



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112292449 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 201980024902.X

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436

(22) 申请日 2019.04.09

代理人 程淼

(30) 优先权数据

62/655,009 2018.04.09 US

(51) Int.Cl.

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 35/761 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/026626 2019.04.09

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/199859 EN 2019.10.17

(71) 申请人 萨克生物研究学院

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·米亚科-斯顿尔 C·欧谢伊

W·帕特洛 M·莱曼

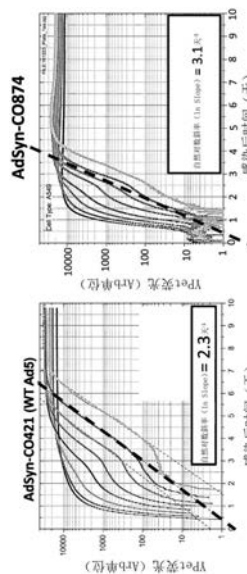
权利要求书3页 说明书42页
序列表(电子公布) 附图15页

(54) 发明名称

具有增强的复制特性的溶瘤腺病毒组合物

(57) 摘要

描述了在E3区域具有缺失或修饰的肿瘤选择性重组腺病毒。表达腺病毒死亡蛋白(ADP)但其余六个E3基因中至少三个缺失的重组腺病毒表现出增强的病毒复制能力。重组腺病毒还包括其它修饰,以允许在肿瘤细胞中选择性复制并使病毒脱靶于肝脏。描述了重组腺病毒在癌症治疗中的用途。



1. 一种重组腺病毒基因组,包括:
E1A区域,其编码修饰的E1a蛋白;
E3区域,其编码腺病毒死亡蛋白(ADP)并在选自于12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k的至少三个E3基因的编码序列中包含修饰,其中,所述修饰阻止了所述编码的蛋白质的表达;以及
E4区域,其包含E4orf6/7编码序列的缺失。
2. 根据权利要求1所述的重组腺病毒基因组,其中,所述修饰的E1a蛋白包括:
LXCXE基序的缺失;
残基2-11的缺失;
C124G替换;
Y47H替换;
Y47H替换和C124G替换;或
Y47H替换、C124G替换和残基2-11的缺失。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的重组腺病毒基因组,其中,所述至少三个E3基因包括12.5k、6.7k和19k。
4. 根据权利要求3所述的重组腺病毒基因组,其中,所述12.5k、6.7k和19k基因缺失。
5. 根据权利要求3所述的重组腺病毒基因组,其中,所述12.5k、6.7k和19k基因包含起始密码子的突变,引入提前终止密码子的突变,或两者。
6. 根据权利要求1或权利要求2所述的重组腺病毒基因组,其中,所述至少三个E3基因包括RID α 、RID β 和14.7k。
7. 根据权利要求6所述的重组腺病毒基因组,其中,所述RID α 、RID β 和14.7k基因缺失。
8. 根据权利要求6所述的重组腺病毒基因组,其中,所述RID α 、RID β 和14.7k基因包含起始密码子的突变,引入提前终止密码子的突变,或两者。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的重组腺病毒基因组,其中,所述至少三个E3基因包括12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k。
10. 根据权利要求9所述的重组腺病毒基因组,其中,所述12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k基因缺失。
11. 根据权利要求9所述的重组腺病毒基因组,其中,所述12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k基因包含起始密码子的突变,引入提前终止密码子的突变,或两者。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的重组腺病毒基因组,其进一步包含E4orf3的缺失。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的重组腺病毒基因组,其中,所述基因组进一步编码与FK506结合蛋白(FKBP)融合的靶向配体,和与野生型FKBP-雷帕霉素结合(FRB)蛋白融合的腺病毒纤维蛋白或能够结合rapalog的突变FRB蛋白。
14. 根据权利要求13所述的重组腺病毒基因组,其中,所述靶向配体是单结构域抗体。
15. 根据权利要求14所述的重组腺病毒基因组,其中,所述单结构域抗体对EGFR具有特异性。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的重组腺病毒基因组,其包含至少一种修饰以使腺病毒脱靶于肝脏。

17. 根据权利要求16所述的重组腺病毒基因组,其包含六邻体蛋白中的突变。
18. 根据权利要求17所述的重组腺病毒基因组,其中,所述六邻体突变是E451Q突变。
19. 根据权利要求16-18中任一项所述的重组腺病毒基因组,其进一步包含肝特异性微小RNA的一个或多个结合位点。
20. 根据权利要求19所述的重组腺病毒基因组,其中,所述肝特异性微小RNA的一个或多个结合位点位于E1A的3'-UTR中。
21. 根据权利要求19或权利要求20所述的重组腺病毒基因组,其中,所述肝特异性微小RNA是miR-122。
22. 根据权利要求1-21中任一项所述的重组腺病毒基因组,其中,所述基因组编码嵌合纤维蛋白。
23. 根据权利要求22所述的重组腺病毒基因组,其中,所述嵌合纤维蛋白包括来自第一腺病毒血清型的纤维杆和来自第二腺病毒血清型的纤维结。
24. 根据权利要求23所述的重组腺病毒基因组,其中,所述第一腺病毒血清型是Ad5,并且所述第二腺病毒血清型是Ad3、Ad9、Ad11、Ad12、Ad34或Ad37。
25. 根据权利要求23所述的重组腺病毒基因组,其中,所述第一腺病毒血清型是Ad5,并且所述第二腺病毒血清型是Ad34。
26. 根据权利要求25所述的重组腺病毒基因组,其中,所述Ad34纤维结包含防止或抑制与CD46结合的修饰。
27. 根据权利要求1-25中任一项所述的重组腺病毒基因组,其中,所述基因组编码经修饰以包括RGD肽的纤维蛋白。
28. 根据权利要求1-27中任一项所述的重组腺病毒基因组,其进一步包含异源开放阅读框(ORF)。
29. 根据权利要求28所述的重组腺病毒基因组,其中,所述异源ORF包含报告基因。
30. 根据权利要求28所述的重组腺病毒基因组,其中,所述异源ORF包含治疗基因。
31. 根据权利要求28-30中任一项所述的重组腺病毒基因组,其中,所述异源ORF可操作地连接至相同的阅读框,并在所述相同的阅读框中作为自切割肽编码序列和所述ADP编码序列。
32. 根据权利要求31所述的重组腺病毒基因组,其中,所述自切割肽是2A肽。
33. 根据权利要求32所述的重组腺病毒基因组,其中,所述2A肽包括:猪捷申病毒-1(PTV1) 2A (P2A) 肽、口蹄疫病毒(FMDV) 2A (F2A) 肽、马鼻炎A病毒(ERAV) 2A (E2A) 肽或明脉扁刺蛾病毒(TaV) 2A (T2A) 肽。
34. 根据权利要求1所述的重组腺病毒基因组,其中,所述基因组的核苷酸序列与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:59具有至少95%同一性。
35. 根据权利要求1所述的重组腺病毒基因组,其中,所述基因组的核苷酸序列与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID

NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:59具有至少99%同一性。

36. 根据权利要求1所述的重组腺病毒基因组,其中,所述基因组的核苷酸序列包括SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:59。

37. 一种分离的细胞,其包含权利要求1-36中任一项所述的重组腺病毒基因组。

38. 一种组合物,其包含权利要求1-36中任一项所述的重组腺病毒基因组或权利要求37所述的分离的细胞,以及药学上可接受的载体。

39. 一种分离的腺病毒,其包含权利要求1-36中任一项所述的重组腺病毒基因组。

40. 一种组合物,其包含权利要求39所述的重组腺病毒和药学上可接受的载体。

41. 一种抑制肿瘤细胞生存力的方法,包括使所述肿瘤细胞与权利要求1-36中任一项所述的重组腺病毒基因组、权利要求39所述的腺病毒或权利要求38或权利要求40所述的组合物接触。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中,所述方法是体外方法。

43. 根据权利要求41所述的方法,其中,所述方法是体内方法,并且接触所述肿瘤细胞包括对患有肿瘤的受试者施用治疗有效量的所述重组腺病毒基因组、所述腺病毒或所述组合物。

44. 一种在受试者中抑制肿瘤进展或减小肿瘤体积的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-36中任一项所述的重组腺病毒基因组、权利要求39所述的腺病毒,或权利要求38或权利要求40所述的组合物,从而抑制所述受试者的肿瘤进展或减小肿瘤体积。

45. 一种治疗受试者癌症的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-36中任一项所述的重组腺病毒基因组、权利要求39所述的重组腺病毒,或权利要求38或权利要求40所述的组合物,从而治疗所述受试者的癌症。

46. 一种重组腺病毒基因组,其中,所述基因组的核苷酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:58具有至少95%的同一性。

47. 根据权利要求46所述的重组腺病毒基因组,其中,所述基因组的核苷酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:58具有至少99%的同一性。

48. 根据权利要求46所述的重组腺病毒基因组,其中,所述基因组的核苷酸序列包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:58。

49. 一种分离的腺病毒,其包含权利要求46-48中任一项所述的重组腺病毒基因组。

具有增强的复制特性的溶瘤腺病毒组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年4月9日提交的美国临时申请号62/655,009的权益,通过引用将其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及在E3区域中具有缺失或其它修饰的肿瘤选择性重组腺病毒,其增强了病毒复制。本公开进一步涉及重组腺病毒在癌症治疗中的用途。

背景技术

[0004] 癌症是一种复杂的、使人衰弱的疾病,每年导致超过五十万人死亡。迫切需要更有效、更具选择性和更安全的癌症治疗方法。现有的疗法(例如化学疗法和外科手术)很少能消除所有恶性细胞,并且经常表现出有害的副作用,其可能超过治疗益处。

[0005] 一种有潜力解决当前癌症治疗方法许多缺点的方法是溶瘤腺病毒治疗(Pesonen等, *Molecular Pharmaceutics* 8(1):12-28, 2010)。腺病毒(Ad)是一种自我复制的生物机器。它由包裹在蛋白质外壳中的线性双链36kb DNA基因组组成。腺病毒侵入并劫持细胞复制机制以繁殖,并在组装后诱导裂解细胞死亡以扩散至周围细胞。这些非常相同的细胞控制是癌症突变的目标。可以利用这些知识来制造合成病毒,其作用类似于导弹,特别是在肿瘤细胞中感染和复制,并裂解细胞以释放成千上万的病毒后代,这些后代可以寻找并破坏远处的转移,同时克服可能的耐药性。因此,溶瘤病毒设计的目的是产生一种在癌细胞中特异性复制但不会损害正常细胞的病毒。然而,在设计可以选择性地在癌细胞中复制的病毒方面存在重大挑战。因此,仍然需要在癌细胞中高效选择性复制的病毒。此外,许多溶瘤病毒已在临床试验中证明对人类癌症患者是安全的,但大多数在治疗晚期癌症方面均达不到效果。因此,与当前的现有技术相比,仍然需要开发具有增强的效力的病毒。

发明内容

[0006] 公开了在肿瘤细胞中表现出增强的复制动力学的重组腺病毒。还描述了编码在肿瘤细胞中复制增强的重组腺病毒的重组腺病毒基因组。

[0007] 本文提供了重组腺病毒基因组,其包括编码修饰的E1A蛋白的E1A区域;编码腺病毒死亡蛋白(ADP)的E3区域,并在选自于12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k的至少三个E3基因的编码序列中有修饰,其中,所述修饰阻止了所编码的蛋白质的表达;以及E4区域,其包含E4orf6/7编码序列的修饰(例如缺失)。

[0008] 在一些实施方案中,重组腺病毒基因组进一步编码靶向配体,进一步编码嵌合纤维蛋白,进一步包括至少一种修饰以使腺病毒脱靶于肝脏,进一步包括异源开放阅读框(ORF),进一步包括缺失E4orf3,或其任意组合。

[0009] 还提供了包含本文公开的重组腺病毒基因组的分离的细胞。还提供了包含重组腺病毒基因组的组合物。

[0010] 还提供了由重组腺病毒基因组编码的重组腺病毒,以及包含本文公开的重组腺病毒的组合。

[0011] 还提供了通过使肿瘤细胞与本文公开的重组腺病毒基因组、重组腺病毒或组合物接触来抑制肿瘤细胞生存力的方法。

[0012] 还提供了通过向受试者施用治疗有效量的本文公开的重组腺病毒基因组、重组腺病毒或组合物来抑制受试者的肿瘤进展或减小肿瘤体积的方法,以及治疗受试者的癌症的方法。

[0013] 还描述了具有与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58和59中的任何一个序列具有至少95%同一性的核苷酸序列的重组腺病毒基因组。进一步描述了由与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58和59中的任何一个序列具有至少95%同一性的核苷酸序列编码的重组腺病毒。

[0014] 根据下面参照附图进行的详细描述,本公开的前述和其它目的及特征将变得更加明显。

附图说明

[0015] 图1是一对图,其对WT Ad5报告病毒AdSyn-C0421和E3缺失的AdSyn-C0874在A549肺癌细胞中的复制进行了比较。相较于WT病毒,AdSyn-C0874中七个E3基因的六个缺失导致复制增强。

[0016] 图2是一对图和表格,其对溶瘤病毒AdSyn-C0821(缺乏E3基因RID α 、RID β 和14.7k)与缺乏六个E3基因(RID α 、RID β 、4.7k、12.5k、6.7k和19.k)的相应病毒AdSyn-C0819的复制动力学进行比较。AdSyn-C0819在所有测试的癌细胞系中均表现出优异的复制能力。

[0017] 图3是一对图,其示出了WT Ad5报告病毒AdSyn-C0421与AdSyn-C0964在柯萨奇腺病毒受体(CAR)阴性细胞中的复制动力学。AdSyn-C0964是合成的Ad5病毒,其表达由Ad5杆和Ad34结组成的嵌合纤维蛋白。Ad34结结构域的表达导致CAR阴性细胞中病毒复制增强。

[0018] 图4是一对图,其对E3缺失的溶瘤Ad5(AdSyn-C01000)与表达Ad34结构域(AdSyn-C01042)的相应的E3缺失的溶瘤病毒在CAR阴性细胞中的复制进行比较。与在多个细胞系中表达Ad5结的病毒相比,AdSyn-C01042表现出增强的复制动力学。

[0019] 图5A-5B是一对图,其示出了AdSyn-C01000和AdSyn-C01042在A549肺肿瘤异种移植模型中的体内功效。通过将 5×10^6 个细胞注射到乳腺脂肪垫中,将人A549肿瘤细胞接种到裸鼠中。当肿瘤平均体积达到约 164mm^3 (第0天)时,将小鼠随机分为不同的治疗组(每组n=8只小鼠)。给小鼠单次肿瘤内注射(IT)PBS(盐水)或单次注射 8×10^6 PFU所示病毒。AdSyn-C0421将YPet荧光团编码为YPet-P2A-ADP融合体,但其余为野生型Ad5。与“野生型”AdSyn-C0421相比,AdSyn-C01000(图5A)和AdSyn-C01042(图5B)均表现出增强的抗肿瘤活性。

[0020] 图6是示出了AdSyn-C01042在原位HS578T三阴性乳腺癌模型中的体内功效的图。通过将 $100\mu\text{l}$ 的HBSS中的 5×10^6 个细胞注射到右乳腺脂肪垫中,将人HS578T肿瘤细胞接种到7周龄的NSG小鼠中。当肿瘤的平均体积达到约 168mm^3 (第0天)时,将小鼠随机分为不同的治疗组(每组n=8只小鼠)。在第0、7和14天给小鼠服用3剂量的PBS(生理盐水)或AdSyn-

C01042 (2×10^8 PFU), 总体积为 $50 \mu\text{l}$ 。由于肿瘤负担, 必须在第30天之前处死生理盐水治疗组中的所有动物。

[0021] 图7A-7B是示出在C57BL/6小鼠中重组腺病毒的安全性和毒性研究结果的图。以指定剂量在第0天以 $200 \mu\text{l}$ 的体积将四种不同病毒静脉内施用于不同组的小鼠 (每组 $n=5$ 只小鼠), 并在第7天重复一次。然后分析小鼠的存活率 (图7A) 和肝酶升高 (图7B) 以对肝毒性进行评估。(图7A) 监测小鼠的存活和毒性的总体征, 直到第14天。尽管WT Ad5以 4×10^9 PFU的剂量引起致命毒性, 但在该剂量下AdSyn-C0181和AdSyn-C0331均被耐受。AdSyn-C01042的耐受剂量甚至更高, 为 2×10^{10} PFU。(图7B) 在第-2天 (给药前)、第2天 (给药1后48小时) 和第9天 (给药2后48小时) 从所有小鼠中采集血样, 并冷冻以用于随后的分析。评估血液样本中各种肝酶的存在, 例如丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST)。显示的结果是各个治疗组第2天血液的平均AST和ALT水平。还示出了所有小鼠的AST和ALT的平均给药前水平。

[0022] 图8是示出了AdSyn-C01000对BALB/c小鼠的毒性的表。在第0天、第6天和第12天以指定剂量将 $200 \mu\text{l}$ 体积的两种不同病毒静脉内施用于不同组的小鼠 (每组 $n=5$ 只小鼠)。然后分析小鼠的存活以对毒性进行评估。然而, WT Ad5在 0.8×10^9 PFU的剂量下, 在5只小鼠中有2只引发致死毒性, 并在 3.2×10^9 PFU的较高剂量下杀死所有小鼠, AdSyn-C01000在 1×10^9 PFU和 4×10^9 PFU更高的剂量下更安全。

[0023] 图9是示出了在A549肺肿瘤异种移植模型中静脉内递送的AdSyn-C01042的体内功效的图。通过将 5×10^6 个细胞注射到乳腺脂肪垫中, 将人A549肿瘤细胞接种到NSG小鼠中。当肿瘤的平均体积达到 $\sim 184 \text{mm}^3$ (第0天) 时, 将小鼠随机分为不同的治疗组 (每组 $n=8$ 只小鼠)。给小鼠单次注射PBS (盐水) 或单次IV注射 2×10^9 PFU的AdSyn-C01042。由于肿瘤负担, 必须在第33天之前处死盐水治疗组中的所有动物。野生型Ad5无法以 2×10^9 PFU的剂量递送, 因为该剂量会导致死亡。

[0024] 图10是示出了AdSyn-C01000和AdSyn-C01042的肿瘤选择性复制的一组图。人A549细胞 (肺癌) 或人原发性小气道上皮细胞 (SAEC-正常肺) 以每细胞0.12病毒颗粒的MOI感染了四种溶瘤病毒。所有病毒都将YPet荧光团编码为报告基因, 以量化病毒随时间的复制/扩张。病毒感染后, 立即在IncuCyte ZOOM成像系统中每小时对病毒感染的细胞进行一次成像, 以量化在6-7天内YPet+病毒感染的细胞的数量。数据表示为一段时间内YPet+细胞的数量。AdSyn-C0874和AdSyn-C01000是相同的病毒, 除了AdSyn-C01000具有赋予肿瘤选择性复制的 Δ LXCXE和 Δ E4orf6/7突变, 以及肝脏脱靶六邻体突变之外。同样, AdSyn-C01041和AdSyn-C01042是相同的病毒, 除了AdSyn-C01042具有 Δ LXCXE和 Δ E4orf6/7突变, 以及肝脏脱靶六邻体突变。在肿瘤细胞中, 与AdSyn-C0874和AdSyn-C01041相比, AdSyn-C01000和AdSyn-C01042分别显示出相似的病毒扩展/复制水平。然而, 在正常肺细胞中, 与AdSyn-C0874和AdSyn-C01041相比, AdSyn-C01000和AdSyn-C01042的扩张/复制能力明显降低。

[0025] 图11是证明了E3B区域的缺失或消除对腺病毒复制的影响的柱状图。使用基于荧光的病毒动力学 (FBVK) 分析评估了四种不同的重组病毒, 以确定在人A549肺肿瘤细胞中的复制速率。该图示出了编码Ypet荧光蛋白的每种重组腺病毒的自然对数斜率 (\ln -slope) 值。在AdSyn-C0869中, RID α 、RID β 和14.7k基因 (E3B基因) 均已从基因组中去除。在AdSyn-C0996中, 通过使起始密码子突变或通过使基因组突变以编码提前终止密码子, 消除了RID α 、RID β 和14.7k基因 (E3B基因) 的表达。在AdSyn-C0874中, 六个E3基因 (12.5k、6.7k、19k、

RID α 、RID β 和14.7k)已从基因组中删除。

[0026] 图12是示出了缺失或删除E3A区域对腺病毒复制的影响的柱状图。在FBVK检验中评估四种不同的病毒,以确定在人A549肺肿瘤细胞中的复制速率。该图示出了编码Ypet荧光蛋白的每种重组腺病毒的1n-斜率值。在AdSyn-C01002中,12.5k、6.7k和19k基因(E3A基因)均已从基因组中删除。在AdSyn-C0999中,相同的E3A基因已被删除,该病毒还包括E1A Δ LXCXE、 Δ E4orf6/7和六邻体[E451Q]修饰。在AdSyn-C01000中,已从基因组中删除了E3A和E3B基因(12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k),该病毒还包括E1A Δ ALXCXE、 Δ E4orf6/7和六邻体[E451Q]修饰。

[0027] 图13是示出了E4orf3的缺失对病毒复制无影响的柱状图。在FBVK检验中对两种病毒进行评估,以确定A549人肺肿瘤细胞的复制速率。柱状图示出了每个重组腺病毒的1n-斜率值。除了在adsync-co1347中缺失E4orf3外,adsync-co1042和adsync-co1347是相同的。

[0028] 序列表

[0029] 如37C.F.R.1.822中所定义,使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三个字母代码,表示所附序列表中列出的核酸和氨基酸序列。每个核酸序列仅显示一条链,但是互补链应理解为包括任何参考显示链的内容。序列表以ASCII文本文件的形式提交,创建于2019年4月8日,1.36MB,在此引用作为参考。在随附的序列表中:

[0030] SEQ ID NO:1是合成腺病毒AdSyn-C0335的核苷酸序列。

[0031] SEQ ID NO:2是合成腺病毒AdSyn-C0821的核苷酸序列。

[0032] SEQ ID NO:3是合成腺病毒AdSyn-C0820的核苷酸序列。

[0033] SEQ ID NO:4是合成腺病毒AdSyn-C0819的核苷酸序列。

[0034] SEQ ID NO:5是合成腺病毒AdSyn-C01020的核苷酸序列。

[0035] SEQ ID NO:6是合成腺病毒AdSyn-C0874的核苷酸序列。

[0036] SEQ ID NO:7是合成腺病毒AdSyn-C01000的核苷酸序列。

[0037] SEQ ID NO:8是合成腺病毒AdSyn-C01067的核苷酸序列。

[0038] SEQ ID NO:9是合成腺病毒AdSyn-C01068的核苷酸序列。

[0039] SEQ ID NO:10是合成腺病毒AdSyn-C01069的核苷酸序列。

[0040] SEQ ID NO:11是合成腺病毒AdSyn-C0964的核苷酸序列。

[0041] SEQ ID NO:12是合成腺病毒AdSyn-C01041的核苷酸序列。

[0042] SEQ ID NO:13是合成腺病毒AdSyn-C01042的核苷酸序列。

[0043] SEQ ID NO:14是合成腺病毒AdSyn-C01139的核苷酸序列。

[0044] SEQ ID NO:15是P2A的氨基酸序列。

[0045] SEQ ID NO:16是F2A的氨基酸序列。

[0046] SEQ ID NO:17是E2A的氨基酸序列。

[0047] SEQ ID NO:18是T2A的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO:19是在N末端包含GSG的修饰的P2A的氨基酸序列。

[0049] SEQ ID NO:20是在N末端包含GSG的修饰的F2A的氨基酸序列。

[0050] SEQ ID NO:21是在N末端包含GSG的修饰的E2A的氨基酸序列。

[0051] SEQ ID NO:22是在N末端包含GSG的修饰的T2A的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO:23是Ad5 E1A的氨基酸序列。

- [0053] SEQ ID NO:24是Ad5 E1A Δ LXCXE的氨基酸序列。
- [0054] SEQ ID NO:25是Ad5 E1A C124G的氨基酸序列。
- [0055] SEQ ID NO:26是Ad5 E1A Δ 2-11的氨基酸序列。
- [0056] SEQ ID NO:27是Ad5 E1A Y47H C124G的氨基酸序列。
- [0057] SEQ ID NO:28是Ad5 E1A Δ 2-11Y47H C124G的氨基酸序列。
- [0058] SEQ ID NO:29是Ad5 E4orf6/7的氨基酸序列。
- [0059] SEQ ID NO:30是Ad5纤维的氨基酸序列。
- [0060] SEQ ID NO:31是Ad5 FRB-纤维的氨基酸序列。
- [0061] SEQ ID NO:32是Ad5 FRB*-纤维的氨基酸序列。
- [0062] SEQ ID NO:33是EGFRVHH-GS-FKBP的氨基酸序列。
- [0063] SEQ ID NO:34是Ad5六邻体的氨基酸序列。
- [0064] SEQ ID NO:35是Ad5六邻体E451Q的氨基酸序列。
- [0065] SEQ ID NO:36是种类A (Ad12) E1A的氨基酸序列。
- [0066] SEQ ID NO:37是B类 (Ad7) E1A的氨基酸序列。
- [0067] SEQ ID NO:38是C类 (Ad2) E1A的氨基酸序列。
- [0068] SEQ ID NO:39是C类 (Ad5) E1A的氨基酸序列。
- [0069] SEQ ID NO:40是D类 (Ad9) E1A的氨基酸序列。
- [0070] SEQ ID NO:41是E类 (Ad4) E1A的氨基酸序列。
- [0071] SEQ ID NO:42是F类 (Ad40) E1A的氨基酸序列。
- [0072] SEQ ID NO:43是G类 (Ad52) E1A的氨基酸序列。
- [0073] SEQ ID NO:44是合成腺病毒AdSyn-C0421的核苷酸序列。
- [0074] SEQ ID NO:45是合成腺病毒AdSyn-C01056的核苷酸序列。
- [0075] SEQ ID NO:46是合成腺病毒AdSyn-C01250的核苷酸序列。
- [0076] SEQ ID NO:47是合成腺病毒AdSyn-C01089的核苷酸序列。
- [0077] SEQ ID NO:48是合成腺病毒AdSyn-C01320的核苷酸序列。
- [0078] SEQ ID NO:49是合成腺病毒AdSyn-C01321的核苷酸序列。
- [0079] SEQ ID NO:50是合成腺病毒AdSyn-C01325的核苷酸序列。
- [0080] SEQ ID NO:51是合成腺病毒AdSyn-C01342的核苷酸序列。
- [0081] SEQ ID NO:52是合成腺病毒AdSyn-C01362的核苷酸序列。
- [0082] SEQ ID NO:53是合成腺病毒AdSyn-C01403的核苷酸序列。
- [0083] SEQ ID NO:54是合成腺病毒AdSyn-C01404的核苷酸序列。
- [0084] SEQ ID NO:55是合成腺病毒AdSyn-C0869的核苷酸序列。
- [0085] SEQ ID NO:56是合成腺病毒AdSyn-C0996的核苷酸序列。
- [0086] SEQ ID NO:57是合成腺病毒AdSyn-C0999的核苷酸序列。
- [0087] SEQ ID NO:58是合成腺病毒AdSyn-C01002的核苷酸序列。
- [0088] SEQ ID NO:59是合成腺病毒AdSyn-C01347的核苷酸序列。
- [0089] SEQ ID NO:60是Ad34纤维的氨基酸序列。

具体实施方式

[0090] I. 缩写

[0091]	Ad	腺病毒
[0092]	ADP	腺病毒死亡蛋白
[0093]	CAR	柯萨奇腺病毒受体
[0094]	EGFR	表皮生长因子受体
[0095]	ERAV	马鼻炎A病毒
[0096]	FBVK	基于荧光的病毒动力学
[0097]	FKBP	FK 506结合蛋白
[0098]	FMDV	口蹄疫病毒
[0099]	FRB	FKBP-雷帕霉素结合
[0100]	IV	静脉注射
[0101]	IT	肿瘤内
[0102]	miR	微小RNA (microRNA)
[0103]	MOI	感染复数
[0104]	mTOR	雷帕霉素的哺乳动物靶标
[0105]	ORF	开放阅读框
[0106]	PSA	前列腺特异性抗原
[0107]	PTV1	猪捷申病毒1 (porcine teschovirus-1)
[0108]	Rb	视网膜母细胞瘤
[0109]	RGD	精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸
[0110]	TaV	明脉扁刺蛾病毒 (Thosea asigna virus)
[0111]	UTR	非翻译区
[0112]	WT	野生型

[0113] II. 术语和方法

[0114] 除非另有说明,否则根据常规用法使用技术术语。分子生物学中常用术语的定义可以在以下书籍中找到: Benjamin Lewin, *Genes V*, 牛津大学出版社出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew等编辑, *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd. 出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 和 Robert A. Meyers 编辑, *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 由 VCH Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

[0115] 为了便于回顾本公开的各种实施方案, 提供了对特定术语的以下解释:

[0116] 2A肽: 由某些RNA病毒 (如小核糖核酸病毒) 编码的一种自切割肽。2A肽通过使核糖体跳过2A要素C末端的肽键合成而起作用, 从而导致2A序列末端与下游肽之间分离 (Kim等, *PLoS One* 6 (4): e18556, 2011)。“切割”发生在2A肽C末端的甘氨酸和脯氨酸残基之间。示例性的2A肽包括但不限于由明脉扁刺蛾病毒 (*Thosea asigna virus*, TaV)、马鼻炎A病毒 (ERAV)、猪捷申病毒1 (porcine teschovirus-1, PTV1) 和口蹄疫病毒 (FMDV) 编码的2A肽, 其在本文描述为 SEQ ID NO:15-18)。在一些实施方案中, 所述2A肽在N末端包含 Gly-Ser-Gly, 以提高切割效率 (SEQ ID NO:19-22)。

[0117] 腺病毒:带有衬里、双链DNA基因组和二十面体衣壳的无包膜病毒。至少有68种已知的人腺病毒血清型,其分为7个种类(A类、B类、C类、D类、E类、F类和G类)。不同血清型的腺病毒与不同类型的疾病相关,某些血清型会引起呼吸道疾病(主要是B类和C类)、结膜炎(B类和D类)和/或胃肠炎(F类和G类)。

[0118] 腺病毒死亡蛋白(ADP):在腺病毒感染后期合成的一种蛋白,介导细胞裂解并释放腺病毒以感染其它细胞。ADP是101个氨基酸的完整膜糖蛋白,位于核膜、内质网和高尔基体。ADP以前称为E3-11.6K。

[0119] 施用:通过任何有效途径向受试者提供或给予诸如治疗剂的试剂(例如重组病毒或重组病毒基因组)。示例性的施用途径包括但不限于注射(例如皮下、肌肉、真皮内、腹膜内、肿瘤内、骨内和静脉内)、口服、导管内、舌下、直肠、透皮、鼻内、阴道和吸入途径。

[0120] 抗体:包含至少一个轻链和/或重链免疫球蛋白可变区域的多肽配体,该可变区识别并结合(例如特异性识别并特异性结合)抗原的表位。免疫球蛋白分子由重链和轻链组成,它们各自具有可变区域,称为可变重链(V_H)区域和可变轻链(V_L)区域,它们共同负责结合被抗体识别的抗原。抗体包括完整的免疫球蛋白以及抗体的变异体和部分(片段),例如单域抗体(例如VH域抗体或骆驼科VHH抗体)、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、单链Fv蛋白("scFv")和二硫键稳定的Fv蛋白("dsFv")。scFv蛋白是一种融合蛋白,其中免疫球蛋白的轻链可变区域和免疫球蛋白的重链可变区域被接头结合,而在dsFvs中,该链已突变以引入二硫键以稳定链的缔合。术语“抗体”还包括基因工程形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)和异源缀合物抗体(例如双特异性抗体)。还参见,Pierce Catalogue and Handbook, 1994-1995(Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, Immunology, 第三版, W.H. Freeman & Co., New York, 1997。

[0121] 化学治疗剂:对以异常细胞生长为特征的疾病具有治疗作用的任何化学治疗剂。这样的疾病包括肿瘤、赘生物和癌症以及以增生性生长为特征的疾病,例如牛皮癣。在一个实施方案中,化学治疗剂是放射性化合物。在一个实施方案中,化学治疗剂是生物学的,例如治疗性单克隆抗体(例如,对PD-1、PDL-1、CTLA-4、EGFR、VEGF等具有特异性)。本领域技术人员可以容易地确定所使用的化学治疗剂(例如,参见Slapak和Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine第14版; Perry等, Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer, L., Berkery, R. (eds.): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer, D. S., Knobf, M. F., Durivage, H. J. (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993)。联合化疗是一种以上药物对癌症进行治疗的给药方案。

[0122] 嵌合体:由至少两个起源不同的部分组成。在本公开的上下文中,“嵌合腺病毒”是具有衍生自至少两种不同血清型(例如来自Ad5和腺病毒的第二血清型)的遗传物质和/或蛋白质的腺病毒。在本文中,“衣壳交换”腺病毒是指嵌合腺病毒,其中衣壳蛋白衍生自腺病毒的一种血清型,而其余蛋白衍生自另一种腺病毒血清型。类似地,“嵌合纤维”是具有源自腺病毒的至少两种不同血清型的氨基酸序列的纤维蛋白。例如,嵌合纤维可以由来自Ad5的纤维杆和来自腺病毒的第二血清型(例如Ad34)的纤维结组成。

[0123] 接触:在直接物理结合中置换,包括以固体和液体形式。

[0124] 缺失:包含“缺失”腺病毒蛋白质编码序列(例如E4orf6/7编码序列)的腺病毒基因组是指具有蛋白质编码序列的完全缺失或导致不存在蛋白质表达的部分缺失的腺病毒。

[0125] 脱靶的:在本公开的上下文中,“脱靶的”腺病毒是重组或合成腺病毒,其包含一种或多种改变病毒趋性的修饰,从而不再感染或不再实质性感染特定细胞或组织类型。在一些实施方案中,重组或合成腺病毒包含衣壳突变,例如六邻体蛋白中的突变(例如,E451Q),其使病毒脱靶于肝脏。在一些实施方案中,重组或合成腺病毒包含天然不感染或基本上不感染特定细胞或组织类型的来自腺病毒的天然衣壳。在本文的一些实施方案中,重组或合成腺病毒是肝脱靶的和/或脾脱靶的。

[0126] E1A:腺病毒早期区域1A(E1A)基因和由该基因表达的多肽。E1A蛋白通过驱动细胞进入细胞周期而在病毒基因组复制中发挥作用。如本文所用,术语“E1A蛋白”是指由E1A基因表达的蛋白,并且该术语包括由任何腺病毒血清型产生的E1A蛋白。举例来说,野生型Ad5 E1A蛋白的氨基酸序列在本文中示为SEQ ID NO:23,而修饰的Ad5 E1A序列在本文中提供为SEQ ID NO:24-28。另外,来自多种不同腺病毒血清型的野生型E1A蛋白序列在本文中示为SEQ ID NO:36-43。在一些实施方案中,修饰的E1A蛋白包括与SEQ ID NO:24、25、26、27、28、36、37、38、39、40、41、42或43中的任何一个具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的蛋白。本文考虑的修饰E1A蛋白是指那些相较于肿瘤细胞,重组腺病毒在正常细胞中的复制缺陷。本文公开的修饰的E1A蛋白是Ad5 E1A蛋白。然而,可以在任何期望的血清型中进行相应的修饰,因此被涵盖在本公开内。例如,人腺病毒的所有种类均包含LXCXE基序,其在Ad5中对应于LTCHE(SEQ ID NO:23的残基122-126)。类似地,残基2-11的缺失以及Y47H和C124G替换参考Ad5进行编号(例如,SEQ ID NO:5),但是可以引入任何其它血清型中。

[0127] E3:腺病毒早期区域3(E3)基因和由该基因表达的多肽。在人腺病毒中,有7种E3蛋白(从5'到3'编码):12.5k(也称为gp12.5 kDa)、6.7k(也称为CR1 α)、19k(也称为gp19k)、ADP(也称为CR1 β 或11.6k)、RID α (10.4k)、RID β (14.9k)和14.7K。RID α 、RID β 和14.7k蛋白组成受体内化和降解复合物(RID),其位于核膜上,并引起多种受体的内吞和降解,包括CD95(FasL受体),以及TNFR1和2(TNF/TRAIL受体),来保护感染的细胞免受宿主抗病毒反应。6.7k蛋白参与感染细胞的凋亡调节,已知19k蛋白可抑制I类MHC蛋白插入受感染宿主细胞膜。ADP介导感染细胞的裂解。12.5k蛋白的功能未知。如本文所用,E3A基因包括12.5k、6.7k和19k基因,并且E3B基因包括RID α 、RID β 和14.7k基因。在本文的一些实施方案中,重组腺病毒基因组包括E3A基因的缺失,E3B基因的缺失或两者。在其它实施方案中,重组腺病毒基因组包含在E3A基因或E3B基因或两者的编码序列中的突变,使得该突变阻止了编码蛋白的表达。

[0128] E4:腺病毒早期区域3(E4)基因和由该基因表达的多肽。在人腺病毒中,E4区编码至少六个蛋白质,包括E4orf1、E4orf2、E4orf3、E4orf4、E4orf6和E4orf6/7。在本文的一些实施方案中,重组腺病毒基因组包含E4orf6/7的缺失。在一些实例中,重组腺病毒基因组进一步包含E4orf3的缺失。

[0129] E4orf6/7:由腺病毒E4基因编码的蛋白质。术语“E4orf6/7蛋白”包括由来自任何腺病毒血清型的E4基因产生的E4orf6/7蛋白。举例来说,野生型Ad5 E4orf6/7蛋白的氨基酸序列在本文中示为SEQ ID NO:29。在一些实施方案中,E4orf6/7蛋白包括与SEQ ID NO:

29中的任何一个具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的蛋白。本文考虑的修饰的E4orf6/7蛋白质是与肿瘤细胞相比,有助于在正常细胞中重组腺病毒的复制缺陷的蛋白质。在一些实施方案中,修饰的E4orf6/7蛋白包含消除或削弱其E2F结合位点和/或削弱E2F相互作用的突变(例如缺失)。在其它实施方案中,修饰的E4orf6/7蛋白包含缺失或损害核定位信号的修饰,这是有效转运E2F4所必需的。E4orf6/7的示例性修饰将在以下小节中进一步讨论。

[0130] 表皮生长因子受体(EGFR):细胞外蛋白配体EGF家族成员的细胞表面受体。EGFR也称为ErbB-1和HER1。许多类型的癌症包含导致EGFR过表达的突变。

[0131] 纤维:腺病毒纤维蛋白是一种三聚体蛋白,可介导与细胞表面受体的结合。纤维蛋白由长的N末端杆和球形C末端结组成。

[0132] FK506结合蛋白(FKBP):在真核生物中表达的蛋白质家族,起蛋白质折叠伴侣的作用。FKBP以其结合雷帕霉素的能力而闻名。示例性的FKBP序列在本文中表示为SEQ ID NO:33的残基132-238。

[0133] FKBP-雷帕霉素结合(FRB):与雷帕霉素结合的哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)结构域。FRB的示例性序列在本文中表示为SEQ ID NO:31的残基547-636。FRB的突变形式(在本文中称为“FRB*”)在本文中表示为SEQ ID NO:32的残基547-636,其能够结合雷帕霉素和rapalog(也称为AP21967)。FRB*在人mTOR的2098位处包含苏氨酸至亮氨酸替换(T2098L),其对应于SEQ ID NO:32的残基620。

[0134] 荧光蛋白:当暴露于特定波长的光时发出一定波长的光的蛋白质。荧光蛋白包括但不限于绿色荧光蛋白(例如GFP、EGFP、AcGFP1、Emerald、Superfolder GFP、Azami Green、mWasabi、TagGFP、TurboGFP、YPet和ZsGreen)、蓝色荧光蛋白(例如EBFP、EBFP2、Sapphire、T-Sapphire、Azurite和mTagBFP)、青色荧光蛋白(例如ECFP、mECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midori-Ishi Cyan、mTurquoise和mTFP1)、黄色荧光蛋白(EYFP、Topaz、Venus、mCitrine、YPet、TagYFP、PhiYFP、ZsYellow1和mBanana)、橙色荧光蛋白(Kusabira Orange、Kusabira Orange2、mOrange、mOrange2和mTangerine)、红色荧光蛋白(mRuby、mApple、mStrawberry、AsRed2、mRFP1、Jred、mCherry、HcRed1、mRasp dKeima-Tandem、HcRed-Tandem、mPlum、AQ143、tdTomato和E2-Crimson)、远红荧光蛋白(例如Katushka2S)、橙/红荧光蛋白(dTomato、dTomato-Tandem、TagRFP、TagRFP-T、DsRed、DsRed2、DsRed-Express(T1)和DsRed-Monomer)及其修改形式。

[0135] 融合蛋白:一种蛋白质,含有至少两个不同(异源)蛋白质或肽的氨基酸序列。融合蛋白可以例如通过由编码两种不同(异源)蛋白的至少一部分的核酸序列改造而来的核酸序列的表达而产生。为了产生融合蛋白,核酸序列必须在相同的阅读框中并且不包含内部终止密码子。融合蛋白,特别是短融合蛋白,也可以通过化学合成产生。

[0136] 异源:异源蛋白质或多肽是指衍生自不同来源或物种的蛋白质或多肽。类似地,异源ORF是衍生自不同来源或物种的ORF。

[0137] 六邻体:一种主要的腺病毒衣壳蛋白。来自Ad5的示例性六邻体序列在本文中示为SEQ ID NO:34。包含E451Q替换的突变六邻体序列在本文中示为SEQ ID NO:35。

[0138] 免疫调节蛋白:改变(例如激活、增强或抑制)免疫系统的蛋白。免疫调节剂包括但不限于细胞因子(例如白介素2(IL-2)、IL-7、IL-12、GM-CSF、FLT3配体或干扰素)、趋化因子

(例如CCL3、CCL26、CXCL7、CXCL9和CXCL10)、T细胞活化配体(例如抗CD3 Abs或同种抗原)、共刺激分子(例如B7.1/B7.2、OX40L、4-1-BBL或CD40L)、检查点封锁抑制剂(例如抗PD-1或抗CTLA4 Abs)和小分子免疫调节剂。

[0139] 分离的:“分离的”生物成分(例如核酸分子、蛋白质、病毒或细胞)已与生物体的细胞或组织、或生物体本身中的其它生物成分充分分离或纯化,其中,所述成分天然存在,例如其它染色体和染色体外的DNA和RNA、蛋白质和细胞。已“分离”的核酸分子和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸分子和蛋白质。该术语还涵盖通过在宿主细胞中重组表达而制备的核酸分子和蛋白质,以及化学合成的核酸分子和蛋白质。

[0140] 微小RNA(microRNA,miRNA或miR):调节植物、动物和病毒中基因表达的单链RNA分子。编码微小RNA的基因被转录,以形成初级转录微小RNA(pri-miRNA),将其加工成短茎环分子,称为前体微小RNA(pre-miRNA),然后进行内切核酸酶切以形成成熟的微小RNA。成熟的微小RNA长度约为21-23个核苷酸,与一个或多个目标信使RNA(mRNA)的3'UTR部分互补。微小RNA通过促进靶mRNA的切割或阻断细胞转录物的翻译对基因表达进行调节。在本公开的上下文中,“肝特异性微小RNA”是优先在肝脏中表达的微小RNA,例如仅在肝脏中表达的微小RNA,或例如与其它器官或组织类型相比,在肝脏中表达更多的微小RNA。

[0141] 修饰:核酸或蛋白质序列的序列变化。例如,氨基酸序列修饰包括例如替换、插入和缺失或其组合。插入包括氨基和/或羧基末端融合以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。缺失的特征在于从蛋白质序列中去除一个或多个氨基酸残基。在本文的一些实施方案中,修饰(例如替换、插入或缺失)导致功能改变,例如蛋白质特定活性的降低或增强。如本文所用,“ Δ ”或“ δ ”是指缺失。例如,E1A Δ LXCXE是指具有LXCXE基序缺失的E1A多肽。替换修饰是其中至少一个残基已被去除并且在其位置插入了不同残基的修饰。氨基酸替换通常是单个残基,但是可以一次在多个不同位置发生。替换、缺失、插入或其任何组合可以组合以获得最终的突变体序列。这些修饰可通过修饰编码蛋白质的DNA中的核苷酸来制备,从而产生编码该修饰的DNA。在具有已知序列的DNA的预定位点进行插入、缺失和替换突变的技术是本领域众所周知的。“修饰的”蛋白质、核酸或病毒是具有一种或多种如上所述的修饰的蛋白质、核酸或病毒。

[0142] 赘生物、恶性肿瘤、癌症和肿瘤:赘生物是由于过度的细胞分裂导致的组织或细胞异常生长。赘生物生长可产生肿瘤。个体中肿瘤的量就是“肿瘤负担”,可以用肿瘤的数量、体积或重量来衡量。不转移的肿瘤称为“良性”。侵入周围组织和/或可以转移的肿瘤被称为“恶性”。恶性肿瘤也称为“癌症”。

[0143] 血液癌症是血液或骨髓的癌症。血液性(或造血性)癌症的实例包括白血病,包括急性白血病(例如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病,和粒细胞性、早幼粒细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红血球性白血病)、慢性白血病(例如慢性髓细胞(粒细胞性)白血病、慢性粒细胞性白血病和慢性淋巴细胞性白血病);真性红细胞增多症;淋巴瘤;霍奇金病;非霍奇金淋巴瘤(惰性和高级别形式);多发性骨髓瘤;华氏巨球蛋白血症;重链疾病;骨髓增生异常综合症;毛细胞白血病和脊髓发育不良。在某些情况下,淋巴瘤被认为是实体瘤。

[0144] 实体瘤是通常不包括囊肿或液体区域的异常组织肿块。实体瘤可以是良性或恶性的。不同类型的实体瘤因形成它们的细胞类型而异(例如肉瘤、癌和淋巴瘤)。诸如肉瘤和癌

等实体瘤的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴样恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、人乳头瘤病毒 (HPV) 感染的赘生物、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、威尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和中枢神经系统肿瘤 (例如神经胶质瘤 (例如脑干神经胶质瘤和混合性神经胶质瘤)、胶质母细胞瘤 (也称为多形胶质母细胞瘤) 细胞瘤、中枢神经系统淋巴瘤、生殖细胞瘤、髓母细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、血管瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移瘤。

[0145] 溶瘤病毒: 选择性杀死增生性疾病细胞 (例如癌细胞/肿瘤细胞) 的病毒。癌细胞的杀伤可以通过本领域建立的任何方法来检测, 例如确定活细胞计数, 或检测癌细胞中的细胞病变效应、凋亡或病毒蛋白的合成 (例如, 通过代谢标记、免疫印迹或复制所需的病毒基因的 RTPCR) 或肿瘤尺寸的缩小。

[0146] 可操作地连接: 当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时, 第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如, 如果启动子影响编码序列的转录或表达, 则该启动子可操作地连接至编码序列。通常, 可操作连接的 DNA 序列是连续的, 并且在需要连接两个蛋白质编码区的情况下, 它们在同一阅读框中。

[0147] 药学上可接受的载体: 可用于本公开的药学上可接受的载体 (载体) 是常规的。由 E.W.Martin 编写的 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第 15 版 (1975) 描述了适用于一种或多种治疗化合物、分子或试剂 (例如本文所公开的重组病毒或重组病毒基因组) 的药物递送的组合物和制剂。通常, 载体的性质将取决于所采用的特定施用方式。例如, 肠胃外制剂通常包含包括药学上和生理学上可接受的流体, 例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等的可注射的流体作为载体。对于固体组合物 (例如粉末、丸剂、片剂或胶囊剂形式), 常规的无毒固体载体可包括例如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物中性载体外, 待施用的药物组合物还可包含少量无毒辅助物质, 例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和 pH 缓冲剂诸如此类, 例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0148] 多肽、肽或蛋白质: 一种聚合物, 其中单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基。当氨基酸是 α -氨基酸时, 可以使用 L-光学异构体或 D-光学异构体。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可互换使用。这些术语适用于氨基酸聚合物, 其中一个或多个氨基酸残基是相应天然氨基酸的人工化学模拟物, 也适用于天然氨基酸聚合物和非天然氨基酸聚合物。术语“残基”或“氨基酸残基”包括所提及的掺入蛋白质、多肽或肽中的氨基酸。

[0149] 多肽中的保守替换是蛋白质序列中一个氨基酸残基被具有相似生物化学性质的不同氨基酸残基替换。通常, 保守替换对所得多肽的活性具有很小或几乎无影响。例如, 包含一个或多个保守替换 (例如不超过 1、2、3、4 或 5 个替换) 的蛋白质或肽保留了野生型蛋白质或肽的结构和功能。通过使用例如标准方法 (如定点诱变或 PCR) 来操纵编码该多肽的核苷酸序列, 可以产生含有一个或多个保守替换的多肽。在一个实例中, 可以通过测试抗体交叉反应性或其诱导免疫应答的能力来容易地选择此类变体。保守替换的实例如下所示。

	原始残基	保守替换
	Ala	Ser
	Arg	Lys
	Asn	Gln; His
[0150]	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
	His	Asn; Gln
	Ile	Leu; Val
	Leu	Ile; Val
	Lys	Arg; Gln、Glu
	Met	Leu; Ile
	Phe	Met; Leu; Tyr
[0151]	Ser	Thr
	Thr	Ser
	Trp	Tyr
	Tyr	Trp; Phe
	Val	Ile; Leu

[0152] 保守替换通常维持 (a) 替换区域中多肽主链的结构, 例如呈片状或螺旋构象, (b) 在靶位点的分子的电荷或疏水性, 或 (c) 侧链的主体。

[0153] 通常预期会产生蛋白质性质最大变化的替换是非保守的, 例如以下变化: 其中 (a) 亲水残基 (例如丝氨酸或苏氨酸) 替换疏水残基 (或被疏水残基替换), 例如, 亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸; (b) 半胱氨酸或脯氨酸替换任何其它残基 (或被任何其它残基替换); (c) 具有正电侧链的残基 (例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸) 替换负电残基 (例如谷氨酸或天冬氨酸) (或被负电残基替换); 或 (d) 具有庞大侧链的残基 (例如苯丙氨酸) 替换没有侧链的残基 (例如甘氨酸) (或被没有侧链的残基替换)。

[0154] 预防、治疗或改善疾病: “预防” 疾病是指抑制疾病的全面发展。“治疗” 是指在疾病或病理状况开始发展后改善其病征或症状的治疗干预。“改善” 是指疾病病征或症状的数量或严重程度的降低。

[0155] 纯化的: 术语“纯化的” 不需要绝对的纯度; 相反, 它旨在作为相对术语。因此, 例如, 纯化的肽、蛋白质、病毒或其它活性化合物是从天然结合的蛋白质和其它污染物中全部或部分分离的纯化的肽、蛋白质、病毒或其它活性化合物。在某些实施方案中, 术语“基本上纯化的” 是指已经从细胞、细胞培养基或其它粗制品中分离出的肽、蛋白质、病毒或其它活性化合物, 并经过分级分离以除去初始制剂的各种成分, 例如蛋白质、细胞碎片和其它成分。

[0156] 雷帕霉素: 具有已知的免疫抑制和抗增殖特性的小分子。雷帕霉素, 也称为西罗莫司, 是最初作为细菌吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 的产物而被发现的一种大环内酯物。雷帕霉素结合并抑制mTOR的活性。Rapalog (也称为AP21967) 是雷帕霉素的类似物。

[0157] 重组: 重组核酸分子、蛋白质或病毒是具有非天然存在的序列, 或者具有由一个序

列的两个分离的片段人工组合而成的序列的重组核酸分子、蛋白质或病毒。可以通过化学合成或通过人工操作核酸分子的分离片段(例如通过基因工程技术),来实现这种人工组合。术语“重组”还包括仅通过添加、替换或缺失天然核酸分子、蛋白质或病毒的一部分而改变的核酸、蛋白质和病毒。

[0158] 复制缺陷:在非肿瘤细胞(与肿瘤细胞相比)中表现出“复制缺陷”的腺病毒是指与肿瘤细胞相比在正常细胞中表现出减少的病毒复制的腺病毒。复制缺陷可通过以下方法证明:例如,缺乏病毒晚期蛋白表达;病毒DNA合成减少;诱导E2F靶基因(例如细胞周期蛋白A和B)的能力降低;引发S期进入的能力降低和/或与肿瘤细胞相比,诱导正常细胞的细胞杀伤的能力降低。

[0159] RGD肽:具有三氨基酸基序精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸的肽。RGD基序存在于许多基质蛋白中,例如纤连蛋白、纤维蛋白原、玻连蛋白和骨桥蛋白,并在细胞与细胞外基质的粘附中发挥作用。

[0160] 自裂解肽:诱导核糖体跳过C末端肽键合成的肽,导致肽序列与下游多肽分离。病毒编码的2A肽是一种类型的自切割肽。病毒编码的2A肽包括例如,来自猪捷申病毒1(PTV1)、口蹄疫病毒(FMDV)、马鼻肺炎病毒(ERAV)和明脉扁刺蛾病毒(TaV)的2A肽。

[0161] 序列同一性:两个或多个核酸序列、或两个或多个氨基酸序列之间的同一性或相似性以序列之间的同一性或相似性表示。序列同一性可以用百分比同一性来衡量;百分比越高,序列同一性越高。序列相似性可以用百分比相似性来衡量(其考虑到保守的氨基酸替换);百分比越高,序列越相似。

[0162] 用于比较序列的比对方法是已知的。在以下文献中描述了各种程序和比对算法:Smith&Waterman,Adv. Appl. Math. 2:482,1981;Needleman&Wunsch,J. Mol. Biol. 48:443,1970;Pearson&Lipman,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444,1988;Higgins&Sharp, Gene, 73:237-44,1988;Higgins&Sharp,CABIOS 5:151-3,1989;Corpet et al.,Nuc. Acids Res. 16:10881-90,1988;Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8,155-65,1992;以及Pearson et al.,Meth. Mol. Bio. 24:307-31,1994。Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10,1990详细介绍了序列比对方法和同源性计算。

[0163] NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST)(Altschul et al.,J. Mol. Biol. 215:403-10,1990)可从包括美国国家生物信息中心(NCBI)和互联网的多种渠道获得,与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。可以在NCBI网站上找到其它信息。

[0164] 血清型:以一系列特征性抗原来区分的一组密切相关的微生物(例如病毒)。

[0165] 受试者:活的多细胞脊椎动物,包括人类和非人类哺乳动物,例如兽类受试者(例如,小鼠、大鼠、兔子、猫、狗、猪和非人类灵长类动物)。

[0166] 合成的:在实验室中通过人工手段生产的,例如合成的核酸或蛋白质可以在实验室中化学合成。

[0167] 靶向配体:在本公开的上下文中,“靶向配体”是将重组腺病毒引导至表达针对该靶向配体特异性的受体或结合蛋白的特定细胞类型的蛋白质。在一些实施方案中,靶向配体是对在肿瘤中过度表达的细胞表面蛋白(例如EGFR)具有特异性的抗体。

[0168] 治疗剂:当适当施用给受试者时,能够引起所需治疗或预防作用的化学化合物、小分子、重组病毒或其它组合物,例如反义化合物、抗体(例如单克隆抗体(mAb)),例如拮抗性

mAb)、肽或核酸分子。例如,用于癌症的治疗剂包括预防或抑制癌症的发展或转移的试剂。

[0169] 治疗有效量:足以在用该试剂治疗的受试者或细胞中达到所需效果的特定药物或治疗试剂(例如重组病毒)的量。试剂的有效量可以取决于几个因素,包括但不限于被治疗的受试者或细胞,以及治疗组合物的施用方式。

[0170] 载体:允许插入外源核酸而不破坏载体在宿主细胞中复制和/或整合的能力的核酸分子。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可以包括一个或多个选择标记基因和其它遗传要素。表达载体是包含必需的调控序列以允许插入的一个或多个基因转录和翻译的载体。

[0171] 除非另有说明,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。除非上下文另外明确指出,否则单数术语“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数对象。“包含A或B”是指包括A、或B、或A和B。进一步应理解,对于核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子重量或分子量值均为近似值,并提供用于说明。尽管与本文所描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本公开的实践或测试中,但是在下面对合适的方法和材料进行了描述。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入本文。在发生冲突的情况下,以本说明书(包括术语解释)为准。另外,材料、方法和实施例仅是说明性的,并不意图进行限制。

[0172] III.几个实施方案的概述

[0173] 描述了在E3区域中具有修饰(例如缺失、替换和/或插入)的肿瘤选择性重组腺病毒。特别地,本公开描述了以下发现:至少三个E3基因(例如,E3A基因或E3B基因)的修饰(例如,缺失),使得E3蛋白表达被废除,或者七个E3基因中的六个(12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k)的修饰(例如,缺失),导致相较于具有WT E3区域的腺病毒,病毒复制得以增强(例如增加至少20%、至少50%、至少75%、至少90%、至少95%、至少100%、至少200%或至少500%)。重组腺病毒可进一步包括其它修饰,以允许在肿瘤细胞中选择性复制并使病毒脱靶于肝脏。描述了重组腺病毒在癌症治疗中的用途。还描述了溶瘤病毒的报告病毒形式,其可以用作诊断试剂,以便确定患者的肿瘤细胞是否可能对溶瘤病毒有反应。

[0174] 参考腺病毒5(Ad5)基因组序列对本文公开的具体修饰进行描述。然而,可以在任何人腺病毒血清型中进行相同的修饰和缺失。PCT公开号W0 2016/049201中详细描述了用于肿瘤选择性、肝脏脱靶、可诱导的重新靶向、经由嵌合纤维蛋白的重新靶向的腺病毒修饰,以及其它修饰,通过引用将该文献整体并入本文。

[0175] 本文提供了重组腺病毒基因组,其包括:E1A区域,其编码修饰的E1a蛋白;E3区域,其编码腺病毒死亡蛋白(ADP)并在选自于12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k的至少三个E3基因的编码序列中包含修饰(例如突变,例如氨基酸替换,或者基因或其部分缺失),其中,该修饰(例如缺失)阻止了所编码的蛋白的表达;以及E4区域,其具有E4orf6/7编码序列的修饰(例如,缺失)。

[0176] 在一些实施方案中,修饰的E1A蛋白包括LXCXE基序的缺失;残基2-11的缺失;C124G替换;Y47H替换;Y47H替换和C124G替换;或Y47H替换;C124G替换和残基2-11的缺失(例如,其中编号对应于SEQ ID NO:23)。

[0177] 在重组腺病毒基因组的一些实施方案中,至少三个E3基因包括12.5k、6.7k和19k(E3A基因)。在一些实例中,12.5k、6.7k和19k基因缺失。在其它实例中,12.5k、6.7k和19k基

因包含突变的起始密码子,引入提前终止密码子的突变,或两者。在特定的实例中,12.5k基因、6.7k基因和/或19k基因编码M1S氨基酸替换。

[0178] 在重组腺病毒基因组的其它实施方案中,至少三个E3基因包括RID α 、RID β 和14.7k (E3B基因)。在一些实例中,RID α 、RID β 和14.7k基因缺失。在其它实例中,RID α 、RID β 和14.7k基因包含突变的起始密码子,引入提前终止密码子的突变,或两者。在特定的实例中,RID α 基因编码M1K替换;RID β 基因编码M1K、C30G和M60终止替换;和/或14.7k基因编码M1K、M9终止、M31终止和M39终止替换。

[0179] 在其它实施方案中,所述至少三个E3基因包含12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k (除ADP以外的所有E3基因)。在一些实例中,12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k基因缺失。在其它实例中,12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k基因包含突变的起始密码子,引入提前终止密码子的突变,或两者。在特定的实例中,RID α 基因编码M1K替换;RID β 基因编码M1K、C30G和M60终止替换;和/或14.7k基因编码M1K、M9终止、M31终止和M39终止替换。

[0180] 在一些实施方案中,重组腺病毒基因组进一步包含E4orf3的缺失。

[0181] 在一些实施方案中,基因组还编码与FK506结合蛋白 (FKBP) 融合的靶向配体,和与野生型FKBP-雷帕霉素结合 (FRB) 蛋白或能够结合rapalog的突变型FRB蛋白融合的腺病毒纤维蛋白。在一些实例中,靶向配体是单结构域抗体,例如对EGFR具有特异性的单结构域抗体。

[0182] 在一些实施方案中,基因组还包括至少一种修饰以使腺病毒脱靶于肝脏。在一些实例中,修饰是六邻体蛋白中的突变,例如E451Q突变(例如,其中编号对应于SEQ ID NO: 34)。在一些实例中,修饰是肝脏特异性微小RNA的一个或多个结合位点。在特定的实例中,肝脏特异性微小RNA的一个或多个结合位点位于E1A的3'-UTR中。肝特异性微小RNA可以是例如miR-122、miR-30或miR-192。

[0183] 在一些实施方案中,基因组编码嵌合纤维蛋白。在一些实例中,嵌合纤维蛋白包含来自第一腺病毒血清型的纤维杆和来自第二腺病毒血清型的纤维结。在具体实例中,第一腺病毒血清型是Ad5,第二腺病毒血清型是Ad3、Ad9、Ad11、Ad12、Ad34或Ad37。在一个非限制性实例中,第一腺病毒血清型是Ad5,第二腺病毒血清型是Ad34。在一个实例中,Ad34纤维结包含防止或抑制与CD46结合的修饰,例如F242S(野生型Ad34纤维序列在本文中示为SEQ ID NO:60)。

[0184] 在一些实施方案中,基因组编码被修饰为包含RGD肽的纤维蛋白。

[0185] 在一些实施方案中,基因组进一步包含异源ORF。在一些实例中,异源ORF与自切割肽编码序列和ADP编码序列可操作地连接并在相同的阅读框中。在一些实例中,自切割肽是2A肽。在特定的实例中,2A肽包括猪捷申病毒1 (PTV1) 2A (P2A) 肽、口蹄疫病毒 (FMDV) 2A (F2A) 肽、马甲鼻炎病毒 (ERAV) 2A (E2A) 肽或明脉扁刺蛾病毒 (TaV) 2A (T2A) 肽。

[0186] 在一些实例中,异源ORF是报告基因。在一些实例中,报告基因编码荧光蛋白,例如绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白或红色(或远红色)荧光蛋白。在特定的实例中,荧光蛋白是YPet、mCherry或Katsushka2S。在其它实例中,报告基因编码可在血清中检测到的可溶性因子,作为病毒复制的生物标记。在特定的非限制性实例中,可溶性因子是PSA。在其它实例中,报告基因编码成像探针,例如荧光素酶、金属蛋白、碘化钠同向转运蛋白或胸苷激酶,例如单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-tk)。

[0187] 在其它实例中,异源ORF是治疗性基因,其编码例如RNAi序列、蛋白质、抗体或其结合片段、趋化因子、细胞因子、免疫调节剂或酶。在一些实例中,治疗基因编码免疫调节蛋白。

[0188] 在特定的非限制性实例中,免疫调节蛋白是细胞因子(例如但不限于,IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-33、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-15、IL-1RA、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α 、TGF β 、淋巴毒素A(LTA)、GM-CSF、HMGB1和FLT3配体)。

[0189] 在其它具体实例中,免疫调节蛋白是趋化因子(例如但不限于IL-8、CCL5、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL12、CCL19、CCL21、CXCR2、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CXCR3、CXCR4、CXCR5和CRTH2)。

[0190] 在其它特定实例中,免疫调节蛋白是T细胞刺激性配体(例如但不限于细胞表面抗CD3、双特异性T细胞接合剂(BiTe)、T细胞刺激性MHC/HLA分子(同种异体的),或肿瘤抗原)或共刺激分子(例如B7.1、B7.2、OX40L、CD40L、CD70、LIGHT、ICOS或4-1BBL)。

[0191] 在其它实例中,治疗性基因编码抗体(例如mAb,例如拮抗mAb)、抗体的抗原结合片段或可溶性拮抗剂。这种分子的具体非限制性实例包括抗VEGF、抗TGF- β 、可溶性TGF- β 受体、抗PD-1、PD-L1和LAG3。

[0192] 在一些实施方案中,基因组的核苷酸序列与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:59具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%的同一性。在一些实例中,基因组的核苷酸序列包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:59,或由以上序列组成。

[0193] 本文还提供了包含本文公开的重组腺病毒基因组的分离的细胞(例如哺乳动物细胞,例如哺乳动物肿瘤细胞)。

[0194] 还提供了包含本文公开的重组腺病毒基因组和药学上可接受的载体(例如水或盐水)的组合物。

[0195] 还提供了包含本文公开的重组腺病毒基因组的分离的腺病毒。还提供了包含分离的腺病毒和药学上可接受的载体(例如水或盐水)的组合物。

[0196] 还提供了一种方法,通过使肿瘤细胞与本文所述的重组腺病毒基因组、腺病毒或组合物接触来抑制肿瘤细胞的活力。在一些实施方案中,该方法是体外方法。在其它实施方案中,该方法是体内方法,并且接触肿瘤细胞包括向患有肿瘤的受试者施用治疗有效量的重组腺病毒基因组、腺病毒或组合物。

[0197] 还提供了抑制受试者的肿瘤进展或减小肿瘤体积的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的重组腺病毒基因组、腺病毒或组合物。

[0198] 还提供了一种治疗受试者的癌症的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的重组腺病毒基因组、重组腺病毒或组合物。

[0199] 本文还提供了重组腺病毒基因组,其中,该基因组的核苷酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:58具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%的同一性。在一些实施方案中,基因组的核苷酸序列包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:58,或由以上序列组成。还提供了包含重组腺病毒基因组的分离的腺病毒。

[0200] IV. 野生型和突变的病毒序列

[0201] 公开了重组腺病毒基因组,其包含与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58或59中的任何一个具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性的核苷酸序列。在特定实例中,重组核酸包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58或59中的任何一个的核苷酸序列或其组成。

[0202] 还提供了包含重组腺病毒基因组的载体(例如质粒或病毒载体)。在一些实施方案中,提供了一种载体,其包含与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58或59中的任一个具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核酸分子。在一些实例中,提供了包含核酸分子的载体,所述核酸分子包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58或59的任何的核苷酸序列或其组成。

[0203] 以下提供由本文公开的重组腺病毒表达的示例性野生型和突变型腺病毒蛋白序列。

[0204] E1A和E4orf6/7突变体

[0205] 在下面的E1A序列中,LXCXE基序用下划线表示。该基序存在于Ad5 E1A的氨基酸122-126(SEQ ID NO:23)。Y47H和C124G替换以粗体显示。E1A和E4orf6/7的修饰(包括缺失)有助于本文公开的重组腺病毒的肿瘤选择性复制。

[0206] Ad5 E1A(野生型)

MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELVDLDVTAPEDPNEE
AVSQIFPDSVMLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPLVPEVIDLT
[0207] CHEAGFPPSDDDEEGEEFVLDYVEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRTCGMFV
YSPVSEPEPEPEPEPARPTRRPKMAPAILRRPTSPVSRECNSSTDSCDSGPSNTPPEIHPVVP
LCPIKPVAVRVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLCKRPRP (SEQ ID NO: 23)

[0208] Ad5 E1A Δ LXCXE

MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELVDLDVTAPEDPNEE
AVSQIFPDSVMLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPLVPEVIDAG
[0209] FPPSDDDEEGEEFVLDYVEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRTCGMFVYSPVS
EPEPEPEPEPEPARPTRRPKMAPAILRRPTSPVSRECNSSTDSCDSGPSNTPPEIHPVVP
PVAVRVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLCKRPRP (SEQ ID NO: 24)

[0210] Ad5 E1A C124G

[0211] MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELVDLDVTAPEDPNEE
 AVSQIFPDSVMLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPLVPEVIDLT
GHEAGFPPSDDEDEEGEEFVLDYVEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRTCGMFV
 YSPVSEPEPEPEPEPARPTRRPKMAPAILRRPTSPVSRECNSSTDSCDSGPSNTPPEIHPVVP
 LCPIKPVAVRVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLCKRPRP (SEQ ID NO: 25)

[0212] Ad5 E1A Δ 2-11

[0213] MEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELVDLDVTAPEDPNEEAVSQIFPDSV
 MLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPLVPEVIDLTCHEAGFPPSD
 DEDEEGEEFVLDYVEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRTCGMFVYSPVSEPEPE
 PEPEPEPARPTRRPKMAPAILRRPTSPVSRECNSSTDSCDSGPSNTPPEIHPVVP
 RVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLCKRPRP (SEQ ID NO: 26)

[0214] Ad5 E1A Y47H C124G

[0215] MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELHDLVDVTAPEDPNEE
 AVSQIFPDSVMLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPLVPEVIDLT
GHEAGFPPSDDEDEEGEEFVLDYVEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRTCGMFV
 YSPVSEPEPEPEPEPARPTRRPKMAPAILRRPTSPVSRECNSSTDSCDSGPSNTPPEIHPVVP
 LCPIKPVAVRVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLCKRPRP (SEQ ID NO: 27)

[0216] Ad5 E1A Δ 2-11Y47H C124G

[0217] MEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELHDLVDVTAPEDPNEEAVSQIFPDSV
 MLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPLVPEVIDLTCGHEAGFPPSD
 DEDEEGEEFVLDYVEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRTCGMFVYSPVSEPEPE
 PEPEPEPARPTRRPKMAPAILRRPTSPVSRECNSSTDSCDSGPSNTPPEIHPVVP
 RVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLCKRPRP (SEQ ID NO: 28)

[0218] A类Ad12_E1A SEQ ID NO:36

[0219] MRTEMTPVLVSYQEADDILEHLVDNFFNEVPSDDDLVPSLYELYDLDVESAGEDNN
 EQAVNEFFPESLILAAASEGLFLPEPPVLSVCEPIGGECMPQLHPEDMDLLCYEMGFPCSDSE
 DEQDENGMAHVSASAAAAAADREREEFQLDHPPELPGHNCKSCEHHRNSTGNTDLMCSLC
 YLRAYNMFYISPVSDNEPEPNSTLDGDERPSPKLGSAVPEGVIKVPVQRTGRRRCAVESI
 LDLIQEEEREQTVPVVDSVCRPRCN

[0220] B类Ad7_E1A SEQ ID NO:37

[0221] MRHLRFLPQEIISSETGIEILEFVNTLMGDDPEPPVQPFDPPTLHDLYDLEVDGPEDPN
 EGAVNGFFTDSMMLAADEGLDINPPPETLVTPGVVSVESGRGGKLPDLGAAEMDLRCYEE
 GFPPSDDEDGETEQSIHTAVNEG VKAASDVFKLDCPELPGHGCKSCEFHRNNTGMKELLCS
 LCYMRMHCHFIYSPVSDDESPDSTTSPPEIQAPAPANVCKPIPVKPKPGKRPVAVDKLEDL
 LEGGDGPLDLSTRKLPRQ

[0222] C类Ad2_E1A SEQ ID NO:38

[0223] MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSHFEPPTLHELVDLDVTAPEDPNEE
 AVSQIFPDSVMLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPLVPEVIDLT
 CHEAGFPPSDDEDEEGEEFVLDYVEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRTCGMFV
 YSPVSEPEPEPEPEPARPTRRPKLVAILRRPTSPVSRECNSSTDSCDSGPSNTPPEIHPVVP
 LCPIKPVAVRVGGRRQAVECIEDLLNESGQPLDLCKRPRP

[0224] C类Ad5_E1A SEQ ID NO:39

[0225] MRHICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPSPSHFEPPTLHELVDLDVTAPEDPNEE
AVSQIFPDSVMLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQPEQPEQRALGPVSMPLNVPEVIDLT
CHEAGFPPSDDDEDEEGEEFVLDYVEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRTCGMFV
YSPVSEPEPEPEPEPARPTRPKMAPAILRRPTSPVSRECNSSTSDSCDSGPSNTPPEIHPVVP
LCPIKPVAVRVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLSCKRPRP

[0226] D类Ad9_E1A SEQ ID NO:40

MRHLRLLPSTVPGELAVLMLEDFVDTVLEDELHPSPFELGPTLQDLYDLEVDAHDDDDP
NEEAVNLIFPESMILQADIANESTPLHTPTLSPIPELEEEDELDLRCYEEGFPPSDSEDERGEQ
[0227] TMALISDYACVIVEEQDVIEKSTEPVQGCRNCQYHRDKSGDVNASCALCYMKQTFSEFIYSP
VSEDELSPSEEDHPSPELSGETPLQVFRPTVVRPSGERRAAVDKIEDLLQDMGGDEPLDLSL
KRPRN

[0228] E类Ad4_E1A SEQ ID NO:41

MRHLRDLDPDEEIIASGSEILELVVNAMMGDDHPEPPTPFETPSLHDLYDLEVDVPEDD
PNEKAVNDLFSDAALLAAEEASSPSSSDSSSLHTPRHDRGEKEIPGLKWEKMDLRCYEECL
[0229] PPSDDDEDEQAIQNAASHGVQAVSESFALDCPPLPGHGCKSCEFHRINTGDKAVLCALCYMR
AYNHCVYSPVSDADDETPTESTLSPPEIGTSPSDNIVRPVVRATGRRAAVECLDDLLQGG
DEPLDLCTRKRPRH

[0230] F类Ad40_E1A SEQ ID NO:42

MRMLPDFFTGNWDDMFQGLLETEYVDFDFPEPSEASEEMSLHDLFDVEVDGFEEEDANQ
EAVDGMFPERLLSEAESAESGSGDSGVGEELLPVLDLTKCYEDGLPPSDPETDEATEAEE
[0231] EAAMPTYVNENENELVLDPENPGRGCACDFHRGTSGNPEAMCALCYMRLTGHCYIYSPI
SDAEGESESGSPEDTDFPHPLTATPPHGIVRTIPCRVSCRRAVEECIEDLLEEDPTDEPLNLS
LKRPKCS

[0232] G类Ad52_E1A SEQ ID NO:43

MRLVPEMYGVFCSETVRNSDELLNTDLLDVPNSPVTSPPSLHDLFDVEVDPPQDPNED
AVNSMFPECLFEAAEEGSHSSEESKRGEELDLKCYEECLPSSDSETEQTGGDGCTEPVVKV
[0233] EPVLDLDRPDQPGHGCACAFHRNASGNPETLALCYLRLTSDVYSDVSDAEGDGRSGSA
NSPCTLGAVVPVGHKPVAVRVSGRRCAVEKLEDLLQEEQTEPLDLSMKRPKLT

[0234] Ad5 E4orf6/7SEQ ID NO:29

MTTSGVPFGMTLRPTRSRLSRRTPYSRDRLPPFETETRATILEDHPLLPECNTLTMHNA
[0235] WTSPSPVQVQVGGQVAAQLDSDMNLSELPGEFINITDERLARQETVWNITPKNMSVTH
DMMLFKASRGERTVYSVCWEGGRLNTRVL

[0236] 本文考虑了具有编码经修饰的E4orf6/7蛋白的基因组的重组腺病毒,所述修饰的E4orf6/7蛋白删除或削弱了与E2F的结合,或者删除或削弱了核定位信号。在一些实例中,修饰的E4orf6/7蛋白在C末端包含约60、约50、约40、约30、约20或约10个氨基酸的缺失,以删除/削弱E2F结合位点。在其它实例中,E4orf6/7蛋白在蛋白质的C末端10个氨基酸中包含缺失、移码或插入,或从蛋白质的C末端三分之一中的33个氨基酸缺失,从而删除或削弱E2F结合。在一些实施方案中,突变包含削弱E2F相互作用的氨基酸81-91。

[0237] 在其它实例中,修饰的E4orf6/7蛋白包含58个氨基酸的N末端缺失,以消除核定位序列,这是E2F4的有效易位所必需的。在Ad2和Ad5 E4orf6/7的氨基酸13和38之间有八个精氨酸残基,相当于该区域的精氨酸含量大于25%。在其它腺病毒血清型中,E4orf6 N末端的精氨酸残基整体聚集得以保留。考虑了用精氨酸残基16、18、21、22、27和/或29替换丙氨酸(或其它适当的残基以消除通过该区域的核定位)的突变。

[0238] 在其它实例中,修饰的E4orf6/7蛋白包含一种或多种修饰,以消除或抑制E4orf6/

7诱导E2F双位点占据的能力。特定的非限制性实例包括F125突变为脯氨酸、丙氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或谷氨酸；或D121突变为P、A、K、R、G、F(其中氨基酸位置对应于SEQ ID NO: 29)。

[0239] 其它E4orf6/7突变包括:T133A、R101A、Q105P或任何阻止E2F单点占据的突变；M84N或P、G、K、L、H和/或E93A,或破坏 α 螺旋并阻止E2F结合的K、P、G、R、L、M(其中氨基酸位置对应于SEQ ID NO:29)。其它预期的突变包括T133Q或A、K、G、P、L、H;G141L、P、K H、F、A;或V149N、K、P、H、G、E、D(其中氨基酸位置对应于SEQ ID NO:29)。

[0240] 还考虑了具有E4orf6/7部分或完全缺失的重组腺病毒和重组腺病毒基因组。

[0241] 纤维序列

[0242] 在下面的重组Ad5纤维序列中,FRB序列带有下划线。FRB*中存在的突变以粗体显示。

[0243] Ad5纤维

MKRARPSEDTFNPVYPYDTETGPPTVPFLTPPFVSPNGFQESPPGVLSLRLSEPLVTSNG
MLALKMGNGLSLDEAGNLTSQNVTTVSPPLKKTNSINLEISAPLTVTSEALTVAAAAPLM
VAGNTLTMQSQAPLTVHDSKLSIATQGPLTVSEGKLALQTSGLPTTTDSSLTITASPPLTTA
TGLGIDLKEPIYTQNGKLGLKYGAPLHVTDLNTLTVATGPGVTINNTSLQTKVTGALGF
DSQGNMQLNVAGGLRIDSQNRRLILDVSYPFDAQNQLNLRGQGPLFINSAHNLDINYNKG
[0244] LYLFTASNNSKKLEVNLSAKGLMFDATAIAINAGDGLFEGSPNAPNTNPLKTKIGHGLEF
DSNKAMVPKLGTLGSLFDSTGAITVGNKNDKLTWTPAPSPNCRLNAEKDAKLTVLTK
CGSQILATVSVLAVKGLAPISGTVQSAHLIRFDENGVLLNNSFLDPEYWNFRNGDLTEGT
AYTNAVGFMPNLSAYPKSHGKTAKSNIVSQVYLNQDGTKPVTLTITLNGTQETGDTTPSAY
SMSFSWDWSGHNYINEIFATSSYTFSYIAQE (SEQ ID NO: 30)

[0245] Ad5 FRB-纤维

MKRARPSEDTFNPVYPYDTETGPPTVPFLTPPFVSPNGFQESPPGVLSLRLSEPLVTSNG
MLALKMGNGLSLDEAGNLTSQNVTTVSPPLKKTNSINLEISAPLTVTSEALTVAAAAPLM
VAGNTLTMQSQAPLTVHDSKLSIATQGPLTVSEGKLALQTSGLPTTTDSSLTITASPPLTTA
TGLGIDLKEPIYTQNGKLGLKYGAPLHVTDLNTLTVATGPGVTINNTSLQTKVTGALGF
[0246] DSQGNMQLNVAGGLRIDSQNRRLILDVSYPFDAQNQLNLRGQGPLFINSAHNLDINYNKG
LYLFTASNNSKKLEVNLSAKGLMFDATAIAINAGDGLFEGSPNAPNTNPLKTKIGHGLEF
DSNKAMVPKLGTLGSLFDSTGAITVGNKNDKLTWTPAPSPNCRLNAEKDAKLTVLTK
CGSQILATVSVLAVKGLAPISGTVQSAHLIRFDENGVLLNNSFLDPEYWNFRNGDLTEGT
AYTNAVGFMPNLSAYPKSHGKTAKSNIVSQVYLNQDGTKPVTLTITLNGTQETGDTTEEMW

[0247] HEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCR
KYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKQPSAYSMSFSWDWSGHNYINEIFATSSYTFSYI
AQE (SEQ ID NO: 31)

[0248] Ad5 FRB*-纤维

[0249] MKRRPSEDTFNPVYPYDTETGPPTVPFLTPPFVSPNGFQESPPGVLSLRLSEPLVTSNG
MLALKMGNGLSLDEAGNLTSQNVTTVSPPLKKTAKSNINLEISAPLTVTSEALTVAAAAPLM
VAGNTLTMQSQAPLTVHDSKLSIATQGPLTVSEGKALQTSGLPTTTDSSTLTITASPLTTA
TGLGIDLKEPIYTQNGKLGKYGAPLHVTDLNTLTVATGPGVTINNTSLQTKVTGALGF
DSQGNMQLNVAGGLRIDSQNRRLILDVSYPFDAQNQLNRLGQGPLFINSAHNLDINYKNG
LYLFTASNNSKKLEVNLSTAKGLMFDATAIAINAGDGLFEGSPNAPNTNPLKTKIGHGLEF
DSNKAMVPKLGTLGSLFDSTGAITVGNKNNDKLTLWTPAPSPNCRNLNAEKDAKLTLLVTK
CGSQILATVSVLAVKGLSAPISGTVQSAHLIIRFDENGVLNNSFLDPEYWNFRNGDLTEGT
AYTNAVGFMPNLSAYPKSHGKTAKSNIVSQVYLNQDKTKPVTLTITLNGTQETGDTTEEMW
HEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQEWCR
KYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKQPSAYSMSFSWDWSGHNYINEIFATSSYTFSYI
AQE (SEQ ID NO: 32)

[0250] Ad34纤维

[0251] MTKRVRLSDSFNPVYPYEDESTSQHPFINPGFISPNQFTQSPDGVLTLKCLTPLTTTGG
LQLKVGGLTVDDTDGTLQENIRATAPITKNNHVELSIGNGLETQNNKLCALGNGLKFN
NGDICIKDSINTLWTGINPPPNCQIVENTNTNDGKLTLLVVKNGGLVNGYVSLVGVSDTVN
QMFTQKTANIQLRLYFDSSGNLLTDESCLKIPLKKNKSSSTATSETVASSKAFMPSTTAYPENT
TTRDSENYIHGICYMYSYDRSLFPLNISIMLNSRMISSNVAYAIQFEWNLNASESPESNIAT

[0252] LTTSPFFFSYITEDDN (SEQ ID NO:60;在242位点的F以粗下划线示出)

[0253] 靶标配体序列

[0254] EGFRVHH-GS-FKBP

[0255] MAVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREVSGISWRG
DSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLRPEDTAIYYCAAAGSTWYGTLYEYDYW
GQGTQVTVSSGSGSGSTGVQVETISPGDGRFTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSRDRN
KPKFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL

[0256] KL (SEQ ID NO:33;FKBP12序列为下划线)

[0257] 六邻体序列

[0258] Ad5六邻体

[0259] MATPSMMPQWSYMHISGQDASEYLSPLVQFARATETYFSLNNKFRNPTVAPTHDVT
TDRSQRLLTRFIPVDREDTAYSYKARFTLAVGDNRVLDMASTYFDIRGVLDRGPTFKPYSG
TAYNALAPKGAPNPCEWDEAATALEINLEEDDDNEDEVDEQAEQKTHVFGQAPYSGIN
ITKEGIQIGVEGQTPKYADKTFQPEPQIGESQWYETEINHAAGRVLKKTTPMKPCYGSYAK
PTNENGGQGILVKQNGKLESQVEMQFFSTTEATAGNGDNLTPKVVLVYSEDVDIETPDTHI
SYMPTIKEGNSRELMGQQSMPNRPNYIAFRDNFIGLMYYNSTGNMGVLAGQASQLNAV
DLQDRNTELSYQLLLDSIGDRTRYFSMWNQAVDSYDPDVRIIENHGTEDELPNYCFPLGGV
INTETLTKVKPKTGQENGWEKDATEFSDKNEIRVGNNFAMEINLNANLWRNFLYSNIALYL
PDKLKYSPLSNVKISDNPNYDYMNKRVVAPGLVDCYINLGARWLDYMDNVNPFNHHRN
AGLRYSMLLGNRGYVPFHIQVPQKFFAIKNLLLLPGSYTYEWNFRKDVNMVLQSSLGND
LRVDGASIKFDSICLYATFFPMAHNTASTLEAMLRNDTNDQSFNDYLSAANMLYPIPANAT
NVPISIPSRNWAAPFRGWAFTRLKTKETPSLGSYDPYTYSGSIPYLDGTFYLNHTFKKVAI
TFDSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDGEGYNVAQCNMTKDWFLVQMLANYNIGYQGFYI
PESYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDTKYKDYQQVGILHQHNSGFVGYLAPTMREGQAY
PANFPYPLIGKTAVDSITQKKFLCDRTLWRIPSSNFMSMGALTDLGQNLLYANSAHALDM
TFEVDPMDEPTLLYVLFVFDVVRVHRPHRGVIETVYLRTPFSAGNATT (SEQ ID NO:
34)

[0261] Ad5六邻体E451Q

MATPSMMPQWSYMHISGQDASEYLSPLVQFARATETYFSLNNKFRNPTVAPTHDVT
 TDRSURLTLRFIPVDREDTAYSYKARFTLAVGDNRVLDMASTYFDIRGVLDRGPTFKPYSG
 TAYNALAPKGAPNPCEWDEAATALEINLEEEEDDDNEDEVDEQAEQQKTHVFGQAPYSGIN
 ITKEGIQIGVEGQTPKYADKTFQPEPQIGESQWYETEINHAAGRVLKKTTPMKPCYGSYAK
 PTNENGGQGILVKQQNGKLESQVEMQFFSTTEATAGNGDNLTPKVVLYSEDVDIETPDTHI
 SYMPTIKEGNSRELMGQQSMPNRPNYIAFRDNFIGLMYYNSTGNMGVLAGQASQLNAV
 DLQDRNTELSYQLLLDSIGDRTRYFSMWNQAVDSYDPDVRIIENHGTEDELPNYCFPLGGV
 [0262] INTETLTKVKPKTGQENGWEKDATEFSDKNQIRVGNNFAMEINLNANLWRNFLYSNIALY
 LPDKLKYSNSVKISDNPNNTYDYMNKRVVAPGLVDCYINLGARWSLDYMDNVNPFNHHR
 NAGLRYRSMLLGNTRYVPFHIQVPQKFFAIKNLLLLPGSYTYEWNFRKDVNMVQLQSSLGN
 DLRVDGASIKFDSICLYATFFPMAHNTASTLEAMLRNDTNDQSFNDYLSAANMLYPIPANA
 TNVPISIPSRNWAAFRGWAFRLKTKETPSLGSYDPYTYSGSIPYLDGTFYLNHTFKKVA
 ITFSSVSWPGNDRLLTPNEFEIKRSVDGEGYNVAQCNMTKDWFLVQMLANYNIGYQGFY
 IPESYKDRMYSFFRNFPMSRQVVDDTKYKDYQQVGILHQHNSGFVGYLAPTREGQA
 YPANFPYPLIGKTAVDSITQKKFLCDRTLWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNLLYANSAHALD
 MTFEVDPMDEPTLLYVLFVFDVVRVHRPHRGVIETVYL RTPFSAGNATT (SEQ ID NO:
 35;E451Q替换以粗下划线示出)

[0263] V. 自切割肽序列

[0264] 自裂解肽是诱导核糖体跳过C末端的肽键合成,从而导致肽序列和下游多肽分离的肽。自切割肽的使用允许表达来自单个ORF的自切割肽侧翼的多种蛋白质。病毒编码的2A肽是一种自切割肽。

[0265] 与其它自切割肽一样,2A肽通过使核糖体跳过2A要素C末端的肽键合成而起作用,从而导致2A序列末端与下游肽之间分离(Kim et al., PLoS One 6 (4):e18556, 2011)。“切割”发生在2A肽C末端的甘氨酸和脯氨酸残基之间。示例性的2A肽包括但不限于由TaV、ERAV、PTV1和FMDV或其修饰形式编码的2A肽。

[0266] 在本文的特定实例中,2A肽包括PTV1A (P2A)、FMDV 2A (F2A)、ERAV 2A (E2A)或TaV 2A (T2A),其序列如下所示并在本文中以SEQ ID NO:15-18列出。

[0267] P2A:ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:15)

[0268] F2A:VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:16)

[0269] E2A:QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:17)

[0270] T2A:EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO:18)

[0271] 在一些实例中,对2A肽进行修饰,以在N末端包含Gly-Ser-Gly,以提高切割效率。修饰的P2A、F2A、E2A和T2A的序列如下所示,并在本文中表示为SEQ ID NO:19-22。

[0272] 修饰的P2A:GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:19)

[0273] 修饰的F2A:GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:20)

[0274] 修饰的E2A:GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:21)

[0275] 修饰的T2A:GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO:22)

[0276] 在一些实施方案中,2A多肽是本文公开的2A多肽的变体。变体可以包括与本文公开的野生型或修饰的2A多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多的序列同一性的多肽序列。变体可以包括,例如,从SEQ ID NO:15、16、17、18、19、20、21或22中的任何一个的2A多肽中删除至少一个N末端氨基酸,例如删除1、2、3、4或5个氨基酸。变体可以包括从SEQ ID NO:15、16、17、18、19、20、21或22中任一

个的2A多肽中删除至少一个C末端氨基酸,例如删除1、2、3、4或5个氨基酸。变体还可以包括例如至少1、2、3、4或5个氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0277] IV. 药物组合物

[0278] 本文提供了包含本文公开的重组腺病毒或重组腺病毒基因组的组合物。所述组合物任选地适合于体外或体内配制和施用。任选地,组合物包含一种或多种所提供的试剂和药学上可接受的载体。合适的载体及其制剂描述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy,22nd Edition,Loyd V.Allen et al.,editors,Pharmaceutical Press (2012)。药学上可接受的载体包括不是生物学上或其它方面不期望的材料,即,将所述材料施用于受试者而不会引起不期望的生物学效应或以有害的方式与包含其的药物组合物的其它组分相互作用。如果施用于受试者,则任选地选择载体以使活性成分的降解最小化,并使受试者的不良副作用最小化。

[0279] 按照已知方法施用重组病毒或重组腺病毒基因组,例如静脉内施用,例如以推注或在一段时间内连续输注,通过肌内、腹膜内、脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部、肿瘤内或吸入途径。该施用可以是局部的或全身的。组合物可以通过几种施用途径中的任一种施用,包括局部、口服、胃肠外、静脉内、关节内、腹膜内、肌肉内、皮下、腔内、经皮、肝内、颅内、肿瘤内、骨内、雾化/吸入,或通过经支气管镜安装。因此,取决于是否需要局部或全身治疗以及取决于要治疗的区域,以多种方式施用组合物。

[0280] 在一些实施方案中,用于施用的组合物将包含溶解在药学上可接受的载体(例如水性载体)中的本文所述的重组腺病毒(或重组基因组)。可以使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的,并且通常无不良物质。这些组合物可以被灭菌。所述组合物可包含近似生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,例如pH调节剂和缓冲剂,毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中活性剂的浓度可以在很大范围内变化,并且将根据所选择的特定施用方式和受试者的需要,根据体液量、粘度、体重等进行选择。

[0281] 特别是重组病毒或重组腺病毒基因组的药物制剂可以通过将具有期望纯度的重组腺病毒(或重组腺病毒基因组)与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备。这样的制剂可以是冻干制剂或水溶液。

[0282] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者无毒。可接受的载体、赋形剂或稳定剂可以是乙酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂(例如抗坏血酸)防腐剂、低分子量多肽;蛋白质,例如血清白蛋白或明胶;或亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;以及氨基酸,单糖,二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂;以及离子和非离子表面活性剂(例如聚山梨酯);成盐的抗衡离子,例如钠;金属配合物(例如锌蛋白配合物);和/或非离子表面活性剂。重组腺病毒(或编码重组腺病毒的一种或多种核酸)可以任何适当浓度的感染单位配制。

[0283] 适用于口服给药的制剂可以由以下组成:(a) 液体溶液,例如有效量的悬浮在稀释剂(例如水、盐水或PEG 400)中的重组腺病毒;(b) 胶囊、小袋或片剂,各自包含预定量的活性成分,作为液体、固体、颗粒或明胶;(c) 在适当液体中的悬浮剂;(d) 合适的乳液。片剂形式可以包括乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、磷酸钙、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、明胶、胶体二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸中的一种或多种,以及其它赋形剂、着色剂、填充

剂、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、调味剂、染料、崩解剂和药学上相容的载体。锭剂形式可包含在调味剂(例如蔗糖)中的活性成分,以及在惰性基质中包含活性成分的药片(pastilles),例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶乳液、凝胶等还包含除了活性成分之外的本领域已知的载体。

[0284] 可以将重组腺病毒或重组腺病毒基因组单独或与其它合适的成分组合制成气雾剂(即,它们可以被“雾化”)以通过吸入施用。可以将气雾剂放入加压的可接受的推进剂中,例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。

[0285] 适用于肠胃外施用的制剂,例如通过关节内(在关节内)、静脉内、肌肉内、肿瘤内、真皮内、腹膜内和皮下途径给药的制剂,包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使制剂与预期受体的血液等渗的溶质,以及水性和非水性无菌混悬液,其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。在所提供的方法中,组合物可以例如通过静脉内输注、口服、局部、腹膜内、膀胱内、肿瘤内或鞘内施用。肠胃外施用、肿瘤内施用和静脉内施用是优选的施用方法。化合物的制剂可以存在于单位剂量或多剂量密封的容器中,例如安瓿和小瓶。

[0286] 注射溶液和悬浮液可以由上述种类的无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备。如上所述,也可以静脉内或肠胃外施用经腺病毒转导或感染或经核酸转染以用于离体治疗的细胞。

[0287] 药物制剂可以是单位剂型。以这种形式,将制剂细分为包含适当量的活性成分的单位剂量。因此,根据施用方法,可以多种单位剂型施用药物组合物。例如,适合口服的单位剂型包括但不限于粉剂、片剂、丸剂、胶囊剂和锭剂。

[0288] 在一些实施方案中,组合物包括至少两种不同的重组腺病毒或重组腺病毒基因组,例如结合不同细胞受体的重组腺病毒。例如,组合物中的至少一种重组腺病毒可以表达嵌合纤维蛋白。或者,重组腺病毒可通过编码靶向配体-FKBP融合蛋白而靶向不同的细胞受体,其中,靶向配体在组合物中的病毒之间不同。在一些实例中,该组合物包含两种、三种、四种、五种或六种不同的重组腺病毒或重组腺病毒基因组。

[0289] VII. 治疗方法

[0290] 可以施用本文公开的重组腺病毒和重组腺病毒基因组组合物用于治疗或预防性治疗。特别地,提供了抑制受试者中的肿瘤细胞生存力、抑制受试者中的肿瘤进展、减小受试者中的肿瘤体积、减少受试者中的转移数目和/或治疗受试者中的癌症的方法。因此,在一些实例中,所述方法将降低肿瘤细胞活力、降低肿瘤进展、减小肿瘤体积、减小肿瘤大小、减少转移的数目或其组合,例如相较于未治疗(用本文公开的重组腺病毒和重组腺病毒基因组组合物治疗之前),降低至少20%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%。

[0291] 所述方法包括向受试者施用治疗有效量的重组腺病毒或重组腺病毒基因组(或其组合物)。如全文所述,腺病毒或药物组合物以多种方式施用,包括但不限于静脉内、血管内、鞘内、肌内、皮下、肿瘤内、腹膜内或口服。任选地,该方法进一步包括向受试者施用一种或多种其它治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是化学治疗剂。在其它实施方案中,治疗剂是免疫调节剂。在其它实施方案中,治疗剂是CDK抑制剂,例如CDK4抑制剂。

[0292] 在一些实施方案中,癌症或肿瘤是肺、前列腺、结肠直肠、乳腺、甲状腺、肾或肝癌或肿瘤,或者是一种类型的白血病。在某些情况下,癌症是转移性的。在一些实例中,所述肿

瘤是乳腺、垂体、甲状腺或前列腺的肿瘤；脑、肝、脑膜、骨骼、卵巢、子宫或子宫颈的肿瘤；单核细胞或骨髓性白血病；腺癌、腺瘤、星形细胞瘤、膀胱肿瘤、脑肿瘤、伯基特淋巴瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、软骨肉瘤、绒毛膜癌、纤维瘤、纤维肉瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、肝癌、组织细胞瘤、成平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、淋巴瘤、脂肪肉瘤细胞、乳腺肿瘤、髓母细胞瘤、骨髓瘤、浆细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、骨肉瘤、胰腺肿瘤，垂体肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、睾丸肿瘤、胸腺瘤或肾母细胞瘤。肿瘤包括原发性和转移性实体瘤，包括乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、口咽癌、下咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌和胆管癌、小肠癌、泌尿道癌（包括肾癌、膀胱癌和尿路上皮癌）、女性生殖道（包括子宫颈、子宫和卵巢以及绒毛膜癌和妊娠滋养细胞疾病）、男性生殖道（包括前列腺、精囊、睾丸和生殖细胞肿瘤）、内分泌腺（包括甲状腺、肾上腺和肾上腺垂体）和皮肤癌，以及血管瘤、黑素瘤、肉瘤（包括那些由骨骼和软组织以及卡波西肉瘤引起的肉瘤）以及脑、神经、眼睛和脑膜的肿瘤（包括星形细胞瘤、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、神经瘤、神经母细胞瘤、神经鞘瘤和脑膜瘤）。在一些方面，可以治疗由造血系统恶性肿瘤引起的实体瘤，例如白血病（即叶绿素、浆细胞瘤以及蕈样肉芽肿和皮肤T细胞淋巴瘤/白血病的斑块和肿瘤），以及治疗淋巴瘤（包括霍奇金和非霍奇金淋巴瘤）。另外，治疗可用于预防来自本文描述的肿瘤的转移。

[0293] 在治疗应用中，以治疗有效量或剂量将重组腺病毒或重组腺病毒基因组或其组合物施用于受试者。对于该用途有效的量将取决于疾病的严重程度和患者健康的总体状况。可以根据患者所要求和耐受的剂量和频率来一次或多次施用组合物。“患者”或“受试者”包括人类和其它动物，特别是哺乳动物。因此，该方法适用于人类治疗和兽医应用。

[0294] 具有修饰序列的腺病毒的有效量是根据个体确定的，并且至少部分地基于所使用的特定重组腺病毒；个体的大小、年龄、性别；以及增殖细胞的大小和其它特征。例如，对于人类的治疗，使用至少 10^3 个重组病毒的噬菌斑形成单位（PFU），例如根据存在的增殖细胞或肿瘤的类型、大小和数量，使用至少 10^4 、至少 10^5 、至少 10^6 、至少 10^7 、至少 10^8 、至少 10^9 、至少 10^{10} 、至少 10^{11} 或至少 10^{12} PFU，例如约 10^3 至 10^{12} PFU的重组病毒。有效量可为约1.0pfu/kg体重至约 10^{15} pfu/kg体重（例如，约 10^2 pfu/kg体重至约 10^{13} pfu/kg体重）。

[0295] 重组腺病毒或重组腺病毒基因组以单剂量或多剂量（例如，两剂量、三剂量、四剂量、六剂量或更多剂量）施用。可以同时或连续（例如，在几天或几周内）多次施用。

[0296] 在一些实施方案中，提供的方法包括向受试者施用一种或多种另外的治疗剂，例如抗癌剂或其它治疗（例如肿瘤的手术切除）。示例性的抗癌剂包括但不限于化学治疗剂，诸如例如有丝分裂抑制剂、烷基化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、抗存活剂、生物反应调节剂、抗激素（例如抗雄激素）、抗血管生成剂和CDK抑制剂。其它抗癌治疗包括放射治疗和特异性靶向癌细胞的抗体（例如治疗性单克隆抗体）。

[0297] 烷基化剂的非限制性实例包括氮芥类（例如氮芥、环磷酰胺、美法仑、尿嘧啶氮芥或苯丁酸氮芥）、烷基磺酸盐（例如白消安）、亚硝基脲（例如卡莫司汀，洛莫司汀，西莫司汀，链脲菌素，或达卡巴嗪）。

[0298] 抗代谢物的非限制性实例包括叶酸类似物（例如甲氨蝶呤）、嘧啶类似物（例如5-

FU或阿糖胞苷)和嘌呤类似物(例如巯基嘌呤或硫代鸟嘌呤)。

[0299] 天然产物的非限制性实例包括长春花碱类(例如长春碱、长春新碱或长春地辛)、表鬼臼毒素(例如依托泊苷或替尼泊苷)、抗生素(例如更生霉素、柔红霉素、阿霉素、博来霉素、普卡霉素或丝裂霉素C)和酶(例如L-天冬酰胺酶)。

[0300] 其它试剂的非限制性实例包括铂配位络合物(例如顺式二胺-二氯铂II,也称为顺铂)、取代的脲(例如羟基脲)、甲基胍衍生物(例如丙卡巴嗪)和肾上腺皮质激素抑制剂(例如米托坦和氨鲁米特)。

[0301] 激素和拮抗剂的非限制性实例包括肾上腺皮质类固醇(例如泼尼松)、孕激素(例如己酸羟孕酮、乙酸甲羟孕酮和醋酸甲地孕酮)、雌激素(例如己烯雌酚和炔雌醇)、抗雌激素(例如他莫昔芬)和雄激素(例如丙酸睾酮和氟甲睾酮)。

[0302] 常用化学疗法药物的实例包括阿霉素、苯丙氨酸氮芥(Alkeran)、Ara-C、BiCNU、白消安(Busulfan)、CCNU、卡铂(Carboplatinum)、顺铂(Cisplatinum)、环磷酰胺(Cytoxan)、柔红霉素(Daunorubicin)、DTIC、5-FU、氟达拉滨、羟基脲(Hydrea)、伊达比星(Idarubicin)、异环磷酰胺(Ifosfamide)、甲氨蝶呤、光辉霉素(Mithramycin)、丝裂霉素、米托蒽醌、氮芥、紫杉醇(或其它紫杉烷类,如多西他赛)、长春碱(Velban)、长春新碱、VP-16,同时一些更新的药物包括吉西他滨(Gemzar)、赫赛汀、伊立替康(Camptosar、CPT-11)、克拉立平(Leustatin)、诺维本(Navelbine)、美罗华(Rituxan)STI-571、多西紫杉醇(Taxotere)、拓扑替康(Topotecan)(和美新(Hycamtin))、希罗达(Xeloda)(卡培他滨(Capecitabine))、泽维林(Zevelin)和骨化三醇。

[0303] 可以使用的免疫调节剂的非限制性实例包括AS-101(Wyeth-Ayerst Labs)、溴匹立明(Upjohn)、 γ 干扰素(Genentech)、GM-CSF(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子;Genetics Institute)、IL-2(Cetus或Hoffman-LaRoche)、人类免疫球蛋白(Cutter Biological)、IMREG(来自Imreg of New Orleans,La.)、SK&F 106528和TNF(肿瘤坏死因子;Genentech)。

[0304] 在一些实例中,所施用的另外的治疗剂是生物制剂,例如单克隆抗体,例如3F8、阿巴伏单抗(Abagovomab)、阿德木单抗(Adecatumumab)、阿芙土珠单抗(Afutuzumab)、阿拉西马单抗(Alacizumab)、阿仑单抗(Alemtuzumab)、喷替酸阿妥莫单抗(Altumomab pentetate)、麻安莫单抗(Anatumomab mafenatox)、阿泊珠单抗(Apolizumab)、阿西莫单抗(Arcitumomab)、巴维昔单抗(Bavituximab)、贝妥莫单抗(Bectumomab)、贝利木单抗(Belimumab)、Besilesomab、贝伐珠单抗(Bevacizumab)、莫比瓦妥单抗(Bivatuzumab mertansine)、博纳吐单抗(Blinatumomab)、本妥昔单抗(Brentuximab vedotin)、莫坎妥珠单抗(Cantuzumab mertansine)、卡罗单抗喷地肽(Capromab pendetide)、卡妥索单抗(Catumaxomab)、CC49、西妥昔单抗(Cetuximab)、泊西他珠单抗(Citatuzumab bogatox)、西妥木单抗(Cixutumumab)、克立伐单抗(Clivatuzumab tetraxetan)、可那木单抗(Conatumumab)、达西珠单抗(Dacetuzumab)、地莫单抗(Detumomab)、依美昔单抗(Ecromeximab)、依库丽单抗(Eculizumab)、依决洛单抗(Edrecolomab)、依帕珠单抗(Epratuzumab)、Ertumaxomab、伊瑞西珠(Etaracizumab)、法鲁珠单抗(Farletuzumab)、Figitumumab、加利昔单抗(Galiximab)、吉妥单抗(Gemtuzumab ozogamicin)、吉妥昔单抗(Girentuximab)、Glebatumumab vedotin、替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗(Igovomab)、英西单抗(Imciromab)、Intetumumab、奥英妥珠单抗(inotuzumab)

ozogamicin)、英妥木单抗 (Ipilimumab)、英妥木单抗 (Iratumumab)、拉贝珠单抗 (Labetuzumab)、来沙木单抗 (Lexatumumab)、林妥珠单抗 (Lintuzumab)、罗佛珠单抗-美登素 (lorvotuzumab mertansine)、Lucatumumab、鲁昔单抗 (Lumiliximab)、马帕木单抗 (Mapatumumab)、马妥珠单抗 (Matuzumab)、美泊利单抗 (Mepolizumab)、美替木单抗 (Metelimumab)、Milatumumab、米妥莫单抗 (Mitumomab)、莫罗木单抗 (Morolimumab)、他那可单抗 (Nacolomab tafenatox)、Naptumomab estafenatox、Necitumumab、尼妥珠单抗 (Nimotuzumab)、疏诺莫单抗 (Nofetumomab merpentan)、奥法木单抗 (ofatumumab)、奥拉单抗 (Olaratumab)、Opportuzumab monatox、奥瑞戈单抗 (Oregovomab)、帕尼单抗 (Panitumumab)、Pentumomab、帕妥株单抗 (Pertuzumab)、Pintumomab、Pritumumab、雷莫芦单抗 (Ramucirumab)、Rilotumumab、利妥昔单抗 (Rituximab)、Robatumumab、Satumomab pendetide、西罗珠单抗 (Sibrotuzumab)、Sonepcizumab、Tacatumumab tetraxetan、Taplitumomab paptox、Tenatumomab、TGN1412、Ticilimumab (替西利姆单抗 (tremelimumab))、Tigatumumab、TNX-650、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、Tremelimumab、Tucotuzumab celmoleukin、维妥珠单抗 (Veltuzumab)、伏洛昔单抗 (Volociximab)、伏妥莫单抗 (Votumumab)、扎鲁木单抗 (Zalutumumab) 或其组合。在一些实例中,治疗性抗体对PD-1或PDL-1具有特异性(例如拮抗性mAb,例如阿替唑单抗 (Atezolizumab)、MPDL3280A、BNS-936558 (纳武单抗 (Nivolumab))、派姆单抗 (Pembrolizumab)、Pidilizumab、CT011、AMP-224、AMP-514、MEDI-0680、BMS-936559、BMS935559、MEDI-4736、MPDL-3280A或MSB-0010718C)。

[0305] 在一些实例中,另外的治疗剂是CTLA-4、LAG-3或B7-H3拮抗剂,例如分别为替西利姆单抗 (Tremelimumab)、BMS-986016和MGA271。

[0306] 在一些实例中,另外的治疗剂是PD-1或PDL-1的拮抗剂。

[0307] 对于某些类型的癌症,另一种常见的治疗方法是手术治疗,例如手术切除癌症或其一部分。治疗的另一实例是放射疗法,例如在手术切除之前向肿瘤部位施用放射性物质或能量(例如外射束治疗)以帮助根除肿瘤或使其缩小。

[0308] CDK (细胞周期蛋白依赖性激酶) 抑制剂是抑制CDK功能的药物。用于提供的方法中的CDK抑制剂的非限制性实例包括AG-024322、AT7519、AZD5438、黄酮吡醇、吡地磺胺 (indisulam)、P1446A-05、PD-0332991和P276-00 (参见例如Lapenna等, Nature Reviews, 8: 547-566, 2009)。其它CDK抑制剂包括LY2835219、Palbociclib、LEE011 (Novartis)、泛CDK抑制剂AT7519、seliciclib、CYC065、丁内酯I、hymenialdisine、SU9516、CINK4、PD0183812或fascaplysin。

[0309] 在一些实例中,CDK抑制剂是大范围抑制剂(例如黄酮吡醇、奥罗莫星 (olomoucine)、核抑制剂 (roscovitine)、肯帕罗酮 (kenpauillone)、SNS-032、AT7519、AG-024322、(S)-核抑制剂 (roscovitine) 或R547)。在其它实例中,CDK抑制剂是一种特异性抑制剂(例如,法西斯菌素、ryuvidine、嘌呤醇A、NU2058、BML-259、SU 9516、PD0332991或P-276-0)。

[0310] 药剂和剂量的选择可以由本领域技术人员根据待治疗的给定疾病来确定。试剂或组合物的组合可以随附施用(例如,作为混合物)、分开但同时施用(例如,通过分开的静脉内管线)或相继施用(例如,先施用一种药物,然后施用第二种药物)。因此,术语组合用于指

两种或多种试剂或组合物的随附、同时或相继施用。

[0311] 根据本文公开的方法,向受试者施用有效量的本文提供的一种或多种药剂。有效量是产生期望的生理反应(例如杀死癌细胞)所需的任何量。通常以每天约0.001mg/kg至约1000mg/kg的初始剂量施用治疗剂。可以使用约0.01mg/kg至约500mg/kg,或约0.1mg/kg至约200mg/kg,或约1mg/kg至约100mg/kg,或约10mg/kg至约50mg/kg的剂量范围。然而,剂量可以根据受试者的需求、所治疗疾病的严重程度以及所使用的化合物而变化。例如,可以根据在特定受试者中诊断出的癌症的类型和阶段根据经验确定剂量。在所提供的方法的上下文中,施用给受试者的剂量应足以随着时间的推移影响患者的有益治疗反应。确定用于特定情况的适当剂量在从业者的技术范围内。因此,本领域技术人员可以凭经验确定施用试剂的有效量和时间表。剂量不应太大以致引起严重的不利副作用,例如不希望的交叉反应、过敏反应等。在有禁忌症的情况下,剂量可由个体医师调整。对于给定类别的药品,可以在文献中找到适当剂量的指南。

[0312] 本文提供了通过使肿瘤细胞与本文所公开的重组腺病毒或重组腺病毒基因组或其组合物接触来抑制肿瘤细胞生存力的方法。在一些实施方案中,该方法是体外方法。在其它实施方案中,该方法是体内方法,并且接触肿瘤细胞包括向患有肿瘤的受试者施用重组腺病毒或重组腺病毒基因组或组合物。

[0313] 还提供了通过向受试者施用治疗有效量的本文公开的重组腺病毒或重组腺病毒基因组(或其组合物)来抑制受试者的肿瘤进展或减小肿瘤体积的方法。

[0314] 还提供了通过向受试者施用治疗有效量的本文公开的重组腺病毒或重组腺病毒基因组(或其组合物)来治疗受试者的癌症的方法。

[0315] 提供以下实施例对某些特定特征和/或实施方案进行说明。这些实施例不应被解释为将本公开限制为所描述的特定特征或实施方案。

[0316] 实施例

[0317] 实施例1:具有增强的复制动力学的合成腺病毒

[0318] 该实施例描述了具有各种修饰的合成腺病毒。一些病毒在至少三个E3基因中包含一个或多个修饰,例如三个或六个E3基因的缺失,或用于阻止三个或六个E3基因表达的修饰,其允许病毒复制增强。在某些情况下,重组病毒包括其它修饰,例如肝脏脱靶突变、肿瘤选择性突变、靶向配体、嵌合纤维蛋白和/或报告基因。

[0319] 表1.合成腺病毒的描述

[0320]

病毒名称	SEQ ID NO:	描述	相较于 WT Ad5 的突变
AdSyn-CO335	1	肿瘤选择性, 肝脏脱靶, EGFR-靶向病毒	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], ΔRIDα/β/14.7K + EGFRVHH-GS-FKBP, FRB-TtoL-纤维, ΔE4orf6/7
AdSyn-CO821	2	AdSyn-CO335 的报告基因 (YPet) 形式	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], YPet-P2A-ADP, ΔRIDα/β/14.7K + EGFRVHH-GS-FKBP, FRB-TtoL-纤维, ΔE4orf6/7
AdSyn-CO820	3	与 AdSyn-CO335 的区别在于缺乏三个另外的 E3 基因	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ12.5k, Δ6.7k, Δ19k, ΔRIDα/β/14.7K + EGFRVHH-GS-FKBP, FRB-TtoL-纤维, ΔE4orf6/7
AdSyn-CO819	4	AdSyn-CO820 报告基因 (YPet) 形式	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ12.5k, Δ6.7k, Δ19k, YPet-P2A-ADP, ΔRIDα/β/14.7K + EGFRVHH-GS-FKBP, FRB-TtoL-纤维, ΔE4orf6/7
AdSyn-CO1020	5	与 AdSyn-CO820 的区别在于由 ADP 代替 E3B 表达 EGFRVHH-FKBP	E1A [LXCXE], 六邻体 [E451Q], Δ12.5k, Δ6.7k, Δ19k, EGFRVHH-GS-FKBP-P2A-ADP, ΔRIDα, ΔRIDβ, Δ14.7k, FRB-纤维, E4-ORF6/7
AdSyn-CO874	6	与 WT Ad5 的区别在于缺失六个 E3 基因和报告基因 YPet-P2A-ADP	Δ12.5k, Δ6.7k, Δ19k, YPet-P2A-ADP, ΔRID, ΔRID, Δ14.7k
AdSyn-CO1000	7	与 AdSyn-CO874 的区别在于含有另外的肿瘤选择性和肝脏脱靶突变	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ6.7k, Δ12.5k, Δ19k, YPet-P2A-ADP, ΔE3-RID, ΔE3-RID, ΔE3-14.7k, ΔE4-ORF6/7
AdSyn-CO1067	8	与 AdSyn-CO1000 的区别在于缺失 YPet 报告基因	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ6.7k, Δ12.5k, Δ19k, ΔE3-RID, ΔE3-RID, ΔE3-14.7k, ΔE4-ORF6/7
AdSyn-CO1068	9	与 AdSyn-CO1067 的区别在于在纤维 HI 环中拥有含有 RGD 的肽来扩大趋性	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ6.7k, Δ12.5k, Δ19k, ΔE3-RID, ΔE3-RID, ΔE3-14.7k, 纤维-RGD4C, ΔE4-ORF6/7
AdSyn-CO1069	10	AdSyn-CO1068 的报告基因 (YPet) 形式	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ6.7k, Δ12.5k, Δ19k, YPet-P2A-ADPΔE3-RID, ΔE3-RID, ΔE3-14.7k, 纤维-RGD4C, ΔE4-ORF6/7

[0321]

病毒名称	SEQ ID NO:	描述	相较于 WT Ad5 的突变
AdSyn-CO964	11	与 WT Ad5 的区别在于具有 Ad34 结；还含有 14.7k-P2A-YPet 报告基因	Ad5: 14.7k-P2A-YPet, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结
AdSyn-CO1041	12	与 AdSyn-CO964 的区别在于具有全部六个 E3 基因缺失和不同的报告基因 (YPet-P2A-ADP)	Δ 12.5k, Δ 6.7k, Δ 19k, YPet-P2A-ADP, Δ RID, Δ RID, Δ 14.7k, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结
AdSyn-CO1042	13	与 AdSyn-CO1041 的区别在于含有另外的肿瘤选择性和肝脏脱靶突变	E1A Δ LXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ 12.5k, Δ 6.7k, Δ 19k, YPet-P2A-ADP, Δ RID, Δ RID, Δ 14.7k, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, Δ E4-ORF6/7
AdSyn-CO1139	14	与 AdSyn-CO1042 的区别在于缺乏报告基因	E1A Δ LXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ 12.5k, Δ 6.7k, Δ 19k, Δ RID, Δ RID, Δ 14.7k, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, Δ E4-ORF6/7
AdSyn-CO421	44	Ad5 表达报告基因	YPet-P2A-ADP
AdSyn-CO1056	45	AdSyn-CO964 的一种肝脏脱靶的、肿瘤选择性形式	E1A Δ LXCXE, 六邻体[E451Q], YPet-P2A-ADP, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, Δ E4-ORF6/7
AdSyn-CO1250	46	与 AdSyn-CO1056 的区别在于缺乏报告基因	E1A Δ LXCXE, 六邻体[E451Q], 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, Δ E4-ORF6/7
AdSyn-CO1089	47	与 AdSyn-CO1042 的区别在于在假定 Ad34 纤维结 DG 环中具有含 RGD 的肽, 在纤维 aa512/ 结 aa112 之后插入	E1A Δ LXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ 12.5k, Δ 6.7k, Δ 19k, YPet-P2A-ADP, Δ RID, Δ RID, Δ 14.7k, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, 在 HI 环中的纤维 RGD-4C, Δ E4-ORF6/7
AdSyn-CO1320	48	与 AdSyn-CO1000 的区别在于具有 Katushka2S 荧光团替代 Ypet	E1A Δ LXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ 6.7k, Δ 12.5k, Δ 19k, Katushka2S-P2A-ADP, Δ RID, Δ RID, Δ 14.7k, Δ E4-ORF6/7
AdSyn-CO1321	49	与 AdSyn-CO1042 的区别在于具有 Katushka2S 荧光团替代 Ypet	E1A Δ LXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ 12.5k, Δ 6.7k, Δ 19k, Katushka2S-P2A-ADP, Δ RID, Δ RID, Δ 14.7k, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, Δ E4-ORF6/7
AdSyn-CO1325	50	与 AdSyn-CO1042 的区别在于具有人前列腺特异性抗原 (PSA) 替代 Ypet	E1A Δ LXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ 12.5k, Δ 6.7k, Δ 19k, PSA-P2A-ADP, Δ RID, Δ RID, Δ 14.7k, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, Δ E4-ORF6/7

病毒名称	SEQ ID NO:	描述	相较于 WT Ad5 的突变
AdSyn-CO1342	51	与 AdSyn-CO1042 的区别在于具有萤火虫荧光素酶 2: YPet 融合蛋白替代 YPet	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ12.5k, Δ6.7k, Δ19k, Luc2:YPet-P2A-ADP, ΔRID, ΔRID, Δ14.7k, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, ΔE4-ORF6/7
AdSyn-CO1362	52	与 AdSyn-CO1042 的区别在于在 Ad34 结中具有 F242S 点突变	E1A ΔLXCXE, 六邻体 [E451Q], Δ12.5k, Δ6.7k, Δ19k, YPet-P2A-ADP, ΔRID, ΔRID, Δ14.7k, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结[F242S], ΔE4-ORF6/7
AdSyn-CO1403	53	与 AdSyn-CO1042 的区别在于在假定 Ad34 结 HI 环中具有含 RGD 的肽, 在纤维 aa547/结 aa147 之后插入	E1A[LXCXE], 六邻体 E451Q; 12.5k, 6.7k, 19k, Ypet-P2A-ADP, ΔRID, ΔRID, Δ14.7k; 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, RGD4C-HI; E4orf6/7
AdSyn-CO1404	54	与 AdSyn-CO1042 的区别在于在假定 Ad34 结 IJ 环中具有含 RGD 的肽, 在纤维 aa569/结 aa169 之后插入	E1A[LXCXE], 六邻体 E451Q; 12.5k, 6.7k, 19k, Ypet-P2A-ADP, ΔRID, ΔRID, Δ14.7k; 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, RGD4C-IJ; E4orf6/7
AdSyn-CO869	55	与 WT Ad5 的区别在于具有报告基因和 E3B 基因缺失	YPet-P2A-ADP, RID, RID, 14.7k
AdSyn-CO996	56	与 AdSyn-CO869 相似, 除了 E3B 基因的表达被起始密码子的突变和一个或多个提前终止密码子的插入所破坏	YPet-P2A-ADP, RID [M1K], RID [M1K, C30G, M60stop], 14.7k[M1K, M9stop, M31stop, M39stop]
AdSyn-CO999	57	包含 E3A 基因缺失的肿瘤选择性、肝脏脱靶的报告基因病毒	E1A LXCXE, 六邻体 [E451Q], 12.5k, 6.7k, 19k, YPet-P2A-ADP, E4orf6/7
AdSyn-CO1002	58	与 WT Ad5 的区别在于具有报告基因和 E3A 基因缺失	12.5k, 6.7k, 19k, YPet-P2A-ADP
AdSyn-CO1347	59	与 Adsync-CO1042 相同, 除了该病毒也含有 E4orf3 的缺失	E1A LXCXE, 六邻体 [E451Q], 12.5k, 6.7k, 19k, YPet-P2A-ADP, RID, RID, 14.7k, 纤维=Ad5 尾 + Ad5 杆 + Ad34 结, E4orf3, E4orf6/7

[0323] 病毒说明:

[0324] AdSyn-C0335 (SEQ ID NO:1) 是一种肿瘤选择性病毒, 具有 E1A ΔLXCXE、ΔE4orf6/7、ΔE3-RIDα/β、ΔE3-14.7k 的溶瘤突变以及肝脏脱靶六邻体突变 E451Q。该病毒还表达雷帕霉素或 AP21967 依赖性 EGFR 靶向基因 EGFRVHH-FKBP 和 FRB*-纤维。在 WO2016/049201 中描述了 AdSyn-C0335 的产生和表征, 其通过引用整体并入本文。

[0325] AdSyn-C0821 (SEQ ID NO:2) 是 AdSyn-C0335 的修饰形式, 其编码荧光报告蛋白 (YPet)。YPet 表示为具有 P2A 自切割肽序列和 ADP 的融合蛋白 (YPet-P2A-ADP)。由于该病毒

表达报告基因,因此可用于确定哪些患者最可能对AdSyn-C0335治疗产生反应。例如,来自癌症患者的肿瘤活检可以用于确定病毒是否可以在活检的肿瘤细胞中复制。AdSyn-C0821还可以用于筛选人类癌细胞系,以鉴定支持AdSyn-C0335复制的肿瘤细胞的遗传突变或基因表达谱。这些数据可用于识别可能对AdSyn-C0335治疗产生反应的肿瘤“特征”。

[0326] AdSyn-C0820 (SEQ ID NO:3) 是一种溶瘤病毒,与AdSyn-C0335的区别在于缺失了另外三个E3基因(12.5k、6.7k和19k)。因此,该病毒缺乏12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7K。

[0327] AdSyn-C0819 (SEQ ID NO:4) 是AdSyn-C0820的修饰形式,其编码荧光报告蛋白(YPet)。YPet报告基因子被编码为YPet-P2A-ADP融合蛋白。与AdSyn-C0820一样,该病毒缺少六个E3基因(12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7K)。在肿瘤细胞系中,AdSyn-C0819表现出增强的效能,并且复制速度比AdSyn-C0821快。该病毒可用于感染各种癌细胞系以及患者来源的肿瘤样品,以确定哪些癌症类型以及哪些患者最有可能对AdSyn-C0820作出反应。因此,在开始治疗之前,可以使用AdSyn-C0819识别哪些患者可能对AdSyn-C0820治疗有反应。

[0328] AdSyn-C01020 (SEQ ID NO:5) 是AdSyn-C0820的修饰形式,它表达来自ADP ORF的EGFRVHH-FKBP融合蛋白(用于重新靶向EGFR⁺肿瘤细胞),作为EGFRVHH-FKBP-P2A-ADP融合体。

[0329] AdSyn-C0874 (SEQ ID NO:6) 是野生型Ad5的E3删除形式,其中删除了六个E3基因(12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7K)。AdSyn-C0874将来自腺病毒ADP ORF的YPet荧光报告基因表达为YPet-P2A-ADP融合蛋白。该病毒在肿瘤细胞系中显示出比野生型Ad5更高的效价和更快的复制速度。

[0330] AdSyn-C01000 (SEQ ID NO:7) 是AdSyn-C0874的修饰形式,它还包含六邻体E451Q突变,该突变可使病毒脱靶于肝脏(以允许静脉内递送),并具有赋予肿瘤选择性复制的E1A LXCXE和E4orf6/7缺失。该病毒还将YPet报告基因编码为YPet-P2A-ADP融合蛋白。AdSyn-C01000具有很高的复制速率。

[0331] AdSyn-C01067 (SEQ ID NO:8) 是不包含YPet报告基因的AdSyn-C01000形式。该病毒是治疗候选物。

[0332] AdSyn-C01068 (SEQ ID NO:9) 与AdSyn-C01067的区别在于,在纤维HI环中具有含RGD的肽。此修饰通过允许病毒利用RGD-整联蛋白相互作用作为替代感染途径来扩大趋性。

[0333] AdSyn-C01069 (SEQ ID NO:10) 与AdSyn-C01068相同,除了它将YPet报告基因编码为YPet-P2A-ADP融合蛋白。

[0334] AdSyn-C0964 (SEQ ID NO:11) 是改良的Ad5病毒,其中Ad5纤维结已被Ad34纤维结替代。该病毒还将YPet报告基因表达为YPet-P2A-ADP融合蛋白。在测试的多个细胞系中,特别是那些具有低或不具有柯萨奇腺病毒受体(CAR)的细胞系中,AdSyn-C0964相对于WT Ad5和AdSyn-C0335表现出增强的复制。这可能是由于Ad34结与在所有有核细胞上表达的CD46结合,从而使病毒进入了不表达CAR的细胞。

[0335] AdSyn-C01041 (SEQ ID NO:12) 也编码嵌合的Ad5/Ad34纤维,但与AdSyn-C0964的区别在于删除了六个E3基因(12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7K)。AdSyn-C01041还包含表达为YPet-P2A-ADP融合蛋白的YPet报告基因。

[0336] AdSyn-C01042 (SEQ ID NO:13) 是AdSyn-C01041的肝脏脱靶的、肿瘤选择性形式。

具体来说,AdSyn-C01042包括E1A Δ LXCXE和 Δ E4orf6/7的溶瘤突变,以及肝脏脱靶的六邻体突变E451Q。AdSyn-C01042还包含表达为YPet-P2A-ADP融合蛋白的YPet报告基因。该病毒在多种不表达CAR的细胞系中表现出强力复制,并且比WT Ad5强得多。Ad34结与特定E3基因的缺失相结合,可产生一种在多种癌细胞系中具有增强效价的病毒。

[0337] AdSyn-C01139 (SEQ ID NO:14) 与AdSyn-C01142相同,除了它不包含报告基因。因此,AdSyn-C01139是AdSyn-C01142的治疗形式。

[0338] AdSyn-C0421 (SEQ ID NO:44) 是将YPet报告基因表达为YPet-P2A-ADP融合蛋白的WT Ad5。该病毒在本文描述的研究中用作对照。

[0339] AdSyn-C01056 (SEQ ID NO:45) 是AdSyn-C0964的肝脏脱靶的、肿瘤选择性形式。具体来说,AdSyn-C01056包含E1A Δ LXCXE和 Δ E4orf6/7的溶瘤突变,以及肝脏脱靶的六邻体突变E451Q。AdSyn-C01056是一种经过修饰的Ad5病毒,其中Ad5纤维结已被Ad34纤维结替代。它还包含表达为YPet-P2A-ADP融合蛋白的YPet报告基因。

[0340] AdSyn-C01250 (SEQ ID NO:46) 是AdSyn-C01056的非报告形式。该病毒是治疗候选物。

[0341] AdSyn-C01089 (SEQ ID NO:47) 与AdSyn-C01042的区别在于,在假定的Ad34纤维DG环中具有含RGD的肽 (RGD4C)。将RGD4C插入纤维氨基酸512 (对应于结氨基酸112) 之后。此修饰通过允许病毒利用RGD-整联蛋白相互作用作为替代感染途径来扩大趋性。

[0342] AdSyn-C01320 (SEQ ID NO:48) 与AdSyn-C01000相同,除了AdSyn-C01000中的YPet荧光团被Katushka2S荧光团替代。

[0343] AdSyn-C01321 (SEQ ID NO:49) 与AdSyn-C01042相同,除了AdSyn-C01042中的YPet荧光团被Katushka2S荧光团替代。

[0344] AdSyn-C01325 (SEQ ID NO:50) 是肝脏脱靶的 (六邻体E451Q) 肿瘤选择性腺病毒,包含嵌合的Ad5/Ad34纤维,六个E3基因 (12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7K) 的缺失,E1A Δ LXCXE和 Δ E4orf6/7的溶瘤突变。AdSyn-C01325还表达人前列腺特异性抗原 (PSA) 作为PSA-P2A-ADP融合蛋白。该病毒与AdSyn-C01042相同,只是AdSyn-C01042中的YPet荧光团被PSA替代。

[0345] AdSyn-C01342 (SEQ ID NO:51) 是肝脏脱靶的肿瘤选择性腺病毒,其编码嵌合的Ad5/Ad34纤维并包含六个E3基因 (12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7K) 的缺失。AdSyn-C01342还编码E1A Δ LXCXE和 Δ E4orf6/7的溶瘤突变,肝脏脱靶六邻体突变E451Q,将Luc2: YPet报告基因表达为Luc2: YPet-P2A-ADP融合蛋白。该病毒与AdSyn-C01042相同,除了用萤火虫荧光素酶2: YPet融合蛋白替代了AdSyn-C01042中的YPet荧光团。

[0346] AdSyn-C01362 (SEQ ID NO:52) 是肝脏脱靶的、肿瘤选择性腺病毒,编码具有F242F突变的嵌合Ad5/Ad34纤维蛋白,并包含六个E3基因 (12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7K) 的缺失。AdSyn-C01362包含E1A Δ LXCXE和 Δ E4orf6/7的溶瘤突变,以及肝脏脱靶六邻体突变E451Q。该病毒还包含表达为YPet-P2A-ADP融合蛋白的YPet报告基因。AdSyn-C01362与AdSyn-C01042几乎相同,但区别在于Ad34结结构域中存在一个点突变 (F242S),可消除与CD46的结合。

[0347] AdSyn-C01403 (SEQ ID NO:53) 与AdSyn-C01042的区别在于假定的Ad34纤维HI环具有含RGD的肽 (RGD4C)。RGD4C在纤维氨基酸547 (对应于结氨基酸147) 之后插入。此修饰通

过允许病毒利用RGD-整联蛋白相互作用作为替代感染途径来扩大趋性。

[0348] AdSyn-C01404 (SEQ ID NO:54) 与AdSyn-C01042的区别在于,在假定的Ad34纤维IJ环中具有含RGD的肽 (RGD4C)。RGD4C在纤维氨基酸569 (对应于结氨基酸169) 之后插入。此修饰通过允许病毒利用RGD-整联蛋白相互作用作为替代感染途径来扩大趋性。

[0349] AdSyn-C0869 (SEQ ID NO:55) 与WT Ad5的区别在于它具有YPet-P2A-ADP报告基因和E3B基因 (RID、RID、14.7k) 的缺失。

[0350] AdSyn-C0996 (SEQ ID NO:56) 与WT Ad5的区别在于它具有YPet-P2A-ADP报告基因,并且可以消除E3B基因的表达。通过每个基因的起始密码子突变和一个或多个提前终止密码子的插入,可以消除RID α 、RID β 和14.7k的表达。

[0351] AdSyn-C0999 (SEQ ID NO:57) 与WT Ad5的区别在于它具有肿瘤选择性突变 (E1A LXCXE和E4orf6/7)、肝脏脱靶突变 (六邻体 [E451Q]) 和E3A基因 (12.5k、6.7k、19k) 的缺失。该病毒还具有YPet-P2A-ADP报告基因。

[0352] AdSyn-C01002 (SEQ ID NO:58) 与WT Ad5的区别在于它具有报告基因 (YPet-P2A-ADP) 和E3A基因 (12.5k、6.7k、19k) 的缺失。

[0353] AdSyn-C01347 (SEQ ID NO:59) 是一种肝脏脱靶的、肿瘤选择性病毒,具有嵌合Ad5/Ad34纤维,缺失E3基因12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7K,缺失E4orf3,并将YPet报告基因表达为YPet-P2A-ADP融合蛋白。该病毒与AdSyn-C01042相同,除了该病毒进一步包含E4orf3缺失。本文所述的研究表明,E4orf3的缺失不会对肿瘤细胞中的病毒复制产生负面影响。

[0354] 实施例2:E3缺失腺病毒的复制动力学

[0355] 使用基于荧光的病毒动力学 (FBVK) 测定法确定实施例1中描述的重组腺病毒的复制动力学,如PCT公开号W0 2017/147265中所公开的 (通过引用整体并入本文)。简而言之,FBVK测定法可用于确定编码在感染后表达的荧光报告基因 (通常为YPet) 的腺病毒的动力学。荧光强度的测量提供了与几个病毒生命周期内感染细胞数成正比的读数。感染细胞的指数增长与时间的半对数图可得出与指数增长率或复制速率成比例的直线。每种病毒在特定细胞系中的复制速率报告为“ln斜率”。ln斜率越高,表示复制速度越快。

[0356] 使用FBVK分析法在多种不同类型的癌细胞系和正常的小气道上皮细胞 (SAEC) 中测试了AdSyn-C0421、AdSyn-C0819、AdSyn-C0821、AdSyn-C0874、AdSyn-C01000、AdSyn-C01041和AdSyn-C01042的复制。确定每种病毒的复制速率 (单位=1/天)。结果表明,缺少六个E3基因的病毒的复制速度要快于不缺少这些基因的对应病毒。

[0357] 如下所述,图1-4示出了特定合成腺病毒的复制动力学的直接比较。

[0358] 为了测试删除六个E3基因 (除ADP以外的所有E3基因) 的复制效果,在A549细胞中比较了AdSyn-C0421 (WT Ad5) 和AdSyn-C0874的复制。如图1所示,AdSyn-C0874的ln斜率大于AdSyn-C0421的ln斜率,表明E3基因的缺失增强了复制。在多种不同的癌细胞系中发现了相似的结果。

[0359] 在另一项研究中,将AdSyn-C0821与AdSyn-C0819在MDA-MB-453乳腺癌细胞中的复制进行比较。AdSyn-C0821是一种肝脏脱靶的溶瘤病毒,缺少三个E3基因 (RID α 、RID β 和14.7K)。AdSyn-C0819包含与AdSyn-C0821相同的突变,但缺失了六个E3基因 (12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7K)。如图2所示,另外三个E3基因的缺失导致复制增强。在其它多种癌

细胞系中也发现了类似的结果。

[0360] AdSyn-C0964是Ad5报告基因表达病毒,其表达嵌合纤维蛋白(Ad5纤维杆和Ad34纤维结)。在CAR阴性细胞系(HS578T)中测试了该病毒的复制。将AdSyn-C0421用作对照。如图3所示,与具有Ad5结结构域的对照病毒相比,AdSyn-C0964在CAR阴性细胞中表现出增强的复制。

[0361] 接下来,将缺乏六个E3基因的肝脏脱靶的、肿瘤选择性报告基因病毒(AdSyn-C010002)的复制与具有相同突变但另外表达嵌合纤维蛋白(Ad5杆和Ad34结)的病毒(AdSyn-C01042)进行比较。在CAR阴性细胞系HS578T中测试了这些病毒的复制。结果表明,当病毒表达带有Ad34结结构域的纤维蛋白时,CAR阴性细胞中的复制得到增强(图4)。

[0362] 实施例3:重组溶瘤腺病毒在一组肿瘤细胞系中的复制速率

[0363] 使用基于荧光的病毒动力学(FBVK)测定法,对重组腺病毒AdSyn-C0421、AdSyn-C0819、AdSyn-C0821、AdSyn-C0874、AdSyn-C0964、AdSyn-C01000、AdSyn-C01041、AdSyn-C01042、AdSyn-C01056、AdSyn-C01069、AdSyn-C01089、AdSyn-C02评估了AdSyn-C01320、AdSyn-C01321和AdSyn-C01342在各种脑癌、乳腺癌、结肠癌、头颈癌、肺癌、前列腺癌和皮肤癌细胞系中的复制速率。数据示于表2A和表2B中。

[0364] 表2A八种重组腺病毒的复制速率(1/天)

[0365]

细胞系	肿瘤组织	AdSyn - CO421	AdSyn - CO819	AdSyn - CO821	AdSyn - CO874	AdSyn - CO964	AdSyn - CO1000	AdSyn - CO1041	AdSyn - CO1042
H4	脑	1.55	2.49	1.59	3.24	1.46	2.95	4.76	4.26
U118-MG	脑	0.97	0.85	0.39	1.28	0.76	0.95	2.05	2.16
U87-MG	脑	1.41	1.09	0.73	1.85	1.26	1.68	2.52	2.42
AU565	乳腺	1.21	1.67	0.92	2.22	1.42	2.46	2.61	2.22
BT-20	乳腺	0.76	0.78	0.48	1.12	1.10	1.27	2.47	2.38
BT474	乳腺	2.07	1.47	1.45	2.11	1.58	1.79	1.58	1.47
BT549	乳腺	0.87	1.33	0.00	1.49	ND	1.96	2.27	2.38
CAMA-1	乳腺	1.66	1.61	1.26	2.09	1.20	1.83	2.42	1.99
HCC1187	乳腺	0.84	2.11	1.41	2.62	1.21	2.84	2.93	2.45
HCC1428	乳腺	0.55	0.78	0.42	0.97	1.27	0.96	1.88	1.81
HCC1500	乳腺	1.62	1.41	1.13	2.22	1.75	1.62	2.94	2.40
HCC1569	乳腺	0.61	0.80	1.10	0.77	1.24	0.80	1.11	1.36
HCC1806	乳腺	0.11	0.84	0.00	1.35	ND	1.03	1.95	1.66
HCC1954	乳腺	1.28	1.50	1.04	2.23	1.52	2.00	ND	ND
HCC202	乳腺	1.47	1.29	1.02	ND	ND	1.56	2.38	1.89
HCC2935	乳腺	1.19	0.99	0.85	1.64	1.70	1.47	1.96	2.01
HCC38	乳腺	2.17	1.90	1.71	2.49	1.39	2.36	2.55	2.22
HCC70	乳腺	1.07	1.47	1.01	2.06	1.85	1.76	2.68	2.59
HS578T	乳腺	0.85	1.25	0.74	1.55	1.38	1.44	2.92	2.45

[0366]

细胞系	肿瘤组织	AdSyn - CO421	AdSyn - CO819	AdSyn - CO821	AdSyn - CO874	AdSyn - CO964	AdSyn - CO100 0	AdSyn - CO104 1	AdSyn - CO104 2
MCF-7	乳腺	1.27	1.19	0.69	1.62	1.18	1.52	2.43	1.97
MDA- MB-157	乳腺	0.00	0.80	0.00	0.42	1.18	1.00	1.26	1.58
MDA- MB- 175VII	乳腺	1.17	0.48	0.60	1.35	1.05	0.84	1.96	1.33
MDA- MB-231	乳腺	1.08	1.35	0.80	1.71	1.27	1.51	2.25	2.01
MDA- MB-361	乳腺	1.71	1.42	1.28	2.22	1.37	2.11	2.22	2.02
MDA- MB-415	乳腺	1.42	1.75	0.87	2.91	1.61	2.24	4.00	3.29
MDA- MB-453	乳腺	1.24	1.47	1.00	1.88	1.36	1.74	2.41	1.82
MDA- MB-468	乳腺	0.83	1.88	0.38	2.50	0.94	3.24	2.70	2.62
T47D	乳腺	1.08	1.65	0.00	1.62	0.68	1.64	1.38	1.90
UACC81 2	乳腺	0.94	0.76	0.53	1.17	1.15	0.78	2.16	1.43
ZR-75- 30	乳腺	1.75	1.45	1.20	ND	ND	1.70	2.04	1.90
Colo205	结肠	0.99	1.22	0.00	1.68	ND	1.34	3.15	2.61
Detroit56 2	头颈	0.72	1.30	0.41	1.77	1.11	1.75	2.18	2.13
FaDu	头颈	0.80	0.58	0.31	1.01	0.87	0.87	3.51	2.51
SCC47	头颈	0.77	1.09	0.50	1.70	1.12	1.32	2.67	2.23
UMSCC 17B	头颈	0.00	0.25	0.00	0.78	1.02	0.40	1.10	0.80
UMSCC 47	头颈	0.64	0.95	0.35	1.47	0.46	1.24	1.96	1.73
Cal27	头颈	0.60	1.20	0.46	1.79	0.90	1.77	2.76	3.66
Cal33	头颈	1.18	1.66	1.18	2.31	1.40	2.40	3.59	3.41
A549	肺	1.98	2.43	1.77	2.66	1.44	2.69	3.08	2.96
H69AR	肺	0.92	1.71	0.64	ND	ND	2.45	2.89	2.63
NCI H1299	肺	1.50	1.99	1.25	2.06	1.12	1.88	1.96	1.98
NCI	肺	1.67	1.28	1.09	1.71	1.56	1.59	1.98	2.00

细胞系	肿瘤组织	AdSyn - CO421	AdSyn - CO819	AdSyn - CO821	AdSyn - CO874	AdSyn - CO964	AdSyn - CO1000	AdSyn - CO1041	AdSyn - CO1042
H1395									
NCI H1417	肺	1.21	1.13	0.69	1.16	1.36	1.64	ND	ND
NCI H1437	肺	0.35	0.94	0.67	ND	ND	1.04	2.62	2.24
NCI H146	肺	1.39	ND	ND	1.62	ND	1.82	1.80	1.99
NCI H1563	肺	1.28	1.04	0.82	1.38	1.26	1.66	1.85	1.58
NCI H1573	肺	1.16	1.23	1.03	2.01	1.40	1.66	2.50	1.93
NCI H1688	肺	0.86	1.00	0.75	1.04	2.06	0.96	3.13	2.70
NCI H1975	肺	0.64	1.80	0.77	1.83	1.35	2.19	3.01	2.42
NCI H446	肺	0.89	1.39	0.81	ND	ND	1.65	1.94	1.61
NCI H526	肺	0.89	ND	ND	1.55	ND	1.28	1.51	1.45
NCI H596	肺	0.26	0.75	0.13	1.03	1.09	1.01	1.83	1.77
NCI H661	肺	2.78	2.25	2.57	ND	ND	2.44	2.84	2.45
NCI H82	肺	0.91	1.53	0.59	ND	ND	1.54	1.70	1.74
SW1271	肺	1.77	1.80	1.57	ND	ND	1.84	2.19	2.06
PC-3	前列腺	0.00	0.86	0.86	0.76	0.64	0.85	2.13	2.36
A431	皮肤	0.40	0.93	0.39	1.26	ND	1.01	2.08	1.96

[0368] ND=未完成

[0369] 表2B 7种重组腺病毒的复制速率(1/天)

细胞系	肿瘤组织	AdSyn-CO1056	AdSyn-CO1069	AdSyn-CO1089	AdSyn-CO1362	AdSyn-CO1320	AdSyn-CO1321	AdSyn-CO1342
H4	脑	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
U118-MG	脑	1.12	1.91	2.43	ND	ND	ND	ND
U87-MG	脑	0.87	2.62	2.74	ND	ND	ND	ND
AU565	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BT-20	乳腺	ND	ND	2.64	ND	ND	ND	ND

[0371]

细胞系	肿瘤组织	AdSyn-CO1056	AdSyn-CO1069	AdSyn-CO1089	AdSyn-CO1362	AdSyn-CO1320	AdSyn-CO1321	AdSyn-CO1342
BT474	乳腺	1.28	1.81	1.78	ND	ND	ND	ND
BT549	乳腺	0.86	2.12	2.61	ND	ND	ND	ND
CAMA-1	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HCC1187	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HCC1428	乳腺	ND	ND	ND	1.66	ND	ND	ND
HCC1500	乳腺	0.91	1.66	1.73	ND	ND	ND	ND
HCC1569	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HCC1806	乳腺	0.51	1.19	1.59	ND	ND	ND	ND
HCC1954	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HCC202	乳腺	ND	ND	1.75	ND	ND	ND	ND
HCC2935	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HCC38	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HCC70	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HS578T	乳腺	1.08	2.38	2.38	ND	ND	ND	2.57
MCF-7	乳腺	1.27	1.54	2.23	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-157	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-175VII	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-231	乳腺	1.00	1.57	2.03	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-361	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-415	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-453	乳腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-468	乳腺	0.83	2.84	2.98	ND	ND	ND	ND
T47D	乳腺	1.79	1.72	1.53	1.57	ND	ND	ND
UACC81	乳腺	ND	ND	ND	1.47	ND	ND	ND

[0372]

细胞系	肿瘤组织	AdSyn-CO1056	AdSyn-CO1069	AdSyn-CO1089	AdSyn-CO1362	AdSyn-CO1320	AdSyn-CO1321	AdSyn-CO1342
2								
ZR-75-30	乳腺	ND	ND	1.57	ND	ND	ND	ND
Colo205	结肠	1.05	1.75	2.61	ND	ND	ND	ND
Detroit562	头颈	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FaDu	头颈	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SCC47	头颈	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UMSCC17B	头颈	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UMSCC47	头颈	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cal27	头颈	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cal33	头颈	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A549	肺	1.28	2.74	2.79	2.76	3.00	3.11	2.63
H69AR	肺	ND	ND	2.40	ND	ND	ND	ND
NCI H1299	肺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NCI H1395	肺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NCI H1417	肺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NCI H1437	肺	ND	ND	2.19	ND	ND	ND	ND
NCI H146	肺	ND	2.04	ND	1.87	ND	ND	ND
NCI H1563	肺	ND	ND	1.63	ND	ND	ND	ND
NCI H1573	肺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NCI H1688	肺	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NCI H1975	肺	1.03	2.16	2.95	ND	ND	ND	ND
NCI H446	肺	ND	ND	1.65	1.57	ND	ND	ND
NCI H526	肺	ND	1.39	ND	ND	ND	ND	ND
NCI H596	肺	ND	ND	1.78	1.03	ND	ND	ND

细胞系	肿瘤组织	AdSyn-CO1056	AdSyn-CO1069	AdSyn-CO1089	AdSyn-CO1362	AdSyn-CO1320	AdSyn-CO1321	AdSyn-CO1342
[0373]	NCI H661	肺	ND	ND	2.57	ND	ND	ND
	NCI H82	肺	ND	ND	1.38	ND	ND	ND
	SW1271	肺	ND	ND	2.07	ND	ND	ND
	PC-3	前列腺	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	A431	皮肤	0.92	1.32	1.71	ND	ND	ND

[0374] ND=未完成

[0375] 实施例4:AdSyn-CO1042和AdSyn-CO1000的体内表征

[0376] 进行了进一步的研究以进一步表征表现出增强的病毒复制的重组腺病毒。

[0377] 如体外FBVK分析所示,AdSyn-CO1000和AdSyn-CO1042均为E3缺失病毒,与WT Ad5相比,在肿瘤细胞中具有增强的效力/复制能力(参见上面的表2A和表2B)。然后在A549肺肿瘤异种移植模型中测试了AdSyn-CO1000和AdSyn-CO1042的体内功效。通过将 5×10^6 个细胞注射到乳腺脂肪垫中,将人A549肿瘤细胞接种到裸鼠中。当肿瘤平均体积达到约 164mm^3 (第0天)时,将小鼠随机分为不同的治疗组(每组 $n=8$ 只小鼠)。给小鼠单次肿瘤内(IT)注射PBS或单次注射 8×10^6 PFU的AdSyn-CO421、AdSyn-CO1000或AdSyn-CO1042。AdSyn-CO421将YPet荧光团编码为YPet-P2A-ADP融合体,但其余为野生型Ad5。与“野生型”AdSyn-CO421相比,AdSyn-CO1000(图5A)和AdSyn-CO1042(图5B)均表现出增强的抗肿瘤活性。

[0378] 还在HS578T原位三阴性乳腺癌肿瘤模型中对AdSyn-CO1042进行了测试。通过将 $100\mu\text{l}$ HBSS中的 5×10^6 个细胞注射到右乳腺脂肪垫中,将人HS578T肿瘤细胞接种到7周龄的NSG小鼠中。当肿瘤的平均体积达到 $\sim 168\text{mm}^3$ (第0天)时,将小鼠随机分为不同的治疗组(每组 $n=8$ 只小鼠)。在第0、7和14天给小鼠3剂PBS或AdSyn-CO1042(2×10^8 PFU),总体积为 $50\mu\text{l}$ 。

[0379] 如图6所示,在40天的研究期内,用AdSyn-CO1042处理的小鼠的肿瘤体积仍然很小。由于肿瘤负担,必须在第30天之前处死PBS治疗组中的所有动物。

[0380] 下文所述的研究表明,与WTAd5相比,肿瘤选择性突变(ΔLXCXE 和 $\Delta\text{E4orf6/7}$)和肝脏脱靶六邻体突变(E451Q)的组合可为AdSyn-CO1042和AdSyn-CO1000带来更好的安全/毒性特性,这很重要,它可以经静脉内(IV)安全输送更高剂量的这些病毒,以治疗转移性癌症。在第0天,以2001的剂量将AdSyn-CO102、AdSyn-CO181、AdSyn-CO331和AdSyn-CO1042静脉内施用于不同组的C57BL/6小鼠(每组 $n=5$ 小鼠),并于第7天再次以 8×10^8 、 4×10^9 或 2×10^{10} 的剂量施用。然后分析小鼠的存活率(图7A)和肝酶升高(图7B)以评估肝毒性。

[0381] 监测小鼠的存活和毒性的总体迹象,直到第14天(图7A)。尽管WT Ad5以 4×10^9 PFU的剂量引起致命毒性,但在此剂量下AdSyn-CO181和AdSyn-CO331均可以耐受。AdSyn-CO1042的耐受剂量甚至更高,为 2×10^{10} PFU。在第-2天(给药前)、第2天(给药1后48小时)和第9天(给药2后48小时)从所有小鼠采集血样,并冷冻以用于随后的分析。评估血液样本中各种肝酶的存在,例如丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)。显示的结果是来自各个治疗组的第2天血液的平均AST和ALT水平(图7B)。还示出了来自所有小鼠的AST和ALT的平均给药前水平。这些数据表明,与WT Ad5相比,限制正常细胞中病毒复制的 ΔLXCXE 和 Δ

E4orf6/7突变(AdSyn-C0181)和AdSyn-C0331中存在的六邻体脱靶突变均导致毒性降低。AdSyn-C01042即使在 2×10^{10} PFU的较高剂量下也显示出降低的肝毒性,表明AdSyn-C01042中存在的这些不同突变的组合可进一步降低毒性。

[0382] 图8是示出了AdSyn-C01000对BALB/c小鼠的毒性的表。在第0天、第6天和第12天,按图中所列剂量将200 μ l体积的不同病毒静脉内施用于不同组的小鼠(每组n=5只小鼠)。然后分析小鼠的存活以评估毒性。WT Ad5以 0.8×10^9 PFU的剂量在5只小鼠中使2只致死,并以 3.2×10^9 PFU的较高剂量杀死所有小鼠,而AdSyn-C01000在 1×10^9 PFU和 4×10^9 PFU的更高剂量下更安全。这些数据表明,尽管AdSyn-C01000在肿瘤细胞中具有增强的复制能力和杀伤力,但由于存在于AdSyn-C01000中的肿瘤选择性突变和肝脏脱靶六邻体突变,因此其表现出比WT Ad5更好的安全性。

[0383] 为了评估AdSyn-C01042的IV递送在A549肺癌异种移植模型中的功效,进行了另一项研究。通过将 5×10^6 个细胞注射到乳腺脂肪垫中,将人A549肿瘤细胞接种到NSG小鼠中。当肿瘤的平均体积达到 $\sim 184\text{mm}^3$ (第0天)时,将小鼠随机分为不同的治疗组(每组n=8只小鼠)。给小鼠单次注射PBS或单次静脉内注射 2×10^9 PFU的AdSyn-C01042。如图9所示,在用AdSyn-C01042治疗的动物中,在33天的研究期内,肿瘤体积仍然很低。相反,由于肿瘤负担,必须在第33天之前处死盐水治疗组中的所有动物。野生型Ad5无法以 2×10^9 PFU的剂量递送,因为该剂量会导致死亡。

[0384] 然后在正常(非肿瘤细胞)中评估AdSyn-C01000和AdSyn-C01042。用四种不同的溶瘤病毒(AdSyn-C0874、AdSyn-C01000、AdSyn-C01041和AdSyn-C01042)之一以每细胞0.12病毒颗粒的MOI感染人A549细胞(肺癌)或人原发性小气道上皮细胞(SAEC-正常肺)。所有病毒都将YPet荧光团编码为报告基因,以量化病毒随时间的复制/扩展。病毒感染后,立即在IncuCyte ZOOM成像系统中每小时对病毒感染的细胞进行一次成像,以量化在6-7天内YPet+病毒感染的细胞的数量。数据表示为一段时间内YPet+细胞的数量。AdSyn-C0874和AdSyn-C01000是相同的病毒,除了AdSyn-C01000具有赋予肿瘤选择性复制的LXCXE和E4orf6/7突变,和肝脏脱靶六邻体突变。同样,AdSyn-C01041和AdSyn-C01042是相同的病毒,除了AdSyn-C01042具有 Δ LXCXE和 Δ E4orf6/7突变以及肝脏脱靶六邻体突变。在肿瘤细胞中,与AdSyn-C0874和AdSyn-C01041相比,AdSyn-C01000和AdSyn-C01042分别显示出相似的病毒扩展/复制水平(图10)。但是,在正常肺细胞中,与AdSyn-C0874和AdSyn-C01041相比,AdSyn-C01000和AdSyn-C01042的扩张/复制能力明显降低。这些数据表明,AdSyn-C01000和AdSyn-C01042在肿瘤细胞中表现出有效的复制,但在正常细胞中它们的复制明显减弱。

[0385] 实施例5:E3A、E3B和/或E4orf3的缺失和修饰

[0386] 进行了研究以评估仅消除E3A基因或仅消除E3B基因对腺病毒复制动力学的影响。为了评估E3B基因的作用,使用基于荧光的病毒动力学(FBVK)分析对AdSyn-C0421、AdSyn-C0869、AdSyn-C0996和AdSyn-C0874进行评估,以确定在人A549肺肿瘤细胞中的复制速率(图11)。数据报告为编码Ypet荧光蛋白的每种重组腺病毒的ln-斜率值。在AdSyn-C0869中,从基因组中删除了RID α 、RID β 和14.7k基因(E3B基因)。在AdSyn-C0996中,通过突变起始密码子或通过突变基因组以编码提前终止密码子,可以消除RID α 、RID β 和14.7k基因(E3B基因)的表达。这样,基因仍存在于基因组中,但是在病毒感染期间基因不表达。在AdSyn-C0874中,从基因组中删除了六个E3基因(12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k)。这些数据

表明,RID α 、RID β 和14.7k基因表达的缺失或消除导致病毒复制增加。在AdSyn-C0874中删除其它E3基因(12.5k、6.7k和19k)会导致复制动力学进一步提高。

[0387] 为了评估E3A基因的作用,在FBVK分析中对AdSyn-C0421、AdSyn-C01002、AdSyn-C0999和AdSyn-C01000进行评估,以确定在人A549肺肿瘤细胞中的复制速率(图12)。数据报告为编码Ypet荧光蛋白的每种重组腺病毒的ln-斜率值。在AdSyn-C01002中,从基因组中删除了12.5k、6.7k和19k基因(E3A基因)。在AdSyn-C0999中,删除了相同的E3A基因,该病毒还包含E1A Δ LXCXE、 Δ E4orf6/7和六邻体[E451Q]修饰。在AdSyn-C01000中,从基因组中删除了E3A和E3B基因(12.5k、6.7k、19k、RID α 、RID β 和14.7k),该病毒还包括E1A Δ LXCXE、 Δ E4orf6/7和六邻体[E451Q]修饰。这些数据表明,E3A基因的缺失导致病毒复制的适度增加。AdSyn-C01000中E3B基因(RID α 、RID β 和14.7k)的额外缺失导致复制动力学进一步提高。

[0388] 进行了进一步的研究,以评估E4orf3缺失对病毒复制动力学的影响。在FBVK测定中,对AdSyn-C01042和AdSyn-C01347进行评估,以确定在A549人肺肿瘤细胞中的复制速率(图13)。该图示出了每种重组腺病毒的ln-斜率值。除了AdSyn-C01347中E4orf3缺失之外,AdSyn-C01042和AdSyn-C01347相同。这些数据表明,E4orf3也可以在Ad5中删除,而不会对肿瘤细胞中的病毒复制产生负面影响。

[0389] 鉴于可以将本公开的原理应用于其的许多可能的实施方案,应当认识到,所示出的实施方案仅是本公开的示例,并且不应被视为限制本公开的范围。相反,本公开的范围由所附权利要求书限定。因此,我们要求保护落入这些权利要求的范围和精神内的所有内容作为我们的发明。

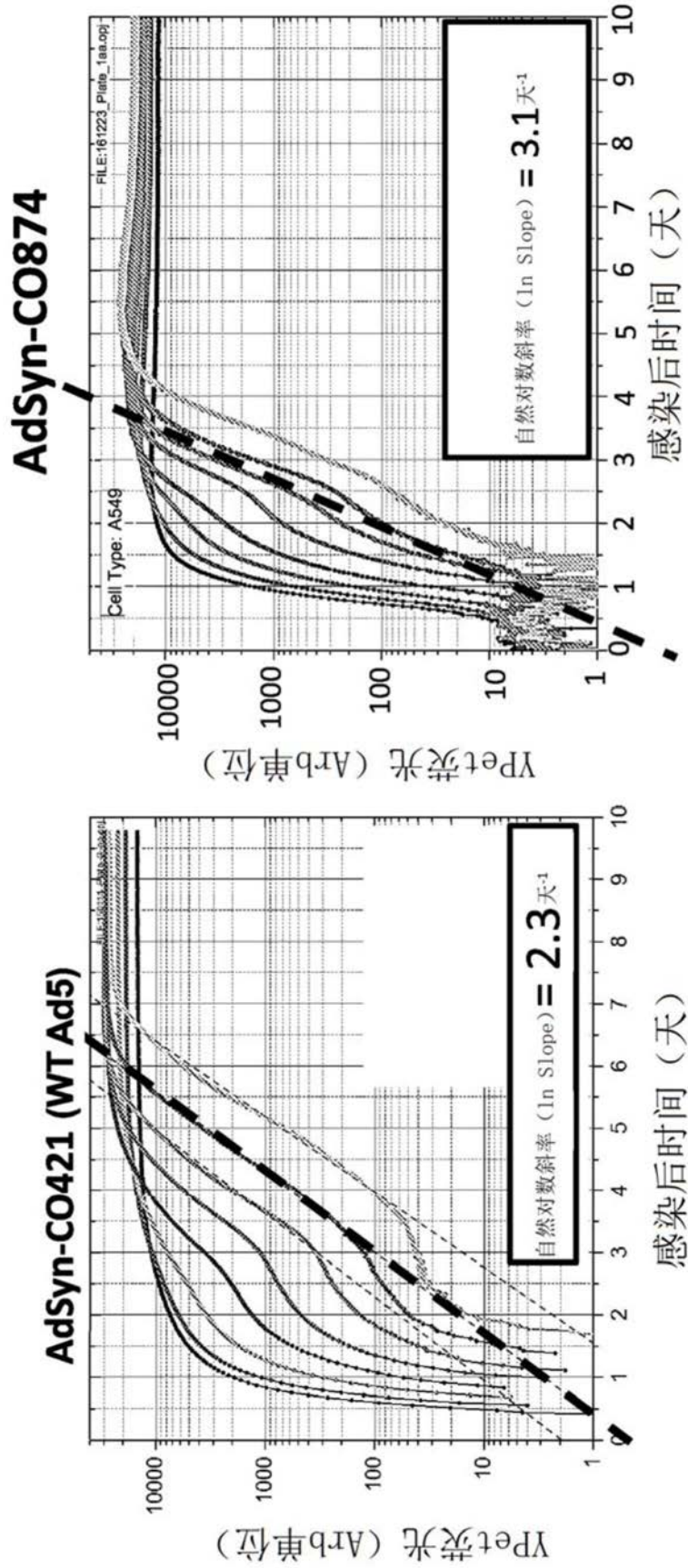
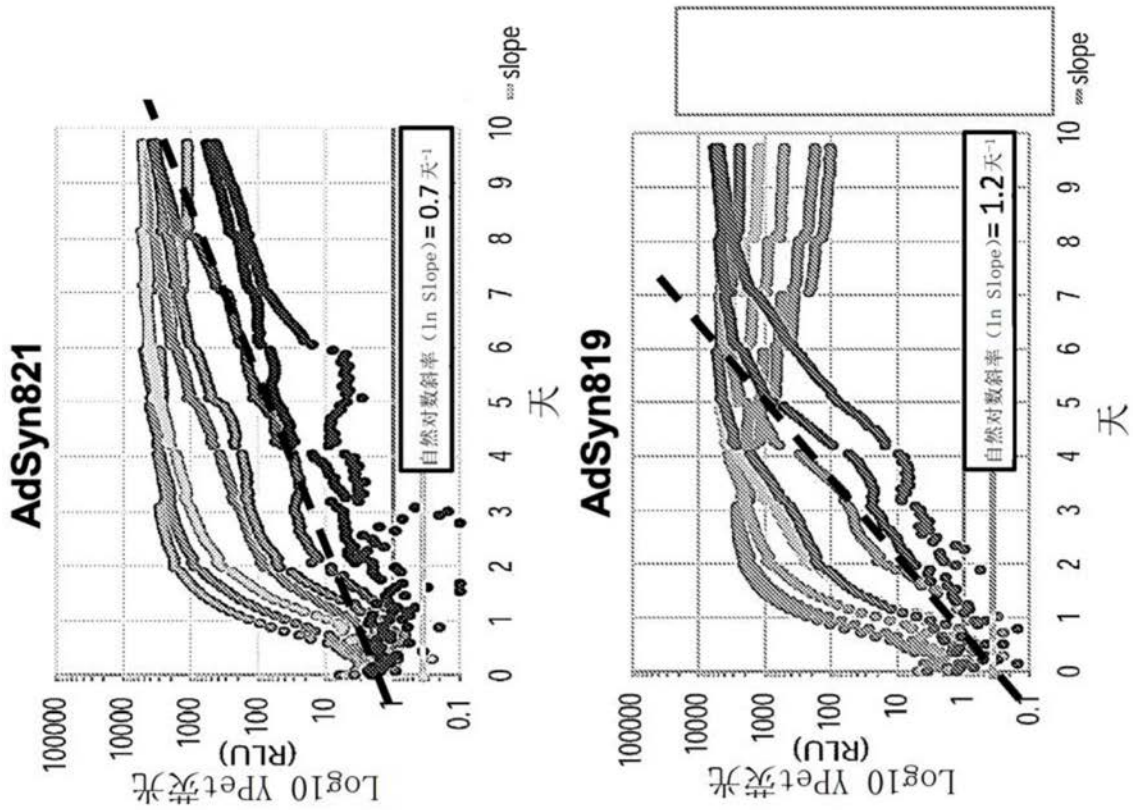


图1



复制速率 (天⁻¹)

乳腺癌细胞系	Adsyn821	AdSyn819
MDA-MB-453	0.7	1.2
MDA-MB-415	0.8	1.6
MDA-MB-231	0.9	1.3
MDA-MB-468	0.8	1.8
HCC1187	1.1	1.7
AU565	0.9	1.6

图2

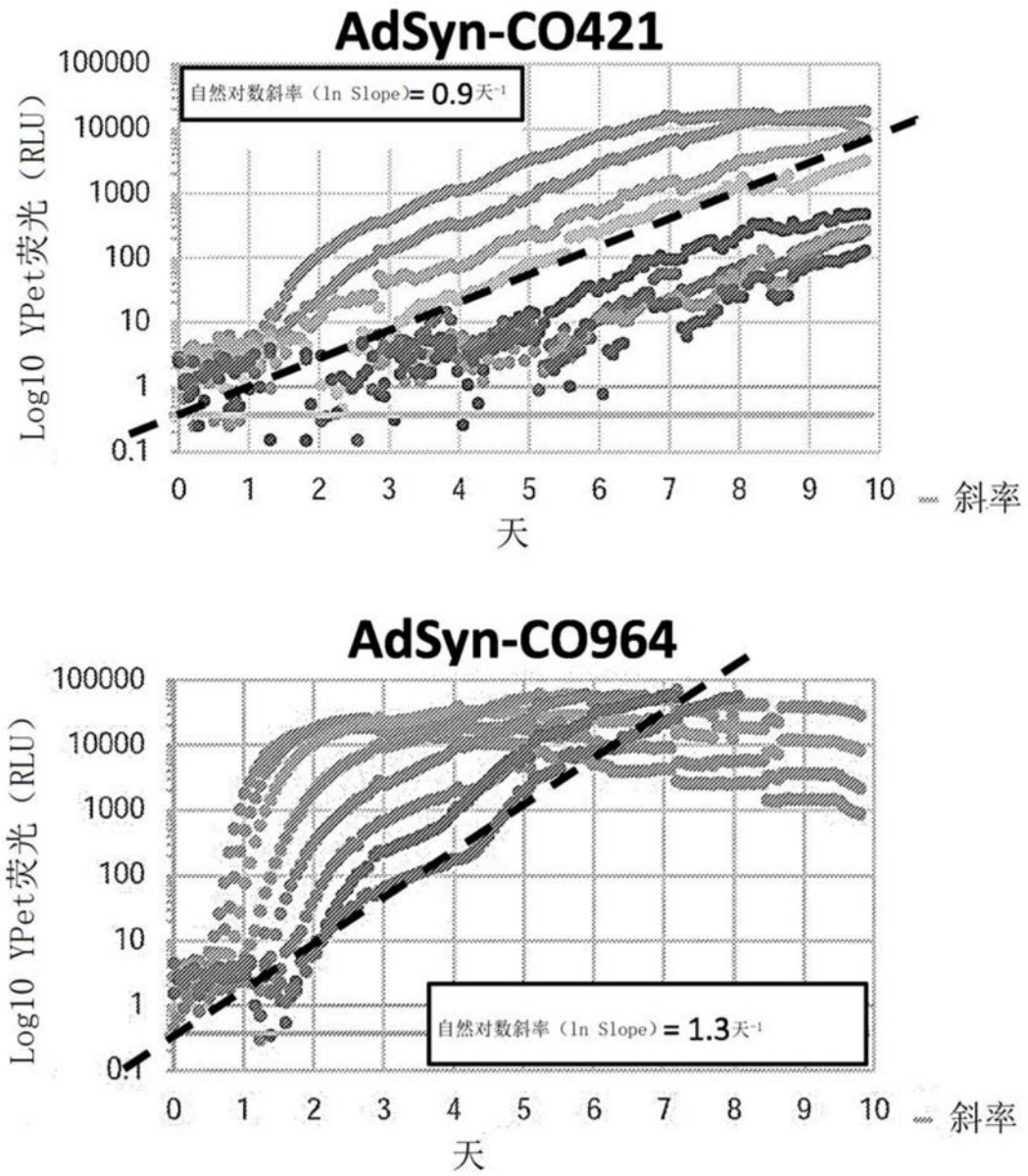


图3

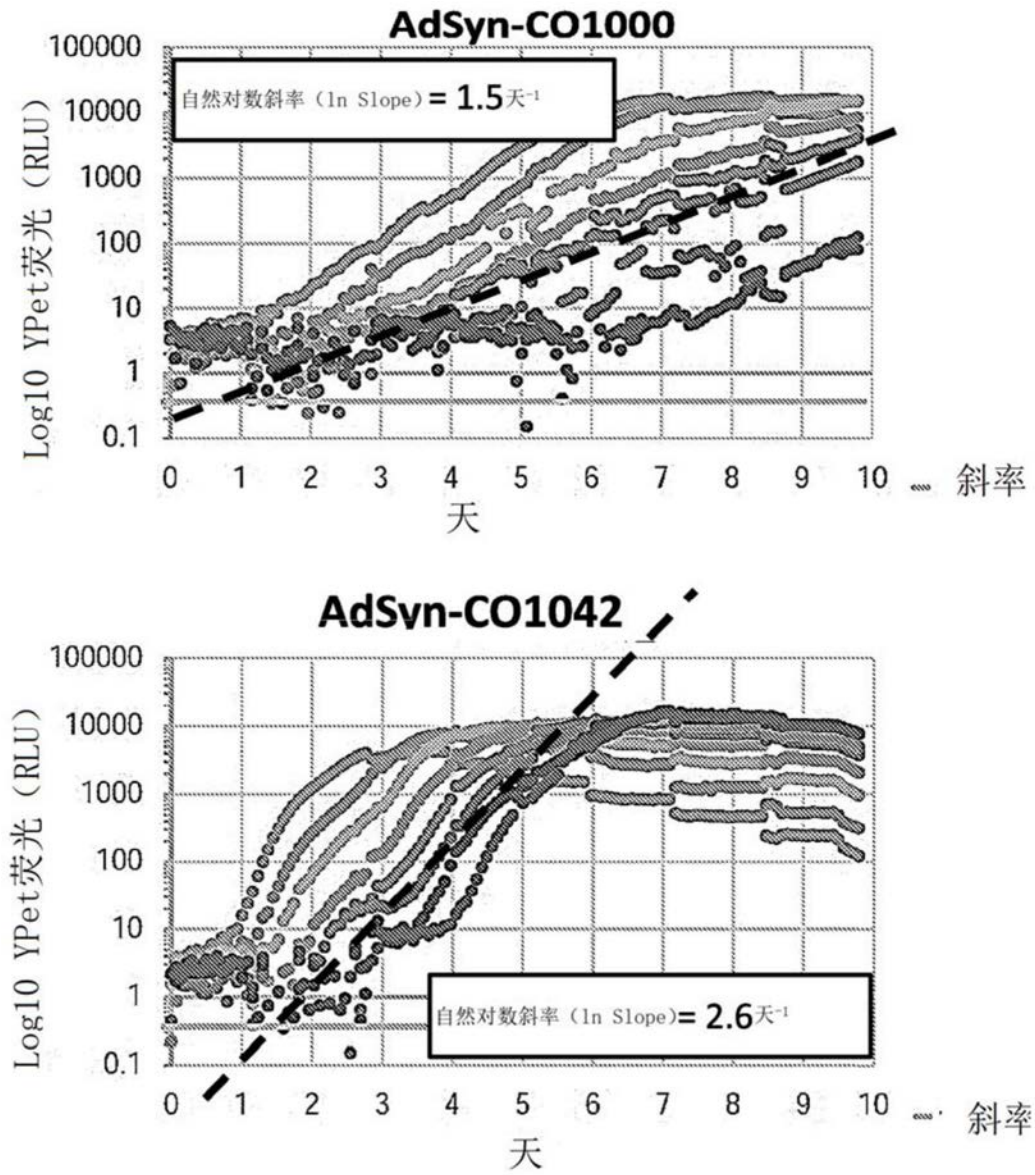


图4

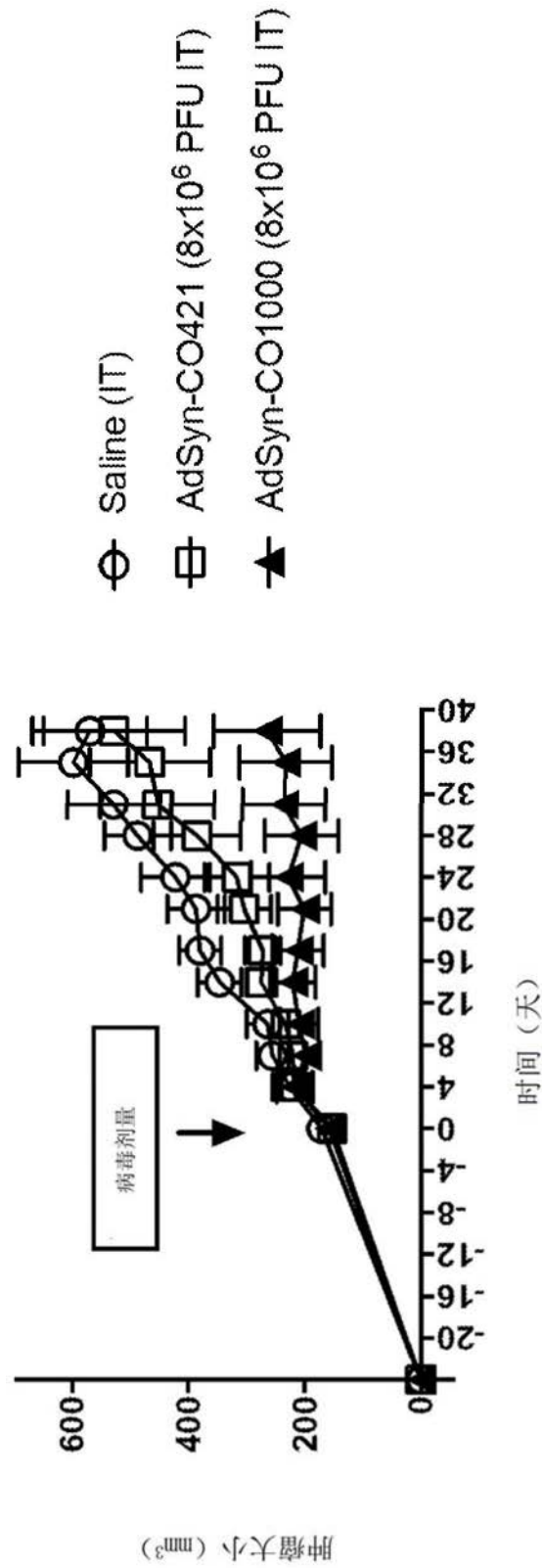


图5A



图5B

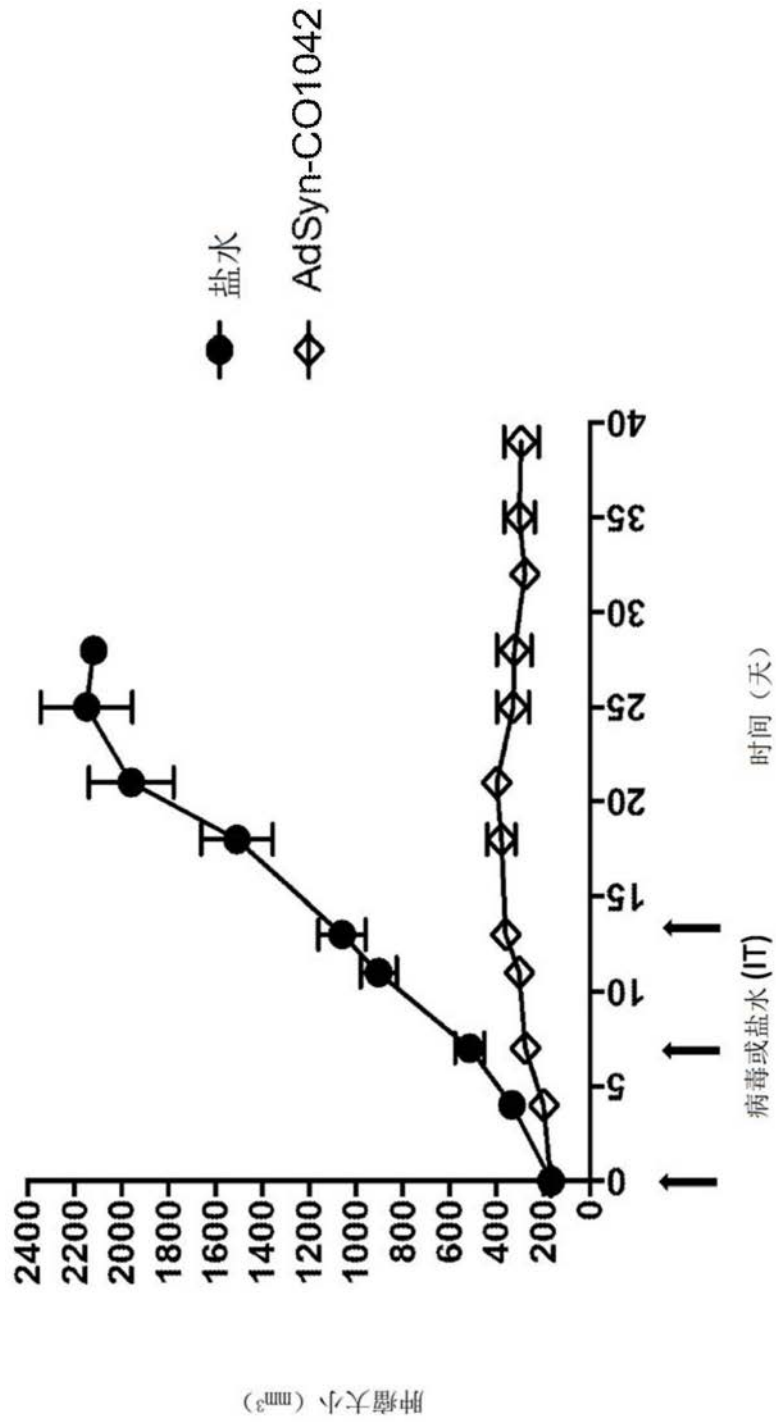


图6

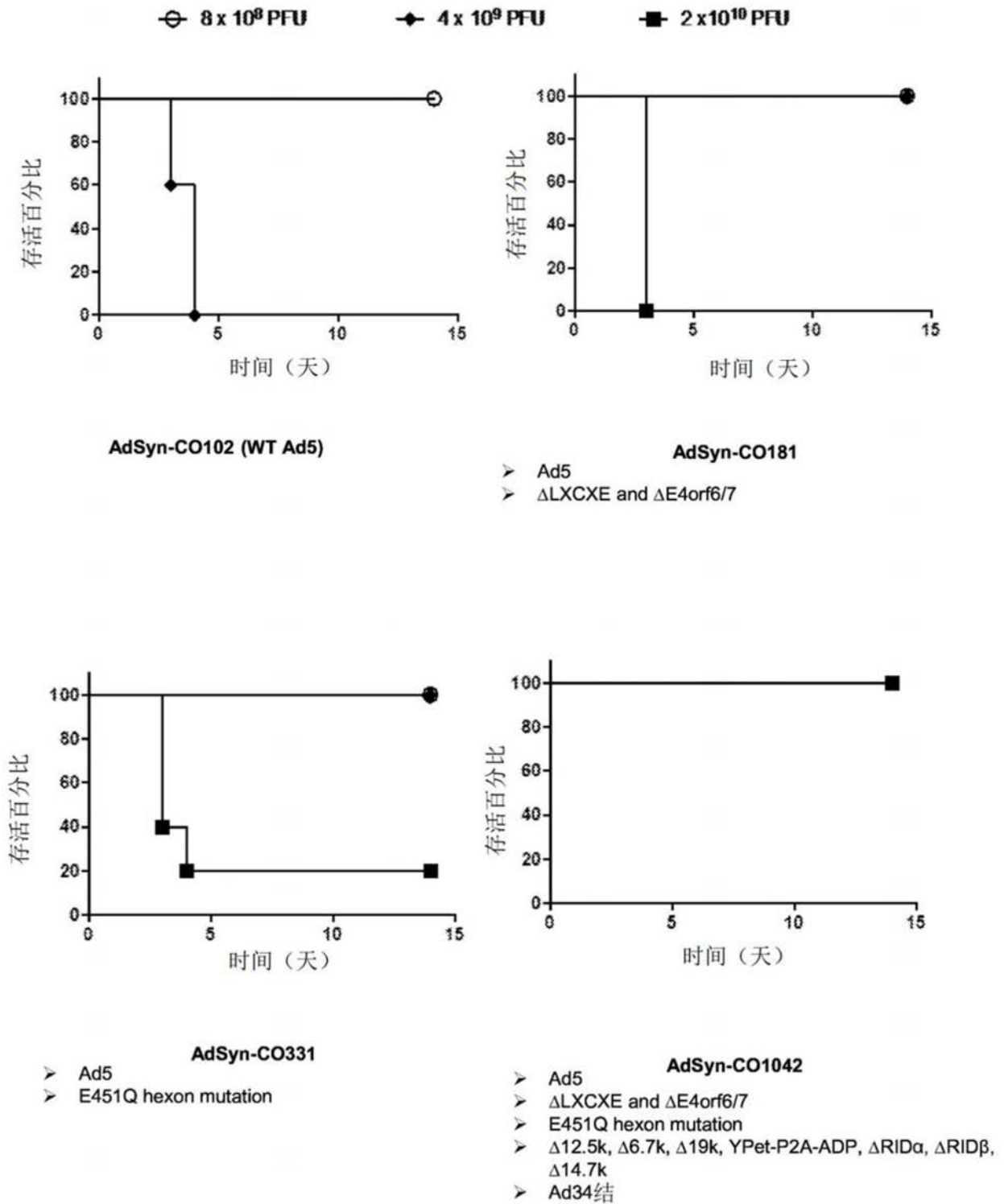


图7A

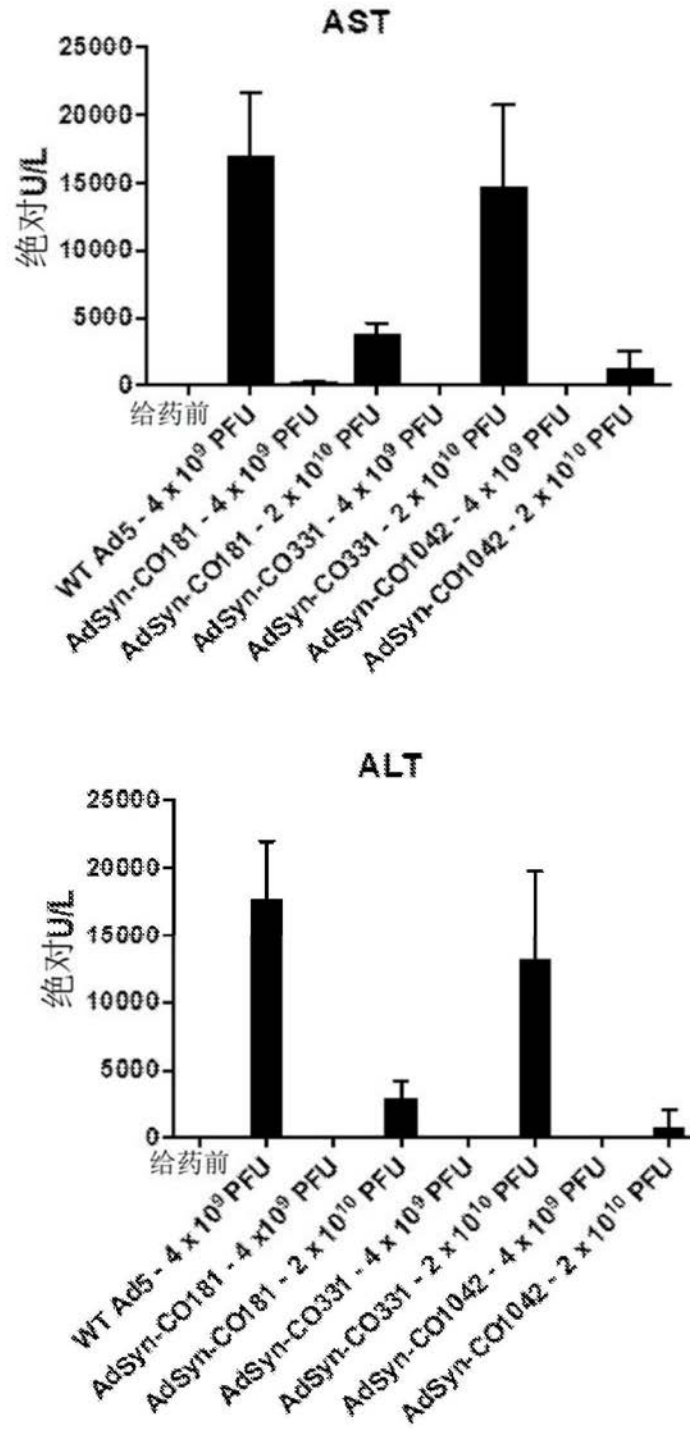


图7B

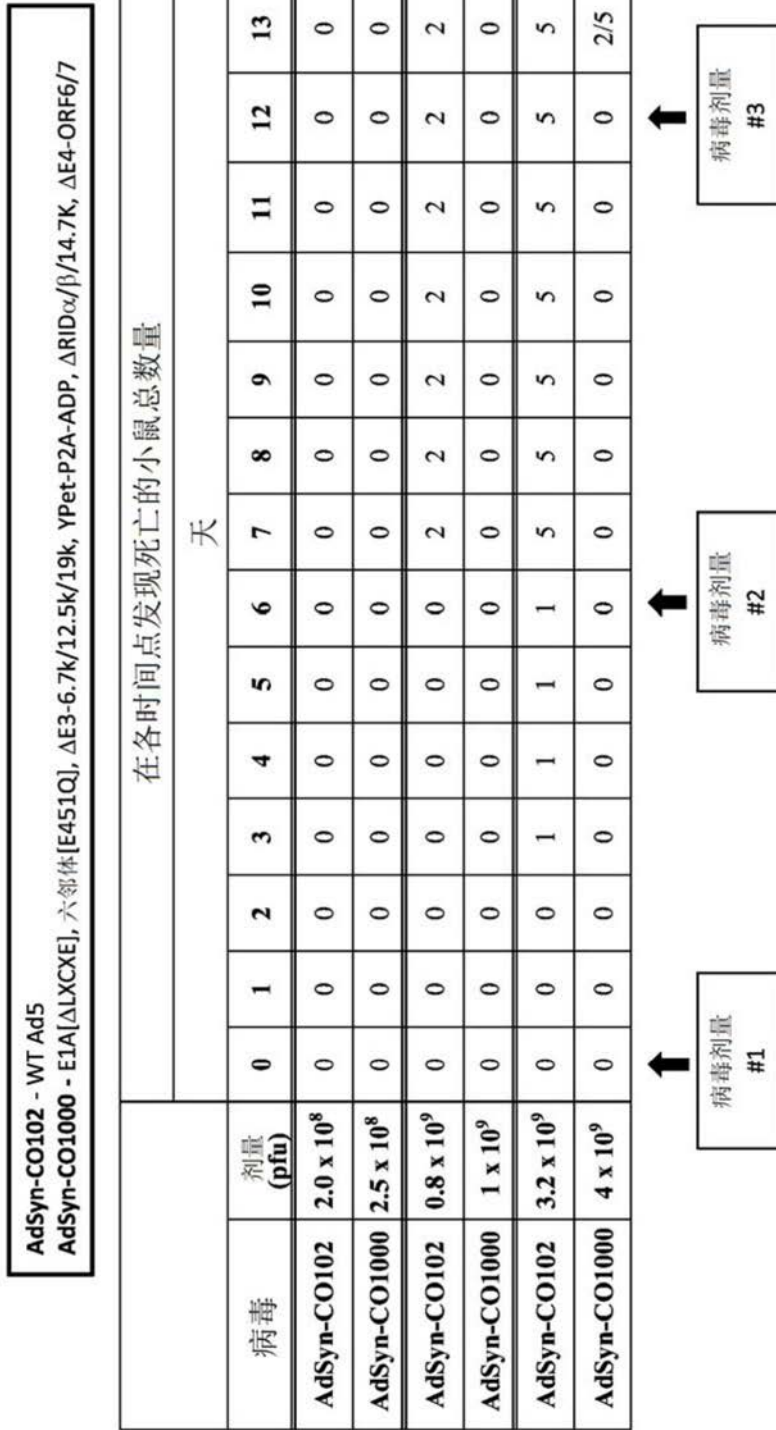


图8

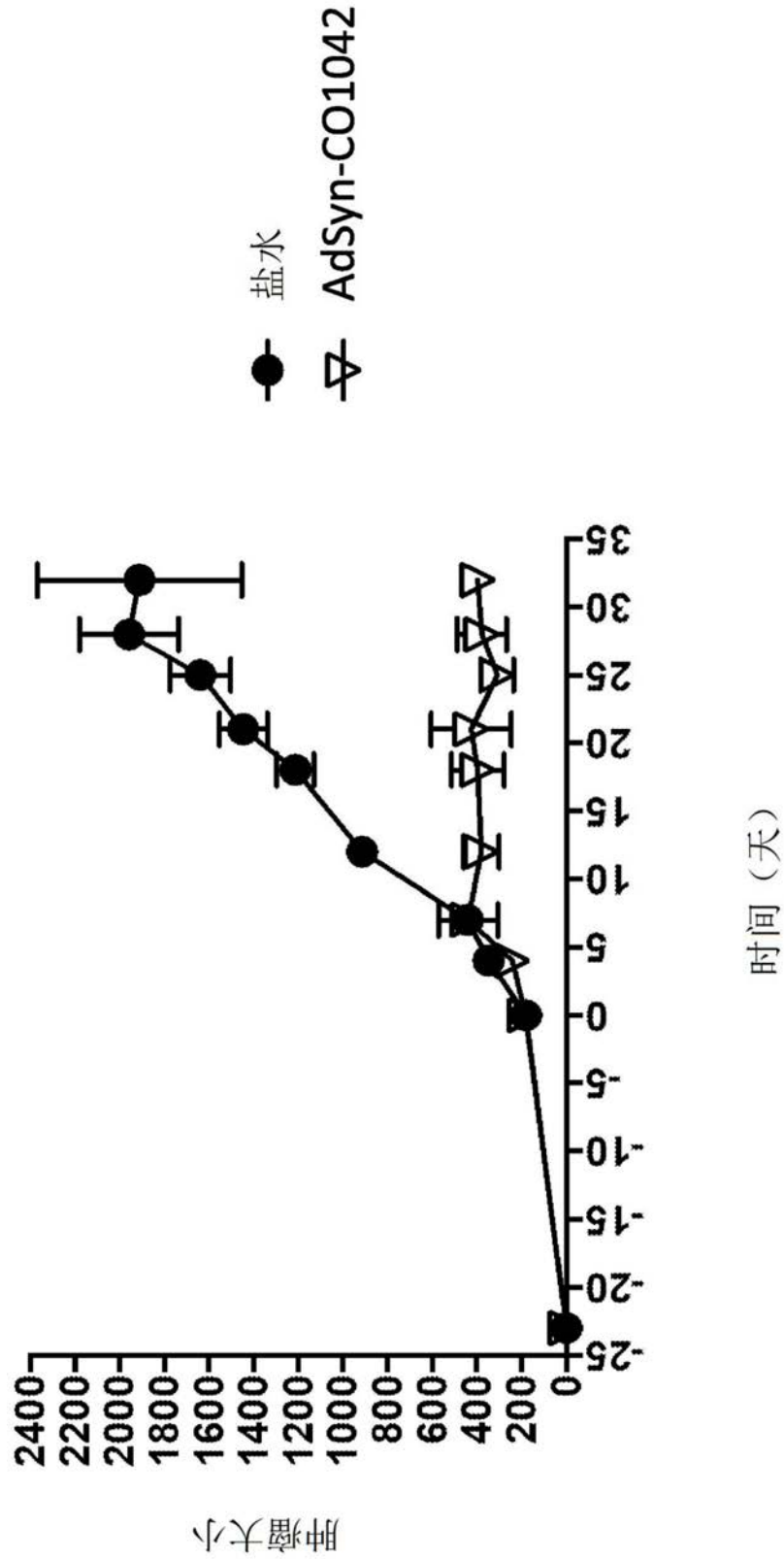


图9

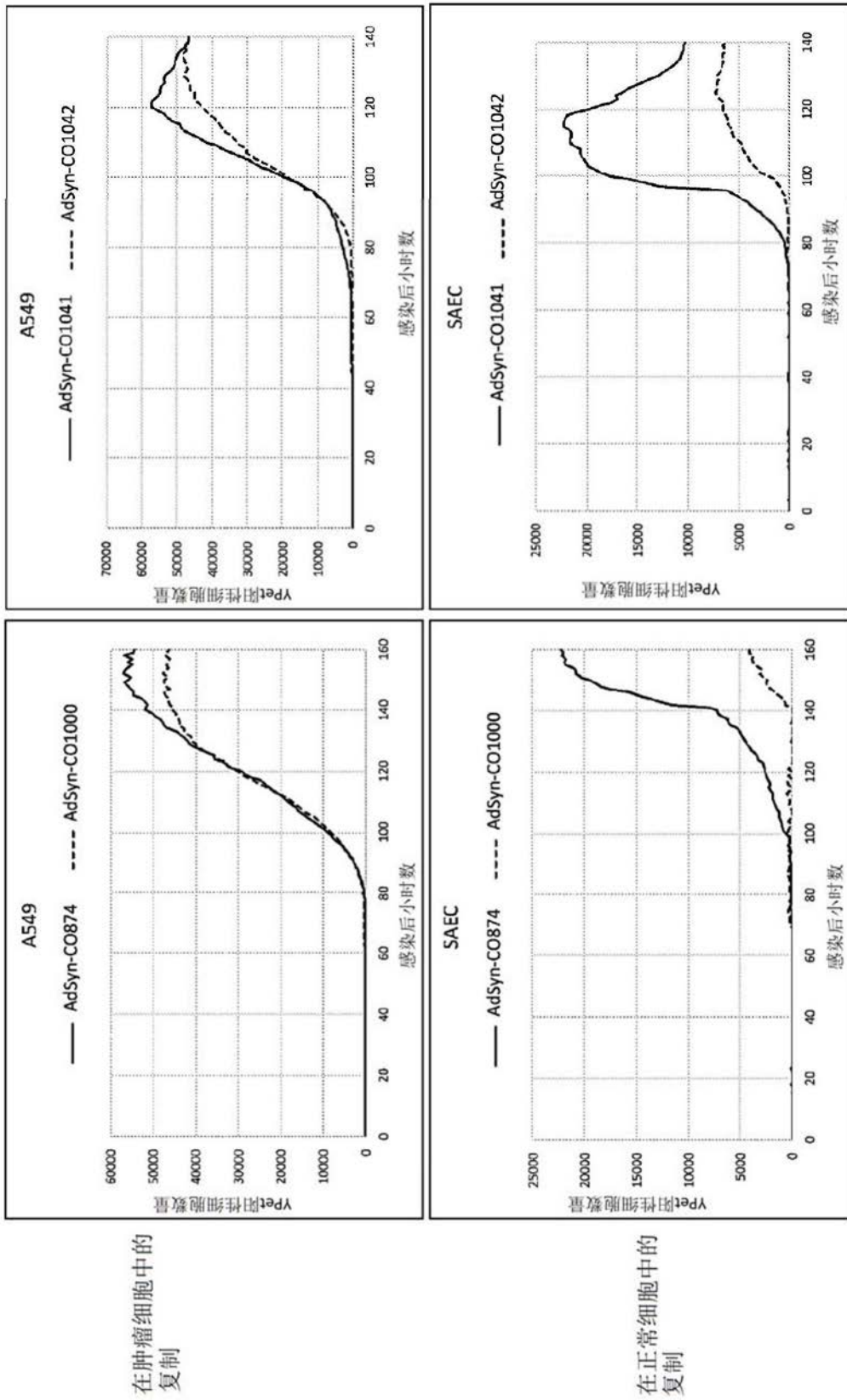


图10

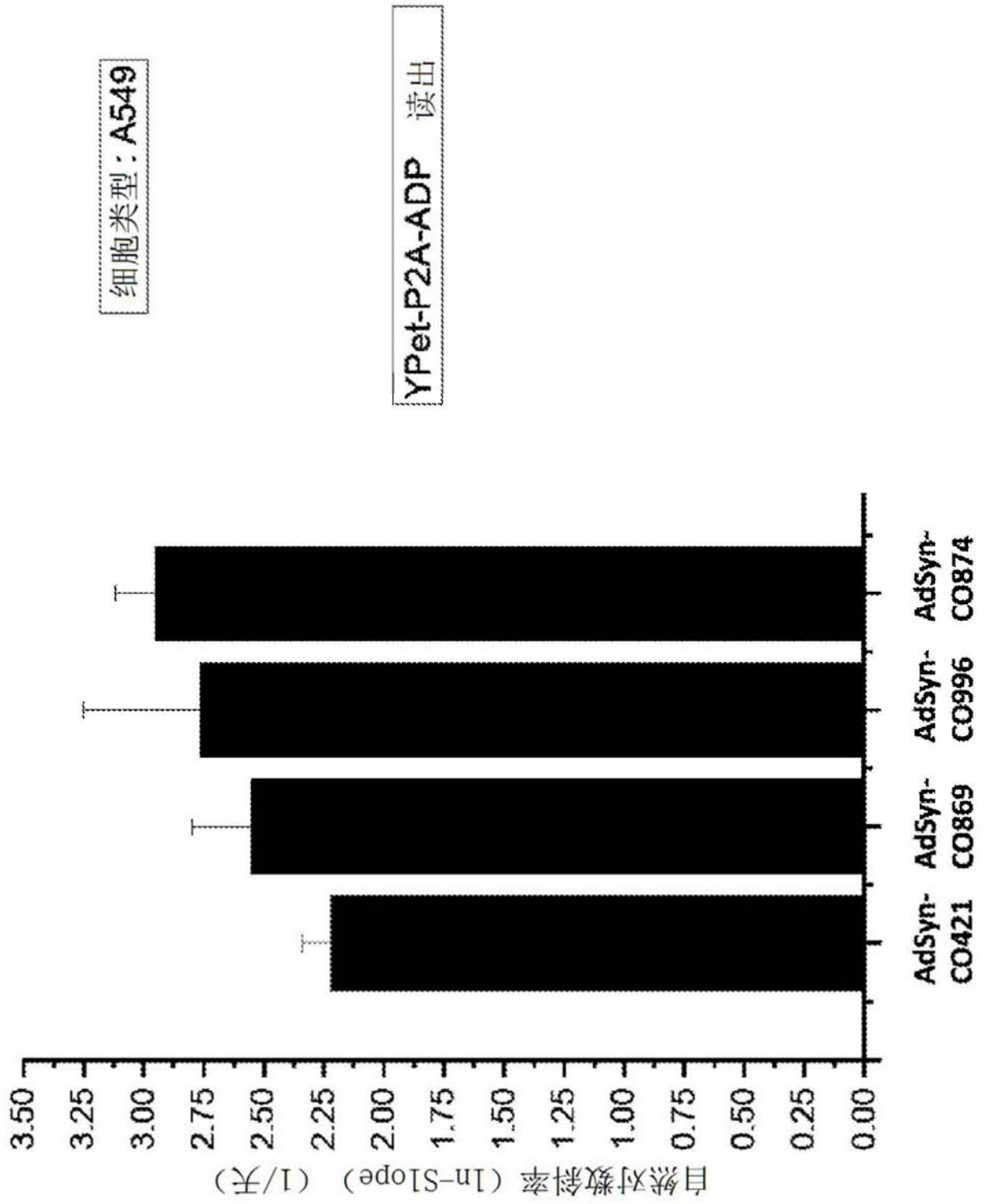


图11

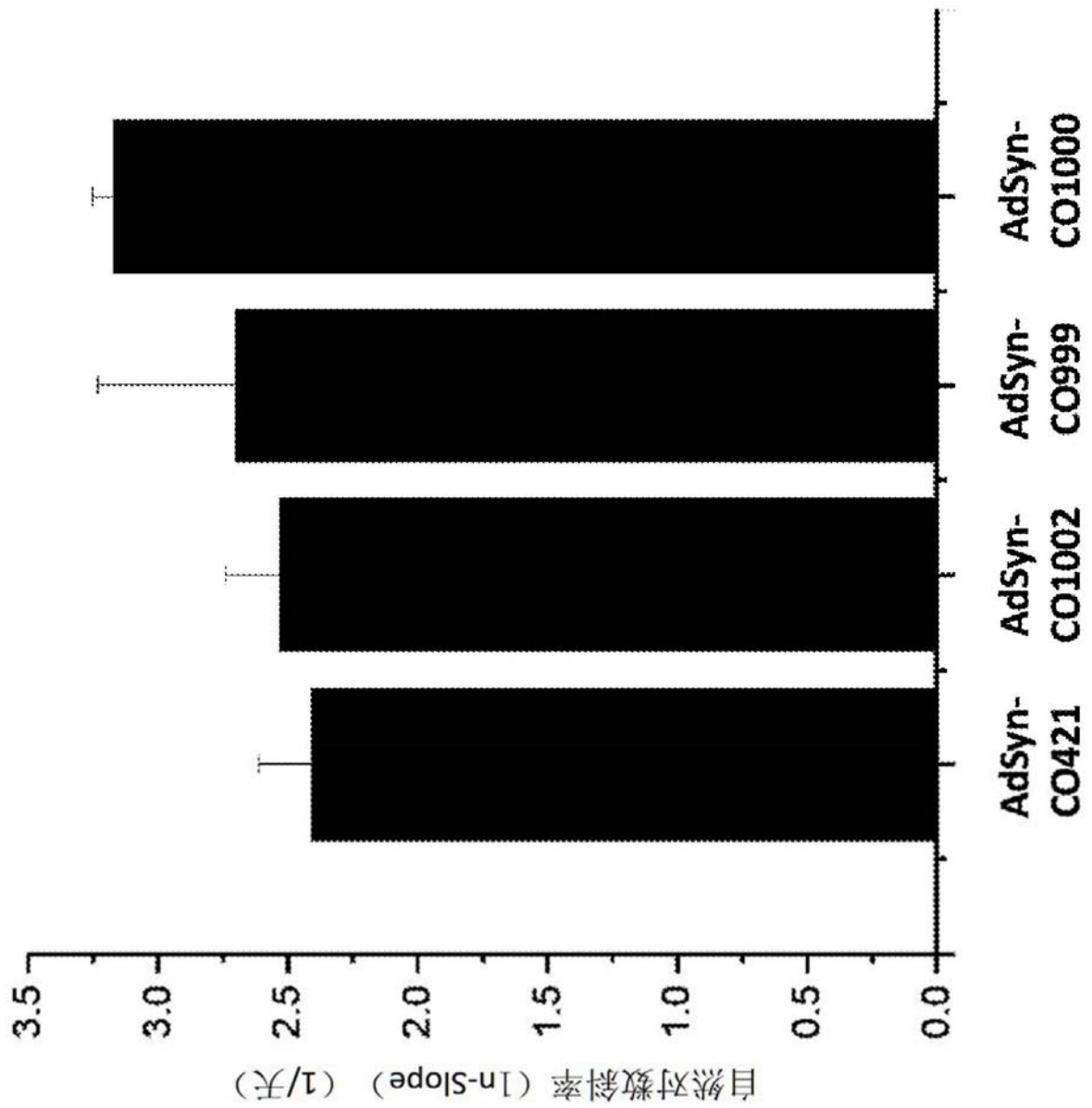


图12

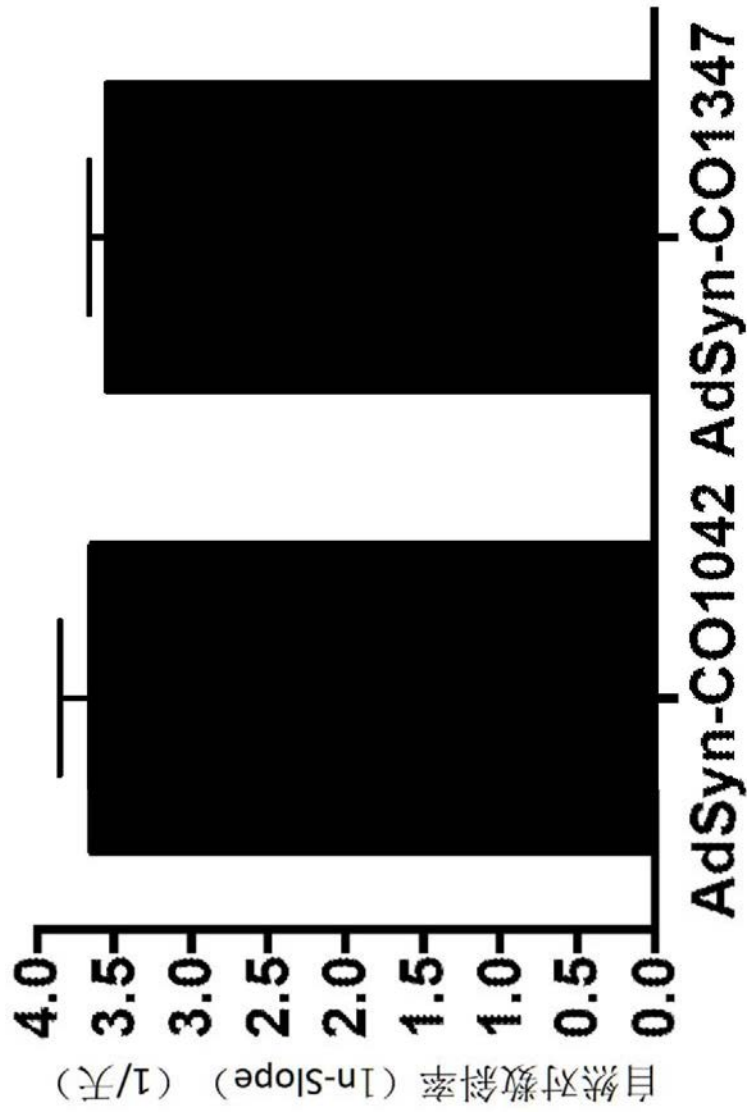


图13