



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104797261 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201380030337. 0

A61K 35/76(2015. 01)

(22) 申请日 2013. 04. 10

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/86(2006. 01)

61/622, 376 2012. 04. 10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2013/000142 2013. 04. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/154503 EN 2013. 10. 17

(71) 申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 王朔 吴春晓 赵莹 李幸慰

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

A61K 31/7088(2006. 01)

权利要求书1页 说明书19页

序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

使用杆状病毒载体的膀胱癌治疗方法

(57) 摘要

本发明提供了使用杆状病毒载体将核酸分子递送至膀胱细胞的方法和用途。将膀胱细胞与杆状病毒载体接触,后者还可包含转基因。

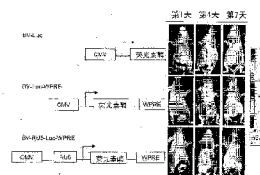


图 1A

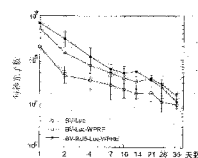


图 1B

1. 一种将核酸分子递送至膀胱细胞的方法,包括使所述膀胱细胞接触杆状病毒载体。
2. 如权利要求 1 所述的方法,所述膀胱细胞是膀胱癌细胞。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,所述膀胱细胞是体外的。
4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,所述膀胱细胞是体内的。
5. 如权利要求 4 所述的方法,所述膀胱细胞在需要进行膀胱癌治疗的对象中,且所述接触包括通过膀胱内灌注向所述对象给予所述杆状病毒载体。
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的方法,所述杆状病毒载体还包含用于在所述膀胱癌细胞中表达的转基因,其可操作地连接至驱动所述转基因在所述膀胱细胞中表达的启动子。
7. 如权利要求 6 所述的方法,所述转基因是用于治疗膀胱癌的治疗性转基因。
8. 如权利要求 7 所述的方法,所述治疗性转基因编码 CD40L 或 IL-15。
9. 如权利要求 6-8 中任一项所述的方法,所述启动子包括人巨细胞病毒立即早期启动子。
10. 如权利要求 9 所述的方法,所述人巨细胞病毒立即早期启动子包括 SEQ ID NO:1 所列序列。
11. 如权利要求 6-10 中任一项所述的方法,所述杆状病毒载体还包括位于所述转基因 3' 非翻译区中的来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调控元件。
12. 如权利要求 11 所述的方法,所述来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调控元件包括 SEQ ID NO:2 所列序列。
13. 如权利要求 6-12 中任一项所述的方法,所述杆状病毒载体还包括位于所述转基因 5' 非翻译区中的来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和至少一部分 U5 序列。
14. 如权利要求 13 所述的方法,所述来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和至少一部分 U5 序列的包括 SEQ ID NO:3 所列序列。
15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的方法,还包括在所述接触前或所述接触同时加入转染试剂。
16. 如权利要求 15 所述的方法,所述转染试剂是聚 L- 赖氨酸、ClorpacktionWCS-90、十二烷基 -B-dd- 麦芽苷 (DDM) 或十二烷基硫酸钠 (SDS) 或其任何组合。
17. 一种应用于在需要膀胱癌治疗的对象中治疗膀胱癌的杆状病毒载体,其中所述应用包括在所述对象中经膀胱内灌注所述杆状病毒载体。
18. 杆状病毒载体在需要膀胱癌治疗的对象中治疗膀胱癌的用途,通过经膀胱内灌注所述杆状病毒载体使用。
19. 杆状病毒载体在制造药物中的用途,所述药物通过经膀胱内灌注所述杆状病毒载体来用于在需要膀胱癌治疗的对象中治疗膀胱癌。
20. 一种用于在对象的膀胱中进行膀胱内灌注的杆状病毒载体。
21. 杆状病毒载体在对象的膀胱中进行膀胱内灌注的用途。
22. 杆状病毒载体在制造药物中的用途,所述药物用于在对象的膀胱中进行膀胱内灌注。

使用杆状病毒载体的膀胱癌治疗方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 4 月 10 日提交的美国临时申请第 61/622,376 号的优先权和权益,其内容通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及使用杆状病毒载体治疗或预防膀胱癌的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 膀胱癌是尿道中最常见的恶性肿瘤形式。在美国,2011 年预计有 69,000 例新增病例和近 15,000 人死亡 (Siegel R 等,2011)。在新加坡,膀胱癌是男性中第 9 大常见癌症。

[0006] 几乎所有膀胱癌都是从变移上皮产生的且因此称为变移细胞癌 (TCC)。大部分的膀胱 TCC 在初始诊断中是浅表性的、非肌肉浸润性的。然而,尿道切除后表面 TCC 的复发率可以高达 70%,必需进行辅助治疗以控制复发和进展。

[0007] 辅助治疗通常使用卡介苗 (BCG) 以膀胱内免疫治疗的形式给予具有中度或高度癌症复发风险的患者。BCG 由减毒的活牛结核菌生成并可激活 CD4+Th1 细胞因子 (如白介素 2 (IL-2)、IL-12、IL-18 和干扰素 γ (INF- γ)) 介导的先天免疫应答。然而,由于 BCG 难治性、耐药性、复发或不耐受,多达 40% 的患者会在第一年中发生 BCG 免疫治疗失败 (Zlotta AR 等,2009 ;Chiong 和 Esuvaranathan,2010)。因此,存在开发新的辅助疗法以提高浅表性膀胱癌患者治疗结果的需要。

[0008] 已被开发作为可能的膀胱癌辅助治疗的基于病毒载体的基因治疗包括疫苗病毒 (Lee SS 等,1994 ;Gomella LG 等,2001 ;Siemens DR 等,2003 ;Fodor I 等,2005)、腺病毒 (Morris BD 等,1994 ;Sutton MA 等,2007 ;Kuball J 等,2002 ;Siemens DR 等,2003 ;Pagliaro LC 等,2003 ;Malmström PU 等,2010)、金丝雀痘病毒 (Siemens DR 等,2003)、呼肠孤病毒 (Hanel EG 等,2004)、逆转录病毒 (Shiau AL 等,2001 ;Kimura T 等,2003 ;Dumey N 等,2005 ;Kikuchi E 等,2007)、慢病毒 (Kikuchi E 等,2004) 和水泡性口炎病毒 (Hadaschik BA 等,2008)。已报道了至少 5 个临床实验,其涉及使用复制型疫苗病毒和腺病毒载体治疗膀胱癌 (Gomella LG 等,2001 ;Kuball J 等,2002 ;Pagliaro LC 等,2003 ;Burke J,2010 ;Malmström PU 等,2010)。

[0009] 经测试用于癌症基因治疗的多种类型病毒载体中有反转录病毒。反转录病毒的生命周期包括宿主基因组中的整合状态,从而允许治疗基因的长期、稳定表达。关于反转录病毒使用的一个主要问题是这些载体优先整合至基因组的转录活跃区域,这会导致插入突变、癌基因激活和细胞转化。进行 SCID-X1 的基因治疗后法国和英国数名儿童发生白血病 (Hacein-Bey-Abina 等,2003) 使得病毒载体相关的潜在风险受到严格审查。

[0010] 腺病毒和腺相关病毒 (AAV) 来源的病毒载体具有低得多的插入突变风险且已经过癌症基因治疗的测试 (Cross 和 Burmester,2006 ;Palmer 等,2006)。还在动物模型和至少 4 个早期临床试验中对腺病毒载体进行了膀胱癌基因治疗的广泛测试 (Kuball J 等,2002 ;Pagliaro LC 等,2003 ;Burke J,2010 ;Malmström PU 等,2010)。然而,作为感染性人病毒,

腺病毒和 AAV 激活人免疫系统 (CalcedoR 等, 2009 ;Huang 和 Yang, 2009 ;Nayak 和 Herzog, 2010)。AAV 载体有效地激活 B 细胞 (Huang 和 Yang, 2009) 且根据年龄组和地理位置, 在 35 至 80% 的个体中检测到了针对 AAV2 的特异性抗体 (Calcedo R 等, 2009)。虽然处于非常低的频率, AAV 衣壳特异性 CD8+ 记忆 T 细胞存在于人中并可在 AAV 转导后被重新激活 (Nayak 和 Herzog, 2010)。针对腺病毒的预存免疫甚至是更普遍的 (Bessis N 等, 2004 ;Nayak 和 Herzog, 2010)。在超过 97% 的人中检测到了针对 C 群腺病毒的预存抗体, 并在约 50% 的人中检测到了通常用于产生腺病毒载体的针对血清型 2 腺病毒的预存抗体 (Nayak 和 Herzog, 2010)。对于 T 细胞介导的免疫, 在人外周血中检测到了针对不同腺病毒血清型的 CD4+ 和 CD8+ 交叉反应性 T 细胞 (Nayak 和 Herzog, 2010)。

[0011] 鉴于可能的不希望发生的排斥反应, 对于在基因治疗中使用人感染性病毒来源的载体, 预存免疫是一个问题。在预存抗病毒免疫不会引起严重病理变化的情况下, 仍能够使病毒载体失活, 从而影响转导效率。在没有预存免疫的患者中, 由于腺病毒是高度免疫原性的, 腺病毒载体会在第一次给药后迅速发挥强的抗病毒免疫性。该反应会阻止载体的进一步使用或使得后续使用的有效性较低。

发明内容

[0012] 已在肿瘤模型中对病毒 (复制型病毒或复制缺陷型重组病毒载体) 进行了膀胱癌治疗的测试。然而, 作为膀胱疗法的人感染性病毒具有显著的缺点, 包括预存免疫和强免疫原性相关的问题。相反地, 发明人发现基于昆虫杆状病毒的载体可为膀胱癌治疗提供合适的载体。

[0013] 因此, 本文所述复发涉及使用杆状病毒治疗膀胱癌, 包括作为辅助治疗以在浅表性肿瘤切除后防止或降低膀胱癌的复发风险。由于目前病毒载体系统的有效性和安全性方面的限制, 杆状病毒载体提供了一种可行的替代方案, 用于作为辅助治疗以诱导免疫或作为载体以递送治疗性核酸。

[0014] 发明人证明, 经膀胱内递送的杆状病毒载体能够有效地转导正常的 (非癌症携带的) 小鼠膀胱。在病毒基因组中整合有哺乳动物表达盒 (包含人巨细胞病毒即时早期基因启动子)、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件以及来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和一部分 U5 序列的杆状病毒载体可提供高水平的体内转导效率。

[0015] 而且, 发明人发现单独的杆状病毒转导 (杆状病毒载体中不包括任何治疗性转基因) 可刺激抗肿瘤免疫。通过使用鼠细胞因子 / 趋化因子抗体阵列以分析收集自接受膀胱内给予不含任何转基因的杆状病毒的小鼠的膀胱组织提取物, 阵列中 59% 的蛋白显示超过 2 倍的表达增加, 包括粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子和皮肤 T 细胞趋化因子的上调。发现使用杆状病毒治疗能够延长具有原位膀胱癌小鼠的存活, 50% 的动物存活了超过 6 个月。

[0016] 通过使用杆状病毒载体以将 CD40 配体基因递送至具有侵略性原位膀胱癌发展的小鼠的膀胱中, 观察到肿瘤的优先转导以及随后肿瘤生长和平均膀胱重量的降低。

[0017] 因此, 直接经膀胱内灌注杆状病毒和杆状病毒基因转移载体能为膀胱癌提供全新的治疗方案。

[0018] 在一个方面, 本发明提供了一种向膀胱细胞递送核酸分子的方法, 包括使膀胱细

胞接触杆状病毒载体。

[0019] 该细胞可以是膀胱癌细胞或健康的非癌膀胱细胞,并且可以是体外或体内细胞,包括在需要膀胱癌治疗的对象中。当该细胞是对象中的细胞时,接触可包括通过膀胱内灌注向该对象给予杆状病毒载体。

[0020] 该杆状病毒载体还包括用于在膀胱癌细胞中表达的转基因,其可操作地连接至驱动该转基因在膀胱细胞中表达的启动子。例如,该转基因可以是用于治疗膀胱癌的治疗性转基因,包括例如编码 CD40L 或 IL-15 的治疗性转基因。

[0021] 在该杆状病毒载体中,启动子可包括人巨细胞病毒立即早期启动子,包括 SEQ ID NO:1 所列序列。

[0022] 杆状病毒载体还可包括来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调控元件,位于转基因的 3' 非翻译区,包括例如 SEQ ID NO:2 所列序列。

[0023] 杆状病毒载体还可包括来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和至少一部分 U5 序列,位于转基因的 5' 非翻译区,包括例如 SEQ ID NO:3 所列序列。

[0024] 该方法还可包括在使膀胱细胞接触杆状病毒载体之前或同时加入转染试剂。所述转染试剂可以是例如聚 L-赖氨酸、Clorpacktion WCS-90、十二烷基-B-dd-麦芽苷 (DDM) 或十二烷基硫酸钠 (SDS) 或其任何组合。

[0025] 为与本文所述方法保持一致,本发明提供了杆状病毒载体的多种用法。

[0026] 因此,在另一个方面,本发明提供了用于治疗需要这类治疗的对象中膀胱癌的杆状病毒载体,其中用法包括在对象内经膀胱内灌注杆状病毒载体。

[0027] 在另一个方面,本发明提供了一种用于在对象的膀胱中经膀胱内灌注的杆状病毒载体。

[0028] 在另一个方面,本发明提供了用于通过经膀胱内灌注杆状病毒载体来治疗需要这类治疗的对象中膀胱癌的杆状病毒载体的用途。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了杆状病毒载体的用途,该杆状病毒载体用于制造通过经膀胱内灌注该杆状病毒载体来治疗需要这类治疗的对象中膀胱癌的药物。

[0030] 在另一个方面,本发明提供了用于在对象的膀胱中经膀胱内灌注的杆状病毒载体的用途。

[0031] 在另一个方面,本发明提供了杆状病毒载体的用法,该杆状病毒载体用于制造用于在对象的膀胱中经膀胱内灌注的药物。

[0032] 本领域技术人员根据本发明下面的具体实施方式的描述以及附图和表将会明白本发明的其它方面和特征。

[0033] 附图简要说明

[0034] 下列显示的附图和表仅仅是以举例方式说明了本发明的实施方式。

[0035] 图 1. 在 balb/c 裸小鼠中经膀胱内灌注后小鼠膀胱的杆状病毒转导。(A). 使用 3 种不同杆状病毒载体转导的代表性动物中荧光素酶报告基因表达的生物发光图像。热图代表转基因表达区域且颜色代表强度。左侧显示了杆状病毒载体表达盒的示意性结构。缩写:CMV:人巨细胞病毒立即早期基因启动子和增强子;WPRE:土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件;RU5:来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和部分 U5 序列。(B). 荧光素酶报告基因表达的时程分析。通过测量生物发光信号对体内基因表达进行定量。数据

以平均值 + 偏差的形式显示, 每组 $n = 3$ 。

[0036] 图 2. 在 C57L/B6 小鼠中经膀胱内灌注后小鼠膀胱的杆状病毒转导。(A) 代表性动物中荧光素酶报告基因表达的生物发光图像。使用杆状病毒载体 BV-RU5-Luc-WPRE 以每只小鼠 10^8 或 10^7 个病毒颗粒的剂量转导小鼠。(B) 荧光素酶报告基因表达的时程分析。通过测量生物发光信号对体内基因表达水平进行定量。数据以平均值 + 偏差的形式显示, 每组 $n = 3$ 。(C) 使用针对荧光素酶蛋白的抗体进行免疫染色以显示膀胱内的杆状病毒转导。在杆状病毒转导后 24 小时收集组织切片。显示了低放大倍数图像和高放大倍数图像。包括苏木精和伊红的染色以显示杆状病毒转导后正常膀胱的结构。

[0037] 图 3. 杆状病毒转导使膀胱内细胞因子 / 趋化因子表达上调。(A) 收集自 C57L/B6 小鼠的样品的代表性印迹图像, 所述小鼠不接受膀胱内灌注 (正常)、分别接受膀胱内 PBS 和 BacPAK6 灌注。在灌注后 48 小时收获膀胱并进行匀浆。上清液用于探测细胞因子 / 趋化因子抗体阵列。(B) 杆状病毒转导后小鼠膀胱内细胞因子和趋化因子的相对上调。使用 RayBio® 分析工具分析密度计量数据。显示了倍数变化 (平均信号强度差异)。数据以平均值 + 偏差的形式显示, 每组 $n = 3$ 。

[0038] 图 4. 杆状病毒转导的抗肿瘤效果。(A) 膀胱内接种小鼠膀胱癌细胞后膀胱中的肿瘤发展。以每只动物 10^5 个癌细胞测试了两种类型的小鼠膀胱癌细胞 MB49 和 MB49S1 (MB49 细胞的亚克隆)。在接种后 14 天收获膀胱。H&E 染色显示与亲本 MB49 细胞接种所形成的肿瘤相比, MB49S1 肿瘤具有缓慢的生长速率。(B) BacPAK6 转导延长了具有膀胱癌的小鼠的存活。在接种 10^5 个 MB49S1 细胞后 7 天进行了 BacPAK6 (一种不具有哺乳动物基因表达盒的杆状病毒载体) 的膀胱内灌注。显示了直至第 95 天的存活曲线。每组 $n = 10$ 。使用对数秩检验进行统计学分析。

[0039] 图 5. 杆状病毒载体调节膀胱癌细胞中的 CD40L 表达。膀胱癌模型中杆状病毒载体的转导效率。(A) 杆状病毒能够在体外和体内转导膀胱癌细胞。使用杆状病毒载体 BV-RU5-Luc-WPRE 以转导小鼠 MB49 膀胱癌细胞、人 T24 膀胱癌细胞和通过接种 MB49 细胞形成的小鼠原位膀胱肿瘤。通过使用针对荧光素酶蛋白的抗体进行的免疫染色显示杆状病毒转导后 24 小时收集的细胞和组织切片中荧光素酶报告基因表达。H&E 染色显示了膀胱肿瘤生长。(B) CD40L 的杆状病毒载体表达盒的示意性结构。(C) RT-PCR 显示体外 BV-CD40L 转导后 24 小时 MB49 细胞中的 CD40L 表达。(D) 通过 Western 印迹显示的小鼠 MB49 膀胱肿瘤中的 CD40L 表达。在接种 10^5 个 MB49 细胞后 3 天进行 BV-CD40L 的膀胱内灌注。在 BV-CD40L 转导后 24 小时收集膀胱。

[0040] 图 6. 杆状病毒介导的 CD40L 表达的抗肿瘤效果。在接种 2×10^4 个 DiR 标记的 MB49 细胞后 3 天进行 BV-CD40L 的膀胱内灌注。包括膀胱内灌注 BacPAK6 以作为转导对照。在杆状病毒转导后 1 周收集膀胱用于分析。(A) CD40L 表达延缓肿瘤生长。DiR 荧光图像显示各动物中最初的肿瘤负担, H&E 染色显示肿瘤发展。(B) 膀胱重量差异。数据以平均值 + 偏差的形式显示, 每组 $n = 5$ 。* 通过斯氏 t 检验相对 BacPAK6 组 $p < 0.05$ 。

[0041] 图 7. 共同递送 CD40L 和 IL-15 对于具有膀胱癌小鼠存活的影响。(A) 通过杆状病毒载体共同递送 CD40L 和 IL-15 延长了具有膀胱癌小鼠的存活。在接种 10^5 个 MB49 细胞后 2 天进行杆状病毒载体的膀胱内灌注。显示了直至第 100 天的存活曲线。(B) H&E 染色显示使用表达 CD40L 和 IL-15 的杆状病毒载体治疗的一只小鼠中 MB49 肿瘤完全停止了。

[0042] 发明详述

[0043] 本文所述方法和用法涉及杆状病毒载体可用于膀胱癌治疗的发现,包括在已患有膀胱癌的对象中降低或防止癌症复发。杆状病毒载体可不含任何转基因插入,用于刺激抗肿瘤免疫应答。可在杆状病毒载体中包括治疗性核酸以加强或补充抗肿瘤应答。在某些条件下,包括在膀胱内递送的情况下,杆状病毒载体可优先转导膀胱肿瘤细胞而不转导健康的非癌膀胱细胞。

[0044] 因此,提供了一种使用杆状病毒载体将核酸分子递送至膀胱细胞的方法。所述方法包括使膀胱细胞接触杆状病毒载体,导致膀胱细胞被杆状病毒载体转导。

[0045] 应理解,通过病毒或病毒载体进行细胞转导指将病毒载体或病毒基因组递送至细胞内,即由病毒核酸材料感染细胞。在由杆状病毒载体进行哺乳动物细胞转导的情况下,转导并不指产物感染或病毒基因组在细胞内复制的能力。

[0046] 进行接触的膀胱细胞可以是任何膀胱细胞。所述膀胱细胞可以是体外膀胱细胞,包括组织培养物中的细胞,如来自已建立的膀胱细胞系的细胞、组织培养物中的原代膀胱细胞、来自对象的外植的膀胱细胞、转化或永生化的膀胱细胞。所述膀胱细胞可以是对象中的体内膀胱细胞,包括哺乳动物对象中,包括人对象。例如,所述膀胱细胞可以是在需要膀胱癌治疗的对象中。所述膀胱细胞可以是转基因膀胱细胞,包括体外或体内环境中,包括例如包含转基因膀胱细胞的动物模型。

[0047] 所述膀胱细胞可以是健康的,即非癌膀胱细胞,或者其可以是膀胱癌细胞,包括肿瘤中或从肿瘤上切下的膀胱癌细胞,或者其可以是倾向于成为癌细胞的膀胱细胞,包括例如携带倾向于使膀胱细胞成为癌细胞的突变的膀胱细胞。

[0048] 与膀胱细胞接触的杆状病毒载体可以是任何杆状病毒载体。杆状病毒载体是本领域已知的,且最常使用的杆状病毒载体来源于苜蓿银纹夜蛾多重核型多角体病毒(*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*) (AcMNPV)。杆状病毒是一种昆虫 DNA 病毒,其具有进入哺乳动物细胞的能力但不复制或对所转导细胞产生毒性。杆状病毒在增殖的和非增殖的、静息的细胞中都具有广泛的趋向性,在哺乳动物活性启动子的支持下能够在体外和体内有效地将感兴趣的基因转移至多种哺乳动物细胞类型中。该病毒可进入哺乳动物细胞但不能通过昆虫特异性启动子表达其自身基因;因此,杆状病毒无法复制并在脊椎动物细胞中表达病毒蛋白,因此不会引起作为病毒编码基因体内表达结果的免疫应答、不会与预存的病毒材料重新结合,也不会协助人体中其他病毒的复制。哺乳动物细胞中杆状病毒的感染引起不可见的细胞病变效应,甚至在高 MOI 时也是如此(Shoji 等, 1997)。

[0049] 使用杆状病毒 AcMNPV 例如作为基因递送载体的另一个吸引人的优势是其 130kb 病毒基因组赋予的大克隆容量,优选用于从单个载体递送大的功能基因或多个基因。在人细胞中,携带哺乳动物表达盒的杆状病毒载体能够有效地调节瞬时表达,因为转基因载体通常不会整合至所转导细胞的基因组中。因此,理想情况下,杆状病毒载体适用于需要短期、高水平转基因表达的应用并具有低的插入突变风险。

[0050] 杆状病毒转导的另一个重要优势是人体中不存在针对昆虫表达的预存免疫(Wang S 等, 2010),因为该表达并不对人传染。Strauss 等报道了人血清样品中针对 5 型腺病毒的中和抗体的普遍程度为 65%,而无一血清样品对杆状病毒中和抗体呈阳性(Strauss R 等,

2007)。在同一研究中,在人体中可检测到预存的腺病毒特异性 T 细胞,但没有预存的杆状病毒特异性 T 细胞。与腺病毒相比,杆状病毒具有较低的免疫原性,这可以由较少数目的病毒特异性 T 细胞得到诱导证明 (Strauss R 等,2007)。

[0051] 而且,与许多其他基因治疗病毒载体不同,杆状病毒载体可在无血清细胞培养基中产生,这就消除了来自贡献血清的动物的病毒和朊病毒物质所造成的潜在血清污染危险。

[0052] 不含任何转基因,杆状病毒自身可以是待递送至膀胱细胞的核酸。即,递送可导致细胞被杆状病毒载体核酸物质转导或将其吸收。

[0053] 在其他实施方式中,杆状病毒载体可包括编码将在膀胱细胞中表达的表达产物的转基因编码序列。应理解,编码表达产物的转基因编码序列将可操作地连接至所有必需的调控序列,包括启动子区域,以在膀胱细胞中产生所需的表达产物的表达概况。当序列以功能关系设置时,第一核酸序列可操作地连接至第二核酸序列。例如,编码序列可操作地连接至启动子,前提是所述启动子激活并驱动该编码序列的转录。因此,与膀胱细胞接触的杆状病毒载体还可包括用于在膀胱细胞中表达的转基因,其可操作地连接至驱动该转基因在膀胱细胞中表达的启动子。

[0054] 在一些实施方式中,可操作地连接至转基因编码序列的启动子包括人巨细胞病毒立即早期启动子。在一些实施方式中,该启动子包括具有 SEQ ID NO:1 所列序列的人巨细胞病毒立即早期启动子。

[0055] TTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA CGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTG TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGAC CTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGT ACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTG TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCG GTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC[SEQ ID NO:1]

[0056] 在一些实施方式中,杆状病毒载体包括基本由具有 SEQ ID NO:1 所列序列的人巨细胞病毒立即早期启动子组成的启动子。在一些实施方式中,所述启动子由具有 SEQ ID NO:1 所列序列的人巨细胞病毒立即早期启动子组成。

[0057] 本文中使用的“基本由……组成”指该核酸序列包括一个或多个核苷酸碱基,包括在序列内或序列的一个或两个末端处,但额外的核苷酸碱基不会实质影响核苷酸序列的功能,例如在膀胱细胞中作为启动子以驱动可操作连接的编码序列表达。

[0058] 在其他实施方式中,所述启动子是 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 序列相同性,同时仍保留驱动膀胱细胞中基因表达能力的人巨细胞病毒立即早期启动子。

[0059] 所述杆状病毒载体还可包括转录后调节元件,包括例如来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调控元件,位于转基因的 3' 非翻译区。在一些实施方式中,所述杆状病毒载体包括包含 SEQ ID NO:2 所列序列的来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调控元件。

[0060] CGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTT

TACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCT
TGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTG
TTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTTTCGCTTCCCCCT
CCCTATTGCCACGGCGGAACATCATCGCCGCCCTGCCCTGCCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACA
ATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGG
ACGTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCC
TCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTG[SEQ ID NO:2]

[0061] 在一些实施方式中,杆状病毒载体包括基本由 SEQ ID NO:2 所列序列组成的来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调控元件。在一些实施方式中,杆状病毒载体包括由 SEQ ID NO:2 所列序列组成的来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调控元件。

[0062] 在其他实施方式中,在一些实施方式中,杆状病毒载体包括与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 序列相同性,同时仍保留指导膀胱细胞中基因表达能力的来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调控元件。

[0063] 杆状病毒载体还可在转基因的 5' 非翻译区包括来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和至少一部分 U5 序列,包括例如其中来自包含 SEQ ID NO:3 所列序列的 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和至少一部分 U5 序列。

[0064] GGCTCGCATCTCTCCTTACGCGCCCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGC
GTTCTGCCGCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAAGTGCCTCCGCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGA
CCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGC
TCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTAC[SEQ ID
NO:3]

[0065] 在一些实施方式中,杆状病毒载体包含基本由 SEQ ID NO:3 所列序列组成的来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和至少一部分 U5 序列的上游 5' 调控区。在一些实施方式中,所述杆状病毒载体包含由 SEQ ID NO:3 所列序列组成的来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和至少一部分 U5 序列的上游 5' 调控区。

[0066] 在其他实施方式中,在一些实施方式中,杆状病毒载体包括与 SEQ ID NO:3 具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 序列相同性,同时仍保留指导膀胱细胞中基因表达能力的来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调控元件。

[0067] 可使用本领域技术人员已知的标准技术(如 PCR 和分子克隆技术)对杆状病毒载体进行修饰。例如可使用市售可得的克隆和表达系统,如 BAC-TO-BAC™ 杆状病毒表达系统(吉布可 BRL 公司(Gibco BRL),生命技术公司(Life Technologies),美国),容易地对杆状病毒进行修饰。

[0068] 除调控区外,所述杆状病毒还可包括转基因编码序列。术语转基因指对杆状病毒而言是外源的基因,满足例如,由杆状病毒载体表达转基因指表达对杆状病毒基因组而言是外源的基因。转基因编码序列可编码需要在膀胱细胞中表达的任何表达产物。例如,转基因可编码治疗性蛋白或 RNA、选择性蛋白或 RNA 标记物、可检测的报告蛋白或 RNA 或者为膀胱细胞对选择性环境调节提供抗性的 RNA 或蛋白。转基因还可编码调控 RNA,例如调控膀胱细胞中基因表达的 miRNA。

[0069] 例如,转基因可编码用于治疗膀胱癌的治疗性表达产物。因此转基因可以是治疗

性转基因,包括具有临床用途的任何基因,如编码涉及癌症预防或治疗的基因产物(如 RNA 或蛋白)的基因,或者涉及癌症预防或治疗的具有细胞调节作用的基因。该基因产物可取代对象中缺陷或缺失的基因产物、蛋白或细胞调节作用,从而实现膀胱癌的预防或治疗。

[0070] 因此,治疗性表达产物包括在膀胱细胞中表达时对细胞具有治疗作用或在膀胱细胞中产生所需结果的蛋白或肽。

[0071] 治疗性表达产物可以是 RNA 分子,例如反义 RNA、miRNA 或小干扰 RNA(siRNA) 分子,其导致膀胱细胞中的基因表达调控,提供临床上有用的调节。这些反义 RNA、miRNA 或 siRNA 可涉及下调或抑制或降低涉及肿瘤发生或肿瘤生长的基因的表达。

[0072] 例如但不限于,治疗性转基因可编码 CD40L 或 IL-15 蛋白。在一个实施例中,编码 CD40L 和 IL-15 的治疗性转基因可在同一对象中联合使用以达到治疗效果。CD40L 和 IL-15 转基因可同时包括在同一杆状病毒载体中,或可包括在不同杆状病毒载体中并随后递送至同一对象。

[0073] 为将核酸分子递送至膀胱细胞,使膀胱细胞与杆状病毒载体接触。接触可包括例如将杆状病毒载体加入含有膀胱细胞的组织培养基中,使得杆状病毒载体转导膀胱细胞。接触可包括将杆状病毒载体给予对象。

[0074] 因此,核酸分子将要递送至的膀胱细胞可以是在需要治疗或预防膀胱癌的对象体内,包括哺乳动物,包括人。

[0075] 因此,该方法可在体内膀胱细胞是癌细胞、是肿瘤的一部分、倾向于成为癌细胞或待预防使之不会变成癌细胞的情况下进行。

[0076] 因此,使膀胱细胞接触杆状病毒载体包括向对象给予有效量的杆状病毒载体。本文所用术语“有效量”指有效地实现所需结果必需的剂量和持续的时间的量,例如为治疗或预防膀胱癌,包括预防或降低之前已患有膀胱癌(包括浅表性膀胱癌,包括 TCC)的患者中膀胱癌的复发风险。

[0077] 相对于膀胱癌,本文所用“治疗”指用于获得有益或所需结果(包括临床结果)的方法。有益或所需的临床结果可包括但不限于一种或多种症状或病症的改善或缓和、疾病程度的减弱、疾病状态的稳定、疾病发展的预防、疾病扩散的预防、疾病复发的预防、疾病进展或复发的延迟或延缓、疾病发生的延迟或延缓、疾病状态的缓和或减轻,以及缓解(部分或全部)。“治疗”还可表示将对象的存活期延长至超过不进行治疗的情况下所能预期的存活期。“治疗”还可指抑制疾病的进展或复发、暂时性延缓疾病的进展或复发,但更优选地,其涉及永久性阻止疾病的进展或复发。

[0078] 已提出将来源于昆虫杆状病毒苜蓿银纹夜蛾多重核型多角体病毒(AcMNPV)的重组载体作为用于基因治疗(包括用于癌症基因治疗)的载体(Hofmann C等,1995;Kost TA等,2005;Hu YC,2008,2010;Wang S等,2010)。Takaku 等通过杆状病毒激活 NK 细胞依赖的抗肿瘤免疫(Kitajima M等,2008a)。杆状病毒诱导的抗肿瘤作用可涉及通过增强肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)应答和肿瘤特异性抗体生成实现的获得性免疫(Kitajima M等,2008b;Suzuki T等,2010)。因此,杆状病毒的免疫刺激特性可用于所述方法以进行癌症免疫治疗。

[0079] 可使用本领域已知的标准技术将杆状病毒载体给予对象。该杆状病毒载体可系统性给予,或可通过膀胱内灌注给予至膀胱。

[0080] 应理解,膀胱是一种空心器官,允许非外科手术的膀胱内给药通过尿道导管并通过内窥镜的方法评估疗效。利用经膀胱内递送的治疗剂在局部起作用,系统性暴露有限,且浅表性膀胱癌易于接近。

[0081] 通过哺乳动物细胞的体内杆状病毒转导,系统性递送的杆状病毒载体的失活可导致病毒被血清补体蛋白(先天免疫系统的主要组分)识别的后果(Hofmann C等,1998)。在免疫活性动物中,系统性递送的杆状病毒载体可能无法表达。杆状病毒的高效价已被用于克服补体中和病毒的能力;然而,该方法仍无法导致杆状病毒介导的转基因表达(Kitajima M等,2008a)。因此,可通过尿道在膀胱内插入导管进行膀胱癌治疗以避免系统性病毒给予的许多缺陷,如血清补体使病毒失活。

[0082] 如本文所述方法所示,经膀胱内给予的杆状病毒可显示出强的免疫刺激能力以诱导炎症细胞因子的表达或促进其释放。该发现与先前的研究一致,先前的研究发现注射进动物体后杆状病毒可引起保护性先天免疫应答。杆状病毒还可诱导适应性免疫,其特征是特异性针对病毒基因产物的免疫应答(Pieroni 等,2001;Abe 等,2005)。

[0083] 不受理论的限制,可治疗性利用上述免疫刺激作用以抑制肿瘤生长。该假说得到了以下观察的支持,即经膀胱内递送不表达任何转基因的杆状病毒能够延长具有已建立的原位膀胱癌的免疫活性小鼠的存活。该同源模型系统提供了完整的免疫功能,允许进行针对膀胱癌的基于治疗性杆状病毒的治疗的研究。

[0084] 为提高杆状病毒载体经膀胱内灌注后膀胱细胞的摄取效率,所述方法还包括使用转染试剂。例如,在使杆状病毒载体经由膀胱内灌注接触膀胱细胞前,可首先使用转染试剂处理评估一段给定时间。

[0085] 转染试剂是本领域已知的;例如,所述转染试剂可以是聚 L- 赖氨酸、Clorpackion WCS-90、十二烷基-B-dd- 麦芽苷(DDM)或十二烷基硫酸钠(SDS)或其任何组合。

[0086] 然而,我们观察到,在不使用转染试剂对膀胱细胞进行任意预处理的情况下使用所述方法会改变健康(非癌)膀胱细胞相比膀胱癌细胞对杆状病毒载体的摄取。因此,在一些实施方式中,所述方法省去了转染试剂的任意使用,从而与健康膀胱细胞相比优先靶向膀胱癌细胞。

[0087] 待给予杆状病毒载体的浓度和量可以变化,取决于待治疗的膀胱癌、杆状病毒载体中所包括转基因的类型、给药模式、其他同时进行治疗以及对象的年龄和健康程度。通过改变膀胱内灌注的频率,可以提高存活和癌症预防或治疗。

[0088] 如上文所述,可通过在杆状病毒载体中包括治疗性转基因以提高杆状病毒载体的效率。

[0089] 为帮助给药,杆状病毒载体可配制为药物组合物的成分。

[0090] 因此,还提供了包含上述杆状病毒载体和可选的药学上可接受的稀释剂的药物组合物。这类药物组合物可用于治疗膀胱癌,如上文所述。

[0091] 组合物可以常规地包含药学上可接受浓度的盐、缓冲试剂、防腐剂和各种相容性载体。对于所有递送形式,杆状病毒载体都在生理盐水溶液中配制。

[0092] 药学上可接受稀释剂的比例和特性可由选定的给药途径、与肝细胞和肝病毒颗粒的相容性和标准药学实践所决定。通常,药物组合物可使用不会杀伤或显著损伤杆状病毒载体的生物学特性的组分配制。

[0093] 可通过适于向对象给药的药学上可接受的组合物制备的已知方法制备该药物组合物,使得有效量的杆状病毒载体和任何其他活性物质混合于具有药学上可接受的载剂的混合物中。例如,在 Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》,麦克出版公司,美国宾夕法尼亚州伊斯顿,1985)中描述了合适的载剂。基于此,药物组合物可包括但不限于杆状病毒载体溶液,连同一种或多种药学上可接受的载剂或稀释剂,并包含于具有合适 pH 和使用生理流体等渗的缓冲溶液中。

[0094] 药物组合物需使用的剂量取决于待治疗的具体病症、病症的严重程度、对象个体参数(包括年龄、身体状况、尺寸和重量)、治疗的持续时间,(若有的话)同时治疗的特性、具体的给药途径和卫生专业人员知识和技能范围内的其它类似因素。这些因素是本领域技术人员已知的,并可用最少的常规实验解决。

[0095] 还涉及了所述杆状病毒载体的多种用法。因此,提供了用于在需要膀胱癌治疗的对象中进行膀胱内灌注的杆状病毒载体,杆状病毒载体在通过膀胱内灌注杆状病毒载体治疗需要这类治疗的对象中的膀胱癌中的用途,杆状病毒载体在制造用于通过膀胱内灌注杆状病毒载体治疗需要这类治疗的对象中的膀胱癌的药物中的用途,杆状病毒载体在需要膀胱癌治疗的对象中进行膀胱内灌注中的用途,以及杆状病毒载体在制造用于在需要膀胱癌治疗的对象中进行膀胱内灌注的药物中的用途。

[0096] 本发明的方法和用途用以下非限制性实施例进一步举例说明。

实施例

[0097] 实施例 1

[0098] 研究了用于膀胱癌治疗的基于昆虫杆状病毒的载体的用途。首先显示了经膀胱内递送的杆状病毒载体可有效地转导正常小鼠膀胱。在测试的 3 种不同杆状病毒载体中,通过在病毒基因组中整合有哺乳动物表达盒(包含人巨细胞病毒即时早期基因启动子、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件以及来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和一部分 U5 序列构建)的新的重组杆状病毒载体提供了最高的体内转导效率。随后研究了单独的病毒转导是否能够刺激抗肿瘤免疫。通过使用鼠细胞因子/趋化因子抗体阵列以分析收集自接受膀胱内给予不含任何转基因的杆状病毒的小鼠的膀胱组织提取物,阵列中 59% 的蛋白(32 个中的 19 个)显示超过 2 倍的表达增加,其中粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子和皮肤 T 细胞淋巴瘤趋化因子是上调最大的三个蛋白。更重要地,治疗显著延长了具有原位膀胱癌小鼠的存活,50% 的动物存活了超过 6 个月。使用杆状病毒载体以将 CD40 配体基因经膀胱内递送至具有侵略性原位膀胱癌发展的小鼠的膀胱中时,检测到肿瘤的优先转导以及随后肿瘤生长和平均膀胱重量的降低。

[0099] 材料与方法

[0100] 杆状病毒制备:根据生产商的说明手册,使用 BAC-to-BAC™杆状病毒表达系统(英杰公司(Invitrogen))构建重组杆状病毒载体 CMV-Luc、CMV-Luc-WPRE 和 CMV-RU5-Luc-WPRE。CMV-Luc 包含在人巨细胞病毒(CMV)早期启动子控制下的荧光素酶基因。CMV-Luc-WPRE 在 3' 非翻译区(UTR)处具有额外的土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。CMV-RU5-Luc-WPRE 在 5' UTR 处具有另一个调控元件 RU5,来自 1 型人 T 细胞白血病病毒的长末端重复的 R 片段和部分 U5 序列。使用相应的杆状病毒质粒(bacmid)通过

Sf9 昆虫细胞的转染生产这些表达荧光素酶的病毒。在用包含表达盒和线性化 AcMNPV 病毒 DNA (克隆泰克公司 (Clontech)) 的 pBacPAK9 转移载体共转染 Sf9 昆虫细胞后,通过同源重组生产 BV-CD40L (CD40 配体) 病毒,该病毒含有 CMV 启动子 (在 5' UTR 处具有 RU5 且在 3' UTR 处具有 WPRE) 控制下的小鼠 CD40L 基因 (英杰公司)。BV-IL-15 (白介素 15) 病毒的构建方法与 BV-CD40L 类似,但使用小鼠 IL15 基因。具有受病毒多角体蛋白启动子驱动的 lacZ 基因的亲本病毒 BacPAK6 获自克隆泰克公司。以 0.1 的 MOI 在 Sf9 细胞中扩增重组杆状病毒并在病毒感染后 3 天收集含病毒的上清液。病毒以 28,000g 沉淀 1 小时并重悬于 PBS 中。

[0101] 细胞系和体外杆状病毒转导 :Sf9 昆虫细胞 (英杰公司) 维持在 sf-900III 无血清培养基 (英杰公司) 中。鼠膀胱癌细胞系 MB49 来自 Esuvaranathan 博士 (国立大学医院,新加坡) 的馈赠,并且人膀胱癌细胞系 T24 购自 ATCC。细胞系在 37°C 和 5% CO₂ 下维持在补充有 10% 胎牛血清 (犹他州洛根的海克隆公司 (Hyclone))、2mM L-谷氨酰胺、1% 青霉素和链霉素 (西格玛公司 (Sigma)) 的 RPMI 1640 中。为获得具有变化的生长行为的克隆 MB49 变体以促进我们对于膀胱癌生长的分子机制的理解,使用 pRC2/CMV-Luc (一种质粒,具有 CMV 启动子驱动的荧光素酶基因和 SV40 启动子控制下的新霉素抗性基因) 转染野生型 MB49 细胞。转染的细胞使用 G418 在 700 μ g/ml 的浓度下选择,持续 2 周。在当前的研究中还使用了在小鼠膀胱中具有高肿瘤建立率和较低生长速率的亚克隆 MB49S1。对于体外杆状病毒转导实验,将肿瘤细胞与杆状病毒载体以 100 的 MOI 在 37°C 下孵育过夜。转基因表达水平在转导后 24 小时测量。

[0102] 动物、动物模型和体内杆状病毒转导 :使用了成年雌性 C57BL/6 小鼠和成年雌性 balb/c 裸小鼠 (重 20g, 5-6 周龄)。通过在 C57BL/6 小鼠中经膀胱内灌注同源 MB49 细胞,在膀胱的内腔表面上产生原位膀胱肿瘤。肿瘤接种前,使用亲脂性、近红外荧光染料 DiR (20ng/ml 过夜,卡钳生命科学公司 (Caliper Life Sciences)) 对 MB49 细胞进行预标记以促进成瘤率的体内监控。将 24 号导管 (BD 医疗 (BD Medical)) 通过用于膀胱内灌注的尿道导入麻醉的雌性小鼠膀胱内。挤出残留的尿液后,将 100 μ l 的 10 μ g/ml 聚 L-赖氨酸 (PLL, 分子量 70,000-150,000, 西格玛公司) 注入膀胱。在挤出前使 PLL 溶液在膀胱内停留 30 分钟。随后使用 100 μ l 的 PBS 清洗膀胱。预处理后,灌注含 100 μ l MB49S1 或 MB49 膀胱癌细胞的 PBS 并在膀胱中停留 1 小时。在大多数实验中使用每只动物 1×10^5 个癌细胞的剂量,CD40L 和 / 或 IL-15 治疗研究除外,其中使用了每只动物 2×10^4 个细胞的低剂量。此后,移开导管并通过自发排泄使膀胱排空。在膀胱内灌注后 24 小时使用与 CCD 相机和 ICG 滤光器偶联的 IVIS 100 体内成像系统 (卡钳生命科学公司 (Caliper Life Sciences)) 测量成瘤率。使用 Xenogen 活体成像软件 v2.5 获取并分析图像和荧光信号。选择成功植入 MB49 细胞和具有类似肿瘤负担的动物并在后续实验中使用。对于膀胱内的体内杆状病毒转导,对小鼠进行麻醉和插管。在 30 分钟的聚 L-赖氨酸处理后灌注含杆状病毒载体的 PBS (100 μ l 中 1×10^8 pfu 病毒颗粒) 并停留 1 小时。

[0103] 为评估膀胱中的体内转导效率,使用具有荧光素酶报告基因的杆状病毒载体转导具有或没有原位肿瘤植入的小鼠并在腹膜内注射 150mg/kg 荧光素 (普洛麦格公司 (Promega)) 后 15 分钟将其置于仰卧位使用与冷却 CCD 相机和 560nm 激发滤光器偶联的 IVIS 100 成像系统 (卡钳生命科学公司 (Caliper Life Sciences)) 成像。使用 Xenogen

活体成像软件 v2.5 获取和分析图像和发光信号并以每秒光子的形式进行定量。

[0104] 为评估疗效,在原位肿瘤植入后 7 天进行膀胱的体内杆状病毒转导。将小鼠随机分配至对照或治疗组。对小鼠进行再次麻醉和再次插管后,灌注 BacPAK6 或 BV-CD40L 或 BV-IL-15 病毒。将动物在 7 天后处死用于组织学分析或者观察 6 个月以观察膀胱癌的迹象和症状(血尿和体重损失)以及活力状态。

[0105] 对动物的所有处理和护理都根据新加坡国家实验动物研究咨询委员会(National Advisory Committee for Laboratory Animal Research, Singapore)提出的《用于科学目的的动物护理和使用指南》(Guidelines on the Care and Use of Animals for Scientific Purposes)进行。

[0106] 组织学分析和免疫染色:对于组织学检查,收获膀胱并在 4% PFA 中固定过夜,将其悬浮于 30%蔗糖中并包埋在组织冷冻介质中。制备 10 μ m 的低温切片并使用苏木精和伊红(H&E)染色。对于免疫染色,使用 Tris 缓冲的盐水吐温-20(TBST)清洗组织切片 2 次并使其在 0.025%曲通 X-100 中孵育 10 分钟。随后将组织切片在 5% BSA 中孵育 1 小时以封闭非特异性结合。使用兔多克隆抗荧光素酶抗体(阿柏堪穆公司(Abcam),1:100)4℃过夜。使用 TBST 清洗 3 次后,将载玻片与二抗(FITC 偶联的山羊抗兔 IgG(1:200))在室温下孵育 1 小时。

[0107] 细胞因子/趋化因子表达:经膀胱内灌注 PBS 或 BacPAK6 后 48 小时处死小鼠。收获膀胱并称重。以 50mg 组织/ml 的量加入含有蛋白酶抑制剂混合物(卡巴开公司(Calbiochem),默克公司(Merck),德国达姆施塔特)的组织裂解缓冲液(富酶泰斯公司(Fermentas),美国马里兰州)并通过超声对膀胱进行匀浆。随后对膀胱匀浆物在 4℃下 16,000x g 离心 30 分钟并收集上清液。通过伯乐蛋白试验方法(伯乐公司(Biorad),美国加利福尼亚州)测量上清液的蛋白浓度。将含 80 μ g 总蛋白浓度的上清液等分试样加载在小鼠细胞因子阵列 2.1(瑞博奥公司(Raybiotech),佐治亚州诺克斯)上以根据生产商的说明书测量细胞因子和趋化因子的表达水平。使用 RayBio™分析工具(瑞博奥公司)将平均信号强度和细胞因子的相对表达水平进行关联。

[0108] 结果

[0109] 经膀胱内灌注后杆状病毒载体有效地转导小鼠膀胱:首先评估杆状病毒是否能够在免疫缺陷的裸小鼠中转导膀胱。在经膀胱内灌注至膀胱后,对三种不同的含萤火虫荧光素酶基因的重组杆状病毒载体进行了测试,并使用 IVIS 活体动物成像系统监控了体内转导效率(图 1A)。所有三种载体都能够在使用聚 L-赖氨酸预处理器官后有效地转导小鼠膀胱。含有两种病毒转录调控元件 WPRE 和 RU5 的其中一种杆状病毒载体 BV-RU5-Luc-WPRE 提供了膀胱中最高的转基因表达水平。虽然随时间降低,但三种载体提供的表达水平在至少 35 天中维持显著高于背景水平(图 1B)。

[0110] 在免疫活性 C57BL/6 小鼠中(图 2A、2B),虽然 BV-RU5-Luc-WPRE 提供的初始表达水平与免疫缺陷的裸小鼠中观察到的类似,但该水平迅速下降且可检测的转基因表达仅持续约 2 周。两种小鼠类型之间转基因表达的差异显示针对杆状病毒转导的强免疫应答。膀胱中杆状病毒介导的转基因表达是剂量依赖的,证据是使用每只小鼠 10^7 个病毒颗粒治疗的 C57BL/6 小鼠中 1 天时的荧光素酶表达水平为使用每只小鼠 10^8 个病毒颗粒治疗时的约 1/4(图 2A、2B)。使用针对荧光素酶蛋白的抗体的免疫组织学染色确认了杆状病毒介导的

转基因表达限于浅表的膀胱上皮（图 2C）。

[0111] 单独的杆状病毒转导能够延缓膀胱肿瘤生长：研究了免疫活性 C57BL/6 小鼠中杆状病毒转导后器官内细胞因子和趋化因子的表达。BacPAK6 是一种不含哺乳动物基因表达盒的杆状病毒载体，用于该目的以避免可能的转基因表达干扰。使用抗体阵列法，与接受 PBS 灌注的膀胱中的表达水平相比，在两天前接受了膀胱内灌注 BacPAK6 的膀胱中，鼠阵列中检测到了 59%（32 个中的 19 个）细胞因子和趋化因子的上调（定义为大于 2 倍的表达增加）（图 3A、B）。上调最多的 5 种蛋白是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF，升高 123 倍）、粒细胞集落刺激因子（G-CSF，升高 35 倍）、皮肤 T 细胞趋化因子（CTACK，升高 10 倍）、血小板生成素（TPO，升高 7 倍）和肿瘤坏死因子 α （TNF α ，升高 7 倍）。不进行任何治疗的正常小鼠膀胱和接受 PBS 灌注的膀胱之间的比较显示，细胞因子和趋化因子的表达水平没有显著性差异。

[0112] 随后研究了杆状病毒转导后细胞因子和趋化因子的表达水平变化是否会影响膀胱肿瘤生长。在建立同源原位小鼠膀胱癌模型以研究效果的过程中，注意到甚至在低接种剂量（每只动物 1×10^5 个癌细胞）下，MB49 细胞在 2 周内快速生长以占据泌尿膀胱的整个内腔（图 4A）。由于侵略性肿瘤生长，小鼠也快速死亡，其中第一只小鼠在 10 至 14 天死亡且所有小鼠在约 4 周内死亡（Günther JH 等，1991）。MB49 细胞的这些特性使进行精确膀胱内灌注和测试靶向已建立膀胱肿瘤的实验治疗剂（尤其是免疫治疗剂）变得困难。MB49S1 细胞是 MB49 小鼠膀胱癌细胞系的亚克隆，显示较慢的生长速率但保持高肿瘤建立率（图 4A），其因此用于在 C57BL/6 小鼠中通过经膀胱内将细胞灌注至聚 L- 赖氨酸预处理的膀胱中以建立膀胱癌模型。

[0113] 接种 1×10^5 个 MB49S1 细胞后一周，将具有已建立肿瘤的 C57BL/6 小鼠随机分为两组（每组 $n = 10$ ）。一组接受 10^8 个 BacPak6 病毒颗粒的单次灌注而另一组接受 PBS 作为灌注对照。膀胱中杆状病毒刺激后观察到具有膀胱肿瘤小鼠的存活显著延长。对照组中的全部动物在 70 天内死亡，而治疗组中 50% 的动物在肿瘤接种后 6 个月仍存活（图 4B，对数秩检验中 $p < 0.01$ ）。该发现显示，膀胱中杆状病毒转导后细胞因子和趋化因子的上调在介导抗肿瘤效果方面是有功能的且可发挥作用以治愈已建立的膀胱肿瘤。

[0114] 杆状病毒载体可介导至膀胱癌细胞的高效基因转移和针对膀胱癌的 CD40L 基因治疗：为评估杆状病毒载体是否可用于将转基因递送至膀胱癌，将培养的小鼠 MB49 膀胱癌细胞和人 T24 膀胱癌细胞与 BV-RU5-Luc-WPRE 一起进行体外转导。使用针对荧光素酶蛋白的抗体进行的免疫染色确认了这些肿瘤细胞中高水平的荧光素酶表达（图 5A）。在具有原位 MB49 肿瘤的 C57BL/6 小鼠中，膀胱内灌注 BV-RU5-Luc-WPRE 导致肿瘤以及正常膀胱上皮中明显的转基因表达（图 5）。在肿瘤中，阳性染色不仅在肿瘤表层而且在内部肿瘤区域中都能观察到，显示肿瘤中病毒的渗透。

[0115] 透过使用鼠 CD40 配体（CD40L）基因（一种编码 II 型跨膜蛋白的基因，所述蛋白的功能为有效的 T 辅助 1 免疫刺激物）代替 BV-RU5-Luc-WPRE 表达盒中的荧光素酶基因，构建了杆状病毒载体 BV-CD40L。在 MB49 细胞中体外杆状病毒转导和原位 MB49 肿瘤中体内杆状病毒转导后分别使用 RT-PCR（图 5C）和 Western 印迹（图 5D）确定 CD40L 的表达。

[0116] 为检测 BV-CD40L 的治疗效果，通过将 2×10^4 个 DiR 标记的 MB49 细胞接种至 C57BL/6 小鼠的膀胱内来建立膀胱肿瘤模型。使用 IVIS 活体动物成像系统监控 DiR 红外荧

光信号以确认成功的肿瘤建立（图 6A）。在肿瘤接种后第 4 天，将小鼠随机分为两组（每组 $n = 5$ ）并以每只小鼠 10^8 个 BV-CD40L 病毒颗粒或作为对照的 10^8 个 BacPAK6 病毒颗粒的剂量经膀胱内灌注进行治疗。在治疗接种后第 6 天和第 8 天进行两组中的第 2 和第 3 次治疗。在第 14 天处死小鼠并通过检测 H&E 染色的膀胱组织切片以评估膀胱中的肿瘤发展阶段（图 6A）。在对照组中，肿瘤发展至晚期，5 只动物中的 4 只（#1、2、4、5）具有严重的肿瘤坏死且肿瘤侵袭至肌肉层中。这些小鼠中膀胱上皮完全损伤且变得混乱。在治疗组中，肿瘤块相对较小且上皮中没有显著损伤。一些肿瘤（#1 和 3）还是浅表性的，而其他（#2、4 和 5）从小鼠膀胱内腔上排列的细胞层生长至下方的结缔组织中，但尚未进入肌肉层。该组的平均膀胱重量在统计学上显著低于治疗组（ $p < 0.05$ ，图 6B）。这些发现显示杆状病毒可能能够用作体内基因治疗载体递送治疗性基因以治疗侵略性生长的膀胱癌。

[0117] 共同递送 CD40L 和 IL-15 对于具有膀胱癌小鼠存活的影响：除 BV-CMV-RU5-Luc-WPRE 和 BV-CD40L 病毒外，还可通过使用鼠白介素（IL15）基因（一种编码诱导天然杀伤细胞增殖的细胞因子的基因，所述天然杀伤细胞形成先天免疫系统的一部分）代替 BV-RU5-Luc-WPRE 表达盒中的荧光素酶基因来构建 BV-IL-15。分别测试 BV-CD40L 病毒和 BV-IL-15 病毒的治疗效果以确认治疗性基因表达并随后共同递送至具有膀胱癌的小鼠的膀胱中。在接种 10^5 个 MB49 细胞后 2 天进行杆状病毒载体的膀胱内灌注。

[0118] 结果示于图 7。观察到通过杆状病毒载体共同递送的 CD40L 和 IL-15 能够延长具有膀胱癌小鼠的存活（图 7）。在使用表达 CD40L 和 IL-15 的杆状病毒载体联合治疗的一只小鼠中，MB49 肿瘤完全停止（图 7B）。

[0119] 讨论

[0120] 可治疗性利用哺乳动物中杆状病毒的免疫刺激效果以抑制膀胱肿瘤生长。该假说得到了以下观察的支持，即经膀胱内递送不表达任何转基因的杆状病毒能够延长具有已建立的原位膀胱癌的免疫活性小鼠的存活。该同源模型系统提供了完整的免疫功能，允许进行针对膀胱癌的治疗性疫苗的研究。虽然在单独一次注射非转基因杆状病毒载体后只治愈了一半的具有肿瘤的小鼠，但如果膀胱内灌注的频率升高，可以提高存活。还可通过在杆状病毒载体中包括治疗性基因以改善效果。就此而言，在具有侵略性生长膀胱癌的动物模型中显示了杆状病毒载体介导的 CD40L 表达的抗肿瘤效果。

[0121] 因此，上述这些结果显示，根据膀胱癌的同源原位动物模型，昆虫杆状病毒可用作膀胱癌治疗的新试剂，其具有治疗性疫苗和治疗性基因递送的双重功能。

[0122] 本说明书引用的所有发表物和专利申请通过引用纳入本文，就好像各发表物或专利申请特定和单独地通过引用纳入本文那样。任何出版物的引用针对提交日之前的公开而不应解释为承认本发明不具有通过在先发明先于这些出版物的权利。

[0123] 在本说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个指示物，除非上下文中有明显的表示。在本说明书和所附权利要求书中所用的术语“包含”、“含有”、“包括”以及其它这些术语的形式意味着非限制性包含的意义，即，包括具体引用的元素或成分，但不排除任何其它元素或成分。该说明书和所附权利要求书中使用的范围或列表旨在表示其中所含的任何中间值或范围或任何子列表。除非另有说明，本文所用的所有科技术语与本发明所属领域普通技术人员所理解的通常含义相同。

[0124] 虽然出于阐明目的已经通过说明和举例的方式对本发明有所描述，但本领域普通

技术人员根据本发明的教导不难了解,可以对本发明作出某些改变和修改而不背离所附权利要求书的构思和范围。

[0125] 参考文献

[0126] 1. Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, 等, Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. (小鼠中杆状病毒诱导先天免疫应答并对致命性流感病毒感染提供保护) J Immunol 2003; 171:1133-9.

[0127] 2. Abe T, Hemmi H, Miyamoto H, 等, Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. (杆状病毒所诱导的先天免疫中 Toll 样受体 9 信号通路的涉及) J Virol 2005; 79:2847-58.

[0128] 3. Abe T, Kaname Y, Wen X, 等, Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and-independent pathways in a cell-type-specific manner. (杆状病毒通过 toll 样受体依赖和不依赖的途径以细胞类型特异的方式诱导 I 型干扰素生产) J Virol 2009; 83:7629-40.

[0129] 4. Barton G. Viral recognition by Toll-like receptors. (Toll 样受体对病毒的识别) Semin Immunol 2007; 19:33-40.

[0130] 5. Beck NB, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes. (在大鼠肝细胞的原代培养物中杆状病毒载体抑制苯巴比妥介导的基因诱导并激活细胞因子表达) Gene Ther 2000; 7:1274-83.

[0131] 6. Bessis N, GarciaCozar F, Boissier M. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. (针对基因治疗载体的免疫应答:对载体功能和效应机制的影响) Gene Therapy 2004; 1:S10-7.

[0132] 7. Boulaire J, Zhao Y, Wang S. Gene expression profiling to define host response to baculoviral transduction in the brain. (定义大脑中宿主对杆状病毒转导应答的基因表达概况) J Neurochem 2009; 109:1203-14.

[0133] 8. Burke J. Virus therapy for bladder cancer. (用于膀胱癌的病毒治疗) Cytokine Growth Factor Rev. 2010 年 4-6 月; 21(2-3):99-102.

[0134] 9. Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, 等, Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. (针对腺相关病毒中和抗体的全球流行病学) J Infect Dis 2009; 199:381-90.

[0135] 10. Chen GY, Shiah HC, Su HJ, 等, Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells triggers the toll-like receptor 3 pathway. (间充质干细胞的杆状病毒转导引发 toll 样受体 3 通路) J Virol 2009; 83:10548-56.

[0136] 11. Chiong E, Esuvaranathan K. New therapies for non-muscle-invasive bladder cancer. (非肌肉侵入性膀胱癌的新疗法) World J Urol. 2010 年 2 月; 28(1):71-8.

[0137] 12. Cross D, Burmester J. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. (癌症治疗的基因治疗:过去、现在和未来) Clin Med Res 2006; 4:218-27.

- [0138] 13. Dumey N, Mongiat-Artus P, Devauchelle P, Lesourd A, Cotard JP, Le Duc A, Marty M, Cussenot O, Cohen-Haguenauer O. In vivo retroviral mediated gene transfer into bladder urothelium results in preferential transduction of tumoral cells. (体内逆转录病毒介导的至膀胱上皮的基因转移导致肿瘤细胞的优先转导) Eur Urol. 2005 年 2 月 ;47(2):257-63.
- [0139] 14. Fodor I, Timiryasova T, Denes B, Yoshida J, Ruckle H, Lilly M. Vaccinia virus mediated p53 gene therapy for bladder cancer in an orthotopic murine model. (原位鼠模型中针对膀胱癌的疫苗病毒介导的 p53 基因治疗) J Urol. 2005 年 2 月 ;173(2):604-9.
- [0140] 15. Gomella LG, Mastrangelo MJ, McCue PA, Maguire HC JR, Mulholland SG, Lattime EC. Phase I study of intravesical vaccinia virus as a vector for gene therapy of bladder cancer. (用作膀胱癌基因治疗载体的膀胱内疫苗病毒的 I 期研究) J Urol. 2001 年 10 月 ;166(4):1291-5.
- [0141] 16. Gronowski AM, Hilbert DM, Sheehan KC, 等, Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. (哺乳动物细胞中杆状病毒激活抗病毒作用) J Virol 1999 ;73:9944-51.
- [0142] 17. Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, Böhle A. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). (优化同源原位鼠膀胱癌 (MB49)) Cancer Res. 1999 年 6 月 15 日 ;59(12):2834-7.
- [0143] 18. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, 等, LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. (SCID-X1 基因治疗后两名患者中 LM02 相关的克隆 T 细胞增殖) Science 2003 ;302:415-9.
- [0144] 19. Hadaschik BA, Zhang K, So AI, Fazli L, Jia W, Bell JC, Gleave ME, Rennie PS. Oncolytic vesicular stomatitis viruses are potent agents for intravesical treatment of high-risk bladder cancer. (溶瘤水泡性口炎病毒是高风险膀胱癌的膀胱内治疗的有效试剂) Cancer Res. 2008 年 6 月 15 日 ;68(12):4506-10.
- [0145] 20. Hanel EG, Xiao Z, Wong KK, Lee PW, Britten RA, Moore RB. A novel intravesical therapy for superficial bladder cancer in an orthotopic model: oncolytic reovirus therapy. (原位模型中浅表性膀胱癌的全新膀胱内疗法: 溶瘤反转录病毒疗法) J Urol. 2004 年 11 月 ;172(5Pt 1):2018-22.
- [0146] 21. Hervas-Stubbs S, Rueda P, Lopez L, 等, Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN (由 I 型 IFN 诱导的昆虫杆状病毒增强适应性免疫应答). J Immunol 2007 ;178:2361-9.
- [0147] 22. Hofmann C, Sandig V, Jennings G, 等, Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. (通过杆状病毒载体的至人干细胞的有效基因转移) Proc Natl Acad Sci U S A 1995 ;92:10099-103.
- [0148] 23. Hofmann C, Hüser A, Lehnert W, 等, Protection of baculovirus-vectors against complement-mediated inactivation by recombinant soluble complement receptor type 1. (杆状病毒载体对重组可溶补体受体 1 型所致补体介导失活的保护)

Biol Chem 1999 ;380:393-5.

[0149] 24. Hu YC. Baculoviral vectors for gene delivery: a review. (用于基因递送的杆状病毒载体: 综述) Curr Gene Ther 2008 ;8:54-65.

[0150] 25. Hu YC. Baculovirus: a promising vector for gene therapy? (杆状病毒: 有希望的基因治疗载体?) Curr Gene Ther. 2010 年 6 月 ;10(3):167.

[0151] 26. Huang X, Yang Y. Innate immune recognition of viruses and viral vectors. (病毒和病毒载体的先天免疫识别) Hum Gene Ther 2009 ;20:293-301.

[0152] 27. Kikuchi E, Menendez S, Ozu C, Ohori M, Cordon-Cardo C, Logg CR, Kasahara N, Bochner BH. Highly efficient gene delivery for bladder cancers by intravesically administered replication-competent retroviral vectors. (膀胱内给予复制有效的反转录病毒载体产生的膀胱癌的高效基因递送) Clin Cancer Res. 2007 年 8 月 1 日 ;13(15Pt 1):4511-8.

[0153] 28. Kikuchi E, Menendez S, Ohori M, Cordon-Cardo C, Kasahara N, Bochner BH. Inhibition of orthotopic human bladder tumor growth by lentiviral gene transfer of endostatin. (内皮抑素的慢病毒基因转移对原位人膀胱肿瘤生长的抑制) Clin Cancer Res. 2004 年 3 月 1 日 ;10(5):1835-42.

[0154] 29. Kimura T, Ohashi T, Kikuchi T, Kiyota H, Eto Y, Ohishi Y. Antitumor immunity against bladder cancer induced by ex vivo expression of CD40 ligand gene using retrovirus vector. (使用反转录病毒载体离体表达 CD40 配体基因诱导的针对膀胱癌的抗肿瘤免疫) Cancer Gene Ther. 2003 年 11 月 ;10(11):833-9.

[0155] 30. Kitajima M, Abe T, Miyano-Kurosaki N, Taniguchi M, Nakayama T, Takaku H. Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus. (苜蓿银纹夜蛾多重核型多角体病毒感染所致天然杀伤细胞依赖的抗肿瘤免疫的诱导) Mol Ther. 2008 年 2 月 ;16(2):261-8.

[0156] 31. Kitajima M, Takaku H. Induction of antitumor acquired immunity by baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice. (小鼠杆状病毒苜蓿银纹夜蛾多重核型多角体病毒感染所致抗肿瘤获得性免疫的诱导) Clin Vaccine Immunol 2008b ;15:376-8.

[0157] 32. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. (作为用于昆虫和哺乳动物细胞中蛋白表达的多功能载体的杆状病毒) Nat Biotechnol 2005 ;23:567-75.

[0158] 33. Kuball J, Wen SF, Leissner J, Atkins D, Meinhardt P, Quijano E, Engler H, Hutchins B, Maneval DC, Grace MJ, Fritz MA, Störkel S, Thüroff JW, Huber C, Schuler M. Successful adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation. (成功的腺病毒介导的野生型 p53 基因通过膀胱内载体灌注转移至具有膀胱癌的患者中) J Clin Oncol. 2002 年 2 月 15 日 ;20(4):957-65.

[0159] 34. Lee SS, Eisenlohr LC, McCue PA, Mastrangelo MJ, Lattime EC. Intravesical

gene therapy:in vivo gene transfer using recombinant vaccinia virus vectors.
(膀胱内基因治疗:使用重组疫苗病毒载体的体内基因转移)Cancer Res.1994年7月1日;
54(13):3325-8.

[0160] 35. Loskog AS,Fransson ME,Totterman TT.AdCD40L gene therapy counteracts
T regulatory cells and cures aggressive tumors in an orthotopic bladder cancer
model. (AdCD40L 基因治疗抵消 T 调节细胞并治愈原位膀胱癌模型中的侵略性肿瘤)Clin
Cancer Res.2005

[0161] 36. Malmström PU,Loskog AS,Lindqvist CA,Mangsbo SM,Fransson
M,Wanders A, Gårdmark T, Tötterman TH.AdCD40L immunogene therapy for bladder
carcinoma—the first phase I/IIa trial. (针对膀胱癌的AdCD40L免疫基因治疗——最
初的第 I/IIa 期试验)Clin Cancer Res.2010年6月15日;16(12):3279-87.

[0162] 37. Morris BD Jr,Drazen KE,Csete ME,Werthman PE, Van Bree MP,Rosenthal
JT,Shaked A. Adenoviral-mediated gene transfer to bladder in vivo. (体内腺病毒介
导的至膀胱的基因转移)J Urol.1994年8月;152(2Pt 1):506-9.

[0163] 38. Nayak S,Herzog RW. Progress and prospects:immune responses to viral
vectors. (进展和展望:针对病毒载体的免疫应答)Gene Ther 2010;17:295-304.

[0164] 39. Nishibe Y,Kaneko H,Suzuki H, 等, Baculovirus-mediated interferon
alleviates dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis symptoms in a murine
modelAcMNPV-mediated IFN alleviates LC in a murine model. (杆状病毒介导的干扰素
消除鼠模型中二甲基亚硝胺诱导的肝硬化症状,AcMNPV 介导的 IFN 消除鼠模型中 LC)Gene
Ther 2008;15:990-7.

[0165] 40. Pagliaro LC,Keyhani A,Williams D,Woods D,Liu B,Perrotte P,Slaton
JW,Merritt JA,Grossman HB,Dinney CP. Repeated intravesical instillations of an
adenoviral vector in patients with locally advanced bladder cancer:a phase I
study of p53 gene therapy. (具有局部晚期膀胱癌患者中腺病毒载体的重复膀胱内灌注:
p53 基因治疗的 I 期研究)J Clin Oncol.2003年6月15日;21(12):2247-53.

[0166] 41. Palmer DH,Young LS,Mautner V. Cancer gene-therapy:clinical trials.
(癌症基因治疗:临床试验)Trends Biotechnol 2006;24:76-82.

[0167] 42. Pieroni L,Maione D,La Monica N. In vivo gene transfer in mouse
skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. (杆状病毒载体调节小鼠骨骼肌中
的体内基因转移)Hum Gene Ther 2001;12:871-81.

[0168] 43. Shiau AL,Lin PR,Chang MY,Wu CL. Retrovirus-mediated transfer of
prothymosin gene inhibits tumor growth and prolongs survival in murine bladder
cancer. (反转录病毒介导的前胸腺素基因转移抑制鼠膀胱癌中肿瘤生长并延长存活)Gene
Ther.2001年11月;8(21):1609-17.

[0169] 44. Siegel R,Ward E,Brawley O,Jemal A. Cancer statistics,2011:the impact
of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths.
(癌症统计,2011:消除社会经济学和种族差异对于成熟前癌症死亡的影响)CA Cancer J
Clin.2011年7-8月;61(4):212-36. Epub 2011年6月17日.

- [0170] 45. Siemens DR, Crist S, Austin JC, Tartaglia J, Ratliff TL Comparison of viral vectors: gene transfer efficiency and tissue specificity in a bladder cancer model.. (病毒载体的比较:膀胱癌模型中的基因转移效率和组织特异性) J Urol. 2003 Sep; 170(3):979-84.
- [0171] 46. Strauss R, Hüser A, Ni S, Tuve S, Kiviat N, Sow PS, Hofmann C, Lieber A. Baculovirus-based vaccination vectors allow for efficient induction of immune responses against plasmodium falciparum circumsporozoite protein. (基于杆状病毒的疫苗载体允许有效的针对恶性疟原虫环孢子体蛋白的免疫诱导) Mol Ther. 2007 年 1 月; 15(1):193-202.
- [0172] 47. Sutton MA, Berkman SA, Chen SH, Block A, Dang TD, Kattan MW, Wheeler TM, Rowley DR, Woo SL, Lerner SP. Adenovirus-mediated suicide gene therapy for experimental bladder cancer. (用于实验膀胱癌的腺病毒介导的自杀基因治疗) Urology. 1997 年 2 月; 49(2):173-80.
- [0173] 48. Suzuki T, Chang MO, Kitajima M, Takaku H. Baculovirus activates murine dendritic cells and induces non-specific NK cell and T cell immune responses. (杆状病毒激活鼠树突细胞并诱导非特异性 NK 细胞和 T 细胞免疫应答) Cell Immunol. 2010; 262(1):35-43.
- [0174] 49. Wang S, Balasundaram G. Potential cancer gene therapy by baculoviral transduction. (通过杆状病毒转导的潜在癌症基因治疗) Curr Gene Ther. 2010 年 6 月; 10(3):214-25
- [0175] 50. Zlotta AR, Fleshner NE, Jewett MA. The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update. (非肌肉侵入性膀胱癌中 BCG 失败的惯例:更新) Can Urol Assoc J. 2009 年 12 月; 3(6 增刊 4):S199-205.

[0001]

序列表

- <110> 新加坡科技研究局 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH)
王朔 (WANG, Shu)
吴春晓 (WU, Chunxiao)
赵莹 (ZHAO, Ying)
李幸慰 (LEE, Esther Xingwei)
- <120> 使用杆状病毒载体的膀胱癌治疗方法
- <130> 93231-900
- <150> US 61/622,376
<151> 2012-04-10
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 583
<212> DNA
<213> 人巨细胞病毒
- <400> 1
ttaaataagtaa tcaattacgg ggicattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac 60
ataacttacg gtaaatggcc cgcttgctg accgcccaac gaccccgcc catigacgtc 120
aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt 180
ggagtattta cggtaaactg cccacttgcc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac 240
gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgctgg cattatgcc agtacatgac 300
cttatgggac ttctctactt ggcatgacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt 360
gatgcggttt tggcagtaca tcaatggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc 420
aagtctccac cccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caccaaaac aacgggactt 480
tccaaaatgt cgtaacaact ccgcccatg gacgcaaatg ggcggtagge gtgtacggtg 540
ggaggtctat ataagcagag ctggtttagt gaaccgtcag atc 583
- <210> 2
<211> 579
<212> DNA
<213> 土拨鼠肝炎病毒
- <400> 2
cgataatcaa cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg actggtatc ttaactatgt 60
tgctectttt acgtatgtg gatagctgc tttaatgctt ttgtatcatg ctattgcttc 120
ccgtatggct ttcattttct cctccttgta taaatcctgg ttgctgtctc ttatgagga 180
gttgtggccc gttgtcagge aacgtggcgt ggtgtgcaact gtgtttgctg acgcaacccc 240
cactggttgg ggcattgcca ccacctgca gctcctttcc gggactttcg ctttccccc 300
ccctattgcc acggcggaac tcacgcccgc ctgccttgcc cgtctctgga caggggctcg 360
getgttgggc actgacaatt ccgtggtgtt gtcggggaag ctgacgtect ttccatgget 420
gctcgcctgt gttgccacct ggattctgcg cgggacgtcc ttctgctacg tcccttcgge 480
cctcaatcca ggggaccttc cttcccgagg cctgtgcgcg gctctgcggc cttctccgcg 540
tcttcgctt cgccctcaga cgagtcggat ctccctttg 579
- <210> 3
<211> 288
<212> DNA

[0002]

<213> 1型人T细胞白血病毒

<400> 3

ggctcgcatc tctccttcae ggcgcgcgcg ccctacctga ggccgccatc caagccgggt	60
gagtcgcgtt ctgcgcctc ccgcctgtgg tgcctcctga actgcgtcgc ccgtctaggt	120
aagttaaag ctacagtega gaccgggcct ttgtcggcg ctcccttgga gcctacctag	180
actcagccgg ctctccacgc ttgcctgac ctgcttgct caactctacg tctttgtttc	240
gttttctgtt ctgcgcgtt acagatccaa gctgtgaccg gcgcctac	288

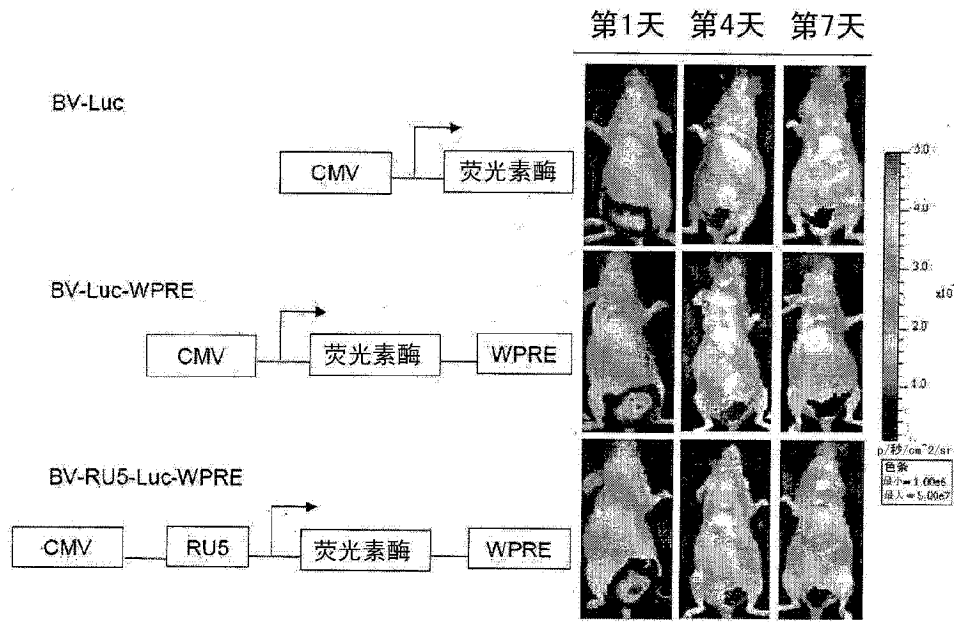


图 1A

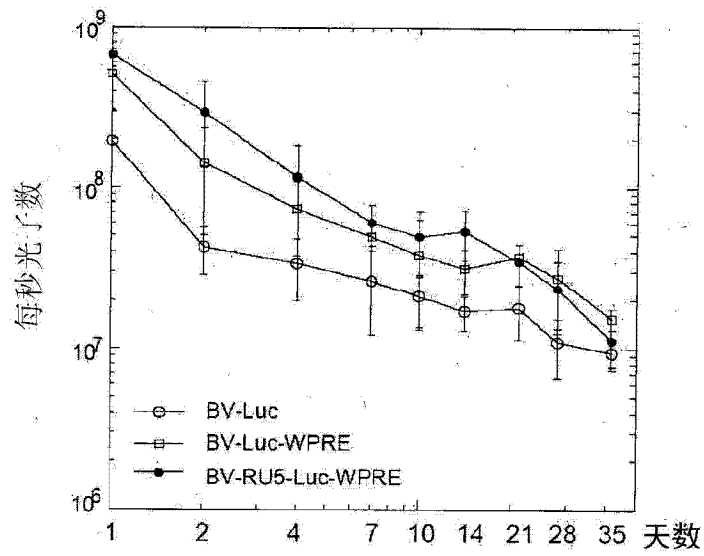


图 1B

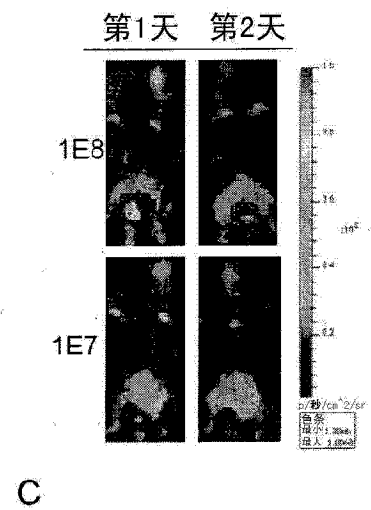


图 2A

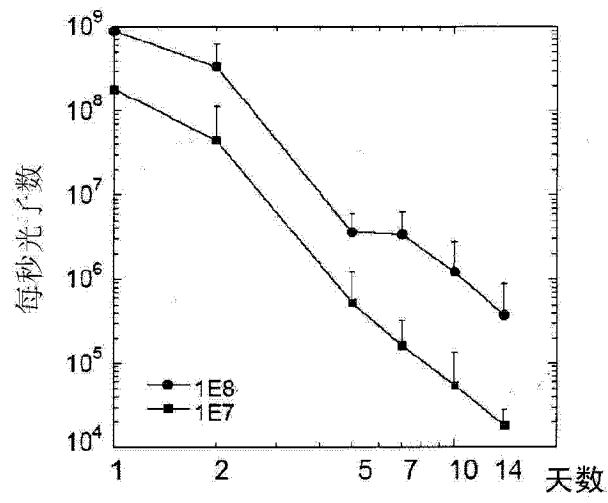


图 2B

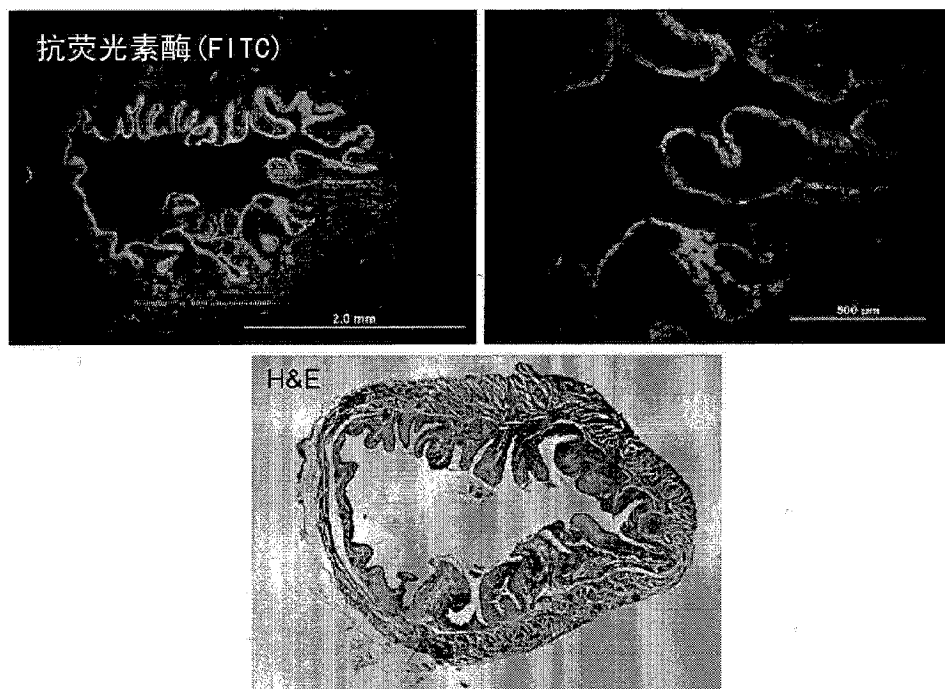


图 2C

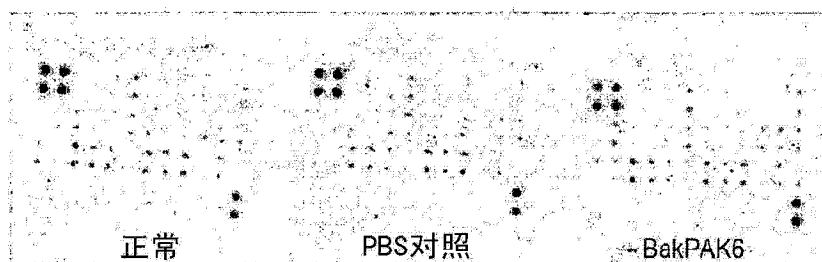


图 3A

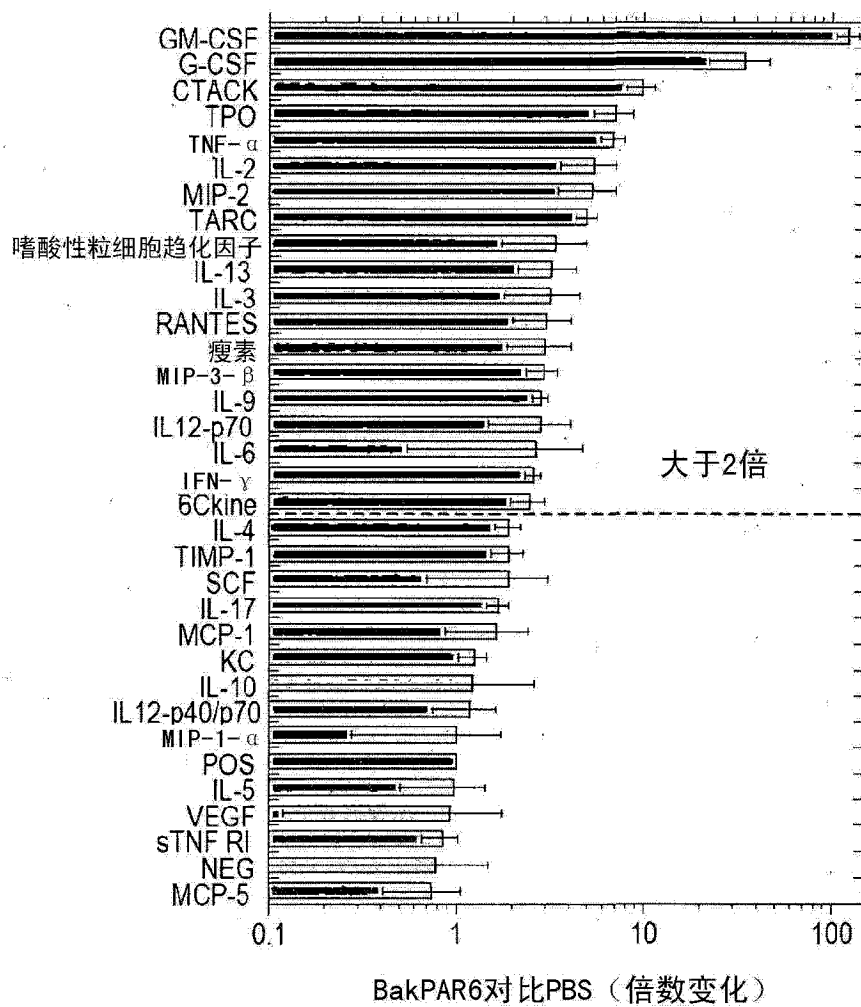


图 3B

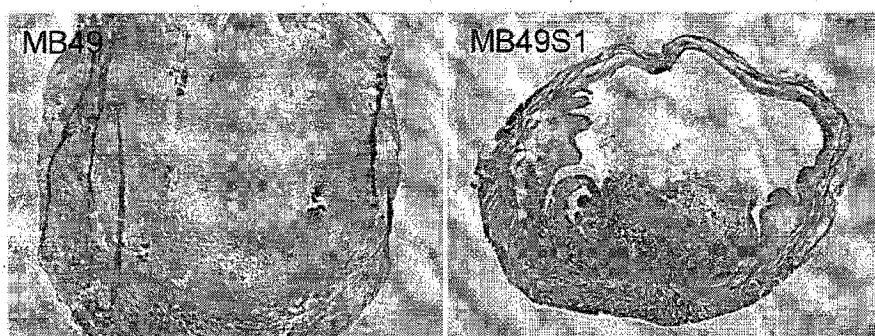


图 4A

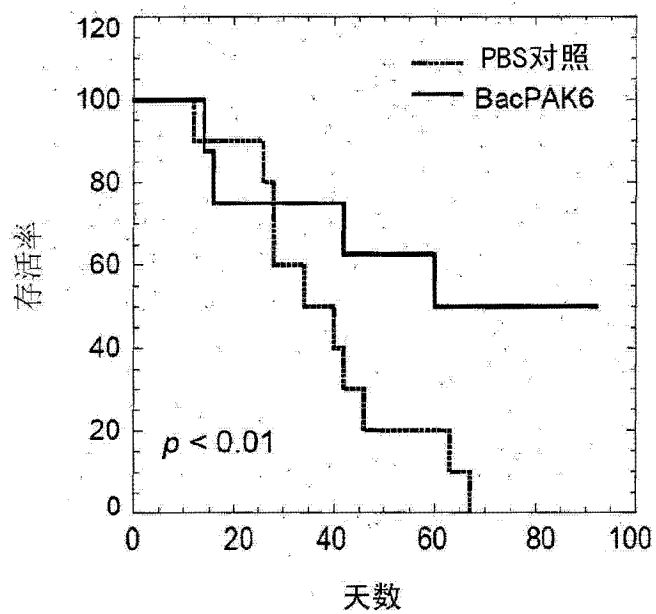


图 4B

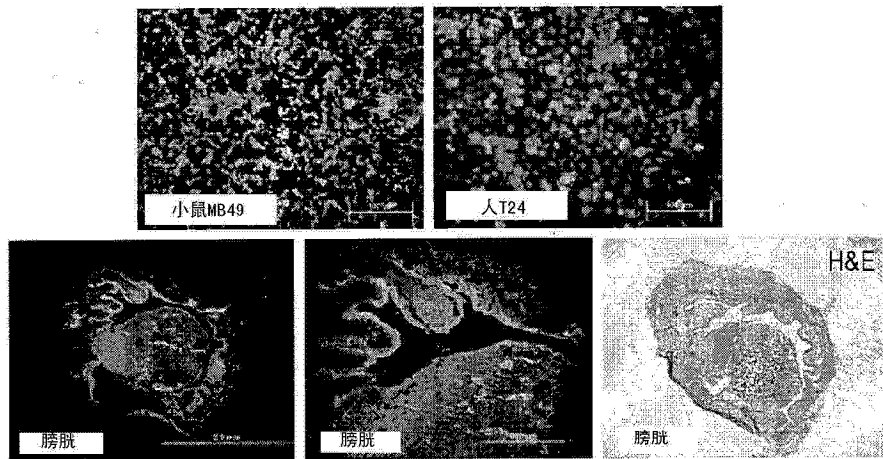


图 5A

图 5B

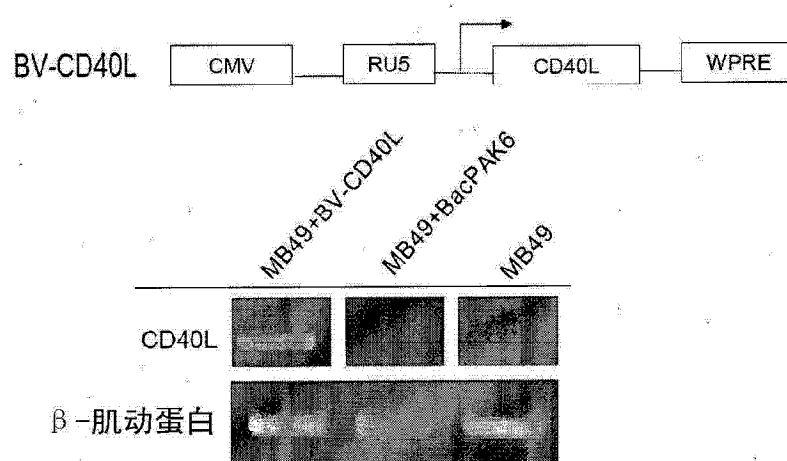


图 5C

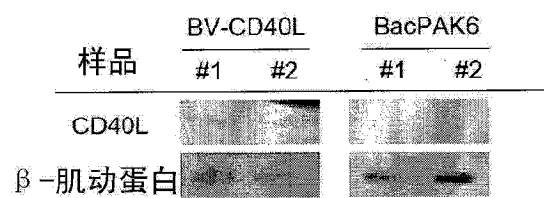


图 5D

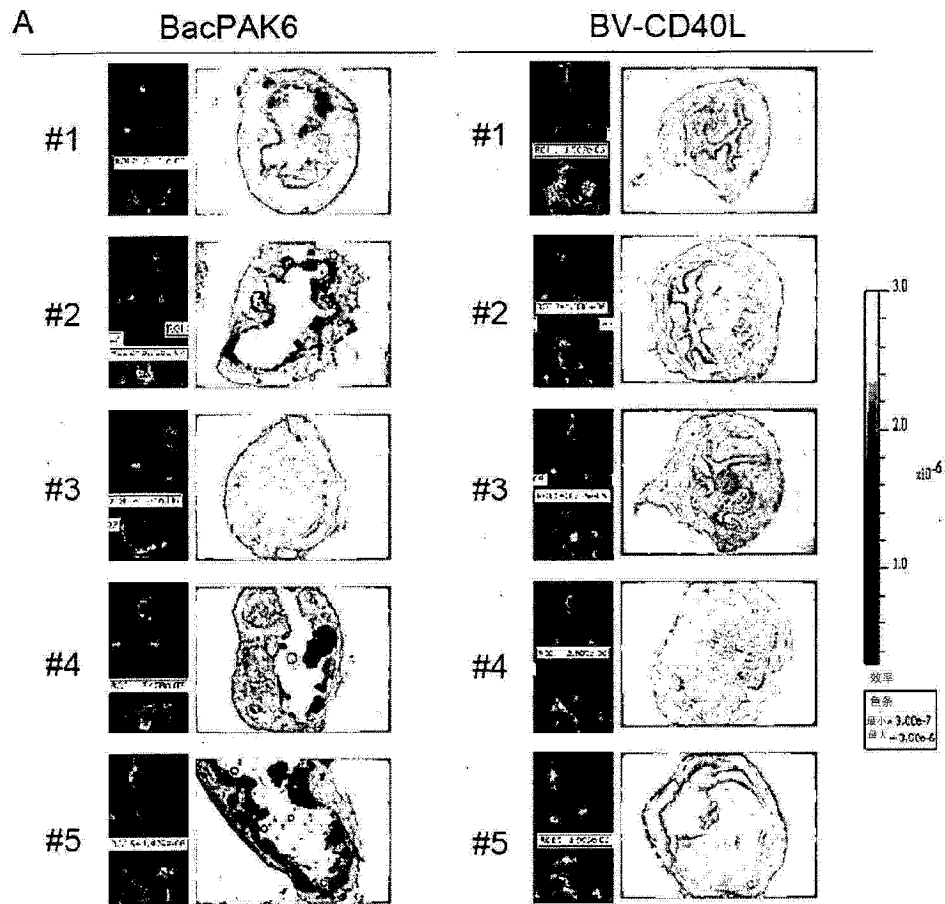


图 6A

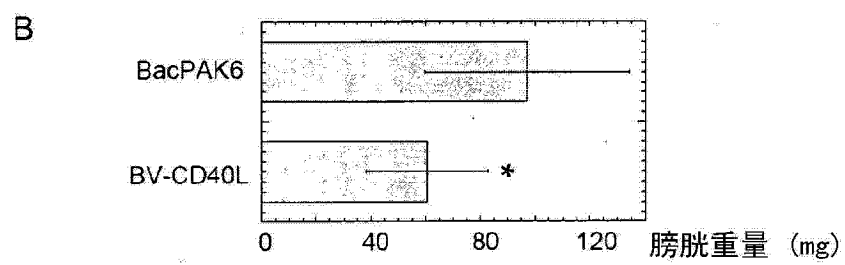


图 6B

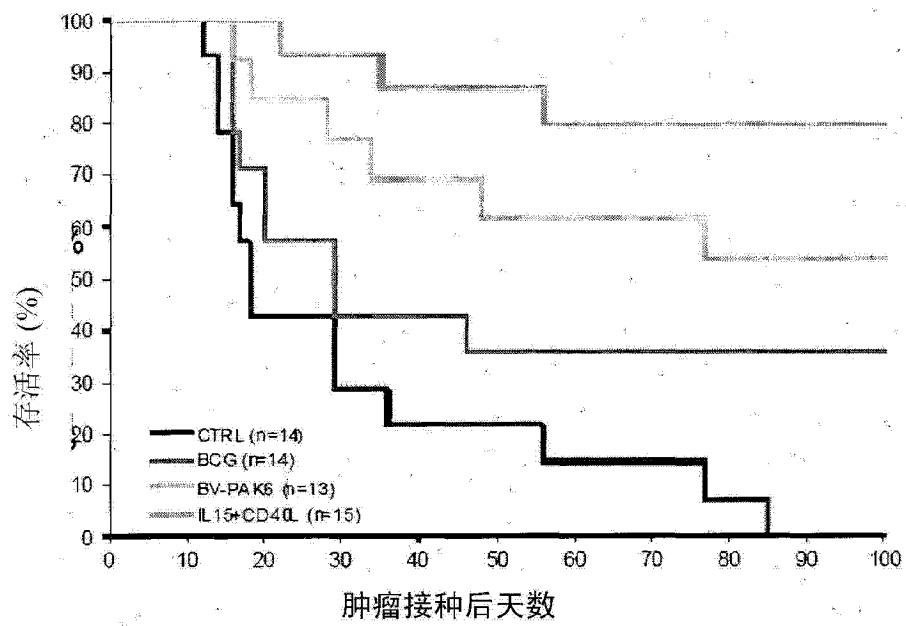


图 7A

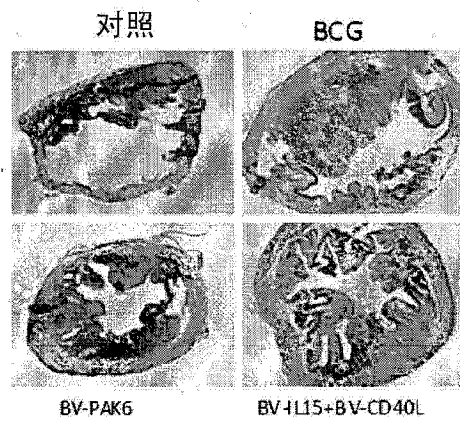


图 7B