



(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 201014607 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：098104858

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 02 月 16 日

(51)Int. Cl. : *A61K49/22 (2006.01)* *A61B8/08 (2006.01)*

(30)優先權：2008/10/13 美國 61/104,869

(71)申請人：國立臺灣大學(中華民國) NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (TW)
臺北市大安區羅斯福路 4 段 1 號

(72)發明人：黃麗華 HWANG, LIHHWA (TW)；陳文翔 CHEN, WENSHIANG (TW)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：6 共 37 頁

(54)名稱

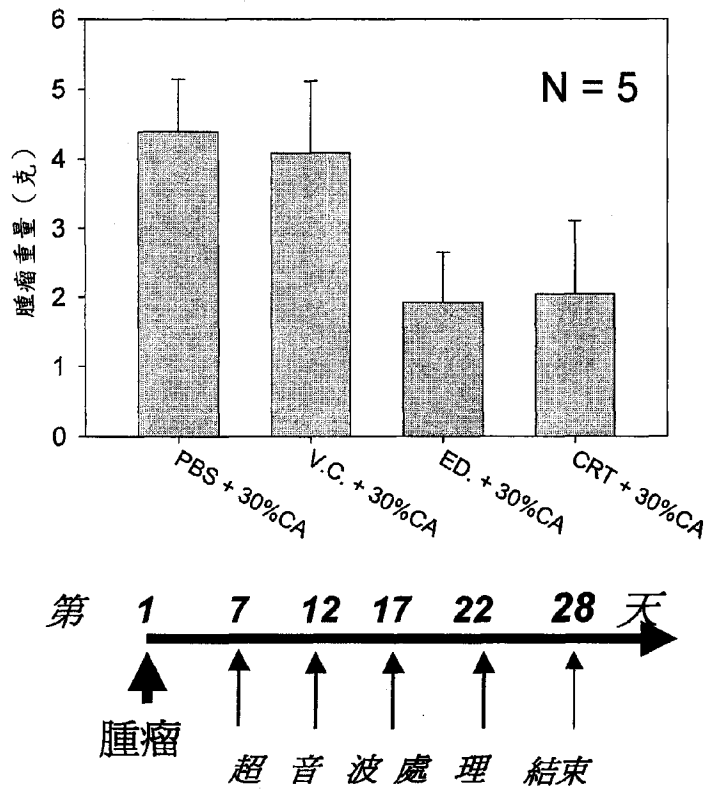
遠端治療腫瘤之組合物與其之音波傳送方法

ACOUSTICALLY DELIVERING METHODS AND COMPOSITIONS FOR REMOTE TREATMENT OF A TUMOR

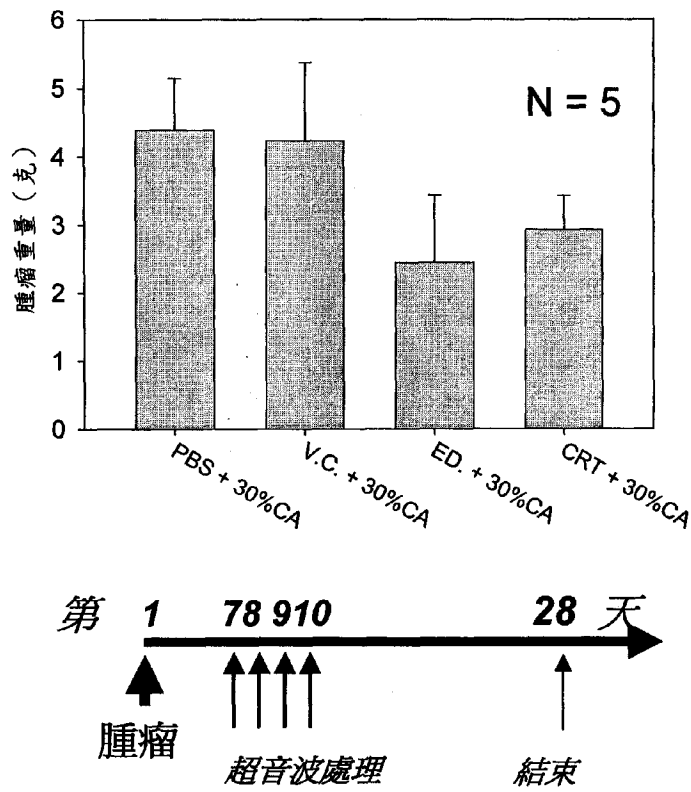
(57)摘要

在此揭示一種以聲波傳送治療性組合物到一已被診斷出罹患有腫瘤之個體身上的方法。所述方法包含以下步驟：從遠離該腫瘤之一位置處，以非經腸胃道方式(parenterally)施用該治療性組合物，且將該位置暴露在超音波下以傳送該組合物。此治療性組合物包含一有效量之一多胜肽或一可編碼出該多胜肽的質體核酸，該多胜肽或該質體核酸是懸浮在一分散介質中；和一有效量之一微氣泡顯影劑，其中該多胜肽是一血管生成抑制劑，且該治療性組合物可在不會誘發該個體產生錮病毒載體所致之免疫反應的風險下，減少該腫瘤的體積。

(A)



(B)





(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 201014607 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：098104858

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 02 月 16 日

(51)Int. Cl. : *A61K49/22 (2006.01)* *A61B8/08 (2006.01)*

(30)優先權：2008/10/13 美國 61/104,869

(71)申請人：國立臺灣大學(中華民國) NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (TW)
臺北市大安區羅斯福路 4 段 1 號

(72)發明人：黃麗華 HWANG, LIHHWA (TW)；陳文翔 CHEN, WENSHIANG (TW)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：6 共 37 頁

(54)名稱

遠端治療腫瘤之組合物與其之音波傳送方法

ACOUSTICALLY DELIVERING METHODS AND COMPOSITIONS FOR REMOTE TREATMENT OF A TUMOR

(57)摘要

在此揭示一種以聲波傳送治療性組合物到一已被診斷出罹患有腫瘤之個體身上的方法。所述方法包含以下步驟：從遠離該腫瘤之一位置處，以非經腸胃道方式(parenterally)施用該治療性組合物，且將該位置暴露在超音波下以傳送該組合物。此治療性組合物包含一有效量之一多胜肽或一可編碼出該多胜肽的質體核酸，該多胜肽或該質體核酸是懸浮在一分散介質中；和一有效量之一微氣泡顯影劑，其中該多胜肽是一血管生成抑制劑，且該治療性組合物可在不會誘發該個體產生錮病毒載體所致之免疫反應的風險下，減少該腫瘤的體積。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大致是關於用於治療已被診斷出罹患有腫瘤(pre-diagnosed with a tumor)之個體的方法與組合物。詳言之，本發明是有關於以音波傳送包含有血管生成抑制劑之核酸分子及微氣泡顯影劑(microbubble contrast agent)的組合物至被診斷出已罹患有腫瘤之個體身上。

【先前技術】

基因治療大致是指將治療基因傳送到個體之目標細胞中以使接受此基因的個體得以獲益的程序。為能有效地傳送治療基因到個體細胞中並於其中進行表現，必須先將這些治療基因插入至載體內，之後再將這些載有治療基因的載體傳送到個體細胞中。載體的功用在於可保護這些治療基因並使其能被安全地傳送到目標細胞的細胞核內，然後經解碼(即，表現)而產生具有治療效果的蛋白質。一般可將載體大致分成兩大類：病毒載體與非病毒載體。非病毒載體一般是先使非病毒載體與脂質、胜肽、蛋白質、不具活性的病毒顆粒或磷酸鈣結晶形成複合物，之後再透過自動吸收使細胞吸入上述的複合物；或是將治療基因鍍覆在噴射微粒上，再利用基因槍將這些微粒發射到目標細胞內，而達成傳送基因的目地。但是，透過非病毒載體來傳送基因的效率通常無法達到可產生實質效益的程度。相反的，病毒載體傳送基因的效率一般都比非病毒載體來得高。病毒載體是透過將病毒基因移除，並插入治療基因所

構築而成的。理論上，任何病毒都能當作病毒載體來使用，但其中以反轉錄病毒及腺病毒載體的使用最為廣泛。但是，想要讓病毒載體能夠被廣泛地使用，還必須克服一些其他問題。例如，病毒載體會誘發免疫反應(亦即，對病毒載體的免疫反應)，此不僅阻礙治療基因被傳送到目標細胞的過程，同時還會造成患者出現嚴重的併發症。在1999年執行的一項基因治療的臨床試驗中，患者即因為接受腺病毒載體進行基因傳送導致嚴重的免疫副作用而死亡(Beardsley T, February 2000, "A tragic death clouds the future of an innovative treatment method." *Scientific American*)。其它病毒載體，如慢病毒(lentiviruses)載體(其可將基因隨機插入宿主基因體中)，往往導致宿主細胞內基因功能被破壞進而產生癌症。在2002年進行的另一項組合使用免疫不足反轉錄病毒基因的臨床試驗中，兩位接受治療的患者後來也出現嚴重的白血病併發症(McDowell N, 15 January 2003, "New cancer case halts US gene therapy trials." *New Scientist*)。

因此，亟需研發出一種可成功傳送治療性基因到目標細胞內的方法，以及可多次重覆施用治療基因使治療效果達到最大且不會使患者因使用病毒載體進行基因傳送而出現嚴重併發症的方法。

【發明內容】

本案發明人意外發現可利用超音波來提高裸露的(naked)、質體核酸(plasmid nucleic acid)的傳送效率，特別是在質體中，而非病毒載體(如，腺病毒載體)中，負載有抗-血管生

成功能的核酸，此質體核酸是懸浮在生理食鹽水或緩衝溶液中，並從遠端的肌肉位置處，即，遠離個體之肝腫瘤 (hepatocellular carcinoma, HCC) 位置處，與微氣泡顯影劑 (microbubble contrast agent) 一同注射到個體體內，藉以減少 HCC 的體積同時不會引起一般因使用病毒載體而引起的免疫併發症。

因此，本發明目地之一在於提供一種以音波來增強傳送一治療性組合物到一已被診斷出罹患有腫瘤的個體身上的方法，包含：

(a) 以非經腸胃道方式 (parenterally) 從一遠離腫瘤的位置處，施用該治療性組合物，且該治療性組合物包含：

一有效量之至少一多胜肽或至少一可編碼出該多胜肽的質體核酸，該多胜肽或該質體核酸是懸浮在一分散介質中；

一有效量之一微氣泡顯影劑；和

(b) 將步驟(a)中的該位置暴露在超音波下，以增強傳送該治療性組合物；

其中，該多胜肽是一血管生成抑制劑，且該治療性組合物可減少該腫瘤的體積。

上述的血管生成抑制劑是選自由 α -干擾素 (interferon alpha, IFN- α)、 β -干擾素 (interferon beta, IFN- β)、 γ -干擾素 (interferon gama, IFN- γ)、白介素-4 (interlukin-4, IL-4)、白介素-8 (interlukin-8, IL-8)、白介素-12 (interlukin-12, IL-12)、白介素-18 (interlukin-18, IL-18)、血小板因子-4 (platelet-4)、血管內皮生長因子-2 (angiopoietin-2)、血管生成因子

(angiostatin)、血管內皮抑制素(endostatin, ED)、骨橋素(osteopontin)、乳腺絲氨酸蛋白酶抑制劑基因(marray serine proteinase inhibitor, maspin)、血管生成抑制素(canstatin)、分泌性糖化素相關蛋白質(proliferin-related protein)、泌乳激素(prolactin)、鈣網蛋白(calreticulin, CRT)。在一實例中，此血管生成抑制劑是ED。在另一實例中，此血管生成抑制劑是CRT。腫瘤則可以是以下任一種，包括：肺癌、結腸癌、胃癌、乳癌、肝癌、黑色素瘤(melanoma)、多形性膠質母細胞瘤(glioblastoma)、腦癌、惡性造血細胞瘤(hematopoeitic malignancies)、視網膜母細胞瘤(retinoblastoma)、腎腫瘤(renal cell carcinoma)、頭部與頸部腫瘤、子宮頸癌(cervical cancer)、膀胱癌(esophageal cancer)和鱗狀上皮細胞癌(squama cell carcinoma)。在一較佳實施方式中，所述腫瘤為肝腫瘤。上述非經腸胃道的施用方式包括肌肉注射。分散介質可以是水、緩衝溶液、等張性氯化鈉溶液、油或脂肪酸。微氣泡顯影劑則是任一種選自以下的物質：ALBUNEX®、SONOZOID®、SONOVUE®、SONOVIST®、OPTISON®、LEVOVIST® 或 DEFINITY®。在一實例中，此微氣泡顯影劑是 SONOVUE®。在一較佳實施方式中，核酸與微氣泡顯影劑是以 7:3(體積/體積)的比例混合。所施用的超音波強度在約 $0.5\sim 4\text{ W/cm}^2$ 間，且施用期間約在 1~30 分鐘之間。在一較佳實施方式中，所施用的超音波強度約為 2 W/cm^2 ，且施用期間約為 10 分鐘。所述組合物可以間歇式(intermittently)或連續式(consecutively)施用到個體身上。在一實例中，所述組合物是以間歇式方式施用，例如，每隔 2~7 天即以 $10\text{ }\mu\text{g}\sim 10\text{ mg}$ 質體核酸/公斤體重或是 $1\text{ mg}\sim 100\text{ mg}$ 多肽/公斤體重的劑量施用至少 4 次。在另一實例中，所述組

合物是以連續式方式施用，例如，每天以 10 μg ~10mg 質體核酸/公斤體重或是 1 mg~100mg 多胜肽/公斤體重的劑量連續施用至少 4 天。在一方面，所述方法可更包含在施用本發明組合物之前、同時或之後，對個體施用一化學性治療藥劑(a chemotherapeutic agent)。此化學性治療藥劑可以是以下任一種，包括：順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、草酸鉑(oxaliplatin)、硫唑嘌呤(azathioprine)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、溫諾平(vinorelbine)、長春花鹼鹽胺(vindesine)、紫杉醇(paclitaxel)、異丙氧代苯紫杉醇(docetaxel)、喜樹鹼(camptothecins)、抗癌妥(irinotecan)、脫癌妥(topotecan)、安吡啶(amsacrine)、鬼臼乙叉甙(etoposide)、磷酸鬼臼乙叉甙(etoposide phosphate)、替尼泊苷(teniposide)、放線菌素 D (dactinomycin)、賀癌平(trastuzumab)、愛必妥(cetuximab)和美羅華(rituximab)。在另一方面，所述方法更包含在對個體施用本發明治療組合物之前、同時或之後，另對個體施用一載有可編碼產生 GM-CSF、IL-12、ED 或 PEDF 多胜肽之核酸的腺病毒載體。在一較佳實施方式中，所述腺病毒載體是在對個體施用本發明治療性組合物之前，先經由腫瘤內施用(intratumorally)途徑而被施用到所述個體之腫瘤內。

本發明另一方面是可提供一種利用音波傳送到一個體中以治療一腫瘤的治療性組合物，包含：一有效量之一多胜肽或一可編碼出該多胜肽的質體核酸，該多胜肽或該質體核酸是懸浮在一分散介質中；和一有效量之一微氣泡顯影劑；其中該多胜肽是一血管生成抑制劑，且相較於控制組而言，該治療性組合物至少可使該腫瘤的體積減少一半。在一較佳實施方式中，所述血管生成抑制劑是 ED 或 CRT，且該微氣泡顯影劑是

SONOVUE®，所述分散介質是一緩衝溶液且核酸與微氣泡顯影劑是以 7:3(體積/體積)的比例混合。依據本發明一較佳實施方式，此治療性組合物是以間歇式或連續式方式施用到亟需治療的個體身上。另一方面，此治療性組合物是在該個體接受一化學性治療藥劑之前、同時或之後，施用到該個體身上。在另一實例中，此治療性組合物是在在該個體接受一載有可編碼產生 GM-CSF、IL-12、ED 或 PEDF 多胜肽之核酸的腺病毒載體之前、同時或之後，施用到該個體身上。在一實施方式中，此腺病毒載體是在對個體施用本發明治療性組合物之前，先經由腫瘤內施用(intratumorally)途徑而被施用到所述個體之腫瘤內。

綜合上述，本發明透過對一已被診斷出罹患腫瘤的個體，從遠離該腫瘤之位置的一遠端處，經由肌肉注射一血管生成抑制劑之核酸分子到該個體體內，並藉助超音波傳送該核酸分子，而達成縮減至少一半腫瘤體積的目地。較佳是，本發明的治療性核酸分子是載入至一質體中，因而排除使接受注射的個體發展出過去常因接受病毒載體導致宿主出現免疫反應之風險。本發明的組合物和/或方法也可透過從一遠離腫瘤的遠端位置處(例如，四肢)施用，而非腫瘤內施用，而能克服先前技藝之組合物和/或方法常見的缺點，此也使得本發明的組合物和/或方法更容易使用，因為，大多數的腫瘤都是位在個體體內不易從表面接觸到的位置。此外，本發明的組合物和/或方法還可被重覆施用到個體身上數次(例如，至少 4 次，參見實施例)，以達成最佳治療效果(例如，縮減腫瘤體積至少一半)。

以下將參照詳細說明、附圖與請求範圍進一步說明本發明的這些特徵、優點與目地。

【實施方式】

在此揭示用以治療一已被診斷出罹患有腫瘤之個體的方法及組合物，其係從該個體身上遠離該腫瘤之一位置處，將懸浮在適當介質中之一血管生成抑制劑的質體核酸注射到肌肉內，並藉超音波之助，將該質體核酸傳送到個體體內。

將超音波用來顯影人體已持續至少半世紀之久，並已成為現代醫學中廣泛使用的診斷工具之一。顯影強化超音波乃是傳統音波學中超音波顯影劑的應用之一。超音波顯影劑乃是內含有填充氣體的微氣泡，一般從血管中施加到循環系統中，並可因微氣泡中氣體與圍繞人體軟組織間的回音(echogenicity)差異而能反射超音波並產生具有較佳對比的獨特影像。因此，傳統上是以超音波顯影劑來顯示器官中血液流動的情形、並測量心臟的血液流量等。近來，也將微氣泡配方成為可攜帶治療性藥劑。可將疏水性化合物包埋在用來使微氣泡穩定的脂膜或聚合性殼層中。已有人使用鍍覆有白蛋白的微氣泡做為可傳送報導基因(包含在腺病毒基因載體中)到小鼠心臟的工具(Shohet *et al.*, "Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium." *Circulation* 2000 101:2554-2556)。本申請案發明人則是利用超音波媒介的微氣泡破裂做為一種傳送工具，以便在活體內將一治療性基因，特別是血管生成抑制劑的基因，送至定位，該基因是被載入至一質體中，而非被包含在一病毒載體內，並懸浮在一生理食鹽水或緩衝溶液中，並以音波傳送至一已被診斷出罹患有腫瘤之個體身上，藉以成功地排除過去經常與病毒基因治療相關的因載體所引發的免疫反應，且本發明改良方法內的治療性基因還可被重

覆施用數次，而沒有一般病毒基因治療常見的只能施用一次的限制，因此可使治療效果達到最好。可使用任何適當的質體來實施本發明，且此領域中具有通常技藝的人士可在不需過度實驗的情況下挑選出適當可用來實施本發明的質體載體。

因此，本發明特徵在於提供用來治療一已被診斷出罹患有腫瘤之個體的方法與組合物。

在一方面，本發明提供一種用來治療一已被診斷出罹患有腫瘤之個體的方法，其係透過從遠離該腫瘤之一位置處，注射一治療性組合物，並將該注射位置暴露在超音波下，以增強傳送該治療性組合物。此治療性組合物包含一有效量之至少一多胜肽或至少一可編碼出該多胜肽的質體核酸，該多胜肽或該質體核酸是懸浮在一分散介質中；和一有效量之一微氣泡顯影劑；其中該多胜肽是一血管生成抑制劑，且相較於控制組而言，該治療性組合物至少可使該腫瘤的體積減少一半。

上述之血管生成抑制劑乃是一種可抑制新生血管的物質。每一種固體腫瘤都需要產生新血管來幫助其生存，一旦此腫瘤體積達到一定大小之後。通常成人體內不會產生新血管，除非該處需要進行非常活躍的組織修復。抗血管生成劑(例如，ED)可抑制血管的構築，防止腫瘤無限制的擴張。恰當可用於本發明中的血管生成抑制劑包括(但不限於) IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL -4、IL -8、IL -12、IL -18、血小板因子-4、血管內皮生長因子-2、血管生成因子、血管內皮抑制素(ED)、骨橋素、乳腺絲氨酸蛋白酶抑制劑基因(maspin)、血管生成抑制素、分泌性糖化素相關蛋白質、泌乳激素、鈣網蛋白(CRT)。在一實例中，

此血管生成抑制劑是 ED。在另一實例中，此血管生成抑制劑是 CRT。

微氣泡顯影劑有許多種，一般是由一殼層與一氣體核心共同組成。殼層材料的選擇決定一微氣泡被免疫系統吸收的難易與否。親水性愈高的材料愈容易被吸收，因此可減少微氣泡在循環系統中的滯留時間，並因而減少其可供顯影用的時間。殼層材料的選擇，也會影響微氣泡的機械可撓性(mechanical elasticity)。材料愈具可撓性，微氣泡破裂前所能承受的音波能量也愈高。目前，微氣泡一般是由白蛋白、半乳糖、脂類或聚合物所構成。氣體核心是超音波顯影劑中最重要的部分，因為其決定回音的性質。當氣泡被超音波頻率域固持住時，氣泡會被壓縮、震盪並反射一特徵性回音，因此可在顯影強化的超音波中產生強且獨特的音波圖。氣體核心一般是由空氣或諸如八氟丙烷、全氟化碳、六氟化硫或氮氣之類的重氣體所組成。重氣體的水溶性低，因此不易從微氣泡中滲漏出去而破壞了回音性質。經美國食品藥物管理局(Food and Drug Administration, FDA)核准使用的第一種微氣泡是 OPTISON® (GE healthcare 製造)，其是由白蛋白殼層與八氟丙烷(C_3F_8)氣體核心所組成。第二種經 FDA 核准使用的微氣泡是 LEVOVIST® (美商先靈葆雅製造)，其是由棕櫚酸/半乳糖殼層與空氣核心所組成。微氣泡的其他實例還包括，但不限於，ALBUNEX® (Molecular Biosystems 製造)、SONOZOID® (美商先靈葆雅製造)、SONOVUE® (Bracco Diagnostics, Inc 製造)、SONOVIST® (美商先靈葆雅製造)和 DEFINITY® (杜邦製藥所製造)。ALBUNEX®是一種由白蛋白殼層與空氣核心所組成的微氣泡。SONOVUE®則包含一種穩定在一單層磷脂水性分散液中的六氟

化硫(SF_6)氣體核心。SONOZOID®是另一種微氣泡製備物，包含全氟化碳氣體核心與脂質殼層。DEFINITY®是另一種經FDA核准使用的微氣泡，其包含脂質殼層與八氟丙烷(C_3F_8)氣體核心。在一較佳實施方式中，所使用的微氣泡顯影劑是 SONOVUE®。

本發明另一方面是提供一種用來治療腫瘤的治療性組合物。此組合物是透過將一可編碼產生一血管生成抑制劑的質體核酸與一微氣泡顯影劑(例如，SONOVUE®，依據製造商的指示說明來準備)，以約 9:1 至 1:9 (體積/體積)的比例，較佳是以約 4:1 至 1:4 (體積/體積)的比例，更佳是以約 7:3 (體積/體積)的比例，混合後所製備而成的。此質體核酸是懸浮在諸如水、磷酸緩衝溶液、生理食鹽水、油或脂肪酸之類的適當分散介質中。如此製備而成的治療性組合物可以非經腸胃道、吸入性噴霧、表面塗抹、直腸、鼻腔、頰內或陰道等途徑來施用。「非經腸胃道(parenterally)」一詞在此包括皮下、血管內、肌肉內、動脈內、滑液內、胸內、氣管內、肝臟內、瘡傷內和顱內注射或灌注技巧等。較佳是以肌肉內、腹膜內或血管內注射來施用本發明組合物，更佳是以肌肉內注射來施用本發明組合物。在一實例中，本發明組合物是從一個體四肢之一(例如，手或腳)的肌肉上一位置處進行注射。適合注射的身體部分是依據以下條件進行挑選，例如，所選擇預備釋出的質體核酸或多胜肽種類，個體的個人情況，包括性別、年齡、體重和/或現在前與先前的醫療情況等。有經驗的醫師可在不需過度實驗的情況下決定出適合進行注射的身體位置。在一實例中，所挑選用於注射的身體部分為人類一上臂區域。本發明組合物之無菌注射形式可以是水溶液或是油狀懸浮液。可依據目前已知的技術，使用

適當的分散液或濕潤劑與懸浮劑來為上述的懸浮液進行配方。此無菌、注射配方也可以是溶解或懸浮於無毒之注射可接受的稀釋劑或溶劑內的無菌注射溶液或懸浮液，例如溶解在1,3-丁二醇中的溶液。可使用的載體與溶劑為水、林格氏溶液(Ringer's solution)、磷酸緩衝溶液及氯化鈉等張溶液(即，生理食鹽水)。除此外，還可使用一般做為溶劑或懸浮介質的固定油(fixed oils)。為此，可使用任何品牌的固定油，包括合成的單-或二-甘油酯。諸如油酸之類的脂肪酸及其之甘油酯衍生物，以及藥學上可接受的天然油類(例如，橄欖油、菜籽油，特別是其之聚氧乙撐形式)，也可用來製備可供注射的製劑。這些油類溶液或懸浮液中也可包含有長鏈醇稀釋劑或分散劑，例如一般常用來配方藥學上可接受劑型(包括乳化液和懸浮液)的羧甲基化纖維素或類似的分散劑。配方時也可使用一般常用來製備藥學上可接受固體、液體或其他劑型時，所經常會用到的介面活性劑，如，Tweens、Spans 和其他乳化劑或可增強生物可利用性的藥劑。所需劑量將視所欲施用的途徑，配方性質，個體之疾病情況，個體體重、表面積、年齡和性別，其它一同施用的藥劑，以及主要照護醫師的決定而定。適當的劑量在 $10\text{ }\mu\text{g}\sim 10\text{mg}$ 質體核酸/公斤體重或是 $1\text{ mg}\sim 100\text{mg}$ 多胜肽/公斤體重間。視所欲使用的血管生成抑制劑種類及施用途徑之效率，可適當地改變所施用劑量的範圍。此領域中習知技藝人士可依據上述資訊，輕易地評估相關因素，而決定出恰當的劑量。

接著，將個體身上接受注射的位置暴露在強度約在 $0.5\sim 4\text{ W/cm}^2$ 間之治療性超音波下約 $1\sim 30$ 分鐘。在一較佳實施方式中，將此注射位置暴露在強度約 2 W/cm^2 間之治療性超音波下

約 10 分鐘。一般認為暴露在超音波下有助於將本發明的治療性組合物傳送到腫瘤位置，使所編碼的血管生成抑制劑可被表現，因而抑制腫瘤區域內的新生血管過程，進而達成治療效果（即，縮減腫瘤體積）。

本發明特徵在於可用來治療一已被診斷出罹患有腫瘤之個體的方法與組合物。「個體(subject)」一詞在此指人類與非人類的動物。非人類的動物實例包括所有脊椎類動物，例如哺乳類動物，如，靈長類、狗、啮齒類（如，小鼠與大鼠）、貓、羊、馬或豬；和非哺乳類動物，例如鳥類、兩棲類、蜥蜴類等。在一較佳實施方式中，此個體微人類。腫瘤或癌的實例包括胰臟癌、肺癌、結腸癌、胃癌、乳癌、肝癌、黑色素瘤(melanoma)、多形性膠質母細胞瘤(glioblastoma)、腦癌、惡性造血細胞瘤(hematopoeitic malignancies)、視網膜母細胞瘤(retinoblastoma)、腎腫瘤(renal cell carcinoma)、頭部與頸部腫瘤、子宮頸癌(cervical cancer)、膀胱癌(esophageal cancer)和鱗狀上皮細胞癌(squama cell carcinoma)。在一實施方式中，所述個體係已被診斷為罹患有肝腫瘤。此個體在接受本發明方法和/或組合物之治療前，已接受過「醫療(medical treatment)」。「醫療(medical treatment)」u 一詞在此指的是一般常用來治療腫瘤病患的手術治療或是放射線治療。本申請案發明人在 2008 年 8 月 22 日提申的美國專利申請案 12/229,389 中，曾報導過載有至少一選自 GM-CSF、IL-12、ED 或 PEDF 之基因的腺病毒載體可以有效地治療小鼠和/或大鼠之肝腫瘤。因此，為擴大基因治療的抗癌效果，上述已被診斷罹患有腫瘤的個體也可在接受本發明方法和/或組合

物之治療之前、同時或之後，接受腺病毒載體的治療。在一實例中，個體在接受本發明方法和/或組合物之前，先以上述的腺病毒載體進行治療。腺病毒載體中所編碼的治療基因為至少一選自 GM-CSF、IL-12、ED 或 PEDF 之基因。

本發明範疇也包括組合使用本發明之組合物與一化學治療藥劑，以增強抗癌效果。化學治療藥劑可在施加本發明組合物之前，同時或之後施加至個體身上。此化學治療藥劑可選自以下任一種，包括：順鉑 (cisplatin)、卡鉑 (carboplatin)、草酸鉑 (oxaliplatin)、硫唑嘌呤 (azathioprine)、巯基嘌呤 (mercaptopurine)、長春新鹼 (vincristine)、長春鹼 (vinblastine)、溫諾平 (vinorelbine)、長春花鹼鹽胺 (vindesine)、紫杉醇 (paclitaxel)、異丙氧代苯紫杉醇 (docetaxel)、喜樹鹼 (camptothecins)、抗癌妥 (irinotecan)、脫癌妥 (topotecan)、安吖啶 (amsacrine)、鬼臼乙叉甙 (etoposide)、磷酸鬼臼乙叉甙 (etoposide phosphate)、替尼泊苷 (teniposide)、放線菌素 D (dactinomycin)、賀癌平 (trastuzumab)、愛必妥 (cetuximab) 和美羅華 (rituximab)。

所有用於本文中的縮寫字與簡稱均與化學及生物領域中相關期刊中用語具有相同的意義。

除了操作例之外，或除非特別指出，否則所有用來表示組成份用量或含量、反應條件等之數字，均為一約略數字。因此，除非出現相反指示，否則本發明說明書中的數字將視所欲達成的效果而略有不同。

為不限於特定數字範圍，在本說明書中所使用的數字已儘可能精確，但需知在不偏離本發明範疇下，所有數字仍容許其具有一定的誤差範圍。

以下，將參照實施方式與附圖說明本發明，在可能的範圍內，相同元件將以相同元件符號來表示。

實施例

材料與方法

細胞株與實驗動物

小鼠肝腫瘤細胞株 BNL 和人類胚胎腎細胞株 293 均購自美國類型培育物收集中心(American Type Culture Collection, Rockville, MD)。將兩細胞株維持在內含 10% 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)(Biological Industries, Israel)的 DMEM 培養基中(Dulbecco's modified Eagles's medium, DMEM)(Sermed, Berlin, Germany)。用於本實驗的動物是約 7~8 週齡之 BALB/c 雄性小鼠以及約 6~7 週齡之 Wistar 雄性大鼠。所有動物實驗均遵照國立台灣大學醫學院動物福利委員會所頒訂的標準進行作業。

製備質體 DNA

以 pcDNA3 載體(Invitrogen, San Diego, CA)來構築可編碼產生 ED 或 CRT 之質體。將此 ED 或 CRT 的 cDNA 轉植到巨細胞病毒(cytomegalovirus, CMV)之立即早期基因啟動子下游，並以大腸桿菌來放大兩表現質體，之後以 QIAGEN EndoFreeTM 來純化兩質體 DNA。

建構腺病毒載體

以先前引述之文章(Tai KF *et al.* J Gene Med 2003; 5:386-398)中所提及的 AdEasy 系統(He TC *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:2509-2514)來構築包含有小鼠 GM-CSF cDNA、IL-12 cDNA、ED cDNA、PEDF cDNA 或 GFP 基因之腺病毒載體，並分別稱其為 Ad/GM-CSF、Ad/IL-12、Ad/ED、Ad/PEDF 及 Ad/GFP。Ad/IL-12 是由國

立台灣大學附設醫院之江伯倫醫師實驗室所提供，其為一種包含有可編碼產生兩條 IL-12 次單元 (p35 和 p40，其中由一條多胜肽加以連接) 的小鼠單鏈 IL-12 基因的腺病毒載體 (Lee YL et al. Hum Gene Ther 2001; 12:2065-2079)。此重組的腺病毒是以人類胚胎腎細胞株 293 所製備而成的。在以病毒感染後，將細胞株裂解並純化出病毒顆粒，儲存在冷凍條件下直到欲使用時才解凍。

產生原位肝腫瘤 (orthotopic liver tumor) 及其之體內基因治療

誘發式腫瘤模型 (inoculated tumor model) 實驗開始第 1 天，從皮下將 3×10^5 個 BNL 細胞注射到實驗小鼠的左葉肝臟上，以誘發產生原位肝癌 (5×10^5 細胞/注射)。注射完，抽離針頭時立即以電凝結器 (Aaron, Petersburg, Florida, USA) 將注射位置封住，以避免所注入的 BNL 細胞從注射位置處滲出。

進行超音波治療時，從實驗動物小腿肌肉處注射入 $10 \mu\text{g}$ 的質體 DNA 溶液，接著於指定時間，將該肌肉注射位置暴露在超音波下 (2 W/cm^2 , 10 分鐘)。質體 DNA 溶液的製備方式如下：從容器中抽出 $10 \mu\text{l}$ 的 SONOVUE® (Bracco Diagnostics, Inc. USA) 並加入 $20 \mu\text{l}$ 的生理食鹽水 (其中含有 $100 \mu\text{g}$ 的 ED-或 CRT-質體 DNA 或是空的質體載體)，並充分混合。SONOVUE® 在注射溶液中的最終濃度為 30%。以卡尺 (calipers) 測量出腫瘤尺寸，並依如下公式計算出體積：體積 = 寬度² x 長度 x 0.52。在組合使用腺病毒載體與本發明超音波治療時，首先於植入腫瘤後第 14 天，單次注射 $30 \mu\text{l}$ 的腺病毒載體 (1×10^9 Ad/LacZ、 0.5×10^9

Ad/GM-CSF + 0.5×10^9 Ad/IL-12(即, Ad/G+I)); 接著, 在所指示時間, 依照上述條件, 進行以本發明質體 DNA 進行的超音波治療。

多發性肝腫瘤模型 (multifocal HCC tumor model)

從實驗開始第一週起, 每天餵食 Wistar 大鼠二乙基硝化胺(diethylnitrosamine, DEN)溶液, 濃度從約 100 ppm 開始, 持續約 6 週。每週測量每組約 5 隻動物的平均體重(BW), 並依據每組動物相對於其第一週的平均體重, 來調整飲用水中的 DEN 濃度。經過 6 週後, 則改為供應正常飲用水 6 週, 使腫瘤有機會持續長大。進行超音波治療時, 每次從肌肉注射質體 DNA 溶液, 接著將該肌肉注射位置暴露在超音波下(2 W/cm^2 , 10 分鐘)。除了以 $200 \mu\text{g}$ 的質體 DNA(其中含有空的質體載體、或是 ED-或 CRT-質體 DNA)來取代 $100 \mu\text{g}$ 的質體 DNA 外, 大致依據前述方式來製備質體 DNA 溶液。在組合使用腺病毒載體與本發明超音波治療時, 首先從通往肝臟的大靜脈注射 $100 \mu\text{l}$ 的腺病毒載體(劑量如上述); 接著, 在所指示時間, 依照上述條件, 進行以本發明質體 DNA 進行的超音波治療。治療後, 將實驗動物犧牲, 並取下其肝臟所有葉片, 秤重, 並測量肝臟葉片表面上顯微鏡可見之直徑約 5 毫米的結節。以直徑大於約 3 毫米之腫瘤結節的總體積來代表腫瘤負荷(tumor burdens)。

結果

以聲波傳送 ED 或 CRT 質體 DNA 可有效縮減小鼠原位肝腫瘤體積

依據上述方法在小鼠身上誘發產生原位肝腫瘤。通

常，在植入腫瘤後第 7 及 14 天後，可分別觀察到各約 $10\sim 20\text{ mm}^3$ 及 $60\sim 100\text{ mm}^3$ 的腫瘤負荷。在本研究中，採行兩種不同的超音波操作程序(間歇式及連續式)，來傳送可治療皮下肝腫瘤的質體 DNA。在間歇式操作程序中，每隔 7 天即從肌肉注射質體 DNA 溶液，並實施至少 4 次；在連續式操作程序中，則是每天從肌肉注射質體 DNA 溶液，並連續注射至少 4 天。

第 1A 圖顯示以間歇式超音波治療之小鼠身上腫瘤體積的變化，其中超音波治療是分別在腫瘤植入後第 1、7、14 及 21 天實施。相較於控制組動物來說，實驗組動物在以 ED 或 CRT 質體 DNA 進行 4 次的間歇式超音波治療後，可發現腫瘤體積縮減了約 $1/4$ 至約 $1/2$ 。在第 28 天實驗結束後，將實驗動物犧牲，取其肝臟秤重後，進一步證實上述結果。接受超音波治療之實驗組小鼠的肝臟平均重量約為控制組動物肝臟平均重量的 $2/9$ 至 $4/9$ 間(參見第 2A 圖)。

第 1B 圖顯示以連續式超音波治療之小鼠身上腫瘤體積的變化，其中超音波治療是分別在腫瘤植入後第 1、2、3 及 4 天實施。第 2B 圖則示出在第 28 天實驗結束後，以連續式超音波治療之小鼠肝臟的平均重量變化。一如上述間歇式治療所發現的結果，相較於控制組，在接受 ED 或 CRT 質體 DNA 治療的小鼠身上，其腫瘤體積以及腫瘤平均重量均顯著地縮減。

同時，還可發現在縮減腫瘤體積這件事上，ED 的效果比 CRT 好，此可由第 28 天後測得的腫瘤重量確認(參閱第 1 及 2 圖)；此外，間歇式超音波治療效果也比連續

式超音波治療效果來得佳(參閱第 1 圖)。

類似的結果也出現在具有 7 天大原位肝癌的小鼠身上。結果示於第 3 圖。無論是間歇式地(第 3A 圖)或連續式(第 3B 圖)地施用超音波治療，均可縮減腫瘤重量至少 50%(相較於控制組動物來說)。接受 ED 或 CRT 質體 DNA 治療之具有原位肝癌小鼠的生存曲線則示於第 4 圖。經過超音波治療之後，小鼠的生命期可延長約 1.6~1.8 倍，接受 ED 或 CRT 質體 DNA 治療之小鼠生存期間可分別延長至約 72 天或約 63 天；控制組動物(即，未接受質體 DNA 治療之動物)的生命則只有約 38~40 天左右。

以聲波傳送 ED 或 CRT 質體 DNA 可有效縮減大鼠多發性肝腫瘤體積

依據上述方法以 DEN 在大鼠身上誘發產生多發性肝癌，接著，依據上述之間歇式或連續式超音波治療程序，在指定時間進行治療，結果示於第 5 圖中。由第 5 圖結果可知，無論是間歇式或連續式地施用 ED 或 CRT 質體 DNA 治療至少 4 次之後，均可有效縮減腫瘤生長，並使其體積所減到原來控制組體積的一半左右。

組合使用 Ad/GSCF + Ad/IL-12 腺病毒載體及以聲波傳送 ED-或 CRT-質體 DNA 可縮減小鼠原位肝腫瘤體積

依據上述方法在小鼠身上誘發產生原位肝腫瘤。在本實驗中使用大腫瘤負荷(即，約 14-天大的腫瘤)的小鼠進行實驗。每一隻小鼠在植入腫瘤第 14 天後，接受第 1 次的 Ad/GSCF + Ad/IL-12 腺病毒載體的免疫治療，接著分別在第 17、22、27 及 32 天，以間歇式聲波傳送 ED 或 CRT 質體 DNA。在第 35 天時，將小鼠犧牲，並切下腫瘤，測

量腫瘤體積大小。結果示於第 6 圖中。組合使用兩種腺病毒載體(Ad/GSCF + Ad/IL-12)可縮減腫瘤體積到至少 1/3 (此係相較於控制組而言)。在施加腺病毒載體後，接著施用聲波傳送 ED 或 CRT 質體 DNA 進行治療的動物身上，其腫瘤體積可分別更縮減約 13% 或 10%。

雖然本發明已以一較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1A 圖顯示在依據本發明一較佳實施方式，以間歇式超音波治療於皮下植入有肝腫瘤的小鼠，該小鼠身上腫瘤體積的變化；

第 1B 圖為依據本發明一較佳實施方式，以連續式超音波治療於皮下植入有肝腫瘤的小鼠，該小鼠身上腫瘤體積的變化；

第 2A 圖顯示在依據本發明一較佳實施方式，在第 28 天所測量到的以間歇式超音波治療皮下植入有肝腫瘤的小鼠的肝臟重量變化；

第 2B 圖顯示在依據本發明一較佳實施方式，在第 28 天所測量到的以連續式超音波治療皮下植入有肝腫瘤的小鼠的肝臟重量變化；

第 3A 圖為依據本發明一較佳實施方式，以間歇式超

音波治療具有原位肝腫瘤的小鼠，該小鼠身上腫瘤體積的變化；

第 3B 圖為依據本發明一較佳實施方式，以連續式超音波治療具有原位肝腫瘤的小鼠，該小鼠身上腫瘤體積的變化；

第 4 圖為為依據本發明一較佳實施方式，接受間歇式超音波治療原位肝腫瘤之小鼠的生存曲線；

第 5A 圖顯示在依據本發明一較佳實施方式，以間歇式超音波治療具有多發性肝腫瘤的小鼠，該小鼠身上腫瘤體積的變化；

第 5B 圖為依據本發明一較佳實施方式，以連續式超音波治療具有多發性肝腫瘤的小鼠，該小鼠身上腫瘤體積的變化；及

第 6 圖為依據本發明一較佳實施方式，對具有原位性肝腫瘤之小鼠，進行免疫治療與超音波治療兩者組合治療的結果。

【主要元件符號說明】

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※申請案號：098/04858

※申請日期：98.2.16

※IPC分類：

A61k 49/22

(2006.01)

A61B 8/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

遠端治療腫瘤之組合物與其之音波傳送方法/

ACOUSTICALLY DELIVERING METHODS AND

COMPOSITIONS FOR REMOTE TREATMENT OF A TUMOR

二、中文發明摘要：

在此揭示一種以聲波傳送治療性組合物到一已被診斷出罹患腫瘤之個體身上的方法。所述方法包含以下步驟：從遠離該腫瘤之一位置處，以非經腸胃道方式(parenterally)施用該治療性組合物，且將該位置暴露在超音波下以傳送該組合物。此治療性組合物包含一有效量之一多胜肽或一可編碼出該多胜肽的質體核酸，該多胜肽或該質體核酸是懸浮在一分散介質中；和一有效量之一微氣泡顯影劑，其中該多胜肽是一血管生成抑制劑，且該治療性組合物可在不會誘發該個體產生錮病毒載體所致之免疫反應的風險下，減少該腫瘤的體積。

三、英文發明摘要：

Disclosed herein is a method of acoustically delivering a therapeutic composition to a subject pre-diagnosed with a tumor. The method comprises the steps of: parenterally administering the composition from a site remote from a tumor location; and exposing the parenterally administering site to ultrasound waves to

target the delivery of the composition. The therapeutic composition comprises an effective amount of a polypeptide or a plasmid nucleic acid encoding the polypeptide, the polypeptide or the nucleic acid is suspended in a dispersed medium; and an effective amount of an microbubble contrast agent; wherein the polypeptide is an angiogenesis inhibitor, and the therapeutic composition is capable of reducing the size of the tumor without the risk of inducing viral vector-induced immunogenicity in the subject.

七、申請專利範圍：

1. 一種以聲波傳送至一個體身上以治療腫瘤的治療性組合物，包含：

一有效量之一多胜肽或一可編碼出該多胜肽的質體核酸，該多胜肽或該質體核酸是懸浮在一分散介質中；及

一有效量之一微氣泡顯影劑；

其中該多胜肽是一血管生成抑制劑，且該治療性組合物可減少該腫瘤的體積。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該微氣泡顯影劑是任一種選自以下的物質：ALBUNEX®、SONOZOID®、SONOVUE®、SONOVIST®、OPTISON®、LEVOVIST® 或 DEFINITY®。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之治療性組合物，其中該微氣泡顯影劑是 SONOVUE®。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該分散介質是以下任一種：水、緩衝溶液、等張氯化鈉溶液、油或脂肪酸。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該血管生成抑制劑是選自 α -干擾素(interferon alpha, IFN- α)、 β -干擾素(interferon beta, IFN- β)、 γ -干擾素(interferon gama, IFN- γ)、白介素-4 (interlukin-4, IL-4)、白介素-8 (interlukin-8, IL-8)、白介素-12 (interlukin-12, IL-12)、白介素-18

(interlukin-18, IL-18)、血小板因子-4 (platelet-4)、血管內皮生長因子-2 (angiopoietin-2)、血管生成因子(angiotatin)、血管內皮抑制素(endostatin, ED)、骨橋素(osteopontin)、乳腺絲氨酸蛋白酶抑製劑基因 (marray serine proteinase inhibitor, maspin)、血管生成抑制素 (canstatin)、分泌性糖化素相關蛋白質 (proliferin-related protein)、泌乳激素 (prolactin)或鈣網蛋白(calreticulin, CRT)。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之治療性組合物，其中該血管生成抑制劑是 ED 或 CRT。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該質體核酸與該微氣泡顯影劑是以約 7：3 的比例混合。

8. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該組合物是以如下步驟進行傳送：

以非經腸胃道方式，從遠離該腫瘤之一位置處施用該組合物；及

將該以非經腸胃道方式施用的位置暴露在超音波下，來加強傳送該組合物。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之治療性組合物，其中該非經腸胃道方式包含肌肉內注射。

10. 如申請專利範圍第 8 項所述之治療性組合物，其中該超音波強度在約 $0.5 \sim 4 \text{ W/cm}^2$ 間，且係施用約 1~20 分鐘之期間。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述之治療性組合物，其中該超音波強度在約 2 W/cm^2 ，且係施用約 10 分鐘之期間。

12. 如申請專利範圍第 8 項所述之治療性組合物，其中該組合物是每隔 1~10 天以約 $10 \mu\text{g}$ ~ 10mg 質體核酸/公斤體重或是 1 mg ~ 100mg 多胜肽/公斤體重的劑量施用至少 1~10 次。

13. 如申請專利範圍第 12 項所述之治療性組合物，其中該組合物是每隔 7 天以約 $10 \mu\text{g}$ ~ 10mg 質體核酸/公斤體重或是 1 mg ~ 100mg 多胜肽/公斤體重的劑量施用至少 5 次。

14. 如申請專利範圍第 12 項所述之治療性組合物，其中該組合物是每天以約 $10 \mu\text{g}$ ~ 10mg 質體核酸/公斤體重或是 1 mg ~ 100mg 多胜肽/公斤體重的劑量施用至少 5 天。

15. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該個體是人類。

16. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該腫瘤是一種選自以下的惡性腫瘤，包括：肺癌、結腸癌、胃癌、乳癌、肝癌、黑色素瘤(melanoma)、多形性膠質母細胞瘤(glioblastoma)、腦癌、惡性造血細胞瘤(hematopoeitic malignancies)、視網膜母細胞瘤(retinoblastoma)、腎腫瘤(renal cell carcinoma)、頭部與頸部腫瘤、子宮頸癌(cervical cancer)、

膀胱癌(esophageal cancer)和鱗狀上皮細胞癌(squama cell carcinoma)。

17. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該腫瘤是肝癌。

18. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該個體在接受所述組合物治療之前，曾接受過手術或放射線治療。

19. 如申請專利範圍第 1 項所述之治療性組合物，其中該組合物是在施用一化學治療藥劑之前、同時或之後，被施用至該個體身上。

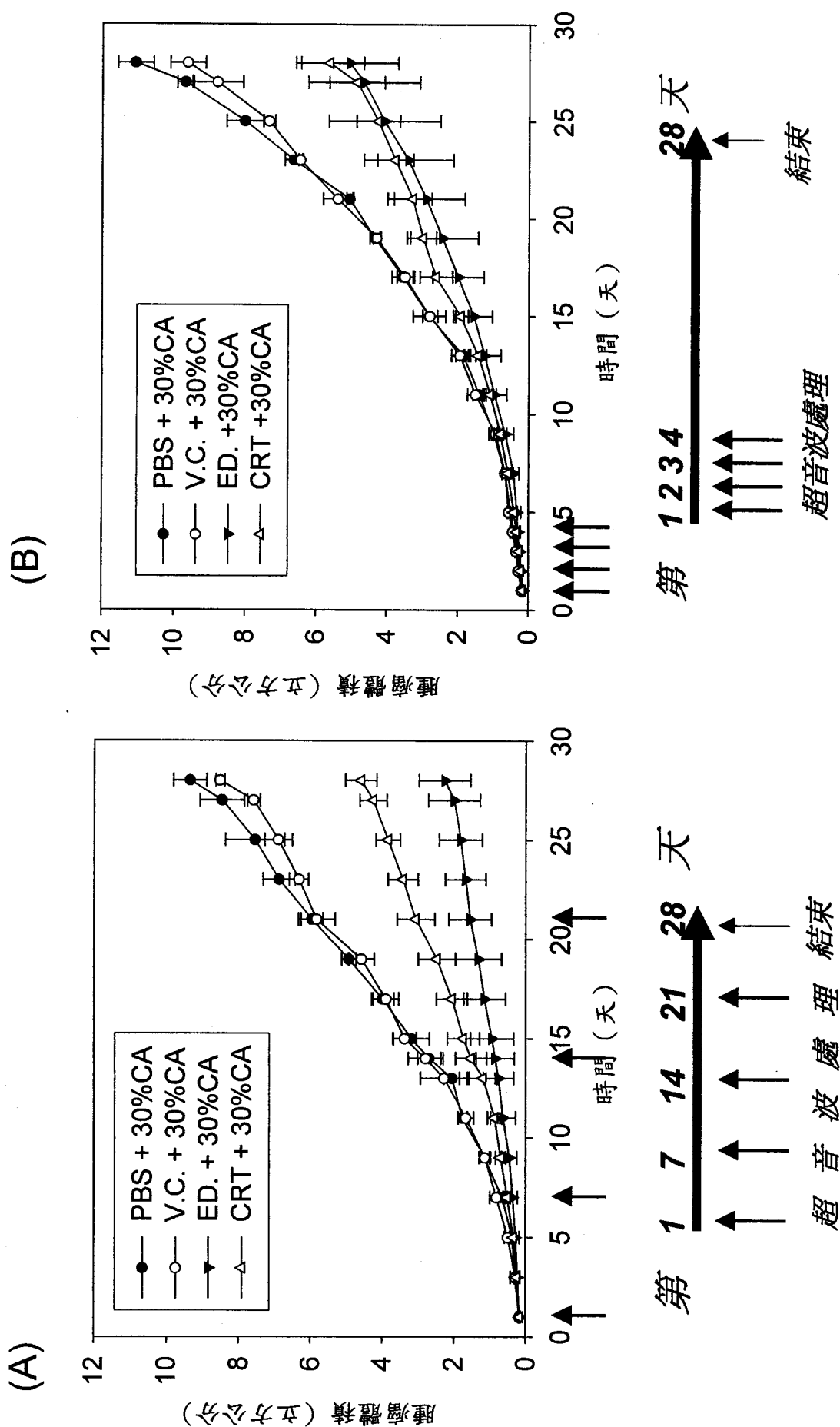
20. 如申請專利範圍第 19 項所述之治療性組合物，其中該化學治療藥劑可以是以下任一種，包括：順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、草酸鉑(oxaliplatin)、硫唑嘌呤(azathioprine)、巰基嘌呤(mercaptopurine)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、溫諾平(vinorelbine)、長春花鹼鹽胺(vindesine)、紫杉醇(paclitaxel)、異丙氧代苯紫杉醇(docetaxel)、喜樹鹼(camptothecins)、抗癌妥(irinotecan)、脫癌妥(topotecan)、安吖啶(amsacrine)、鬼臼乙叉甙(etoposide)、磷酸鬼臼乙叉甙(etoposide phosphate)、替尼泊苷(teniposide)、放線菌素 D(dactinomycin)、賀癌平(trastuzumab)、愛必妥(cetuximab)和美羅華(rituximab)。

21. 如申請專利範圍第 19 項所述之治療性組合物，其中該

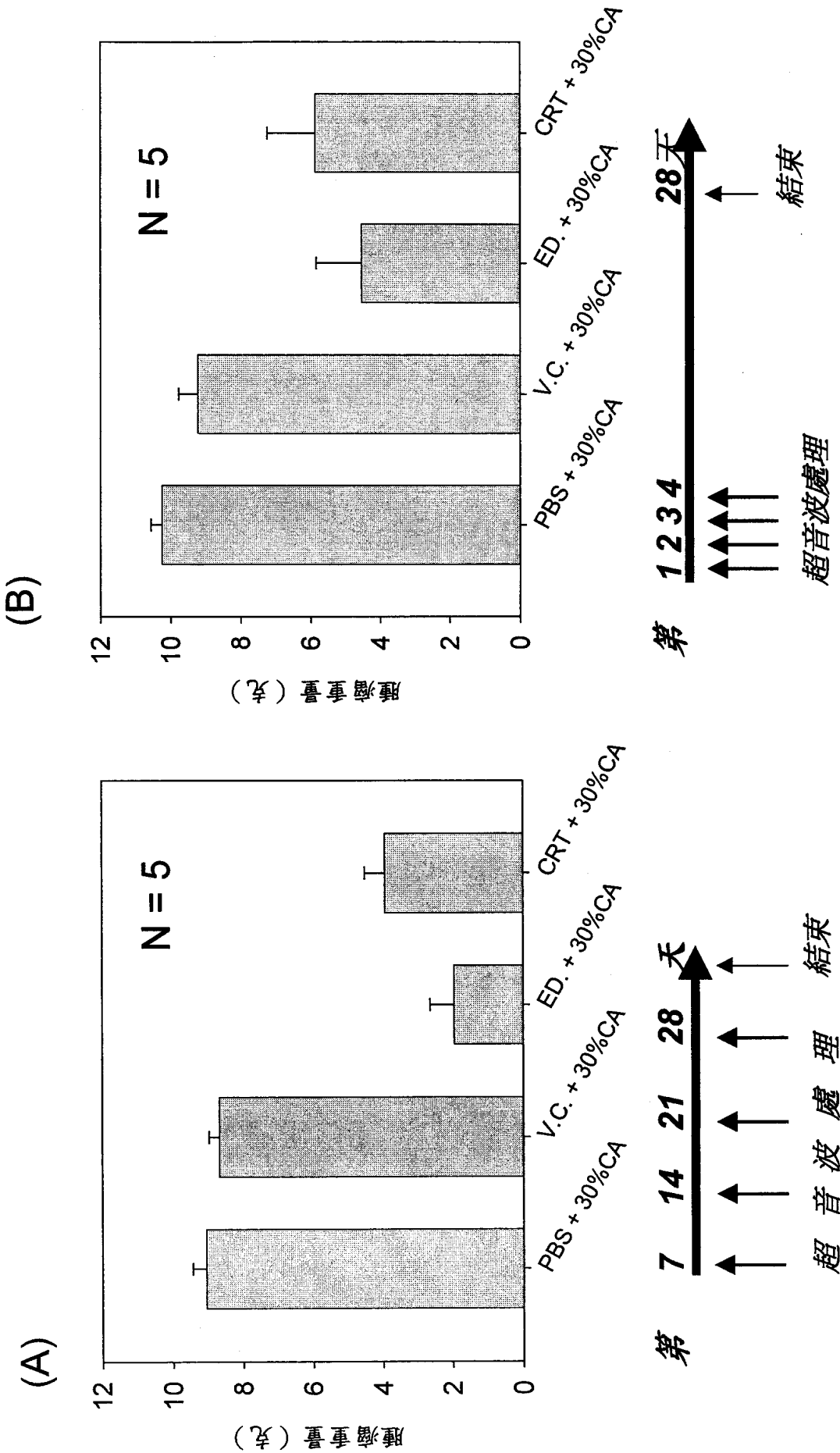
組合物是在施用一腺病毒載體之前、同時或之後，被施用至該個體身上，該腺病毒載體含有一可編碼產生一 GM-CSF、IL-12、ED 或 PEDF 之多胜肽的核酸。

22. 如申請專利範圍第 21 項所述之治療性組合物，其中該腺病毒載體是在施用該組合物之前，施用至該腫瘤內。

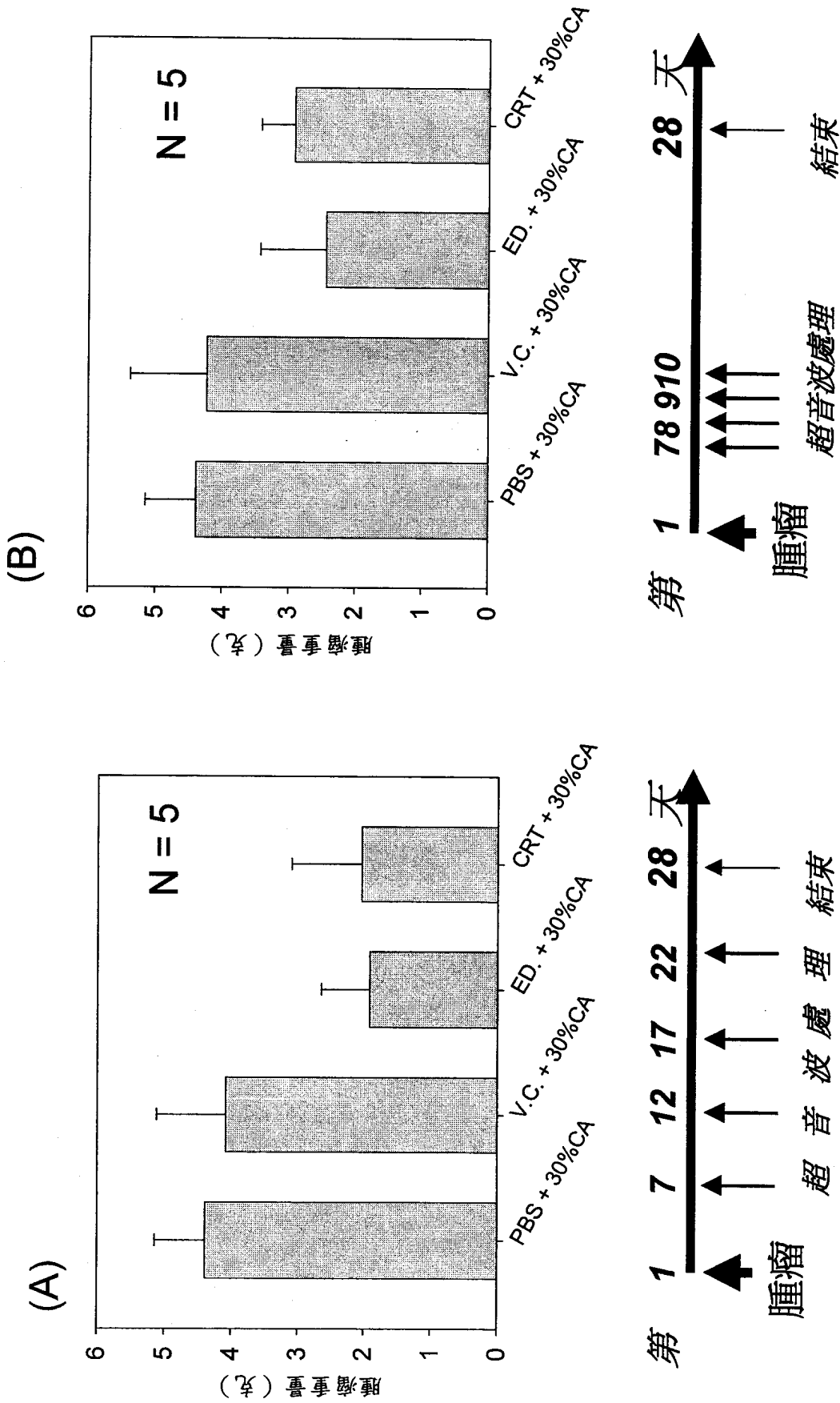
圖 1 第



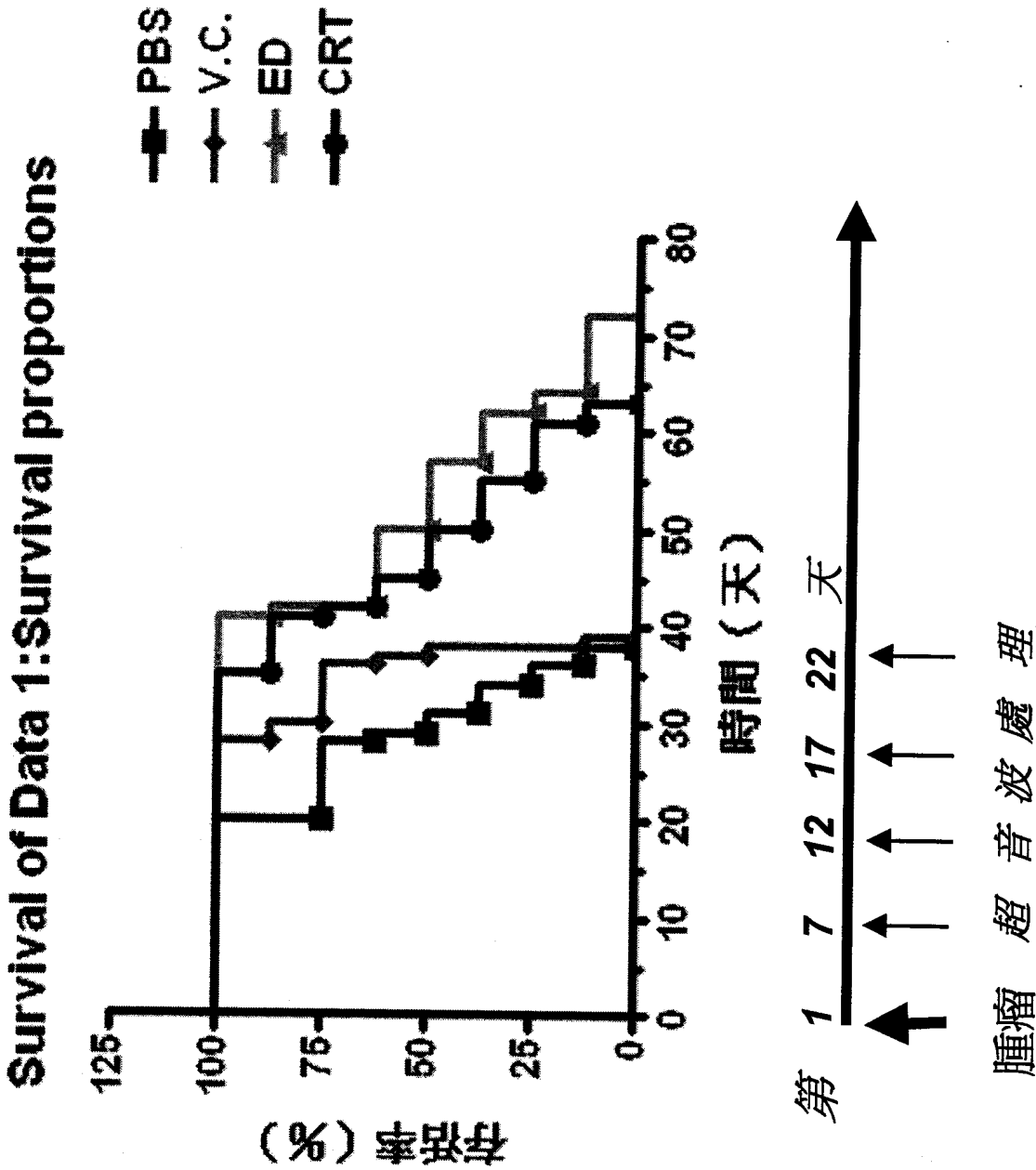
第 2 圖



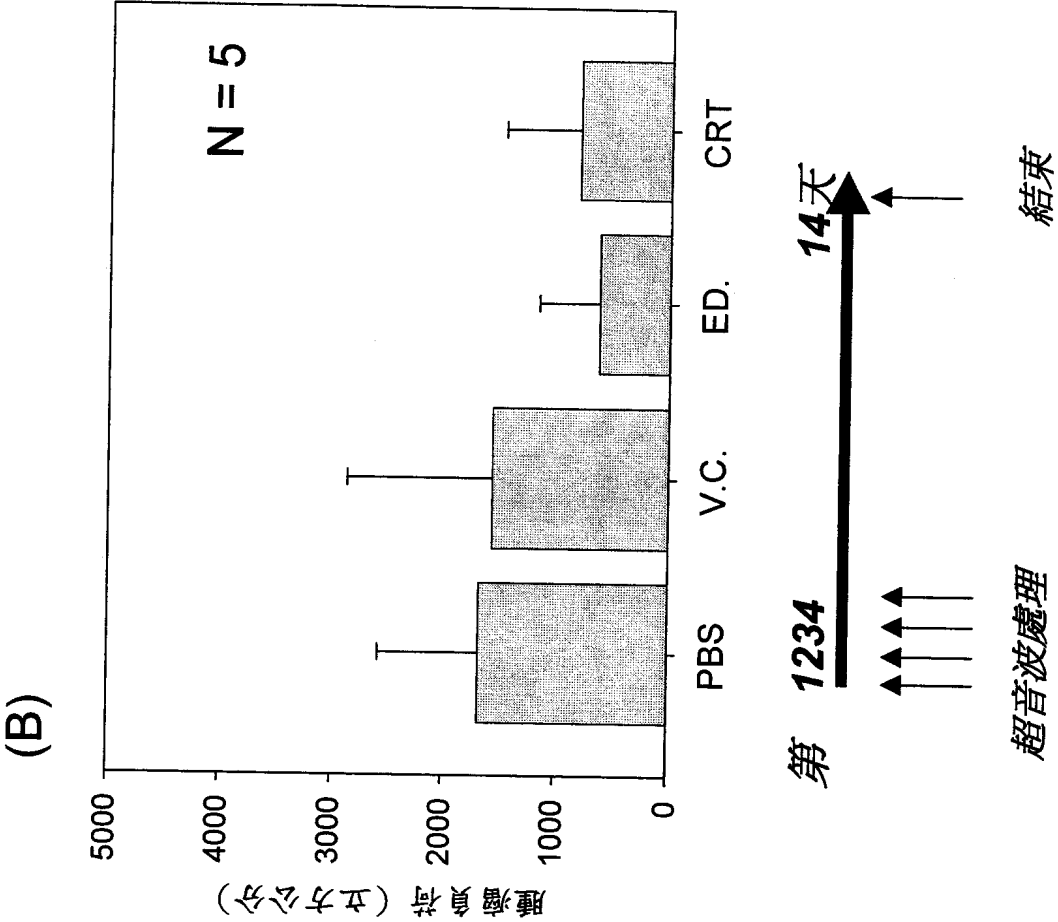
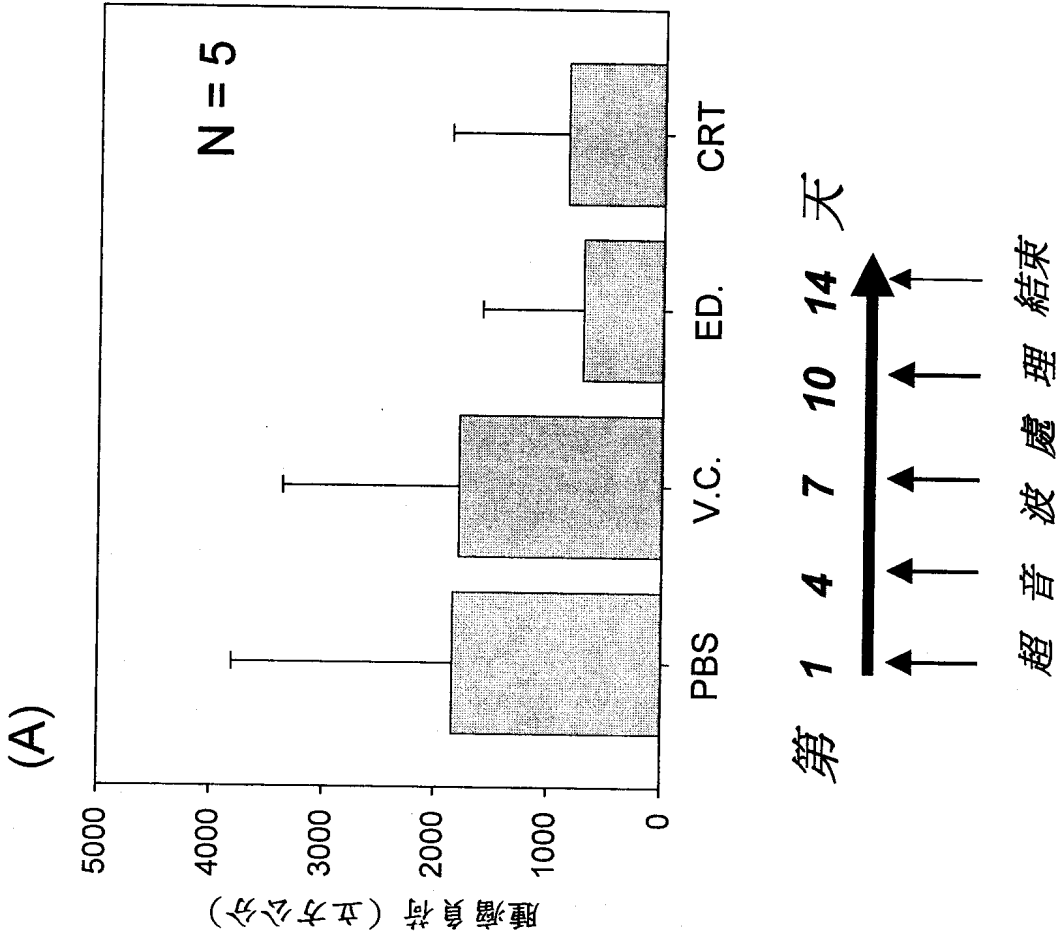
第 3 圖



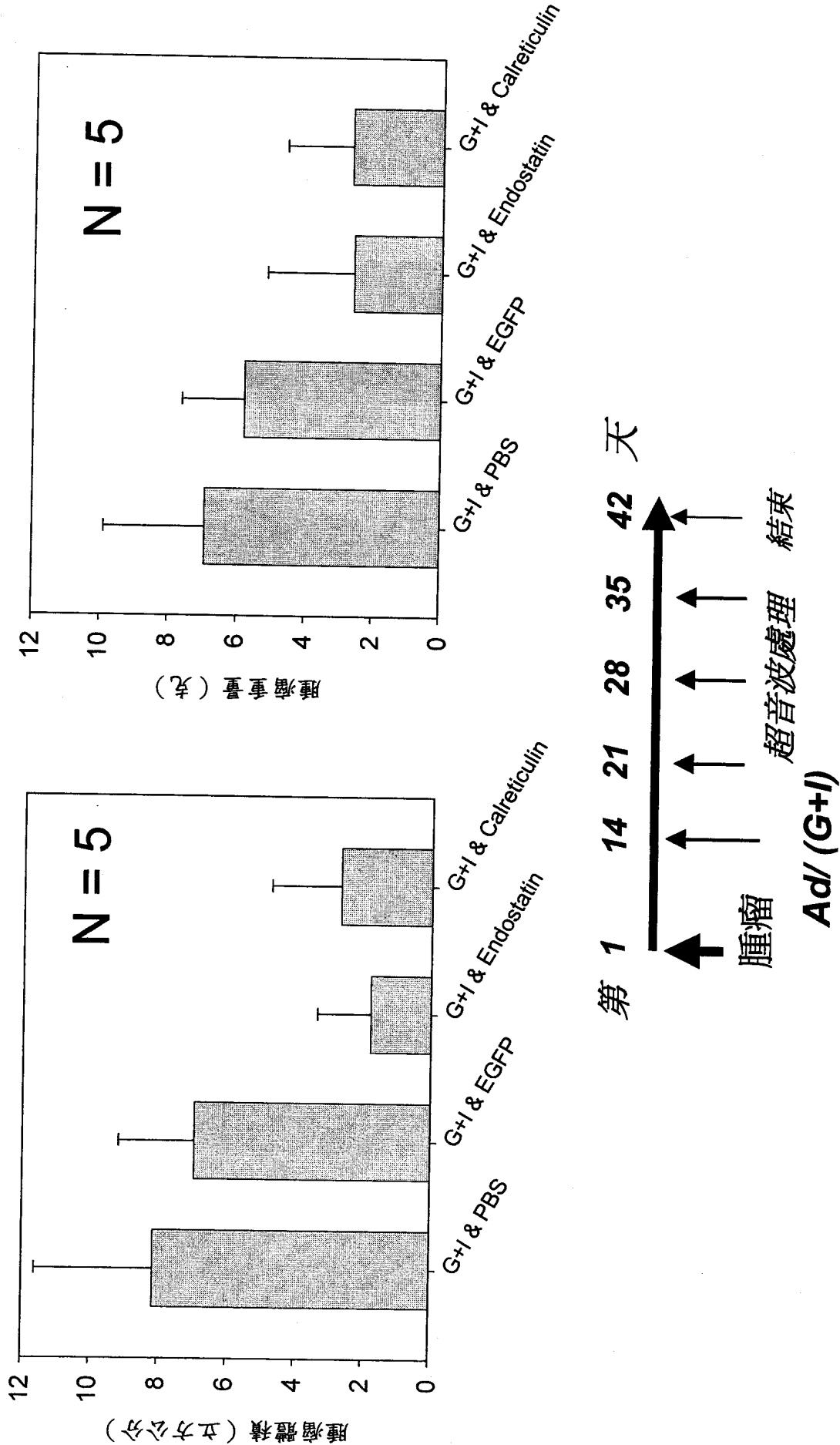
第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(3A, 3B)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：