



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I402345B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：098118162

(22)申請日：中華民國 92 (2003) 年 06 月 26 日

(51)Int. Cl. : C12N7/01 (2006.01)

G01N33/50 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

(30)優先權：2002/06/28 美國

60/392,031

2003/01/29 美國

60/443,188

(71)申請人：腫瘤防治生化科技公司 (加拿大) ONCOLYTICS BIOTECH INC. (CA)

加拿大

(72)發明人：湯普森 布拉德雷 G THOMPSON, BRADLEY G. (CA)；柯菲 馬邱 C COFFEY,

MATTHEW C. (CA)

(74)代理人：桂齊恆；閻啟泰

(56)參考文獻：

EP 0931830A2

Ring Christopher J A., Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 83, no. 3, March 2002

(2002-03), pages 491-502.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：0 共 0 頁

(54)名稱

做為腫瘤表現型分類劑之溶瘤病毒

ONCOLYTIC VIRUSES AS PHENOTYPING AGENTS FOR NEOPLASMS

(57)摘要

本發明提供一種鑑定具有特定表現型之腫瘤的方法，該方法係使用一種在具有特定表現型之腫瘤中選擇性複製的溶瘤病毒予以進行。例如，呼腸孤病毒(reovirus)不會在正常細胞中複製。然而，呼腸孤病毒選擇性地在具有經活化的 ras 途徑之細胞中複製，由而導致此等細胞死亡。因此，當細胞因 ras 途徑活性升高(至少佔部分成因)變成腫瘤時，可藉由其對於呼腸孤病毒複製的易感性而鑑定出來。本發明可進一步使用其他溶瘤病毒而應用於其他腫瘤(例如：干擾素敏感型腫瘤、p-53 缺陷型腫瘤及 Rb-缺陷型腫瘤)的鑑定及/或治療上。本發明亦提供本文所揭示之鑑定或治療用的套組。

The present invention provides a method of diagnosing neoplasms having a particular phenotype by using oncolytic viruses that selectively replicate in neoplasms having the particular phenotype. For example, reovirus does not replicate in normal cells. However, reovirus selectively replicate in cells with an activated ras pathway, which leads to death of these cells. Therefore, a cell which becomes neoplastic due to, at least in part, elevated ras pathway activities can be diagnosed by its susceptibility to reovirus replication. This invention can further be applied, using other oncolytic viruses, to the diagnosis and/or treatment of other tumors, such as interferon-sensitive tumors, p53-deficient tumors and Rb-deficient tumors. Kits useful in the diagnosis or treatment disclosed herein are also provided.

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：9811816

※申請日期：92.6.26

原申請案號：92117377

※IPC 分類：

C12N 7/01 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

做為腫瘤表現型分類劑之溶瘤病毒

Oncolytic Viruses as Phenotyping Agents for Neoplasms

二、中文發明摘要：

本發明提供一種鑑定具有特定表現型之腫瘤的方法，該方法係使用一種在具有特定表現型之腫瘤中選擇性複製的溶瘤病毒予以進行。例如，呼腸孤病毒(reovirus)不會在正常細胞中複製。然而，呼腸孤病毒選擇性地在具有經活化的 ras 途徑之細胞中複製，由而導致此等細胞死亡。因此，當細胞因 ras 途徑活性升高(至少佔部分成因)變成腫瘤時，可藉由其對於呼腸孤病毒複製的易感性而鑑定出來。本發明可進一步使用其他溶瘤病毒而應用於其他腫瘤(例如：干擾素敏感型腫瘤、p-53 缺陷型腫瘤及 Rb-缺陷型腫瘤)的鑑定及/或治療上。本發明亦提供本文所揭示之鑑定或治療用的套組。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a method of diagnosing neoplasms having a particular phenotype by using oncolytic

viruses that selectively replicate in neoplasms having the particular phenotype. For example, reovirus does not replicate in normal cells. However, reovirus selectively replicate in cells with an activated ras pathway, which leads to death of these cells. Therefore, a cell which becomes neoplastic due to, at least in part, elevated ras pathway activities can be diagnosed by its susceptibility to reovirus replication. This invention can further be applied, using other oncolytic viruses, to the diagnosis and/or treatment of other tumors, such as interferon-sensitive tumors, p53-deficient tumors and Rb-deficient tumors. Kits useful in the diagnosis or treatment disclosed herein are also provided.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 無 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

（無）

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

（無）

六、發明說明：

相關申請案

本發明請求美國臨時申請案系列號 60/392,031(申請日：2002 年 6 月 28 日)；及系列號 60/443,188(申請日：2003 年 1 月 29 日)之優惠。此等優先申請各自所揭示之內容以引述方式納入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種檢測腫瘤之潛在成因的方法，特定言之，係將呼腸孤病毒使用於鑑定 ras 活化型腫瘤。此外，具有不同選擇性之其他溶瘤病毒亦可使用於鑑定特定的腫瘤類型。

參考文獻

美國專利案第 6,136,307 號案。

WO 94/18992，公告於 1994 年 9 月 1 日。

Bischoff JR. 等人，“在 p53 缺陷型人類腫瘤中選擇性複製之腺病毒突變體(An Adenovirus Mutant that Replicates Selectively in p53-Deficient Human Tumor)”，*科學 (Science)* 274(5286)：373-376 (1996)。

Bos, J.，“人類癌症中之 ras 致癌基因：綜覽(ras oncogenes in human cancer: a review)”，*癌症研究 (Cancer Res.)* 49：4682-4689 (1989)。

Campbell, S.L. 等人，“錯綜複雜的 Ras 信號(Increasing complexity of Ras signaling)，*致癌基因 (Oncogene)* 17：1395-1413 (1998)。

Chandron 與 Nibert, “經蛋白酶切割之呼腸孤病毒蛋白殼蛋白質 mul 及 mulC 被硫酸烷基酯類清潔劑阻斷, 並產生一種新型的傳染性次病毒顆粒 (Protease cleavage of reovirus capsid protein mul and mulC is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subvirion particle)”, *病毒學期刊 (J. of Virology)* 72(1): 467-75 (1998)。

Chang 等人, *J. Virol.* 69: 6605-6608 (1995)。

Chang 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 4825-4829 (1992)。

Chang 等人, *Virol.* 194: 537-547 (1993)。

Fueyo, J. 等人, “一種攻擊 Rb 途徑的突變體溶瘤腺病毒於生物體內產生抗神經膠質瘤作用 (A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb pathway Produces Anti-Glioma Effect *in vivo*)”, *致癌基因 (Oncogene)* 19 (1): 2-12 (2000)。

Gutkind, J.S., “由不同的促細胞分裂素活化蛋白質激酶階級使 G 蛋白質偶合型受體與細胞核連結的途徑 (The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades)”, *J Biol Chem.* 273: 1839-1842 (1998)。

Kawagishi-Kobayashi, M. 等人, *Mol. Cell. Biol.* 17: 4146-4158 (1997)。

Nemunaitis, J., “溶瘤病毒 (Oncolytic virus)”, *J. Invest. New Drugs* 17: 375-386 (1999)。

Nibert, M.L., Schiff, L.A., 及 Fields, B.N., “呼腸孤病毒及其複製(reovirus and their replication)”, *Virology* 第 1557-96 頁(Fields 等人, 第 3 版), Lippencott-Raven 出版社, 1996。

Romano 等人, *Mol. Cell. Biol.* 18(12): 7304-7316 (1998)。

Sharp 等人, *Virology* 250: 302-315 (1998)。

Smith, R.E. 等人, “第 3 型呼腸孤病毒之病毒粒子多胜肽成分、頂部成分及核心 (Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3)”, *Virology*, 39: 791-800 (1969)。

Smith, C.A. 等人, “以多參數流動細胞計數法檢測人類乳癌中 p53、Her-2/neu、及 ras 過度表現與非整倍體之間的相關性：關於浸潤性乳管癌之一般表現型演化圖樣之證據 (Correlations among p53, Her-2/neu, and ras overexpression and aneuploidy by multiparameter flow cytometry in human breast cancer: evidence for a common phenotypic evolutionary pattern in infiltrating ductal carcinoma)”, *Clin Cancer Res.* 6(1): 112-26 (2000)。

上文所陳或於本申請案所述之所有文獻、專利案及專利申請案之全文皆以引述方式納入本文中，其引述的程度正猶如各篇文獻、專利案及專利申請案之揭示係詳細且各別地以其全文用引述方式納入本文中的方式予以揭露。

【先前技術】

隨著近來在腫瘤學及細胞生物學領域的發展，研究人員已能夠著手進行專一地攻擊癌症潛在肇因的藥物發展計畫，尤其是當該肇因為特定基因產物缺陷或突變時尤然。因此，若臨床醫生有檢測各個癌症病患的癌症肇因之工具時，則可以選擇對該特定肇因具有最佳效果的合宜治療體系。

Ras 致癌基因是大多數腫瘤的主要成因。在所有人類腫瘤中，約有 30%發生 ras 基因本身的活化突變(Bos, J.L., 1989)，主要發生於胰臟癌(90%)、散發型結腸直腸癌(50%)、及肺癌(40%)、以及骨髓性白血病(30%)。除了 ras 基因本身的突變作用以外，在 ras 途徑之 ras 上游及下游因子之活化作用亦與腫瘤有關。例如，HER2/Neu/ErbB2 或上皮生長因子(EGF)受體過度表現常見於乳癌(25-30%)，而血小板衍生之生長因子(PDGF)受體或 EGF 受體之過度表現，則普遍發生於神經膠質瘤及神經膠母細胞瘤(40-50%)。已知，EGF 受體及 PDGF 受體二者皆是在 ras 結合於其各別之配位子時活化 ras，而 v-erbB 編碼主要被活化之欠缺細胞外區段的受體。總括而論，一般認為，ras 致癌基因或 ras 途徑上游分子直接突變在所有腫瘤中約發生三分之二。

既然 ras 途徑在腫瘤發生上扮演要角，期盼能檢測出腫瘤是否與 ras 途徑的活化作用有關，由而可以發展出一種合宜的治療體系。然而，在本發明以前，未有一種簡單且敏感之診斷癌症與 ras 途徑間之相關性的方法。雖然 ras 結構

基因突變可藉由聚合酶鏈反應(PCR)高度靈敏地測得，但在 ras 途徑中有許多其他因子可能是高 ras 活性的肇因，例如位於 ras 基因兩旁序列之突變(導致 ras 基因產物的異常高表現量)、在 ras 途徑之 ras 上游及或下游因子的結構基因突變，或是調節性表現(影響此等 ras 上游及或下游因子的表現量)。因此，ras 基因之 PCR 無法精確地鑑定出所有與 ras 途徑有關的癌症。仍需一種簡單且精確診斷 ras 活化型腫瘤的方法。

【發明內容】

發明大綱

本發明提供一種診斷具有特定表現型之腫瘤(特別是因 ras 途徑異常高活性所形成的腫瘤)的方法，該方法是藉由使用呼腸孤病毒或其他類似的溶瘤病毒達成。呼腸孤病毒不會在正常細胞中複製。然而，呼腸孤病毒選擇性地在具有經活化之 ras 途徑的細胞中複製，由而導致此等細胞死亡。由於 ras 結構基因或 ras 途徑中的任何其他因子突變可能活化此等細胞中的 ras 途徑，由而導致該途徑活化。因此，當細胞因 ras 途徑活性升高(至少佔部分成因)變成腫瘤時，可藉由其對於呼腸孤病毒複製的易感性而鑑定出來。

據此，本發明之一方向是提供一種檢測生物樣品中之 ras 活化型腫瘤細胞的方法，該方法包括使該樣品與呼腸孤病毒接觸，及測定呼腸孤病毒在該樣品中複製的能力，其中，該呼腸孤病毒複製能力係指樣品中含有 ras 活化型腫瘤細胞。

該生物樣品較佳是來自哺乳動物，尤其是人類。任一種能於 ras 活化型細胞中複製的呼腸孤病毒皆可使用於本發明，例如哺乳類呼腸孤病毒或鳥類呼腸孤病毒。哺乳類呼腸孤病毒較佳為血清型 3 號呼腸孤病毒，更佳為迪爾玲 (Dearing) 品系呼腸孤病毒。

於一較佳具體實例中，該生物樣品是取自帶有由下列所成組群選出之腫瘤的動物：肺癌、前列腺癌、直腸結腸癌、甲狀腺癌、腎臟癌、腎上腺癌、肝癌、胰臟癌、乳癌、造血系癌及中樞暨周邊神經系統癌。

本發明之另一方向是提供一種診斷動物中之 ras 活化型腫瘤的方法，包括：

- (a) 由動物體取出生物樣品，其中，該樣品包括細胞；
- (b) 在呼腸孤病毒可於 ras 活化型細胞中複製的條件下，使樣品與呼腸孤病毒接觸；
- (c) 測定呼腸孤病毒於樣品中複製的能力；及
- (d) 若呼腸孤病毒可於樣品中複製，則證明該動物具有 ras 活化型腫瘤。

該動物較佳為哺乳動物，尤其是人類。任一種能於 ras 活化型細胞中複製的呼腸孤病毒皆可使用於本發明，例如哺乳類呼腸孤病毒或鳥類呼腸孤病毒。哺乳類呼腸孤病毒較佳為血清型 3 號呼腸孤病毒，更佳為迪爾玲品系呼腸孤病毒。

於一較佳具體實例中，該生物樣品是取自帶有由下列所成組群選出之腫瘤的動物：肺癌、前列腺癌、直腸結腸

癌、甲狀腺癌、腎臟癌、腎上腺癌、肝癌、胰臟癌、乳癌、造血系統癌及中樞暨周邊神經系統癌。

本發明之另一方向是提供一種治療或改善動物中之 ras 活化型腫瘤的方法，包括：

(a)藉由下列步驟鑑定動物中之 ras 活化型腫瘤：由動物體取出細胞群，在呼腸孤病毒可於 ras 活化型細胞中複製的條件下，使彼等細胞與呼腸孤病毒接觸，及若呼腸孤病毒可於細胞中複製，則證明該等細胞包括 ras 活化型細胞；及

(b)對該動物投予有效量之對 ras 活化型腫瘤具選擇性之治療劑。

該對 ras 活化型腫瘤具選擇性之治療劑較佳為溶瘤病毒。該溶瘤病毒較佳為呼腸孤病毒、VA1 區域突變之腺病毒、K3L 及/或 E3L 區域突變的牛痘病毒、OV20.0L 基因突變之羊痘瘡副痘病毒、NS-1 基因突變之流感病毒、 $\gamma_{134.5}$ 基因突變之疱疹病毒、水泡性口炎病毒(VSV)、或新城疫病毒。其他對 ras 活化型腫瘤具選擇性之治療劑包含，但不限於法呢基轉移酶抑制劑(FTIs)及 RAF 激酶抑制劑。

於本發明任一具體實例中，呼腸孤病毒可為重組體呼腸孤病毒。該重組體呼腸孤病毒可藉由以不同亞型的呼腸孤病毒共感染哺乳類細胞而生成。該重組體呼腸孤病毒可為自然發生或是非自然發生。重組體呼腸孤病毒可來自二種或更多種呼腸孤病毒品系，尤其是由迪爾玲品系、阿布尼(Abney)品系、瓊尼絲(Jones)品系、及雷恩(Lang)品系所成組群選出之二種或更多種呼腸孤病毒品系。該重組體呼

腸孤病毒亦可為不同血清型之呼腸孤病毒基因重排的結果，彼等不同血清型之呼腸孤病毒為例如由血清型 1 號呼腸孤病毒、血清型 2 號呼腸孤病毒、及血清型 3 號呼腸孤病毒所成組群選出者。該等重組體呼腸孤病毒可包括自然發生之變異體外殼蛋白質編碼序列或突變之外殼蛋白質編碼序列。

除了呼腸孤病毒以外，亦有若干種其他溶瘤病毒亦對 ras 活化型腫瘤具選擇性，因此，可依呼腸孤病毒之相同方式使用彼等病毒而實施本發明。此等病毒包含，但不限於 VA1 區域突變之腺病毒、K3L 及/或 E3L 區域突變的牛痘病毒、OV20.0L 基因突變之羊痘瘡副痘病毒、NS-1 基因突變之流感病毒、或 γ 134.5 基因突變之疱疹病毒。因此，例如本發明之一方向是提供一種檢測生物樣品中之 ras 活化型腫瘤細胞的方法，包括：使樣品與彼等在 PKR 缺陷型細胞中選擇性地複製之溶瘤病毒接觸，及測定該病毒於樣品中複製的能力，其中，該病毒複製的能力係指樣品中所含之 ras 活化型腫瘤細胞。較佳，該溶瘤病毒係由下列所成組群選出者：VA1 區域突變之腺病毒、K3L 及/或 E3L 區域突變的牛痘病毒、OV20.0L 基因突變之羊痘瘡副痘病毒、NS-1 基因突變之流感病毒、或 γ 134.5 基因突變之疱疹病毒。

再者，有許多種可以選擇性地感染特定的腫瘤細胞之其他溶瘤病毒亦可依呼腸孤病毒之相同方式使用於本發明。例如，水泡性口炎病毒(VSV)可用於診斷干擾素抗性腫瘤，ONYX-015 病毒可用於診斷 p53 缺陷型病毒，而 δ 24

病毒可用於診斷 Rb 缺陷型腫瘤。不過，使用於本發明之溶瘤病毒較佳不為腺病毒，尤其是不為 ONYX-015 病毒。

本發明進一步提供一種治療或改善干擾素抗性腫瘤、p53 缺陷型腫瘤、或 Rb 缺陷型腫瘤的方法，該方法係藉由先使取自腫瘤的生物樣品與選自 VSV、ONYX-015 病毒及 δ 24 所成組群的病毒接觸，當診斷結果為陽性時，接著以適宜的治療劑治療該腫瘤。

本發明之又一方向係提供一種套組，該套組包括呼腸孤病毒及用於檢測呼腸孤病毒複製的裝置。該檢測裝置可為一對專一辨識呼腸孤病毒核酸的引子，且可視需要包含 PCR 試劑。該檢測裝置亦可為專一辨識呼腸孤病毒蛋白質的抗體，以及附加試劑如第二抗體。該檢測裝置又可為適於在顯微鏡下觀察被感染細胞之形態的玻璃片及染料，或是可用於測定呼腸孤病毒力價之病毒培養基及細胞。相仿地，本發明亦提供他種套組，該等套組包括其他能在特定腫瘤細胞中複製的病毒，以及用於檢測該病毒複製的裝置。此等病毒的實例包含，但不限於 VSV、ONYX-015 病毒及 δ 24 病毒。

本發明的另一方向係提供一種套組，該套組包括至少兩種可用於如本發明表現型分類腫瘤的病毒。該等病毒較佳係選擇具有不同表現型的腫瘤。較佳，該等病毒係由呼腸孤病毒、VSV、ONYX-015 病毒及 δ 24 病毒所成組群選出者。

本發明之再一方向係提供一種套組，該套組包括用於診斷特定表現型腫瘤之病毒，以及對該腫瘤具選擇性的治

療劑。

再者，由於溶瘤病毒選擇性地在腫瘤細胞複製而不於正常細胞複製，本發明之另一方向係提供一種診斷存在於哺乳動物中之腫瘤的方法，該方法包括使來自該哺乳動物細胞的樣品與溶瘤病毒接觸，其中，該病毒在該樣品中複製的能力表示該哺乳動物中有腫瘤。

本發明的其他方向將由本申請案全文之揭示予以證明。

發明之詳細說明

本發明提供一種藉由使用溶瘤病毒診斷具有特定表現型之腫瘤的方法。特定言之，因 ras 途徑異常高活性所致之腫瘤可使用呼腸孤病毒予以診斷出。呼腸孤病毒不會在正常細胞中複製。然而，呼腸孤病毒選擇性地在具有經活化的 ras 途徑之細胞中複製，由而導致此等細胞死亡。因此，ras 活化型腫瘤可藉由其對於呼腸孤病毒的易感性而診斷出來。而後，該診斷將促使更有效率地治療或改善腫瘤。

本發明可進一步應用於診斷及/或治療或是改善其他腫瘤，例如干擾素抗性腫瘤、p53 缺陷型腫瘤、或 Rb 缺陷型腫瘤。亦提供用於本文揭示之診斷或治療之套組。

在進一步詳細說明本發明之前，先將使用於本申請案之詞彙定義如下，除非另有說明。

定義

使用於本文之“腫瘤細胞”亦作“增殖失調之細胞”，係指增殖時不具正常生長抑制性的細胞。而包括腫瘤細胞的新

生長物即為“腫瘤(neoplasm 或是 tumor)”。腫瘤是一種異常的組織生長物，一般是因細胞增殖比正常組織生長物更迅速地生長所形成的一種獨特團狀物。腫瘤在結構組織上，以及與正常細胞之功能協調上可能表現部分或完全缺乏。至於使用於本文之腫瘤大致包含造血系腫瘤及固體性腫瘤。

腫瘤可為良性(良性腫瘤)或惡性(惡性腫瘤或癌)。惡性腫瘤可概略區分成三種主要類型。發生於上皮結構的惡性腫瘤稱為癌瘤，起源於結締組織如肌肉、軟骨、脂肪或硬骨之惡性腫瘤稱為肉瘤，而影響造血系結構(與形成血液細胞有關的結構，包含免疫系統成分)的惡性腫瘤稱為血癌及淋巴瘤。其他腫瘤包含但不限於纖維神經瘤病。

“PKR 缺陷型細胞”是其中之 PKR 不比正常細胞所含 PKR 活躍的細胞。此 PKR 之缺陷可能是由於例如 PKR 基因突變，或是 PKR 蛋白質質量或活性減低。例如，ras 活化型腫瘤細胞之 PKR 缺陷是由於活化之 ras 途徑阻斷 PKR 的磷酸化。PKR 蛋白質質量或活性的分析法為技藝中周知者。

至於本文所用之“ras 活化型腫瘤細胞”或“ras 調節型腫瘤細胞”是指至少部分由於 ras 途徑之活化作用，導致其以異常高速進行增殖的細胞。Ras 途徑可由下列方式予以活化：ras 基因結構突變、ras 基因表現量增加、ras 基因信息的穩定度增加、或是導致 ras 或位於 ras 途徑之 ras 下游及或上游的因子活化，由而增加 ras 途徑活性的任何突變或其他機制。例如，EGF 受體、PDGF 受體或 Sos 的活化作用導

致 ras 途徑活化。Ras 調節型腫瘤細胞包含，但不限於 ras 調節型癌細胞，彼等細胞係因 ras 途徑的活化作用，以惡性腫瘤的方式予以增殖。

“ras 活化型腫瘤”是指 ras 途徑被活化的腫瘤。

“干擾素抗性腫瘤”或是“具有干擾素抗性表現型的腫瘤”是指可以用干擾素- α 、 β 或 γ 予以治療或改善的腫瘤。

“p53 缺陷型腫瘤”或是“具有 p53 缺陷之表現型的腫瘤”是指細胞腫瘤抑制物 p53 含量比正常細胞低的腫瘤。

“Rb 缺陷型腫瘤”或是“具有 Rb 缺陷之表現型的腫瘤”是指細胞腫瘤抑制物 Rb 含量比正常細胞低的腫瘤。

“溶瘤病毒”是一種選擇性殺死腫瘤細胞的病毒。腫瘤細胞的撲殺作用可藉由任何技藝中已確立的方法予以檢測，例如：測定存活細胞量、細胞病變作用、腫瘤細胞凋零、腫瘤細胞中合成之病毒蛋白質[例如：代謝標記法、病毒蛋白質之韋斯頓(Western)分析法、或病毒複製之必要基因的逆轉錄聚合酶鏈反應]、或是腫瘤尺寸減小。

至於本發明所用之“呼腸孤病毒”是指歸類於呼腸孤病毒屬的任一種病毒。呼腸孤病毒之名(呼吸及腸道孤兒病毒)為一種敘述頭字語，暗指此等病毒雖然與已知之人類疾病狀態無任何相關性，卻可由呼吸道及腸道分離出來。“呼腸孤病毒”一詞是指歸類於呼腸孤病毒屬的所有病毒。

人類呼腸孤病毒由三種血清型組成：第 1 型(雷恩品系或 T1L)、第 2 型(瓊尼絲品系，T2J)、第 3 型(迪爾玲品系或阿布尼品系，T3D)。此三種血清型可依據中和作用及血細

胞凝集抑制分析輕易地鑑定(參見,例如 Nibert 等人,1996)。

呼腸孤病毒可為自然發生或經改質者。當呼腸孤病毒可由自然來源分離,且非由實驗室人員故意改質時,該呼腸孤病毒為“自然發生”者。例如,呼腸孤病毒可來自“實地來源”,亦即,來自經呼腸孤病毒感染的人。

呼腸孤病毒可經予改質,但仍能溶解感染具有活化之 ras 途徑的哺乳類細胞。呼腸孤病毒在投藥至增殖中的細胞之前可先經化學性或生化性預處理(例如以蛋白酶如胰凝乳蛋白酶或胰蛋白酶處理)。以蛋白酶預處理去除病毒的外被膜及蛋白殼,且可以增加病毒的感染性。呼腸孤病毒可包被於脂質體或膠團中(Chandron 與 Nibert, 1998),以減少或防止來自人類之已發展出的對於呼腸孤病毒的免疫力。例如,病毒粒子可在形成硫酸烷基酯清潔劑濃縮物的膠團存在下,以胰凝乳蛋白酶處理,而生成一種新穎的感染性次病毒粒子顆粒。

呼腸孤病毒可為經由來自兩種或更多種遺傳性不同之呼腸孤病毒的基因組片段進行重組/基因重排而產生之重組體呼腸孤病毒。重組體呼腸孤病毒可來自兩種或更多種具不同致病表現型之呼腸孤病毒(例如含有不同抗原決定子者),由而減少或預防因哺乳動物事先曝露於呼腸孤病毒亞型所引起之免疫反應。重組體呼腸孤病毒亦可展現有別於原始呼腸孤病毒之不同生物活性(例如在腫瘤細胞中的複製活性及生物分布性)。呼腸孤病毒基因組片段之重組/基因重排亦可在以至少兩種遺傳性不同之呼腸孤病毒感染寄主生

物後自然發生。重組體呼腸孤病毒亦可在細胞培養時發生，例如：藉由以遺傳性不同之呼腸孤病毒共感染容許的寄主細胞(Nibert 等人，1996)。

據此，本發明思及，由來自兩種或更多種遺傳性不同之呼腸孤病毒的基因組片段基因重排而得之重組體呼腸孤病毒的用途，該等遺傳性不同之呼腸孤病毒包含，但不限於人類呼腸孤病毒，例如：第 1 型(如，雷恩品系)、第 2 型(如，瓊尼絲品系)、第 3 型(迪爾玲品系或阿布尼品系)、非人類哺乳類呼腸孤病毒、或鳥類呼腸孤病毒。本發明進一步思及由來自兩種或更多種遺傳性不同之呼腸孤病毒的基因組片段基因重排而得之重組體呼腸孤病毒的用途，其中至少一種母系病毒係由遺傳工程獲得、包括一個或更多個化學合成之基因組片段、業經化學或物理誘變劑處理、或其本身為重組事件的結果。本發明進一步思及業已在化學誘變劑或物理誘變劑存在下進行重組之重組體呼腸孤病毒的用途，該等化學誘變劑包含，但不限於硫酸二甲酯及溴化乙鎢，該等物理誘變劑包含，但不限於紫外線或其他型式之幅射。

本發明進一步思及包括在一個或更多個基因組片段中發生刪失或複製的重組體呼腸孤病毒、包括因與寄主細胞基因組重組而產生其他遺傳訊息的重組體呼腸孤病毒、或包括合成之基因的重組體呼腸孤病毒。

“表現型分類(phenotyping)”腫瘤，是指依腫瘤的表現型進行腫瘤分類。例如：腫瘤表現型包含 ras 途徑活化、干擾

素抗性、p-53 缺陷及 Rb-缺陷。彼等表現型並不相互排斥，亦即，一種腫瘤可能經表現型分類成一種以上的類別。

“生物樣品”是一種由生物個體，例如動物，收集的樣品。

“有效量”是一種足以達到所欲目的的量。例如：為達到治療或改善疾病或是病情的目的之呼腸孤病毒有效量，是足以導致疾病症狀或病情減輕或完全去除的量。現存治療劑的有效量將依例如下列因子：藥劑屬性、投藥途徑、接受治療劑之動物大小及種類、以及投藥目的而異。各個個體案例的有效量可由熟諳技藝之人士，依據技藝上已確立之方法作實驗決定。

“治療或改善”疾病或是病情，是指減輕或完全去除疾病症狀或病情。

一治療劑對某一特定疾病或病情具“選擇性”，是指該治療劑對該疾病或病情比對其他疾病或病情更有效。相仿地，一治療劑對某一特定腫瘤細胞族群具“選擇性”，是指該治療劑撲殺該特定腫瘤細胞族群的效率比撲殺其他腫瘤細胞的效率更高。

方法

本發明有效用於精確地表型分析腫瘤，由而促進發展出適於特定腫瘤的治療體系。於一較佳具體實例中，呼腸孤病毒被用於感染由患有腫瘤之動物取得的生物樣品。由於呼腸孤病毒選擇性地感染 ras 活化型腫瘤細胞，而不感染正常細胞或 ras 途徑未經活化的腫瘤細胞，本方法可以使醫師精確地判定腫瘤是否與 ras 途徑活化作用有關。若診斷出

為 ras 活化型，則可用 ras 專一性治療體系，例如呼腸孤病毒治療法(美國專利第 6,1636,307 號)治療該腫瘤。

Ras 途徑為一種導致細胞增殖之複雜的信號傳遞途徑。Ras 為此途徑之中樞接替物，其接收來自上游分子(例如生長因子受體)的信號，並將彼等信號傳遞至下游分子。

許多生長因子受體，例如：上皮生長因子(EGF)受體、血小板衍生之生長因子(PDGF)受體、及 EGF 受體相關性分子(例如 Her2/Neu/ErbB2)，具有內在酪胺酸激酶活性，該活性由配位子誘發之受體二聚體化作用予以活化。如此導致受體之酪胺酸殘基的自體磷酸化作用，並致使含有 Src 同源區 2(SH2)之蛋白質的結合作用。此等 SH2 蛋白質中之二者 Grb2 及 SHC 間接活化結合於漿膜之小型 GTP 結合型蛋白質 Ras。Ras 活化作用亦發生於對結合於 7 個穿膜區段 G 蛋白質偶合型受體之配位子反應時(例如，Gutkind, 1998)。Ras 及其他經生長因子經受體調節之信號途徑的活化作用最終導致細胞骨架及基因表現的改變，此等改變乃是細胞增殖、分化及轉型所需(回顧 Campbell 等人，1998)。

三種人類 ras 基因(Ha-Ras、N-Ras、及 Ki-Ras)編碼 4 種蛋白質(此因 Ki-Ras mRNA 選擇性剪接所致)。於正常情況下，Ras 蛋白質在活化態(GTP 結合態)及不活化態(GDP 結合態)之間循環。Ras 活化作用發生於所結合之 GDP 轉換成 GTP 時，此作用是由鳥嘌呤核苷酸轉換因子家族促成。Ras 不活化作用發生於所結合之 GTP 轉換 GDP 時。此反應是由 GTPase 活化蛋白質(GAPs)促成。在許多人類癌症中，

因破壞 GTPase 活性的突變作用，使 Ras 蛋白質變成癌性活化型，由而使 Ras 信號作用失調(參照 Campbell 等人，1998)。

存在著許多可適用作為 Ras 訊息傳遞及致癌轉型作用下游之預定的 Ras 效應物，彼等效應物包含小型 GTPase 之 Rho 家族成員、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)、及絲胺酸/酪胺酸蛋白質激酶 c-Raf-1 (參照 Campbell 等人，1998)。Raf 調節型信號作用是最富特色之 Ras 效應物途徑。被活化之 Ras 促使 Raf 回復至 Raf 發生活化時之膜。經活化之 Raf 為激酶級聯[促細胞分裂素活化型蛋白質激酶(MARK)級聯]的起始成分。Raf 磷酸化並活化 MEK1 及 MEK2 (MAPK/ERK 激酶)蛋白質激酶，由而磷酸化並活化細胞外信號調節激酶 ERK1 及 ERK2(亦稱為 MAPK1 及 MAPK2)。與其下游標的物 ERK1、2 不同的是：MEK1、2 蛋白質為高度專一性酵素，彼等酵素所辨識的基質僅為 ERK1、2 蛋白質。當活化時，ERK1 及 ERK2 磷酸化(並由而調節)多種標的蛋白質(包含核轉錄因子)，導致最終的細胞反應。

據此，有若干事件可導致 ras 途徑的活化作用。例如：突變可發生於三種 ras 結構基因的任一者。結構性突變亦可發生於 ras 受體上游、ras 下游之信號傳遞子(如 raf 或 mek1、2)、或是最終效應物 MAPK1 及 2。相仿地，導致 ras 途徑中之任一種蛋白質異常高量表現的調節性突變亦可能造成細胞分裂素所致之細胞反應。此種調節性突變可能發生於 ras 途徑成員之調節性序列的任一處，或者甚至於可發生在控制 ras 途徑成員表現的因子調節區域。因此，檢測 ras 途

徑中任一特定成員的異常並非決定 ras 途徑是否被活化的有效方式。

由於 MAPK 的基本活化作用為 ras 途徑活化作用的指標，因此可以測定 MAPK(ras 途徑的最終效應物)的活性。然而，此種生化性研究需要大量的樣品材料，以及冗長的程序，例如 MAPK 的萃取及/或部分純化。

藉由檢測 ras 被活化的表現型而非任何特定基因或基因產物的異常，使本發明可有效用於不論 ras 活化作用是肇因於 ras 結構基因、ras 基因之調節性序列、或 ras 途徑中之任何其他因子的突變。因此，本方法相當簡單，且不須由樣品萃取或純化酵素。

呼腸孤病毒感染樣品中之細胞的能力可藉技藝中的任一方法測定。例如：呼腸孤病毒核酸複製作用可使用對所用之呼腸孤病毒具專一性的引子進行聚合酶鏈反應予以測定；呼腸孤病毒蛋白質之合成可由特定抗體檢測；感染的細胞可在顯微鏡下觀察，並藉由所測得之呼腸孤病毒所誘發的細胞病理作用證實；而複製之病毒可由樣品收取，並由所測得之病毒力價評估是否發生病毒之複製作用。其他測定呼腸孤病毒複製作用之存在的方法為熟諳技藝之人士已知或可發展出來者。

應注意，腫瘤可含有多種致癌性異常。特定言之，據報導，乳癌在 ras 活化以前，常有 p53 過度表現(Smith 等人，2000)。然而，除了 ras 途徑活化作用以外之其他致癌性異常的存在不會阻礙專一適合於 ras 活化型腫瘤之治療體系

的能力。例如，呼腸孤病毒仍可以選擇性地殺死 ras 活化型腫瘤細胞，即便彼等細胞亦含有異常高量的 p53。

再者，由於溶瘤病毒選擇性地在 ras 活化型腫瘤細胞複製而不於正常細胞複製，本發明之另一方向係提供一種診斷存在於哺乳動物中之腫瘤的方法，該方法包括使來自該哺乳動物細胞的樣品在呼腸孤病毒可於 ras 活化型細胞複製的條件下，與呼腸孤病毒接觸，其中，該呼腸孤病毒在該樣品中複製的能力表示該哺乳動物中有腫瘤。

如同呼腸孤病毒，若干其他溶瘤病毒亦選擇性地在 ras 活化型細胞複製。預期此等溶瘤病毒可依如同呼腸孤病毒的相同方式用於實施本發明。此等病毒一般為敏感於雙股 RNA 激酶(PKR)的突變體，然而其野生型確對 PKR 不敏感。

一般而言，當病毒進入細胞，PKR 被活化並阻斷蛋白質合成，使病毒不會在體內合成。某些病毒發展出一種抑制 PKR 的系統，促使病毒蛋白質合成，以及病毒複製。例如，腺病毒製造大量小型 RNA，VA1 RNA。VA1 RNA 具有廣擴的二級結構並與 PKR 結合，而與正常地活化 PKR 的雙股 RNA(dsRNA)競爭。由於活化 PKR 需要極小長度的 dsRNA，故 VA1 RNA 不會活化 PKR。相反地，VA1 RNA 憑藉著其大數量隔離 PKR。繼之，蛋白質合成不被阻斷，使腺病毒可在細胞中複製。

Ras 活化型腫瘤細胞不會進行 PKR 所抑制之蛋白質合成作用，因為 ras 使 PKR 不活化。此等細胞因而易於感染病毒，即便彼等病毒不具 PKR 抑制系統。因此，若腺病毒

中的 PKR 抑制劑突變而不再阻斷 PKR 功能，則導致病毒因蛋白質合成作用不被 PKR 抑制而無法感染正常細胞(腺病毒在缺乏 PKR 活性的 ras 活化型腫瘤細胞中複製)。

據此，經改質或突變以致於不會抑制 PKR 功能的病毒選擇性地在 ras 活化型腫瘤細胞中複製，而正常細胞抵抗此等病毒。較佳，病毒為 VA1 區域突變之腺病毒、K3L 及/或 E3L 區域突變的牛痘病毒、OV20.0L 基因突變之羊痘瘡副痘病毒、NS-1 基因突變之流感病毒、 $\gamma_134.5$ 基因突變之疱疹病毒。

彼等病毒可依已知之結構-功能相關性病毒 PKR 抑制劑予以改質或突變。例如，由於 E3 蛋白質的胺基端區域與 PKR 的羧基端區域交互作用，此區段的刪失或點突變防止抗 PKR 功能(Chang 等人，1992、1993、1995；Sharp 等人，1998；Romano 等人，1998)。牛痘病毒的 K3L 基因編碼 pK3，一種 PKR 的偽基質。在 K3L 中有功能缺失突變。若與 eIF-2 之殘基 79 至 83 同源的 K3L 蛋白質之 C 端部分發生平截或點突變，則廢止了 PKR 抑制活性(Kawagishi-Kobayashi, M. 等人，1997)。

於本發明之另一具體實例，水泡性口炎病毒(VSV)可用於診斷干擾素抗性腫瘤。干擾素係鍵結於細胞表面受體上的循環因子，其最終導致抗病毒反應，並誘發標的細胞的生長抑制及/或凋零信號。雖然干擾素理論上可以用於抑制腫瘤細胞增殖，但此種企圖並非非常成功，此因干擾素成員之腫瘤專一性突變所致。

然而，在藉由破壞干擾素途徑防止受干擾素影響之生長抑制作用的同時，腫瘤細胞可能損及其抗病毒反應。的確，已證實 VSV(一種具被膜之負股 RNA 病毒)在干擾素存在下，迅速地在多種人類腫瘤細胞株中複製，並殺死彼等細胞，而正常的人類初級細胞培養物明顯地受干擾素保護。VSV 因而可用於診斷干擾素抗性但對 VSV 敏感的腫瘤。如同呼腸孤病毒之具體實例般，依據 VSV 的診斷法是一種表現型評估法，且其不依賴干擾素抗性機制。

於本發明之另一具體實例，可使用 ONYX-015 病毒診斷 p53 缺陷型腫瘤。p53 是一種重要的腫瘤抑制劑，其存在於各種細胞並控制細胞生長。由於病毒依賴細胞增殖機制進行複製，其易受 p53 調控而不會過度複製。然而，某些腺病毒(SV40 及人類乳突病毒)包含使 p53 不活化的蛋白質，由而使其本身複製(Nemunaitis, 1999)。

至於血清型 5 號蛋白質是一種由 E1B 區域編碼之 55 Kd 蛋白質。若 E1B 區域編碼之此 55 Kd 蛋白質被刪失，如同在 ONYX-015 病毒中者一般(Bischoff 等人, 1996; WO 94/18992), 則該 55 kd 之 p53 不再存在。結果，當 ONYX-015 進入正常細胞中，p53 發揮抑制細胞增殖及病毒複製的功能。因此，ONYX-015 不會在正常細胞中複製。另一方面，在 p53 功能受損的腫瘤細胞中，ONYX-015 可以複製，最後並造成細胞死亡。因此，此病毒可以用於檢測樣品中之 p53 缺陷型腫瘤細胞。熟諳技藝之人士亦可使用已確立之技術突變並破壞腺病毒 5 號或其他病毒中之 p53 抑制劑基因，

且所得病毒可用於本方法診斷 p53 缺陷型腫瘤。

相仿地， $\delta 24$ 病毒可用於診斷 Rb 缺陷型腫瘤。 $\delta 24$ 病毒是一種在 E1A 區域帶有 24 個鹼基對刪失的突變體腺病毒 (Fueyo 等人，2000)。此區域負責結合細胞腫瘤抑制子 Rb，並抑制 Rb 功能，由而通過細胞增殖機制，因此病毒複製，而發生不可控制的情況。 $\delta 24$ 在 Rb 結合區域具刪失片段，而無法結合於 Rb。因此，該突變體病毒的複製在正常細胞受到抑制。然而，若 Rb 不活化，且細胞變為腫瘤，則 $\delta 24$ 不再受抑制。取而代之的是，突變體病毒有效率地複製，並溶解 Rb 缺陷型細胞。據此， $\delta 24$ 病毒可以用於測定樣品中是否含有 Rb 缺陷型腫瘤細胞。

就 ras 活化型腫瘤細胞而論，p53 缺陷型細胞或 Rb 缺陷型細胞之產生有多種成因。例如：p53 或 Rb 結構基因突變可能導致基因產物機能不全或不良的轉譯作用，p53 或 Rb 基因的調節性序列突變可能造成轉錄量減少，p53 或 Rb 基因的轉錄因子突變可能得到缺陷的 p53 或 Rb 產物，或是對於 p53 或 Rb 之功能而言為必要的共因子突變可能也是 p53 或 Rb 缺陷的理由。由於本發明檢測表現型，而非僅檢測 p53 或 Rb 基因/蛋白質的結構異常，因此比以結構為基礎之方法，例如 PCR 更有力。

一旦決定了腫瘤的表現型，則可依其表現型治療該腫瘤。例如：ras 活化型腫瘤可用呼腸孤病毒或是 ras 途徑抑制劑進行治療。據此，本發明亦提供一種治療或改善動物中之 ras 活化型腫瘤的方法，包括藉由下列步驟鑑定動物體

中之 ras 活化型腫瘤：由動物體取出細胞群，在呼腸孤病毒可於 ras 活化型細胞中複製的條件下，使彼等細胞與呼腸孤病毒接觸，若呼腸孤病毒可於細胞中複製，則證明該等細胞包括 ras 活化型腫瘤細胞；及對該哺乳動物投予有效量之呼腸孤病毒。呼腸孤病毒治療法已揭示於例如美國專利第 6,136,307 號。

因此，本發明亦提供一種治療或改善腫瘤的方法，包括收集樣品，以 VSV、 $\delta 24$ 或 ONYX-015 病毒鑑定樣品的表現型，以及依該表現型投予有效量的合宜治療劑。該治療劑可為病毒本身，或是在 p53 或 Rb 缺陷的情形下，為 p53 或 Rb 功能的活化劑。應注意， $\delta 24$ 及 ONYX-015 僅為說明本發明之應用的實例，熟諳技藝之人士應可依本發明之揭示鑑定或發展出其他可用於診斷及治療腫瘤的病毒。

關於呼腸孤病毒，其他溶瘤病毒之免疫保護型或基因重排型病毒的用途亦包含於本發明。因此，除了在本申請案中詳細討論的病毒以外，熟諳技藝之人士可依本文之揭示及技藝中可得之知識使用其他溶瘤病毒實施本發明。溶瘤病毒可為下列病毒家族的成員：肌病毒科(myoviridae)、siphoviridae、短尾病毒科(podoviridae)、teciviridae、被脂病毒科(corticoviridae)、菌原體病毒科(plasmaviridae)、lipothrixviridae、fuselloviridae、痘病毒科(poxviridae)、虹彩病毒科(iridoviridae)、藻類 DNA 病毒科(phycodnaviridae)、桿狀病毒科(baculoviridae)、疱疹病毒科、腺病毒科、乳多空病毒科(papovaviridae)、多 DNA 病

毒科 (polydnaviridae)、絲桿病毒科 (inoviridae)、微病毒科 (microviridae)、雙聯病毒科 (geminiviridae)、環狀病毒科 (circoviridae)、小 DNA 病毒科 (parvoviridae)、肝 DNA 病毒科 (hepadnaviridae)、反轉錄病毒科 (retroviridae)、cyctoviridae、呼腸孤病毒科、雙 RNA 病毒科 (birnaviridae)、副黏病毒科 (paramyxoviridae)、彈性病毒科 (rhabdoviridae)、線狀病毒科 (filoviridae)、正黏病毒科 (orthomyxoviridae)、布尼亞病毒科 (bunyaviridae)、砂粒病毒科 (arenaviridae)、輕小病毒科 (leviviridae)、微小核糖核酸病毒科 (picornaviridae)、sequiviridae、豇豆花葉病毒科 (comoviridae)、馬鈴薯 Y 病毒科 (potyviridae)、杯狀病毒科 (caliciviridae)、星狀病毒科 (astroviridae)、野田病毒科 (nodaviridae)、T 四病毒科 (tetraviridae)、蕃茄叢矮病毒科 (tombusviridae)、冠狀病毒科 (coronaviridae)、glaviviridae、披膜病毒科 (togaviridae)、或 barnaviridae。

本發明可實施於任何動物，特別是哺乳動物。較佳哺乳動物包含狗、貓、綿羊、山羊、牛、馬、豬、人類及非人類之靈長類。最佳，哺乳動物為人類。

套組

本發明提供有效用於診斷及/或治療腫瘤的套組。本發明之一方向提供一種套組，該套組包括呼腸孤病毒及用於檢測呼腸孤病毒複製的裝置。該檢測裝置可為一對專一辨識呼腸孤病毒核酸的引子，且可視需要包含 PCR 試劑。該檢測裝置亦可為專一辨識呼腸孤病毒蛋白質的抗體，以及

可視需要含有附加試劑如第二抗體。該檢測裝置又可為適於在顯微鏡下觀察被感染細胞之形態的玻璃片及染料，或是可用於測定呼腸孤病毒力價之病毒培養基及細胞。相仿地，本發明亦提供他種套組，該等套組包括其他能在特定腫瘤細胞中複製的其他病毒，以及用於檢測該病毒複製的裝置。此等病毒的實例包含，但不限於 VSV、ONYX-015 病毒及 $\delta 24$ 病毒。

本發明的另一方向係提供一種套組，該套組包括至少兩種可用於如本發明表現型分類腫瘤的病毒。較佳，該等病毒係由呼腸孤病毒、VSV、ONYX-015 病毒及 $\delta 24$ 病毒所成組群選出者。

下述實施例將用以闡述本發明，但不能以任何方式解釋為用以限制本發明範疇者。

【實施方式】

於下文之實施例中，下述縮寫具有下述意義。未被定義之縮寫具有其平時廣被接受之意義。

°C = 攝氏度

hr = 小時

min = 分鐘

μ M = 微莫耳濃度

mM = 毫莫耳濃度

M = 莫耳濃度

ml = 毫升

μ l = 微升

mg=毫克

μ g=微克

PAGE=聚丙烯醯胺凝膠電泳

rpm=每分鐘迴轉次數

FBS=胎牛血清

DTT=二硫蘇糖醇

SDS=十二烷基硫酸鈉

PBS=磷酸鹽緩衝鹽液

DMEM=杜貝克(Dulbeco's)改良型伊果(Eagle's)培養基

α -MEM= α -改良型伊果培養基

β -ME= β -巰基乙醇

MOI=感染多樣性

PFU=菌斑形成單位數

EGF=上皮生長因子

PDGF=血小板衍生之生長因子

CPE=細胞病理作用

VSV=水泡性口炎病毒

PCR=聚合醣鏈反應

SH2=src同源區2

實施例 1

以呼腸孤病毒表現型分類腫瘤

在一65歲年長婦女的常規乳房X光像上發現一硬塊。
於切片檢查時，自該硬塊收集樣品，結果顯示為惡性腫瘤。

為了確定該腫瘤是否含有 ras 活化型細胞，將該樣品置於細胞培養物中，並與呼腸孤病毒一起培養。

使迪爾玲品系呼腸孤病毒血清型 3 號在依據 Smith 的方法 (Smith, 1969) 純化之 L-929 細胞的懸浮培養物中繁殖，但該萃取緩衝液中不含 β -巰基乙醇 (β -ME)。純化之呼腸孤病毒的粒子/PFU 比為 100/1。切片檢查樣品在 DMEM 中磨碎，在 37°C 下，與呼腸孤病毒一起培養 2 小時，換至含有 20%FBS 的新鮮 DMEM 中，培養 48 小時。隨後，收集培養物之上清液，並測定呼腸孤病毒力價。結果顯示呼腸孤病毒在樣品中複製。因此，該乳房腫瘤含有 ras 活化型腫瘤細胞。

七、申請專利範圍：

1. 一種用於藉由表現型診斷腫瘤的套組，其包括至少兩種溶瘤病毒，其中每種溶瘤病毒選擇性地於具有選自由 ras 途徑活化、干擾素抗性、p53 缺陷型、與 Rb 缺陷型所組成之群組的表現型之腫瘤細胞中複製；且其中每種溶瘤病毒分別在具有不同表現型的腫瘤細胞中選擇性地複製。

2. 如申請專利範圍第 1 項之套組，其中該溶瘤病毒為由下列所成組群選出者：呼腸孤病毒、水泡性口炎病毒（VSV）、ONYX-015 病毒、 δ 24 病毒、VA1 區域突變之腺病毒、K3L 及/或 E3L 區域突變的牛痘病毒、OV20.0L 基因突變之羊痘瘡副痘病毒、NS-1 基因突變之流感病毒、 γ 134.5 基因突變之疱疹病毒。

3. 如申請專利範圍第 1 項之套組，其中該溶瘤病毒為由下列所成組群選出者：呼腸孤病毒、VSV、ONYX-015、及 δ 24。

4. 如申請專利範圍第 2 項之套組，其中該呼腸孤病毒為哺乳類呼腸孤病毒。

5. 如申請專利範圍第 4 項之套組，其中該哺乳類呼腸孤病毒是血清型 3 號呼腸孤病毒。

6. 如申請專利範圍第 5 項之套組，其中該血清型 3 號呼腸孤病毒是迪爾玲(Dearing)品系呼腸孤病毒。

7. 如申請專利範圍第 2 項之套組，其中該呼腸孤病毒為鳥類呼腸孤病毒。

8. 如申請專利範圍第 1 項之套組，其進一步包括用於

檢測病毒複製的裝置。

9. 如申請專利範圍第 8 項之套組，其中該檢測裝置為一對對於該病毒核酸專一的引子。

10. 如申請專利範圍第 9 項之套組，其進一步包括 PCR 試劑。

11. 如申請專利範圍第 8 項之套組，其中該檢測裝置為對於病毒蛋白質專一的抗體。

12. 如申請專利範圍第 11 項之套組，其進一步包括第二抗體。

13. 如申請專利範圍第 8 項之套組，其進一步包括適於在顯微鏡下觀察被感染細胞之形態的玻璃片。

14. 如申請專利範圍第 8 項之套組，其進一步包括適於在顯微鏡下觀察被感染細胞之形態的染料。

15. 如申請專利範圍第 8 項之套組，其進一步包括用於測定病毒力價之病毒培養基及細胞。

八、圖式：

(無)