

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880016669.2

[51] Int. Cl.

C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/46 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/14 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 101679953A

[22] 申请日 2008.5.21

[21] 申请号 200880016669.2

[30] 优先权

[32] 2007.5.21 [33] US [31] 60/939,255

[86] 国际申请 PCT/CA2008/000964 2008.5.21

[87] 国际公布 WO2008/141448 英 2008.11.27

[85] 进入国家阶段日期 2009.11.19

[71] 申请人 昂科利蒂克斯生物科技有限公司

地址 加拿大艾伯塔省

[72] 发明人 M·C·科菲 B·G·汤普森

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 权陆军 黄可峻

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 1 页

[54] 发明名称

突变的呼肠孤病毒及其制备和使用方法

[57] 摘要

本发明提供突变的呼肠孤病毒和遗传改造的 IS-VP。具体地,本发明提供缺乏 $\sigma 3$ 多肽表达或展示 $\sigma 3$ 多肽表达减少或缺乏功能性 $\sigma 3$ 多肽的突变的呼肠孤病毒。其中所描述的突变的呼肠孤病毒可用于产生和稳定地繁殖 ISVP。还提供了包含突变的呼肠孤病毒的组合物以及使用这种突变的呼肠孤病毒的方法。

1. 一种突变的呼肠孤病毒，其中所述突变的呼肠孤病毒包含第一突变，其中所述第一突变减少 $\sigma 3$ 多肽表达、实质上消除 $\sigma 3$ 多肽表达、或导致功能性 $\sigma 3$ 多肽不存在。

2. 根据权利要求 1 所述的突变的呼肠孤病毒，其中所述第一突变在编码所述 $\sigma 3$ 多肽的核酸中或在调节所述 $\sigma 3$ 多肽表达的核酸中。

3. 根据权利要求 2 所述的突变的呼肠孤病毒，其中所述核酸是 S4 基因。

4. 根据权利要求 1 所述的突变的呼肠孤病毒，其中所述第一突变是遗传改造的取代。

5. 根据权利要求 1 所述的突变的呼肠孤病毒，其中所述第一突变是遗传改造的插入或缺失一个或多个核苷酸。

6. 根据权利要求 1 所述的突变的呼肠孤病毒，其进一步包含一种或多种另外的突变。

7. 根据权利要求 6 所述的突变的呼肠孤病毒，其中所述另外的突变选自以下组成的组：

减少 $\mu 1$ 多肽表达、实质上消除 $\mu 1$ 多肽表达、或导致功能性 $\mu 1$ 多肽不存在的突变；

减少 $\lambda 2$ 多肽表达、实质上消除 $\lambda 2$ 多肽表达、或导致功能性 $\lambda 2$ 多肽不存在的突变；和/或

减少 $\sigma 1$ 多肽表达、实质上消除 $\sigma 1$ 多肽表达、或导致功能性 $\sigma 1$ 多肽不存在的突变。

8. 根据权利要求 1 所述的突变的呼肠孤病毒，其中所述第一突变减少所述 $\sigma 3$ 多肽的表达的至少 30%。

9. 一种遗传改造的呼肠孤病毒感染性亚病毒粒子(ISVP)。

10. 根据权利要求 9 所述的呼肠孤病毒 ISVP，其中所述呼肠孤病毒

ISVP 被遗传改造以展示 $\sigma 3$ 多肽表达减少、以缺乏 $\sigma 3$ 多肽表达、或以表达非功能性 $\sigma 3$ 多肽。

11. 根据权利要求 10 所述的呼肠孤病毒 ISVP, 其中所述呼肠孤病毒 ISVP 被遗传改造以包含第一突变。

12. 根据权利要求 11 所述的呼肠孤病毒 ISVP, 其中所述第一突变在编码所述 $\sigma 3$ 多肽的核酸中或在调节所述 $\sigma 3$ 多肽表达的核酸中。

13. 根据权利要求 12 所述的呼肠孤病毒 ISVP, 其中所述核酸是 S4 基因。

14. 根据权利要求 11 所述的呼肠孤病毒 ISVP, 其中所述第一突变是取代。

15. 根据权利要求 11 所述的呼肠孤病毒 ISVP, 其中所述第一突变是插入或缺失一个或多个核苷酸。

16. 根据权利要求 11 所述的呼肠孤病毒 ISVP, 其进一步包含一种或多种另外的突变。

17. 根据权利要求 16 所述的呼肠孤病毒 ISVP, 其中所述另外的突变选自以下组成的组:

减少 $\mu 1$ 多肽表达、实质上消除 $\mu 1$ 多肽表达、或导致功能性 $\mu 1$ 多肽不存在的突变;

减少 $\lambda 2$ 多肽表达、实质上消除 $\lambda 2$ 多肽表达、或导致功能性 $\lambda 2$ 多肽不存在的突变; 和/或

减少 $\sigma 1$ 多肽表达、实质上消除 $\sigma 1$ 多肽表达、或导致功能性 $\sigma 1$ 多肽不存在的突变。

18. 根据权利要求 10 所述的呼肠孤病毒 ISVP, 其中所述 $\sigma 3$ 多肽的表达被减少至少 30%。

19. 一种制备具有增加的感染性的呼肠孤病毒的方法, 其包括:

突变第一呼肠孤病毒以产生突变的呼肠孤病毒, 其中所述突变的呼肠孤病毒展示 $\sigma 3$ 多肽表达减少、缺乏 $\sigma 3$ 多肽表达、或表达非功能性 $\sigma 3$ 多

肽，和

分离所述突变的呼肠孤病毒，其中所述突变的呼肠孤病毒与所述第一呼肠孤病毒相比具有增加的感染性。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述增加的感染性由以下证实：与所述第一呼肠孤病毒相比所述突变的呼肠孤病毒可感染的瘤细胞范围增加、或与所述第一呼肠孤病毒相比所述突变的呼肠孤病毒感染的细胞数目增加。

21. 一种获得遗传改造的呼肠孤病毒感染性亚病毒粒子(ISVP)的方法，其包括：

遗传改造第一呼肠孤病毒以展示 $\sigma 3$ 多肽表达减少、以缺乏 $\sigma 3$ 多肽表达、或以表达非功能性 $\sigma 3$ 多肽；

培养所述遗传改造的呼肠孤病毒，和

分离 ISVP 从而获得遗传改造的呼肠孤病毒 ISVP。

22. 一种治疗受治疗者的增生性病症的方法，其包括向所述受治疗者施用权利要求 1 所述的突变的呼肠孤病毒或权利要求 9 所述的遗传改造的呼肠孤病毒 ISVP。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其进一步包括至少一种选自手术、化疗、放疗和免疫抑制疗法所组成的组的程序。

24. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 所述的突变的呼肠孤病毒或权利要求 9 所述的遗传改造的呼肠孤病毒 ISVP。

25. 根据权利要求 24 所述的药物组合物，其进一步包含一种或多种化疗剂和/或一种或多种免疫抑制剂。

26. 一种包含突变的 $\sigma 3$ 多肽，其中所述突变产生不结合入病毒衣壳的 $\sigma 3$ 多肽或以减少的水平结合入所述衣壳的 $\sigma 3$ 多肽。

突变的呼肠孤病毒及其制备和使用方法

相关申请的交叉引用

本申请要求 2007 年 5 月 21 日提交的美国临时申请第 60/939,255 号的权益。

背景

呼肠孤病毒建立生产性感染的能力需要蛋白水解外衣壳。蛋白水解将病毒体转变为称为中间亚病毒体粒子(ISVP)的形式,该形式具有穿透细胞膜的能力并因此接近病毒基因表达所需的细胞质成分。对完整呼肠孤病毒病毒体部分蛋白水解以产生 ISVP 还可在体外使用蛋白酶诸如糜蛋白酶或胰蛋白酶进行。参见例如,Golden 等人.(2002, *J. Virol.*, 76:7430-43)和 Chandran & Nibert (1998, *J. Virol.*, 72:467-75)。

概述

本公开描述了缺乏 $\sigma 3$ 多肽表达或展示 $\sigma 3$ 多肽表达减少或缺乏功能性 $\sigma 3$ 多肽的突变的呼肠孤病毒。本文所述的突变的呼肠孤病毒可用于产生和稳定地繁殖 ISVP。

描述了一种突变的呼肠孤病毒,其包含减少 $\sigma 3$ 多肽表达、实质上消除 $\sigma 3$ 多肽表达、或导致功能性 $\sigma 3$ 多肽不存在的第一突变。该第一突变可在编码所述 $\sigma 3$ 多肽的核酸中或在调节所述 $\sigma 3$ 多肽表达的核酸中。在某些情况中,该核酸是 S4 基因。代表性的突变包括遗传改造的取代和遗传改造的插入或缺失一个或多个核苷酸。通常,该第一突变减少所述 $\sigma 3$ 多肽表达的至少 30%。

如本文所述的突变的呼肠孤病毒可包含一种或多种另外的突变。该另外的突变可为减少 $\mu 1$ 多肽表达、实质上消除 $\mu 1$ 多肽表达、或导致功能性 $\mu 1$ 多肽不存在的突变；减少 $\lambda 2$ 多肽表达、实质上消除 $\lambda 2$ 多肽表达、或导致功能性 $\lambda 2$ 多肽不存在的突变；和/或减少 $\sigma 1$ 多肽表达、实质上消除 $\sigma 1$ 多肽表达、或导致功能性 $\sigma 1$ 多肽不存在的突变。

还提供一种遗传改造的呼肠孤病毒感染性亚病毒粒子(ISVP)。这种呼肠孤病毒 ISVP 可被遗传改造以展示 $\sigma 3$ 多肽表达减少、以缺乏 $\sigma 3$ 多肽表达、或以表达非功能性 $\sigma 3$ 多肽。如本文所述的呼肠孤病毒 ISVP 可被遗传改造以包含第一突变。该第一突变可在编码所述 $\sigma 3$ 多肽的核酸中或在调节所述 $\sigma 3$ 多肽表达的核酸中。在某些情况中，该核酸是 S4 基因。代表性突变包括取代和插入或缺失一个或多个核苷酸。通常，该第一突变减少所述 $\sigma 3$ 多肽的表达的至少 30%。

如本文所述的突变的呼肠孤病毒可包含一种或多种另外的突变。所述另外的突变可为减少 $\mu 1$ 多肽表达、实质上消除 $\mu 1$ 多肽表达、或导致功能性 $\mu 1$ 多肽不存在的突变；减少 $\lambda 2$ 多肽表达、实质上消除 $\lambda 2$ 多肽表达、或导致功能性 $\lambda 2$ 多肽不存在的突变；和/或减少 $\sigma 1$ 多肽表达、实质上消除 $\sigma 1$ 多肽表达、或导致功能性 $\sigma 1$ 多肽不存在的突变。

提供一种制备具有增加的感染性的呼肠孤病毒的方法。这种呼肠孤病毒可通过以下步骤来制备：突变第一呼肠孤病毒以产生突变的呼肠孤病毒，其中所述突变的呼肠孤病毒展示 $\sigma 3$ 多肽表达减少、缺乏 $\sigma 3$ 多肽表达、或表达非功能性 $\sigma 3$ 多肽，和分离所述突变的呼肠孤病毒，其中所述突变的呼肠孤病毒与所述第一呼肠孤病毒相比具有增加的感染性。增加的感染性可由以下证实：与所述第一呼肠孤病毒相比所述突变的呼肠孤病毒可感染的瘤细胞范围增加、或与所述第一呼肠孤病毒相比所述突变的呼肠孤病毒感染细胞的数目增加。

还提供一种获得遗传改造的呼肠孤病毒感染性亚病毒粒子(ISVP)的方法。这种方法包括：遗传改造第一呼肠孤病毒以展示 $\sigma 3$ 多肽表达减少、以缺乏 $\sigma 3$ 多肽表达、或以表达非功能性 $\sigma 3$ 多肽；培养所述遗传改造的呼肠孤病毒，并分离 ISVP 从而获得遗传改造的呼肠孤病毒 ISVP。

进一步提供了一种治疗受治疗者的增生性病症的方法。这种治疗方法包括向所述受治疗者施用本文公开的突变的呼肠孤病毒或本文公开的遗传改造的呼肠孤病毒 ISVP。这种方法还可包括至少一种选自手术、化疗、放疗和免疫抑制疗法的程序。

提供包含本文所述的突变的呼肠孤病毒或本文所述的遗传改造的呼肠孤病毒 ISVP 的药物组合物。这种药物组合物进一步可包含一种或多种化疗剂和/或一种或多种免疫抑制剂。

还提供一种包含突变的 $\sigma 3$ 多肽,所述突变产生不结合入病毒衣壳的 $\sigma 3$ 多肽或以减少的水平结合入所述衣壳的 $\sigma 3$ 多肽。

除非另外限定,否则本文所用的所有技术术语和科学术语与本发明方法和组合物所属领域的普通技术人员所通常理解的具有相同含义。下文描述了适合的方法和材料,尽管与本文描述的方法和材料相似或等价的方法和材料可用于实践或测试本发明的方法和组合物。此外,材料、方法和实例仅仅是示例性的并不意为限制。本文提到的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用以其全部内容并入本文。

附图说明

图 1 是显示呼肠孤病毒病毒体和呼肠孤病毒 ISVP 的结构元件的示意图。

详述

本文描述了缺乏 $\sigma 3$ 多肽表达或展示 $\sigma 3$ 多肽表达减少或缺乏功能性 $\sigma 3$ 多肽的突变的呼肠孤病毒。除了在编码或调节 $\sigma 3$ 多肽的核酸中含有突变,本文所述的突变的呼肠孤病毒还可在一种或多种其它外衣壳蛋白中含有另外的突变。本文提供的突变的呼肠孤病毒可用于产生中间亚病毒体粒子 (ISVP),其可以 ISVP 稳定地繁殖用于多次传代。与呼肠孤病毒自身相比 ISVP 通常展示增加的感染性和/或减少的免疫原性,但 ISVP 通常缺乏以稳定方式繁殖的能力。相反,以突变的呼肠孤病毒形成的 ISVP 证实了可用

于多次复制的稳定繁殖，不同于酶处理或类似方法产生的 ISVP。

突变的呼肠孤病毒和制备方法

如本文所述的突变的呼肠孤病毒可含有减少 $\sigma 3$ 多肽表达或实质上消除 $\sigma 3$ 多肽表达或导致功能性 $\sigma 3$ 多肽不存在的第一突变。消除 $\sigma 3$ 多肽表达或导致功能性 $\sigma 3$ 多肽不存在的突变可在编码 $\sigma 3$ 多肽的核酸(即 S4 基因)中或在编码调节 $\sigma 3$ 多肽的表达或功能的多肽的核酸中。

$\sigma 3$ 多肽长度为 365 个氨基酸并具有 41 kDa 的分子量。完整病毒体含有 600 个拷贝的 $\sigma 3$ 多肽。 $\sigma 3$ 多肽很可能与包括例如 $\mu 1$ 、 $\lambda 2$ 和 $\sigma 1$ 的其它外衣壳蛋白相互作用，并还可能在 RNA 选择或 RNA 包装中起作用。呼肠孤病毒病毒体的图表明， $\sigma 3$ 多肽象手指一样在病毒体表面上伸出并对病毒体密度有显著贡献。参见图 1。

本文所用的减少 $\sigma 3$ 多肽表达的突变是指与表达野生型水平 $\sigma 3$ 多肽的呼肠孤病毒相比，导致 $\sigma 3$ 多肽的量减少至少 30% (如，至少 40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%)的突变。本文所用的实质上消除 $\sigma 3$ 多肽表达的突变是指相对于野生型呼肠孤病毒产生的 $\sigma 3$ 多肽的量，导致 $\sigma 3$ 多肽的量减少至少 95% (如，96%、97%、98%、99%或 100%)的突变。本文所用的导致功能性 $\sigma 3$ 多肽减少或不存在的突变是指允许 $\sigma 3$ 多肽表达但导致 $\sigma 3$ 多肽不能组装或结合入病毒衣壳的突变。应理解的是，对于 $\sigma 3$ 多肽可能期望或需要保持其它功能性(如，结合 RNA 的能力)以使突变的呼肠孤病毒保持繁殖能力。

如本文所述的 $\sigma 3$ 多肽突变可产生以减少的水平结合入衣壳的 $\sigma 3$ 多肽，该减少是相对于不含有该突变的 $\sigma 3$ 多肽(如野生型 $\sigma 3$ 多肽)而言。如本文所述的 $\sigma 3$ 多肽突变还可产生不能结合入病毒衣壳的 $\sigma 3$ 多肽。不受任何具体机制限制， $\sigma 3$ 多肽可具有减少的功能或缺乏功能，例如，由于 $\sigma 3$ 多肽和 $\mu 1$ 多肽不能适当地结合，或由于减少或禁止 $\sigma 3$ 多肽结合入衣壳的构象改变。

根据本公开的突变的呼肠孤病毒可为 3 型哺乳动物正呼肠孤病毒。3 型哺乳动物正呼肠孤病毒包括但不限于 Dearing 和 Abney 毒株(分别是 T3D

或 T3A)。参见例如, ATCC 登记号 VR-232 和 VR-824。如本文所述的突变的呼肠孤病毒可含有自发产生的突变或遗传改造的突变。例如, 可突变天然产生的呼肠孤病毒(如分离自天然来源, 如从患者分离)或可产生不表达 $\sigma 3$ 多肽或缺乏功能性 $\sigma 3$ 多肽的重组的呼肠孤病毒(参见如美国专利第 7,163,678 号)。注意到在 S4 基因中携带突变的呼肠孤病毒, 诸如 Clark 等人(2006, *J. Virol.*, 80:671-81)、Ebert 等人(2001, *J. Virol.*, 75:3197-206)和 Wetzel 等人(1997, *J. Virol.*, 71:1362-9)描述的那些不是本发明突变体的部分并从本发明突变体排除, 因为这种突变体被认为表达功能性 $\sigma 3$ 多肽。

本文所指的突变可为取代或插入或缺失一个或多个核苷酸。点突变包括, 例如单个核苷酸转变(嘌呤到嘌呤或嘧啶到嘧啶)或颠换(嘌呤到嘧啶或反之亦然)和单个或多个核苷酸缺失或插入。核酸中的突变可导致编码的多肽中一种或多种保守性或非保守性氨基酸取代, 这可能造成构象改变或失去或部分地失去功能, 翻译读码框中位移(“移码”)导致从该位点起开始编码的完全不同的多肽, 提前终止密码子导致平截的多肽(“平截”), 或呼肠孤病毒核酸中的突变完全不改变编码的多肽(“沉默”或“无义”)。参见例如, Johnson & Overington, 1993, *J. Mol. Biol.*, 233:716-38; Henikoff & Henikoff, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-19; 和美国专利第 4,554,101 号公开的保守性和非保守性氨基酸取代。

使用本领域已知的任何多种方法可在呼肠孤病毒的核酸中产生突变。例如, 位点定向诱变可用于修饰呼肠孤病毒的核酸序列。位点定向诱变的一种最常用方法是针对寡核苷酸的诱变。在针对寡核苷酸的诱变中, 将编码序列中期望改变的寡核苷酸退火到目标 DNA 的一条链, 并作为开始 DNA 合成的引物。以这种方式, 将含有序列改变的寡核苷酸并入新合成的链。参见例如, Kunkel, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488; Kunkel 等人, 1987, *Meth. Enzymol.*, 154:367; Lewis & Thompson, 1990, *Nucl. Acids Res.*, 18:3439; Bohnsack, 1996, *Meth. Mol. Biol.*, 57:1; Deng & Nickoloff, 1992, *Anal. Biochem.*, 200:81; 和 Shimada, 1996, *Meth. Mol. Biol.*, 57:157。本领域中例行使用其它方法来修饰蛋白或多肽的序列。例如, 使用 PCR 或化学合成可产生含有突变的核酸, 或可化学合成氨基酸序列中具有期望改

变的多肽。参见例如, Bang & Kent, 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:5014-9 和其中的参考文献。

除了消除 $\sigma 3$ 多肽表达或减少 $\sigma 3$ 多肽表达或产生非功能性 $\sigma 3$ 多肽或导致 $\sigma 3$ 多肽功能减少的突变, 如本文所述的突变的呼肠孤病毒还可包含其它呼肠孤病毒衣壳多肽(如, $\mu 1$ 、 $\lambda 2$ 和/或 $\sigma 1$)之一中的一种或多种另外的突变(如, 第二、第三或第四突变)。可对含有影响 $\sigma 3$ 多肽的突变和任选地在任何或所有其它外衣壳蛋白中的另外的突变的呼肠孤病毒筛选这种突变的呼肠孤病毒感染和导致细胞溶解的能力。例如, 耐受野生型呼肠孤病毒溶解的瘤细胞可用于筛选本文所述的突变的呼肠孤病毒。

例如, 另外的突变可减少或实质上消除 $\mu 1$ 多肽的表达或导致功能性 $\mu 1$ 多肽不存在。M2 基因编码的 $\mu 1$ 多肽可能牵涉在细胞渗透中并可能在转录酶活化中起作用。每个病毒体包含约 600 个拷贝的 $\mu 1$ 多肽, 其以与 $\sigma 3$ 多肽的 1:1 复合体形式存在。 $\mu 1$ 多肽在其 N-末端被豆蔻酰化(myristolated), 随后豆蔻酰化(myristolated)的 N-末端 42 个残基被切除, 形成 C-末端片段($\mu 1C$)。此外或选择性地, 另外的突变可减少或实质上消除 $\lambda 2$ 多肽的表达或导致功能性 $\lambda 2$ 多肽不存在, 和/或另外的突变可减少或实质上消除 $\sigma 1$ 多肽的表达或导致功能性 $\sigma 1$ 多肽不存在。 $\lambda 2$ 多肽由 L2 基因编码, 牵涉在粒子组装中, 并展示鸟苷酸转移酶和甲基转移酶活性。 $\sigma 1$ 多肽由 S1 基因编码, 牵涉在细胞附着中并作为病毒血凝素。

使用可购得的标准核酸方法可从呼肠孤病毒粒子分离核酸。还参见例如, Schiff 等人, "Orthoreoviruses and Their Replication(正呼肠孤病毒和其复制)," 第 52 章, *Fields Virology*(费氏病毒学), Knipe & Howley 编辑, 2006, Lippincott Williams & Wilkins。本文所用的分离的核酸是指与通常伴随它们的其它核酸分开的核酸。因此, 分离的核酸包括但不限于基本上没有非-呼肠孤病毒(如宿主细胞)核酸的呼肠孤病毒核酸, 或基本上没有对应其它基因组区段的核酸的呼肠孤病毒基因组区段。此外, 分离的核酸可包括工程化核酸诸如重组或合成核酸。

可使用本领域已知方法通过重构含有影响 $\sigma 3$ 多肽的至少第一突变的基因组区段来产生感染性亚病毒粒子(ISVP; 如遗传改造的 ISVP)而产生如

本文所述的突变的呼肠孤病毒。参见例如, Schiff等人, “Orthoreoviruses and Their Replication(正呼肠孤病毒和其复制),” 第 52 章, *Fields Virology*(费氏病毒学), Knipe & Howley 编辑, 2006, Lippincott Williams & Wilkins; Smith 等人, 1969, *Virology*, 39(4):791-810; 和美国专利第 7,186,542; 7,049,127; 6,808,916 和 6,528,305 号。还可使用基于质粒的反向遗传学系统通过表达呼肠孤病毒基因组区段来产生 ISVP 而产生突变的呼肠孤病毒。参见例如, Kobayashi 等人, 2007, *Cell Host & Microbe*, 1:147-57。本文所用的遗传改造的或突变的 ISVP 是突变的呼肠孤病毒并指从携带影响至少 $\sigma 3$ 多肽的遗传改造的或自发产生的突变的呼肠孤病毒产生的 ISVP。本文所述的 ISVP 是稳定的并可以 ISVP 繁殖用于多次(如多于一次, 如, 2、3、4、5、10、20、50 或更多)传代。

经由遗传改造的 ISVP 或经由基于质粒的反向遗传学系统产生的本文所述的突变的呼肠孤病毒可培养在例如人类瘤细胞或 L929 小鼠成纤维细胞。本文公开的突变的呼肠孤病毒可培养在仅允许缺乏 $\sigma 3$ 多肽的呼肠孤病毒毒株的细胞中。使用这种细胞系来传代本文所述的突变的呼肠孤病毒可允许选择突变体并且还可用于减少或防止突变的逆转。

使用标准方法可纯化突变的呼肠孤病毒。参见例如, Schiff 等人, “Orthoreoviruses and Their Replication(正呼肠孤病毒和其复制),” 第 52 章, *Fields Virology* (费氏病毒学), Knipe & Howley 编辑, 2006, Lippincott Williams & Wilkins; Smith 等人, 1969, *Virology*, 39(4):791-810; 和美国专利第 7,186,542; 7,049,127; 6,808,916 和 6,528,305 号。可以例如针对 $\sigma 3$ 多肽的抗体使用亲和色谱来除去含有 $\sigma 3$ 多肽的呼肠孤病毒并允许缺乏 $\sigma 3$ 多肽的突变体流过。本文所用的纯化的突变的呼肠孤病毒是指已经从天然伴随其的细胞组分分离的呼肠孤病毒。通常, 当至少 70%(如至少 75%、80%、85%、90%、95%或 99%)干重的呼肠孤病毒不含天然伴随该病毒的蛋白和其它细胞组分时, 认为呼肠孤病毒是纯化的。

本文所述的突变的呼肠孤病毒如与非突变的呼肠孤病毒(如, 对照呼肠孤病毒)相比展示增加的感染性和/或减少的免疫原性, 并可根据这种性状来选择。增加的感染性可由以下证实: 与表达功能性 $\sigma 3$ 多肽的呼肠孤病

毒(如,完整病毒体;如,野生型呼肠孤病毒)相比,突变的呼肠孤病毒感染的瘤细胞范围增加和/或感染的细胞数目增加。突变的呼肠孤病毒的减少的免疫原性可由这种突变的呼肠孤病毒不能在受治疗者中引起显著的免疫应答而证实。本文所述的突变的呼肠孤病毒还可根据其它期望性状筛选和选择,所述性状包括但不限于:复制速率更快;包装速率更快;诱导凋亡的能力;实现溶解和有效杀死人类瘤细胞系的能力;释放有效肿瘤表位的能力;与标准化疗的相互作用;和病毒后代数目增加。此外,突变的呼肠孤病毒可根据溶解地感染瘤细胞(如,具有活性 Ras 途径的哺乳动物细胞)的能力来选择。参见例如,美国专利第 7,052,832 号。

使用具有修饰的序列的呼肠孤病毒的方法

如以前所述(参见例如,美国专利第 6,110,461; 6,136,307; 6,261,555; 6,344,195; 6,576,234 和 6,811,775 号),呼肠孤病毒使用宿主细胞的 Ras 途径机制来下调双链 RNA-活化的蛋白激酶(PKR)并因此在细胞中复制。基于这些发现,已经开发了使用呼肠孤病毒来治疗哺乳动物增生性病症的方法,哺乳动物诸如小鼠、犬、猫、绵羊、山羊、牛、马、猪、非-人类灵长类和人类。本文所述的突变的呼肠孤病毒可用于治疗受治疗者的增生性病症。

增生性病症是任何细胞病症,其中细胞增殖比正常组织生长更快。因此增殖细胞是比正常细胞增殖更快的细胞。增生性病症包括但不限于瘤,也称为肿瘤。瘤可包括但不限于胰腺癌、乳腺癌、脑癌(如成胶质细胞瘤)、肺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、甲状腺癌、肾癌、肾上腺癌、肝癌、神经纤维瘤病 1 和白血病。瘤可为实体瘤(如肉瘤或癌瘤)或影响造血系统的癌性生长(如淋巴瘤或白血病)。其它增生性病症包括但不限于神经纤维瘤病。

通常,在呼肠孤病毒用作疗法的增生性病症中,至少一些增殖细胞可具有突变,其中 Ras 基因(或 Ras 信号转导途径的元件)被直接地(如通过活化 Ras 中的突变)或间接地(如通过活化 Ras 途径中的上游或下游元件)活化。活化 Ras 途径中的上游元件包括,例如藉由表皮生长因子受体(EGFR)或 Sos 的转化。参见例如, Wiessmuller & Wittinghofer, 1994, *Cellular Signaling*, 6(3):247-267; 和 Barbacid, 1987, *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 779-827。

活化 Ras 途径中的下游元件包括,例如 B-Raf 内的突变。参见例如, Brose 等人 (2002, *Cancer Res.*, 62:6997-7000)。此外,呼肠孤病毒可用于治疗 PKR 突变或失调引起的增生性病症。参见例如, Strong 等人 (1998, *EMBO J.*, 17:3351-62)。

本文所述的突变的呼肠孤病毒可施用于患有增生性病症的哺乳动物。本文所用的施用是指递送突变的呼肠孤病毒(如, ISVP)以使突变的呼肠孤病毒接触增殖细胞。施用突变的呼肠孤病毒的途径取决于病症类型和增殖细胞的位置。可采用多种施用途径,并且以下仅通过示例方式提供而不意为以任何方式限制。

对于实体瘤,例如,可通过包括向肿瘤直接注射或通过注射、输注或类似方式系统施用(如静脉内)的方法施用突变的呼肠孤病毒。对于造血的瘤,例如,可静脉内或血管内施用突变的呼肠孤病毒。例如,对于转移瘤或瘤诸如脑瘤,突变的呼肠孤病毒可经由使其系统转运过身体的方式施用(如鞘内、静脉内或肌内)。突变的呼肠孤病毒还可皮下地、腹膜内地(如对于卵巢瘤)、局部地(如对于黑素瘤)、口地(如对于口瘤或食管瘤)、直肠地(如对于结肠直肠癌)、阴道地(如对于子宫颈或阴道瘤)、鼻地或通过吸入喷雾剂(如对于肺癌)施用。可由多于一种途径施用突变的呼肠孤病毒和/或施用突变的呼肠孤病毒到受治疗者中多于一处位置。

如本文公开的突变的呼肠孤病毒以足以治疗增生性病症的量施用(如,有效量)。当向增殖细胞施用突变的呼肠孤病毒实现细胞溶解(如溶瘤作用)、导致增殖细胞数目减少、瘤大小减小、和/或增生性病症相关的症状(如疼痛)减少或消除时,认为治疗了该增生性病症。本文所用的术语溶瘤作用是指溶解至少 10%的增殖细胞(如溶解至少约 20%、30%、40%、50%或 75%的细胞)。可确定溶解百分比,例如,通过测量哺乳动物中瘤大小的减小或增殖细胞数目的减少,或通过体外测量溶解的细胞的量(如根据增殖细胞的活组织检查)。

将在个体基础上确定突变的呼肠孤病毒的有效量,并且可以至少部分地基于所用的具体突变的呼肠孤病毒;个体的尺寸、年龄、性别;和增殖细胞的大小和其它特征。例如,对于治疗人类,可使用大约 10^3 至 10^{12} 个

蚀斑形成单位(PFU)的突变的呼肠孤病毒,这取决于增殖细胞或存在的瘤的类型、大小和数目。例如,有效量可为从约 1.0 PFU/kg 体重至约 10^{15} PFU/kg 体重(如从约 10^2 PFU/kg 体重至约 10^{13} PFU/kg 体重)。可以单剂量或多剂量(如二、三、四、六或更多剂量)施用突变的呼肠孤病毒。可同时或连续地(如经过数天或数周时间)施用多剂量。突变的呼肠孤病毒的治疗可持续数天至数月,或直到实现减少疾病。

预期如本文公开的突变的呼肠孤病毒可联合手术或除去增殖细胞(如瘤)施用。还预期突变的呼肠孤病毒可联合放疗施用或除放疗以外施用。进一步预期突变的呼肠孤病毒可联合抗癌化合物、化疗剂和/或免疫抑制剂施用或除抗癌化合物、化疗剂和/或免疫抑制剂以外施用。这种剂包括但不限于 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素 C、甲氨蝶呤、羟基脲、吉西他滨、环磷酰胺、达卡巴嗪、米托蒽醌、蒽环类(如,表柔比星和多柔比星(doxorubicin));微管蛋白稳定剂(如,长春花生物碱)、针对受体的抗体诸如 HERCEPTIN® (赫赛汀®) (Genentech, South San Francisco, CA)、依托泊苷和 pregnasome、铂化合物诸如碳铂和顺铂、紫杉烷类诸如 TAXOL® (紫杉醇®) (Bristol-Myers Squibb, New York, NY)和 TAXOTERE® (多西紫杉醇®) (Rhone-Poulenc Rorer SA, Antony, France)、激素治疗剂诸如他莫昔芬和抗雌激素、干扰素、芳香酶抑制剂、促孕剂和 LHRH 类似物。还预期如本文公开的突变的呼肠孤病毒可联合血管渗透剂施用或除血管渗透剂以外施用,血管渗透剂诸如但不限于 IL-2、TNF- α 、VEGF、AVASTIN® (Genentech)和松弛素。

药物组合物

提供包括如本文所述的突变的呼肠孤病毒的药物组合物。参见例如,美国专利第 6,576,234 号。除了一种或多种突变的呼肠孤病毒,药物组合物通常包括药学上可接受的载体。药学上可接受的载体可以是作为突变的呼肠孤病毒的运载体、载体或介质的固态、半固态或液态材料。因此,含有突变的呼肠孤病毒的组合可可为以下形式:片剂、丸剂、粉末剂、锭剂、囊剂、扁囊剂、酏剂、悬浮剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气溶胶(作为固体或在液态介质中)、含有例如达 10%的重量的活性化合物的软膏剂、软和硬明胶胶囊、栓剂、无菌注射溶液和无菌包装粉末。

适合载体的一些实例包括磷酸盐缓冲盐水或另一种生理上可接受的缓冲剂、乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、黄芪胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、无菌水、糖浆和甲基纤维素。药物组合物另外可包括但不限于，润滑剂诸如滑石、硬脂酸镁和矿物油；润湿剂；乳化剂和悬浮剂；防腐剂诸如苯甲酸甲酯和苯甲酸丙基羟基酯；甜味剂和调味剂。药物组合物可配制为在通过采用本领域已知程序施用后，提供突变的呼肠孤病毒的快速、持续或延迟的释放。除了下述的代表性制剂，用于药物组合物的其它适合制剂可见于 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (雷氏药理学理论和实践) (2003, Gennaro & Gennaro 编辑, Lippincott Williams & Wilkins)。

对于制备固态组合物诸如片剂，可将突变的呼肠孤病毒与药物载体混合以形成固态组合物。任选地，片剂或丸剂可被包衣或以其它方式复合以提供给予延长作用的益处的剂型。例如，片剂或丸剂可包括内剂量组分和外剂量组分，后者为包封前者的形式。这两种组分可被肠衣层分开，肠衣层用于抵抗胃中的崩解并允许内组分完整地进入十二指肠或延迟释放。多种材料可用于这种肠衣层或包衣，这种材料包括多种聚合物酸 (polymeric acid) 和聚合物酸与诸如虫胶、十六醇和醋酸纤维素等材料的混合物。

用于口服施用或用于注射的包括突变的呼肠孤病毒的液态制剂通常包括水性溶液、适当调味的糖浆剂、水性或油性悬浮液和带有可食用油诸如玉米油、棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油的调味乳剂、以及酞剂和类似药物运载体。

用于吸入或吹入的组合物包括药学上可接受的水性溶剂或有机溶剂或其混合物中的溶液和悬浮液，和粉末。这些液态或固态组合物可包含如本文所述的合适的药学上可接受的赋形剂。为了区域或系统作用，这种组合物可通过口或鼻呼吸途径施用。药学上可接受的溶剂中的组合物可通过使用惰性气体雾化。可直接从雾化装置吸入雾化溶液，或者所述雾化装置可与面罩幕 (face mask tent) 或间歇性正压呼吸机连接。可从以合适方式递送制剂的装置口地或鼻地施用溶液、悬浮液或粉末组合物。

可用于本公开方法的另一种制剂采用经皮递送装置(如贴片)。这种经

皮贴片可用于提供连续或不连续的如本文所述的突变的呼肠孤病毒的输入。用于递送药物剂的经皮贴片的构造和使用是本领域公知的。参见例如，美国专利第 5,023,252 号。这种贴片可构造为连续、脉动性或按需地递送突变的呼肠孤病毒。

如果需要，可将突变的呼肠孤病毒包被在脂质体或胶束中以减少或防止在对呼肠孤病毒有建成的免疫的哺乳动物中的免疫应答。这种组合物称为免疫保护的呼肠孤病毒。参见例如，美国专利第 6,565,831 和 7,014,847 号。此外，本文所公开的突变的呼肠孤病毒(如，缺乏 $\sigma 3$ 多肽或 $\sigma 3$ 多肽缺陷或 $\sigma 3$ 多肽功能缺陷的突变的呼肠孤病毒)可被酶蛋白水解地处理以除去或部分地除去存在的任何其它外衣壳蛋白。

突变的呼肠孤病毒或包含这种突变的呼肠孤病毒的药物组合物可包装到药盒中。预期药盒还可包含一种或多种化疗剂、一种或多种免疫抑制剂和/或一种或多种抗-抗呼肠孤病毒抗体。药物组合物可配制为单位剂型。术语“单位剂型”是指适合作为用于人类受治疗者和其它哺乳动物的单一剂量的物理上离散的单位，各单位含有预先确定量的突变的呼肠孤病毒连同适合的药学上可接受的载体，该量是计算以产生期望治疗效果的量。

根据本公开，可采用本领域技术人员能力范围内的常规分子生物学、微生物学、生物化学和重组 DNA 技术。这种技术在文献中充分阐释。在以下实施例进一步描述本发明的方法和组合物，以下实施例不限制本发明范围，本发明范围描述于权利要求书。

实施例

实施例 1 - 产生突变的呼肠孤病毒

产生在组成型或诱导型启动子控制下表达 S4 基因突变形式的构建体，以便转录正链 RNA。在一个实例中，翻译 S4 基因的起始密码子通过缺失、插入或取代而突变。随后以该构建体转化易感染呼肠孤病毒的细胞系。

以呼肠孤病毒感染转化的细胞系，且如果需要的话诱导 S4 基因的表达。含有该突变的正链 S4 RNA 是病毒 RNA-依赖性 RNA 聚合酶的底物，

该酶产生被包装但非功能性的双链突变的 S4 RNA，至少关于将编码的 $\sigma 3$ 多肽结合入衣壳是非功能性的。

来自转化细胞的后代病毒包括表达 $\sigma 3$ 多肽的野生型呼肠孤病毒以及不表达 $\sigma 3$ 多肽的突变的呼肠孤病毒。不表达 $\sigma 3$ 多肽的突变的呼肠孤病毒偶尔被称为裸的呼肠孤病毒。

例如，用已证实在脱被步骤中阻滞的细胞系使用蚀斑滴定检测选择裸病毒。在这种细胞系中，野生型病毒不能有效复制。选择和扩增最大的蚀斑。可选择地，以针对 $\sigma 3$ 多肽的抗体使用亲和色谱将野生型呼肠孤病毒纯化出来。 $\sigma 3$ 多肽的存在或不存在通过蛋白印迹法和/或免疫沉淀法确定。

应理解的是，尽管已经结合其详细的说明书描述了材料和方法，但是如上的说明书意为阐释而不是限制材料和方法的范围，材料和方法的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、益处和修饰在如下权利要求书的范围内。

公开了这样的方法和组合物——其可用于公开的方法和组合物，可联合公开的方法和组合物使用，可用于制备公开的组合物，或是公开的方法和组合物的产物。本文公开了这些和其它材料，应理解公开了这些方法和组合物的组合、子集、相互作用、组等。即，尽管可能没有明确地公开所具体提到的这些组合物和方法的每一种不同的个体和集合的组合和排列，但是本文具体地预期和描述了每一个。例如，如果公开和讨论了呼肠孤病毒的具体突变或具体方法，且讨论了可对呼肠孤病毒进行的多种突变或可对方法进行的多种修饰，那么除非明确地另外指出，否则明确地包含呼肠孤病毒和方法的每种和所有组合和排列。类似地，还明确地包含和公开这些的任何子集或组合。

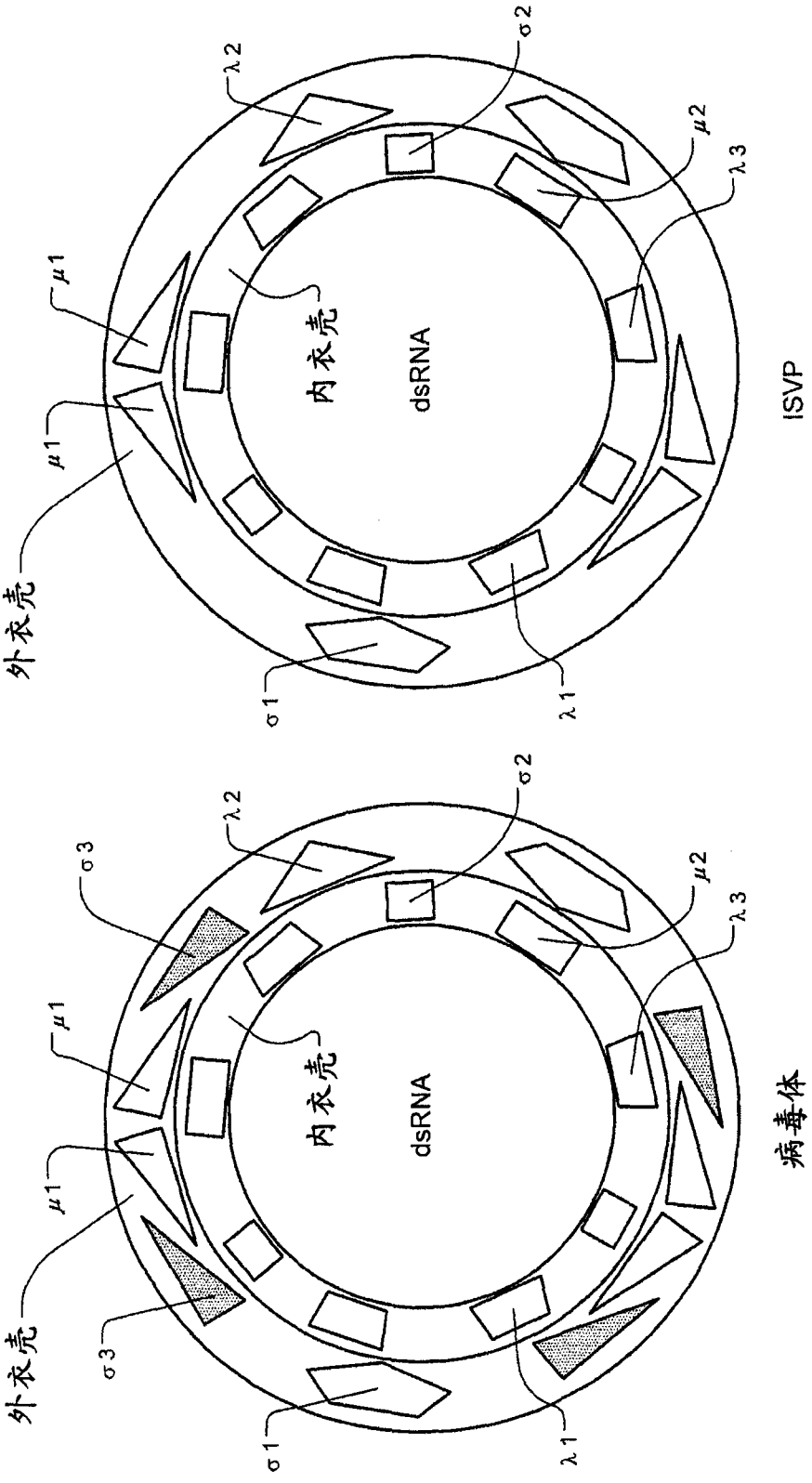


图1