I664976

(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 I664976 B**

(45)公告日： 中華民國 108 (2019) 年 07 月 11 日

(21)申請案號：102147759 (22)申請日： 中華民國 102 (2013) 年 12 月 23 日

(51)Int. Cl.： *A61K39/02 (2006.01)* *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2013/01/02 美國 61/748,369

(71)申請人：美商迪科生物系統公司 (美國) DECOY BIOSYSTEMS, INC. (US)
美國

(72)發明人：紐曼 麥可 NEWMAN, MICHAEL J. (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

US 4842855 WO 98/53851A1

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：8 共 60 頁

(54)名稱

使用細菌治療癌症之組成物和方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATMENT OF CANCER USING BACTERIA

(57)摘要

本發明提供之組成物實質上包含非活的革蘭氏陰性細菌有機體，及使用該相同組成物治療癌症的方法，該有機體具有實質降低之內毒素活性及/或致熱性。亦提供本文所提供用於治療癌症的方法，包含將一份量足以抑制癌症的生長或轉移的實質上非活的革蘭氏陰性細菌施予經診斷患有癌症的哺乳動物，該細菌具有實質降低之內毒素活性/及或致熱性。提供另外的方法包含施予活的或非活的革蘭氏陰性細菌有機體，該有機體具有導致該細菌外膜內的脂多醣實質喪失的基因缺陷。另提供包含以多黏菌素及戊二醛處理，用以降低革蘭氏陰性細菌之內毒素活性及/或致熱性的方法。

Provided herein are compositions comprising substantially non-viable Gram-negative bacterial organisms that have a substantial reduction in endotoxin activity and/or pyrogenicity and methods for treating a cancer using the same. Also provided are methods for treating cancer provided herein, comprising administering to a mammal diagnosed with cancer, substantially non-viable Gram-negative bacteria having a substantial reduction in endotoxin activity and/or pyrogenicity, in an amount sufficient to inhibit growth or metastasis of the cancer. An additional method is provided comprising administering viable or non-viable Gram-negative bacterial organisms that have a genetic defect that results in a substantial loss of lipopolysaccharide within the outer membrane of the bacteria. Further provided are methods for reducing endotoxin activity and/or pyrogenicity in Gram-negative bacteria comprising treatment with polymyxin and glutaraldehyde.

指定代表圖：

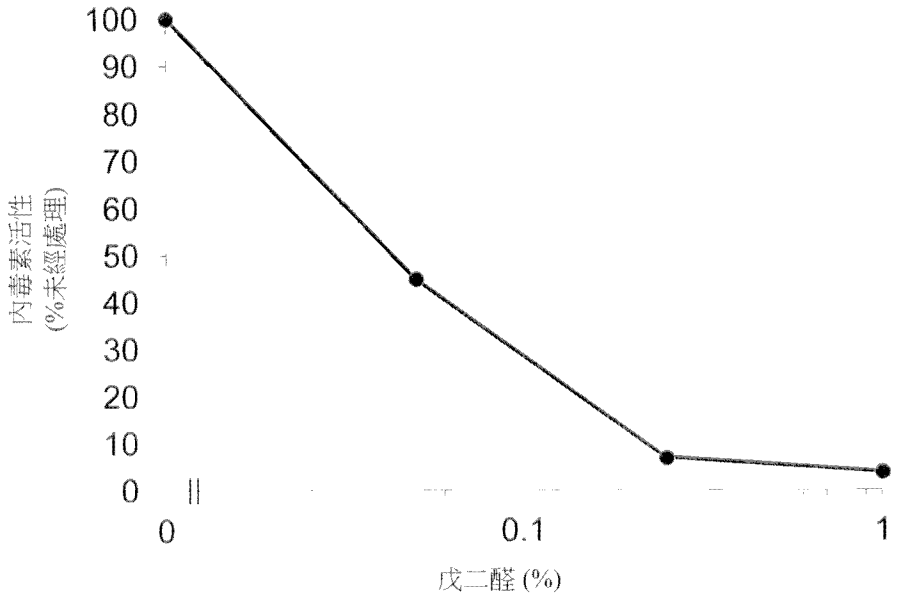


圖 3

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】(中文/英文)

使用細菌治療癌症之組成物和方法

Compositions and methods for treatment of cancer using bacteria

前後參照相關申請案

本申請案基於 35U.S.C.§119（e）主張 2013 年 1 月 2 日提出申請的美國臨時申請案第 61/748,369 號之權益，其藉由引用方式併入本文。

【技術領域】

本發明揭示關於包含革蘭氏陰性細菌之組成物及藉由施予彼以治療癌症之方法。

【先前技術】

受細菌感染的患者之癌症消退的相關性早在 1868 年被發現並提出報告。將減毒之活沙門桿菌有機體系統性施予患有實體腫瘤的動物已被報告能導致腫瘤治療。參見如美國專利第 6,685,935 號及 Pawelek 等人文獻（Lancet Oncol. 4（9）：548-56, 2003）。此外，膀胱內（非全身性）施予減毒之革蘭氏陽性分枝桿菌（BCG）已在美國證實能用於膀胱原位癌（CIS）之治療及預防。

針對某些營養缺陷型的突變株，使用活的革蘭氏陰性

沙門桿菌以改善腫瘤治療也已經提出報告。參見如 Hoffman et al., Amino Acids 37：509-521, 2009、美國專利申請案第 20090300779 號（Zhao 等人）及 Zhao 等人（Proc. Natl. Acad. Sci.（USA）102（3）：775-760, 2005）。

製備 *msbB* 基因座缺失的沙門桿菌，其表現在外膜中脂質 A 的末端缺乏豆蔻酸化之 LPS。經該 *msbB* 沙門桿菌菌株處理之小鼠與豬的 TNF-α 誘導量分別為經野生型細菌處理之誘導量的 33%和 14%。參見如 Low et al., Nature 17：37-41, 1999 及美國專利第 7,354,592 號（Bermudes 等人）。據報導，施予此等活的有機體（包括菌株 VNP20009）以抑制皮下植入之 B16F10 鼠黑色素瘤的生長，以及人腫瘤異種移植 Lox、DLD-1、A549、WiDr、HTB117 及 MDA-MB-231 在小鼠中的生長（Luo et al., Oncol. Res. 12（11-12）：501-508, 2001）。沙門桿菌菌株 VNP20009 亦經提出報告能改善以最大容忍劑量及低劑量節律性療法之化療藥劑環磷醯胺的抗腫瘤功效（Jia et al., Int. J. Cancer 121（3）：666-674, 2007）。

無法製造脂質 A 且於外膜中缺乏 LPS 的革蘭氏陰性細菌的條件式突變株已被製備，但經報導對有機體有毒性。例如，合成 3-去氧-D-甘露辛酮糖酸（Kdo）的突變抑制或 Kdo 分子併入脂質 IV_A 的突變抑制能防止脂質 A 與 LPS 之合成及 LPS 前驅體在革蘭氏陰性細菌的外膜的定位。脂質 IV_A 為缺乏糖基化的 LPS 前驅物。該等突變株

的活化導致細菌活性喪失（Rick et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69（12）：3756-3760, 1972、Belunis et al. J. Biol. Chem. 270（46）：27646-27652, 1995 及 Taylor et al. J. Biol. Chem. 275（41）：32141-32146, 2000）。

也可能經由使用外源性添加化合物來抑制 Kdo 併入脂質 IV_A、脂質 A 之合成及外膜定位。Goldman 等人（J Bacteriol. 170（5）：2185-91, 1988）描述特異性抑制 CTP：CMP-3 去氧-D-甘露辛酮糖酸胞苷醯轉移酶活性的抗菌藥劑，藉此阻礙 2-酮 3 去氧-D-甘露辛酮糖酸（Kdo）併入革蘭氏陰性有機體之脂質 IV_A 中。當 LPS 合成停止時，發現與脂質 IV_A 結構相似的分子累積，且細菌生長停止。該作者的結論是添加 Kdo 至 LPS 前驅物脂質類 IV_A 為在鼠傷寒沙門桿菌 LT2 及大腸桿菌（*E. coli*）兩者中形成脂質 A-Kdo_2 的主要路徑。

最近，外膜中缺乏 LPS（包括脂質 A 或 6-醯基脂多醣）的革蘭氏陰性細菌的突變體已被製備且維持其存活力。例如，美國專利申請案第 2010/0272758 號指出大腸桿菌 K-12 菌株 KPM22 在合成 3-去氧-d-甘露辛酮糖酸（Kdo）是有缺陷的。KPM22 具有主要以脂質 IV_A 組成的外膜（OM）。該些有機體的存活力是藉由有助於將脂質 IV_A 從內膜傳輸至外膜的第二位點抑制因子的存在而達成。據報導，此抑制因子係減輕脂質 IV_A 累積於內膜的毒性副作用並提供足夠 LPS 前驅物的量以維持 OM 生源。如同由其自身在高達 1 μg/mL 的 LPS 前驅物劑量下無法誘導

由人類單核細胞分泌 TNF-α 所判定，由此缺乏內毒素活性的菌株製造 LPS 前驅物。亦參見 Mamat 等人（Mol Microbiol. 67（3）：633-48, 2008）。

與感染及敗血性休克有關的劑量限制副作用顯著地限制將活菌全身性施予至癌症病患。此限制與野性型細菌（參見如 Wiemann and Starnes, Pharmac. Ther. 64：529-564, 1994 以供檢閱）有關，且亦與於腫瘤組織中選擇性增生且表現經修飾之脂質 A 的基因性減毒細菌有關（參見如 Toso et al., J. Clin. Oncol. 20（1）：142-152, 2002）。這些限制導致使用熱滅活細菌用於癌症治療。參見如 Havas 等人（Med. Oncol. & Tumour Pharmacother. 10（4）：145-158, 1993）、Ryoma 等人（Anti-cancer Res. 24：3295-3302, 2004）、Maletzki 等人（Clin. Develop. Immunol. 2012：1-16, 2012）、美國專利第 8,034,359 B2 號（Gunn）、歐洲專利第 EP 1,765,391 B1 號（Gunn）及 Wiemann and Starnes（Pharmac. Ther. 64：529-564, 1994）以供檢閱。然而，非感染的滅活細菌仍誘導顯著劑量限制性毒性，其與 LPS 衍生的內毒素及其他細胞成份有關，其他細胞成份為致熱的並可產生敗血性休克症狀。於是，以細菌治療癌症的進一步改善是有必要的。

【發明內容】

本文所提供用於藉由將一份量的革蘭氏陰性細菌施予至哺乳動物來治療經診斷為患有癌症的哺乳動物（如人

類）癌症的組成及方法，其中該細菌為（i）非活的或實質上在哺乳動物中係非活的，（ii）具有實質降低之內毒素活性及/或致熱性，及（iii）係由一有效量施予以抑制癌症的生長或轉移能力。在某些實施例中，革蘭氏陰性細菌在施予至哺乳動物前係藉由以（i）輻射、（ii）化學滅菌劑、（iii）使內毒素失活的抗生素（例如多黏菌素 B 或多黏菌素 E）或（iv）干擾 KDO2-脂質 IV_A 的有機體合成之抗生素來處理後呈現非活的或實質上非活的。可替代地，或除了前述處理的任何一或多者，革蘭氏陰性細菌進一步包括干擾或部分干擾 KDO2-脂質 IV_A 或防止 KDO2-脂質 IV_A 的 O-醯化之有機體合成的基因缺陷。干擾或部分干擾 KDO2-脂質 IV_A 的 O-醯化基因缺陷包括，例如功能性干擾 *msbB* 及 *lpxM* 基因座的缺陷。

在本揭示的一態樣中，組成物包含實質上非活的革蘭氏陰性細菌及藥學上可接受的賦形劑，該細菌具有實質降低之內毒素活性及/或熱發性。在一實施例中，非活的革蘭氏陰性細菌係由戊二醛處理而製成。在另一施實例中，內毒素活性及/或致熱性是由多黏菌素 B 或多黏菌素 E 處理而降低。在進一步實施例中，內毒素活性及/或致熱性係以戊二醛處理而降低。

在另一態樣中，提供治療經診斷患有癌症的哺乳動物，其包括施予一份量實質上非活的革蘭氏陰性細菌，該細菌具有實質降低之內毒素活性及/或致熱性，其中該施予量足以抑制癌症的生長或轉移。

在另一態樣中，本揭示提供用於治療經診斷患有癌症的哺乳動物中的癌症之方法，藉由將一份量的革蘭氏陰性細菌施予至哺乳動物，其中該細菌係活的、可能有或可能沒有減毒且具有導致細菌的外膜內之脂多醣實質或完全喪失的基因缺陷且其中施予量足以抑制癌症的生長或轉移能力。

在一實施例中，本揭示提供用於治療癌症的方法，包含將一活的或非活的革蘭氏陰性細菌有機體的量施予至經診斷為患有癌症的哺乳動物，該細菌具有導致該細菌外膜內的脂多醣實質喪失的基因缺陷，其中施予量足以抑制癌症生長。

在一些實施例中，該基因缺陷干擾或部分干擾 KDO2-脂質 IV_A 的有機體合成，或防止 KDO2-脂質 IV_A 的 O-醯化。

在某些實施例中，癌症為實體腫瘤。

在其他實施例中，對哺乳動物進一步施予化療藥劑，例如環磷醯胺。在其他實施例中，對哺乳動物進一步施予免疫功能抑制受體或包括例如抑制 T 細胞受體功能的受體促效劑或 T 細胞受體配體（例如 CTLA-4、PD-1、PD-L1 及 PD-L2）之拮抗劑。

在其他實施例中，對哺乳動物進一步施予免疫功能刺激受體的促效劑，包括例如刺激性 T 細胞受體的促效劑。適合的受體目標包括例如 GITR、4-1BB、CD40 及 OX40。

在其他實施例中，對哺乳動物進一步施予免疫功能刺激細胞激素，包括例如干擾素-α、干擾素-β、干擾素-γ、顆粒細胞巨噬細胞集落刺激因子、介白素-2 及介白素-12。

在其他實施例中，革蘭氏陰性細菌為沙門桿菌屬或大腸桿菌屬。

在另一實施例中，本揭示提供藉由以多黏菌素 B 及戊二醛處理該細菌而殺死或降低革蘭氏陰性細菌的內毒素活性及/或致熱性。在一實施例中，存活力降係至 0%且內毒素活性或致熱性係降低約 90%或 96%。

【圖式簡單說明】

圖 1 及 2 顯示以多黏菌素 B（PMB）培養大腸桿菌以降低細菌的細胞相關內毒素活性等級與細胞存活力。此係進一步描述於實施例 2 中。

圖 3 及 4 顯示以戊二醛（GA）培養大腸桿菌以降低與細菌細胞相關的內毒素活性等級與細胞存活力，如同實施例 3 中進一步描述。

圖 5 描述大腸桿菌未經處理（圖 5A）、以 1,000 μg/mL PMB 處理（圖 5B）、1% GA（圖 5C）或 PMB 及 GA 兩者（圖 5D）之穿透式電子顯微鏡影像，顯示細菌在所有處理後仍維持完整，如同實施例 4 中進一步描述。

圖 6 描述顯示經 PMB+GA 處理之大腸桿菌在小鼠中的的皮下小鼠 B16F10 黑色素瘤的生長之劑量依賴性效應

的圖表，如同實施例 7 中進一步描述。

圖 7 示出顯示未經處理及經 1% GA 處理之大腸桿菌在小鼠中的皮下小鼠 B16F10 黑色素瘤的生長之劑量依賴性效應的圖表，如同實施例 8 中進一步描述。

圖 8A 及 8B 說明顯示不利用及利用節律性環磷醯胺（圖 8A）或抗小鼠 CTLA-4 抗體（圖 8B）之經 PMB + GA 處理大腸桿菌在小鼠中的皮下 CT26 小鼠大腸癌的生長之劑量依賴性效應之圖表，如同實施例 8 中進一步描述。

【實施方式】

本文提供包含非活的革蘭氏陰性細菌有機體的組成物，且其具有實質降低之內毒素及/或致熱活性及用以治療癌症的方法，包含施予一份量非活的革蘭氏陰性細菌有機體至患有癌症的哺乳動物，該有機體具有實質降低之內毒素或致熱活性的，其中該施予量足以抑制癌症的生長或轉移。

負責由細菌所介導的抗腫瘤活性可能機制包括腫瘤組織中活菌有機體的選擇性增生與宿主免疫反應的刺激，特別是經由以 LPS（內毒素）介導之自宿主單核細胞釋放的殺瘤細胞激素之誘導。然而，活菌的增生及經 LPS（內毒素）介導之細胞激素之誘導（即使以由 *msbB* 突變而減毒的 LPS），據信是負責與由活菌治療哺乳動物相關的劑量限制性毒性。Toso 等人（J. Clin. Oncol. 20（1）：142-

152, 2002）以經 *msbB* 減毒的活沙門桿菌治療癌症病患及包括與細胞激素釋放有關的菌血症及副作用之劑量限制性毒性。相較於人類腫瘤異種移植，在小鼠中腫瘤組織的細菌增生降低且對細胞激素介導之毒性敏感性較高。據信由缺乏一個二級醯基鏈之 LPS 的部分介導之以活的細菌及/或細胞激素相關毒性之全身性增生，可避免施予活的、減毒的革蘭氏陰性細菌之安全有效量至一些哺乳動物（諸如人類）而非小鼠，其已知是對於細菌的感染及與細胞誘導之敗血性結果相對較有抗性。

僅管不希望受到理論所束縛，相較於使用活的或有活性有機體，據信具有實質降低的內毒素活性及/或致熱性之殺死或非活的革蘭氏陰性有機體，能以較少毒性且更有效的量施予至癌症病患以治療癌症，該活的或有活性有機體以無法由醫生控制各種方式增生於每個病患的正常及腫瘤組織中，或增生不足以產生治療效果，或增生太多，藉此產生不可接受的毒性。相較於使用表現野生型內毒素活性及/或致熱性的殺死的細菌，據信具有實質降低之內毒素活性及/或致熱性之殺死或非活的革蘭氏陰性有機體，能以較少毒性且較有效的量施予至癌症病患以治療癌症。

不論施予活的並減毒的或是殺死的有機體，其據信具有 LPS 形成的基因缺陷之活的革蘭氏陰性有機體會導致在細菌的外膜中糖基化脂質 A 及 LPS 的量實質降低，以防止在哺乳動物宿主內進一步增生。僅管此有機體缺乏造成內毒素休克的功能性 LPS 分子及對宿主的免疫系統提供刺

激，據信在革蘭氏陰性細菌具有其他特性，其將刺激宿主的先天或結合先天及後天的免疫反應以達成殺死腫瘤細胞或抑制腫瘤生長。

在一實施例中，如本文中所揭示，在癌症治療中使用革蘭氏陰性有機體，不含有編碼或表現非細菌蛋白之DNA（例如腫瘤特異性抗原）。由於革蘭氏陰性有機體不直接誘導抵抗腫瘤抗原之特異性免疫反應，因此不是癌症疫苗。此外，該些有機體用作為佐劑或生物性反應調節劑（BRM），其通常可刺激宿主先天免疫反應且可能間接刺激後天抗腫瘤免疫反應。在一些實施例中，革蘭氏陰性有機體直接注射至腫瘤內或腫瘤位置附近，或全身性注射並累積於腫瘤附近。增加對該有機體的先天性免疫反應則可能接著變成針對腫瘤。除此之外，或可替代的，抵抗該有機體的免疫反應可刺激或活化既存腫瘤（pre-existing tumor）抗原特異性細胞，其能夠參與後天抗腫瘤反應。

在另一個實施例中，革蘭氏陰性有機體生表現編碼表現非細菌蛋白的 DNA，包括例如腫瘤特異性抗原或免疫系統刺激蛋白。在此，該有機體可注射於腫瘤內或腫瘤附近，或全身性注射，並誘導抵抗該有機體的先天或後天免疫反應、腫瘤特異性抗原或兩者。

如本文中所使用，術語腫瘤特異性抗原意指經由腫瘤表現但不由任何源自該腫瘤的有機體的正常細胞表現之抗原。術語腫瘤相關抗原意指由腫瘤表現但可能也由源自該腫瘤的有機體的正常細胞以受限的方式表現的抗原。由正

常細胞的受限型表現或由僅在胎兒發育期間（即胎兒抗原）的正常細胞表現，該表現的受限方式可反映在正常細胞中的表現等級比腫瘤低。如本文所使用，抗原為可經由免疫反應或抗體，或由免疫細胞（如 T 細胞）所辨識的任何分子。

如本文中所使用之術語「佐劑」及「生物性反應調節劑」意指增強對抗原、腫瘤或腫瘤相關細胞的免疫反應之任何物質。因此，佐劑或生物性反應調節劑可用於刺激免疫系統以對外源抗原、或表現新抗原之致病的或疾病相關的細胞，或一現有抗原的結構性變化或異常濃度有更強烈的反應。然而，在一些實施例中，考慮將革蘭氏陰性細菌的重組形式表現例如腫瘤特異性或腫瘤相關抗原，或人類免疫激活蛋白，諸如細胞激素或趨化激素用於所揭示之方法中。在另一實施例中，經純化之免疫激活蛋白，諸如細胞激素或趨化激素，係在施予之前與革蘭氏陰性有機體混合，或在革蘭氏陰性有機體之前或之後施予。

如同本文中所使用，術語哺乳動物包括任何哺乳動物，諸如人類、狗、貓、乳牛、綿羊等等。較佳的哺乳動物為人類。

術語「革蘭氏陰性細菌」意指不保留初始鹼性染劑染色（例如結晶紫），其為已知之革蘭氏染色程序之一部分。在一例示性革蘭氏染色中，細胞首先藉由加熱固定至玻片並以鹼性染劑（例如結晶紫）染色，其染劑被革蘭氏陰性及革蘭氏陽性細菌兩者攝入。玻片接著以媒染劑（例

如革蘭氏碘）處理，其可與鹼性染劑（例如結晶紫）結合並截留於細胞中。該細胞接著以丙酮或醇清洗，並接著以不同色的二級染劑（例如番紅花紅）複染。革蘭氏陽性有機體保留初始紫染色，而革蘭氏陰性有機體經有機溶劑脫色而呈現複染色。例示性革蘭氏陰性細菌包括，但不限於，大腸桿菌屬、志賀桿菌屬、沙門桿菌屬、曲狀桿菌屬、奈瑟菌屬、嗜血桿菌屬、氣單胞菌屬、法蘭西斯桿菌屬、耶氏桿菌屬、克萊桿菌屬、博德氏桿菌屬、退伍軍人桿菌屬、棒狀桿菌屬、檸檬酸桿菌屬、披衣菌屬、布氏桿菌屬、假單胞菌屬、幽門螺旋桿菌屬及弧菌屬。

在革蘭氏陰性有機體為腸內桿菌科，伴隨許多無害共生體之大家族，包含許多已知病原體，諸如沙門桿菌、大腸桿菌、鼠疫耶氏桿菌、克萊桿菌及志賀桿菌、變形桿菌、腸內桿菌、鋸桿菌及檸檬酸桿菌。如同存活於動物小腸中的數種成員，腸內桿菌的成員被稱為腸內菌。

腸內桿菌為桿狀、通常為 1 至 5μm 長。其為兼厭氧菌，將醣類發酵以產生乳酸及各種最終產物。大多數亦將硝酸鹽還原成亞硝酸鹽，且通常缺乏細胞色素 C 氧化酶。大多數具有許多用於活動的鞭毛，但有些係不動的。腸內桿菌不形成芽孢。

術語「載體」意指一核酸分子，其能夠與另一核酸分子連接成為單個核酸而運送之。能夠將基因的表現引導至其可操作地連接的載體，在本文中稱為「表現載體」。在本文中使用的術語「表現系統」意指能夠使序列在表現載

體中被轉錄為 RNA、折疊為結構 RNA 或轉譯成蛋白之組成的組合。表現系統可為體外表現系統，諸如根據已知方法之市售或可輕易達成者，或可為體內表現系統，諸如含有表現載體的真核或原核宿主細胞。通常，在重組 DNA 技術中使用的表現載體可為「質體」，在其載體型式中一般指不與細菌染色體結合的環狀雙股 DNA。在本領域中已詳知之其他表現載體也可使用於表現系統（例如黏質體、噬質體及噬菌體載體）中。

術語「核酸」意指多核苷酸或寡核苷酸，諸如去氧核醣核酸（DNA），及在適當情況下的核醣核酸（RNA）。亦應了解此術語包含作為由核苷酸類似物製成之 RNA 或 DNA 的類似物之等同物，且適用於單（正義或反義）或雙股多核苷酸之所述之實施例。

在本文中所使用之術語「調節」意指調升（即，活化或刺激（例如藉由促進或增效））及調降（即抑制或壓抑（例如藉由拮抗、降低或抑制））。術語「可誘導的」特別意指非固有的基因表現，但在對一刺激產生反應發生該基因表現（例如溫度、重金屬或其他媒介添加物）。

A. 候選細菌有機體

可以本文中的方法使用之候選細菌有機體為且源自該些具有如野生型有機體之內毒素活性的革蘭氏陰性有機體。例示性革蘭氏陰性細菌包括，但不限於，大腸桿菌屬、志賀桿菌屬、沙門桿菌屬、曲狀桿菌屬、奈瑟菌屬、

嗜血桿菌屬、氣單胞菌屬、法蘭西斯桿菌屬、耶氏桿菌屬、克萊桿菌屬、博德氏桿菌屬、退伍軍人桿菌屬、棒狀桿菌屬、檸檬酸桿菌屬、披衣菌屬、布氏桿菌屬、假單胞菌屬、幽門螺旋桿菌屬及弧菌屬。候選革蘭氏陰性有機體也可以是落入腸內桿菌科、假單胞菌科、奈瑟氏菌科、韋榮氏球菌科、擬桿菌科、弧菌科、巴斯德菌科及梭桿菌科家族之有機體。在一些實施例中，候選有機體為沙門桿菌屬或大腸桿菌屬之物種。

已由 Luo et al., Oncol Res. 12（11-12）：501-8, 2001 所描述之 VNP20009 為一候選沙門桿菌有機體。VNP20009 係以 *msbB* 及 *purI* 基因座缺失而基因改造的鼠傷寒沙門桿菌菌株。以活 VNP20009 於 1×10^4 至 3×10^6 cfu/mouse 之範圍的劑量靜脈給藥至帶有腫瘤的小鼠以抑制植入 B16F10 小鼠黑色素瘤及人類腫瘤異種移植 Lox、DLD-1、A549、WiDr、HTB177 和 MDA-MB-231 的皮下生長。靜脈施予 VNP20009 亦抑制該些動物中肺轉移瘤的生長。亦參見美國專利第 7,354,592 號（Bermudes 等人）。

另一候選沙門桿菌有機體為 Eisenstein et al. Med. Oncol. 12（2）：103-8, 1995 所述之 SL3235。SL3235 為一減毒沙門桿菌菌株，當施予活菌株可治癒小鼠中生長的漿細胞瘤。

又一候選沙門桿菌包括由 Hoffman et al., Amino Acids 37：509-521, 2009 所提出之營養缺陷型突變體。鼠

傷寒沙門桿菌 A1-R 突變為白胺酸-精胺酸之營養型突變且具有高抗種瘤毒性。在體外，A1-R 感染腫瘤細胞並造成核破壞。施予 A1-R 治療原位植入裸鼠中的轉移型人類前列腺與乳房瘤。以原發性骨肉瘤及肺轉移瘤靜脈施予（i.v.）A1-R 至裸鼠係有效的，尤其是抵抗轉移。當將 A1-R 施予至裸鼠脾臟內，亦經報導有效的抵抗胰腺癌肝轉移。亦參見美國專利申請案第 20090300779 號（Zhao 等人）及 Zhao 等人（Proc. Natl. Acad. Sci.（USA）102（3）：775-760, 2005）。

經美國專利第 6,685,935 號（Pawelek 等人）報導，多種革蘭氏陰性有機體適用於實體腫瘤的治療。如有機體在施予後於腫瘤中優先複製，該些有機體被稱為超級感染。超級感染包括沙門桿菌屬（例如鼠傷寒沙門桿菌）的腫瘤特異性突變體。亦如所述，超級感染為沙門桿菌屬的腫瘤特異性突變體，含有諸如來自疱疹單純型病毒的胸苷激酶、來自大腸桿菌的胞嘧啶脫氨酶或人類微粒體 p450 氧化還原酶之自殺基因。亦參見 Pawelek 等人（Lancet Oncol. 4（9）：548-56, 2003）。

在一實施例中，大腸桿菌係被選為有機體。考慮一特定菌株為大腸桿菌菌株 2617-143-312,（Migula）Castellani and Chalmers（ATCC® 13070™）。可使用額外的大腸桿菌菌株包括 MG1655（ATCC® 47076）及 KY8284（ATCC® 21272）。

於本文之方法中使用的革蘭氏陰性有機體不必需為包

含或表現與野生型有機體不同之重組有機體。然而，在一些實施例中，該有機體可被修飾為表現某些非原生性分子。例如，美國專利第 7,452,531 號提出製備及使用減毒腫瘤靶向細菌載體，以用於遞送一或多個初級效應分子至實體腫瘤的位置。根據此方法，當全身性施予至宿主時效應分子可能有毒性，可由減毒腫瘤靶向細菌原位遞送，以降低對宿主的毒性。特別是減毒腫瘤靶向細菌可為兼好氧菌或兼厭氧菌，其是經修飾以編碼一或多個初級效應分子。初級效應分子包括 TNF 細胞激素家族、抗血管生成因子以及細胞毒性多肽或肽之成員。本揭示之主要效應分子，例如，治療實體腫瘤癌，諸如惡性腫瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肉瘤或來自該些腫瘤的轉移瘤是有用的。

B. 降低細菌內毒素活性

可使用各種方法降低細菌有機體的內毒素及/或致熱性。如本文中所使用，術語「內毒素活性」意指部分革蘭氏陰性細菌可造成毒性，包含致熱性及敗血性休克。歸因於內毒素的毒性效應已發現與存在或源自於革蘭氏陰性細菌外膜的脂多醣分子的糖基化脂質 A 部分有關。

術語「脂多醣（LPS）」意指由脂質與多醣（糖磷脂）以共價鍵連接而組成的大分子。LPS 包含三個部分：1）O 抗原；2）核心寡糖及 3）脂質 A。O 抗原為附接至核心寡糖的連續聚醣聚合物，且包含 LPS 分子最外層的域。核心寡糖直接附接至脂質 A 且通常含有諸如庚醣及

3-去氧-D-甘露辛酮糖酸（亦被稱為 KDO，酮基-脫氧辛酮糖）的糖。脂質 A 為一連接至多個脂肪酸的磷酸葡萄糖二糖。脂肪酸將 LPS 錨定至細菌膜內，且其餘的 LPS 自細胞表面突出。若 LPS 突變或被移除可能導致細菌死亡。

內毒素活性存留於 LPS 的脂質 A 域部分。當細菌細胞被免疫系統溶解，含有脂質 A 的膜片段被釋放至體循環中，造成發燒（致熱性）、腹瀉及潛在的致命休克（稱為內毒素或敗血性休克）。LPS 的毒性是由脂質 A 經由與哺乳動物免疫系統的 B 細胞及巨噬細胞交互作用所表現，導致前發炎細胞激素分泌的過程，主要為腫瘤壞死因子（TNF），其對宿主可能有致命的結果。脂質 A 亦「在體外」活化人類 T 淋巴細胞（Th-1）以及「在體內」活化鼠 CD4+ 及 CD8+ T 細胞，其係使宿主免疫系統為反應於各種大小的 LPS 碳水化合物鏈而裝載一特定的、記憶性的 IgG 抗體之性能。基於此，LPS 在近年已可「在體內」被辨識為 T 細胞依賴性抗原。

內毒素活性可以本領域中所詳知之方法測量，包括例如，其利用鱟的血液之鱟檢測試劑（Limulus Amebocyte Lysate（LAL））試驗，其能夠偵測非常低之 LPS 濃度。由於經由酵素級聯放大，內毒素活性的存在將導致鱟血溶解物的凝固。LAL 試驗的凝膠、濁度以及顯色形式可由市售購得。參見如 Lonza, Allendale, NJ, and Clongen Labs, Germantown, MD。

亦已知以酵素結合免疫吸附分析法（ELISA）為基的

內毒素活性試驗，諸如來自德國慕尼黑 Hyglos 的 EndoLISA®。此試驗採用附接至固相的 LPS 特異性噬菌體蛋白以捕獲 LPS，並接續清洗步驟，所存在的 LPS 係藉由添加重組因子 C 來測定，其當被 LPS 活化時，裂解一化合物而發出螢光。存在於鱟檢測試劑中的因子 C 一般以酶原存在，且為在 LAL 測試中發生凝固級聯的引子。

內毒素活性也可藉由評估誘導 TNF-α 分泌來測量，不論是從體外的初級周邊血單核細胞，或藉由以可疑的內毒素的來源施予至動物，再於約 1 至 4 小時後從該動物得到的血漿中測量 TNF-α 濃度。初級哺乳動物周邊血單核細胞能夠購自諸如 Lonza（Allendale, NJ, USA）之公司。細胞懸浮液或血漿中的 TNF-α 濃度能以 ELISA 套組來測定，諸如可購自 Thermo Scientific（Rockford, IL, USA）、Abcam（Cambridge, MA, USA）或 eBioscience（San Diego, CA, USA）。

內毒素活性也能藉由測量在兔子試驗中對靜脈施予有機體或其衍生物產生之反應的致熱性（直腸溫度增加）而在體內被評估。

革蘭氏陰性有機體的內毒素活性及/或致熱性相較於野生型有機體的內毒素活性及/或致熱性可能實質上降低。內毒素活性的實質降低較佳係大於約 70%、大於約 75%、大於約 80%、大於約 85%、大於約 90%、大於 95% 及大於約 99%。

可使用多種方法降低革蘭氏陰性有機體的內毒素活

性。這些方法包括以連接至 LPS 或干擾其形成之試劑處理該等有機體，或藉由基因操控該細菌有機體以修飾 LPS 或抑制 LPS 形成。

在一實施例中，內毒素活性或致熱性的降低係由以滅活內毒素的抗生素處理細菌有機體來達成。適當的這些抗生素為多黏菌素 B 或多黏菌素 E。例如，Cooperstock et al., Infect Immun. 1981 Jul;33（1）：315-8 指出多黏菌素 B 處理可降低革蘭氏陰性細菌疫苗中 LPS 的發炎反應，該革蘭氏陰性細菌包含百日咳博德氏桿菌、大腸桿菌、流行性感冒桿菌及綠膿桿菌。以在本領域中熟悉此技藝的人決定抗生素的量及處理條件。在一實施例中，多黏菌素（不論多黏菌素 B 或 E）可以每毫升每 $1x10^7$ 至 $5x10^{10}$ 的細菌約 3 微克至 5,000 微克來使用。在另一實施例中，多黏菌素的濃度可能為每毫升 $1x10^7$ 至 $5x10^{10}$ 的細菌約 200 微克至 5,000 微克。在一實施例中，對該細菌施予 10 分鐘至 4 小時或從約 30 分鐘至約 3 小時。在一實施例中，該細菌係生長於有 $MgCl_2$ 形式的鎂（Mg）存在之下，並在有 $MgCl_2$ 的存在下以多黏菌素處理，以及適當的溫度以維持細菌的完整性。在一實施例中，在生長培養基的 $MgCl_2$ 濃度係約 0.5 mM 至約 5.0 mM 或約 2 mM，且處理培養基的 $MgCl_2$ 濃度係約 5.0 mM 至約 30 mM 或約 20 mM。在一實施例中，處理培養基的溫度係約 2°C 至約 10°C 或約 4°C。細菌完整性係於 3,000×g 的離心經 10 分鐘後藉由有效率的回收一邊界明顯的片狀沉澱物及以電子顯微鏡來測

定。在一較佳實施例中，在處理及清洗後細菌回收率係大於約 80%，且細菌在電子顯微鏡下呈現完整。

在另一實施例中，內毒素活性的降低係藉由以已知用以干擾生物合成 KDO2-脂質 IV_A 之抗生素處理細菌有機體來達成。例如， Goldman et al., J Bacteriol. 170（5）：2185-91, 1988 所述的抗菌藥劑，包括抗菌藥劑 III，其專一性抑制 CTP：CMP-3-去氧-D-甘露辛酮醣酸胞苷醯轉移酶活性且其對阻礙 3-去氧-D-辛酮醣酸（KDO）併入革蘭氏陰性有機體的 LPS 中係有用的。由於 LPS 合成停止，故細菌生長停止。添加 KDO 至 LPS 前驅物類脂質 IV_A 為鼠傷寒沙門桿菌及大腸桿菌兩者中脂質 A-KDO 形成的主要路徑。在一實施例中，抗生素為抗菌藥劑 III 且革蘭氏陰性細菌被施以適當量，諸如例如每毫升 5 微克至每毫升 500 微克經一適當時間，例如 2 至 8 小時。

內毒素活性的降低可藉由將基因缺陷導入該有機體中來達成。如本文中使用，術語「缺陷」關於基因或基因表現，表示該基因與正常（野生型）基因不同，或與野生型基因的基因表現相比，其基因表現之表現水平降低。缺陷基因可導因於基因突變或調控該基因的表現的突變。（例如，轉錄或後轉錄）

在一實施例中，內毒素活性的降低可藉由導入干擾 KDO2-脂質 IV_A 生物合成的基因缺陷來達成。例如，Woodard 等人之美國專利申請案第 20100272758 號指出活的無毒革蘭氏陰性細菌（例如大腸桿菌）在外膜中實質上

缺乏 LPS。此作者描述大腸桿菌 K-12 菌株 KPM22 在合成 3-去氧-d 甘露辛酮醣酸（Kdo）時係有缺陷的。KPM22 的外膜（OM）主要由脂質 IV_A 組成，其係缺乏糖基化之 LPS 前驅物。有機體的活性係藉由將脂質 IV_A 從內膜（IM）傳輸至外膜的第二位點抑制因子的存在而達成。此抑制因子經指出為釋放累積在內膜中的脂質 IV_A 的毒性副作用並提供足夠量的 LPS 前驅物以支持 OM 生源。亦參見 Mamat 等人（Mol Microbiol. 67（3）：633-48, 2008）。

在另一實施例中，Bramhill 等人之美國專利申請案第 2011-0224097 號描述活的革蘭氏陰性細菌包含實質上缺乏配體（諸如脂質 A 或作為 TLR4/MD2 促效劑的 6-醯基脂多醣）的外膜。根據 Bramhill，該細菌可能包含降低活性之阿拉伯糖-5-磷酸異構酶及一或多個抑制因子突變，例如藉此增加運輸蛋白能力以運輸脂質 IVA 的運輸蛋白或膜蛋白 YhjD。一或多個基因（例如 *IpxL*、*IpxM*、*pagP*、*IpxP* 及/或 *eptA*）可能實質上被刪除及/或一或多個酶（例如 LpxL、LpxM、PagP、LpxP 及/或 EptA）可能實質上失活。

在另一實施例中，內毒素活性的降低可藉由將防止 Kdo 生物合成之基因缺陷導入來達成。例如，Rick 等人（Proc Natl Acad Sci U S A. 69（12）：3756-60, 1972）指出鼠傷寒沙門桿菌的營養缺陷突變為 LPS 之 3-去氧-D-甘露辛酮醣酸（酮去氧辛酸）域之合成缺陷且需要 D-阿拉伯糖-5-磷酸以供生長。該突變缺陷是由於經改變的酮

去氧辛酸-8-磷酸合成酶（*kdsA*）對於 D-阿拉伯糖-5-磷酸之表觀 K（m）值比親本酶（parental enzyme）之表觀 K（m）值高出 35 倍。此造成突變菌株的生長及完整 LPS 之合成係依賴外源性 D-阿拉伯糖-5-磷酸。在另一實施例中，Belunis 等人（J. Biol. Chem. 270（46）：27646-27652, 1995）干擾大腸桿菌中的 Kdo 轉移酶（*kdtA*）基因，其防止 Kdo 併入脂質 IV_A。此突變為致命的，但能夠藉由編碼 *kdtA* 之溫度敏感型質體的條件式存在來挽救。此 Kdo 合成路徑之條件式突變的建立使得細菌能夠生長，接著轉變為不適合條件，導致足以生長或存活以製造具有顯著降低內毒素活性的非活的細菌。

除了 LPS 衍生之內毒素，革蘭氏陰性有機體的各種其他成分可誘導或導致致熱性及敗血性休克，包括外膜蛋白、纖毛、菌毛、脂肽及脂蛋白（檢閱 Jones, M., Int. J. Pharm. Compd., 5（4）：259-263, 2001）。致熱性能藉由涉及在以靜脈給予假定熱原後之直腸溫度評估之本領域詳知之兔子試驗來測得。

如在兔子試驗中所測得，已發現以多黏菌素 B 及戊二醛之組合處理革蘭氏陰性有機體產生致熱性降低 30 倍。在一實施例中，如兔子試驗中所測得，每毫升 1,000 微克（μg/mL）的多黏菌素 B 及 1%戊二醛係用以產生熱性降低 30 倍。致熱性是由多黏菌素 B 與 LPS 反應和戊二醛與 LPS 及/或其他細菌成分反應的組合而降低。由於戊二醛也殺死細菌，故在此設置中作為雙重角色。因此，在一實

施例中藉由以 1,000μg/mL 的多黏菌素 B 及 1%戊二醛之組合處理該細菌而殺死革蘭氏陰性細菌微生物而降低內毒素活性及致熱性之方法。在另一實施例中，以介於約 3 μg/mL 至約 1,000 μg/mL 之劑量範圍的多黏菌素 B 及介於約 0.1%至 1.0%之劑量範圍的戊二醛之組合處理革蘭氏陰性細菌。在進一步實施例中，多黏菌素 B 的劑量範圍是介於約 100 μg/mL 至約 1,000 μg/mL 且戊二醛的劑量範圍是介於約 0.5%至約 1.0%。此外，革蘭氏陰性細菌可能例如被處理以介於約 1,000 μg/mL 至約 3,000 μg/mL 劑量範圍的多黏菌素 B 及介於約 0.5%至約 1.0%劑量範圍的戊二醛。在另一態樣中，革蘭氏陰性細菌可能例如被處理以介於約 3,000 μg/mL 至約 5,000 μg/mL 劑量範圍的多黏菌素 B 及介於約 0.5%至約 2.0%劑量範圍的戊二醛。在一實施例中，內毒素活性係降低約 70%、或約 75%、或約 80%、或約 85%、或約 90%、或約 92%，而致熱性係降低約 75%、或約 80%、或約 85%、或約 90%、或約 95%、或約 97%。

C. 使細菌呈現非活的

根據本揭示之方法所施予之細菌係呈現非活的或實質上非活的，不論是在施予之前或是在施予時變成如此。所謂「非活的」所指的是該有機體藉由以外源性藥劑處理而殺死，及/或含有導致有機體無法存活在哺乳動物宿主中之突變。實質上非活的細菌為具有其活性降低至少 80%、

85%、90%、95%、99%或更多之菌株。在較佳實施例中，未殺死或未完全殺死之細菌係進一步處理或修飾使得其無法在哺乳動物宿主內增生。在實質上未產生 LPS 的一些實施例中，其視為非活的、減毒的或活的細菌予以施予。

較佳使細菌呈現非活的的方法係以結合至 LPS 之化合物處理，藉此阻礙其內毒素活性或以干擾 LPS 生物合成之化合物處理。在 LPS 結合及干擾 LPS 合成兩種情況中，由於細胞包膜之通透性而導致活性下降。另一方法係以 LPS 生物合成路徑之條件式突變來培養細菌菌株，在生長期間 LPS 生物合成路徑被抑制，且接著轉變為活化突變且破壞 LPS 生物合成之不適合條件。在每一例中，該應用之程序為使細菌呈現非活的之程序，藉由以最佳處理時間或化合物劑量之每個設置中決定，使得已經實質上失去存活力而保留顯著細菌細胞的完整性。在無存活力係小於100%的情況下，可使用含有防止活的細菌在哺乳動物宿主中進一步增生之突變的細菌（例如，二胺庚二酸營養缺陷型，如 Bukhari and Taylor, J. Bacteriol. 105（3）：844-854, 1971 及 Curtiss et al., Immunol. Invest. 18（1-4）：583-596, 1989 中所描述）。

若使細菌呈現非活的的替代或額外方法是有需要的，則用於殺死細菌的較佳的方法係游離輻射（伽瑪射線或電子束），但也能以其他標準滅菌方法來完成，諸如潮溼或乾熱滅菌、滅菌氣體或蒸氣（參見如 Shintani et al., Biocontrol Science, 16（3）：85-94, 2011）。可使用額外

的最終滅菌的非標準方法包括化學處理（諸如化學滅菌劑），由 Rutala 和 Weber（Emerg. Infect. Dis. 7（2）：348-353, 2001）及 Yaman（Curr. Opin. Drug Discov. Develop. 4（6）：760-763, 2001）總結整理。化學氣體、蒸氣及液體滅菌劑的實例包括環氧乙烷氣體（EOG）、二氧化氯、液體過氧化氫的氣態相（VHP）、甲醛、戊二醛（例如，≥0.05% 歷經 ≥10 分鐘）、鄰-苯二甲酸（OPA）（例如 ≥0.1% 歷經 ≥5 分鐘）以及苯酚。殺菌的方法可能影響該有機體的完整性。例如，相對於使用輻射，添加熱可能破壞細菌的完整性。參考本文中所使用之細菌有機體，包括完整有機體及部分降解形式之有機體可在當有機體被殺死後出現，但不含括具有成為獨立於其他細胞組成物之有機體的亞細胞部分，諸如細胞壁部分（製備）或細胞壁骨架（參見如美國專利第 4,436,727 號）、細胞質部分等等。

D. 組成物

在一實施例中，提供包含非活的革蘭氏陰性細菌有機體及藥學上可接受之賦形劑的組成物，該有機體具有實質降低之內毒素及/或致熱活性。在另一實施例中，至少約80%的有機體為非活的，或至少約 90%的有機體為非活的，或約 100%的有機體為非活的。在一實施例中，該有機體之存活力係降低約 80%、或約 85%、或約 90%、或約 95%、或約 100%。

在一實施例中，該內毒素及/或致熱活性係降低約70%、或約75%、或約80%、或約85%、或約90%、或約95%。該組成物可含有任何預期量之非活的或存活力降低之有機體與任何預期的降低之內毒素或致熱毒性的組合。在另一實施例中，該組成物包含至少100%非活的有機體，具有至少係降低約95%的內毒素活性及致熱性。

本文所述之組成物可以各種方式配製以用於本文所述之方法中。在一實施例中，該組成物包含各處所述之有機體及藥學上可接受之載體。

「藥學上可接受之載體」意指可用於組成物之任何稀釋劑、賦形劑或載體。藥學上可接受之載體包括離子交換劑、礬土、硬脂酸鋁、卵磷脂、血清蛋白（諸如人類血清白蛋白）、緩衝劑物質（諸如磷酸鹽）、甘胺酸、山梨酸、山梨酸鉀、飽合植物性脂肪酸之部分甘油脂混合物、水、鹽類或電解質（諸如硫酸魚精蛋白）、磷酸氫二鈉、磷酸氫二鉀、氯化鈉、鋅鹽、膠體二氧化矽、三矽酸鎂、聚乙烯吡咯烷酮、以纖維素為基之物質、聚乙二醇、羧甲基纖維素鈉、聚丙烯酸酯、蠟、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇及羊毛酯。適合的藥物載體如本領域中標準參考文本，Mack出版公司之*Remington's Pharmaceutical Sciences*所描述。該等係相對於意欲給藥的形式而選擇，即，口服片劑、膠囊、酏劑、糖漿等等，並與習知藥物之使用一致。

藥物組成物可藉由本領域中已詳知之方法製造，諸如

微生物生長於酵原中，接著藉由離心、過濾或透析、傳統製粒、混合、溶解、封裝、凍乾或乳化製程諸如此類來濃縮並清洗。組成物可以各種形式製造，包括顆粒、沉澱物或微粒，粉末包括冷凍乾燥、迴轉烘乾或噴霧乾燥粉末、非晶質粉末、注射劑、乳劑、酏劑、懸浮液或溶液。配方可隨意含有穩定劑、pH 調節劑、界面活性劑、生物可用度調節劑及該等之組合。

藥物組成物可使用滅菌液體，諸如油、水、醇及其組合被製備為液體懸浮液或溶液。可加入藥物上適合之界面活性劑、懸浮劑或乳化劑以供口服或腸外給藥。懸浮液可包括油，諸如花生油、芝麻油、棉花籽油、玉米油及橄欖油。懸浮液製劑也可包含脂肪酸的酯，諸如油酸乙酯、肉荳蔻酸異丙酯、脂肪酸甘油酯和乙醯化脂肪酸甘油酯。懸浮液配方可包括醇，諸如乙醇、異丙醇、十六醇、甘油及丙二醇。亦可被用於懸浮液配方的有醚，諸如聚（乙二醇）、石油烴，諸如礦物油和石油，及水。

該組成物被配製以用於施藥給哺乳動物，較佳為人類。本發明的此種藥物組成物可以各種方法施予，包括腸外給藥。本文所使用之術語「腸外」包括皮下、靜脈、肌肉內、關節內、滑膜內、胸骨內、鞘內、肝內、病灶內及顱內注射或灌注技術。

滅菌可注射形式的組成物可為水性或油性懸浮液。這些懸浮液可根據本領域已知之技術使用適當分散劑或潤濕劑及懸浮劑來配製。滅菌可注射製劑亦可為無毒的腸胃可

接受之稀釋劑或溶劑中之滅菌可注射溶液或懸浮液，例如在 1,3-丁二醇中的溶液。在可接受之媒介物及溶劑之間，可採用水、林格氏溶液及等滲氯化鈉溶液。此外，滅菌、非揮發性油通常用來作為溶劑或懸浮媒介。為此目的，任何溫和的非揮發性油可被採用，包含合成單-或二酸甘油脂。脂肪酸，諸如油酸及其甘油脂衍生物係有用於可注射劑之製備，如同天然的藥學可接受油，諸如橄欖油或蓖麻油，特別是經聚氧乙醯化之版本。這些油溶液或懸浮液也可含有長鏈醇稀釋劑或分散劑，諸如羧甲基纖維素或類似懸浮劑，其通常用於配製包含乳化劑及懸浮劑之藥學上可接受劑量型式。其他一般使用之界面活性劑，諸如 Tween、Span 及其他乳化藥劑或生物可用度增強劑，其通常用於製備藥學可接受之固態、液態或其他也可用於配製的目的之劑量型式。組成物可被配製以藉由注射來腸胃外給藥，諸如以大劑量注射或連續灌注。

E. 治療癌症的方法

適用於由本文中之方法治療之癌症包括一般惡性腫瘤、白血病或淋巴瘤及肉瘤。惡性腫瘤可能為肛門、膽道、膀胱、乳房、結腸、直腸、肺、口咽、下咽部、食道、胃、胰、肝、腎、膽囊及膽管、小腸、尿道、女性生殖道、男性生殖道、內分泌腺、胸腺及皮膚的惡性腫瘤。其他適用的癌症包括類癌腫瘤、胃腸道間質腫瘤、頭頸部腫瘤、不明原發性腫瘤、血管瘤、黑色素瘤、惡性間皮

瘤、多發性骨髓瘤、大腦、神經、眼和腦膜的腫瘤。

在一些實施例中，待治療的癌症形成實體腫瘤，諸如惡性腫瘤、肉瘤、黑色素瘤及淋巴瘤。

如本文所描述之癌症療法係由施予一份量之革蘭氏陰性（如所適合之活或死的）有機體，其足以抑制癌症的生長或轉移。如本文中所使用，片語「足夠量」意指足夠對其接受著產生有益的影響之劑量（或系列劑量）。針對任何特定對象的特定治療有效劑量濃度取決於包括待治療的癌症之類型、癌症的嚴重性、特定有機體或經結合的組成物的活性、施予途徑、有機體或經結合的組成物的清除率、治療持續時間、與有機體合併使用之藥物（如果有）、年齡、體重、性別、飲食、及對象之一般健康狀況及在醫療領域和科學中所詳知之類似因素等等的各種因素。考慮到決定「治療有效量」的各種一般考量在本領域中技術人員為已知，且例如在 Gilman et al., eds., Goodman And Gilman's： The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990 及 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990 中所描述。化合物的劑量濃度通常落入約 0.001 起至 100 mg/kg/day 的範圍內，而約 0.05 起至 10 mg/kg/day 的範圍內的濃度係一般可使用的。用於經施予有機體的劑量濃度通常落入每平方公尺約 10^6 至 10^{12} 的範圍內。一組成物可經腸胃外施予，諸如血管內、靜脈內、動脈內、肌肉內、皮下、口服等等。

細菌有機體可經腸胃外施予，諸如血管內、靜脈內、動脈內、肌肉內、皮下、腹腔內或膀胱內。

治療有效劑量可由本領域中詳知之方法來估計。癌症動物模式諸如患有小鼠腫瘤的免疫活性小鼠或患有人類腫瘤異種移植之免疫缺乏小鼠（例如，裸鼠）在本領域中已詳知並廣泛地描述於併入於本文中作為參考的許多參考文獻中。此種資訊係用以與大鼠、狗及/或非人類靈長動物的安全性研究，以確定在人類中之安全及可能有用之初始劑量。用於估計有機體的劑量之額外資訊從實際人類癌症中之研究得到。例如，Toso 等人（J Clin Oncol. 20（1）：142-52, 2002）指出在 I 期臨床試驗中活 VNP20009 係施予至患有轉移素黑色素瘤的病患。病患接受 10^6 至 10^9cfu/m^2 的 VNP20009 之 30 分鐘靜脈推注輸液。最大耐受劑量為 3×10^8 cfu/m^2。在病患中接受 1×10^9 cfu/m^2 來觀察劑量限制毒性，其包含血小板減少症、貧血症、持續菌血症、高膽紅素血症、腹瀉、嘔吐、噁心、鹼性磷酸酶升高及低血磷症。

有機體可如藥學上可接受之配方予以施予。術語「藥學上可接受」表示材料其係非生物性的或在其他方面不期望的，即，該材料可隨著經選定之有機體或經結合之化合物被施予至個體，而不造成任何不期望的生物效應，或以有害的方式與任何其他施予之藥劑交互作用。此係如上文中充分的描述。

如本文中所使用，術語「治療」一對象之病症或疾病

係意欲包括治癒，以及改善病症或疾病之至少一種症狀。癌症病患係被治療，若病患的癌症被治癒，癌症進入緩解期，以統計學顯著的方式延長了存活率，以統計學顯著的方式增加腫瘤進展的時間，基於建立每種類型的淋巴細胞或造血系統的惡性腫瘤之標準準則，或如由實體腫瘤中的反應評估準則所定義之實體腫瘤負擔已降低，淋巴或造血腫瘤之負擔降低（RECIST 1.0 或 RECIST 1.1，Therasse et al. J Natl. Cancer Inst. 92（3）：205-216, 2000 及 Eisenhauer et al. Eur. J. Cancer 45：228-247, 2009）。如本文中所使用，「緩解期」意指先前證實有癌症之病患中癌細胞生長不復存在。因此，在緩解期中的癌症病患其癌症被治癒，或癌症仍存在但無法輕易測得。因此，當腫瘤無法增大或轉移，癌症可能在緩解期中。如本文中的完全緩解為如由診斷方式（諸如，x 射線、MRI、CT 及 PET、或血球或骨髓活檢）所指示為疾病不復存在。當癌症病患進入緩解期，接下來可能伴隨其癌症再次出現的復發。

術語「實質上」除非另有說明，係指大於約 80%、大於約 90%、大於約 95%及大於約 99%。

F. 治療癌症的組合

本文所描述之癌症療法的方法可使用革蘭氏陰性有機體與一或多種受體或配體的拮抗劑一併施予，該拮抗劑負向調節宿主免疫反應。拮抗劑可指 PD-1、PD-L1 或 CTLA-4 且一般係經靜脈施予，例如每 1 至 4 週以每公斤

約 0.03 毫克至每公斤約 30 毫克的劑量範圍。

程序性細胞死亡蛋白 1（PD-1）係在人類中由 PDCD1 基因所編碼的蛋白質。PD-1 又稱為 CD279（分化群 279）。PD-1 為 268 個胺基酸的 I 型膜蛋白。PD-1 為 T 細胞調節劑的延伸 CD28/CTLA-4 家族之成員。參見如 Ishida et al., EMBO J. 11（11）： 3887-95, 1992。該蛋白含有細胞外 IgV 域，其次是穿膜蛋白區及細胞內尾端。在以酪胺酸為基之抑制模體的免疫受體及以酪胺酸為基之轉換模體的免疫受體內細胞內尾端含有兩個磷酸化位點。其認為 PD-1 負向調控 TCR 傳訊。PD-1 表現於活化 T 細胞、B 細胞及巨噬細胞的表面上。PD-1 為免疫反應的通用負向調節劑。

PD-1 具有兩個配體， PD-L1 及 PD-L2，其為 B7 家族的成員。參見如 Freeman et al., J. Exp. Med. 192（7）：1027-34, 2000 及 Latchman et al., Nat. Immunol. 2（3）： 261-8, 2001。PD-L1 為 40 kDa 之第 1 型穿膜蛋白，其已經報導在懷孕、組織移植、自身免疫疾病及肝炎期間抑制免疫系統中扮演主要角色。在反應於 LPS 及 GM-CSF 處理，向上調控巨噬細胞及樹狀細胞（DC）上的 PD-L1 蛋白，而 T 細胞及 B 細胞上的 PD-L1 蛋白之向上調控取決於 TCR 及 B 細胞受體傳訊。PD-1 受體/PD-L1 配體複合物之形成將傳送抑制訊號，其在淋巴節處降低 CD8+ T 細胞（在免疫反應期間）的增生，且 PD-1 亦可透過細胞凋亡控制外源抗原特異性 T 細胞在淋巴節中之累

積。PD-L2 表現更受限制，且主要由樹狀細胞及一些腫瘤株表現。

CTLA-4（細胞毒性 T 淋巴細胞抗原 4），亦已知為 CD152（分化群 152），為向下調控免疫系統的蛋白質受體。CTLA-4 為表現於輔助、作用性及免疫調節 T 細胞的表面上，使得細胞免疫攻擊抗原。T 細胞能夠藉由刺激 CD28 受體而啟動，或藉由刺激 CTLA-4 受體而關閉。如同 T 細胞的共刺激蛋白 CD28，CTLA-4 與抗原表現細胞上的 CD80 及 CD86（亦分別稱為 B7-1 及 B7-2）結合。T 細胞經由 T 細胞受體及 CD28 而活化，導致 CTLA-4 的表現增加，其為針對 B7 分子的抑制性受體。

增強或延長 T 細胞活化已藉由針對 CTLA-4 及 PD-1 的單株抗體（mAbs）來達成。易普利姆瑪（ipilimumab）及曲美母單抗（tremelimumab）為抑制 CTLA-4 的單株抗體，且已顯示誘導或增強抗腫瘤免疫反應，導致持久的抗腫瘤效應。易普利姆瑪（亦已知為 MDX-010 或 MDX-101）以 Yervoy 的名字在美國上市，由 Bristol Myers Squibb 販賣以供治療不能切除的或者轉移的惡性黑色素瘤。BMS-936558（MDX-1106）為針對 PD-1 的單株抗體，並在人類臨床試驗中展現顯著抗腫瘤活性。參見如 Brahmer et al., J. Clin. Oncol., 28（19）：3167-3175, 2010, Brahmer et al., N. Engl. J. Med., 366（26）：2455-2465, 2012 及 Lipson et al., Clin. Can. Res. 19（2）：462-468, 2013。

CTLA-4 的抑制亦可藉由以 CTLA-4 及免疫球蛋白（Ig）重鏈的 Fc 製成的融合蛋白（CTLA4Ig）來實現。參見如 Park et al., Pharm Res. 20（8）：1239-48, 2003。

在腫瘤微環境中免疫反應的額外重要負向調節劑為訊號轉導及轉錄激活因子（STAT）訊號反應轉錄因子 STAT3。此因子的活性在腫瘤及相關免疫細胞中提升。腫瘤細胞中的 STAT3 活性有助於增強存活、增生、侵入及轉移，以及血管生成的刺激。在免疫細胞中提升的 STAT3 活性使得免疫細胞累積及活化於腫瘤微環境內，諸如 Treg、TH17 及髓源抑制細胞。參見如檢閱 Rébé 等人（JAK-STAT 2（1）：e23010-1-10, 2013）。廣泛使用的第 2 型糖尿病藥物二甲雙胍及苯乙雙胍已顯示具有抗腫瘤活性且該機制被認為包括抑制 STAT3 活性，導致抗腫瘤免疫抑制降低。參見如檢閱 Deng 等人（Cell Cycle 11（2）：367-376, 2012）、Hirsch 等人（Proc. Natl. Acad. Sci., USA 110（3）：972-977, 2013）、Appleyard 等人（British J Cancer 106：1117-1122, 2012）、Jiralerspong 等人（J Clin Oncol. 27（20）：3297-3302, 2009）及 Del Barco 等人（Oncotarget 2（12）：896-917, 2011）。如本文中所描述的癌症療法的方法可利用革蘭氏陰性有機體與 STAT3 表現或活性抑制劑一起施予。此種抑制劑可包括二甲雙胍及苯乙雙胍。二甲雙胍可例如以通常每天 1 至 3 次施予約 50 毫克至約 1,000 毫克之間的劑量範圍。苯乙雙胍一般以每天 1 至 2 次施予約 20 毫克至約 800 毫克之間

的劑量範圍。

如本文中所描述的癌症療法的方法亦可利用革蘭氏陰性有機體與正向調控宿主免疫反應之受體或配體的一或多種促效劑一起施予。促效劑指 4-1BB（CD137）、GITR、CD40 或 OX40（CD134）能以每 1 至 4 週靜脈施予例如每公斤約 0.03 毫克至每公斤約 30 毫克的劑量範圍。

糖皮質素誘導腫瘤壞死因子受體（TNFR）相關蛋白（GITR）、4-1BB（CD137）、CD40 及 OX40（CD134）為共刺激 TNFR 家族成員，其表現於調節及作用性 T 細胞上，以及免疫系統的其他細胞上。這些蛋白的活化導致免疫功能的刺激或增強。在臨床前模型中針對每一已展現抗腫瘤活性且已進入臨床開發的該等蛋白來活化單株抗體。參見如 Melero et al., Clin. Cancer Res. 15（5）：1507-1509, 2009、Garber, JNCI 103（14）：1079-1082, 2011、Khong et al., Int. Rev. Immunol. 31（4）：246-266, 2012、Vinay and Kwon, Mol. Cancer Ther. 11（5）：1062-1070, 2012、Snell et al., Immunol. Rev. 244（1）：197-217, 2011 及 So et al., Cytokine Growth Factor Rev. 19（3-4）：253-262, 2008。

如本文中所描述的癌症療法的方法亦可利用革蘭氏陰性有機體與一或多種化療藥劑一起施予。此種藥劑可包括環磷醯胺。其設想為當環磷醯胺被用於本文中所述之方法中時，其可以靜脈或口服每天或每 21 天施予 5 mg/m^2 至 750 mg/m^2 之間的劑量。或者，環磷醯胺可以節律性飲食

療法施予例如每天口服 5 mg 至 100 mg 之間的劑量。參見如 Jia et al., Int. J. Cancer 121（3）：666-674, 2007。

抗腫瘤免疫反應的刺激已由各種細胞激素證實。參見如 Smyth et al., Immunological Rev. 202：275-293, 2004 及 Kim-Schulze, Surg. Oncol. Clin N. Am. 16：793-818, 2007 以供檢閱。如本文中所描述的癌症療法的方法亦可利用革蘭氏陰性有機體與重組表現的或獨立並純化的細胞激素一起施予，諸如干擾素-α、干擾素-β、干擾素-γ、顆粒細胞巨噬細胞集落刺激因子、介白素-2 及介白素-12。

如本文中所描述的癌症療法的方法亦可利用革蘭氏陰性有機體與重組表現的或獨立並純化的干擾素-α 一起施予。干擾素-α 可經皮下、肌肉內或靜脈以每週 1、3、5 或 7 次施予約 3×10^5 至約 3×10^8 IU 之間的劑量範圍。在另一實施例中，革蘭氏陰性細菌可能與干擾素-β 一起施予。在特定實施例中，干擾素-β 可經皮下或靜脈以每週或每隔一天施予一次約 0.01 毫克至約 5 毫克之間的劑量範圍。干擾素-γ 也可被一起施予。在一實施例中，干擾素-γ 可經皮下或靜脈以每隔一天或每天施予約 1×10^5 IU 至約 1×10^9 IU 之間的劑量範圍。

在額外方法中，介白素（例如，介白素-2 及介白素-12）可被一起施予。在一實施例中，介白素結合革蘭氏陰性細菌以每週一次或高達一天三次靜脈施予約 1×10^4 至約 1×10^7 IU 之間的劑量。額外的方法包括施予革蘭氏陰性細菌，例如以顆粒細胞巨噬細胞集落刺激因子，一般經皮

下、皮內或靜脈以每天或每月施予約 5 微克至約 5 毫克的劑量範圍。在本篇所記述的結合處理的任一者，有機體可考慮在額外癌症處理之前或之後施予。其亦可同時施予。

後續實施例作為說明本揭示。該些實施例不意欲限制本揭示之範圍。

實施例 1

針對脂多醣相關內毒素活性的失活及由多黏菌素 B 殺死的細菌細胞而不喪失細胞完整性之最佳條件係由在含有 1-100μg/mL 的多黏菌素 B 的磷酸鹽緩衝液（PBS）中於 37°C 培養濃縮對數生長期後期細菌（每 mL 10^9 至 10^{11}）經 2 分鐘及 6 小時之間之各種不同時間的每一細菌菌株來測定。藉由連續稀釋生長兼容洋菜平板培養上的控制組及處理組細菌懸浮液來測定存活力，接著培養過夜並計算菌落。細胞完整性由可見（顯微鏡）檢驗及於 600nm 的吸光度分析來測定。內毒素活性藉由鱟檢測試劑（LAL）試驗來測定。可溶性或多餘的多黏菌素及細胞碎屑（包括可溶性內毒素）可藉由以 0.9% NaCl（生理食鹽水）離心介導清洗來移除。

另外，以由條件突變造成的有缺陷的 LPS 來分離完整、非活的細菌的最佳條件，係由所述之多黏菌素處理來測定，不同的是細菌於不適當條件下生長於 LB（潛溶型培養液）培養基中，並在各種不同時間移出，接著分析並進行所述之多黏菌素處理。

經多黏菌素處理的細菌，或經生理食鹽水清洗對數生長期後期 LPS 突變/缺陷的細菌係使用海藻糖作為低溫保護劑來進行冷凍乾燥（參見例如 Leslie et al., App. Environment. Microbiol. 61（10）：3592-3597, 1995；Gu et al., J. Biotech. 88：95-105, 2001 及 American Type Culture Collection Bacterial Culture Guide）。如果需要，藉由在足以降低存活力至 0%而不喪失細菌完整性的劑量以電離輻射處理而進一步降低細菌存活力。

冷凍乾燥的細菌在用於抗腫瘤研究之前，在滅菌水中再懸浮。PBS 清洗小鼠腫瘤細胞（B16 及 B16F10 黑色素瘤、CT-26 大腸癌、Panc02 胰腺癌或 Lewis 肺腺癌（10^5-10^7 細胞，取決於細胞株））係皮下植入經剃毛的 C57BL/6 小鼠的背部。小鼠為隨機，並且當腫瘤一旦能被觸診、當腫瘤達到平均 75 mm^3 的體積、或當腫瘤達到平均 300 mm^3 的體積時時開始治療（如由卡尺測量來估計）。經再懸浮的細菌以每 0.1-0.2 mL 的注射體積 10^3 至 10^{10} 範圍的單一劑量經由尾靜脈注射或腹腔（i.p.）注射每週一至二次。針對 T 細胞受體的抗體拮抗劑或促效劑係經 i.p.以每週一次至兩次施予 3-100 微克之單一劑量。環磷醯胺經 i.p.以每隔一天施予高達 150 mg/kg 共 5 天（MTD 給藥）或於飲用水中每天 25 mg/kg（規律性給藥）。小鼠每週稱重兩次並記錄臨床觀察。每週兩次進行腫瘤測量（藉由卡尺），且若/當腫瘤達到 1,000 mm^3 時、變成壞死或若觀察到≥15% 重量損失，小鼠被人道犧牲。

腫瘤被移出並且稱重，以犧牲小鼠進行最小屍檢。若長期腫瘤消退或觀察到治癒時，小鼠可以再嘗試植入腫瘤細胞。

實施例 2

在實施例 2 中，施予大腸桿菌菌株 2617-143-312（Migula）Castellani 及 Chalmers（ATCC® 13070™）。此無毒害的革蘭氏陰性細菌需要外源性二胺庚二酸（DAP）以供生長。然而哺乳動物不製造 DAP，此細菌菌株係非活的且無法感染哺乳動物。此外，在體外研究期間 DAP 營養缺陷可被用以監視污染。細菌係在具有 2 mM $MgCl_2$、0.5%葡萄糖及 1mM 於 37°C 下以 300rpm 恆定搖動的 DAP 之 LB Miller 培養液中生長至對數生長期後期（基於 $O.D._{600}$）。該培養物藉由 2,000×*g* 離心 15 分鐘來清洗三次並在含有 20 mM $MgCl_2$、0.5% 葡萄糖及 0.1 mM DAP（PMB 處理培養基）於 4°C LB Miller 培養液中再懸浮。基於 1 $O.D._{600}$ 等同於每 mL 有 $1.12x10^9$ 的細菌，最終再懸浮係每 mL 由 $2x10^{10}$ 的細菌製成。培養物的各等分係經不具有或具有各種濃度的多黏菌素 B（PMB）（Calbiochem #5291）於 4°C 下恆定搖動培養 1 小時。細菌接著以 4°C 新鮮 PMB 處理培養基以 3,000×*g* 離心 10 分鐘清洗三次，並以每 mL 含 $2x10^9$ 細菌再懸浮。細菌回收效率係由 $O.D._{600}$ 來監測。對於所有以高達 300 μg/mL PMB 處理的樣本在 PMB 處理及清洗後細菌回收率高於

90%，且以 1,000 μg/mL PMB 處理則超過 80%。

在圖 1 中，內毒素活性係藉由以鱟檢測試劑（LAL）Endosafe Endochrome-K 動力試驗套組（Charles River Endosafe, Charleston, SC）分析未經處理及經處理的細菌培養物的連續稀釋液。未經處理培養物每 $1x10^6$ 細菌一般含有將近 50-100 內毒素單元。於四個獨立實驗（平均 = 17%未經處理）中以 1,000 μg/mL PMB 處理，觀察到類似的內毒素降低。

在圖 2 中，細菌存活力藉由連續地稀釋並將每個樣本種至含有 2 mM $MgCl_2$、0.5% 葡萄糖、具有或不具有 1 mM DAP（用以分別監測存活力及污染）的 LB Miller 洋菜平板培養來測定。平板於 37°C 下培養隔夜，測定每一平板上的菌落數，並接著藉由稀釋因數乘上每一平板上的菌落數來計算存活力。每一懸浮液中的細菌總數係將由每 1 $O.D._{600}$ 的 $1.12x10^9$ 細菌/mL 的轉換因子乘上 $O.D._{600}$ 來計算。存活力（%活細菌）係相對於細菌總數的活的細菌/mL 百分比來計算。以 1,000 μg/mL PMB 處理使細菌存活力降低至 0%。在隨後的大規模實驗中，在四次獨立實驗中 1,000 μg PMB 使存活力降低至平均 11%。

實施例 3

除了處理前清洗、戊二醛（GA）處理及處理後清洗係在 pH7.5 下以含有 20 mM $MgCl_2$ 的磷酸鹽緩衝液（PBS；無 Mg 及 Ca）來進行，試驗係如實施例 2 所述來

進行。在 GA 處理後所有經測試濃度之細菌回收率一般為 80-100%。圖 3 顯示以 1%GA 處理降低內毒素活性 96%。相對於未經處理之培養，以 1% GA 處理的 2 公升大規模實驗產生 82%的內毒素活性降低。

以高於 0.05%的劑量之 GA 處理總是造成 100%殺菌效果，如圖 4 所顯示。

以 1,000 μg/mL PMB 處理後使用 2 公升的對數生長期後期培養物的 1% GA 處理之組合，產生相對於未經處理之培養物（表 1）具有 0%存活力且內毒素活性降低 92%（12 倍）的細菌。

實施例 4

在實施例 4 中，細菌生長並以 1,000 μg/mL PMB、1% GA 或兩者來處理，如實施例 2 及 3 之規程中所描述。樣本以 pH 7.5、含有 1%GA（若先前未暴露至 GA）的 PBS 稀釋並固定 10 分鐘。含有細菌的 25 微升之滴液被置放於封口膜上且接著以 100 網目聚乙醯醇酸甲醛+碳 EM 網格（EMS, Hatfield, PA）覆蓋，其係預先塗上 0.1%聚-L-離胺酸。樣本係可附著 10 分鐘，且接著藉由置放 200 微升水滴液來簡要的清洗該網格三次。該網格藉由放置在含有 2%乙酸氧鈾的水中 100 微升滴液負染色 1 分鐘。以 3M 濾紙沾掉多餘的染劑，接著空氣乾燥。使用配備有底座安裝 Eagle 4k（1600 萬畫素）數位相機（放大倍率 1,200x 及 11,000x）的 FEI Tecnai Spirit G2 BioTWIN 穿透式電子顯

微鏡使樣本可見。圖 5B、5C 及 5D 的影像證實根據本方法進行 PMB 及/或 GA 處理而留下完整的細菌，其為所期望的結果。在未經處理的細菌（圖 5A）上可見到（模糊表面）多醣莢膜，但在所有經處理的細菌（圖 5B、5C 及 5D）中則顯示被移除或纏結在一塊。

實施例 5

對於實施例 5，大腸桿菌生長並以 1,000 μg/mL PMB 加 1%GA 處理，且存活力及內毒素濃度如實施例 2 及 3 所述來測定。在最終清洗後，未經處理及經 PMB + GA 處理之細菌於 pH 7.5、0.5 mM $MgCl_2$、12%海藻糖的 50%PBS 中再懸浮成每 mL 有 $1.1x10^{11}$ 的細菌之濃度，分裝，急速冷凍並且儲存於-80°C。如美國藥典第 151 章中所述，致熱性臨界值本質上已確定。使用重量至少 2.0 kg 成年雌性紐西蘭白兔。所有的動物在熱原檢測前以假檢測調節不超過 7 天。劑量範圍研究以每劑量一隻兔子來進行，且這些結果隨後以每劑量兩隻兔子來確認。細菌以滅菌生理食鹽水稀釋以供注射。所有劑量以 10mL 之體積經由靜脈途徑遞送。施予試驗試劑的三個小時內，在任何時間點產生溫度增加 0.5-1.0°C 試驗試劑的最低濃度被視為表現致熱性的臨界值。於基線處記錄直腸溫度且在 1 及 3 小時之間的 30 分鐘區間接著注射試驗試劑。用於儲存未經處理及經處理的大腸桿菌的生理食鹽水稀釋媒介已顯示為非致熱的。將 $3x10^4$ 個未經處理的細菌施予至兩隻兔子以產生溫

度增加 0.8 及 1.0°C。施予 $3x10^5$ 個經 PMB + GA 處理的細菌，並不產生超過 0.1°C 的溫度增加，但將 $9x10^5$ 個經 PMB + GA 處理的細菌施予至兩隻兔子以產生 0.7 及 1.0°C 的溫度增加，證實了致熱性臨界值有 30 倍的差異。其可能是 PMB 只中和脂多醣介導之致熱活性。然而，GA 可中和由脂多醣以及由細菌的其他成分所介導的致熱性。

表 1 顯示針對未經處理細菌，及經 1,000 μg/mL PMB 與 1% GA 兩者處理之細菌之致熱性（發熱反應）臨界值，如藉由標準體內兔子試驗來測量。該結果與由體外 LAL 試驗測定之內毒素濃度比較，顯示了相較於未經處理的細菌雖然 PMB + GA 處理降低內毒素濃度 12 倍，但藉由相同樣本所介導的致熱性則降低 30 倍。

表 1

處理	活細菌	內毒素活性 LAL 試驗	致熱性臨界值 兔子試驗
無處理	83%	44.7 Units / 10^6 細菌	3×10^4 細菌
PMB + GA	0%	3.6 Units / 10^6 細菌	9×10^5 細菌
最大降低		12X	30X

實施例 6

在實施例 6 中，大腸桿菌生長並以 1,000 μg/mL 多黏菌素 B 加 1% GA 處理，如實施例 2 及 3 之規程中所描述。未經處理及經處理的細菌之冷凍庫存於 37°C 下快速解凍，並以滅菌生理食鹽水稀釋至少 10 倍以供注射（靜脈注射劑量 $\leq3x10^9$ 個細菌），或以 3,000×g 離心 10 分鐘

並以滅菌生理食鹽水再懸浮以供注射（靜脈注射劑量 $\geq 5x10^9$）。細菌或媒介物經由尾靜脈以 100 微升的體積靜脈注射。

使用八週大的 C57BL/6 或 BALB/c 雌性小鼠並在研究前馴化至少 7 天。每天進行一或二次的死亡率及臨床觀察。在注射時及注射後 1-4 小時進行額外的觀察。確認媒介物為缺乏毒性的。籠側觀察包括，但不限於下列情況：

皮膚、皮毛、眼睛、黏膜、步態、姿勢以及對處理分泌物/排泄物出現時的反應或其他自主活動之表達，諸如流淚、豎毛、不尋常的呼吸模式；癲癇發作；一般警覺的改變；刻板行為，諸如過度梳理反覆盤旋；不尋常行為（自殘）；腫塊/突塊的發育（腫瘤、膿腫等）；壓力及/或呼吸系統癥狀之發展；注射位置的刺激及發炎跡象之觀察；食物及水和排尿及排便的改變。

多劑量的細菌施予研究係每週進行兩次，共兩週（4 次處理）。毒性評估包括監測動物體重。用於反映以 $1x10^9$ 個經 PMB + GA 處理之細菌的多劑量研究之小鼠係患有腫瘤的。在表 2 中所反映的所有其他小鼠係不患有腫瘤的。

表 2

細菌處理	劑量	單一劑量觀察	多（4）劑量觀察
無處理	3×10^8	在 1-4 小時稍微昏睡	在 1-4 小時稍微昏睡
	1×10^9	在 1-4 小時昏睡	在 1-4 小時昏睡，3 隻小鼠中有 2 隻在第四劑後死亡
	5×10^9	在 1-48 小時昏睡 72 小時後死亡	ND*
	1×10^{10}	18 小時後死亡	ND
PMB+GA	1×10^9	在 1-4 小時稍微昏睡	在 1-4 小時稍微昏睡，皮毛豎起
	3×10^9	在 1-4 小時昏睡	處理後稍微昏睡，昏睡或皮毛豎起達 4 小時
	5×10^9	在 1-4 小時昏睡	處理後稍微昏睡，昏睡或皮毛豎起達 4 小時
	1×10^{10}	嚴重昏睡，3 隻小鼠中有 1 隻第 24 小時後死亡	昏睡，稍微昏睡，皮毛豎起及/或淺呼吸

*ND = 無法斷定

實施例 7

在實施例 7 中，如實施例 2 及 3 之規程中所描述製備經 1,000 μg/mL PMB + 1% GA 處理的細菌（DB103）。將八週大雌性 C57BL/6J 小鼠的注射位置剃毛，並以 $2x10^5$ B16F10 小鼠黑色素瘤細胞（ATCC CRL-6475）皮下注射於右側。處理開始於由尾靜脈靜脈注射 3 天後，並且接著每週兩次共 5 次處理。DB103 於 50% PBS 中、pH 7.5、0.5 mM $MgCl^2$, 12% 海藻糖在每 mL 有 $1.1x10^{11}$ 之濃度係以滅菌生理食鹽水稀釋 11 倍（$1x10^9$ 的劑量）或 220 倍（$5x10^7$ 的劑量）並以最終體積 100 微升來進行注射。該庫存媒介物係稀釋 11 倍以用於媒介物控制處理組。每週

以卡尺測量腫瘤兩次，且使用公式（長度 x 寬度 ^{2}）/2 來測定腫瘤體積。沒有觀察到化合物相關的死亡。除了以 $1x10^9$ DB103 處理的兩隻動物之外，所有動物發育出腫瘤。觀察到體重在短時間損失高達 3%（低劑量組）及 7%（高劑量組），但在最後一次處理（圖 6）復原。

實施例 8

對於實施例 8，如實施例 2 及 3 之規程中所描述製備大腸桿菌（未經處理與經 1% GA 處理）。除了處理於第 11 天（當腫瘤一旦可觸摸到時）開始之外，本實驗如實施例 7 之規程中所描述來進行。因為每一該等組別中的動物子集因為腫瘤負擔而安樂死，大部分組別的組別測量在第 24 天後並沒記錄。在 $1x10^9$ GA 組別中的最大體重損失為 11%。施予 $1x10^9$ 未經處理的大腸桿菌的毒性被排除（參見表 2）。

實施例 9

在實施例 9 中，如實施例 2 及 3 之規程中所描述製備經 1,000 μg PMB + 1% GA 處理的細菌（DB103）。除了 $1x10^5$ 個小鼠 CT26 大腸癌細胞經皮下注射於 BALB/c 小鼠的右側之外，本實驗如實施例 7 之規程中所描述來進行。DB103 處理開始於由尾靜脈靜脈注射 3 天後，並且接著每週兩次共 6 次處理。於第 3 天開始，經由不斷地飲水施予環磷醯胺（LKT Laboratories, #C9606），約 20

mg/kg/day（0.133 mg/mL 於水中）。於第 3、6、9 天，將溶於 200 微升 PBS 中的 100 μg 抗小鼠 CTLA-4 抗體（BioXcell #BE0164）施予腹腔注射。每天記錄臨床觀察及死亡率。每週以卡尺測量腫瘤兩次，且使用公式（長度 x 寬度 ^{2}）/2 來測定腫瘤體積。在媒介物組別中所有小鼠皆形成腫瘤。在任一組別中沒有觀察到體重喪失且無化合物相關之死亡。對於媒介物之資料，低劑量與高劑量 DB103 組別與圖 8A 及 8B 中相同。

在本說明書中提及之所有專利與發表係指示對本揭示相關之該等本領域中一般技術人員之水準。本文中所有專利與發表藉由引用相同範圍來結合，如同每個個別的發表係具體地且單獨地指明以藉由引用來併入。

本文中適當地說明性描述本揭示，可實施本文中未具體公開之不存在任何元素或多個元素、限制或多個限制。因此，例如，在本文各個例子中，術語「包括」、「基本上由…組成」及「由…組成」之任一者可由其他兩者用詞之一所取代。所採用的術語及表達為用作描述而不是限制，且在使用此術語及表達時沒有意圖排除任何所顯示及描述的特徵之等同物或其部份，但可知道的是在本申請專利範圍的範圍內，各種不同的修改是可能的。因此，應了解雖然已由較佳實施例及隨意特徵具體描述本揭示，仍可藉由本領域技術人員復原本文中揭示之修改及各種不同的概念，且如由隨附之申請專利範圍所定義，該些修改及變化被視為在此揭示之範圍內。其餘實施例如下列申請專利

範圍內所闡述。

I664976

發明摘要

公告本

※申請案號：102147759

※申請日：102 年 12 月 23 日　　※IPC 分類：A61K 35/74 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

使用細菌治療癌症之組成物和方法

Compositions and methods for treatment of cancer using bacteria

【中文】

本發明提供之組成物實質上包含非活的革蘭氏陰性細菌有機體，及使用該相同組成物治療癌症的方法，該有機體具有實質降低之內毒素活性及/或致熱性。亦提供本文所提供用於治療癌症的方法，包含將一份量足以抑制癌症的生長或轉移的實質上非活的革蘭氏陰性細菌施予經診斷患有癌症的哺乳動物，該細菌具有實質降低之內毒素活性/及或致熱性。提供另外的方法包含施予活的或非活的革蘭氏陰性細菌有機體，該有機體具有導致該細菌外膜內的脂多醣實質喪失的基因缺陷。另提供包含以多黏菌素及戊二醛處理，用以降低革蘭氏陰性細菌之內毒素活性及/或致熱性的方法。

【英文】

Provided herein are compositions comprising substantially non-viable Gram-negative bacterial organisms that have a substantial reduction in endotoxin activity and/or pyrogenicity and methods for treating a cancer using the same. Also provided are methods for treating cancer provided herein, comprising administering to a mammal diagnosed with cancer, substantially non-viable Gram-negative bacteria having a substantial reduction in endotoxin activity and/or pyrogenicity, in an amount sufficient to inhibit growth or metastasis of the cancer. An additional method is provided comprising administering viable or non-viable Gram-negative bacterial organisms that have a genetic defect that results in a substantial loss of lipopolysaccharide within the outer membrane of the bacteria. Further provided are methods for reducing endotoxin activity and/or pyrogenicity in Gram-negative bacteria comprising treatment with polymyxin and glutaraldehyde.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(3)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

申請專利範圍

1. 一種醫藥組成物，其包含完整且實質上非活的革蘭氏陰性細菌細胞及藥學上可接受之賦形劑，其中與對應之野生型革蘭氏陰性細菌細胞相比較，該完整且實質上非活的革蘭氏陰性細菌細胞具有脂多醣（LPS）介導之內毒素活性降低至少 80%，且其中藉由於 2°C 至 10°C 之溫度下 3 μg 至 5000 μg 多黏菌素/1×10^{7} 至 5×10^{10} 個活的革蘭氏陰性細菌細胞/ml 和濃度為 0.05%至 2.0%之戊二醛處理活的革蘭氏陰性細菌細胞以製備該完整且實質上非活的革蘭氏陰性細菌細胞。

2. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該細胞之至少約 80%為非活的。

3. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該細胞之至少約 90%為非活的。

4. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該細胞之約 100%為非活的。

5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之組成物，其中該內毒素活性降低約 85%。

6. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之組成物，其中該革蘭氏陰性細菌細胞之致熱性降低約 95%。

7. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之組成物，其中該革蘭氏陰性細菌細胞為沙門桿菌屬（*Salmonella*）或大腸桿菌屬（*Escherichia*）細胞。

8. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之組成物，

其中該多黏菌素為多黏菌素 B 或多黏菌素 E。

9. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之組成物，其中該戊二醛處理係於該多黏菌素處理之後。

10. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之組成物，其中該多黏菌素處理係於約 4°C 之溫度下。

11. 如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該多黏菌素處理係於氯化鎂之存在下。

12. 如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該多黏菌素之濃度為約 200 μg 至 5000 μg/1×10^{7} 至 5×10^{10} 個細菌/ml。

13. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之組成物，其中該戊二醛之濃度為約 0.5%至約 2.0%。

14. 一種如申請專利範圍第 1 至 13 項中任一項之組成物於製造藥物之用途，該藥物用於治療哺乳動物之癌症。

15. 一種完整且實質上非活的革蘭氏陰性細菌細胞於製造藥物之用途，該藥物用於治療哺乳動物之癌症，其中與對應之野生型革蘭氏陰性細菌細胞相比較，該完整且實質上非活的革蘭氏陰性細菌細胞係於條件下經多黏菌素 B 或多黏菌素 E 和戊二醛處理以具有脂多醣（LPS）介導之內毒素活性降低至少 80%。

16. 如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該癌症為實體腫瘤。

17. 如申請專利範圍第 15 或 16 項之用途，其中該細

胞為沙門桿菌屬。

18. 如申請專利範圍第 15 或 16 項之用途，其中該細胞為大腸桿菌屬。