



(21) 申请号 201580022374.6

(22) 申请日 2015.02.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107073099 A

(43) 申请公布日 2017.08.18

(30) 优先权数据
2014900647 2014.02.27 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2015/000111 2015.02.27

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/127501 EN 2015.09.03

(83) 生物保藏信息
PTA-8854 2007.12.20
PTA-8616 2007.08.15
PTA-8853 2007.12.20
PTA-8852 2007.12.20

(73) 专利权人 默沙东公司
地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·雪弗伦 G·G·奥

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

专利代理师 陈文平

(51) Int.Cl.
A61K 39/125 (2006.01)
A61K 35/768 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2010135242 A1, 2010.11.25
WO 2010135242 A1, 2010.11.25
CN 101065144 A, 2007.10.31
CN 101065144 A, 2007.10.31
CN 101304761 A, 2008.11.12
候剑刚等. 溶瘤病毒与癌症治疗.《微生物与感染》.2009,第4卷(第1期),全文.
JD Dias等.Targeted cancer immunotherapy with oncolytic adenovirus coding for a fully human monoclonal antibody specific for CTLA-4.《GENE THERAPY》.2012,第19卷(第10期),全文.

审查员 王艳丽

权利要求书1页 说明书30页 附图32页

(54) 发明名称
用于治疗癌症的联合方法

(57) 摘要
本发明涉及治疗肿瘤的方法,所述方法包括经由直接注射或全身施用或囊内施用而递送溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA至所述肿瘤或癌症,联合经由全身途径将免疫刺激物质共同施用至哺乳动物。

1. 柯萨基病毒A21或其病毒RNA与免疫刺激物质的组合在制备用于治疗患有表达细胞内粘附分子-1 (ICAM-1) 的癌症的人类对象的药物中的用途, 其中所述免疫刺激物质是与人PD-1特异性结合的单克隆抗体, 并且经配制用于经由全身途径递送至所述对象, 并且其中所述柯萨基病毒A21或其病毒RNA经配制用于经由向肿瘤直接注射或者向所述对象全身施用而递送。

2. 如权利要求1所述的用途, 其中所述柯萨基病毒A21或其病毒RNA经配制用于在经由全身途径将免疫刺激物质施用至所述对象之前, 经由向肿瘤直接注射而施用至所述对象。

3. 如权利要求1所述的用途, 其中所述柯萨基病毒A21或其病毒RNA经配制用于在经由全身途径将免疫刺激物质施用至所述对象之后, 经由向肿瘤直接注射而施用至所述对象。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述癌症选自: 前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、淋巴癌、白血病、脑癌、肺癌、结肠直肠癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、肠癌、膀胱癌、肾脏的癌症、多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、胰腺癌和恶性胶质瘤。

5. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述癌症是乳腺癌。

6. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述癌症是肝癌。

7. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述癌症是胃癌。

8. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述癌症是非小细胞肺癌。

9. 如权利要求 1-3中任一项所述的用途, 其中所述癌症是黑素瘤。

10. 如权利要求 1-3中任一项所述的用途, 其中所述癌症是肾癌。

11. 如权利要求 1-3中任一项所述的用途, 其中所述癌症是肾上腺癌。

12. 柯萨基病毒A21或其病毒RNA与免疫刺激物质的组合在制备用于治疗患有表达细胞内粘附分子-1 (ICAM-1) 的膀胱癌的人类对象的药物中的用途, 其中所述免疫刺激物质是与人PD-1特异性结合的单克隆抗体, 并且经配制用于经由全身途径递送至所述对象, 并且其中所述柯萨基病毒A21或其病毒RNA经配制用于经由向肿瘤直接注射或者向所述对象全身施用或膀胱内施用而递送。

13. 如权利要求12所述的用途, 其中所述柯萨基病毒A21或其病毒RNA经配制用于在经由全身途径将免疫刺激物质施用至所述对象之前, 经由向所述对象膀胱内施用而施用至所述对象。

14. 如权利要求12所述的用途, 其中所述柯萨基病毒A21或其病毒RNA经配制用于在经由全身途径将免疫刺激物质施用至所述对象之后, 经由向所述对象膀胱内施用而施用至所述对象。

15. 如权利要求12所述的用途, 其中所述柯萨基病毒A21或其病毒RNA经配制用于在与经由全身途径将免疫刺激物质施用至所述对象的同时经由向所述对象膀胱内施用而施用至所述对象。

16. 如权利要求1-3和12-15中任一项所述的用途, 其中所述免疫刺激物质是Lambrolizumab。

17. 如权利要求1-3和12-15中任一项所述的用途, 其中所述免疫刺激物质还包含与人CTLA-4特异性结合的单克隆抗体, 并且经配制用于经由全身途径递送至所述对象。

用于治疗癌症的联合方法

[0001] 领域

[0002] 本发明涉及治疗肿瘤的方法,所述方法包括经由直接注射或全身施用而递送溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA至肿瘤或癌症,联合经由全身途径将免疫刺激物质共同施用至哺乳动物。

[0003] 相关申请

[0004] 该申请要求于2014年2月27日提交的标题为“用于治疗癌症的联合方法”的澳大利亚临时专利申请第2014900647号的优先权权益,将其全部内容通过引用并入本文。

[0005] 背景

[0006] 在最近的临床试验中,用于黑素瘤治疗的数种新免疫治疗方法显示有希望的结果。在2011年3月,由美国食品药品监督管理局(FDA)批准了基于抗体的疗法——伊匹单抗(ipilimumab),在III期临床试验中,其在患有转移性黑素瘤的患者中表现出改善的总存活。伊匹单抗(商品名: **Yervoy®**, Bristol-Myers Squibb)是靶向细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)(CD152)蛋白的单克隆抗体。已知通过CTLA-4的信号转导对细胞毒性T-淋巴细胞(CTL)具有抑制作用,用伊匹单抗阻断该抑制信号,CTL能够成功地靶向破坏癌细胞。在黑素瘤患者中,相比于用糖蛋白100(gp100)肽疫苗治疗的患者的6.4个月的总存活,单独用伊匹单抗的总存活是10.1个月[Hodi, et al., 2010]。在III期研究中,在单独进行伊匹单抗治疗之后,先前治疗的晚期黑素瘤患者的应答率是11%,以及在对未经治疗的患者进行伊匹单抗加达卡巴嗪(dacarbazine)疗法中应答率是15%[Hodi, et al., 2010; Robert, et al., 2011]。在这些试验中,清楚地显示用伊匹单抗具有改善的总存活,如明显的是,死亡的概率降低34%(与疫苗相比)和28%(与单独的达卡巴嗪相比)。当伊匹单抗与达卡巴嗪联合使用时,与达卡巴嗪单一疗法的8.1个月相比,最佳总应答的中值持续时间是19.3个月。

[0007] 癌症免疫疗法所靶向的另一免疫关卡分子是活化的T细胞、B细胞和骨髓细胞的表面上存在的程序性细胞死亡1(PD-1)(CD279)[Keir, et al., 2008]。当程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)(CD274)或PDL-2(CD273)分子与PD-1受体结合时,T细胞被抑制,由此限制了潜在的抗肿瘤应答。当前,存在一系列这样的抗体,其被设计来靶向PD-1和PD-L1作为刺激抗肿瘤T细胞免疫力的工具,即纳武单抗(nivolumab)(BMS-936558, Bristol-Myers Squibb)和抗PD-L1抗体BMS-936559[Brahmer, et al., 2012; Topalian, et al., 2012]。这些针对PD-1和PD-L1的抗体与CTLA-4联合已被用于一系列临床前研究以及III期人体试验中[Curran et al., 2010; Merelli, 2014; Ott et al., 2013]。

[0008] 柯萨基病毒(Coxsackievirus)A21(CVA21)是天然存在的小核糖核酸病毒,其具有优选感染并破坏携带病毒细胞进入受体细胞内粘附分子-1(ICAM-1)和/或衰变加速因子(DAF)的恶性细胞的能力。先前,在一系列利用免疫缺陷小鼠的临床前异种移植模型中,我们已证明了CVA21针对黑素瘤细胞,以及针对诸如乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌和卵巢癌的其它癌症[Shafren, et al., 2004; Au, et al., 2005; Au et al., 2007; WO2001/037866];和针对血液癌[WO/2006/017914]的功效。

[0009] 仍需要用于治疗、缓解或预防癌症的新的且改善的方法以及改善患有肿瘤或癌症

的对象存活的方法。

[0010] 发明概述

[0011] 发明人提出,CVA21感染并随后裂解肿瘤细胞导致含有刺激抗肿瘤免疫力的黑素瘤抗原的细胞碎片的释放,由此作为特化的原位癌症疫苗。首先,我们建立了免疫活性B16-ICAM-1黑素瘤模型,其中使通常对CVA21有抗性的B16细胞转染有人ICAM-1,使得它们允许被感染。考虑到大多数癌症疫苗通常对抗肿瘤免疫力的微弱诱导[Blanchard,et al.,2013;Garbe,et al.,2011],我们研究了免疫刺激作用的抗PD-1抗体与CVA21病毒疗法联合的使用,和分别地免疫刺激作用的抗CTLA-4抗体与CVA21病毒疗法联合的使用,以及CVA21病毒疗法与抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体二者联合的使用。

[0012] 如本文所证明的,在黑素瘤的鼠B16-ICAM-1模型中,靶向免疫关卡分子的免疫刺激物质(本文所例示的通过使用鼠抗PD-1抗体和鼠抗CTLA-4抗体)与溶瘤CVA21的联合使用将在治疗上有益于降低肿瘤负担、肿瘤破溃率并延长存活。

[0013] 在一方面,本发明提供用于治疗对象中的癌症的方法,所述方法包括经由向肿瘤直接注射或者向所述对象全身施用而递送溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA,联合经由全身途径将免疫刺激物质共同施用至所述对象。

[0014] 在一方面,本发明提供用于治疗对象中的膀胱癌的方法,所述方法包括经由向肿瘤直接注射或者向所述对象全身施用或囊内施用而递送溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA,联合经由全身途径将免疫刺激物质共同施用至所述对象。

[0015] 在实施方案中,溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA选自小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)。在实施方案中,溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA选自与肿瘤细胞表面上的细胞内粘附分子-1(ICAM-1)和/或衰变加速因子(DAF)结合的小核糖核酸病毒科病毒。在实施方案中,溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA选自与肿瘤细胞表面上的细胞内粘附分子-1(ICAM-1)和/或衰变加速因子(DAF)结合的肠病毒属(enterovirus)。在实施方案中,肠病毒是人肠病毒C。在实施方案中,溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA选自与肿瘤细胞表面上的细胞内粘附分子-1(ICAM-1)和/或衰变加速因子(DAF)结合的A组柯萨基病毒(Coxsackievirus)。在实施方案中,溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA是柯萨基病毒A21。

[0016] 在实施方案中,免疫刺激物质是靶向选自以下免疫关卡分子的物质:PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、CD134、CD134L、CD137、CD137L、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、B7RP1、ICOS、TIM3、GAL9、CD28或OX-40。在实施方案中,免疫刺激物质选自与表面表达的PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4或OX-40特异性结合的物质。在实施方案中,免疫刺激物质选自与表面表达的PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4或OX-40特异性结合的单克隆抗体。

[0017] 在实施方案中,所述方法包括在经由全身途径施用免疫刺激物质之前,经由直接注射或全身施用或囊内施用而递送溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA。

[0018] 在实施方案中,所述方法包括在经由全身途径将免疫刺激物质施用至对象之后,经由直接注射或全身施用或囊内施用而递送溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA。

[0019] 在实施方案中,与不存在所述治疗情况下预计的存活时间相比,治疗为对象提供了增长的存活时间。在实施方案中,与不存在所述治疗情况下预计的肿瘤生长相比,治疗提供肿瘤生长的阻滞。

[0020] 在一方面,本发明提供了溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA在制备用于治疗患有癌症对

象的药物中的用途,其中所述药物用于与经由全身途径递送至对象的免疫刺激物质联合使用,并且其中所述药物用于经由向肿瘤直接注射或向对象全身施用而递送。

[0021] 在一方面,本发明提供了溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA在制备用于治疗患有膀胱癌对象的药物中的用途,其中所述药物用于与经由全身途径递送至对象的免疫刺激物质联合使用,并且其中所述药物用于经由向肿瘤直接注射或者向对象全身施用或囊内施用而递送。

[0022] 在所述用途的实施方案中,所述溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA用于在经由全身途径将免疫刺激物质施用至哺乳动物之前,经由直接注射或者全身施用或囊内施用而施用至肿瘤。在所述用途的实施方案中,包含溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA的药物用于在经由全身途径将免疫刺激物质施用至哺乳动物之后,经由直接注射或者全身施用或囊内施用而施用至肿瘤。

[0023] 在一方面,本发明提供了用于治疗患有癌症的对象的用途的溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA,其中所述用途与免疫刺激物质联合,其中在所述用途中,经由向肿瘤直接注射或向对象全身施用而将溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA施用至所述对象,以及经由全身途径将所述免疫刺激物质施用至对象。

[0024] 在一方面,本发明提供了用于治疗患有膀胱癌的对象用途的溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA,其中所述用途与免疫刺激物质联合,其中在所述用途中,经由向肿瘤直接注射或向对象全身施用或囊内施用而将溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA施用至所述对象,以及经由全身途径将所述免疫刺激物质施用至对象。

[0025] 在实施方案中,施用溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA在施用免疫刺激物质之前。在实施方案中,施用溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA在施用免疫刺激物质之后。

[0026] 在实施方案中,哺乳动物或对象是人。

[0027] 在实施方案中,癌症或肿瘤选自:前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、白血病、脑癌、肺癌、结肠直肠癌、甲状腺癌、肾癌、肾上腺癌、肝癌、胃癌、肠癌、膀胱癌、肾脏癌症、多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、胰腺癌、恶性胶质瘤和黑素瘤。

[0028] 在实施方案中,癌症或肿瘤是黑素瘤。

[0029] 在实施方案中,癌症或肿瘤是转移性癌症或转移性肿瘤。

[0030] 附图简述

[0031] 图1:免疫活性鼠黑素瘤方案的概述。A) 显示处理组的流程图。首先用CVA21 ($1 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ [$5 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{kg}$])、UV-灭活CVA21或盐水瘤内处理动物,随后用鼠同种型对照抗体或抗PD-1抗体 ($12.5 \text{mg}/\text{kg}$) 进行腹膜内注射。B) 显示治疗日程表(绿色三角形和橙色星号)和监测程序的时间线。在第45天终止实验(NTC=无肿瘤的对照)。

[0032] 图2:小鼠的平均体重(g)相对于时间(天)。误差线指示标准误差。第12天、第15天、第18天和第21天处的虚线显示各轮疗法。使用针对多重比较的多重t-检验校正(Holm-Sidak方法),除了第31天的UV-CVA21+抗PD-1组之外,处理组和无肿瘤的对照(NTC)小鼠的平均体重之间不存在统计学显著差异。由于研究期间小鼠的安乐死,观察到平均重量的一些波动。

[0033] 图3:各小鼠的体重(g)相对于时间(天)。虚线指示第12天、第15天、第18天和第21天的四轮疗法。A) 无肿瘤的对照组, B) 盐水+对照Ab, C) 盐水+抗PD-1, D) UV-CVA21+对照Ab,

E) UV-CVA21+抗PD-1, F) CVA21+对照Ab, G) CVA21+抗PD-1。

[0034] 图4:关于B16-ICAM-1鼠黑素瘤肿瘤,联合的免疫疗法和CVA21病毒疗法之后来自各小鼠的各肿瘤体积(每组n=8)。C57BL/6小鼠在后肋皮内注射B16-ICAM-1细胞。在第12天、第15天、第18天和第21天,用盐水、CVA21 ($1 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ [$5 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{kg}$]) 或UV-灭活CVA21 ($1 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ [$5 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{kg}$]) 与对照或抗PD-1抗体(分别是12.5mg/kg)联合瘤内注射肿瘤。处理天数通过虚线指示。在治疗期间,相对于对照抗体组,抗PD-1处理组中存在显而易见的延迟肿瘤生长的趋势。盐水+抗PD-1处理组中的肿瘤采取率完全可变,并且在完成疗法进程之前,使至少三只动物安乐死。

[0035] 图5:CVA21溶瘤病毒疗法与抗PD-1免疫疗法联合之后A) 病毒血症和B) 抗CVA21中和抗体的检测。图显示平均值+SEM(开始研究时n=8)。CVA21+抗PD-1抗体与CVA21+对照抗体之间的中和抗体水平差异在第33天是显著的($p=0.04$, 单尾t-检验)。

[0036] 图6:用盐水、UV-CVA21或CVA21与对照抗体或抗PD-1联合处理后C57BL/6小鼠的存活。第45天处的虚线表示实验的结束/终止。

[0037] 图7:用盐水、UV-灭活CVA21、CVA21与对照抗体或抗PD-1抗体联合处理后C57BL/6小鼠的存活。A) 盐水+对照Ab相对CVA21+对照Ab、B) 盐水+抗PD-1相对CVA21+抗PD-1、C) 盐水+对照Ab相对盐水+抗PD-1、D) CVA21+对照Ab相对CVA21+抗PD-1、E) 盐水+对照Ab相对CVA21+抗PD-1、F) UV-CVA21+抗PD-1相对CVA21+抗PD-1之间存活曲线的比较。虚线显示50%存活截止值和对应的中值存活时间。

[0038] 图8:实施例2中所描述的免疫活性鼠黑素瘤方案的概述。显示处理日程表(蓝色圆圈[抗PD-1抗体]、橙色正方形[CVA21])和监测程序(红色三角形[血液收集]和绿色三角形[肿瘤测量和体重测量])的时间线。首先用盐水或CVA21 ($1 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ /注射 [$5.56 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{kg}$]) 处理动物,随后用鼠同种型对照抗体或抗PD-1抗体(12.5mg/kg)进行腹膜内注射。在第66天终止实验。

[0039] 图9:关于B16-ICAM-1鼠黑素瘤肿瘤(每组n=12),免疫疗法和CVA21病毒疗法联合之后来自各小鼠的单独肿瘤体积。A) 盐水+对照Ab, B) 盐水+抗PD-1, C) CVA21+对照Ab, D) CVA21+抗PD-1。C57BL/6小鼠在后肋皮内注射B16-ICAM-1细胞。在第6天、第9天、第12天和第15天,用盐水或CVA21 ($1 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ [$5.56 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{kg}$]) 与对照或抗PD-1抗体(分别是12.5mg/kg)联合瘤内注射肿瘤。处理天数通过虚线指示。在第19天、第26天、第33天和第40天,施用另外的瘤内病毒注射 ($1 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ [$5.56 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{kg}$])。在处理期间,相对于对照抗体组,抗PD-1处理组中存在显而易见的肿瘤生长延迟的趋势。

[0040] 图10:继发性B16肿瘤结节的肿瘤体积。在第31天,用B16肿瘤细胞 (1×10^5 个) 在右后肋再激发之后来自各小鼠的单独肿瘤体积。A) 盐水+对照Ab, B) 盐水+抗PD-1, C) CVA21+对照Ab, D) CVA21+抗PD-1。所有的动物最后发展了可触知的肿瘤,然而,存在这样的趋势:其指示了B16肿瘤生长的发作被CVA21+抗PD-1疗法延迟。

[0041] 图11:用盐水或CVA21与对照抗体或抗PD-1联合处理后C57BL/6小鼠的存活。A) 当将盐水+抗PD-1的存活曲线与CVA21+抗PD-1处理组相比时,存在统计学差异($p=0.0026$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)。B) 与抗PD-1抗体联合使用的CVA21产生显著的存活优势(对于盐水+抗PD-1和CVA21+抗PD-1分别是45天与60天的中值存活)。在第66天终止研究。

[0042] 图12:免疫活性鼠黑素瘤方案的概述。显示处理日程表(蓝色圆圈[抗CTLA-4抗体])

和橙色正方形[CVA21])和监测程序(红色三角形[血液收集]和绿色三角形[肿瘤测量和体重测量])的时间线。在第77天终止实验。

[0043] 图13:关于B16-ICAM-1鼠黑素瘤肿瘤,在免疫疗法和CVA21病毒疗法联合之后的肿瘤体积。(A)用盐水+对照抗体、盐水+抗CTLA-4、CVA21+对照抗体或CVA21+抗CTLA-4处理之后的平均肿瘤体积(mm^3) \pm S.E.M.。(B&C)关于B16-ICAM-1鼠黑素瘤肿瘤,免疫疗法和CVA21病毒疗法联合之后来自各小鼠的单独肿瘤体积。C57BL/6小鼠在后肋皮内注射B16-ICAM-1细胞。在第7天、第10天、第13天和第16天,用盐水或CVA21($1 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ [$5.56 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{kg}$])与对照或抗CTLA-4抗体(分别是12.5mg/kg)联合瘤内注射肿瘤。处理天数通过虚线指示。

[0044] 图14:继发性B16肿瘤结节的肿瘤体积。(A)在研究结束时(第77天),盐水+对照抗体、盐水+抗CTLA-4、CVA21+对照抗体和CVA21+抗CTLA-4处理小鼠中的继发性肿瘤发展的百分比发生率。(B)肿瘤发生率相对于天数的图。在第37天,用B16肿瘤细胞在后肋再激发小鼠,并且监测肿瘤直到第77天。(C)用B16肿瘤细胞(2×10^5 个)在右后肋再激发之后来自各小鼠的单独肿瘤体积。

[0045] 图15:用盐水或CVA21与对照抗体或抗CTLA-4联合处理之后C57BL/6小鼠的存活。(A)用盐水或CVA21与对照抗体或抗CTLA-4联合处理之后C57BL/6小鼠的存活。实验的结束/终止是在第77天。(B)显示来自各处理组小鼠的中值存活的表。

[0046] 图16:关于B16-ICAM-1鼠黑素瘤肿瘤,免疫疗法和CVA21病毒疗法联合之后的肿瘤体积。(A)在研究的第27天,来自用盐水+对照抗体、盐水+抗CTLA-4、盐水+抗PD-1、CVA21+对照抗体、CVA21+抗CTLA-4、CVA21+抗PD-1或CVA21+抗CTLA-4+抗PD-1处理的小鼠的平均肿瘤体积(mm^3) \pm S.E.M.。(B)用盐水+对照抗体、盐水+抗CTLA-4、盐水+抗PD-1、CVA21+对照抗体、CVA21+抗CTLA-4、CVA21+抗PD-1或CVA21+抗CTLA-4+抗PD-1处理之后的平均肿瘤体积(mm^3) \pm S.E.M.。(C)关于B16-ICAM-1鼠黑素瘤肿瘤,免疫疗法和CVA21病毒疗法联合之后来自各小鼠的单独肿瘤体积。C57BL/6小鼠在后肋皮内注射B16-ICAM-1细胞。在第7天、第10天、第13天和第16天,用盐水或CVA21($1 \times 10^8 \text{TCID}_{50}$ [$5.56 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{kg}$])与对照、抗PD-1、抗CTLA-4或抗CTLA-4+抗PD-1抗体(分别是12.5mg/kg)联合静脉内注射小鼠。处理天数通过虚线指示。

[0047] 图17:Pt 12-002:对男性患者腿上的转移性黑素瘤病灶进行的瘤内CVA21注射在第85天显示对注射和未注射病灶的效果。Pt 03-032:左侧颈部和肺部具有转移性黑素瘤的男性在第86天显示未注射的远端内脏应答。只在左侧颈部瘤内注射CVA21。

[0048] 图18:CALM II期试验。预分析:血清细胞因子活性(具有目标应答的患者)。在最初的瘤内CVA21注射后的指定时间取来自个体患者的血清样本。使用Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay (#M50-00031YV) BioRad, Richmond, VA, USA,通过多重免疫分析,按照生产商的说明书,评估血清样本的炎性细胞因子水平。采用免疫相关的RECIST 1.1标准评估患者的肿瘤应答。

[0049] 图19:静脉内施用CVA21(在图上也被标注为CAVATAK™)诱导肿瘤细胞的基因表达变化。向BALB小鼠施用CVA21或盐水,并且在施用后3小时、6小时、24小时和72小时处死,分析基因的表达(右边四个图)。在左边的单个图中显示CVA21的复制动力学。

[0050] 缩写

[0051]	Ab	抗体
[0052]	ACEC	动物福利和伦理委员会
[0053]	方差分析	方差分析
[0054]	ATCC	美国典型培养物保藏中心
[0055]	BSA	牛血清白蛋白
[0056]	CI	联合指数
[0057]	CO ₂	二氧化碳
[0058]	CD	分化簇
[0059]	CPE	致细胞病变效应
[0060]	CTL	细胞毒性T淋巴细胞
[0061]	CVA21	柯萨基病毒A21
[0062]	DAF	衰变加速因子
[0063]	dH ₂ O	蒸馏水
[0064]	DMEM	达尔伯克改良伊戈尔培养基
[0065]	DNA	脱氧核苷酸磷酸
[0066]	EtOH	乙醇
[0067]	FCS	胎牛血清
[0068]	g	克
[0069]	ICAM-1	细胞内粘附分子-1
[0070]	i.p.	腹膜内
[0071]	i.t.	瘤内
[0072]	i.v.	静脉内
[0073]	irPFS	免疫相关无进展生存
[0074]	MAb	单克隆抗体
[0075]	nAb	中和抗体
[0076]	MOI	感染复数
[0077]	PBS	盐酸盐缓冲盐溶液
[0078]	PCR	聚合酶链式反应
[0079]	PD-1	程序性细胞死亡1
[0080]	PD-L1	程序性细胞死亡1配体1
[0081]	p.i.	接种后
[0082]	p.t.i.	肿瘤接种后
[0083]	RNA	核糖核酸
[0084]	RPMI	皇家公园纪念研究所
[0085]	RT	室温
[0086]	RT-PCR	逆转录酶-聚合酶链式反应
[0087]	s.c.	皮下
[0088]	SCID	重症联合免疫缺陷
[0089]	SD	标准偏差

[0090]	SE	标准误差
[0091]	sICAM-1	可溶的细胞内粘附分子-1
[0092]	TCID ₅₀	50%组织培养感染量
[0093]	UV	紫外线
[0094]	XTT	2,3-二-(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四唑
[0095]		-5-羧酰苯胺
[0096]	单位	
[0097]	°C	摄氏度
[0098]	d	天
[0099]	g	重力
[0100]	g	克
[0101]	h	小时
[0102]	L	升
[0103]	m	米
[0104]	M	克分子
[0105]	min	分钟
[0106]	mol	摩尔
[0107]	rpm	每分钟转数
[0108]	s	秒
[0109]	U	单位
[0110]	V	伏
[0111]	v/v	每体积的体积
[0112]	w/v	每体积的重量
[0113]	核苷酸	
[0114]	A	腺嘌呤
[0115]	C	胞嘧啶
[0116]	G	鸟嘌呤
[0117]	T	胸腺嘧啶
[0118]	前缀	
[0119]	k	千10 ³
[0120]	m	毫10 ⁻³
[0121]	μ	微10 ⁻⁶
[0122]	n	纳10 ⁻⁹
[0123]	p	皮10 ⁻¹²

[0124] 发明详述

[0125] 目前,包括关于下文的实例,仅以示例的方式更详细地描述本发明。

[0126] 下述是可以帮助理解本发明的描述的一些定义。这些旨在作为一般的定义并且决不应该将本发明的范围限于那些单独的术语,但是为了更好地理解下面的描述而提出。

[0127] 本发明的方法通常涉及施用治疗有效量的溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA以及治疗有

效量的免疫刺激物质。本文使用的术语“治疗有效量”在其含义内包括在本发明中使用的溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA和免疫刺激物质的无毒但足以提供期望治疗效果的量。所需的精确量将因对象而不同，其取决于诸如以下的因子：被治疗的物种，对象的年龄和一般病况，被治疗病况的严重性，施用的特定药剂以及施用模式等等。因此，不可能指定精确的“有效量”。然而，对于给定的情况，可以通过本领域普通技术人员仅使用常规的实验确定合适的“有效量”。

[0128] 在本说明书的背景中，术语“治疗(treatment)”以及诸如“治疗(treating)”、“治疗(treated)”和“治疗(treat)”的相关术语指医治或缓解疾病的状态或症状，预防疾病的建立，或在其他方面预防、阻止、延缓或逆转疾病的进展或无论如何任何方式的其它不良症状的任何和所有应用。为了避免误解，应注意，本文使用的“治疗(treatment)”及相关的术语不需要完全治愈或减轻正被治疗的疾病。

[0129] 在本说明书的背景中，术语“包含(comprising)”意指“主要地包括，但不一定唯一地”。而且，词语“包含(comprising)”的变型，如“包含(comprise)”和“包含(comprises)”具有相应变化的含义。

[0130] 在允许的范围内，将本文提及的文档的内容通过引用并入。

[0131] 在本说明书的背景中，术语“对象”或“患者”包括人和有社会、经济或研究重要性的任何物种的个体，其包括但不限于绵羊属、牛属、马属、猪属、猫属、犬属、灵长类、啮齿动物的成员。在优选的实施方案中，对象或患者是人。

[0132] 除非上下文另有要求或特别地声明与此相反，本文以单整数、单步骤或单元素列举的本发明的整数、步骤或元素清楚地涵盖了所列整数、步骤或元素的单数和复数形式。

[0133] 在本说明书的背景中，除非具体的上下文另有清楚指示，单数还涵盖了复数概念。例如，在陈述本发明包括通过施用溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA联合免疫刺激物质的共同施用治疗癌症的方法的地方，应理解，其涵盖了施用一种或多种此类病毒或病毒的RNA，以及涵盖了施用一种或多种免疫刺激物质。

[0134] 在本说明书的背景中，术语“约”，当涉及数值使用时，将被理解为针对描述的测量值表达本领域已知的通常变化程度。当本领域不承认测量值的通常变化程度时，或者当其承认测量值的通常变化程度然而另外的方向是所希望的时，本文使用的术语“约”将被理解为表达使用术语“约”的数值的加或减10%的变化。

[0135] 本文的现有技术文档的任何描述，或者本文源自或基于那些文档的陈述并非承认文档或得到的陈述是澳大利亚或别处相关领域的公知常识。

[0136] 本领域技术人员将了解，本文所描述的发明除了那些明确描述的之外，易于变化和修饰。应理解，本发明包括所有此类变化和修饰。本发明还包括本说明书中个别或集中提及或指示的所有步骤、特征、组合物和化合物，以及所述步骤或特征的任意和全部组合或者任两个或更多的组合。

[0137] 在本说明书的背景中，当提供数值范围时，其应被理解为涵盖所述范围的规定端点以及这些端点之间的所有值，包括那些端点内的任意子区间。

[0138] 本文的发明人证明了，在黑素瘤的鼠B16-ICAM-1模型中，靶向免疫关卡分子的免疫刺激物质(本文所例示的通过使用鼠抗PD-1抗体和鼠抗CTLA-4抗体)与溶瘤CVA21的联合使用将在治疗上有益于降低肿瘤负担、肿瘤破溃率以及延长存活。虽然预料的是，通过使用

免疫刺激物质增强免疫系统将例如通过增强的免疫清除或病毒的靶向损害溶瘤病毒的功效,但是本文的发明人证明了,意外且反直觉地,与单独的病毒物质或免疫刺激物质相比,溶瘤病毒和免疫刺激物质的联合提供了改善的抗肿瘤效果。因此,本文所描述的发明提供了包括以下的治疗肿瘤的方法:经由直接注射或全身施用而将溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA递送至肿瘤,联合经由全身途径将免疫刺激物质共同施用至哺乳动物。其中,希望被治疗的癌症是这样的癌症:递送病毒或物质的具体机制对于所述癌症可能是有利的,则该递送方法是优选的。例如,当所述方法用于治疗膀胱癌或转移性膀胱癌时,通过囊内途径有利地至少施用病毒或病毒的RNA。

[0139] CVA21是人肠病毒C (HEC) 家族病毒的成员。HEC家族的其它值得注意的成员包括柯萨基病毒,例如CVA13、CVA15和CVA18。已证明了CVA13、CVA15、CVA18和CVA21各自在诸如乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌和黑素瘤的多种实体癌症 (Shafren et al, 2004; Au et al., 2005; Au et al., 2007; 于2000年11月27日提交的标题为“治疗对象中的恶性肿瘤的方法以及用于治疗对象中的恶性肿瘤的方法用途的药物组合物”的W02001/037866;将其内容通过引用整体并入本文) 以及诸如多发性骨髓瘤的血癌 (于2005年8月22日提交的标题为“用于治疗血癌的方法和组合物”的W0/2006/017914, 将其内容通过引用整体并入本文) 的治疗中具有溶瘤效果。各自与ICAM-1受体相互作用用于作为合作隔离位点 (Shafren et al, 1997) 起作用而感染具有衰变加速因子 (DAF) 的宿主细胞 (Shafren et al, 1997)。因此,本文证明的CVA21与免疫刺激物质的共同施用在癌症模型中的有益效果也适用于与CVA21功能相关的病毒,如CVA13、CVA15和CVA18以及其它人肠病毒C。

[0140] 任何合适的病毒源可用于本发明的方法中。例如,多种合适的病毒株可获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 美国弗吉尼亚州马纳萨斯大学街10801号20110-2209, 如依据布达佩斯条约于下文提供的日期储存的材料, 并且根据布达佩斯条约的条款获得。柯萨基A组病毒, 毒株CVA13ATCC号: PTA-8854, 于2007年12月20日储存; 柯萨基A组病毒, 毒株CVA15 (G9) ATCC号: PTA-8616, 储存日期: 2007年8月15日; 柯萨基A组病毒, 毒株CVA18ATCC号: PTA-8853, 于2007年12月20日储存; 柯萨基A组病毒, 毒株CVA21 (Kuykendall) ATCC号: PTA-8852, 于2007年12月20日储存。

[0141] 如本文所述, 方法涵盖了作为溶瘤病毒施用的病毒物质和以溶瘤病毒的RNA (如对应于CVA21病毒的RNA) 的形式施用的病毒物质。使用溶瘤病毒的RNA治疗癌症的方法已描述于标题为“治疗瘤的方法和组合物”的W02006/074526, 将其内容通过引用并入本文。

[0142] 感染后, 溶瘤病毒通过直接的裂解感染、诱导细胞凋亡或通过启动对病毒抗原的免疫应答可以杀死癌细胞。因此, 溶瘤病毒不限于单次的输入剂量并且可经历多轮感染, 其导致大量子代病毒的产生。这些子代可以局部地蔓延至相邻的肿瘤细胞, 或全身地蔓延至远端的转移性位点。溶瘤疗法的该特征对于治疗难接近的肿瘤或未确诊的微转移特别有吸引力。本文的证明 (例如, 将CVA21瘤内施用至患者颈部的黑素瘤与注射病灶和远端未注射病灶中的抗肿瘤活性相关 (图17)) 与全身作用的发生一致。如本文所证明的, 病灶内CVA21是用于治疗不可切除的IIIC-IVM1c期黑素瘤的有希望的新的溶瘤免疫治疗剂, 以及基于实施例5研究的本文所描述的临床研究在第6个月满足irPFS的第一终点。CVA21被很好地耐受, 并且表现出局部和远端的持久肿瘤应答。

[0143] 具体而言, 本文观察的未注射病灶中的抗肿瘤活性与全身的宿主免疫介导的抗肿

瘤应答一致。本文的实施例暗示, CVA21介导的未注射的远端转移性病灶活性与宿主产生的免疫应答有关, 如通过可能的血清细胞因子特征(signature)——血清IL-8和g-IFN的升高水平来证明(图18)。在肋植有黑素瘤细胞(SK-Mel 28)的小鼠模型中静脉内递送CVA21与通过肿瘤细胞表达的干扰素- γ 可诱导蛋白10(IP-10)和PD-L1的增加相关, 如通过施用病毒后肿瘤活检的时间进程来评估(图19)。IP-10是由暴露于IFN-g的细胞分泌的趋化因子并且在将活化的T细胞招募入组织炎症位点中发挥重要作用。在持续的临床研究中, 越来越明显的是, 在使用抗PD-1或抗PD-L1阻断治疗之后, 与肿瘤缺少PD-L1表达的患者相比, 肿瘤表达较高水平免疫关卡分子(如PD-L1)的患者表现出优良的肿瘤应答。这表明CVA21作为肿瘤免疫激动器(immuno-agitator)与免疫关卡抑制物质抗体的联合在表达ICAM-1的癌症(如黑素瘤、NSCLC、转移性膀胱癌、肾癌、多发性骨髓瘤、胰腺癌、恶性胶质瘤和前列腺癌以及其它)中的潜能。

[0144] 本发明的方法通常涉及施用治疗有效量的病毒和治疗有效量的免疫刺激物质。本文使用的术语“治疗有效量”在其含义内包括病毒或免疫刺激物质的无毒但足以提供期望的治疗效果的量。如本文所指出的, 由于协同作用, 使用的病毒和免疫刺激物质的量可以低于它们在单一疗法(仅使用病毒或免疫刺激物质之一治疗对象中的癌症)中使用的量。所需的精确的量将因对象而不同, 其取决于诸如以下的因子: 被治疗的物种、对象的年龄和一般病况、被治疗的病况的严重性、被施用的特定药剂以及施用模式等等。因此, 不可能指定理论上精确的“有效量”。然而, 对于任何给定的情况, 可以通过本领域普通技术人员仅使用常规的实验确定适当的“有效量”。

[0145] 在一方面, 溶瘤病毒或溶瘤病毒的RNA和免疫刺激物质彼此结合使用用于治疗患有肿瘤或患有癌症的对象。在所述方法涉及将病毒物质和免疫刺激物质“共同施用”至对象的实施方案中, 应理解, 该术语意指施用所述药剂以便具有重叠的治疗活性, 并且不一定将所述药剂同时施用至对象。所述药剂在施用之前可以是物理组合的状态或者可以不是物理组合的状态。通常, 在施用之前或当施用所述药剂不是物理组合的状态。在实施方案中, 将病毒和免疫刺激物质同时地或约同时施用至对象。在实施方案中, 在施用免疫刺激物质之前将病毒施用至对象。

[0146] 通常, 将病毒以药物组合物的形式施用至对象, 所述药物组合物包含病毒和药学可接受的载体。组合物可以包含任意合适浓度的病毒, 如每ml约 10^5 个病毒颗粒至每ml约 10^{15} 个病毒颗粒的浓度范围、或每ml约 10^6 个病毒颗粒、或每ml约 10^7 个病毒颗粒或每ml约 10^8 个病毒颗粒、或每ml约 10^9 个病毒颗粒、或每ml约 10^{10} 个病毒颗粒、或每ml约 10^{11} 个病毒颗粒、或每ml约 10^{12} 个病毒颗粒、每ml约 10^{13} 个病毒颗粒、或每ml约 10^{14} 个病毒颗粒、或每ml约 10^{15} 个病毒颗粒。

[0147] 可以将病毒组合物的储存物稀释至适合于给药的适当体积, 例如以实现在期望体积中施用的病毒颗粒的期望剂量。例如, 可以向对象施用包含以下的病毒物质质量: 约 10^5 个病毒颗粒至约 10^{15} 个病毒颗粒、或约 10^6 个病毒颗粒、或约 10^7 个病毒颗粒、或约 10^8 个病毒颗粒、或约 10^9 个病毒颗粒、或约 10^{10} 个病毒颗粒、或约 10^{11} 个病毒颗粒、或约 10^{12} 个病毒颗粒、或约 10^{13} 个病毒颗粒、或约 10^{14} 个病毒颗粒、或约 10^{15} 个病毒颗粒。施用病毒的体积将受施用方式的影响。例如, 在治疗膀胱癌的情况下, 相比于通过囊内滴注进行的施用, 通过注射施用病毒将通常是较小的体积, 例如约0.5ml至约10ml, 所述囊内滴注通常可以使用约10ml至

约100ml、例如约20ml、约30ml、约40ml、约50ml、约60ml、约70ml、约80ml或约90ml或者与用于治疗膀胱癌滴注BCG的已知程序类似的体积。作为其它实例,病毒的静脉内施用通常可以使用约100ml至约500ml的病毒,所述病毒稀释于生理盐水中,在大约30分钟内通过自动泵注入。

[0148] 组合物还可包含药学可接受的稀释剂、赋形剂和/或佐剂。载体、稀释剂、赋形剂和佐剂在与组合物的其它成分兼容方面必须是“可接受的”,并且不是不可接受地有害于接受者对象。

[0149] 病毒可以以编码病毒的裸病毒RNA而不是病毒颗粒的形式施用,如描述于例如于2006年1月17日提交的标题为“治疗肿瘤的方法和组合物”的PCT/AU2006/000051(其公开为W02006/074526,将其全部内容通过引用并入本文)。在这样的实施方案中,病毒的RNA可以以脂质体的形式施用。脂质体通常源自磷脂或其它脂类物质,并且其通过分散于水介质的单层或多层含水液晶形成。可以使用能够形成脂质体的任何无毒的、生理可接受的且可代谢的脂类。脂质体形成中的组合物可以含有稳定剂、防腐剂、赋形剂等等。优选的脂类是天然的和合成的磷脂和磷脂酰胆碱(卵磷脂)。形成脂质体的方法是本领域已知的,并且与该具体参考文献有关:Prescott,Ed.,Methods in Cell Biology,Volume XIV,Academic Press,New York,N.Y. (1976),p.33 et seq.,将其内容通过引用并入本文。

[0150] 可以通过任何适当的手段,如通过注射将病毒施用至对象。注射可以是全身地、肠胃外、直接注射入癌症、或膀胱内注射。通常,在膀胱癌的治疗中,病毒的施用是膀胱内的(直接地注入膀胱)。

[0151] 通过技术人员已知的任何合适的手段可以进行肿瘤的病灶内注射,其考虑诸如以下的因素:被治疗的肿瘤类型、肿瘤的大小和位置、肿瘤直接注射的可及性。增加病毒在整个肿瘤上的分布或使病毒在整个肿瘤上的分布最大化的注射技术可以提供改善的治疗后果。例如,在黑素瘤和其它固体肿瘤的治疗中,可以以剂量高分割模式注射多处病灶,用最大的病灶开始(向>2.5cm的肿瘤注射2.0mL,向1.5cm至2.5cm的肿瘤注射1.0mL;向0.5cm至1.5cm的肿瘤注射0.5mL)至4.0mL最大量。用CVA21最初注射之后,可以按照规定的治疗日程表,用0.1mL CVA21注射直径降低至<0.5cm的任何注射病灶,直到病灶完全地溶解。

[0152] 使整个肿瘤上最初被感染的癌细胞和区域的数量最大化理论上将增加破坏的癌细胞的量。其还将增加由肿瘤产生的病毒子代的量,从而增加持续的病毒血用于接种远端肿瘤的机会。可以使用任何适当的手段以实现施用的病毒在肿瘤上的期望分布,并且对技术人员(addressee)来说是显而易见的。在将CVA21施用至肿瘤的背景中,下述描述了发明人在本文记录的实验中使用的一种示例性手段。

[0153] 将容纳所需病毒(如CVA21)体积的注射器和25号针头用于施用。基于待注射的肿瘤的直径可以如上所述地确定待施用的CVA21的体积。为了使注射器载有CVA21,从单独的硬纸盒移出小瓶并于室温(18-25℃)解冻。小瓶在室温下保持的时间不要长于解冻内容物需要的时间。将小瓶轻轻地混合5秒。使用适当体积的鲁尔锁紧接口注射器和21号针头来吸取所需的体积。移除气泡。移除抽取针头并更换为25号戴帽的针头。冰上保持直到需要(2-8℃)。在装载注射器3小时内施用,如下文所述,分配进肿瘤。

[0154] 在各注射日,注射可以在肿瘤内的9个区域中。所述区域不重叠,并且通过使用下述标志可以选择它们。第1天,病毒溶液的分布可以如下所述,第一次注射:(i)估计并标出

肿瘤的中心；(ii) 在肿瘤的周围45度辐射点进行标记；(iii) 针插入的位点在中心标记和270度辐射点之间，在近似的正中央-这是第一剂注射位点；(iv) 将分配的体积分为10份，并且将其分配进肿瘤内的9个区域。注射的靶区域是与辐射标记相邻的肿瘤内的区域，预计大约在肿瘤的外侧20%“边缘(rim)”。这将导致8次注射。前8次注射应当旨在深入到由超声引导的肿瘤的中线平面。最后的注射直接深入至预测的肿瘤中心，并且在该次注射中，第一剂旨在中线以上的深度并且包含20%的注射体积。

[0155] 将理解，仅出于示例的目的，提供前述计算的待施用的病毒量，以及所描述的可以施用病毒的方法，并且不意图限于本文所描述的发明。

[0156] 本发明提供用于治疗癌症的方法，所述方法包括人肠病毒C(如CVA21)与免疫刺激物质的联合使用。已作为许多最近研究和临床发展的对象的免疫刺激物质是靶向所谓的关卡抑制物质的免疫刺激物质。在关卡阻断中，人化单克隆抗体用来干扰宿主免疫关卡分子及其天然配体。在大量的晚期癌症患者(黑素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌和肾癌)中，此类分子包括PD-1、PDL1/L2和CTLA-4的阻断导致显著的抗肿瘤应答。免疫关卡分子通常的功能是保持宿主免疫系统平衡并且维持自身耐受性。特异阻断的免疫关卡分子使负反馈系统松懈并且提高宿主免疫系统的活性以特别是对癌细胞和抗原更有效。简言之，其松开宿主免疫系统的“生物手刹”。免疫关卡的阻断导致改善的持久肿瘤应答，转化为有意义的存活益处。尽管在大量癌症患者中显著的广泛肿瘤应答，仍需要增加由免疫关卡阻断引起的肿瘤应答的速率和持久性。

[0157] 如本文所证明的，溶瘤人肠病毒C(如CVA21)与免疫关卡阻断分子(免疫刺激物质)(如抗PD-1抗体或抗CTLA-4抗体)的联合在引起有利的肿瘤应答方面提供意外的优势。关于对免疫关卡分子的表达水平和宿主免疫细胞浸润的影响，重要的是已意外地鉴定了病毒的施用引起肿瘤微环境静态平衡的变化。因为大量的这些免疫上调方法涉及免疫刺激物质，如干扰素，特别是干扰素- γ 的直接活性，涉及施用人肠病毒C(如CVA21)以引起细胞内病毒复制的治疗方法是创始靶向破坏宿主免疫系统活性微妙平衡的有吸引力的方法。

[0158] 免疫刺激物质可以选自任何合适的药剂。在本发明的背景中，当被施用至个体时，免疫刺激物质将被理解为能够刺激对肿瘤细胞的免疫应答的任何药剂。在本发明的优选实施方案中，免疫刺激物质可以是与免疫关卡分子相互作用以阻断、减少或抵消所述免疫关卡分子或包含所述免疫关卡分子的复合物在降低个体的基于先天免疫的抗肿瘤应答方面的能力的任何药剂。因而，免疫刺激物质降低了免疫关卡分子对抗肿瘤应答具有的“手刹”效应。例如，免疫刺激物质可以是靶向选自以下的免疫关卡分子的任何药剂：PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、CD134、CD134L、CD137、CD137L、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、B7RP1、ICOS、TIM3、GAL9、CD28或OX-40。还应理解，当免疫刺激物质靶向免疫关卡时，本文使用的术语“免疫刺激物质”还被称为免疫关卡抑制物质。

[0159] 通常，免疫刺激物质可以是抗体，或者在优选的实施方案中，其可以是单克隆抗体。通过本领域熟知的方法可以进行用于本发明的抗体的制备，所述方法包括利用熟知的技术制备单克隆抗体并且针对高亲和力的抗体进行筛选，或者首先鉴定具有合理高亲和力的单克隆抗体，然后利用熟知的方法改善亲和力[例如，Huse, W.D., et al., *Internat'l Rev. Immunol.* 10:129-137 (1993)；Yelton, D.E., et al., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Wu, H., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:6037-6042 (1998)；Cramer, A., et

al., Nature Medicine 2:100-103 (1996); Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 91:10747-10751 (1994); Stemmer, Nature 370:389-391 (1994), 将与制备抗体有关的其各自的部分通过引用并入本文]。可选地, 可以获得而不是制备所述药剂。针对关卡抑制物质分子的示例性抗体包括纳武单抗 (BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、Lambrolizumab (MK-3475)、BMS-936559。所述纳武单抗是完全的人免疫球蛋白G4 (IgG4) 单克隆PD-1抗体, 是首次在患有转移性黑素瘤的107例患者的I期试验中测试的类型 [Sosman et al. 2012b]; 所述Lambrolizumab (MK-3475) 是人化单克隆IgG4PD-1抗体, 在包括患有转移性黑素瘤的132例患者的I期试验中对其进行研究 [Iannone et al. 2012]; 所述BMS-936559是完全的人IgG4PD-L1抗体, 在作为I期试验一部分的患有转移性黑素瘤的55例患者中进行测试 [Brahmer et al. 2012]。

[0160] 在治疗特定癌症类型的患者中, 技术人员将意识到, 另外的治疗方法或步骤也可以是合适的。例如, 在膀胱癌患者的治疗中, 本发明的方法在施用病毒之前可任选地包括膀胱的清洗或冲洗例如以通过移除或减少可以降低病毒功效的物质的存在来制备具有改善的病毒接受性的膀胱。例如, 膀胱上皮受糖胺聚糖 (GAG) 层的保护, 所述糖胺聚糖层的破坏可以允许病毒与细胞更有效的结合, 并且因而更有效的转导细胞。在非限制性实例DDM (n-十二烷基- β -D-麦芽糖苷) 中, 用作食品添加剂和增溶剂的非离子温和清洁剂可以用来以任意适当的浓度, 例如约0.1%的浓度破坏或移除GAG层, 并且从而帮助促进转导。

[0161] 本发明的方法可以与癌症的外科治疗联合使用。例如肿瘤切除术之后可以使用本发明所述的联合方法治疗对象。期望这可以预防或减少肿瘤的复发。

[0162] 所述方法可以包含病毒或免疫刺激物质中任一种或多种的单次剂量或多次剂量, 所述免疫刺激物质是例如与表面表达的PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4或OX-40特异性结合的单克隆抗体的物质。

[0163] 本发明还涉及用于本发明的方法中的试剂盒。在基本的形式中, 试剂盒可以包含含有人肠病毒C和药学可接受的载体的药物组合物, 以及所述组合物与化疗剂或放射物联合使用用于治疗患者中的癌症的说明。可以将组合物提供在任何合适的容器中, 如例如小瓶、安瓿瓶或注射器。组合物可以提供为冻干的、冷冻干燥的、液体形式或冰冻状态。

[0164] 试剂盒可以包含任意数量的另外组分。以非限制性实例的方式, 另外的组分可以包括 (i) 一种或多种抗病毒物质, 如Pleconil; (ii) 包含溶瘤病毒的一种或多种另外的药物组合物; (iii) 包含溶瘤病毒的RNA的一种或多种另外的药物组合物; (iv) 有益于治疗患者中的癌症的一种或多种另外的治疗剂。试剂盒还可包含用于联合疗法的免疫刺激物质, 如与表面表达的PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4或OX-40特异性结合的单克隆抗体。试剂盒还可以包含这样的组合物, 其被容纳在一次性小瓶中、容纳在预装注射器中用于直接人体施用、稀释于生理溶液中用于静脉内输注或者是能够用生理溶液适当稀释的浓缩形式。此类溶液可以是, 例如, 磷酸盐缓冲盐溶液或生理浓度的NaCl。

[0165] 本文使用的术语“试剂盒”指用于递送材料的任何递送系统。在药物组合物的背景中, 此类递送系统包括允许将治疗剂 (例如, 在合适容器中的溶瘤病毒; 或在合适容器中的免疫刺激物质) 和/或支持材料 (例如, 缓冲液、使用组合物的书面说明等) 从一个位置储存、运输或递送至另一位置的系统。例如, 试剂盒包括含有相关组分和/或支持材料的一种或多种壳体, 如盒子。

[0166] 试剂盒可以是分立式试剂盒。本文使用的术语“分立式试剂盒”指包含两个或更多个单独容器的递送系统,所述容器各自还有总试剂盒组分的子部分。可将容器一起或分别地递送至预期的接受者。分立式试剂盒可以是适合的,例如,根据不同的条件,如在不同的温度下,相比于一种或多种其它组分,可以最佳地储存和/或运输诸如病毒或免疫刺激物质的一种或多种组分。的确,在术语“分立式试剂盒”中包括包含两个或更多个单独容器的任何递送系统,所述两个或更多个单独容器各自含有总试剂盒组分的子部分。相反,“组合式试剂盒”指在单个容器(例如,在放置各期望组分的单一盒子中)中含有反应分析的所有组分的递送系统。术语“试剂盒”包括分立式试剂盒和组合式试剂盒二者。

实施例

[0167] 实施例1:溶瘤CVA21病毒疗法与免疫刺激抗体抗PD-1的联合

[0168] 该研究调查了CVA21溶瘤病毒疗法与免疫刺激抗体抗PD-1的联合在恶性黑素瘤的B16-ICAM-1鼠模型中的效力。小鼠皮内植有肿瘤(2×10^5 个细胞)并且在开始疗法之前允许建立12天。在第12天、第15天、第18天和第21天,用盐水、CVA21或UV灭活CVA21与鼠抗PD-1抗体或相配的对照抗体联合处理小鼠。盐水、CVA21或UV灭活CVA21的处理瘤内施用,而抗PD-1和对照抗体腹腔内施用。基于肿瘤破溃或体重大于10%的损失为终点,用CVA21与抗PD-1抗体联合处理的动物相比于对照组中的动物(盐水+对照抗体)显示微微的存活益处。在第12天和第21天之间的处理期间,CVA21+抗PD-1的联合显示抑制肿瘤(tumoristatic)作用,然而一旦停止疗法,肿瘤体积缓慢地增加。尽管这样,相比于盐水+对照抗体、UV-CVA21+对照抗体和UV-CVA21+抗PD-1抗体处理组,该组中的动物显示统计学上显著的存活优势。该研究还证实了抗PD-1抗体的免疫刺激特性,因为相对接受CVA21+对照抗体的小鼠,在接受CVA21+抗PD-1的小鼠中检测到较高水平的抗CVA21中和抗体水平。总之,该研究的主要发现是,用CVA21+抗PD-1处理的荷瘤小鼠显示与肿瘤生长的阻滞和肿瘤破溃的减少有关的总存活益处。

[0169] 测试材料:病毒

[0170] 测试物,柯萨基病毒A21 (CVA21) [商品名:CAVATAK™]由Viralytics有限责任公司提供。从商业制备的CAVATAK™小瓶制取用于体外使用的研究储液。批次:CCVA2115;浓度: 1×10^9 TCID₅₀/ml (1.1ml小瓶);实施例2和3的再测试日期:2008年12月,2014年1月;储存推荐:在-70℃以下储存。

[0171] 通过使7ml同一CAVATAK™批次:CVA2115产品在生物安全柜(biohazard hood)中暴露于紫外光1小时来制备UV灭活CVA21。首先将病毒从最初的产品小瓶转移至6孔板的孔,并且暴露于大约10cm距离处的紫外光源1小时。然后将UV灭活病毒分成小份并于-80℃冷冻。

[0172] 抗体

[0173] 对照抗体

[0174] 将来自BioXCell的抗体InVivoMAb Rat IgG2a用作实施例1和2中的对照抗体。克隆:2A3.目录#:BE0089.亚批(Lot):4807/0713.内毒素:<0.35EU/mg.制剂:PBS,pH 6.5.无菌:0.2μm过滤.纯度:>95%.储存:4℃,不稀释,黑暗。将来自BioXCell的抗体InVivoMAb Rat IgG2b用作实施例3中的对照抗体。克隆MPC-11.目录#:BE0086.亚批:4700-2/0414.内毒素:<2.0EU/mg.制剂:PBS,pH 7.无菌:0.2μm过滤.纯度:>95%.储存:4℃,不稀释,黑暗。

[0175] 抗PD-1

[0176] 活性抗鼠PD-1抗体获自BioXCell。产品名:InVivoMAb anti m PD-1。克隆:RMP1-14。目录#:BE0416。亚批:4781/0813。内毒素:<0.61EU/mg。制剂:PBS,pH 7。无菌:0.2μm过滤。纯度:>95%。储存:4℃,不稀释,黑暗。

[0177] 抗CTLA-4

[0178] 活性抗鼠CTLA-4抗体获自BioXCell。产品名:InVivoMAb anti m CTLA-4。克隆:9D9。目录#:BE0164。亚批:5159/0414。内毒素:< 2.0EU/mg。制剂:PBS,pH 7。无菌:0.2μm过滤。纯度:>95%。储存:4℃,不稀释,黑暗。

[0179] 细胞

[0180] 将人黑素瘤细胞系SK-Mel-28以及鼠黑素瘤细胞系B16和B16-ICAM-1用于该研究中。黑素瘤细胞系SK-Mel-28获自ATCC(美国模式培养物保藏中心)。Mel-RM由P.Hersey博士(纽卡斯尔大学,New South Wales,Australia)赠送。B16鼠黑素瘤细胞最初获自A.Shurbier博士(昆士兰医学研究所,Brisbane,Queensland,Australia),然后稳定地转染有人ICAM-1基因以产生细胞系B16-ICAM-1。所有的细胞系维持于DMEM(Thermo Scientific)中,所述DMEM含有10%胎牛血清(FCS)(SAFC Biosciences™,Australia),10mM 无菌N-2-羟乙基哌嗪N'-2-乙磺酸(HEPES)(ThermoScientific,Australia),2mM L-谷氨酰胺(ThermoScientific,Australia),丙酮酸钠(Invitrogen,Australia)和100IU/ml青霉素-链霉素(Invitrogen,Auckland,NZ)。将所有细胞在5%CO₂环境中于37℃培养。

[0181] 动物

[0182] 所有的动物工作被纽卡斯尔大学动物管理伦理委员会(ACEC)批准,批准号:A-2013-327。通过纽卡斯尔大学的动物服务单位获得六至八周龄的雌性C57BL/6小鼠(n=52)。将它们维持在动物资源设施中特定的无病原体的区域中,在单独通风笼内。将小鼠在4个组中饲养,在与PC2实验室内的Techni-Plast Slim Line空气处理系统连接的HEPA过滤的Techni-Plast笼(1145IVC)内,12/12小时的明/暗循环。用由Specialty Feeds,WA,Australia制造的小鼠方块/球喂养小鼠,随意进食。将该标准的小鼠饲料配制成具有低的脂肪含量(大约5%)并且不含肉。房间中的气流每小时进行12至15次换气,但是IVC笼中的气流是每小时70次的更换速率。用不褪色笔通过尾部标记鉴别小鼠。根据动物伦理委员会批准的方案进行所有的动物研究。在研究的结尾或当动物达到人道端点时,通过CO₂窒息使小鼠安乐死。

[0183] 方法

[0184] 病毒TCID₅₀分析

[0185] 用CVA21的10倍连续稀释液(一式四份的100μL/孔)对96孔组织培养板中的SK-Mel-28细胞的汇合单层进行接种,并于37℃在5%CO₂环境中孵育72小时。将小鼠血清在含2%胎牛血清(FCS)的DMEM中连续10倍稀释,从1:10²至1:10⁸。在倒置显微镜下,针对致细胞病变效应(CPE)视觉上对孔进行评分。将具有可检测CPE的孔评分为阳性的,并且使用Karber方法(Dougherty1964)计算50%病毒端点滴度。

[0186] 病毒中和分析

[0187] 为了测试中和抗体的存在,首先将热灭活的小鼠血清样本在DMEM(2%FCS)中稀释,1:32至1:2048。将一百微升各血清稀释液与100μL CVA21(100TCID₅₀)于37℃孵育1小时。

然后将五十微升的该血清/病毒混合物以一式三份接种在384孔形式中的SK-Mel-28细胞上。通过联邦血清实验室商购获得A+IgG(阳性对照)(Sandoglobulin NF Liquid,批号:4322800002)。在倒置显微镜下,针对病毒中和(缺少CPE)的存在视觉上对孔进行评分。然后,使用Karber方法(Dougherty1964)计算中和抗体滴度。

[0188] 黑素瘤的免疫活性B16-ICAM-1小鼠模型

[0189] 将年龄在六至八周的五十二只雌性C57BL/6小鼠(动物服务单位,纽卡斯尔大学,Australia)在如上所述的相同条件中饲养。在注射肿瘤细胞之前的三天,使用电剃光小鼠的后肋以允许足够的恢复时间。用胰蛋白酶收获B16-ICAM-1细胞,洗涤两次并在无菌PBS中重悬。通过台盼蓝染色并用TC-10自动细胞计数器(Biorad,Hercules,California,USA)分析来评估所制备细胞的活力,并且只将具有>95%活力的细胞制备物用于异种移植。在肿瘤移植之前,用5%异氟烷使动物麻醉。在小鼠的后肋,用50 μ L体积PBS中的 2×10^5 个B16-ICAM-1细胞的单一注射液,皮下接种肿瘤。

[0190] 实施例1-3中使用的处理组和方案的综述简要如下。

[0191] 在实施例1中,用盐水、CVA21(1×10^8 /注射)或UV-灭活CVA21(1×10^8 /注射),与对照抗体或抗PD-1抗体(分别为12.5mg/kg)联合处理动物。在肿瘤细胞植入后12天起始处理,动物首先接受瘤内处理(0.1ml),之后立即接受腹膜内抗体(0.2ml)。给予小鼠四次疗法进程,每3天一次,自肿瘤接种后第12天开始,第21天结束。用于实施例1的处理日程表的概要在图1中示出。

[0192] 在实施例2中,用盐水或CVA21(1×10^8 TCID₅₀/注射)与对照抗体或抗PD-1抗体(分别为12.5mg/kg)联合处理动物。在肿瘤细胞植入后6天起始治疗,动物首先接受瘤内治疗(0.1ml/小鼠),之后立即接受腹膜内抗体(0.2ml/小鼠)。给予小鼠四次疗法进程,每3天一次,在肿瘤接种后第6天开始,以及第15天结束。其后每一星期间隔给予动物另外补充注射的CVA21盐水(1×10^8 TCID₅₀/注射),持续四周。用于实施例2的处理日程表的概要在图8中示出。

[0193] 在实施例3中,用盐水、CVA21(1×10^8 TCID₅₀/注射)与对照抗体或抗CTLA-4抗体(分别是12.5mg/kg)联合处理动物。肿瘤细胞植入后7天起始治疗,动物首先接受瘤内治疗(0.1ml),之后立即接受腹膜内抗体(0.2ml)。间隔3天给予小鼠四次处理,肿瘤接种后第10天开始,至第16天结束。用于实施例3的处理日程表的概要在图12中示出。

[0194] 在实施例4中,在第7天、第10天、第13天和第16天,用静脉内盐水或静脉内CVA21(1×10^8 TCID₅₀[5.56×10^9 TCID₅₀/kg,假设为18g小鼠])与如上所述的鼠抗PD-1或抗CTLA-4或抗PD-1+抗CTLA-4抗体或相配的对照抗体(12.5mg/kg)联合处理小鼠。盐水或CVA21的处理静脉内施用,而抗CTLA-4、抗PD-1和对照抗体腹腔内施用(每组n=12-14)。如技术人员将理解,腹膜内施用是使抗体进入血流的有效方式,并且因此提供用于全身施用的合适模型。

[0195] 一周两次测量肿瘤,并且基于球状体的体积估算肿瘤的体积, $V = \Pi/6 \cdot a \cdot b^2$,其中“a”和“b”分别是肿瘤的最长和最短垂直直径。以每周一次的基础通过静脉穿刺隐静脉收集来自所有小鼠的血液,并且于室温下10,000rpm离心5分钟收集血清。将血清样本储存于-80 $^{\circ}$ C,直到进一步测试。当肿瘤变得破溃或者体重损失超出10%时,通过CO₂窒息人道地使动物安乐死,不然的话,在研究的终点(实施例1中第45天;实施例2中第66天;实施例3中第77天)处死小鼠。

[0196] 表1:免疫活性C57BL/6小鼠模型:处理组的小鼠识别号和分配

	第1组 NTC	第2组 盐水+ 对照Ab	第3组 盐水+抗 PD-1	第4组 UV CVA21 +对照 Ab	第5组 UV CVA21 +抗PD-1	第6组 CVA21 +对照 Ab	第7组 CVA21 + 抗PD-1
[0197]	1515	1519	1523	1551	1539	1531	1559
	1516	1520	1524	1552	1540	1532	1560
	1517	1521	1525	1553	1541	1533	1561
	1518	1522	1526	1554	1542	1534	1562
	-	1527	1535	1555	1547	1543	1563
	-	1528	1536	1556	1548	1544	1564
	-	1529	1537	1557	1549	1545	1565
	-	1530	1538	1558	1550	1546	1566

[0198] 统计分析

[0199] 使用GraphPad Prism v6.0 (GraphPad软件公司) 分析并绘制所有数据。为了分析动物数据,使用GraphPad Prism v6.0 (GraphPad软件公司) 使用两因素方差分析 (具有重复的测量值) 和邦费罗尼事后检验来比较处理组之间的肿瘤体积的差异。使用对数秩 (Mantel-Cox) 检验进行存活曲线的比较。

[0200] 结果

[0201] 在免疫活性小鼠模型中体内评估联合的溶瘤病毒疗法和抗PD-1免疫疗法

[0202] 为了评估联合的CVA21和抗PD-1疗法方法在黑素瘤的免疫活性小鼠模型中是否有效,在C57BL/6小鼠的后肋皮下植入鼠B16-ICAM-1肿瘤细胞 (2×10^5 个)。在肿瘤接种后的第12天、第15天、第18天和第21天开始疗法之前允许肿瘤建立 (参见图1)。在指定的时间点瘤内施用盐水或CVA21,而腹腔内施用对照抗体或抗PD-1抗体。每天监测小鼠,并且一周多至三次进行称重,一周两次通过电子卡尺测量肿瘤体积。每一星期间隔从隐静脉进行血液采样。在肿瘤接种后第45天终止研究。

[0203] 用盐水、CVA21或UV-灭活CVA21与抗PD-1或对照抗体联合处理之后的体重

[0204] 一周多至三次对动物进行称重,并且使用FileMaker Pro和用于保存记录的专利动物监测数据库电子记录结果 (内部编号:实验#53)。可在表2至表10中找到原始重量。还将重量抄写至动物监测清单/记录以满足我们机构的动物管理伦理委员会的要求。除了第31天的UV-CVA21+抗PD-1组之外,在任何时间点,在处理组和NTC小鼠之间观察到平均体重无统计学显著差异 (使用Holm-Sidak方法,针对多重比较进行多重t检验校正) (用于Mac OS X Version 6.0c的Prism 6, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com)。动物似乎很好地耐受CVA21和抗PD-1疗法,并且不存在可观察的来自处理的毒性。由于肿瘤破溃和/或大于10%体重损失,使总共9只动物安乐死。在大多数情况下,重量的减少与肿瘤破溃和相关的肿瘤负担有关。

[0205] 表2:免疫活性动物模型:第1组-无肿瘤的对照 (NTC) 小鼠的各小鼠体重

[0206]

	第1组- NTC -小鼠编号			
研究天数	1515	1516	1517	1518
-2	15.34	16.13	18.02	17.23
0	15.6	16.86	17.65	17.45
3	16.4	17.5	18.16	18.57
5	16.99	17.92	18.07	18.21
7	17.46	17.54	18.31	18.2
10	17.41	18.45	18.25	18.22
12	17.97	18.11	19.29	18.47
14	17.73	18.87	18.85	19.24
17	17.95	19.18	19.54	18.52
19	18.01	19.15	18.96	19.3
21	18.94	19.15	19.4	20.18
24	18.52	19.02	19.32	19.43
26	19.81	20.07	19.95	19.59
28	18.92	18.99	19.89	19.43
31	19.68	19.64	20.05	19.62
33	19.03	19.45	20.2	20.22
35	20.21	20.12	20.06	20.85
38	19.89	19.96	20.26	20.79
40	20	20.83	20.78	21.04
42	19.69	20.98	21.02	21.9
45	19.98	20.95	20.68	22.32

[0207] 表3:免疫活性动物模型:第2组-盐水+对照Ab处理小鼠的各小鼠体重

[0208]

	第2组-盐水+对照Ab-小鼠编号							
研究天数	1519	1520	1521	1522	1527	1528	1529	1530
-2	17.44	17.31	17.24	16.41	15.79	17.94	16.52	15.79
0	17.49	17.1	17.21	15.46	15.74	17.11	17.13	15.75
3	17.59	17.6	16.96	16.39	15.73	17.77	16.31	15.85
5	17.71	17.61	16.85	16.02	16.13	18.14	17.08	16.41
7	18.37	18.11	17.76	16.23	16.88	18.19	17.15	16.76
10	17.98	18.5	18.58	16.07	17.39	18.72	17.46	17.29
12	19.2	19.14	18.63	17.01	17.36	18.62	17.54	16.9
14	-	18.41	16.55	16.54	17.28	18.72	17.57	16.23
17	-	18.82	-	16.75	18.06	18.97	18.13	-
19	-	19.58	-	17.32	17.86	19.08	17.86	-
21	-	19.31	-	17.4	17.22	19.54	18.73	-
24	-	19.86	-	18.11	-	20.24	18.5	-
26	-	19.92	-	18.79	-	20.4	19.84	-
28	-	20.49	-	19.02	-	19.7	20.14	-
31	-	20.69	-	19.4	-	-	21.43	-

[0209]

[0210] 表4:免疫活性动物模型:第3组-盐水+抗PD-1处理小鼠的各小鼠体重

[0211] 第3组-盐水+抗PD-1-小鼠编号

[0212]

研究天数	1523	1524	1525	1526	1535	1536	1537	1538
-2	16.03	17.41	16.25	16.95	17.18	15.65	15.25	17.14

0	16.66	17.63	16.08	16.73	16.68	15.6	15.81	16.64
3	16.77	17.8	16.78	16.96	16.85	15.64	15.93	16.88
5	17.61	18.56	17.07	17.53	17.07	16.29	16.21	17.18
7	18.08	18.37	17.32	17.34	17.89	16.64	16.71	18.03
10	18.33	19.48	17.58	17.49	17.92	16.75	17.53	18.12
12	18.57	19.17	18.35	16.83	18.41	16.72	17.69	18.87
14	18.68	19.55	17.61	14.06	-	16.97	16.25	18.17
17	19.03	19.72	17.76	-	-	-	-	19.43
19	18.8	19.49	17.54	-	-	-	-	19.95
21	19.47	20.38	17.93	-	-	-	-	20.22
24	18.96	20.14	18.08	-	-	-	-	20.31
26	19.66	20.8	18.3	-	-	-	-	20.34
28	19.42	20.27	18.61	-	-	-	-	20.6
31	20.37	21.3	18.24	-	-	-	-	20.65
33	-	20.9	18.52	-	-	-	-	21.37
35	-	21.54	18.68	-	-	-	-	21.58
38	-	23.02	19.34	-	-	-	-	22.4
40	-	23.47	19.91	-	-	-	-	23.12
42	-	-	20.34	-	-	-	-	-
45	-	-	21.05	-	-	-	-	-

[0213] 表5:免疫活性动物模型:第4组-UV CVA21+对照Ab处理小鼠的各小鼠体重

研究天数	第4组-UV CVA21+对照Ab-小鼠编号							
	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558

[0215]	-2	16.05	14.82	16.43	15.56	16.09	14.88	15.62	16.9
	0	16.12	14.99	16.88	15.42	15.97	15.23	15.79	16.64
	3	16.66	15.45	17.32	16.07	15.92	15.67	16.36	17.01
	5	16.98	15.65	17.49	16.41	16.02	16.02	16.09	17.19
	7	17.2	16.35	18.22	16.63	16.6	16.2	16.67	17.8
	10	18.09	15.18	18.26	17.48	16.4	15.23	16.62	17.78
	12	17.81	15.66	18.94	17.1	16.69	-	-	18.2
	14	17.92	16.02	18.58	17.35	16.33	-	-	17.74
	17	-	16.03	18.66	17.64	16.62	-	-	17.27
	19	-	16.12	18.77	17.05	17.13	-	-	18.41
	21	-	16.45	19.43	17.85	17.21	-	-	18.7
	24	-	17.45	19.82	17.75	17.82	-	-	19.41
	26	-	17.71	21.26	18.66	17.9	-	-	19.89
	28	-	17.91	18.66	18.7	19.14	-	-	18.77
	31	-	19.09	-	19.19	18.73	-	-	-
	32	-	17.9	-	-	-	-	-	-
	33	-	-	-	19.63	20.53	-	-	-
	35	-	-	-	-	20.88	-	-	-

[0216] 表6:免疫活性动物模型:第5组-UV CVA21+抗PD-1处理小鼠的各小鼠体重

[0217]

	第5组- UV CVA21 +抗PD-1 -小鼠编号							
研究天数	1539	1540	1541	1542	1547	1548	1549	1550
-2	16.96	15.96	17.42	16.43	18.51	15.41	15.61	17.99
0	17.05	15.9	17.15	16.45	17.39	15.82	15.34	17.34
3	16.96	16.5	16.97	17	18.72	16.8	15.9	18.09
5	17.53	17.06	17.38	17.14	18.18	16.88	15.51	17.87
7	17.88	17.06	18.3	17.31	18.93	17.16	16.33	18.51
10	18.24	17.97	18.19	17.61	18.37	17.95	16.38	18.17
12	18.93	17.71	19.14	17.72	19.84	18.23	16.47	18.58
14	17.72	18.16	18.59	17.83	19.42	17.82	16.52	19.06
17	-	17.65	19.03	17.68	19.57	18.48	16.93	18.78
19	-	18.11	18.73	18.36	19.94	19.21	16.87	19.21
21	-	18.33	18.78	18.11	19.93	19.1	17.16	19.97
24	-	18.86	19.31	18.95	20.38	20.08	17.46	20.27
26	-	19.49	20.44	18.62	21.02	19.42	18.15	21.5
28	-	18.59	20.65	18.92	21.57	20.06	18.17	21.35
31	-	18.95	22.04	18.64	21.66	19.93	-	22.79
32	-	19.29	21.37	-	-	-	-	-
33	-	-	-	18.81	23.07	20.78	-	23.53
34	-	-	-	-	-	20.53	-	-
35	-	-	-	18.94	23.62	-	-	-
38	-	-	-	19.78	-	-	-	-
40	-	-	-	19.55	-	-	-	-
42	-	-	-	20.03	-	-	-	-
45	-	-	-	20.39	-	-	-	-

[0218] 表7:免疫活性动物模型:第6组-CVA21+对照抗体处理小鼠的各小鼠体重

[0219]

	第6组- CVA21 +对照Ab-小鼠编号							
研究天数	1531	1532	1533	1534	1543	1544	1545	1546
-2	16.26	13.98	15.65	15.27	16.13	16.8	14.75	15.63
0	16.7	14.05	15.87	15.48	16.34	16.19	14.59	15.77
3	16.75	13.69	16.06	15.81	16.53	16.83	14.93	16.91
5	16.93	14.14	16.73	16.17	17.25	17.14	15.4	16.51
7	17.06	15.05	17.19	16.67	18.09	17.2	15.7	17.46
10	16.85	14.75	17.32	16.81	18.21	17.98	15.76	16.48
12	17.32	14.8	18.22	17.03	18.82	17.99	15.82	16.45
14	16.88	14.69	17.19	16.91	18.47	17.52	16.13	-
17	17.04	15.25	18.59	17.11	19.4	17.97	16.02	-
19	17.35	15.51	18.39	17.38	19.31	17.91	16.79	-
21	17.69	15.64	18.65	17.44	19.69	18.19	16.41	-
24	17.84	14.33	18.96	18.12	19.74	18.72	17.54	-
26	18.75	-	-	17.57	21.15	19.61	17.64	-
28	18.77	-	-	-	19.91	20.33	18.27	-
31	18.51	-	-	-	-	18.19	18.44	-
33	19.37	-	-	-	-	-	18.98	-
35	19.97	-	-	-	-	-	20.35	-
38	20.96	-	-	-	-	-	21.01	-
40	21.68	-	-	-	-	-	-	-
42	22.37	-	-	-	-	-	-	-
45	24.67	-	-	-	-	-	-	-

[0220]

表8:免疫活性动物模型:第7组-CVA21+抗PD-1处理小鼠的各小鼠体重

[0221]

	第7组- CVA21 +抗PD-1-小鼠编号							
研究天数	1559	1560	1561	1562	1563	1564	1565	1566
-2	17.88	16.47	16.52	19.57	15.37	16.5	16.68	17.03
0	18.02	16.59	16.73	19.24	16.45	16.46	16.19	16.47
3	17.84	17.03	17.4	18.91	17.34	16.54	16.8	17.15
5	18.35	16.62	17.88	19.38	17.69	17.07	16.61	16.68
7	19.09	17.25	17.89	19.98	17.82	16.77	17.17	17.28
10	19.63	17.6	18.53	20.61	19.05	17.59	17.06	17.66
12	18.44	17.79	19.2	21.32	19.47	17.43	17.62	18.18
14	18.39	17.45	19.16	20.23	19.12	17.37	17.57	17.88
17	19.34	17.24	18.92	21.07	19.36	17.48	17.59	17.87
19	19.32	17.74	19.27	20.69	19.96	17.37	18.25	18.11
21	19.8	17.54	19.54	21.25	20.54	17.38	17.58	18.13
24	20.02	18.29	19.7	20.76	20.28	17.76	18.79	18.23
26	19.15	18.5	20.89	21.76	21	18.01	18.69	18.61
27	18.25	-	-	-	-	-	-	-
28	-	18.84	19.82	21.67	21.68	18.61	18.77	19
31	-	19.44	21.06	22.94	21.92	18.56	18.7	18.81
33	-	20.09	20.9	20.88	18.94	19.37	19.62	19.53

[0222]	35	-	18.62	21.82	-	-	19.09	19.8	19.94
	36	-	-	-	-	-	16.21	-	-
	37	-	16.05	-	-	-	-	-	-
	38	-	-	22.15	-	-	-	20.67	20.77
	40	-	-	24.17	-	-	-	19.03	21.68
	42	-	-	24.15	-	-	-	-	20.27
	45	-	-	23.23	-	-	-	-	19.96

[0223] 表9、表10和表11包含在本文档的附图部分。

[0224] 用盐水、CVA21或UV-灭活CVA21与抗PD-1或对照抗体联合处理之后的肿瘤体积数据

[0225] 使用电子游标卡尺一周两次测量肿瘤体积。在第31天前,由于由肿瘤体积和肿瘤破溃所证实的渐进性疾病,使所有的盐水+对照抗体处理小鼠安乐死。如图4所示,在UV-CVA21+对照抗体处理肿瘤中几乎没有观察到抗肿瘤活性。在第35天,所有的肿瘤体积增大达到最大的人道端点,并且需要安乐死。在最初的肿瘤开始体积中存在高度的可变性,并且用于活性CVA21+抗PD-1的最适当的对照被认为是UV-CVA21+抗PD-1处理组,而不是盐水+抗PD-1(在完成疗法之前3只动物需要安乐死)。在第24天,使用双尾t检验,UV-CVA21+抗PD-1和CVA21+抗PD-1处理之间肿瘤体积的比较揭示了存在显著性差异($p < 0.0039$)。在处理的有效期期间,相比于UV-灭活CVA21,活CVA21+抗PD-1组中的小鼠中肿瘤的明显缩小是最显著的,并且在大多数组中最后肿瘤复发。

[0226] 免疫活性小鼠的病毒清除以及抗CVA21中和抗体的增加水平

[0227] 在第12天,瘤内注射病毒后大约45分钟,在病毒处理动物的血清中检测到感染性CVA21。尽管用CVA21瘤内进行另外的处理,在第19天前第一周内血液中的循环病毒被清除。用活CVA21处理的动物产生最高水平的CVA21中和抗体,在第26天达到最高。考虑到这些小鼠具有功能性免疫系统,从血流清除CVA21并不意外。意外地是,抗PD-1抗体的施用似乎提高了抗病毒免疫应答,这些小鼠显示大于1:228中和单位的升高水平的抗CVA21抗体,其持续向上直到第45天。这可能是抗PD-1抗体作用的结果,其允许较大程度的病毒复制,和随后的抗病毒抗体产生。该发现提高了这样的可能性:不仅产生升高水平的抗病毒抗体,而且在该过程中产生了较高水平的特异性抗肿瘤抗体,此类抗肿瘤抗体可以导致由于降低肿瘤负担得到的临床益处(抗体依赖性细胞毒性)。

[0228] 用CVA21与抗PD-1联合处理的小鼠相对盐水和抗PD-1提高的存活

[0229] 相比于盐水+对照抗体组,CVA21与抗PD-1抗体的联合证明表现了统计学显著的总存活改善($p = 0.014$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图7E)。将盐水+抗PD-1和盐水+对照抗体组进行比较,不存在统计学显著差异。这暗示了在存活方面对照抗体和抗PD-1抗体之间不存在差异。当将盐水+抗PD-1的存活曲线与CVA21+抗PD-1处理组相比时,不存在统计学差异($p = 0.4901$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图7B)。该发现暗示,存活的主效应主要基于抗PD-1,然而有点意外地是,UV-灭活CVA21组与抗PD-1和活性CVA21组与抗PD-1之间的比较揭示了活CVA21给予了另外显著的存活时间优势。由于开始肿瘤可变性的程度高和早期处死,严格分析相关的存活益处明显具有挑战性。然而,在有效处理期期间,观察到活CVA21+抗PD-1处理组相比于盐水+抗PD-1组具有显著的存活益处趋势。

[0230] 讨论

[0231] 结果表明,相比于盐水+对照抗体处理组,活CVA21与抗PD-1抗体的联合使用产生最好的总存活。相比于盐水+对照抗体组,CVA21与抗PD-1抗体的联合表明了统计学显著的总存活改善($p=0.014$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图7E)。将盐水+抗PD-1和盐水+对照抗体组进行比较,不存在统计学显著差异。这暗示了在存活方面对照抗体和抗PD-1抗体之间不存在差异。当将盐水+抗PD-1的存活曲线与CVA21+抗PD-1处理组相比时,不存在统计学差异($p=0.4901$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图7B)。该发现暗示了,存活的主效应主要基于抗PD-1,然而,基于我们组大小的有限性,CVA21的添加相比于盐水没有显著地提高存活。有趣的是,UV-灭活CVA21组与抗PD-1和活性CVA21组与抗PD-1之间的比较显示活CVA21产生稍微较长的存活时间,并且是统计学显著的。这符合我们的假设:在免疫刺激作用的抗PD-1抗体的存在下,相比于灭活病毒颗粒,主动地复制CVA21并裂解肿瘤细胞可以更有效地刺激抗肿瘤免疫力。UV-灭活CVA21+抗PD-1抗体组的存活没有统计学地不同于UV-灭活CVA21+对照抗体组或CVA21+对照抗体组的存活。

[0232] 该研究的重要发现是CVA21+抗PD-1处理的荷瘤小鼠显示与肿瘤生长的阻滞以及肿瘤破溃的减少有关的总存活益处。在治疗的有效期期间,用CVA21+抗PD-1抗体处理的动物相对于对照组显示变慢的疾病进展。

[0233] 实施例2:溶瘤CVA21病毒疗法与免疫刺激抗体抗PD-1联合:肿瘤再激发研究

[0234] 该研究是实施例1中记载的工作的延续,其调查了柯萨基病毒A21 (CVA21) 溶瘤病毒疗法与免疫刺激抗体抗PD-1的联合在恶性黑素瘤的B16-ICAM-1鼠模型中的效力。实施例2的时间线表示显示于图8中。与实施例1不同,实施例2的总时间线是66天并且包括下文更详细描述“肿瘤再激发”。尽管用于实施例2的小鼠的年龄是四至六周,实施例2中使用的材料和方法在其他方面大体上如实施例1所述。

[0235] 小鼠在右后肋皮内植入B16-ICAM-1肿瘤(2×10^5 个细胞),并且在开始疗法之前允许建立6天。在第6天、第9天、第12天和第15天,用盐水或CVA21(1×10^8 TCID₅₀[5.56×10^9 TCID₅₀/kg])与鼠抗PD-1抗体或相配的对照抗体(12.5mg/kg)联合处理小鼠。盐水或CVA21的处理瘤内施用,而抗PD-1和对照抗体腹腔内施用(每组的 $n=12$)。其后每一星期期间隔施用盐水或CVA21(1×10^8 TCID₅₀[5.56×10^9 TCID₅₀/kg])的另外补充注射,持续四周。使用数字卡尺,每2至3天定期地监测原发B16-ICAM-1黑素瘤肿瘤,并且肿瘤体积的计算基于针对球状体的公式,所述公式利用肿瘤的x/y平面上的两条最长垂直轴。使肿瘤显示破溃征象、重量损失 $>10\%$ 或肿瘤体积大于 2500mm^3 的动物安乐死。

[0236] 在第31天,用 1×10^5 个B16鼠黑素瘤细胞(所述细胞缺少人-ICAM-1受体)皮内再激发剩余的动物以确定在CVA21病毒疗法与抗PD-1疗法联合后小鼠是否发展了强的抗肿瘤免疫应答。在再激发的37只动物中,所有的动物最后发展了可触知的肿瘤,然而,存在这样的趋势:其指示B16肿瘤生长的发作被既有B16-ICAM-1肿瘤的CVA21+抗PD-1疗法延迟。

[0237] 用CVA21与抗PD-1抗体联合处理的动物相比于盐水+抗PD-1抗体组和盐水+对照抗体组中的动物显示统计学显著的存活延长(分别是60天相对45天相对28天的中值存活),其暗示了CVA21+抗PD-1在临床环境中可能是有利的。发现CVA21+抗PD-1的使用在该黑素瘤免疫活性小鼠模型中被很好地耐受,不存在与测试物质相关的不良事件。

[0238] 用盐水或CVA21与抗PD-1或对照抗体联合处理后的体重

[0239] 如实施例1所述,收集并分析各动物的体重。在任何时间点,在处理组和NTC小鼠之

间观察到平均体重无统计学显著差异(结果未显示;使用Holm-Sidak方法针对多重比较进行多重t-检验校正)[用于Mac OS X Version 6.0c的Prism 6, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com]。动物似乎很好地耐受CVA21和抗PD-1疗法,并且不存在可观察的来自处理的毒性。在大多数情况下,重量的减少与肿瘤破溃和相关的肿瘤负担有关。

[0240] 原发B16-ICAM-1结节的肿瘤体积

[0241] 使用电子游标卡尺,一周三次测量肿瘤体积。在第42天前,由于通过肿瘤体积肿瘤破溃所证实的渐进性疾病,使所有的盐水+对照抗体处理小鼠安乐死。如图9所示,在盐水+对照抗体处理肿瘤中几乎没有观察抗肿瘤活性。所有的肿瘤体积扩大达到最大的人道端点,并且需要安乐死。CVA21+抗PD-1处理组显示最好的应答,肿瘤发作显著延迟,并且在研究的后半部分只有六只动物显示原发肿瘤生长的征象。

[0242] 继发B16结节的肿瘤体积

[0243] 为了确立在CVA21疗法与抗PD-1处理联合后是否发展了强的抗肿瘤免疫应答,用B16鼠黑素瘤细胞再激发小鼠。B16细胞缺少人ICAM-1受体,因此对CVA21疗法具有抗性。这些细胞在抗原上类似于被用来产生B16-ICAM-1细胞系的B16细胞,并且被用来鉴定抗肿瘤免疫应答的存在,所述抗肿瘤免疫应答可能在原发肿瘤的癌细胞溶解之后产生。如在图10中看到的,B16肿瘤最后在所有用B16细胞再激发的小鼠中发展,然而,在第45天,盐水+对照抗体组的平均肿瘤体积统计学上大于盐水+抗PD-1组、CVA21+对照抗体组和CVA21+抗PD-1抗体组(两因素方差分析)。

[0244] 用CVA21与抗PD-1联合处理的小鼠相对盐水和抗PD-1提高的存活

[0245] 相比于盐水+对照抗体组,CVA21与抗PD-1抗体的联合显示统计学显著的总存活改善($p < 0.0001$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图11)。将CVA21+对照抗体和盐水+对照抗体组进行比较,不存在统计学显著差异。当将盐水+抗PD-1的存活曲线与CVA21+抗PD-1处理组相比时,存在统计学差异($p = 0.0026$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图11)。该发现暗示了,与抗PD-1抗体联合使用的CVA21产生明显的存活优势(对于盐水+抗PD-1和CVA21+抗PD-1,分别是45天相对60天的中值存活)。

[0246] 讨论

[0247] 实施例2的结果表明,与接受盐水+抗PD-1抗体的动物处理组相比,CVA21与抗PD-1抗体的联合使用改善了荷瘤小鼠的总存活。与盐水+对照抗体组相比,CVA21与抗PD-1抗体的联合显示统计学显著的总存活改善($p < 0.0001$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图11)。CVA21与抗PD-1联合的处理方案被很好地耐受,不存在归因于测试物的不良事件。该研究的主要发现是用CVA21+抗PD-1处理的荷瘤小鼠显示与肿瘤生长阻滞相关的总存活益处。用CVA21+抗PD-1抗体处理的动物相对对照组显示变慢的疾病进展,并且对用二次B16肿瘤的再激发具有更大的抗性。

[0248] 实施例3:溶瘤CVA21病毒疗法与免疫刺激抗体抗CTLA-4的联合:肿瘤再激发研究

[0249] 该研究调查了柯萨基病毒A21(CVA21)溶瘤病毒疗法与免疫刺激抗体抗CTLA-4的联合在恶性黑素瘤的B16-ICAM-1鼠模型中的效力。

[0250] 小鼠在右后胁皮内植有B16-ICAM-1肿瘤(2×10^5 个细胞),并且在开始疗法之前允许建立七天。在第7天、第10天、第13天和第16天,用盐水或CVA21(1×10^8 TCID₅₀ [$5.56 \times$

10^9 TCID₅₀/kg,其假设是18g的小鼠])与鼠抗CTLA-4抗体或相配的对照抗体(12.5mg/kg)联合处理小鼠。盐水或CVA21的处理瘤内施用,而抗CTLA-4和对照抗体腹腔内施用(每组n=12)。使用数字卡尺,每2至3天定期地监测原发B16-ICAM-1黑素瘤肿瘤,并且基于针对球状体的公式计算肿瘤体积,所述公式利用了肿瘤的x/y平面上的两条最长垂直轴。使肿瘤显示破溃征象、重量损失>10%或肿瘤体积大于2500mm³的动物安乐死。相比于所有其它处理组,B16-ICAM-1荷瘤小鼠中的CVA21+抗CTLA-4疗法导致持久的肿瘤消退。

[0251] 在第37天,用 2×10^5 个B16鼠黑素瘤细胞(所述细胞缺少人-ICAM-1受体)皮内再激发剩余的动物以确定CVA21病毒疗法与抗CTLA-4疗法联合之后小鼠是否发展了强的抗肿瘤免疫应答。在被再激发的34只动物中,除了六只动物之外的所有动物最后发展了可触知的肿瘤(两只盐水+抗CTLA-4小鼠以及四只CVA21+抗CTLA-4小鼠保持无肿瘤)。

[0252] 与盐水+对照抗体组中的动物相比,用CVA21与抗CTLA-4抗体联合处理的动物显示统计学显著的存活延长(72天相对39天的中值存活),单独的单一物质CVA21和抗CTLA-4抗体也显示统计学显著的存活延长。虽然CVA21+抗CTLA-4相比单一物质抗CTLA-4不存在显著的差异,但是CVA21+抗CTLA-4的联合相比单独的CVA21产生改善的存活(72天相对56.5天的中值存活),其暗示了该组合在临床环境中可能是有利的。发现CVA21+抗CTLA-4的使用在该黑素瘤免疫活性小鼠模型中被很好地耐受,不存在与测试物质相关的不良事件。

[0253] 用盐水或CVA21与抗CTLA-4或对照抗体联合处理后的体重。

[0254] 如实施例1所描述的,收集并分析各只动物的体重。在任何时间点,在处理组和NTC小鼠之间观察到平均体重无统计学显著差异(结果未显示;使用Holm-Sidak方法针对多重比较进行多重t-检验校正)[用于Mac OS X Version 6.0c的Prism 6,GraphPad Software,La Jolla California USA,www.graphpad.com]。动物似乎很好地耐受CVA21和抗CTLA-4疗法,并且不存在可观察的来自处理的毒性。在大多数情况下,重量的减少与肿瘤破溃和相关的肿瘤负担有关。

[0255] 原发B16-ICAM-1结节的肿瘤体积

[0256] 使用电子游标卡尺,一周两次测量肿瘤体积。在第45天前,由于通过肿瘤体积和肿瘤破溃所证实的渐进性疾病,使所有的盐水+对照抗体处理小鼠安乐死。如图13所示,在盐水+对照抗体处理肿瘤中,几乎没有观察到抗肿瘤活性。所有的肿瘤体积扩大达到最大的人道端点,并且需要安乐死。在后半部分的研究期间,CVA21+抗CTLA-4处理组显示最好的应答,肿瘤发作显著延迟,并且没有动物显示原发肿瘤生长的征象。用单一疗法处理的动物中60%中观察到完全的肿瘤消退,后面是持久的应答。更有趣地是,用CVA21+抗CTLA-4联合疗法处理的所有动物针对原发肿瘤显示完全排斥。

[0257] 继发B16结节的肿瘤体积

[0258] 为了确立在CVA21疗法与抗CTLA-4治疗联合之后是否发展了强的抗肿瘤免疫应答,用B16鼠黑素瘤细胞再激发小鼠。B16细胞缺少人ICAM-1受体,因此对CVA21疗法具有抗性。这些细胞在抗原上与用来产生B16-ICAM-1细胞系的B16细胞类似,并且被用来鉴定抗肿瘤免疫应答的存在,所述抗肿瘤免疫应答可能在原发肿瘤的癌细胞溶解之后产生。在第77天,与用单一物质抗CTLA-4抗体处理的动物25%受保护相比,用抗CTLA-4+CVA21联合疗法处理的动物针对肿瘤再激发显示40%受保护(图14)。

[0259] 用CVA21与抗CTLA-4联合处理的小鼠相对盐水和抗CTLA-4提高的存活

[0260] 研究动物的总存活。当针对盐水处理动物比较时,所有处理组显著地延长了动物的总存活。单一物质抗CTLA-4 ($p=0.0068$),单一物质CVA21 ($p=0.0067$)以及CVA21+抗CTLA-4+CVA21 ($p<0.0001$)。与盐水+对照抗体组相比,CVA21与抗CTLA-4抗体的联合显示统计学显著的总存活改善 ($p<0.0001$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图15)。将CVA21+对照抗体和盐水+对照抗体组进行比较,不存在统计学显著差异。当将盐水+抗CTLA-4的存活曲线与CVA21+抗CTLA-4处理组相比时,存在统计学差异 ($p=0.0026$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图15)。该发现暗示了,与抗CTLA-4抗体联合使用的CVA21产生了显著的存活优势(对于盐水+抗CTLA-4和CVA21+抗CTLA-4,分别是45天相对60天的中值存活)。研究动物的中值存活显示于图15(B)。接受CVA21+抗CTLA-4联合疗法的动物具有最长的中值存活(72天)。

[0261] 讨论

[0262] 实施例3的结果表明,与接受CVA21+对照抗体处理的动物组相比,CVA21与抗CTLA-4抗体的联合使用改善了荷瘤小鼠的总存活。所有CVA21+抗CTLA-4处理的B16-ICAM-1肿瘤在第77天前消退。与盐水+对照抗体组相比,CVA21与抗CTLA-4抗体的联合显示统计学显著的总存活改善 ($p<0.0001$ 对数秩[Mantel-Cox]检验)(图15)。在第45天前,由于肿瘤进展和/或破溃,使所有盐水+对照抗体处理的小鼠安乐死。CVA21与抗CTLA-4联合的治疗方案被很好地耐受,不存在归因于测试物的明显不良事件。

[0263] 实施例3中呈现的该研究的主要发现是CVA21+抗CTLA-4处理的荷瘤小鼠显示与B16-ICAM-1肿瘤生长的阻滞有关的总存活益处。用CVA21+抗CTLA-4抗体处理的动物相对对照组显示疾病进展的抑制,并且相比于单一物质处理组对用二次B16肿瘤进行的再激发具有更大的抗性。

[0264] 实施例4:静脉内溶瘤CVA21病毒疗法与免疫刺激抗体抗PD-1、抗CTLA-4以及抗PD-1+抗CTLA-4联合的肿瘤研究。

[0265] 该研究调查了柯萨基病毒A21(CVA21)溶瘤病毒疗法与免疫刺激抗体抗PD-1、抗CTLA-4以及抗PD-1+抗CTLA-4的联合在恶性黑素瘤B16-ICAM-1鼠模型中的效力。

[0266] 小鼠在右后肋皮内植有B16-ICAM-1肿瘤(2×10^5 个细胞),并且在开始疗法之前允许建立七天。在第7天、第10天、第13天和第16天,用静脉内盐水或静脉内CVA21(1×10^8 TCID₅₀[5.56×10^9 TCID₅₀/kg,假设是18g的小鼠])与鼠抗PD-1或抗CTLA-4或抗PD-1+抗CTLA-4抗体或相配的对照抗体(12.5mg/kg)联合处理小鼠。盐水或CVA21的处理静脉内施用,而抗CTLA-4和对照抗体腹腔内施用(每组 $n=12-14$)。使用数字卡尺,每2至3天定期地监测原发B16-ICAM-1黑素瘤肿瘤,并且基于针对球状体的公式计算肿瘤体积,所述公式利用了肿瘤x/y平面上的两条最长的垂直轴。使肿瘤显示破溃征象,重量损失>10%或肿瘤体积大于2500mm³的动物安乐死。

[0267] 原发B16-ICAM-1结节的肿瘤体积

[0268] 使用电子游标卡尺,一周两次测量肿瘤体积。如图16A所示,在研究的第27天,在盐水+对照抗体处理肿瘤中几乎没有观察到抗肿瘤活性。所有的单一物质组(CVA21、抗PD-1和抗CTLA-4)相比于盐水组显示显著的肿瘤缩小。所有的联合处理组相比于盐水组展现肿瘤的缩小但是相对单一物质的处理大体上具有更大的显著水平。在图16B中,整个研究时间进程中平均肿瘤体积的分析再次表明在单一物质和联合组中相比于盐水对照动物的显著的肿瘤缩小。鉴定了这样的显著趋势:与单一物质CVA21或抗PD-1的单独处理相比,抗PD-1和

CVA21的联合展示减少的肿瘤发展动力学。肿瘤发展的单独的蛛网图显示于图16C。数据表明,相比于盐水对照组,所有处理组中可触知肿瘤发展的发生率显著降低。特别值得注意的是,与单一物质抗PD-1或抗CTLA-4处理动物中存在的可检测的肿瘤相比,当与静脉内CVA21的施用联合时,在抗PD-1和抗CTLA-4二者中的肿瘤发生率降低。更意外地是,观察到,用CVA21+抗PD-1+抗CTLA-4联合疗法处理的所有动物在研究的第27天针对原发肿瘤发展显示完全排斥。

[0269] 实施例5:CVA21瘤内注射对远端肿瘤的全身作用

[0270] 在瘤内(i.t)注射之后,CVA21优选感染表达ICAM-1的肿瘤细胞,其导致肿瘤细胞的裂解和全身的免疫介导的抗肿瘤应答。晚期黑素瘤患者中瘤内递送CVA21的II期试验在注射病灶和远端的未注射病灶处均具有突出的抗肿瘤活性(图17)。

[0271] CALM的研究(晚期黑素瘤中的CAVATAK™)调查了瘤内施用CVA21在具有处理的IIIC-IVM1c期黑素瘤或具有未处理的无法切除的IIIC-IVM1c期黑素瘤的57例患者中的功效和安全性。通过在第1天、第3天、第5天、第8天、第22天、第43天、第64天以及此外3周的间隔(多至最多10次注射),通过瘤内施用,各患者接受最大体积4.0mL的多至 $3 \times 10^{8.0}$ TCID₅₀(对于70kg患者,约 4.5×10^6 TCID₅₀/kg)总剂量的CVA21,直到确认疾病的进展或过多毒性的发展。在各安排的注射随访时,如果可能,以剂量超分割模式注射多处病灶,必要时使用超声波引导,从最大的病灶开始(将2.0mL CVA21注入>2.5cm肿瘤,将1.0mL CVA21注入1.5cm至2.5cm肿瘤;将0.5mL CVA21注入0.5cm至1.5cm肿瘤)至4.0mL最大量。测量待注射的各肿瘤的长度,并且确定待注入各肿瘤的CVA21的体积。这些体积的总和是需要用于施用的CVA21的总体积。待施用的CVA21的最大体积是4.0mL。用CVA21初步注射之后,按照规定的处理安排,用0.1mL CVA21注射直径降低至<0.5cm的任何注射病灶,直到病灶完全地消失。在第6个月显示免疫相关无进展生存(irPFS)或显示更好的患者符合9次另外连续注射的条件。关键的合格标准是≥18岁,ECOG 0-1,以及至少1处可注射皮肤,sc,或者结节肿瘤>1.0cm。第一终点是治疗后第6个月54例可评价患者中实现>9例具有irPFS;第二终点包括1年的存活以及目标应答率。采用2阶段Simon极大极小设计。在第1阶段治疗35例患者,具有要求在这些患者中观察由改良的实体瘤疗效评价标准(RECIST 1.1;Eisenhauer, et al., 2009)的标准评估的3项或更多项目目标应答(完全的或部分的;分别是CR或PR)以进入第2阶段的无结果条款。另外的22例患者在第2阶段入选。

[0272] 实现了研究的第一终点,在第6个月,在57例可评价的患者中有21例(38.6%)显示irPFS,具有4.2个月的中值irPFS。总应答率(irRECIST)是28.1%(57例可评价患者中16例),≥6个月持久应答率是19.3%(57例患者中11例)。对应答的中值时间是2.8个月,以及1年的存活率是75.4%(57例患者中43例)。~16.5个月的中值随访之后,应答者中应答的中值持续时间和所有患者的中值总存活(OS)未达到。最常见的不良事件(AE)是1级疲劳、受寒、局部注射位点反应和发烧。未观察到3级或4级的产品相关AE。

[0273] 注射病灶和远端未注射病灶中的抗肿瘤活性在患者中是明显的(图17),后者的观察特别是与全身的免疫介导的抗肿瘤应答一致。CVA21介导的未注射的远端转移病灶活性与可能的血清细胞因子特征——升高水平的血清IL-8和g-IFN有关,其指示产生潜在活跃的全身抗肿瘤免疫应答。

[0274] 患有转移性黑素瘤的患者中程序性死亡1(PD-1)和CTLA-4的阻断经由涉及逆转肿

瘤诱导T细胞抑制的机制导致大量的肿瘤应答。如本文所证明的,CVA21和PD-1或CTLA-4阻断的联合提高了抗肿瘤应答,从而提供改善的临床活性。

[0275] 实施例6:静脉内施用的CVA21引起肿瘤细胞的基因表达变化

[0276] Balb-C SCID小鼠在左肋植入SK-Me1-28细胞(第0天)。通过注入尾部静脉,向小鼠静脉内施用CVA21或盐水(第14天)。在处理3小时、6小时、24小时和72小时后处死小鼠,并且切离肿瘤用于病毒和细胞的基因谱分析。在来自用CVA21处理的小鼠的肿瘤细胞中观察到干扰素- γ 可诱导蛋白10(IP-10)和PD-L1的上调(图19)。

[0277] 细胞、培养条件和病毒大体上如实施例1所述。6-8周龄的雌性SCID-BALB/c小鼠获自ARC(珀斯,Australia)并且饲养于SPF条件的大学动物饲养设施内。SK-Me1-28细胞在含有10%FCS的DMEM中生长。收获细胞并用无菌PBS洗涤两次。通过台盼蓝染色评估细胞活力,因为对于异种移植需要细胞活力>95%。将细胞重悬于无菌PBS并保持在冰上以维持活力。在异种移植之前,经由异氟烷的吸入(4L/min,维持2%)使小鼠麻醉。向小鼠给予 2×10^6 个SK-Me1-28细胞向后肋的皮下注入。每天视觉上监测小鼠,并且每3至4天进行称重。每3至4天,通过触诊监测肿瘤的发展。使用电卡尺测量肿瘤,并且如上所述估计肿瘤的体积(实施例1)。

[0278] 一旦肿瘤可触知(体积 $\approx 50\text{mm}^3$),用异氟烷(4L/min,维持在2%)麻醉小鼠并且经由眼球后途径施用 1×10^7 TCID₅₀CVA21或无菌PBS(总体积100 μL)。在处理后的3小时、6小时、24小时和72小时由CO₂窒息随后处死来自各肿瘤模型的四只小鼠(其中的两只用PBS处理,另两只用CVA21处理)。经由心脏穿刺取血。切离肿瘤,并且为了RNA稳定,将其储存于4℃的RNALater(QIAGEN)中。对于存在的感染病毒,经由终点病毒感染分析以一式三份分析血清(1:10-1:100的起始稀释),如下所述。

[0279] 为了测定被感染样本中CVA21的滴度,将SK-Me1-28细胞接种在96孔板上,并且在含有2%FCS的DMEM中生长至50-80%汇合。在含有2%FCS的DMEM中用纯化CVA21的10倍连续稀释液以一式三份或一式四份接种细胞单层,并且在5%CO₂环境中于37℃孵育72小时。将基于显微镜检查呈现CPE的孔评分为阳性。使用Karber方法(Dougherty,1964)计算百分之五十的感染终点滴度。根据生产商的方案,利用RNEasy Mini试剂盒(QIAGEN),从异种移植组织提取总RNA。根据生产商的方案,利用Viral RNA Mini试剂盒(QIAGEN)从血清提取病毒RNA。

[0280] 利用实时定量RT-PCR来分析从肿瘤和血清样本提取的RNA以测定存在的CVA21RNA的水平。利用SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR试剂盒(Invitrogen)进行一步法RT-PCR。引物和探针对CVA21(Kuykendall)基因组的VP3区具有特异性,并且利用Primer Express 1.5软件(Applied Biosystems,Foster City,CA)进行设计。正向引物(KKVP3fwd)的序列是5'-GAGCTAAACCACCAACCAATCG-3',反向引物(KKVP3rev)是5'-CGGTGCAACCATGGAACAA-3'。使用的FAM标记探针(KKVP3)是6FAMCACACATCATCTGGGA-MGB。在25 μL 的体积中,反应混合物包含1倍SuperScript反应混合物,500nM正向引物,500nM反向引物,250nM探针,500nM ROX,0.5 μL SuperScript III RT/Platinum Taq Mix和5 μL 提取的RNA。利用ABI Prism 7000序列检测系统(Applied Biosystems)进行RT-PCR反应。循环条件是60℃30分钟,随后95℃5分钟,然后50个以下循环:95℃15秒和60℃1分钟。针对已知浓度的预验证CVA21RNA标准对样本进行定量,并且将结果记录为等效TCID₅₀/mL(针对血清RNA)

或TCID₅₀/mg (针对异种移植的组织RNA)。

[0281] 扩增cRNA并且并入生物素-dUTP标记。根据生产商的方案,使获自SK-Mel-28异种移植的生物素化cRNA样本与人Ref-8 v2 Expression BeadChips(Illumina)杂交,提供>22000个转录本。利用BeadStation 500系统(Illumina)扫描微珠芯片阵列。利用GeneSpring 7.0软件(Silicon Genetics,USA)分析微阵列数据。通过将测量值设置在<0.01至0.01对数据集进行转化,然后针对第50百分位数将每一芯片进一步标准化以及针对中值将每一基因进一步标准化。在各异种移植模型内,将来自针对各时间点(3小时、6小时、24小时和72小时)的各处理(PBS和CVA21)获得的各对小鼠的数据集分析为重复样本。基于在重复样本至少之一中的阳性基因表达(信号强度)过滤基因。

[0282] 细胞内的病毒复制是启动靶向破坏宿主免疫系统活性微平衡的吸引人的过程。在图19中,将CVA21全身递送至小鼠模型中的人黑素瘤异种移植引起明显的靶向病毒复制,如通过整个研究期间肿瘤组织内的CVA21特异性RNA的增加水平来证实,特别是在经由眼球后途径全身施用后24小时开始。施用CVA21后的3小时、6小时、24小时和72小时处的基因表达分析揭示了肿瘤微环境内干扰素应答基因(特别是干扰素可诱导蛋白-10(IP-10))的明显上调,所述干扰素可诱导蛋白-10为由暴露于IFN- γ 的细胞分泌的趋化因子并且其在将活性T细胞招募入组织炎症位点中发挥重要作用。因为已知由活性T-细胞提供的IFN- γ 上调免疫关卡分子,所以监测PD-L1基因的表达水平。如图19中所阐述的,在全身施用后24-72小时,CVA21的复制达到高点,同时,IP-10和PD-L1的表达伴随增加,其指示IFN- γ 的活性。基于在黑素瘤肿瘤组织中通过靶CVA21复制所引起的免疫激发,发明人期望,当两种物质联合使用时,该免疫刺激事件可以增加免疫关卡阻断的抗肿瘤活性。

[0283] 参考文献

[0284] Hodi FS,O'Day SJ,McDermott DF,Weber RW,Sosman JA,Haanen JB,et al.Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.N Engl J Med.2010 Aug;363(8):711-23.

[0285] Keir ME,Butte MJ,Freeman GJ,Sharpe AH.PD-1 and its ligands in tolerance and immunity.Annu Rev Immunol.2008;26:677-704.

[0286] Brahmer JR,Tykodi SS,Chow LQM,Hwu WJ,Topalian SL,Hwu P, et al.Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer.N Engl J Med.2012 Jun;366(26):2455-65.

[0287] Topalian SL,Hodi FS,Brahmer JR,Gettinger SN,Smith DC,McDermott DF,et al.Safety,activity,and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer.N Engl J Med.2012 Jun;366(26):2443-54.

[0288] Curran MA,Montalvo W,Yagita H,Allison JP.PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors.Proc Natl Acad Sci U S A.2010 Mar;107(9):4275-80.

[0289] Merelli B,Massi D,Cattaneo L,Mandalà M.Targeting the PD1/PD-L1 axis in melanoma:biological rationale,clinical challenges and opportunities.Crit Rev Oncol Hematol.2014 Jan;89(1):140-65.

- [0290] Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. Clin Cancer Res. 2013 Oct;19(19):5300-9.
- [0291] Shafren DR, Au GG, Nguyen T, Newcombe NG, Haley ES, Beagley L, et al. Systemic therapy of malignant human melanoma tumors by a common cold-producing enterovirus, coxsackievirus A21. Clin Cancer Res. 2004 Jan;10(1 Pt 1):53-60.
- [0292] Au GG, Lindberg AM, Barry RD, Shafren DR. Oncolysis of vascular malignant human melanoma tumors by Coxsackievirus A21. Int J Oncol. 2005 Jun;26(6):1471-6.
- [0293] Blanchard T, Srivastava PK, Duan F. Vaccines against advanced melanoma. Clin Dermatol. 2013;31(2):179-90.
- [0294] Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. Oncologist. 2011;16(1):5-24.
- [0295] Dougherty RM. Animal virus titration techniques. Techniques in experimental virology. 1964;178.
- [0296] Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, McDermott JW, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. N Engl J Med. 2011 Jun;364(26):2517-26.
- [0297] Eisenhauer HA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. DANCEY J, ARBUCK S, GWYTHY M, MOONEY L, RUBINSTEIN L, SHANKAR L, DODD R, KAPLAN J, LACOMBE D, VERWEIJ J. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247.
- [0298] Dougherty, R.M. 1964. Animal virus titration techniques, p.169-223. In R.J.C. Harris (ed.), Techniques in experimental virology. Academic Press, New York.

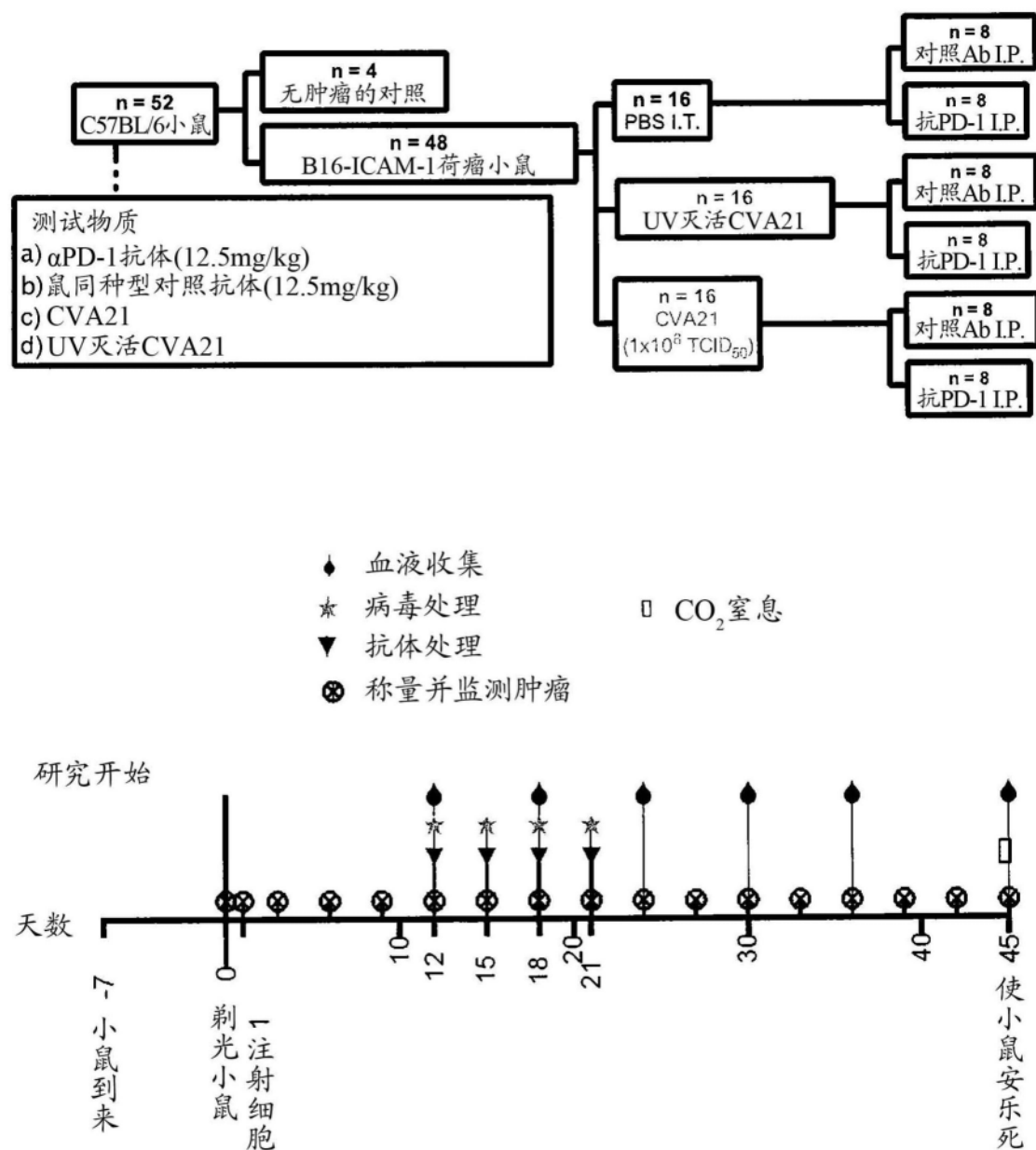


图1

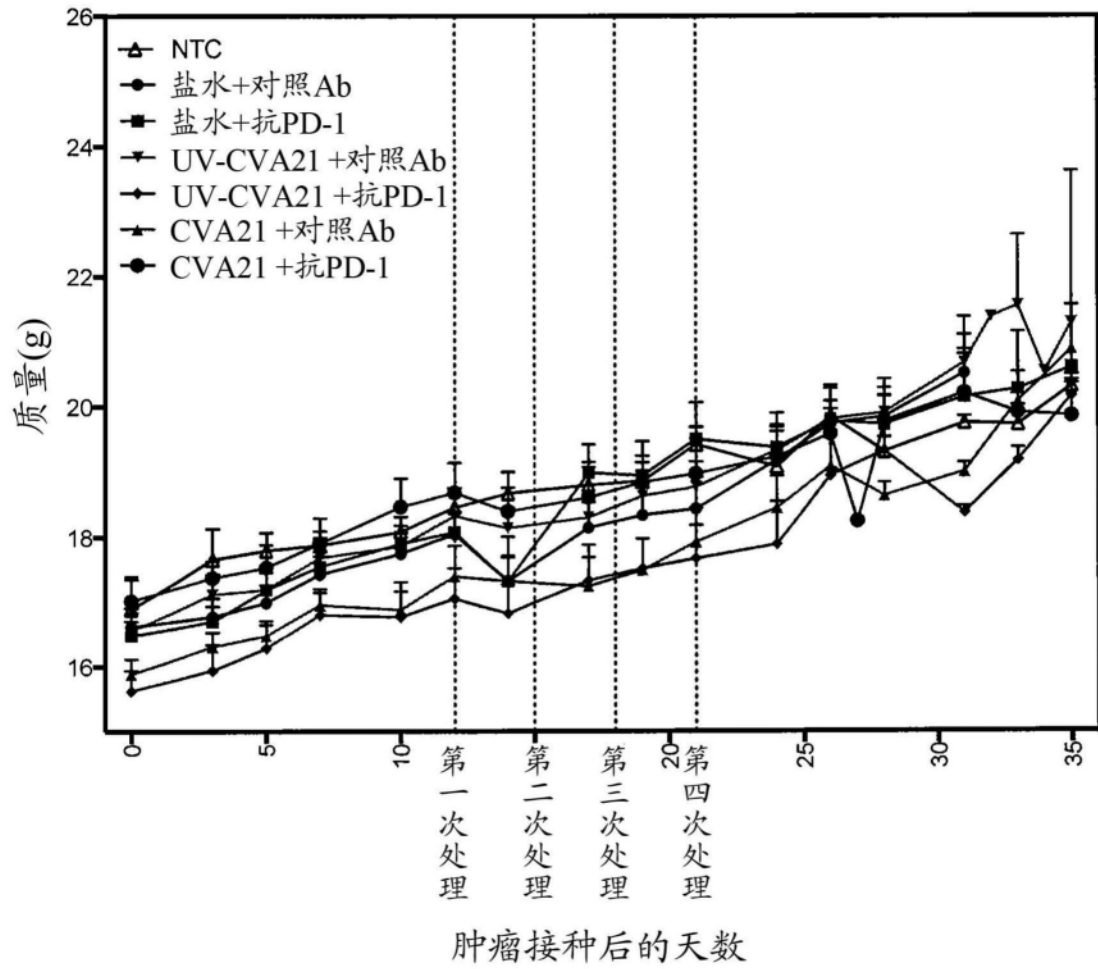
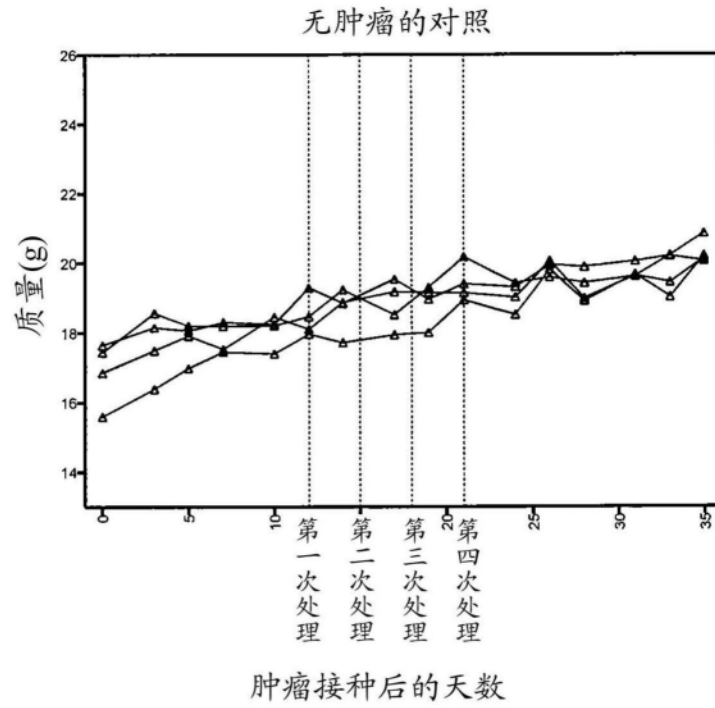


图2

(A)



(B)

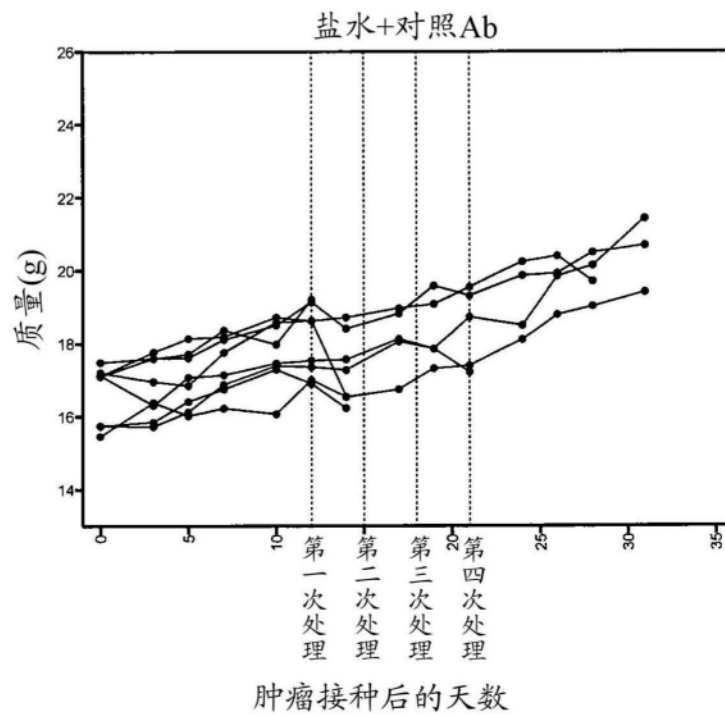
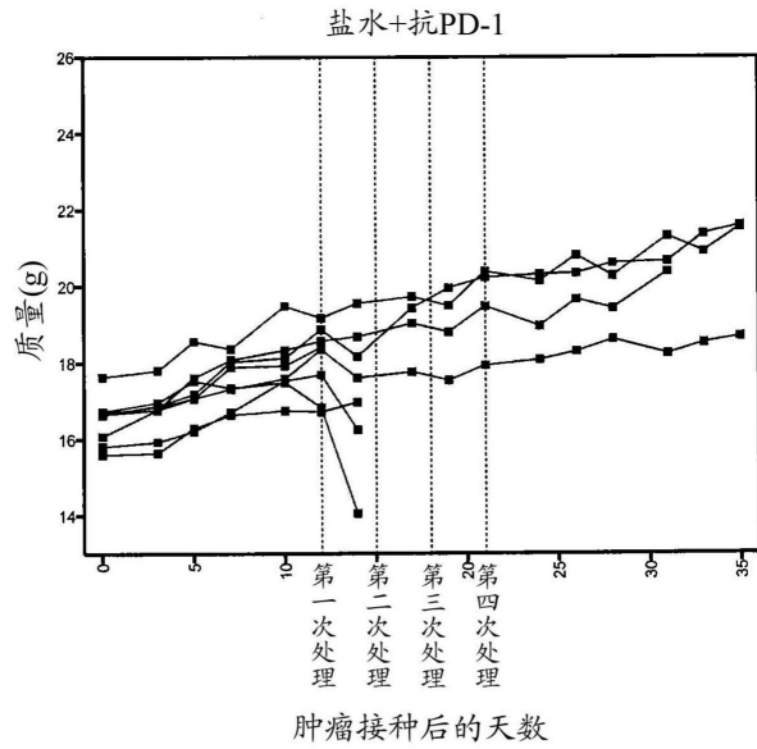


图3

C)



D)

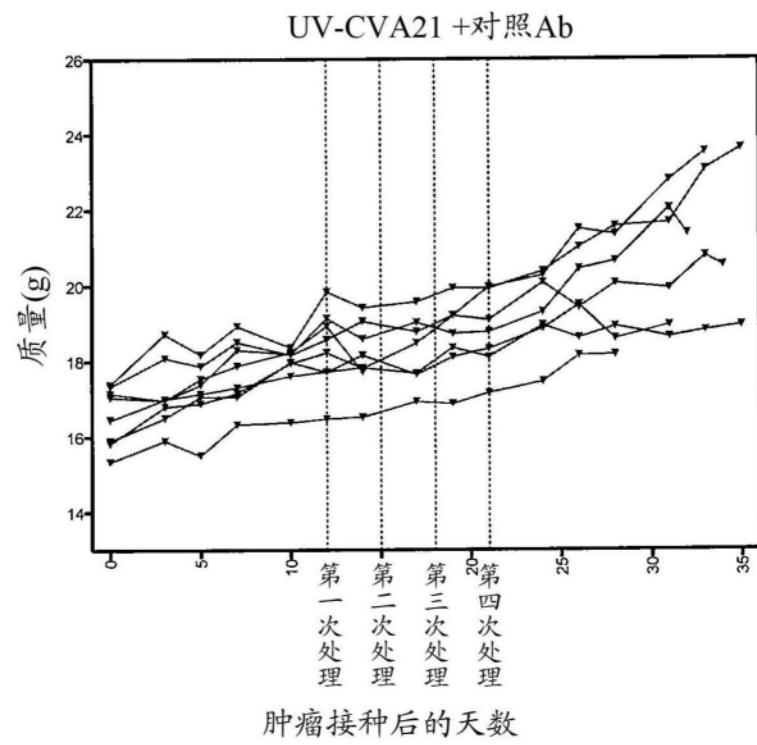
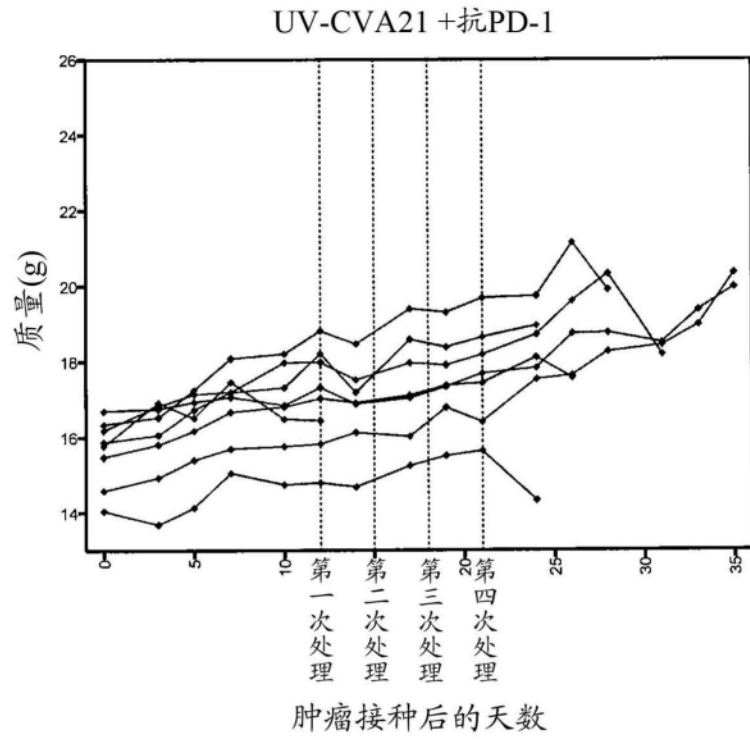


图3(续)

E)



F)

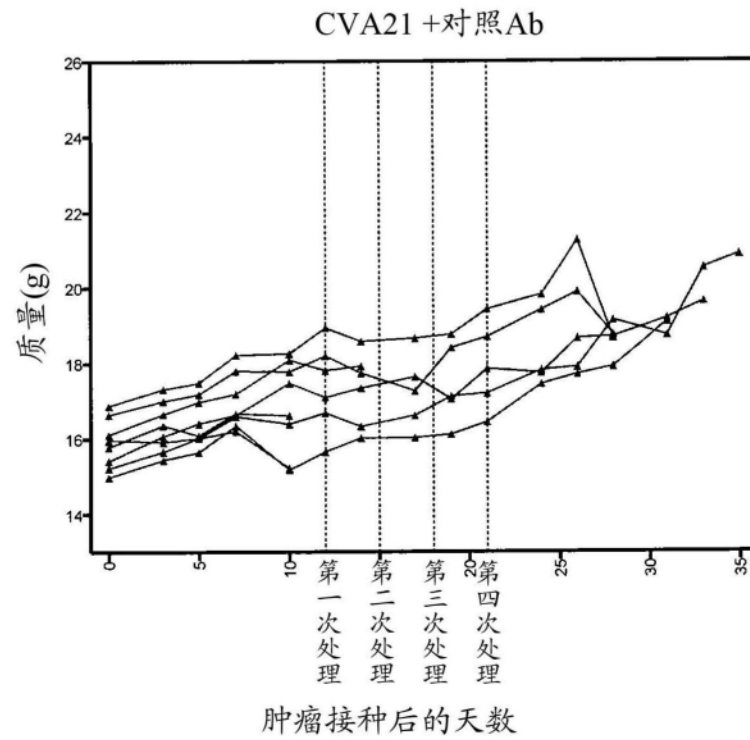


图3(续)

G)

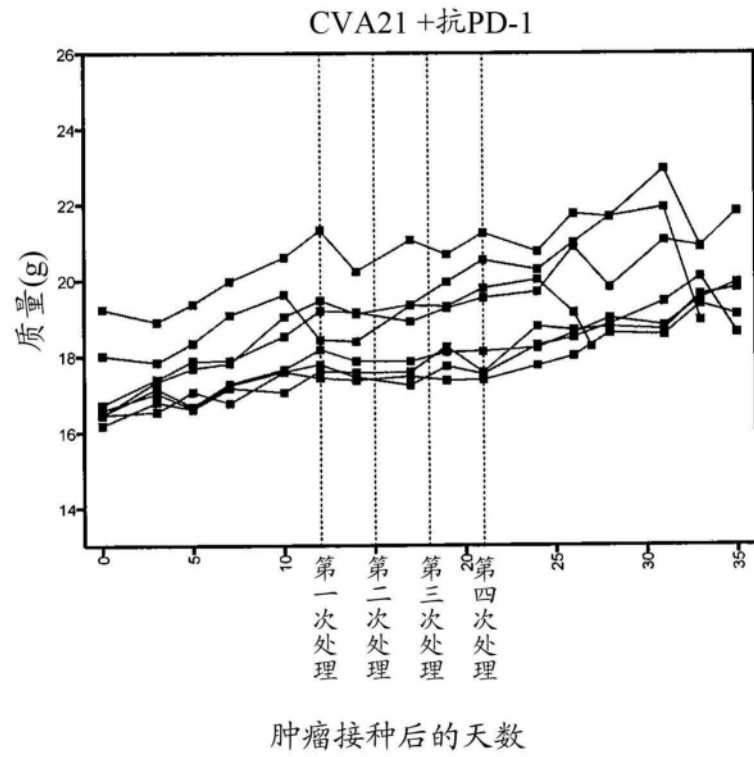


图3(续)

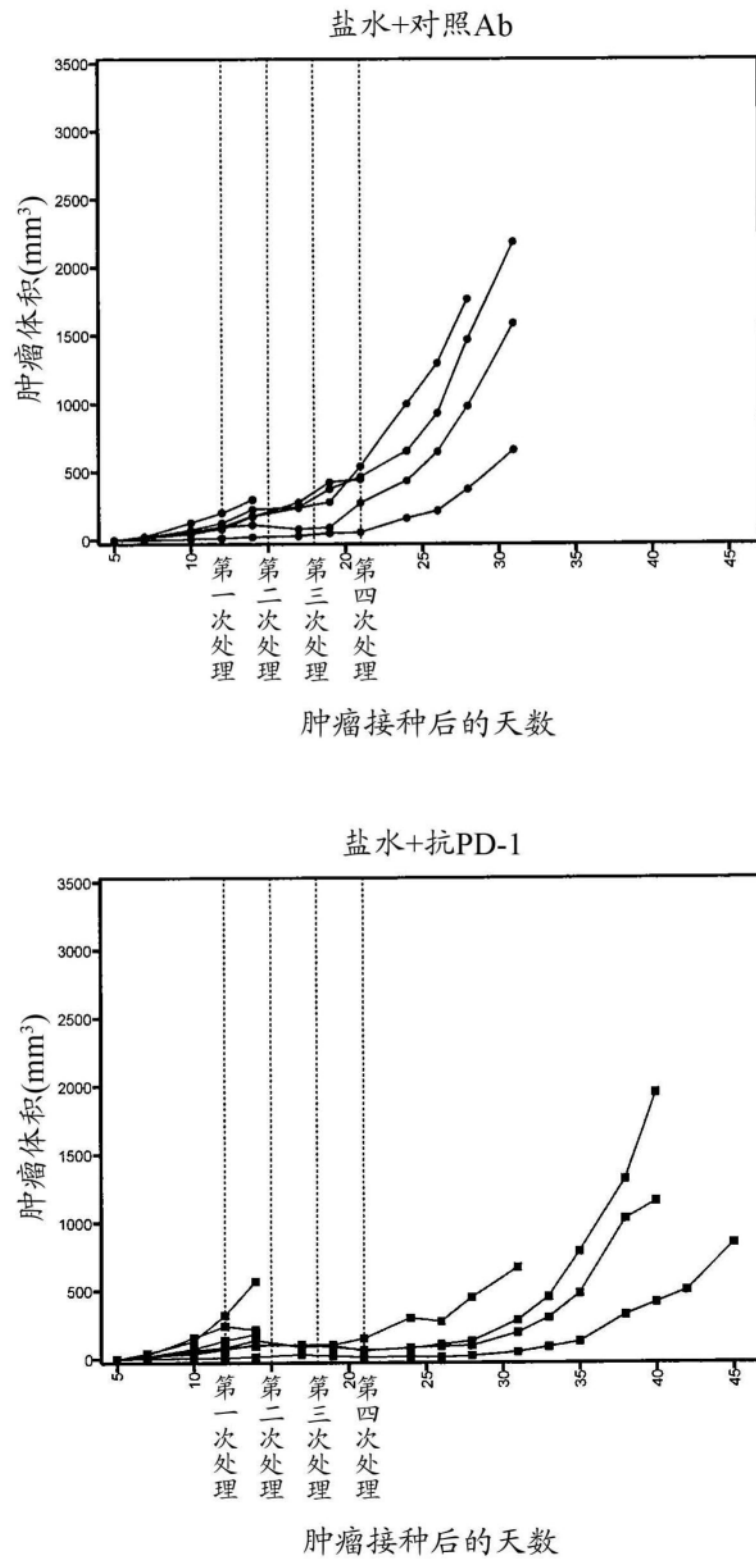


图4

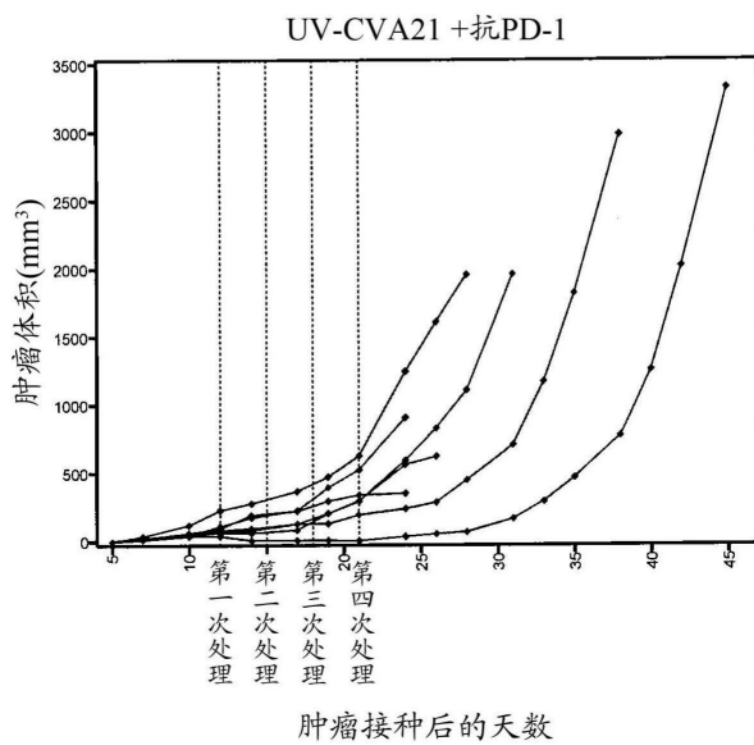
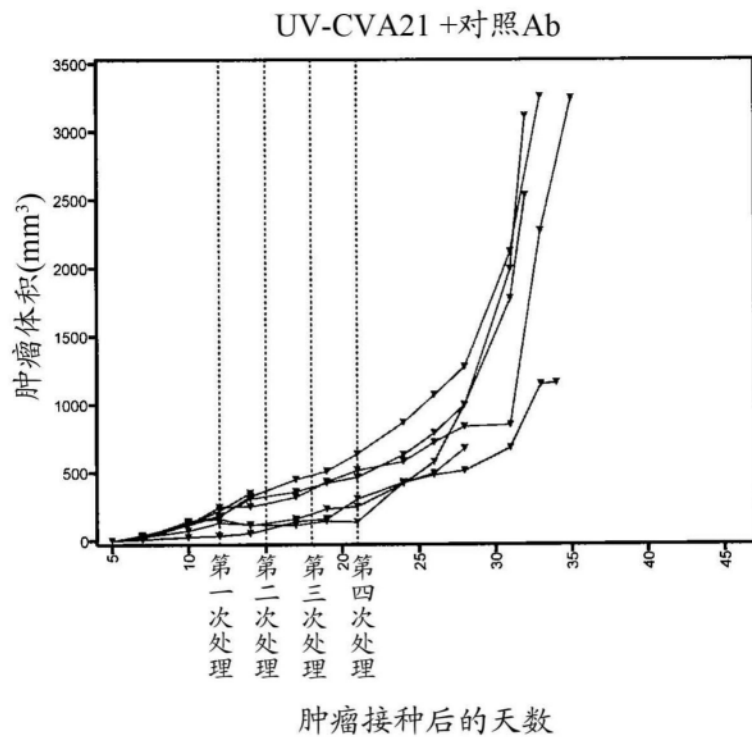


图4(续)

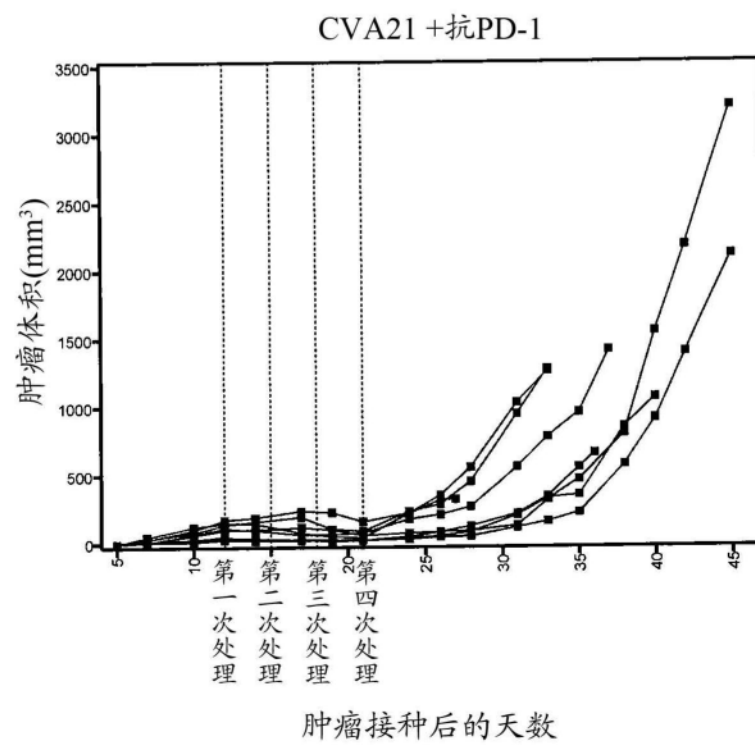
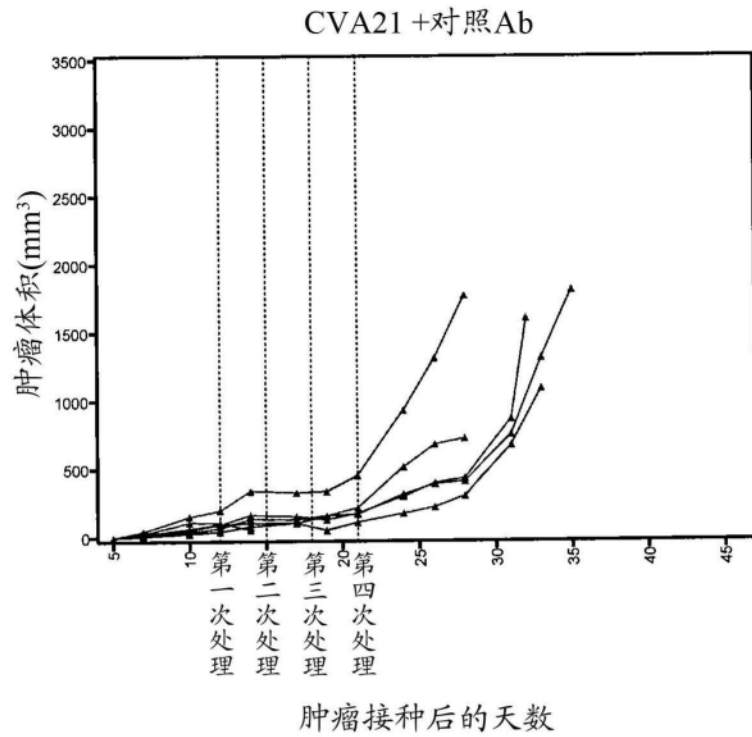
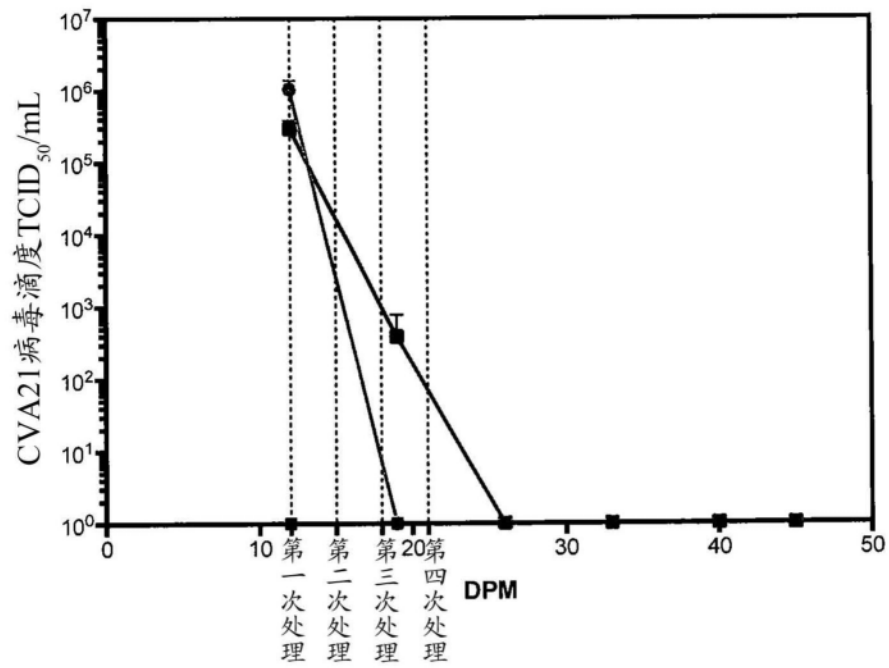
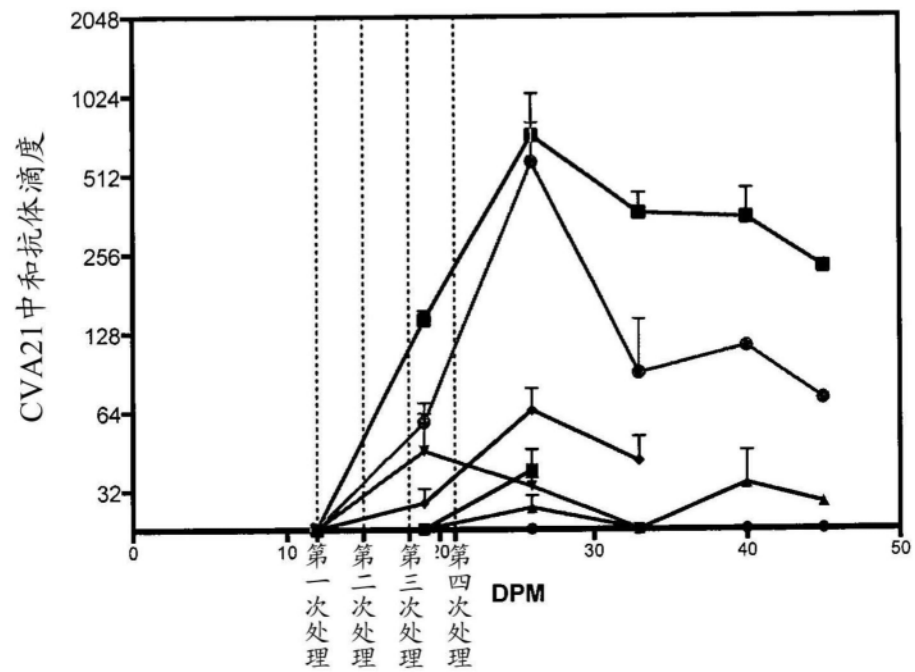


图4(续)

(A)



(B)



◆ NTC ■ 盐水+对照AB ▲ UV-CVA21 + 对照Ab ◆ CVA21 + 对照Ab
 ▼ 盐水+抗PD-1 + UV-CVA21 + 抗PD-1 ■ CVA21 + 抗PD-1

图5

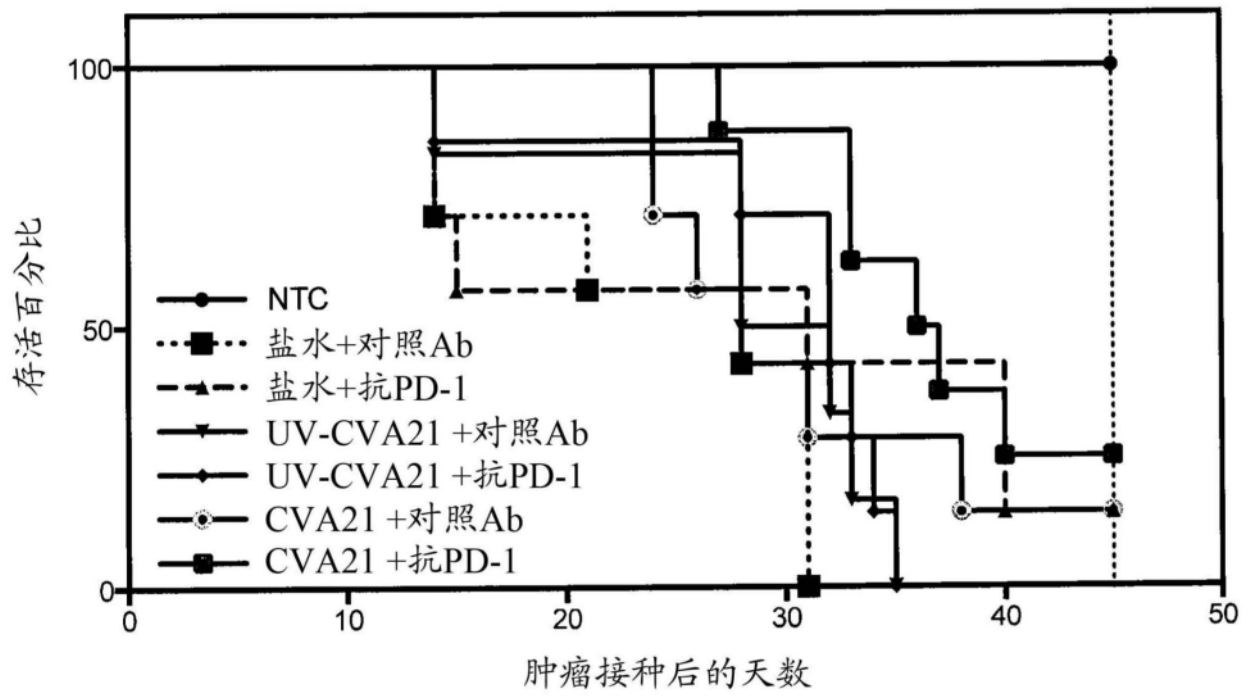
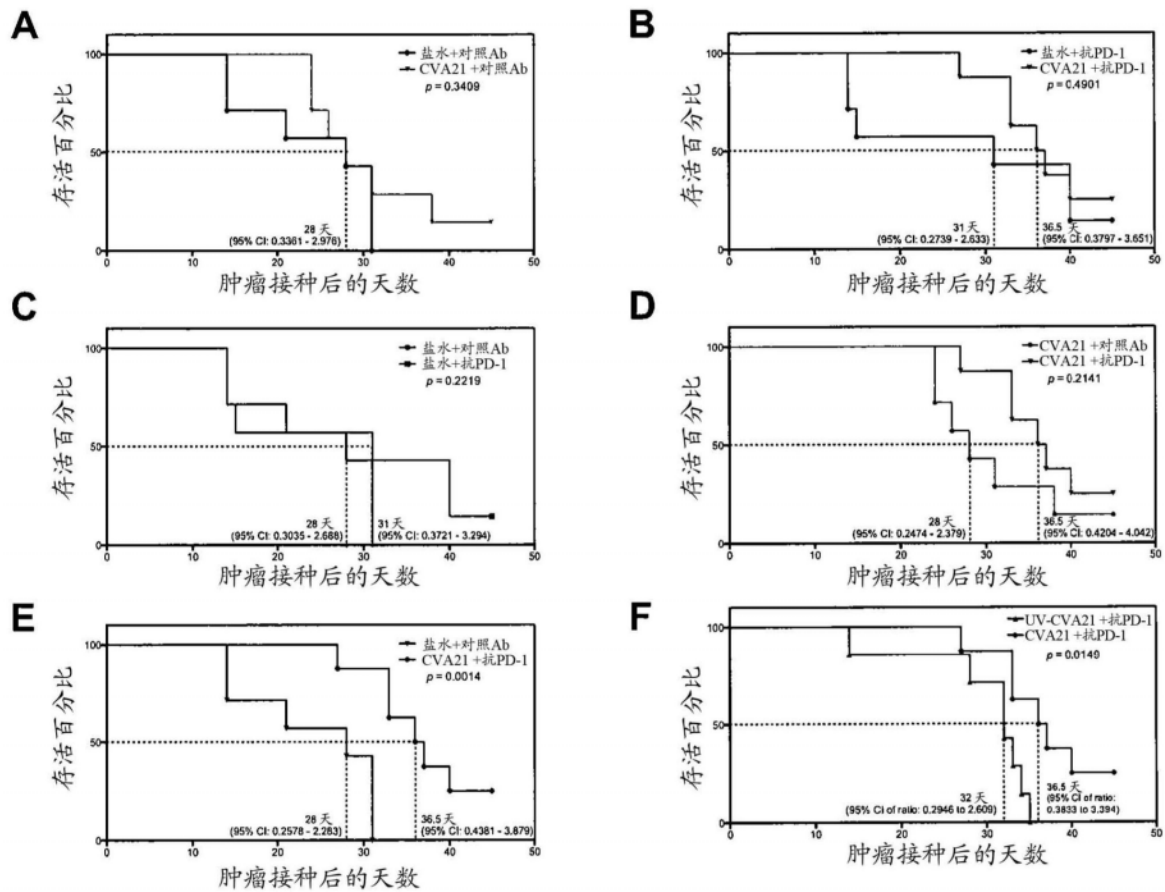


图6



	NTC n = 4	盐水+对照Ab n = 7	盐水+抗PD-1 n = 7	UV-CVA21+对照Ab n = 7	UV-CVA21+抗PD-1 n = 8	CVA21+对照Ab n = 8	CVA21+抗PD-1 n = 8
#死亡/事件	0	7	6	6	7	6	6
中值存活	未定义	28	31	30	32	28	36.5

图7

表9: 免疫活动动物模型: 各处理组中的小鼠体重(g)的总结

研究日	第一组 NTC			第2组 盐水+对照Ab			第3组 盐水+抗PD-1			第4组 UV-CVA21 +对照Ab			第5组 CVA21 +抗PD-1		
	平均值	S.D.	n	平均值	S.D.	n	平均值	S.D.	n	平均值	S.D.	n	平均值	S.D.	n
-2	16.7	±1.2	4	16.8	±0.8	8	16.5	±0.8	8	15.8	±0.7	8	16.8	±1.1	8
0	16.9	±0.9	4	16.6	±0.8	8	16.5	±0.6	8	15.9	±0.7	8	16.6	±0.8	8
3	17.7	±0.9	4	16.8	±0.8	8	16.7	±0.7	8	16.3	±0.7	8	17.1	±0.9	8
5	17.8	±0.6	4	17.0	±0.8	8	17.2	±0.8	8	16.5	±0.7	8	17.2	±0.8	8
7	17.9	±0.4	4	17.4	±0.8	8	17.5	±0.6	8	17.0	±0.7	8	17.7	±0.9	8
10	18.1	±0.5	4	17.7	±0.9	8	17.9	±0.8	8	16.9	±1.2	8	17.9	±0.6	8
12	18.5	±0.6	4	18.1	±0.9	8	18.1	±0.9	8	17.4	±1.2	6	18.3	±1.0	8
14	18.7	±0.7	4	17.3	±1.0	7	17.3	±1.8	7	17.3	±1.0	6	18.1	±0.9	8
17	18.8	±0.7	4	18.1	±0.9	5	19.0	±0.9	4	17.2	±1.0	5	18.3	±0.9	7
19	18.9	±0.6	4	18.3	±0.9	5	18.9	±1.0	4	17.5	±1.1	5	18.6	±1.0	7
21	19.4	±0.5	4	18.4	±1.1	5	19.5	±1.1	4	17.9	±1.2	5	18.8	±1.0	7
24	19.1	±0.4	4	19.2	±1.0	4	19.4	±1.1	4	18.5	±1.1	5	19.3	±1.0	7
26	19.9	±0.2	4	19.7	±0.7	4	19.8	±1.1	4	19.1	±1.5	5	19.8	±1.2	7
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	19.3	±0.4	4	19.8	±0.6	4	19.7	±0.9	4	18.6	±0.4	5	19.9	±1.4	7
31	19.7	±0.2	4	20.5	±1.0	3	20.1	±1.3	4	19.0	±0.2	3	20.7	±1.7	6
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.9	±0.0	1	20.3	±1.5	2
33	19.7	±0.6	4	-	-	-	20.3	±1.5	3	20.1	±0.6	2	21.5	±2.2	4
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20.5	±0.0	1
35	20.3	±0.4	4	-	-	-	20.6	±1.7	3	20.9	0.0	1	21.3	±3.3	2
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	20.2	±0.4	4	-	-	-	21.6	±2.0	3	-	-	-	19.8	±0.0	1
40	20.7	±0.5	4	-	-	-	22.2	±2.0	3	-	-	-	19.6	±0.0	1

图7 (a)

42	20.9	±0.9	4	-	-	-	20.3	±0.0	1	-	-	20.0	±0.0	1
45	21.0	±1.0	4	-	-	-	21.1	±0.0	1	-	-	20.4	±0.0	1

图7 (a) (续)

表10: 免疫活性动物模型: 各处理组中的小鼠体重的总结

研究日	第6组 CVA21 + 对照Ab			第7组 CVA21 + 抗PD-I		
	平均值	S.D.	n	平均值	S.D.	n
-2	15.6	±0.9	8	17.0	±1.2	8
0	15.6	±0.9	8	17.0	±1.1	8
3	15.9	±1.1	8	17.4	±0.7	8
5	16.3	±1.1	8	17.5	±1.0	8
7	16.8	±1.0	8	17.9	±1.1	8
10	16.8	±1.1	8	18.5	±1.2	8
12	17.1	±1.3	8	18.7	±1.3	8
14	16.8	±1.2	7	18.4	±1.0	8
17	17.3	±1.4	7	18.6	±1.3	8
19	17.5	±1.2	7	18.8	±1.2	8
21	17.7	±1.4	7	19.0	±1.5	8
24	17.9	±1.7	7	19.2	±1.1	8
26	18.9	±1.5	5	19.6	±1.4	8
27	-	-	-	18.3	±0.0	1
28	19.3	±1.0	4	19.8	±1.4	7
31	18.4	±0.2	3	20.2	±1.8	7
32	-	-	-	-	-	-
33	19.2	±0.3	2	19.9	±0.8	7
34	-	-	-	-	-	-
35	20.2	±0.3	2	19.9	±1.2	5
36	-	-	-	16.2	±0.0	1
37	-	-	-	16.1	±0.0	1
38	21.0	±0.0	2	21.2	±0.8	3
40	21.7	±0.0	1	21.6	±2.6	3

图7 (b)

42	22.4	±0.0	1	22.2	±2.7	2
45	24.7	±0.0	1	21.6	±2.3	2

图7 (b) (续)

表11: 显示在对存活曲线的比较统计分析之后的显著度值(p)的表。p<0.05的值加阴影

	盐水+对照Ab	盐水+抗PD-1	UV-CVA21 +对照Ab	UV-CVA21 +抗PD-1	CVA21 +对照Ab	CVA21 +抗PD-1
盐水+对照Ab	-	0.2219	0.2472	0.0475	0.3409	0.0014
盐水+抗PD-1	0.2219	-	0.7745	0.9488	0.847	0.4901
UV-CVA21 +对照Ab	0.2472	0.7745	-	0.7555	0.8866	0.0269
UV-CVA21 +抗PD-1	0.0475	0.9488	0.7555	-	0.6073	0.0149
CVA21 +对照Ab	0.3409	0.847	0.8866	0.6073	-	0.2141
CVA21 +抗PD-1	0.0014	0.4901	0.0269	0.0149	0.2141	-

图7 (c)

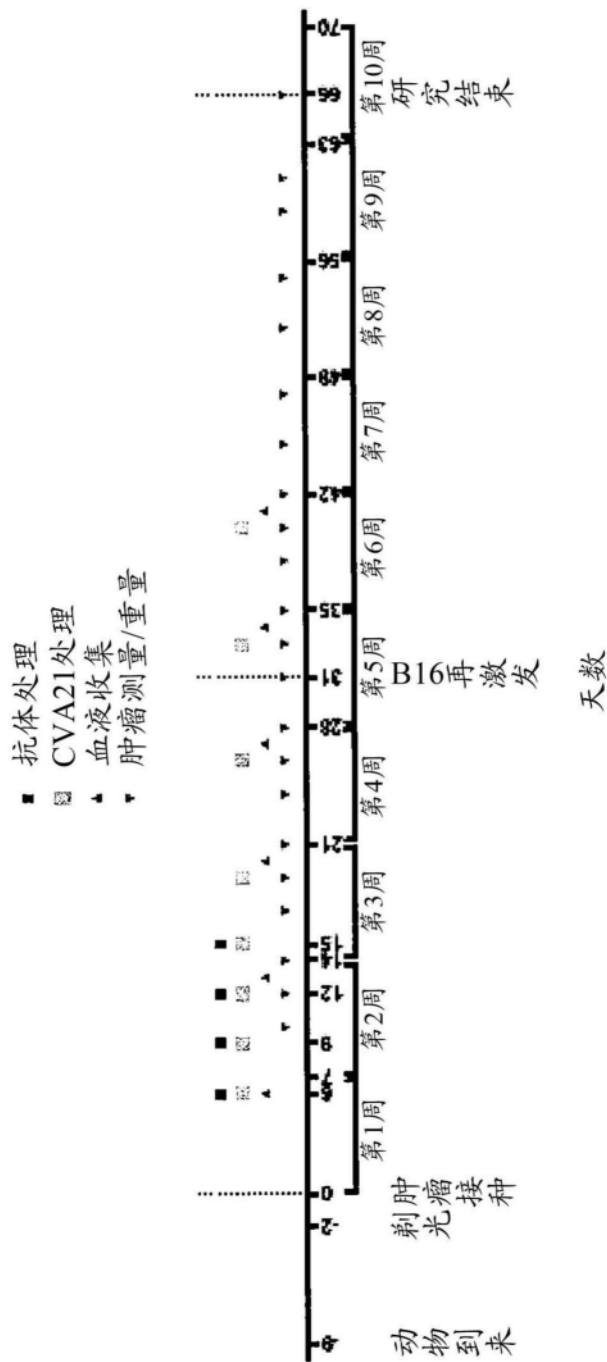


图8

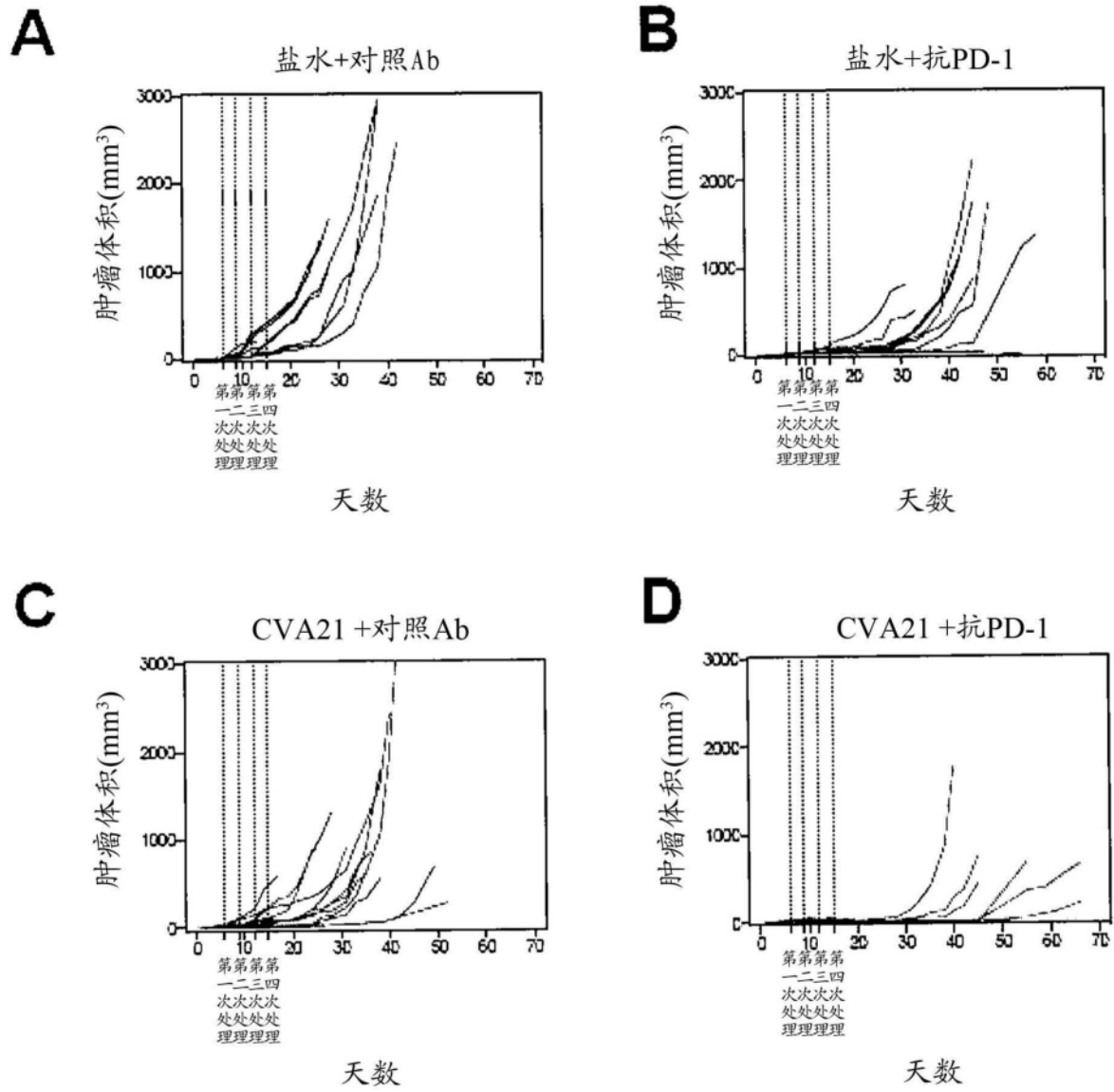


图9

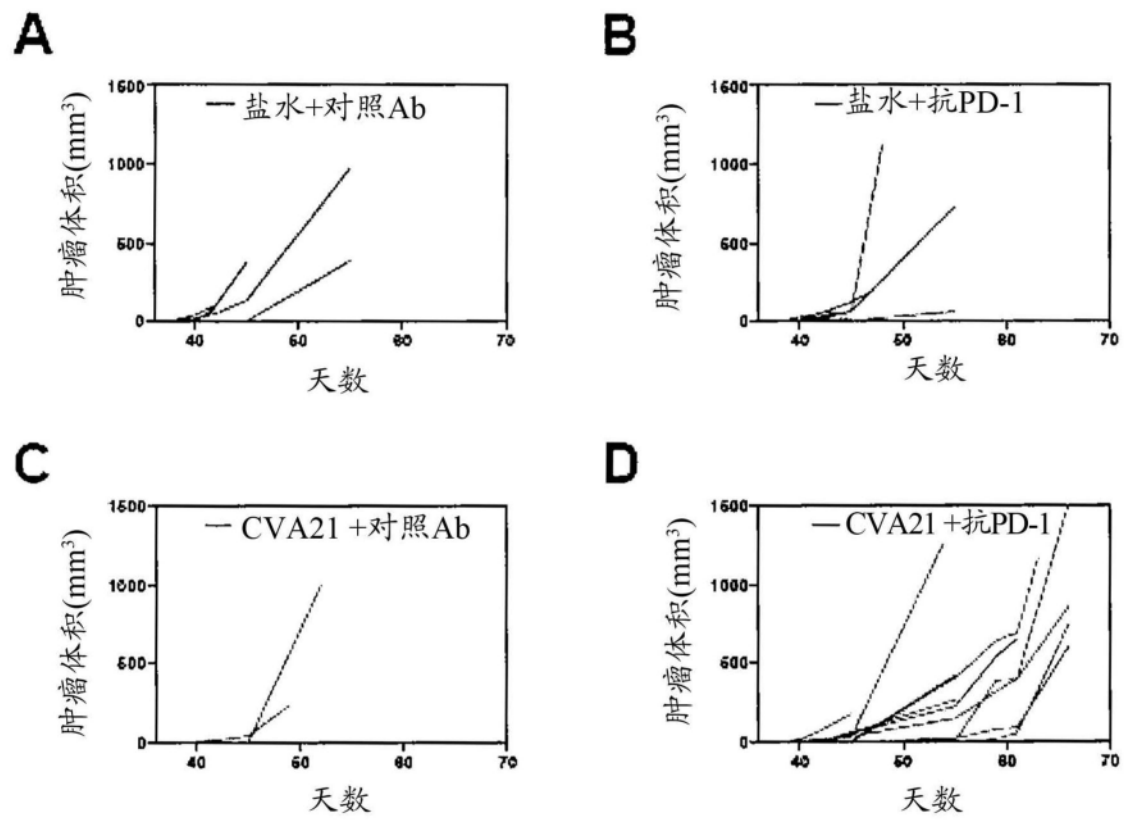


图10

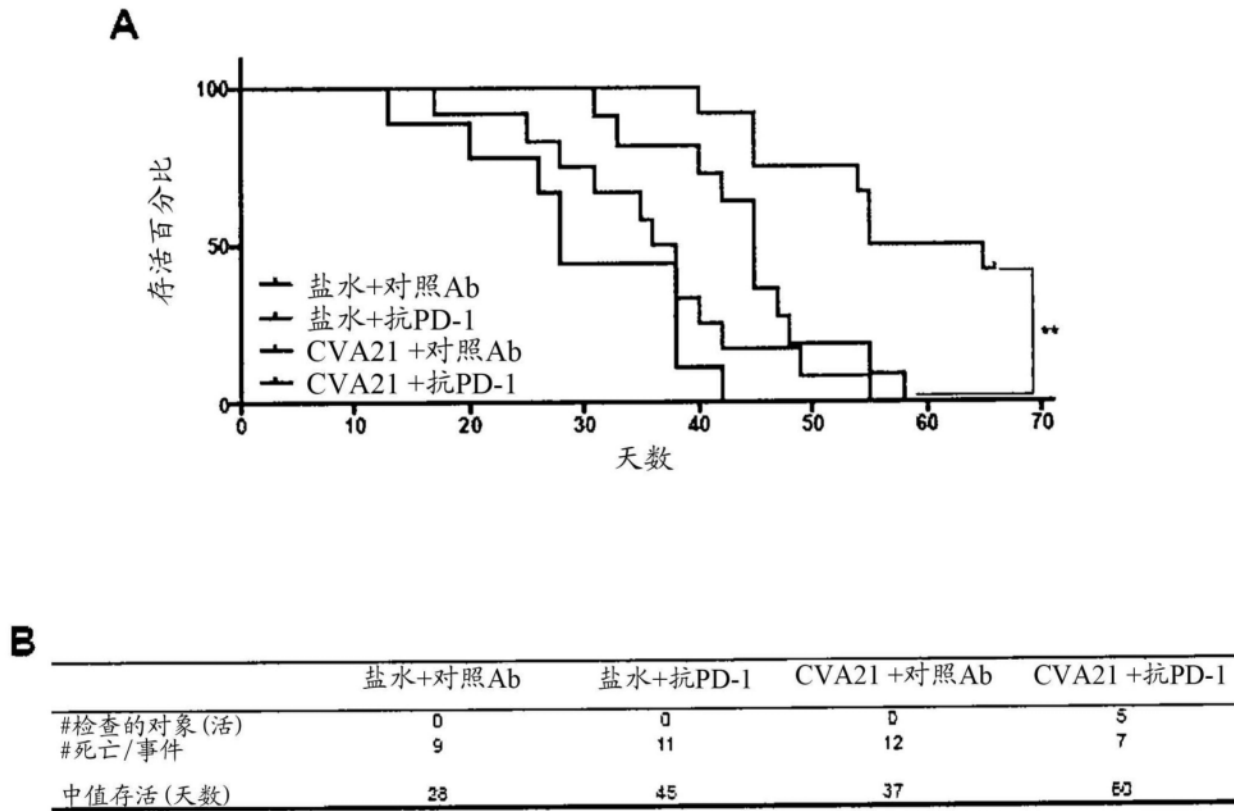


图11

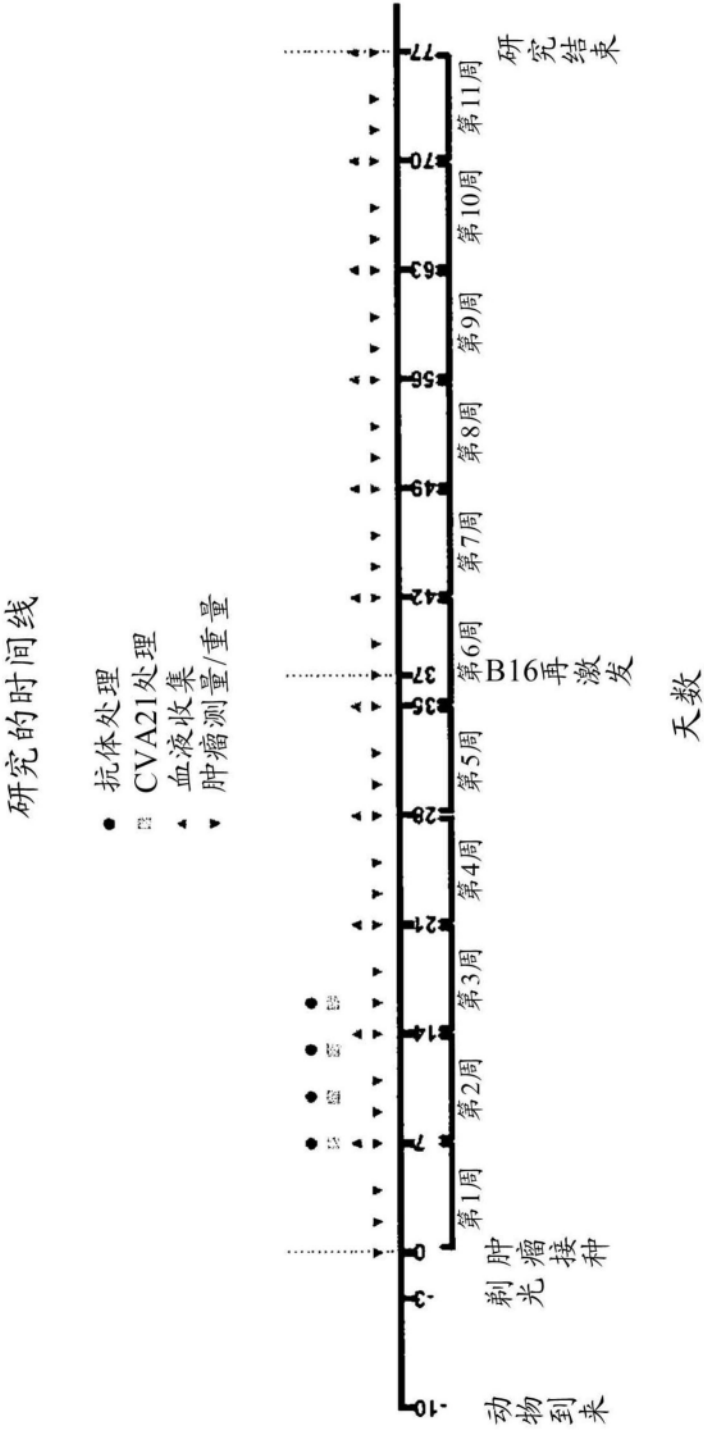


图12

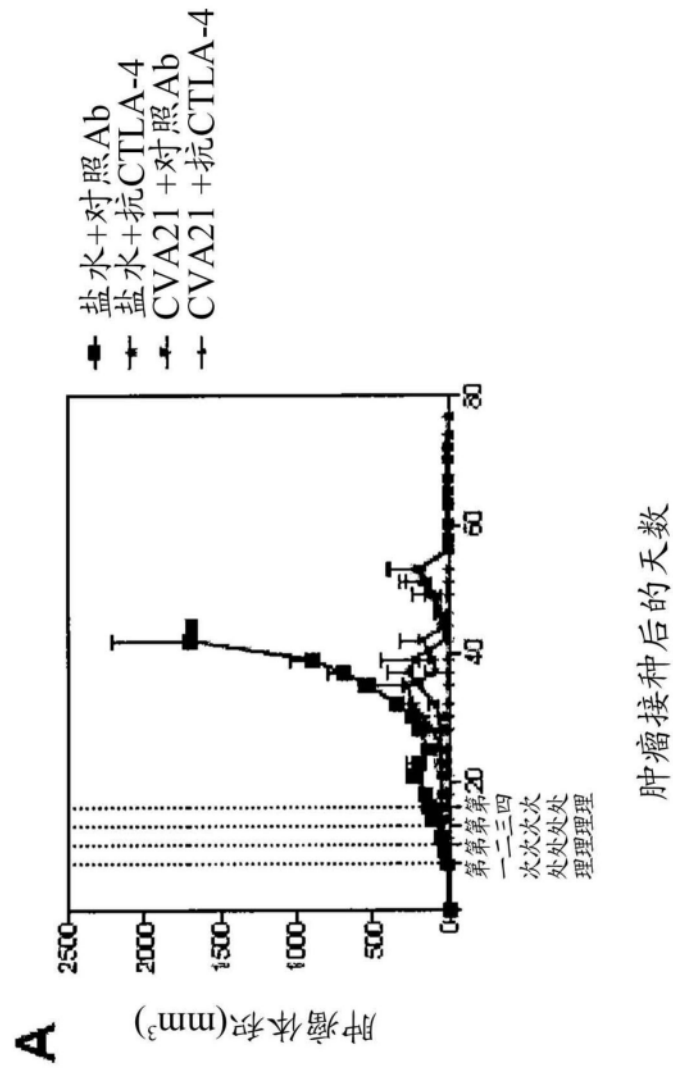


图13

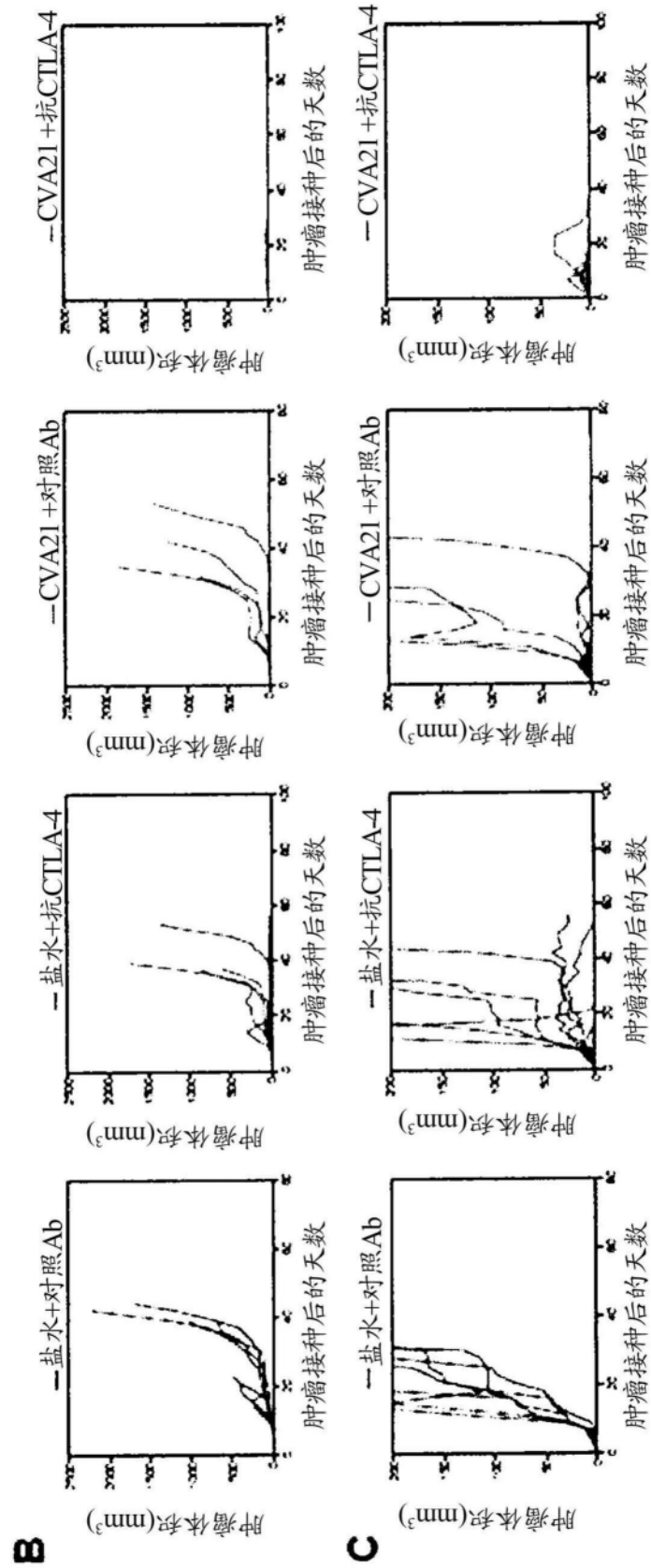


图13(续)

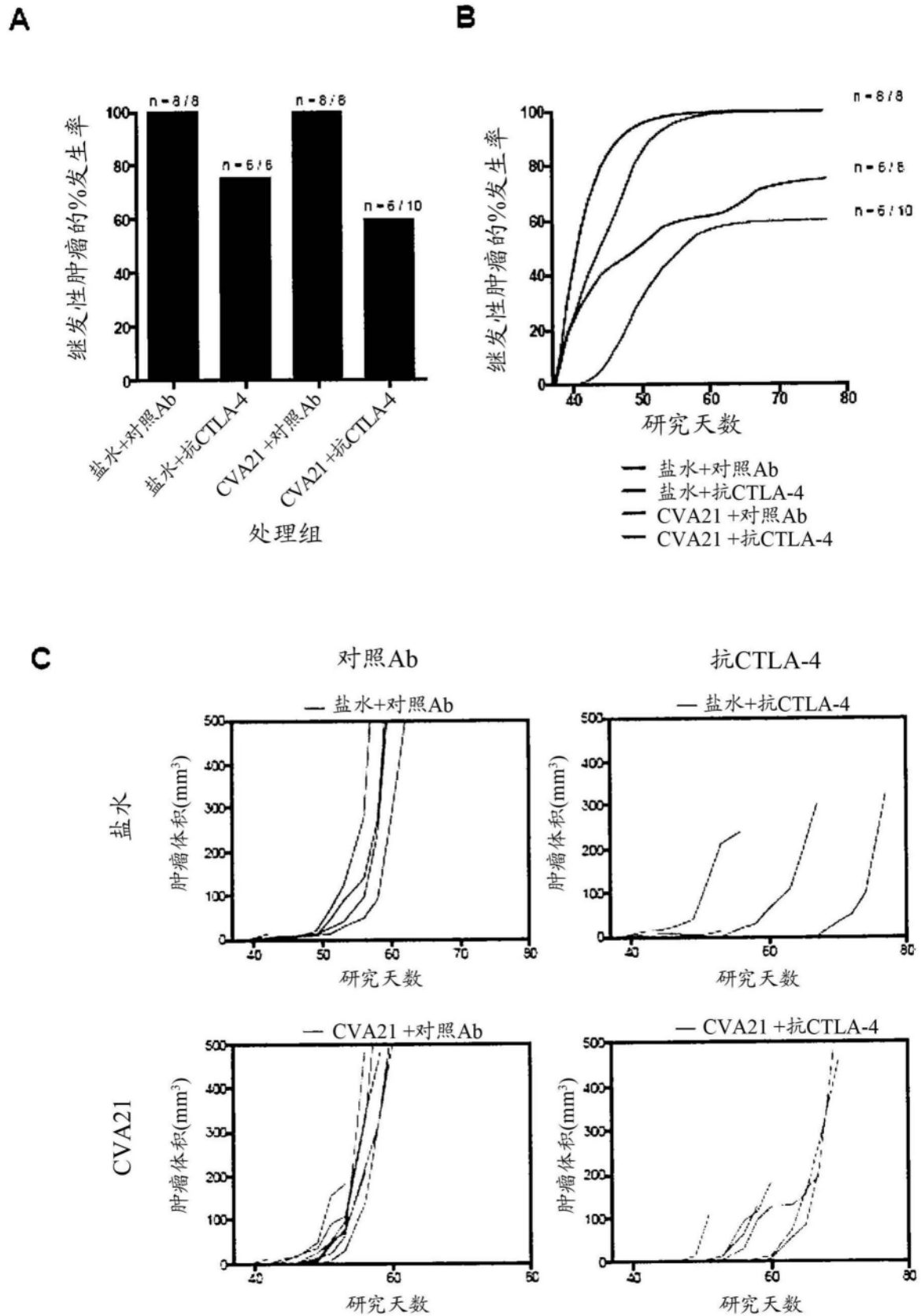
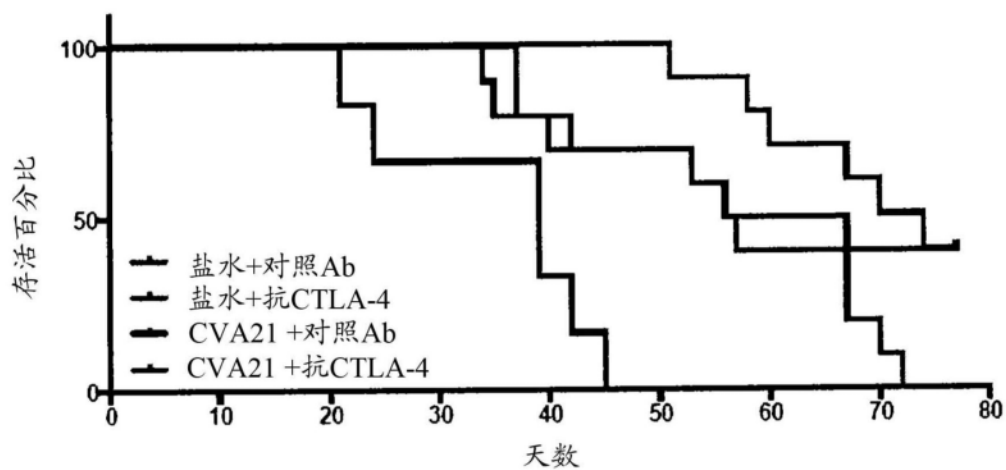


图14

A**B**

	盐水+对照Ab	盐水+抗CTLA-4	CVA21+对照Ab	CVA21+抗CTLA-4
#检查的对象	0	4	0	4
#死亡/事件	6	6	10	6
中值存活	39	61.5	56.5	72

图15

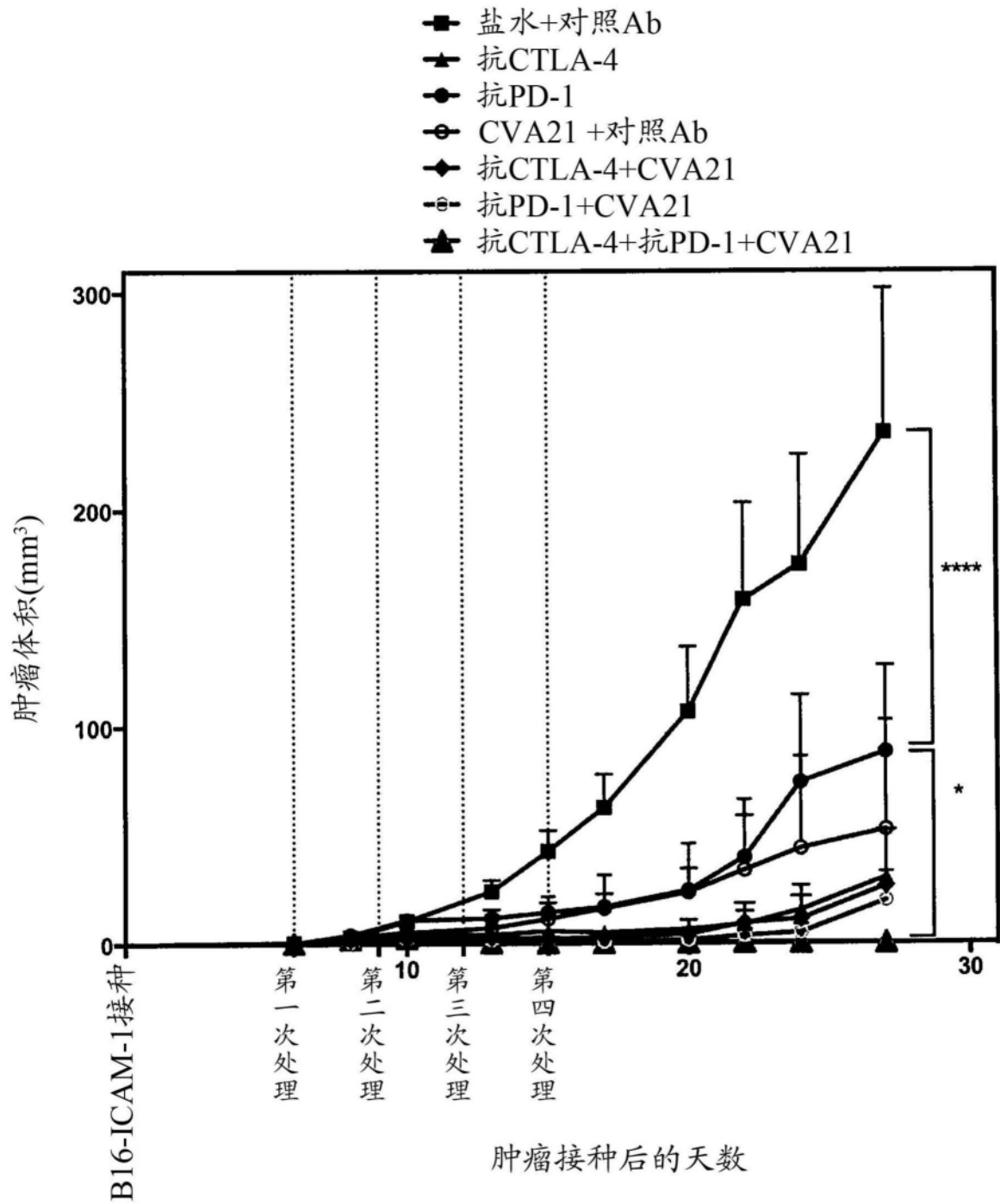


图16B

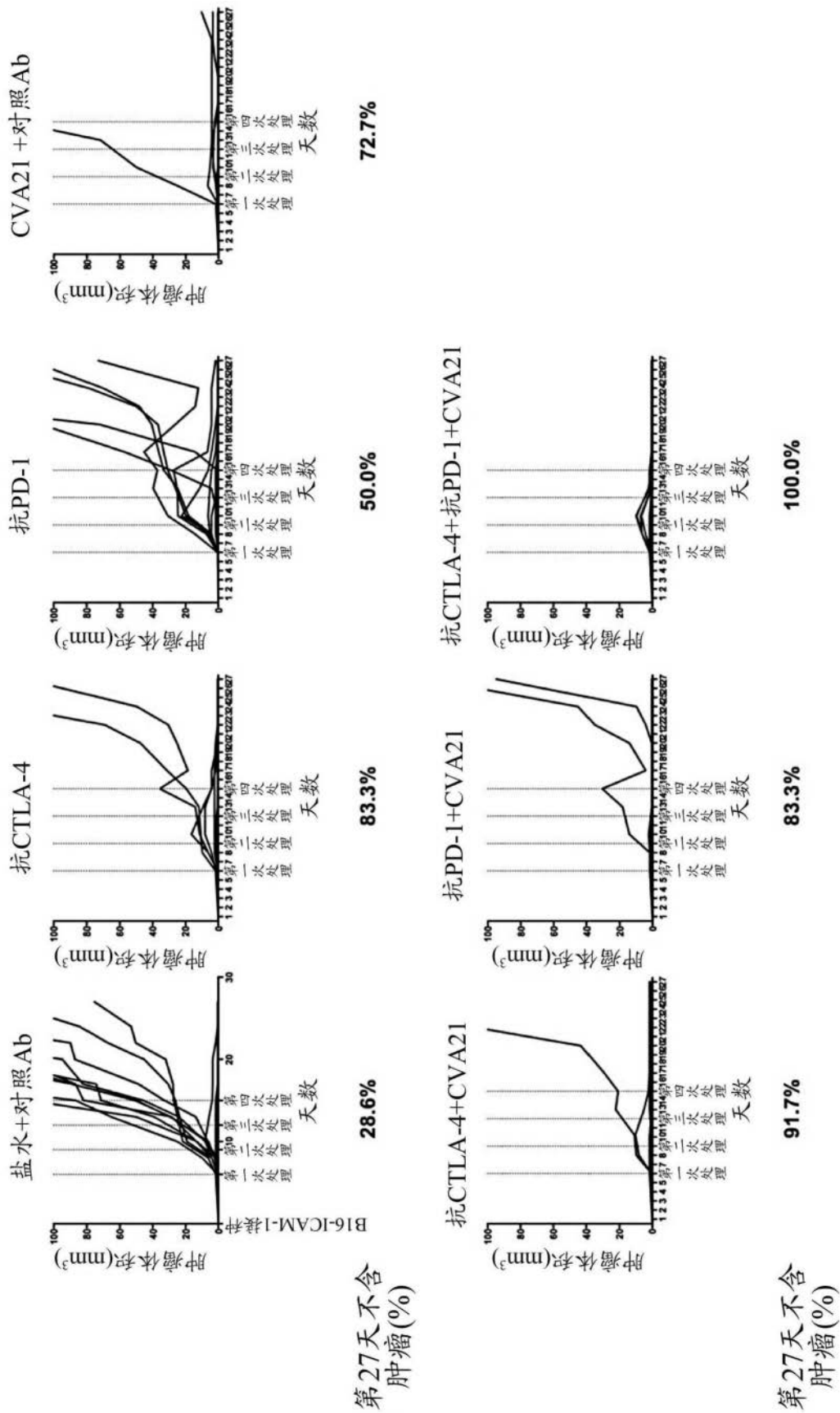
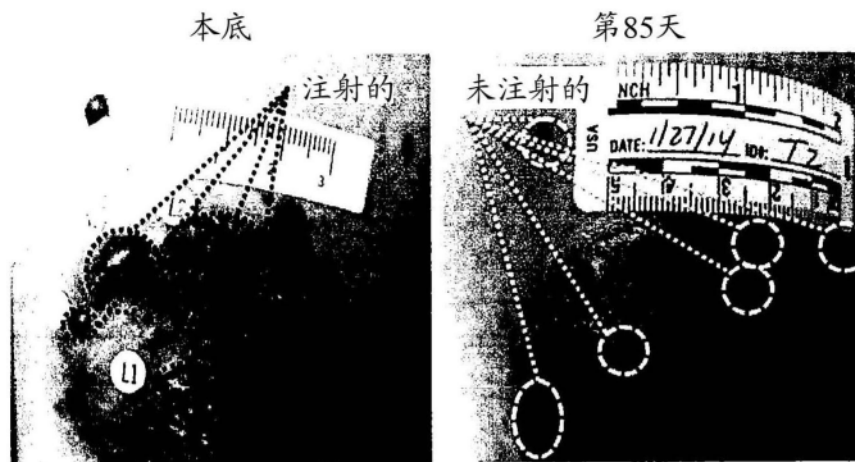


图16C

PT 12-002: 局部注射病灶和未注射病灶的应答



患有转移性黑素瘤的男性的腿。在腿病灶上的注射

PT 03-032: 未注射的远端内脏病灶的应答

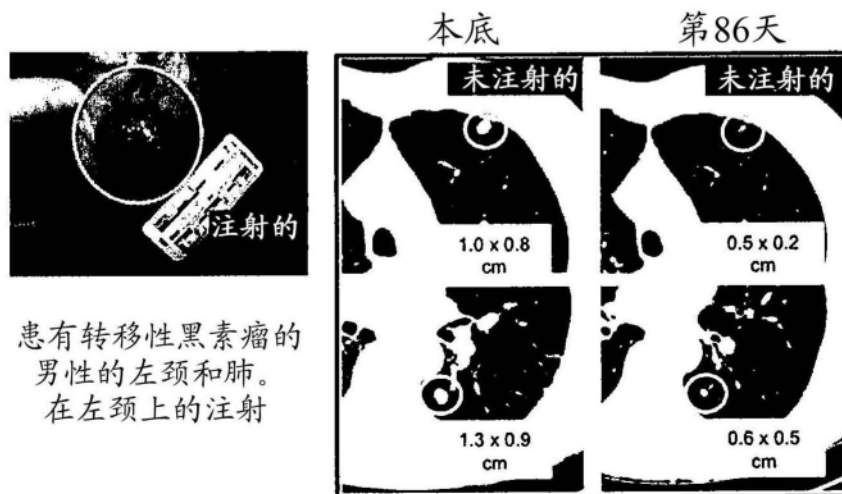
患有转移性黑素瘤的
男性的左颈和肺。
在左颈上的注射

图17

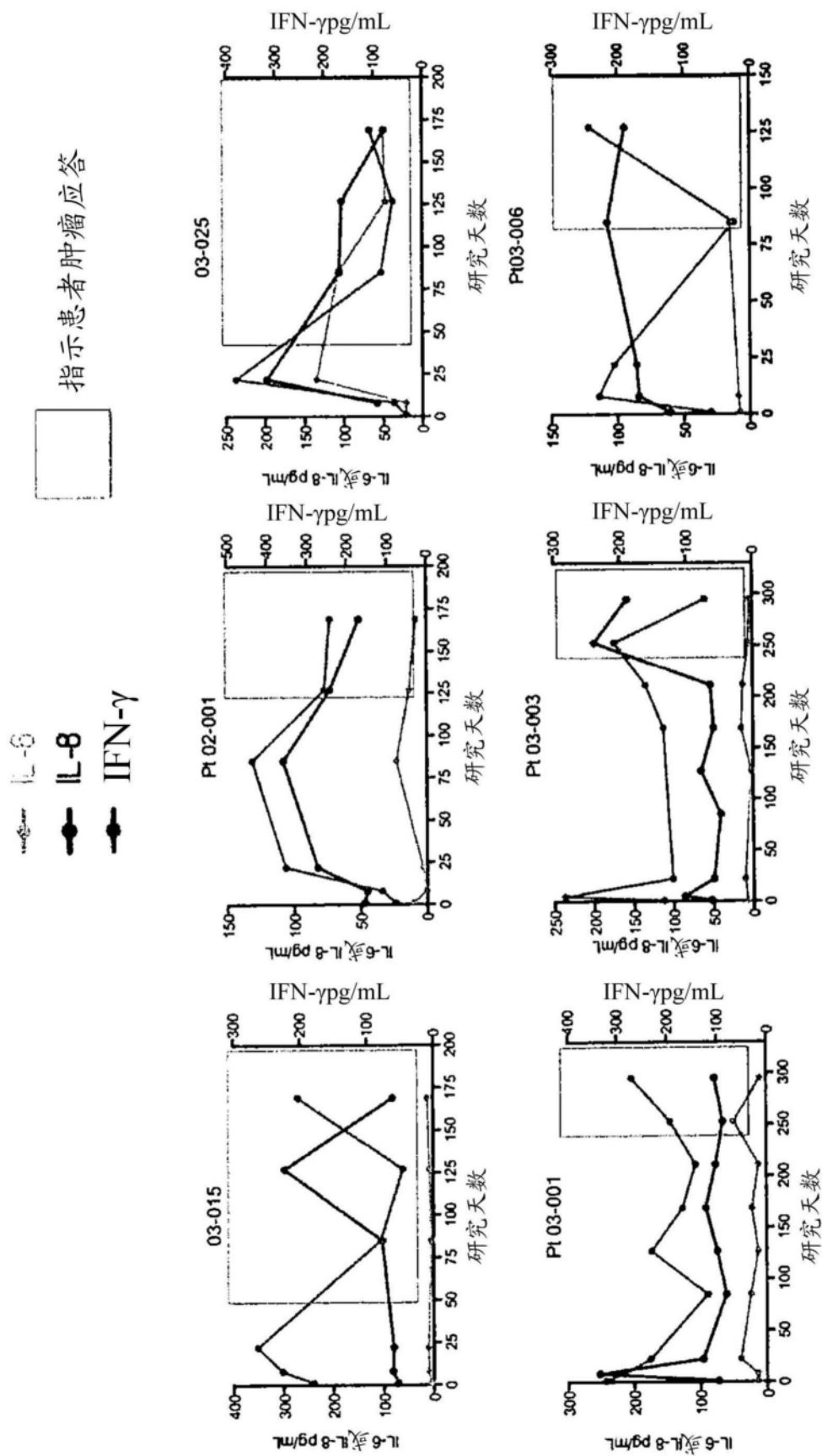


图18

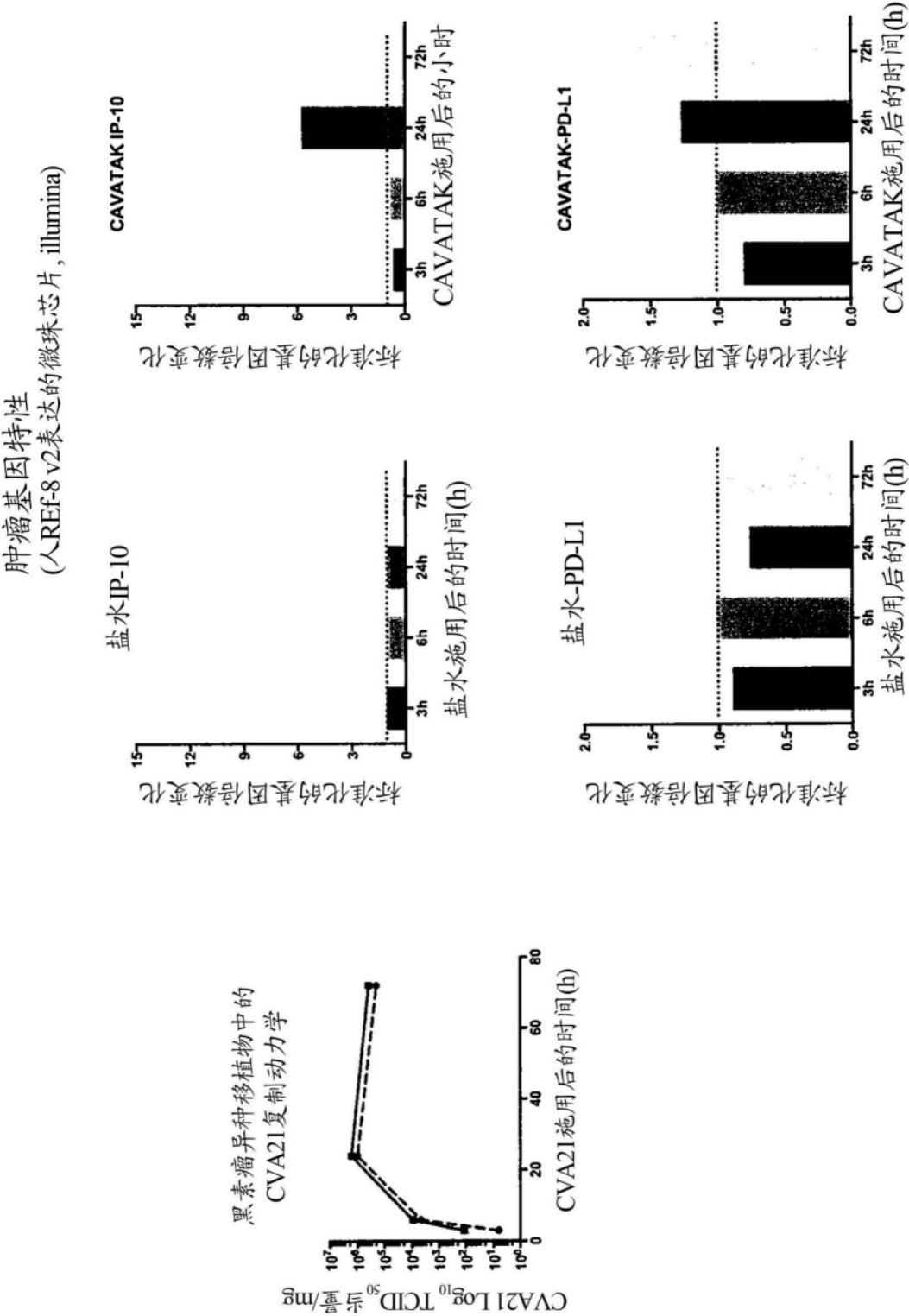


图19