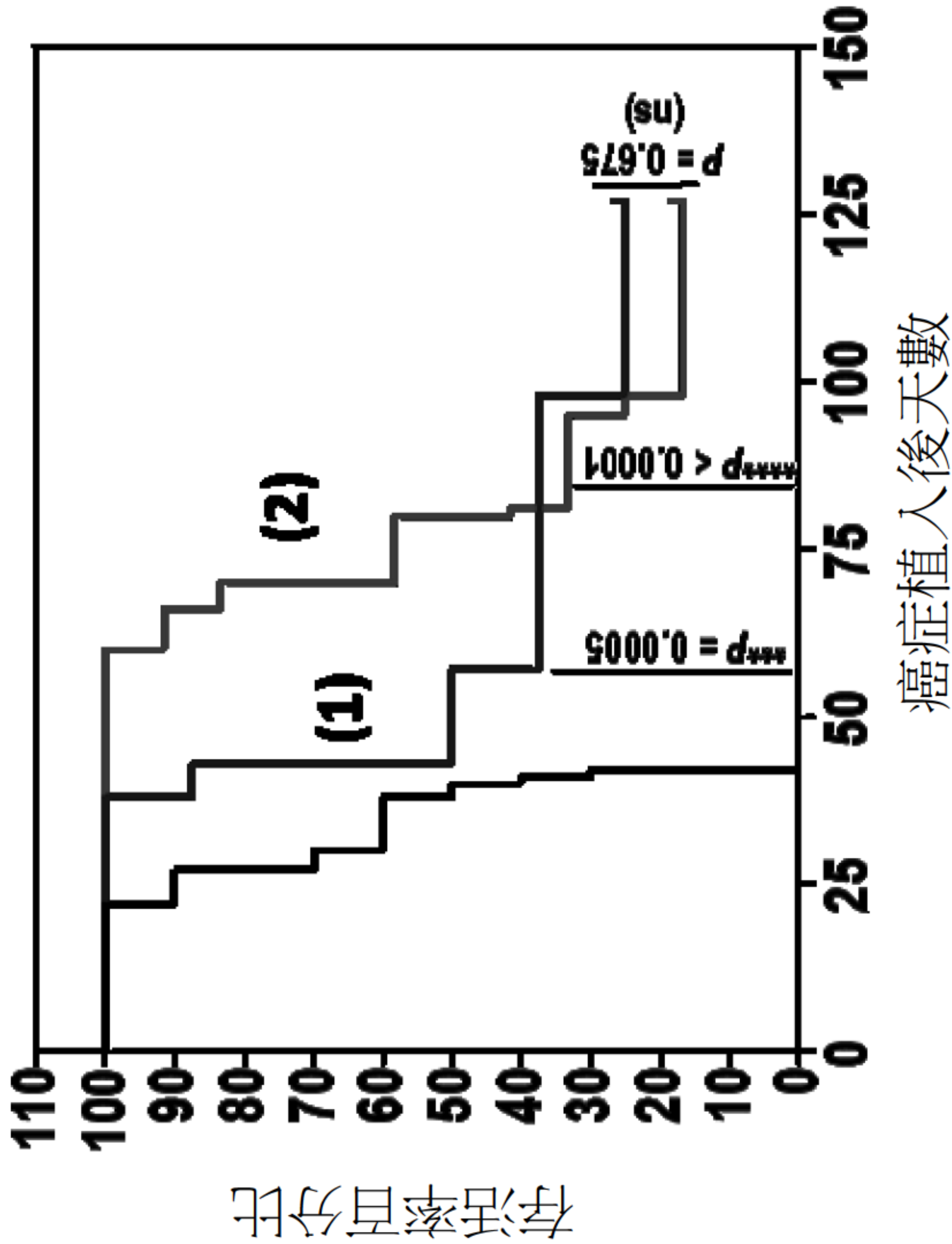
→ 無BM移植
→ **BM (1)**
→ **BM+vMyx-M135KO (2)**
→ **BM + vMyx-SODKO-TNF (3)**

【圖13B】



【圖14A】

存活率曲線

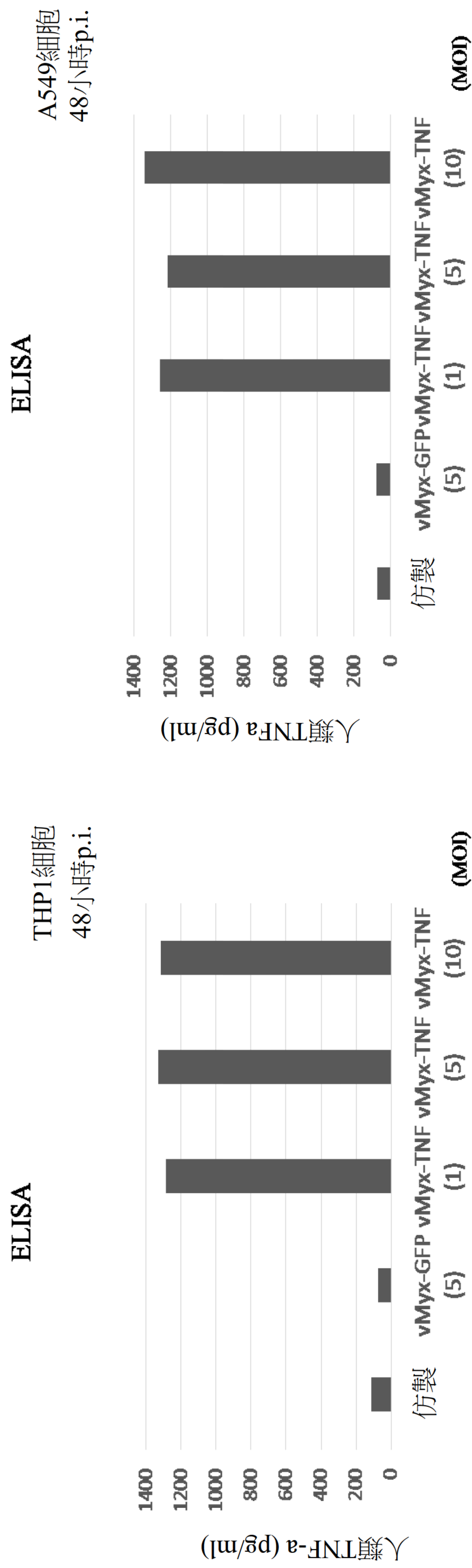


→ 無BM移植 → BM+vMyx-hTNF+α-PD-1 (1)
→ BM+vMyx-hTNF+LCL161 (2)

【圖14B】

組	無疾病/ 總計	存活率 百分比(%)
無BM移植	0/10	0
BM + MYXV + α-PD-1	2/8	25
BM + MYXV + LCL161	2/12	17

【圖14C】



【圖15】