(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109475613 B
(45)授权公告日 2024.02.20

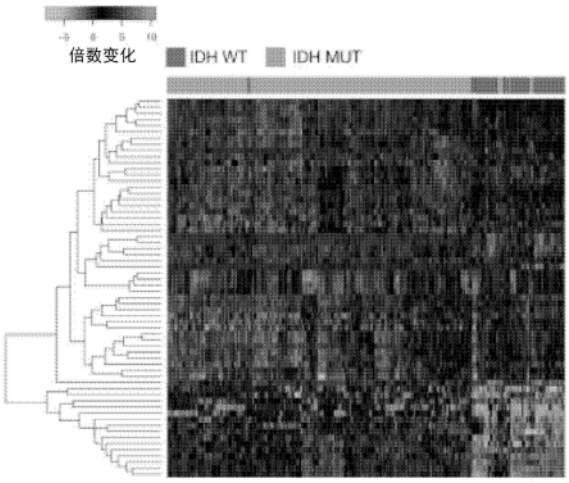
(21)申请号 201780036512.5
(22)申请日 2017.06.14
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109475613 A
(43)申请公布日 2019.03.15
(30)优先权数据
62/350,095 2016.06.14 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.12.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/037531 2017.06.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/218689 EN 2017.12.21
(73)专利权人 匹兹堡大学-属高等教育联邦体系
地址 美国宾夕法尼亚州
(72)发明人 宝拉·格兰迪
尼杜卡库·梅格贝钦耶尔·阿曼库乐
约瑟夫·C·格洛廖索三世
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 高丽娜 张莹
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
C12N 7/04(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
US 2013156808 A1,2013.06.20
WO 2015066042 A1,2015.05.07
左伋等.病毒载体.《21世纪复旦大学研究生教学用书遗传医学进展》.复旦大学出版社,2014,
审查员 牛育苗
权利要求书2页 说明书16页
序列表1页 附图29页

(54)发明名称

使癌细胞对胞毒免疫细胞攻击敏感的NKG2D活化配体蛋白表达

(57)摘要

本发明提供了表达NKG2D活化配体如UL-16结合蛋白的重组病毒载体。当导入癌细胞中时,所述载体可以引起NKG2D活化配体的表达,从而克服NK介导的(或其他效应细胞,例如巨噬细胞)细胞毒性的抑制并导致效应细胞介导的癌细胞的死亡。NKG2D活化配体的表达可以通过在非癌细胞中以比癌细胞中更高浓度存在的miRNA来控制,这可以允许配体在癌细胞中选择性表达并且降低对非癌细胞的细胞毒性。所述载体可以引起溶瘤因子的表达。当配制成药物组合物并给予患者时,所述载体可用于治疗癌症。癌症可以是神经胶质瘤,如胶质母细胞瘤,包括具有异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变的胶质母细胞瘤。所述载体可以是单纯疱疹病毒载体等。



CN 109475613 B

1.包含外源基因的重组病毒载体,所述外源基因表达至少一种NKG2D配体蛋白,

其中所述载体包含一个或多个miRNA靶序列,其中所述miRNA以比在癌细胞中更高的浓度存在在非癌细胞中,

其中相对于在所述癌细胞中的表达,所述NKG2D配体蛋白的表达在非癌细胞中下调,并且

其中所述载体选自由腺病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒载体组成的病毒载体的组。

2.权利要求1的载体,其中,所述NKG2D配体蛋白的表达使所述癌细胞对NK介导的细胞毒性敏感。

3.权利要求1的载体,其中,所述NKG2D配体蛋白是UL16结合蛋白。

4.权利要求3的载体,其中,所述NKG2D配体蛋白是选自由UL16结合蛋白1、UL16结合蛋白2、UL16结合蛋白3、UL16结合蛋白4、UL16结合蛋白5和UL16结合蛋白6组成的UL16结合蛋白的组的一个或多个UL16结合蛋白。

5.权利要求3的载体,其中,所述NKG2D配体蛋白具有UL16结合蛋白1、UL16结合蛋白2、UL16结合蛋白3、UL16结合蛋白4、UL16结合蛋白5或UL16结合蛋白6的氨基酸序列。

6.权利要求1的载体,其中,当所述载体被引入所述癌细胞时,所述载体表达UL16结合蛋白1、UL16结合蛋白3、或UL16结合蛋白1和UL16结合蛋白3两者。

7.上述权利要求中任一项的载体,其中,所述一个或多个miRNA靶序列插入到所述载体的必需病毒基因中。

8.权利要求7的载体,其中,所述载体是HSV载体并且所述必需病毒基因选自ICP0、ICP4、ICP22、ICP27和ICP47。

9.权利要求8的载体,其中,所述必需病毒基因是ICP4。

10.权利要求1的载体,其中,所述载体包含2、3、4、5或6个miRNA靶序列,所述靶序列任选地串联,并且任选地由四个或更多个核苷酸的间隔区隔开。

11.权利要求1的载体,其中,所述一个或多个miRNA靶序列包含所述miRNA的反向互补序列。

12.权利要求1的载体,其中,所述miRNA包括mir122、mir124、mir128、mir137和/或mir199。

13.权利要求1的载体,其中,所述一个或多个miRNA靶序列插入到表达所述NKG2D配体蛋白的所述外源基因的3'UTR中。

14.权利要求1的载体,进一步包括削弱或阻断所述载体复制和/或毒性基因表达的一个或多个基因敲除、敲低、缺失、插入或者其他突变。

15.权利要求14的载体,其是HSV载体,并且其中所述一个或多个基因敲除、敲低、缺失、插入或其他突变是在ICP0、ICP4、ICP22、ICP27和ICP47中的一个或多个中。

16.权利要求15的载体,其中所述一个或多个基因敲除、敲低、缺失、插入或其他突变是在全部ICP0、ICP4、ICP22、ICP27和ICP47中。

17.权利要求14至16中任一项的载体,其中,所述载体在体内是不能复制的。

18.权利要求1的载体,其中,所述癌细胞是IDHmut细胞。

19.权利要求1的载体,其中,所述癌细胞是胶质母细胞瘤细胞。

20.权利要求1的载体,其中,所述载体是溶瘤性的。

21.权利要求20的载体,其中,所述载体还包含编码溶瘤因子的外源基因。

22.权利要求21的载体,其中,所述溶瘤因子是金属蛋白酶、前药转化酶、胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或嘌呤核苷磷酸化酶之一。

23.权利要求1的载体,其包含编码基质金属蛋白酶9的转基因。

24.权利要求1的载体,其包含编码针对PD-L1的抗体的转基因。

25.权利要求1的载体,其包含转基因,该转基因编码UL16结合蛋白1和/或UL16结合蛋白3中的一个或两者、MMP9、和任选的针对PD-L1的抗体。

26.权利要求1的载体,其中,编码UL16结合蛋白1和/或UL16结合蛋白3中的一个或两者的外源基因处于miRNA的控制下。

27.权利要求26的载体,其中,所述miRNA是mir124。

28.编码上述权利要求中任一项的载体的核酸。

29.权利要求28的核酸,其中,所述核酸为细菌人工染色体。

30.药物组合物,其包含权利要求1-27中任一项的载体和药学上可接受的载剂。

31.病毒原液,其包含权利要求1-27中任一项的载体。

32.在癌细胞中表达NKG2D配体蛋白的体外方法,该方法包括施用权利要求1-27的载体、权利要求30的药物组合物或权利要求31的病毒原液,条件是足以使所述载体感染所述癌细胞并表达所述NKG2D配体蛋白。

33.权利要求32的方法,其中,所述癌细胞是胶质母细胞瘤细胞。

34.有效量的权利要求1-27的载体、权利要求30的药物组合物或权利要求31的病毒原液在制备用于治疗哺乳动物受试者中神经胶质瘤的药物中的用途。

35.权利要求34的用途,其中所述神经胶质瘤是对效应免疫细胞的NKG2D依赖性细胞溶解敏感的。

36.权利要求34或35的用途,该用途包括将所述载体、所述药物组合物或所述病毒原液直接施用于肿瘤。

37.权利要求36的用途,其中,所述施用是通过颅内注射。

38.权利要求34或35的用途,其中,所述受试者是人。

使癌细胞对胞毒免疫细胞攻击敏感的NKG2D活化配体蛋白表达

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国临时专利申请62/350,095的优先权,其整体内容通过引用并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助研究和开发的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院授予的基金号AI175052和CA163205的政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

[0005] 以电子方式提交的通过引用并入的材料

[0006] 与本文一起提交并且通过引用整体并入本文的是计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表,标识如下:2017年6月14日创建的名为“728947_ST25.TXT”的一个3,118字节的ASCII(文本)文件。

背景技术

[0007] 甲基化相关的表观遗传抑制(epigenetic repression)与人类恶性肿瘤的发展相关。特别地,天然杀伤(NK)细胞配体的表观遗传抑制是一种与癌症发展共同进化的常见事件。用于克服NK细胞配体抑制的新技术可用于治疗癌症。

[0008] 国际PCT公开号WO 2015/066042(通过引用整体并入本文)公开了重组溶瘤单纯疱疹病毒(oHSV),其表达插入HSV复制基因座中的对细胞表面分子特异性的转基因配体和一个或多个拷贝的微RNA靶序列。溶瘤HSV和使用方法的综述在Varghese和Rabkin,Cancer Gene Therapy(2002)9,967-978中得以公开,其也通过引用并入本文。

发明内容

[0009] 本发明是基于以下发现:在异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变体(IDH^{Mut})神经胶质瘤中NKG2D活化配体(NKG2DL)的转录抑制,例如与IDH^{Mut}细胞对自然杀伤(NK)细胞介导的体外和离体细胞溶解的易感性与IDH野生型(WT,IDH^{WT})细胞相比降低有关。本发明提供了表达人NKG2D配体(如UL16结合蛋白(ULBP)(例如,ULBP1-ULBP6,特别是ULBP1和ULBP3))的基于HSV的载体,在一些实施方案中,其能增强NK和T细胞对癌症细胞的识别。病毒介导的ULBP表达可导致通过NKG2D受体(NKG2DR)识别ULBP的NK细胞和/或T细胞的活化,并随后破坏靶肿瘤细胞。该策略代表了用于癌症治疗的载体介导的基因疗法的新方法。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供了一种包含一种或多种外源基因(例如转基因)的重组病毒载体,当所述载体被引入癌细胞时,所述外源基因表达至少一种NKG2D活化配体蛋白。所述载体可以是,例如,腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒、或单纯疱疹病毒(HSV)载体。配体蛋白的表达可使癌细胞对效应细胞介导的细胞毒性(例如,NK细胞介导的细胞毒性)敏感化。所述NKG2D配体蛋白可以是UL16结合蛋白(ULBP),如ULBP1-ULBP6、MIC-A或MIB-B中的任一种。在具体的实施方案中,ULBP是ULBP1和ULBP3中的一个或两者,以致当所述载体被引入癌细胞时,本发明的载体表达ULPB1、ULBP3、或者ULBP1和ULBP3两者。

[0011] 在一些实施方案中,NKG2D配体的表达受细胞生物分子的调节控制。在一些实施方案中,细胞生物分子在非癌性细胞中比在癌细胞中的浓度更大,以致相对于在癌细胞中的表达,NKG2D配体在非癌细胞中的表达被下调。在一些实施方案中,细胞生物分子是微RNA(miRNA或miR)。在一些实施方案中,miR是miR122、miR124、miR128、miR137和/或miR199中的一个或多个。在一些实施方案中,本文所述的载体包含插入到一个或多个病毒基因和/或一个或多个外源基因中的一个或miRNA靶序列。在一些实施方案中,所述载体包括插入到一个或多个外源基因中的2、3、4、5、6或更多个靶序列。在一些实施方案中,miR靶序列是串联的。在一些实施方案中,miR靶序列被四个或更多个核苷酸的间隔区隔开。所述一个或多个miRNA靶序列可以是miRNA的反向互补序列(reverse complement)。在一些实施方案中,一个或多个miRNA靶序列被插入到表达NKG2D配体的一个或多个病毒基因和/或外源基因的3'非翻译区(UTR)。

[0012] 在一些实施方案中,载体可包含削弱或阻断载体复制和/或毒性基因表达的一个或多个基因敲除、敲低、缺失、插入或者其他突变。例如,在一个非限制性的说明性实施方案中,HSV载体可以包括在ICP0、ICP4、ICP22、ICP27和/或ICP47基因中的一个或多个基因中的一个或多个基因敲除、敲低、缺失、插入或其它突变。在进一步的实施方案中,HSV载体可以包括在所有ICP0、ICP4、ICP22、ICP27和ICP47基因中的一个或多个基因敲除、敲低、缺失、插入或其它突变。在一些实施方案中,载体是不能复制的(replication incompetent)(即,在非互补细胞和/或体内不复制)。

[0013] 在一些实施方案中,本文所述的重组病毒载体被引入到细胞中。在一些实施方案中,所述细胞可以是对效应免疫细胞的NKG2D依赖性细胞溶解敏感的任何癌细胞,包括IDH^{Mut}和IDH^{WT}癌细胞。

[0014] 在一些实施方案中,所述载体包括编码至少一个NKG2D活化配体蛋白的第一外源基因和编码溶瘤因子的第二外源基因。溶瘤因子的非限制性实例包括酶(例如蛋白酶)、细胞因子、趋化因子、抗体、或其它生物活性多肽。在一些特定实施方案中,溶瘤因子是酶,如金属蛋白酶(例如基质金属蛋白酶-9(MMP-9))、前药转化酶、胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶、嘌呤核苷磷酸化酶、或选自表1中列出的那些的酶。

[0015] 在一个实施方案中,本发明提供了编码本文所述任意载体的核酸。在一些实施方案中,所述核酸可以是细菌人工染色体(BAC)。在一些实施方案中,本发明提供了本文所述任意载体的病毒原液(viral stock)。在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述任何载体的药物组合物。在进一步的实施方案中,所述药物组合物包含药学上可接受的载剂(carrier)。

[0016] 在一些实施方案中,本发明提供了在癌细胞中表达NKG2D配体蛋白的方法,所述方法包括将任何本文所述的载体、药物组合物或病毒原液引入癌细胞,条件是足以使所述载体感染癌细胞并表达NKG2D配体蛋白。在一些实施方案中,细胞可以源自患有癌症的受试者(例如,原代细胞样品,例如活组织检查)。在一些实施方案中,癌细胞可以是但不限于神经胶质瘤细胞,如多形性胶质母细胞瘤(GBM)细胞。在此类实施方案中,NKG2D配体蛋白的表达增强了癌细胞(例如,胶质母细胞瘤细胞)对NK介导的细胞毒性的易感性。

[0017] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗有此需要的哺乳动物受试者的癌症的方法,包括向受试者施用本文所述的任何载体、药物组合物或病毒原液,从而治疗癌症。在一

些实施方案中,所述载体、药物组合物或原液可以直接施用于肿瘤,例如通过瘤内注射,颅内注射(适合于肿瘤类型)或全身施用。

附图说明

[0018] 图1表明NKG2D配体在IDH^{Mut}神经胶质瘤中差异性地表达。RNAseq分析:使用从来自286个个体弥漫性神经胶质瘤样本的TCGA数据库中可公开获得的RNASeq的数据,在IDH^{Mut}和IDH^{WT}弥漫性胶质瘤中比较1639个免疫相关基因(Gene Ontology Category 0050776)。图1A:62个差异表达基因的无监督分级聚类(unsupervised hierarchical clustering),其中p值$<1e^{-7}$且基因表达的绝对差异大于3。使用Pearson相关性作为距离量度,通过它们的表达值对标志物进行聚类。图1B:来自与图1A中描述的相同群组的其他已知NKG2D配体的基因表达分析。与IDH^{WT}相比,ULHP1和ULBP3在IDH^{Mut}中的表达明显更低。图1C:来自TCGA低级别神经胶质瘤数据库的152名低级别神经胶质瘤患者(130IDH^{Mut},32IDH^{WT})的平均甲基化值。(*=p<0.05;***=p<0.001)

[0019] 图2显示了IDH^{Mut}神经胶质瘤中ULBP1、ULBP2和ULBP3的表达降低。图2A:RT-PCR表达值比较在IDH^{Mut}或IDH^{WT}永生化人星形胶质细胞系中NKG2DL的表达。显示的数据代表相对于18s RNA的表达水平。显示的结果代表3次独立实验。图2B:对来自患者的IDH^{Mut}或IDH^{WT}原发性神经胶质瘤干细胞样细胞进行针对NKGD2L的实时PCR表达。每个数据点代表源自个体患者肿瘤的原发性神经胶质瘤细胞。显示的数据代表相对于18s RNA的表达水平。对于图2A和2B,所有样品重复三次测试,误差条显示重复测试之间的标准偏差。(*=p<0.05;***=p<0.001)

[0020] 图3表明$IDH1^{Mut}$神经胶质瘤细胞对NK介导的细胞毒性具有抗性。在星形胶质细胞或源自患者的GSC中使用基于7-AAD的流式细胞术测量NK细胞介导的细胞毒性。测量上清液中的IFN-γ分泌作为NK细胞活化的相关指标。图3A:在三种不同的效应物靶标比率(1:5、1:10和1:20)下测量的IDH^{Mut}和亲本星形胶质细胞(PA)的NK介导的特异性裂解。使用配对student t检验测量IDH^{Mut}星形胶质细胞(灰线,正方形)和PA星形胶质细胞(黑线,圆圈)的特异性裂解的统计学差异。图3B:由NK-92细胞效应细胞引起的源自患者的IDH^{Mut}(黑色圆圈)或IDH^{WT}(黑色正方形)GSC源的特异性裂解。图3C和3D:通过ELISA测量的分别在图3A和3B的实验的上清液中IFN-γ的详细描述。通过配对student t检验确定IFN-γ浓度的差异。(*=p<0.05;**=p<0.01;****=p<0.001)。

[0021] 图4表明星形胶质细胞中NK介导的杀伤是NKG2D依赖性的。图4A:在存在或不存在NKG2D阻断抗体的情况下进行供体来源NK介导的IDH^{Mut}或IDH^{WT}星形胶质细胞的细胞裂解。通过7-AAD流式细胞术测定特异性裂解。在存在NKG2D阻断抗体的情况下,IDH^{WT}星形胶质细胞的NK裂解显著降低(10.2%对3.03%,p=0.04),但同种型对照抗体未发现差异。IDH^{Mut}星形胶质细胞表现出低水平的NK介导的特异性裂解(<2%),并且在NKG2D阻断上没有观察到统计学上显著的变化。图4B:提取来自图4A实验中的无细胞上清液用于通过ELISA评估IFN-γ水平。所示数据代表3次独立实验。误差条表示每个样本之间的SD。(*=p<0.05,**=p<0.01,**=p<0.001)。

[0022] 图5显示转导的原代人星形胶质细胞中NKG2DL的表达。对用IDH^{WT}(WT)或IDH^{Mut}(Mut)稳定转导的原代星形胶质细胞进行RT-qPCR分析。与IDH^{WT}相比,IDH^{Mut}中的ULBP显著降

低。

[0023] 图6表明地西他滨(decitabine,DNA甲基转移酶抑制剂)治疗恢复ULBP3表达。将IDH^{Mut}星形胶质细胞(Mut)用地西他滨(100nM或200nM)、载体(DMSO)处理或不处理(un)5、7或13天,并通过RT-qPCR定量ULBP3表达。用地西他滨(200nM)处理7天的IDH^{Mut}星形胶质细胞显示出与IDH^{WT}(WT)星形胶质细胞相当的ULBP3表达,这表明IDH突变诱导NK配体的高甲基化。

[0024] 图7A显示HSV缺陷型载体JΔNI7的示意图。删除或修饰(黑框)ICP0、ICP4、ICP22、ICP27和ICP47基因以阻断病毒复制和毒性即刻早期(immediate-early,IE)基因的表达。糖蛋白B(gB)被突变以提高感染效率(Uchida等,J.Virol.84(23),12200-09(2010),其通过引用整体并入本文)。插入使用泛素C启动子(UbCp)的mCherry表达盒以监测载体转录活性。JΔNI7-GFP在LAT基因座内具有CAG启动子驱动的EGFP盒,而JΔNI7-ULBP3具有CAG启动子驱动的ULBP3盒。

[0025] 图7B表明用JΔNI7-FlagULBP3感染的星形胶质细胞和U2OS细胞表达带标签的ULBP3蛋白。

[0026] 图8表明用JΔNI7-FlagULBP3感染的U2OS细胞表达带标签的蛋白质,其在质膜处如预期的那样定位。用MOI为5的JΔNI7-ULBP3载体感染U2OS细胞,成像时间为感染后48小时(h.p.i.)。

[0027] 图9表明通过JΔNI7在IDH^{Mut}细胞中表达的ULBP3诱导NK细胞活化和改善动物存活。将IDH^{WT}星形胶质细胞(图9A)和IDH^{Mut}星形胶质细胞(图9B)用MOI为10的JΔNI7-EGFP(对照载体)或JΔNI7-ULBP3感染5天,并用NK细胞(10:1)覆盖48小时。通过台盼蓝测量细胞杀伤。(图9C)Kaplan-Meier存活率图。将氚化的原代神经胶质瘤细胞系GBM30细胞颅内植入,并在7天后在相同的坐标处注射PBS或JΔNI7-ULBP3病毒(在2.5μl中的2×10^9个基因组拷贝)。中位存活:PBS=18.5d,ULBP3=24.5d。

[0028] 图10A和图10B分别显示通过miR124对ULBP1和ULBP3的缺失。miR124抑制ULBP1和ULBP3表达,这表明该方法可以用于阻断正常神经元中的蛋白表达。

[0029] 图11显示用于将ULBP3递送至宿主细胞的重组HSV的载体图。

[0030] 图12A和图12B显示过表达ULBP和ULBPmir124RE(RE=应答元件)的溶瘤HSV载体的载体图。这里的"USBP"指的是任何ULBP,如ULBP1、ULBP3等。通过重组产生溶瘤载体,利用ULBP表达盒替换2A5BGw(2A5B=gD wt;gB-NT=gB中病毒进入增强双突变;gC-EGFP=通过T2A序列将完整gC ORF与EGFP融合;Δjoint=删除包括一个ICP4拷贝的完整内部重复区域;ICP4:mir124=插入到剩余ICP4基因的3′UTR中的T124)中的通道盒(gateway cassette),或14Gw(其中gD被改造为通过人EGFR或EGFRvIII感染并且具有与2A5B中列出的相同修饰)中的通道盒。

[0031] 图13A显示了使用以下引物的mir124RE序列重组的PCR验证:UL4f&pENTRcagULBPsf(PCR#1)。图13B显示使用引物gDF和gDR2的gD/向性(Tropism)的PCR验证(PCR#2)。泳道代表在U2OS中转染的BAC-DNA:

[0032] • 2A5B ULBP1,克隆#2

[0033] • 2A5B ULBP1 mir 124RE克隆#2(图12B)

[0034] • 2A5B ULBP3克隆#1

[0035] • 2A5B ULBP3 mir124RE克隆#2(图12B)

[0036] • 14 ULBP1克隆#1

[0037] • 14 ULBP1 mir124RE克隆#1(图12A)

[0038] • 14 ULBP3克隆#3

[0039] • 14 ULBP3 mir124RE克隆#8(图12A)

[0040] 2A5B ULBP1和2A5B ULBP3构建体如图12B中所示,其中没有ICP4-miR123RE修饰,14ULBP1和14ULBP3构建体如图12B所示,其中没有ICP4-miR123RE修饰。

[0041] 图14-17描述了关于本发明的向性载体的数据。用KMMP9、KGW或携带WT gD的亲本病毒KG4:T124感染J/A、J/C和J/EGFR细胞6小时,并用ICP4的抗体进行免疫染色以检测病毒进入。通过感染表达人EGFR受体(J-EGFR)或者HSV天然受体HveA和Hve C(J/A和J/C细胞)的细胞,确认EGFR重新靶向的14-ULBP构建体通过人EGFR的进入,另一方面,非重新靶向载体(2A5B骨架)仅可注射J/A或J/C细胞(转导用于表达gD的天然受体)。

[0042] 图18显示通过miR124对带Flag标签的ULBP1表达的下调。使用≅100pmol(5μl,来自原液20μM),用miR124或加扰对照(scramble control)转染293T细胞。24小时后,用溶瘤载体2A5BULBP1mir124RE(参见图12B中的构建体)或用MOI为0.1的缺陷型病毒J7ULBP1mir124感染细胞。24h.p.i.收集细胞用于WB(总共100μL/样品-加载2μL)。

[0043] 图19描述了通过miR124的ULBP1下调。使用≅100pmol(5μL,来自原液20μM),用miR124或加扰对照(J7ULBP3mir124)转染293T细胞。24小时后,用溶瘤载体2A5BULBP3mir124RE(参见图12B中的构建体)或用MOI为0.1的缺陷型病毒J7ULBP3mir124感染细胞。24h.p.i.收集细胞用于WB(总共100μL/样品-加载2μL)。

[0044] 图20描述了表明ULBP3改善2A5B的治疗功效的实验的实验设计。图20中描绘的时间线表示天,如图所示,每四天注射Asialo GM1 Ab或同种型对照。

[0045] 图21图示了表明在NK细胞存在(左图)和NK细胞耗尽(右图)的情况下ULBP3改善2A5B的治疗功效的数据。

[0046] 图22A显示了比较溶瘤HSV载体2A5B ULBP3(右图)与骨架载体(2A5B)(中图)以及假(PBS)处理动物(左列)的肿瘤抑制能力的数据,各自在不存在NK细胞的情况下。

[0047] 图22B显示了比较溶瘤HSV载体2A5B ULBP3(右图)与骨架载体(2A5B)(中图)以及假(PBS)处理动物(左列)的肿瘤抑制能力的数据,各自在存在NK细胞的情况下。

具体实施方式

[0048] 本发明提供了一种重组病毒载体,其具有一个或多个外源基因(即,载体中通常或天然不存在的基因),所述外源基因编码并导致在病毒载体感染的宿主细胞中表达NKG2D活化配体。在用所述病毒载体感染细胞后NKG2D活化配体得以表达。术语“载体”在本文中用于指能够转移或转运另一种核酸分子的核酸分子。被转移的核酸通常与载体核酸分子连接,例如插入载体核酸分子中。载体可以包括指导细胞中自主复制的序列,或者可以包括足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。病毒载体有时可称为“重组病毒”或“病毒”。术语“溶瘤病毒”和“溶瘤载体”在本文中可互换使用。在一些实施方案中,本发明提供重组溶瘤病毒,其是指已被修饰成或天然优先感染癌细胞的病毒。本领域已知的溶瘤病毒的实例包括但不限于单纯疱疹病毒、腺病毒、脊髓灰质炎病毒、牛痘病毒、麻疹病毒、水泡性口炎病毒、正粘

病毒、细小病毒、马拉巴(maraba)病毒或柯萨奇病毒。

[0049] 可以使用具有复制能力和无复制能力的载体。国际PCT公开号WO 2015/066042(其全部内容通过引用并入)中描述的一般方法可以应用于改造HSV载体,包括敲除和/或调节HSV复制基因。

[0050] 可以通过一种或多种必需病毒基因的缺失、突变或其他改变(例如插入)产生无复制能力的载体。如本文所用,“必需病毒基因”是指病毒复制所需的病毒基因。复制各种病毒所需的基因是本领域已知的。在本发明的一些实施方案中,所述载体是HSV载体,并且在ICP0、ICP4、ICP22、ICP27和ICP47基因座中的一个或多个中包含一个或多个缺失、突变或其他改变(例如插入)。在一些实施方案中,所述病毒载体在所有ICP0、ICP4、ICP22、ICP27和ICP47基因座中包含缺失、突变或其他改变(例如插入)。在某些实施方案中,本文所述的HSV载体含有一个或多个内部重复(连接)区的缺失,所述区包含每个二倍体基因ICP0、ICP34.5、LAT和ICP4中的一个拷贝以及ICP47基因的启动子。在一些实施方案中,代替删除连接,可以通过缺失或其他方式失活这些基因使连接区域中的基因(特别是ICP0和/或ICP47)的表达沉默。

[0051] 在一些实施方案中,本发明的病毒载体包含一种或多种外源基因。术语“外源基因”是指在载体中通常或天然不存在的基因(例如转基因)。通常,外源基因在用病毒载体感染细胞后由细胞表达。在一些实施方案中,外源基因编码NKG2D配体。在一些实施方案中,NKG2D配体是NKG2D活化配体,如UL-16结合蛋白(ULBP),包括ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5或ULBP6。在一些实施方案中,NKG2D活化配体是MHC I类相关链A(MicA)或MHC I类相关链B(MicB)蛋白。不希望受理论束缚,据信当被引入癌细胞时,所述载体引起NKG2D活化配体的表达,从而促进效应细胞介导的癌细胞死亡。

[0052] 在一些实施方案中,本文所述的病毒载体包含编码NKG2D配体的第一外源基因和编码溶瘤因子的第二外源基因。如本文所用,术语“溶瘤因子”是指增强本文所述载体的肿瘤溶解能力的任何蛋白质或核酸。虽然单独的NKG2D配体可以募集/激活效应细胞以溶解肿瘤细胞,但另外的溶瘤因子的表达可以增强本文所述载体的治疗功效。示例性溶瘤因子包括蛋白酶,如金属蛋白酶(例如,作为非限制性实例的基质金属蛋白酶(MMP)-9(MMP9))、前药转化酶、胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或嘌呤核苷磷酸化酶。表1呈现了合适的细胞外基质(ECM)酶(MMP,ADAMTS和透明质酸酶)及其各自的靶标,其适合作为溶瘤因子包含在本发明的载体中。

[0053] 载体还可以导致宿主细胞表达溶瘤因子。当配制成药物组合物并给予患者时,所述载体可用于治疗癌症。癌症可以是胶质母细胞瘤,包括具有异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变(IDH^{Mut})的胶质母细胞瘤。示例性胶质母细胞瘤是多形性胶质母细胞瘤(GBM)。

[0054] 出于本公开的目的,单纯疱疹病毒(HSV)载体及其在治疗包括IDH^{Mut}胶质母细胞瘤在内的胶质母细胞瘤中的用途一起举例说明。尽管如此,还预期其他细胞靶标和其他病毒载体用于表达NKG2D配体,包括腺病毒、逆转录病毒和腺相关病毒载体,如本领域所熟知的。这些载体可以使用本领域普通技术人员已知的方法构建。

[0055] 如下所述,已发现相对于IDH野生型(WT,IDH^{WT})神经胶质瘤,IDH^{Mut}(具有异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变的那些)中的ULBP1和ULBP3显著下调(以较低量表达)。因此,通过病毒载体在癌细胞中表达ULBP1和ULBP3中的一种或两种可能是有利的。在各种实施方案中,来自

WTULBP序列的一些变化是可接受的(即,仍然导致对NK细胞敏感)。例如,ULBP蛋白可与ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5或ULBP6中任何一种的成熟ULBP蛋白具有70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％的序列同一性。序列同一性可以例如通过手工比对或使用Needleman-Wunsch方法确定。还考虑了编码所述载体的核酸,包括保留载体功能或由于遗传密码的简并性导致的序列变异。

[0056] 因为载体可以感染癌细胞和非癌细胞,在一些实施方案中,一种或多种外源基因(例如,NKG2D活化配体和/或ECM蛋白酶)的表达受细胞生物分子(例如,小分子、大分子或复合物)的控制。在某些实施方案中,细胞生物分子调节包含在病毒载体内的一种或多种外源基因(如NKG2D配体或ECM蛋白酶)的表达。如本文所用,细胞生物分子是由细胞内源表达的分子,其能够结合包含在载体内的一种或多种核酸序列,从而调节由载体编码的一种或多种基因的表达。细胞生物分子可以是小分子(例如,激素)、蛋白质、核酸或大分子。在某些实施方案中,细胞生物分子调节包含在病毒载体内的一种或多种外源基因(如NKG2D配体或ECM蛋白酶)的表达。在一些实施方案中,细胞生物分子是微RNA(miRNA或miR),如miR122、miR124、miR128、miR137和/或miR199。

[0057] 细胞生物分子可负向调节(例如,细胞生物分子的表达降低一种或多种基因的表达)由载体编码的一种或多种基因的表达。例如,在一些实施方案中,包含在病毒载体中的一种或多种基因(例如,外源基因和/或必需基因)的表达受细胞生物分子的控制,所述细胞生物分子在非癌细胞中以比在癌细胞中更高的浓度存在。在此类实施方案中,细胞生物分子在非癌细胞中的增加的表达可以降低非癌细胞中外源基因和/或必需基因的表达,同时允许外源基因和/或必需基因在癌细胞中的表达。在此类实施方案中,细胞生物分子的差异表达导致对非癌细胞的细胞毒性(例如,NK细胞介导的细胞毒性)降低。

[0058] 细胞生物分子可以是在非癌细胞中比在癌细胞中浓度更高的细胞生物分子。通过将基因置于生物分子的负调控下,相对于可能被载体感染的非癌细胞,NKG2D活化配体将优先在癌细胞中表达。不希望受理论束缚,这可以降低对非癌细胞的细胞毒性,从而提高安全性或允许增加剂量以增加功效(即,提高治疗窗口)。相对NK募集可以根据使用本文附图所示的测定以及如本领域普通技术人员已知的其它方式来测量。生物分子可以通过与NKG2D活化配体基因可操作连接的启动子、控制NKG2D活化配体干扰RNA翻译的调节元件、诱导NKG2D活化配体mRNA降解的元件、或本领域已知的其他调节方案起作用。替代地,或另外地,相应的正调控(positive control)方案可用于相对于非癌细胞在癌细胞中以更高浓度出现的细胞生物分子。相对NK募集可以根据使用本文附图所示的测定以及如本领域普通技术人员已知的其它方式来测量。

[0059] 在一些实施方案中,细胞生物分子正向调节(例如,细胞生物分子的存在提高一种或多种基因的表达)一种或多种基因的表达。例如,在一些实施方案中,包含在病毒载体中的一种或多种基因(例如,外源基因和/或必需基因)的表达受细胞生物分子的控制,所述细胞生物分子在癌细胞中比在非癌细胞中以更高浓度存在。在此类实施方案中,癌细胞中细胞生物分子的增加的表达可提高外源基因和/或必需基因在癌细胞中的表达,同时防止外源基因和/或必需基因在非癌细胞中的表达。在此类实施方案中,细胞生物分子的差异表达导致对非癌细胞的细胞毒性(例如,NK细胞介导的细胞毒性)降低。生物分子可以通过与NKG2D活化配体基因可操作连接的启动子、用于控制NKG2D活化配体干扰RNA翻译的调节元

件、诱导NKG2D活化配体mRNA降解的元件、或本领域已知的其他调节方案起作用。

[0060] 在一些实施方案中,细胞生物分子是微RNA(miRNA或miR),并且miRNA控制多核苷酸(control polynucleotide)包含在载体中。miRNA控制多核苷酸包含一个或多个miRNA靶序列或应答元件(RE),其包含miRNA的反向互补序列。在一些实施方案中,miRNA可以是mir122、mir124、mir128、mir137或mir199。多个控制多核苷酸(例如,miRNA靶序列)可以包括在病毒载体内包含的一个或多个基因中,也可以用于识别一种以上的miRNA。例如,如下所示,miRNA可以是mir124,癌细胞可以是胶质母细胞瘤细胞。已知mir124在正常(例如,非癌)细胞中比在至少一些胶质母细胞瘤细胞中表达的量高得多(即,与非癌细胞相比,高10%,高20%,高30%,高40%,高50%,高60%,高70%,高80%,高90%,高95%,高99%或高100%)。

[0061] 一些实施方案中,miRNA控制多核苷酸可包含一种或多种miRNA靶序列。例如,miRNA控制多核苷酸可包含1、2、4、5、6或更多个miRNA靶序列。在一些实施方案中,所述序列可以串联插入并且可以被四个或更多个核苷酸的间隔区间隔开。这些应答元件和使用方法在国际PCT公开号WO 2015/066042中公开,其通过引用并入本文。

[0062] 表1:示例性ECM酶

[0063]

ECM 酶	ECM 靶标	其它靶标
MMP1*	胶原蛋白 I、II、III、VII 和 X;明胶;聚集蛋白聚糖(aggrecan);内功素(entactin);生腱蛋白(tenascin);基底膜蛋白多糖(perlecan)	IGFBP-2, -3, -5;pro-IL-1b;CTGF;NMP-2,-9
MMP2***	明胶;胶原蛋白 IV、V、VII、X 和 XI;纤连蛋白;层粘连蛋白;弹性蛋白;聚集蛋白聚糖	Pro-TGF-b;FGF 受体 I;MCP-3;IGFBP-5;pro-IL-1b;半乳凝素-3;纤溶酶原(plasminogen)

[0064]

MMP-3*	聚集蛋白聚糖；核心蛋白多糖(decorin)；明胶；纤连蛋白；层粘连蛋白；胶原蛋白 III、IV、IX 和 X；生腱蛋白；基底膜蛋白多糖	IGFBP-3；pro-IL-1b；HB-EGF；pro-TGF-b；CTGF；E-钙黏着蛋白(cadherin)；纤溶酶原；μPA；pro-MMP-1，-7，-8，-9，-1
MMP-7**	聚集蛋白聚糖；明胶；纤连蛋白；层粘连蛋白；弹性蛋白；内功素；胶原蛋白 IV；生腱蛋白；核心蛋白多糖	b4 整合素(integrin)；E-钙黏着蛋白；pro-TNFa；CTGF；HB-EGF；RANKL；IGFBP-3；纤溶酶原，MMP-1，-2，-9
MMP-8*	胶原蛋白 I、II 和 III；明胶；聚集蛋白聚糖；	
MMP9***	明胶；胶原蛋白 III、IV 和 V；聚集蛋白聚糖；弹性蛋白；内功素；玻连蛋白(vitronectin)；胶原蛋白的 N-端肽	pro-TNF-b；IL-2 受体 a；Kit-L；IGFBP-3；pro-IL-1b；ICAM-1；半乳凝素-3；纤溶酶原
MMP-10*	聚集蛋白聚糖；纤连蛋白；层粘连蛋白；胶原蛋白 III、IV 和 V；	Pro-MMP-1，-8，-10
MMP-11*	纤连蛋白；层粘连蛋白；聚集蛋白聚糖；明胶	IGFBP-1
MMP-12*	弹性蛋白；聚集蛋白聚糖；纤连蛋白；骨结合素(osteonectin)；层粘连蛋白；巢蛋白(nidogen)	纤溶酶原
MMP-13*	胶原蛋白 I、II、III、IV、IX、X 和 XIV；聚集蛋白聚糖；纤连蛋白；生腱蛋白；SPARC/骨结合素；层粘连蛋白；基底	CTGF；pro-TGF-b；MCP-3

[0065]

	膜蛋白多糖	
MMP-14****	胶原蛋白 I、II 和 III；明胶；聚集蛋白聚糖；纤连蛋白；层粘连蛋白；纤维蛋白；	pro-MMP-2；pro-MMP-13；CD44；MCP-3；组织转谷氨酰胺酶
MMP15****	纤连蛋白；层粘连蛋白；生腱蛋白；巢蛋白；聚集蛋白聚糖；基底膜蛋白多糖	Pro-MMP-2；组织型转谷氨酰胺酶
MMP16****	胶原蛋白 III；纤连蛋白；明胶	Pro-MMP-2；组织型转谷氨酰胺酶
MMP17****	明胶；纤连蛋白	
MMP-21*	未知	
MMP24****	纤维蛋白，明胶	Pro-MMP-2
MMP25****	明胶；胶原蛋白 IV；纤维蛋白；纤连蛋白；层粘连蛋白；	Pro-MMP-2
MMP-26*	明胶；胶原蛋白 IV；纤连蛋白；纤维蛋白原；玻连蛋白	Pro-MMP-9
MMP-27*	未知	
ADAMTS-1	聚集蛋白聚糖；多能聚糖(versican)	
ADAMTS-2	前胶原蛋白 I、II 和 III N-前肽的处理	
ADAMTS-3	前胶原蛋白 II N-前肽的处理	
ADAMTS-4	聚集蛋白聚糖；短蛋白聚糖(brevican)；多能聚糖；纤连蛋白；核心蛋白多糖	
ADAMTS-5	聚集蛋白聚糖；多能聚糖；短蛋白聚糖；	
ADAMTS-6	未知	
ADAMTS-7	软骨寡聚蛋白(Cartilage oligomeric protein)	

[0066]

ADAMTS-8	聚集蛋白聚糖	
ADAMTS-9	聚集蛋白聚糖	
ADAMTS-10	未知	
ADAMTS-12	未知	
ADAMTS-13	von Willebrand 因子	
ADAMTS-14	前胶原蛋白 I N-前肽的处理	
ADAMTS-15	聚集蛋白聚糖	
ADAMTS-16	聚集蛋白聚糖	
ADAMTS-17	未知	
ADAMTS-18	聚集蛋白聚糖	
ADAMTS-19	未知	
ADAMTS-20	聚集蛋白聚糖	
HYAL1	未知	
HYAL2	高分子量 HA (CD44 配体)	
HYAL3	未知	
HYAL4	未知	
HYAL5	未知	

[0067] *＝基本结构域(含有前结构域þ催化结构域p血红素结合蛋白的辅助结构域)

[0068] **＝最小结构域(前结构域þ催化结构域)

[0069] ***＝具有纤连蛋白结构域插入的MMP

[0070] ****＝由GPI或跨膜结构域(TM)锚定的膜结合MMP

[0071] PCT公开号WO 2015/066042公开了溶瘤性HSV(oHSV),其中复制基因被置于mir124的控制下以使其选择性杀死胶质母细胞瘤细胞,并且这种策略也可用于本发明的语境中。还可以通过表达表面-细胞结合蛋白来修饰载体向性,例如PCT公开号WO 2015/066042中所公开的那样。

[0072] 编码NKG2D活化配体的多核苷酸可以是外源表达盒的部分。在本文所述载体的一些实施方案中,外源表达盒内的编码序列可与任何所需的基因调控序列(如组成型启动子或诱导型或组织特异性启动子,其中许多实例是在本领域中已知的)可操作地连接。例如,常用的组成型启动子是人巨细胞病毒(hCMV)启动子,也可以使用其他启动子,例如CMV早期增强子/鸡β肌动蛋白(CAG)启动子和HSV即刻早期启动子(例如ICP4启动子)等。

[0073] 根据本发明的优选载体是包含转基因的HSV载体,该转基因编码MMP9、ULBP1和/或ULPB3中的一种或两种、以及任选的抗PD-L1的抗体。如图12A和12B所示,ULBP1、ULPB3(或其他ULPB)优选在miRNA序列(如miR124)的表达控制下。分别包括miR124控制元件的ULBP1(SEQ ID NO:1)和ULPB3(SEQ ID NO:2)的序列如下所示:

[0074] 表2.示例性ULBP核酸序列

[0075]

ULBP	核酸序列	SEQ ID NO:
ULBP1	ATGTCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTTGGAGCTGCAGTTGCTGACTACAAAGACC ATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGCTTGG CTGGTCCCGGGCAGGATGGGTCGACACACACTGTCTTTGCTATGACTTCATCATCACT CCTAAGTCCAGACCTGAACCACAGTGGTGTGAAGTTCAAGGCCTGGTGGATGAAAGGC CTTTTCTTCACTATGACTGTGTTAACCACAAGGCCAAAGCCTTTGCTTCTCTGGGGAA GAAAGTCAATGTCACAAAAACCTGGGAAGAACAAACTGAAACACTAAGAGACGTGGTG GATTTCCTTAAAGGGCAACTGCTTGACATTCAAGTGGAGAATTTAATACCCATTGAGC CCCTCACCCTGCAGGCCAGGATGTCTTGTGAGCATGAAGCCCATGGACACGGCAGAGG ATCTTGGCAGTTCCTCTTCAATGGACAGAAGTTCCTCCTCTTTGACTCAAACAACAGA AAGTGGACAGCACTTCATCCTGGAGCCAAGAAGATGACAGAGAAGTGGGAGAAGAACA GGGATGTGACCATGTTCTTCCAGAAGATTTCACTGGGGGATTGTAAGATGTGGCTTGA AGAATTTTTGATGTACTGGGAACAAATGCTGGATCCAACAAAACCACCCTCTCTGGCC	1
	CCAGGCACAACCCAACCCAAGGCCATGGCCACCACCCTCAGTCCCTGGAGCCTTCTCA TCATCTTCCTCTGCTTCATTCTAGCTGGCAGATGAGAATTCGGCATTCACCGCGTGCC TTATAGTACCAGGGCATTCACCGCGTGCCTTAAGGATCCTGGCATTCACCGCGTGCCT TAATGACTGCGGCATTCACCGCGTGCCTTAagatcT	
ULBP3	ATGTCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTTGGAGCTGCAGTTGCTGACTACAAAGACC ATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGCTTTT CGACTGGTCCGGGACGGGGCGGGCCGACgCTCACTCTCTCTGGTATAACTTCACCATC ATTCATTTGCCCAGACATGGGCAACAGTGGTGTGAGGTCCAGAGCCAGGTGGATCAGA AGAATTTTCTCTCCTATGACTGTGGCAGTGACAAGGTCTTATCTATGGGTCACCTAGA AGAGCAGCTGTATGCCACAGATGCCTGGGGAAAACAACTGGAAATGCTGAGAGAGGTG GGGCAGAGGCTCAGACTGGAACTGGCTGACACTGAGCTGGAGgATTTCACACCCAGTG GACCCCTCACGCTGCAGGTCAGGATGTCTTGTGAGTGTGAAGCCGATGGATACATCCG TGGATCTTGGCAGTTCAGCTTCGATGGACGGAAGTTCCTCCTCTTTGACTCAAACAAC AGAAAGTGGACAGTGGTTCACGCTGGAGCCAGGCGGATGAAAGAGAAGTGGGAGAAGG ATAGCGGACTGACCACCTTCTTCAAGATGGTCTCAATGAGAGACTGCAAGAGCTGGCT TAGGGACTTCCTGATGCACAGGAAGAAGAGGCTGGAACCCACAGCACCACCCACCATG GCCCCAGGCTTAGCTCAACCCAAAGCCATAGCCACCACCCTCAGTCCCTGGAGCTTCC TCATCATCCTCTGCTTCATCCTCCCTGGCATCTGAGAATTCGGCATTCACCGCGTGCC TTATAGTACCAGGGCATTCACCGCGTGCCTTAAGGATCCTGGCATTCACCGCGTGCCT TAATGACTGCGGCATTCACCGCGTGCCTTA	2

[0076] 本发明的载体可以通过病毒学领域的普通技术人员已知的标准方法制备。然而，为了便于操作基因组和制备本文所述的载体，本发明还提供了编码本发明载体的核酸。任选地，所述核酸是编码本发明载体的细菌人工染色体(BAC)，其有助于在细菌系统中操作载体，特别是当它是HSV时。

[0077] 应该认识到，本文所述的载体可用于靶向和杀死癌细胞，无论是体内还是体外。在一些实施方案中，本文所述的载体用于治疗人类患者的人肿瘤细胞以治疗癌症。然而，该方法也可用于其他哺乳动物，如伴侣动物(例如猫和狗)，或具有农业重要性的动物(例如，牛、羊、马等)，或具有动物学或实验室重要性的动物(例如，大鼠、小鼠等)。在一些实施方案中，本发明涉及治疗有需要的受试者中癌症的方法，所述方法包括给予受试者预防有效量或治疗有效量的本文所述的溶瘤病毒、病毒原液或组合物。如本文所用，“受试者”包括表现出可用本文公开的重组病毒载体、组合物和方法治疗的疾病、障碍或病症的症状的任何动物。合适的受试者(例如，患者)包括实验动物(如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)，农场动物(如马或牛)，家畜或宠物(如猫或狗)。还包括非人灵长类动物和优选的人类患者。可以选择合适的受试者。

例如,可以诊断和选择患有IDH^{Mut}胶质母细胞瘤的人类患者用于施用(例如,颅内和瘤内)药物组合物,所述药物组合物包含具有(任选地在mir124应答元件的控制下)产生NKG2D活化配体的表达盒的载体。因此,基于NK和/或T细胞的免疫应答可以通过受试者的免疫系统抵抗胶质母细胞瘤。

[0078] 通常,当足够的病毒(载体)可以被递送至细胞群以确保细胞面对合适数量的病毒(载体颗粒)时,本文所述的载体是最有用的。因此,本发明提供了一种原液,优选均质原液,其包含本文所述的载体。病毒原液的制备和分析是本领域熟知的。例如,病毒原液可以在含有用载体转导的细胞的滚瓶中制备。然后可以在连续的nycodenze梯度上纯化病毒原液,并等分和储存直至需要。病毒原液的滴度差异很大,主要取决于病毒基因型和用于制备它们的方案和细胞系。优选地,这种原液具有至少约10^5个噬斑形成单位(pfu)/mL的病毒滴度,如至少约10^6pfu/mL,或甚至更优选至少约10^7pfu/mL,10^8pfu/mL,10^9pfu/mL,10^{10}pfu/mL或10^{11}pfu/mL。例如,可以使用表达载体靶向的受体的细胞来建立这样的滴度。

[0079] 本发明还提供了包含本发明的载体(vector)和载剂(carrier,优选生理学上可接受的载剂)的组合物。所述组合物的载剂可以是适用于所述载体的任何载剂。载剂通常是液体,但也可以是固体,或液体和固体组分的组合。载剂理想地是药学上可接受的(例如生理学或药理学上可接受的)载剂(例如赋形剂或稀释剂)。药学上可接受的载剂是众所周知的并且容易获得。载剂的选择至少部分地由特定载体和用于施用组合物的特定方法来确定。该组合物可进一步包含任何其他合适的组分,特别是用于增强组合物的稳定性和/或其最终用途。因此,存在多种本发明组合物的合适制剂。以下配方和方法仅是示例性的,决不是限制性的。

[0080] 适用于肠胃外给药的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射液(其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和致使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质),以及水性和非水性无菌悬浮液(其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂)。所述制剂可以在单位剂量或多剂量密封容器(如安瓿和小瓶)中提供,并且可以在冷冻干燥(冻干)条件下储存,仅需要在马上使用前添加用于注射的无菌液体赋形剂,例如水。临时注射液和悬浮液可由前述类型的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0081] 可以以适当剂量或治疗有效量将本文所述的组合物和载体递送至有需要的受试者。如本文所用,“适当剂量”和“治疗有效量”是指实现期望的生理和/或生物学结果所需的本文所述组合物或重组载体的量。病毒、病毒原液或组合物的“治疗有效量”可根据诸如疾病状态、个体年龄、性别和体重以及干细胞和祖细胞在个体中引发期望反应的能力等因素而变化。治疗有效量也可以是其中治疗有益效果超过病毒或转导的治疗细胞的任何毒性或有害作用的量。术语“治疗有效量”包括有效“治疗”受试者(例如,患者)的量。本领域技术人员应当理解,治疗有效量将根据所施用病毒的类型、制剂的性质、施用途径、待治疗疾病的性质和/或严重程度、和/或受试者的一般健康和良好状态而变化。在一些实施方案中,合适的剂量为10^2至10^{11}pfu或10^4至10^{10}pfu。本文所用的术语“治疗”是指向受试者施用治疗有效量的如本文所述的重组病毒或其组合物,使受试者的疾病或病症、或者疾病或病症的症状得以改善。改善是疾病或病症、或者疾病或病症的症状的任何改善或补救。改善是可观察的或可测量的改善,或者可以是受试者的良好状态的总体感觉的改善。因此,本领域技术人员认识到治疗可改善疾病状况,但可能不是完全治愈疾病。

[0082] 本发明的一些方面包括杀死癌细胞的方法,包括在足以使溶瘤病毒在所述癌细胞内感染和复制的条件下将癌细胞暴露于本文所述的溶瘤病毒或其组合物,并且溶瘤病毒在癌细胞内的复制导致细胞死亡。可以选择合适的受试者。例如,可以诊断和选择患有IDH^{mut}胶质母细胞瘤的人类患者用于施用(例如,颅内和瘤内)药物组合物,所述药物组合物包含具有(任选地在mir124应答元件的控制下)产生NKG2D活化配体的表达盒的载体。因此,基于NK和/或T细胞的免疫应答可以通过受试者的免疫系统治疗胶质母细胞瘤。

[0083] "给药"在本文中是指将溶瘤病毒、病毒原液或其组合物引入受试者或使溶瘤病毒、病毒原液或其组合物与细胞和/或组织接触。可以通过注射、冲洗、吸入、消耗、电渗透、血液透析、离子电渗疗法和本领域已知的其他方法进行给药。给药途径自然会随着所治疗疾病的位置和性质而变化。在一些实施方案中,药物组合物可以直接施用于肿瘤(肿瘤内递送);例如,通过注射、导管输液等。或者,组合物可以通过静脉内、动脉内、鼻、淋巴、腹膜内、颅内、鞘内或通过局部血管灌注递送。因此,给药可以是局部的或全身的。

[0084] 此外,该组合物可包含另外的治疗剂或生物活性剂。例如,可以存在用于治疗特定适应症的治疗因子。控制炎症的因子,如布洛芬或类固醇,可以是组合物的一部分,以减少与载体的体内施用和生理窘迫相关的肿胀和炎症。免疫系统抑制剂可以与组合物方法一起施用,以减少对载体本身或与病症相关的任何免疫应答。或者,免疫增强剂可以包括在组合物中以上调身体对疾病的天然防御,特别是对抗要使用本发明载体对抗的癌症或肿瘤。可以存在抗生素,即杀微生物剂和杀真菌剂,以降低与基因转移程序和其他病症相关的感染风险。

[0085] 以下实施例用于说明本发明的各种实施方案,并不意味着以任何方式限制本发明。这些实施例以及本文描述的方法是示例性的,并且不旨在作为对本发明范围的限制。包含在由权利要求的范围限定的本发明的精神内的对所述实施方案的改变、修改和其他变化是特别考虑的。

[0086] 实施例1

[0087] 该实施例叙述了已经针对本发明的载体(在图12A和12B中公开)进行的观察。

[0088] 与IDHwt星形胶质细胞相比,IDHmut星形胶质细胞和原代神经胶质瘤细胞系显示NKG2DL的相对表达降低。

[0089] 在IDHmut细胞中的NKG2D低水平与受损的NK-介导的细胞毒性相关,并表明NK细胞抗性在IDH突变肿瘤中的作用。

[0090] IDHmut和IDHwt中ULBP3的过表达使这些细胞对NK细胞介导的细胞毒性敏感,并且似乎产生了显着的生长停滞。

[0091] 实施例2

[0092] 该实施例描述了已经针对本发明的载体进行的观察结果,其关于通过miR124的ULBP1和ULBP3的减少。

[0093] 将miR124RE序列克隆到ULBP1和ULBP3的3′UTR区域,生成名为pENTRcagFlagULBP1和pENTRcagFlagULBP3的质粒。将293T细胞接种在六孔板(5×10^5/孔)中。次日,使用Lipo2000试剂,用300ng的ULBP1或ULBP3质粒(pENTRcagFlagULBP1和pENTRcagFlagULBP3)和100pmol的miR124共转染细胞。在转染后24小时,收集细胞,在冷PBS中洗涤两次,并在RIPA1X缓冲液(每孔100μl)中在冰上裂解20分钟。通过离心澄清细胞裂解物,并使用抗体抗

Flag和抗微管蛋白通过SDS-Page和WB进行分析。

[0094] 结果(图10)显示miR124抑制ULBP1和ULBP3的表达,这表明该方法可用于阻断蛋白质在正常神经元中的表达。

[0095] 实施例3

[0096] 该实施例表明ULBP3增强HSV载体2A5B的治疗功效。

[0097] 如图20所示,设计了一个实验,其中将30只裸鼠分成两组。此类小鼠缺乏T细胞但具有NK细胞和巨噬细胞。每4天(整个实验期间)用Asialo GM1 Ab处理一组(n=15)以消耗小鼠的NK细胞;另一组(n=15)接受同种型对照。将所有30只动物用10^6个表达荧光素酶的人胶质瘤细胞GBM30注射到右胁腹。一旦形成肿瘤,每一组分为3个组,每个接受一个下列处理:(1)单次注射表达ULBP3的溶瘤HSV载体(2A5B-ULBP3)(2×10^6pfu),(2)单次注射空白(unarmed)的HSV载体(2A5B)(2×10^6pfu)或(3)利用PBS作为阴性对照。

[0098] 该实验的结果如图21、22A和22B以及下面的表3所示。在图21中,左图显示NK细胞活性增强了oHSV治疗的益处。用2A5B、2A5B-ULBP3或PBS处理的(A)NK活性小鼠和(B)NK缺陷型小鼠中GBM30胁腹肿瘤的肿瘤生长曲线。通过用卡尺测量垂直直径来评估肿瘤大小。通过ANOVA确定肿瘤生长的差异。

[0099] 图22A中绘制的数据显示,在没有NK细胞的情况下,与对照骨架2A5B载体相比,2A5BULBP3溶瘤HSV载体显示出显著有效的肿瘤生长抑制,甚至相对于根本没有治疗,这种2A5B也显示出抑制肿瘤生长的功效。图22B中绘制的数据表明,当在NK细胞存在下使用2A5BULBP3溶瘤HSV时,五只动物中的四只在肿瘤生长方面甚至更为显著的抑制。与图22A一样,与未处理(或假处理)的动物相比,用骨架2A5B载体观察到肿瘤生长的一些抑制。代表在用2A5B-ULBP3溶瘤HSV载体处理的组中观察到肿瘤生长的五只动物之一的图22B中的单个数据表明它是异常值。

[0100] 简而言之,结果表明用2A5B-ULBP3溶瘤HSV载体处理的五只动物中有四只仅用单剂量就显示肿瘤完全消退。这些结果出人意料且令人惊讶。此外,NK细胞的消融降低了治疗的治疗特征。然而,即使在不存在NK细胞的情况下,表达ULBP3的载体也显示出显著的治疗益处。

[0101] 表3

[0102]

NK 细胞存在	第 1-13 天	第 17 天	第 20 天	第 25 天	第 30 天	第 33 天	第 37 天
PBS vs 2A5B	ns	ns	ns	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001
PBS vs 2A5B-ULBP3	ns	ns	* p=0.033	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001
2A5B vs 2A5B-ULBP3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NK 耗尽(Ab 处理)	第 1-13 天	第 17 天	第 20 天	第 25 天	第 30 天	第 33 天	第 37 天
PBS vs 2A5B	ns	ns	ns	*** p=0.0007	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001
PBS vs 2A5B-ULBP3	ns	* p=0.015	** p=0.005	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001
2A5B vs 2A5B-ULBP3	ns	ns	ns	ns	* p=0.024	ns p=0.073	ns p=0.063

[0103] 所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,均以相同的程度通过引用整体并入本文,如同每个参考文献被单独且具体地指出通过引用并入并且在本文中完整地阐述。

[0104] 在描述本发明的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)使用术语“一”和“一个”和“该”和“至少一个”以及类似的指示词应被解释为涵盖单数和复数,除非本文另有说明或明确与上下文相矛盾。使用后面跟着一个或多个项目的列表(例如,“A和B中的至少一个”)的术语“至少一个”应被解释为表示从列出的项目中选择的一个项目(A或B),或所列项

目中的两个或更多个的任何组合(A和B),除非本文另有说明或明确与上下文相矛盾。除非另有说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被解释为开放式术语(即,意味着“包括但不限于”)。除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的描述仅旨在用作单独提及落入该范围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独值并入本说明书中,如同其在本文中单独引用一样。除非本文另有说明或上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法均可以任何合适的顺序进行。除非另外声明,否则本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅旨在更好地说明本发明,而不是对本发明的范围进行限制。说明书中的任何语言都不应被解释为表明任何未要求保护的要素对于本发明的实践是必不可少的。

[0105] 本文描述了本发明的优选实施方案,包括发明人已知的实施本发明的最佳方式。在阅读前面的描述后,那些优选实施例的变化对于本领域普通技术人员来说可以变得显而易见。发明人期望熟练的技术人员适当地采用这些变化,并且发明人希望本发明以不同于本文具体描述的方式实施。因此,本发明包括适用法律允许的所附权利要求中所述主题的所有修改和等同物。此外,除非本文另有说明或上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述元素的所有可能变型的任何组合。

<110> 匹兹堡大学-属高等教育联邦体系

<120> 使癌细胞对胞毒免疫细胞攻击敏感的NKG2D活化配体蛋白表达

<130> 728947

<150> US 62/350,095
<151> 2016-06-14

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 906
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 1
atgtctgcac ttctgatcct agctcttgtt ggagctgcag ttgctgacta caaagaccat 60

gacggtgatt ataaagatca tgacatcgat tacaaggatg acgatgacaa gcttggctgg 120

tcccgggcag gatgggtcga cacacactgt ctttgctatg acttcatcat cactcctaag 180

tccagacctg aaccacagtg gtgtgaagtt caaggcctgg tggatgaaag gccttttctt 240

cactatgact gtgttaacca caaggccaaa gcctttgctt ctctggggaa gaaagtcaat 300

gtcacaaaaa cctgggaaga acaaactgaa acactaagag acgtggtgga tttccttaaa 360

gggcaactgc ttgacattca agtggagaat ttaataccca ttgagccccc caccctgcag 420

gccaggatgt cttgtgagca tgaagcccat ggacacggca gaggatcttg gcagttcctc 480

ttcaatggac agaagttcct cctctttgac tcaaacaaca gaaagtggac agcacttcat 540

cctggagcca agaagatgac agagaagtgg gagaagaaca gggatgtgac catgttcttc 600

cagaagattt cactgggggа ttgtaagatg tggcttgaag aatttttgat gtactgggaa 660

[0001] caaatgctgg atccaacaaa accaccctct ctggccccag gcacaaccca acccaaggcc 720

atggccacca ccctcagtcc ctggagcctt ctcatcatct tcctctgctt cattctagct 780

ggcagatgag aattcggcat tcaccgcgtg ccttatagta ccagggcatt caccgcgtgc 840

cttaaggatc ctggcattca ccgcgtgcct taatgactgc ggcattcacc gcgtgcctta 900

agatct 906

<210> 2
<211> 900
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 2
atgtctgcac ttctgatcct agctcttgtt ggagctgcag ttgctgacta caaagaccat 60

gacggtgatt ataaagatca tgacatcgat tacaaggatg acgatgacaa gcttttcgac 120

tggtccggga cggggcgggc cgacgctcac tctctctggt ataacttcac catcattcat 180

ttgcccagac atgggcaaca gtggtgtgag gtccagagcc aggtggatca gaagaatttt 240

ctctcctatg actgtggcag tgacaaggtc ttatctatgg gtcacctaga agagcagctg 300

tatgccacag atgcctgggg aaaacaactg gaaatgctga gagaggtggg gcagaggctc 360

agactggaac tggctgacac tgagctggag gatttcacac ccagtggacc cctcacgctg 420

caggtcagga tgtcttgtga gtgtgaagcc gatggataca tccgtggatc ttggcagttc 480

agcttcgatg gacggaagtt cctcctcttt gactcaaaca acagaaagtg gacagtggtt 540

cacgctggag ccaggcggat gaaagagaag tgggagaagg atagcggact gaccaccttc 600

ttcaagatgg tctcaatgag agactgcaag agctggctta gggacttcct gatgcacagg 660

aagaagaggc tggaacccac agcaccaccc accatggccc caggcttagc tcaacccaaa 720

gccatagcca ccaccctcag tccctggagc ttcctcatca tcctctgctt catcctccct 780

ggcatctgag aattcggcat tcaccgcgtg ccttatagta ccagggcatt caccgcgtgc 840

[0002] cttaaggatc ctggcattca ccgcgtgcct taatgactgc ggcattcacc gcgtgcctta 900

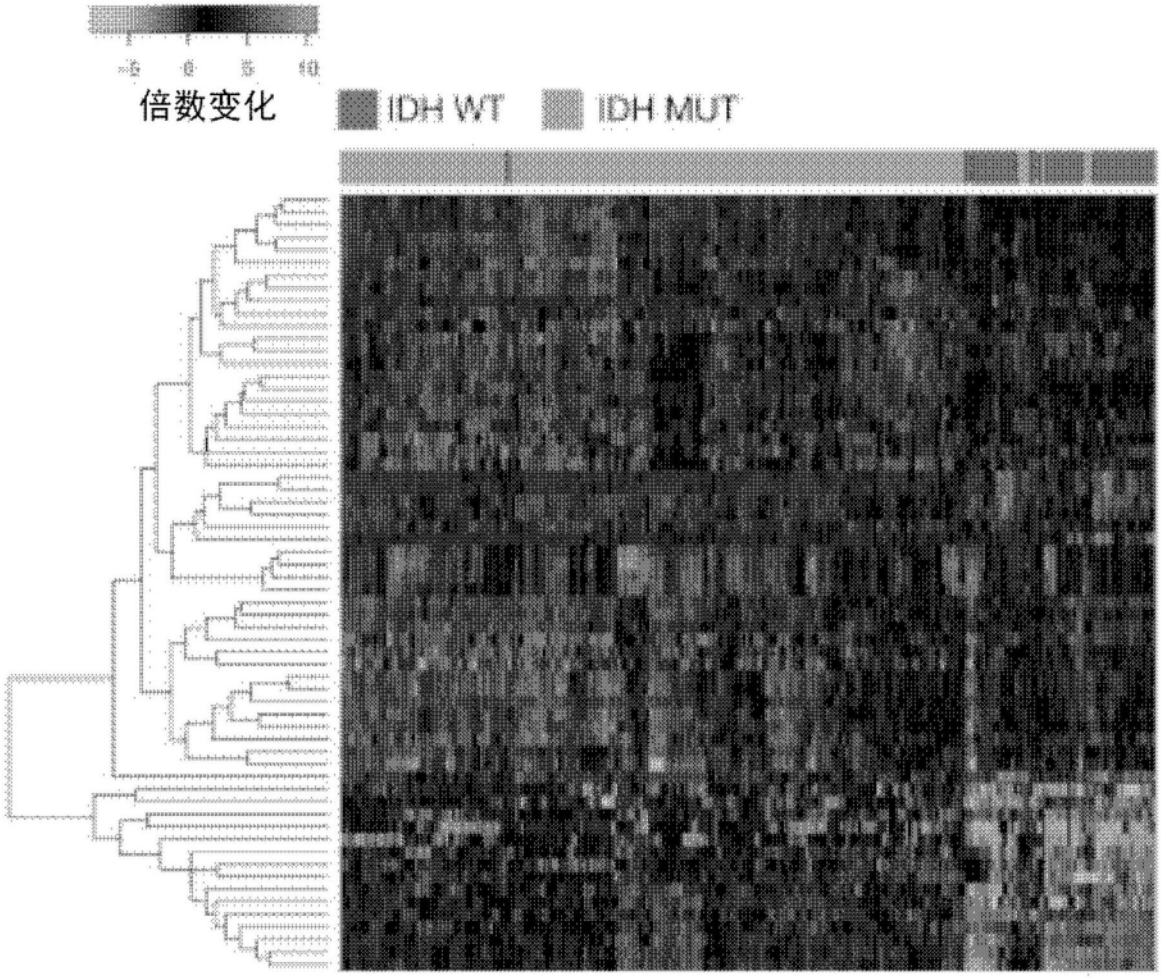

-5
0
5
10
倍数变化
IDH WT
IDH MUT

图1A

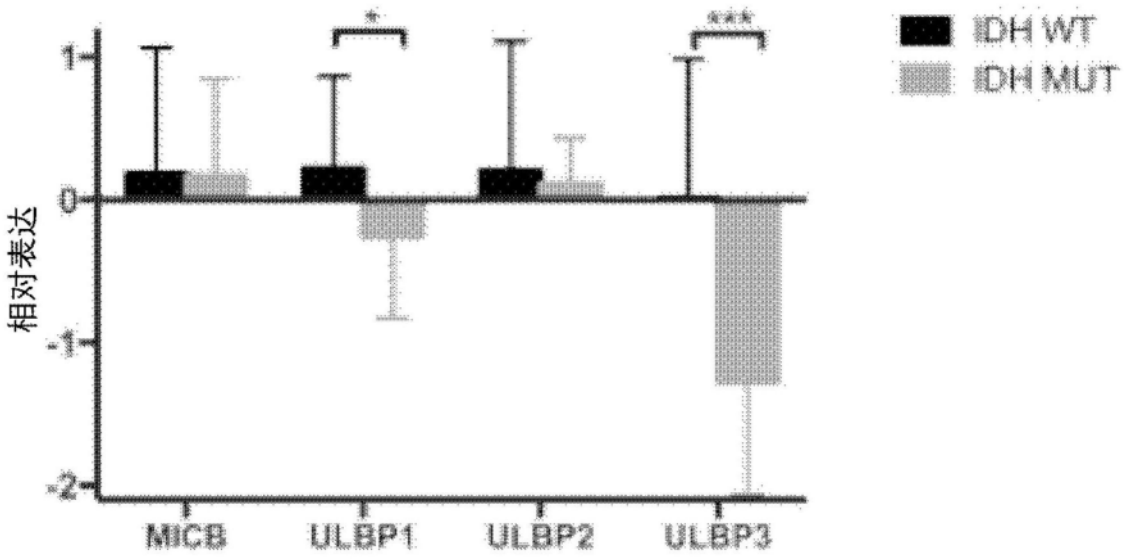

*
***
IDH WT
IDH MUT
1
0
-1
-2
相对表达
MICB
ULBP1
ULBP2
ULBP3

图1B

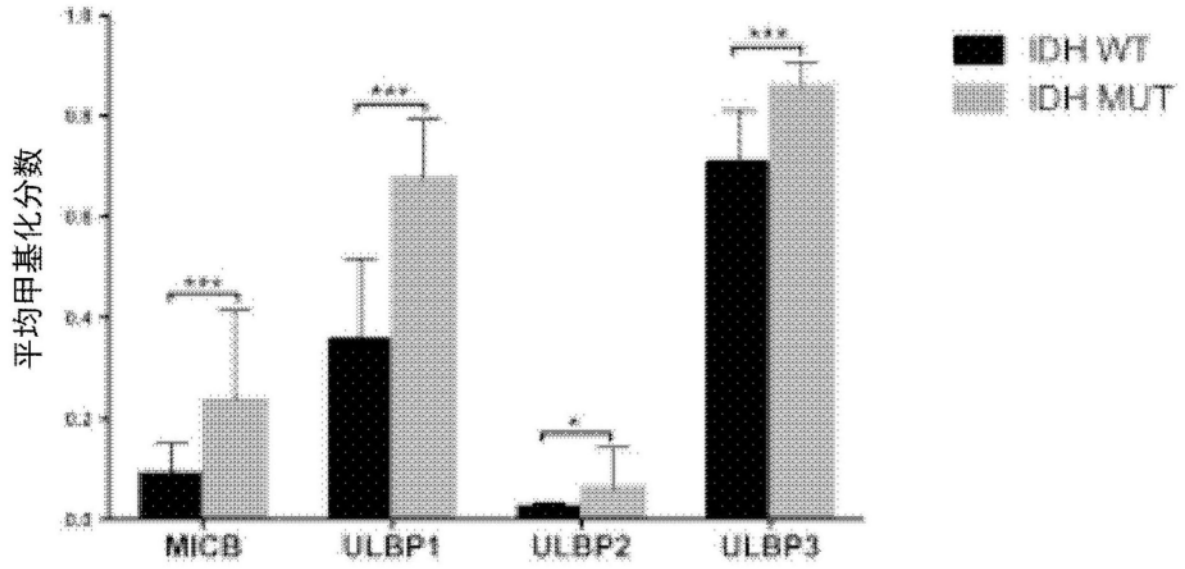


图1C

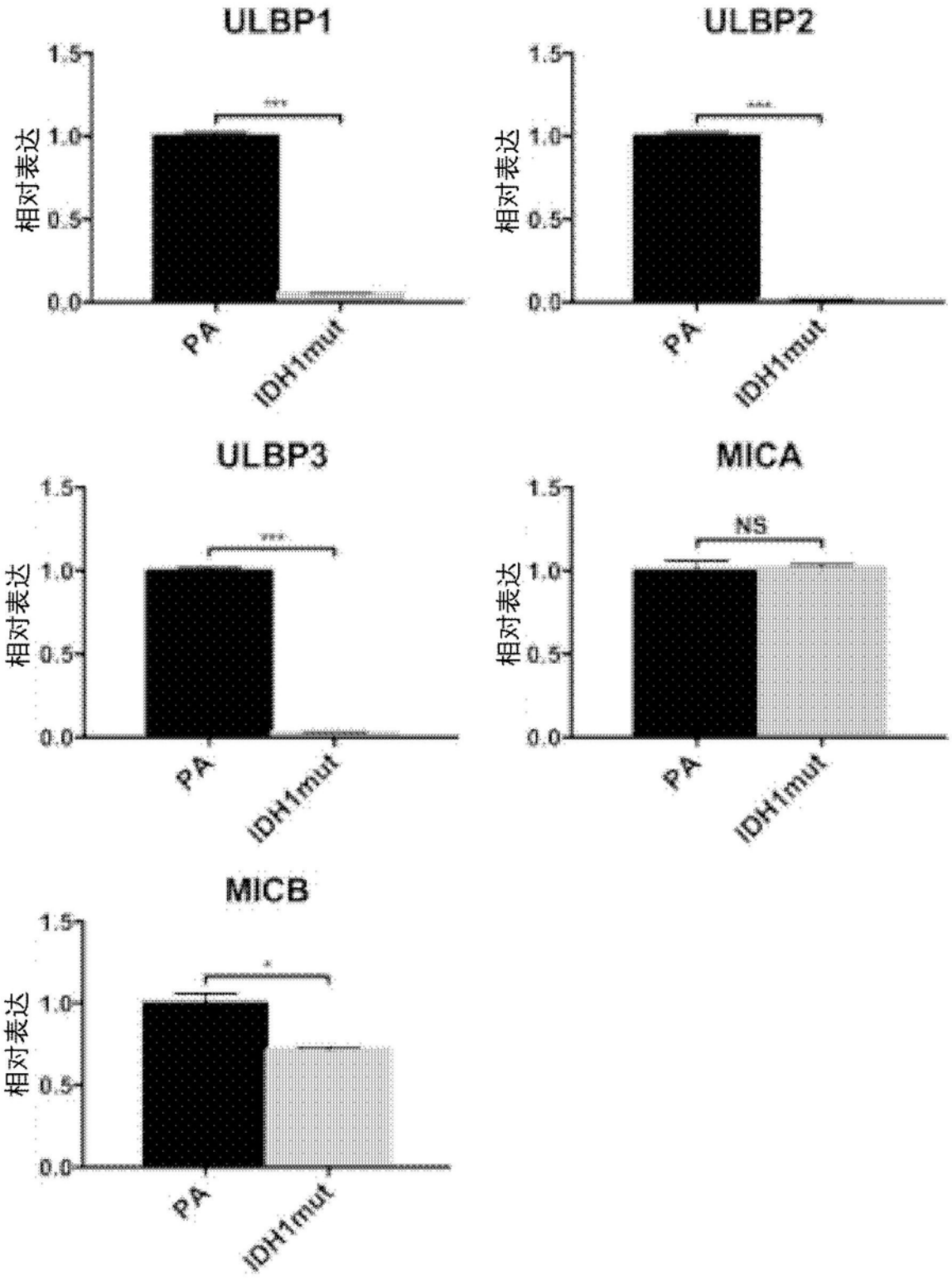


图2A

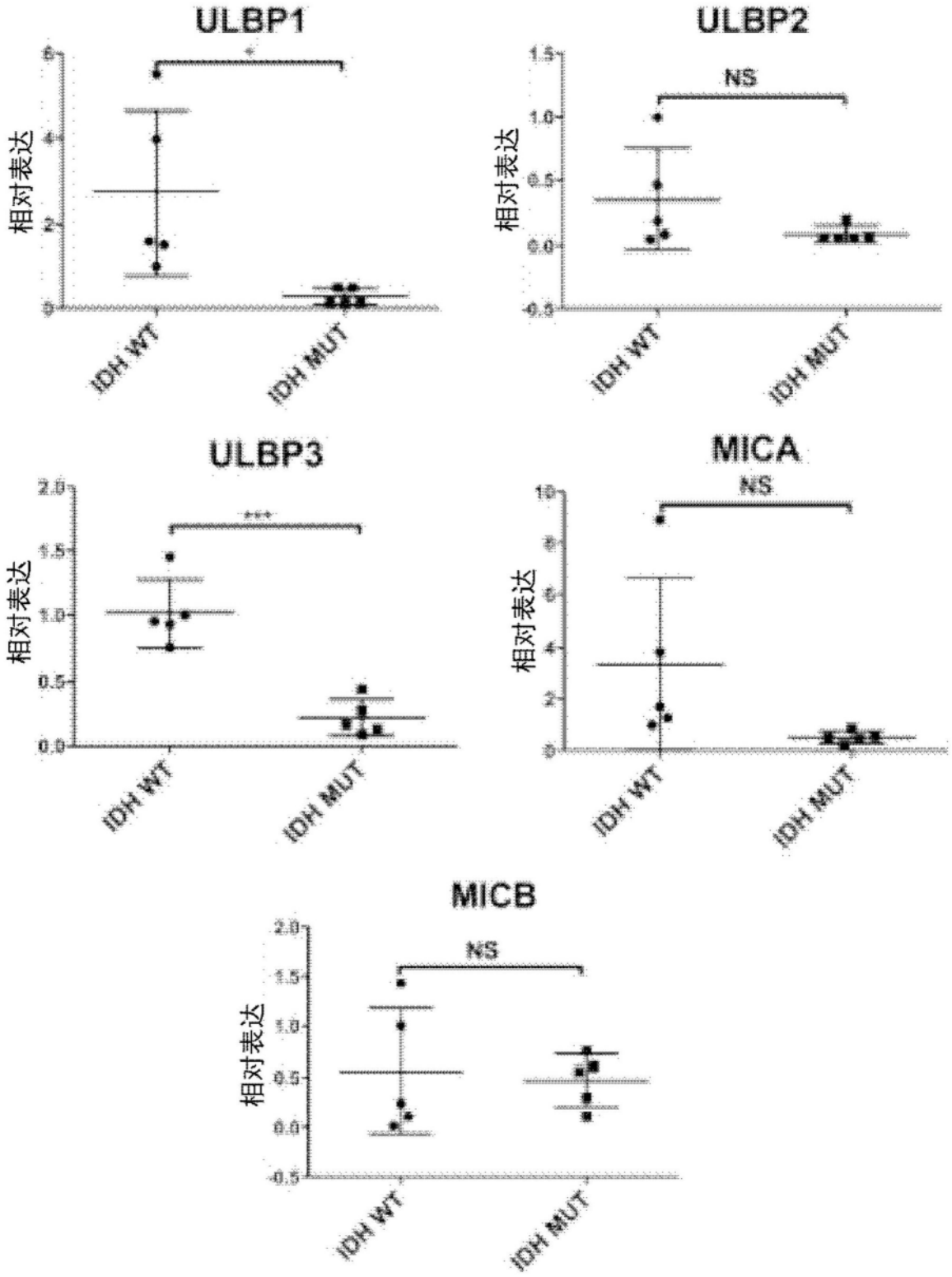


图2B

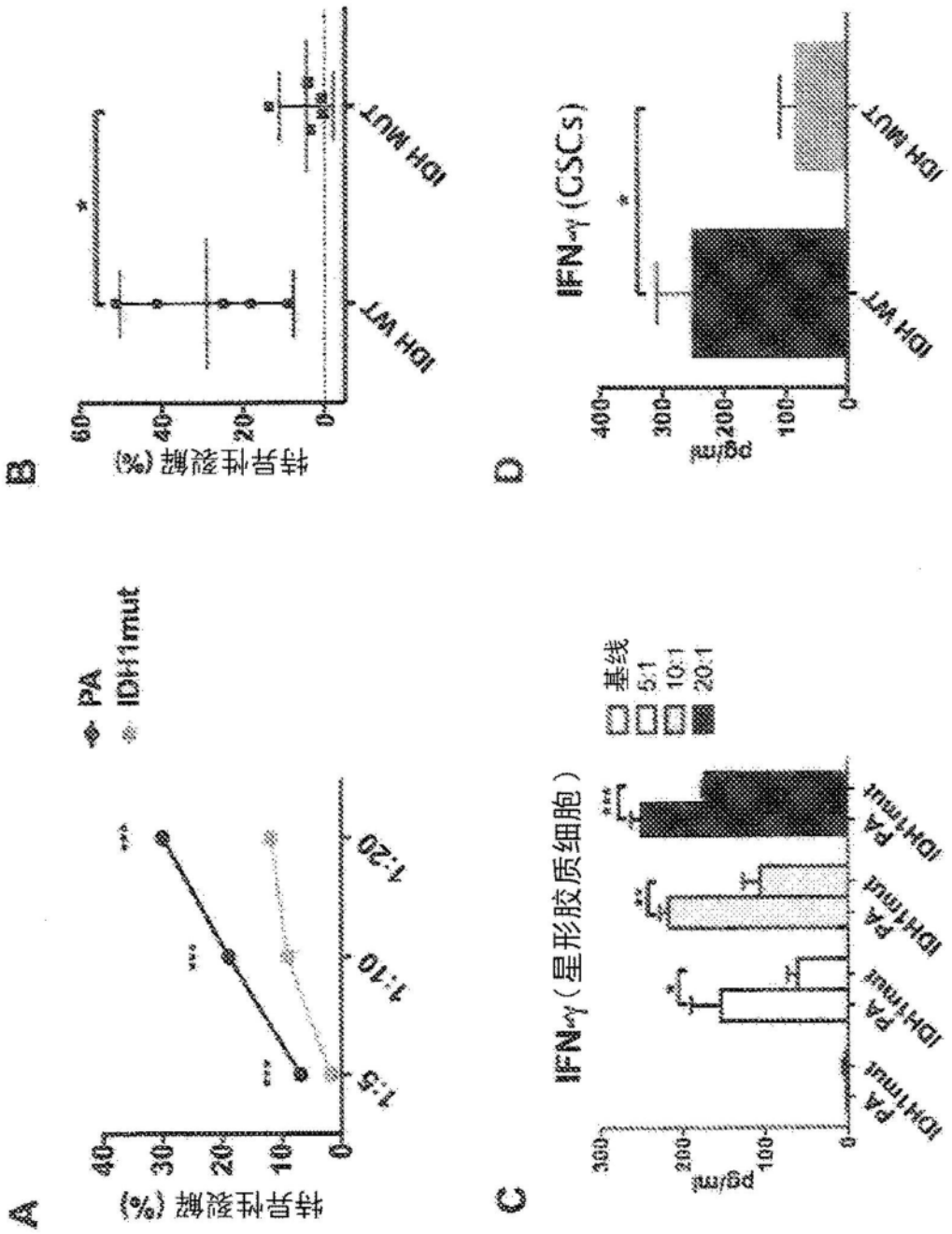

A
特异性裂解 (%)
PA
IDH1mut
1:5
1:10
1:20
B
特异性裂解 (%)
IDH WT
IDH MUT
C
IFNγ (星形胶质细胞)
基线
5:1
10:1
20:1
pg/ml
IDH1mut
PA
D
IFNγ (GSCs)
pg/ml
IDH WT
IDH MUT

图3

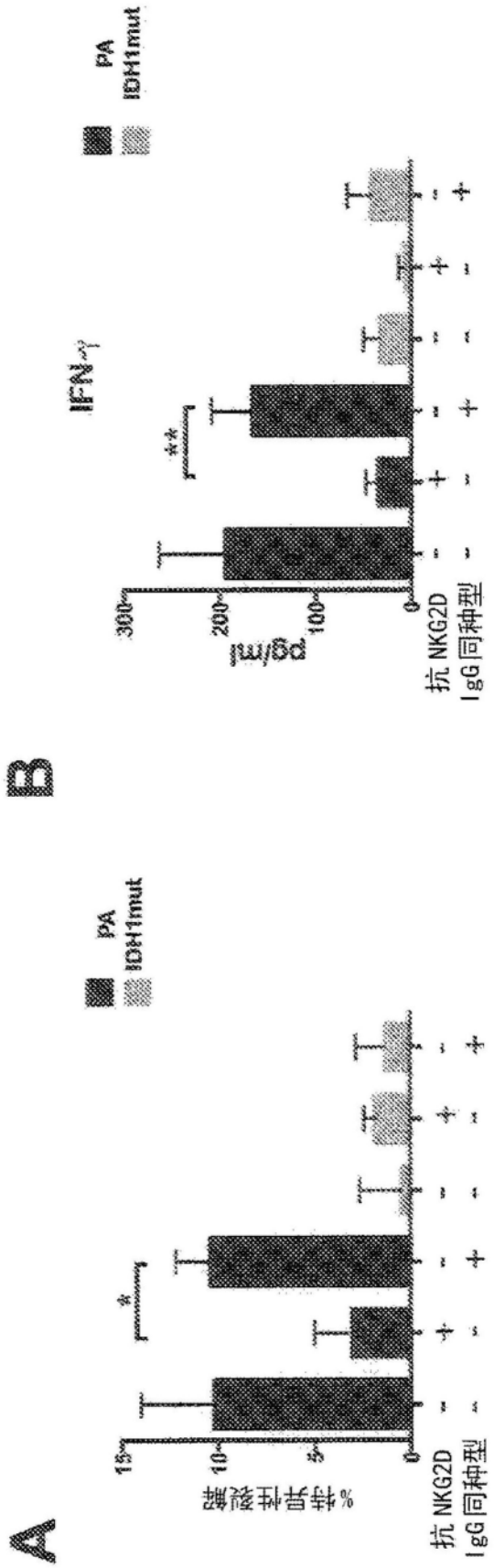

A
PA
IDH1mut
% 特异性裂解
15
10
5
0
*
抗 NKG2D
IgG 同种型
B
PA
IDH1mut
IFN-γ
pg/ml
300
200
100
0
**
抗 NKG2D
IgG 同种型

图4

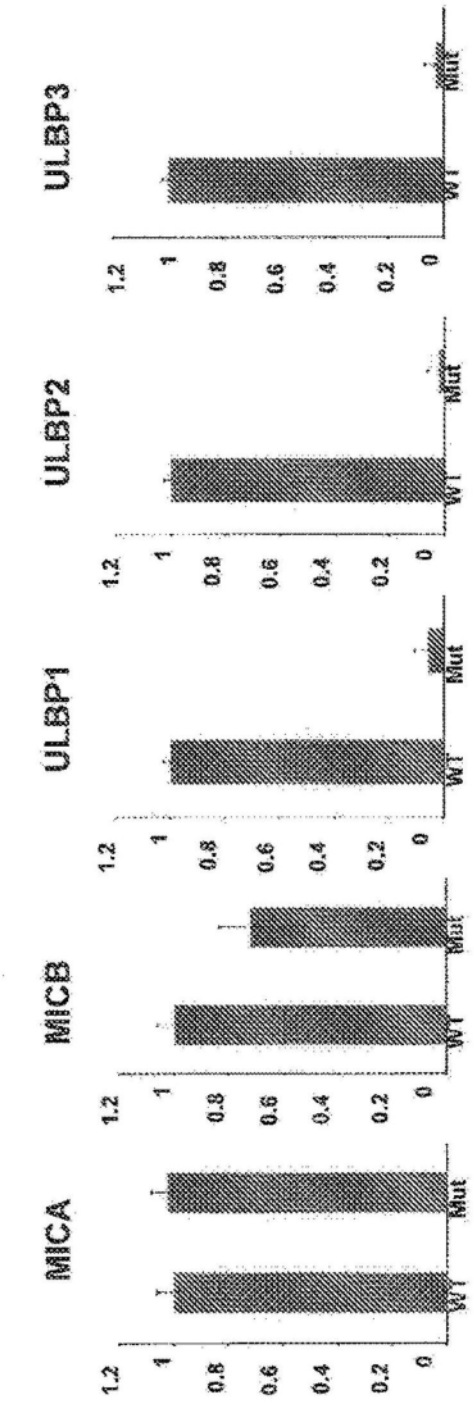


图5

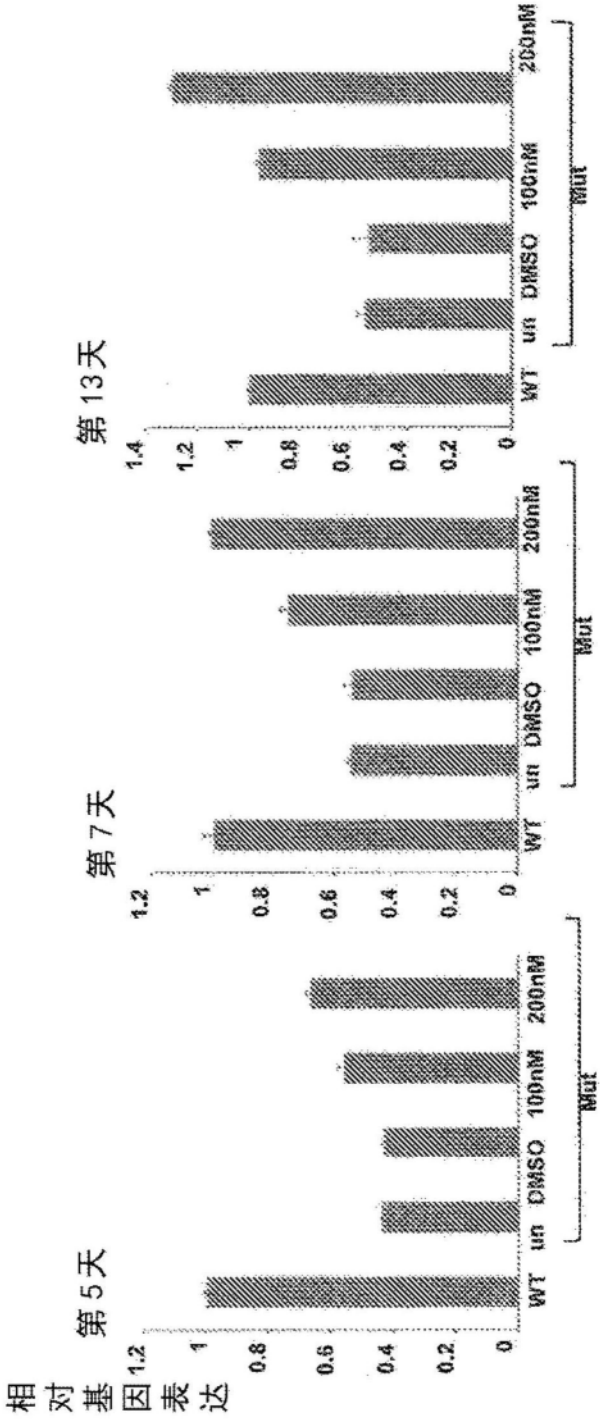

相对基因表达
第5天
第7天
第13天
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
WT
un
DMSO
100nM
200nM
Mut

图6

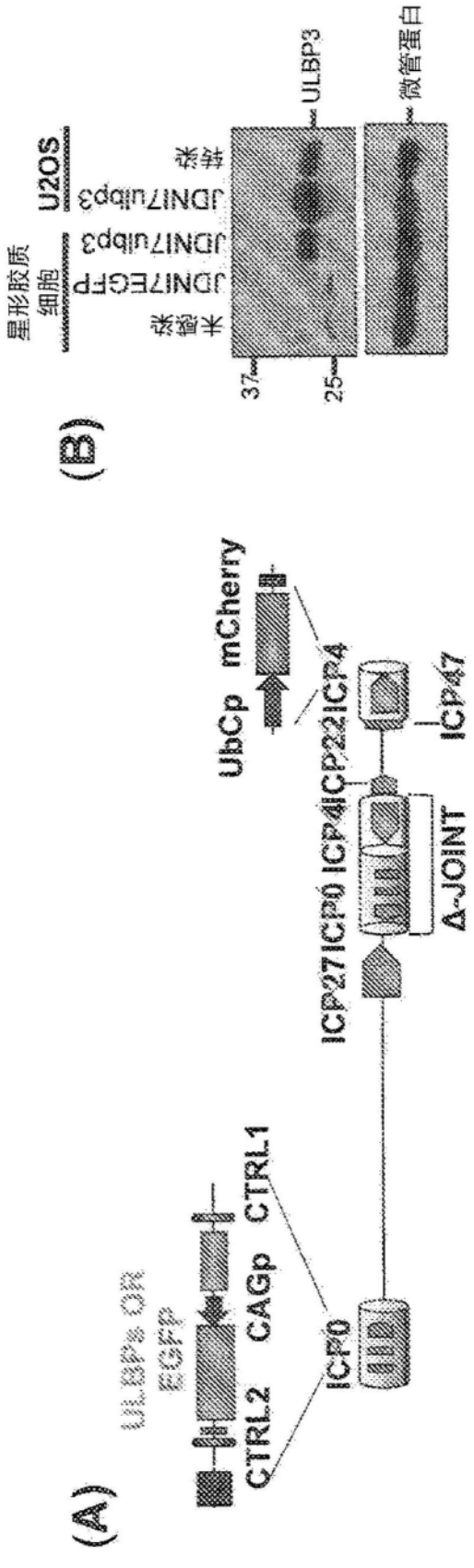

(B)
星形胶质细胞
U2OS
未感染
ΔICP7EGFP
ΔICP7ubip3
ΔICP7ubip3
转染
ULBP3
微管蛋白
37
25
(A)
ULBPs ORF
EGFP
CTRL2
CAGp
CTRL1
ICP0
ICP27
ICP0
ICP4
ICP22
ICP4
ICP47
Δ-JOINT
UbCp
mCherry

图7

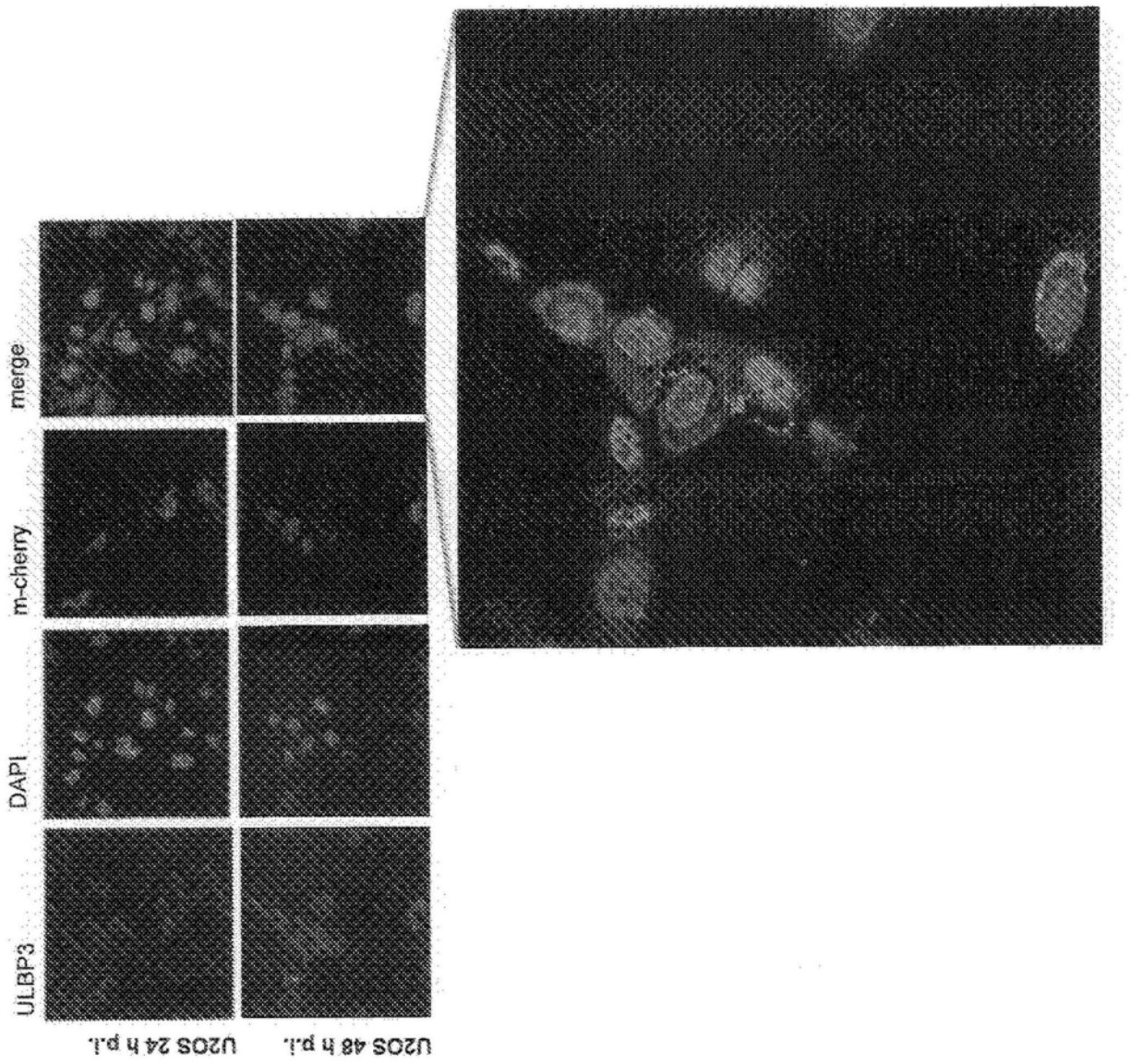


图8

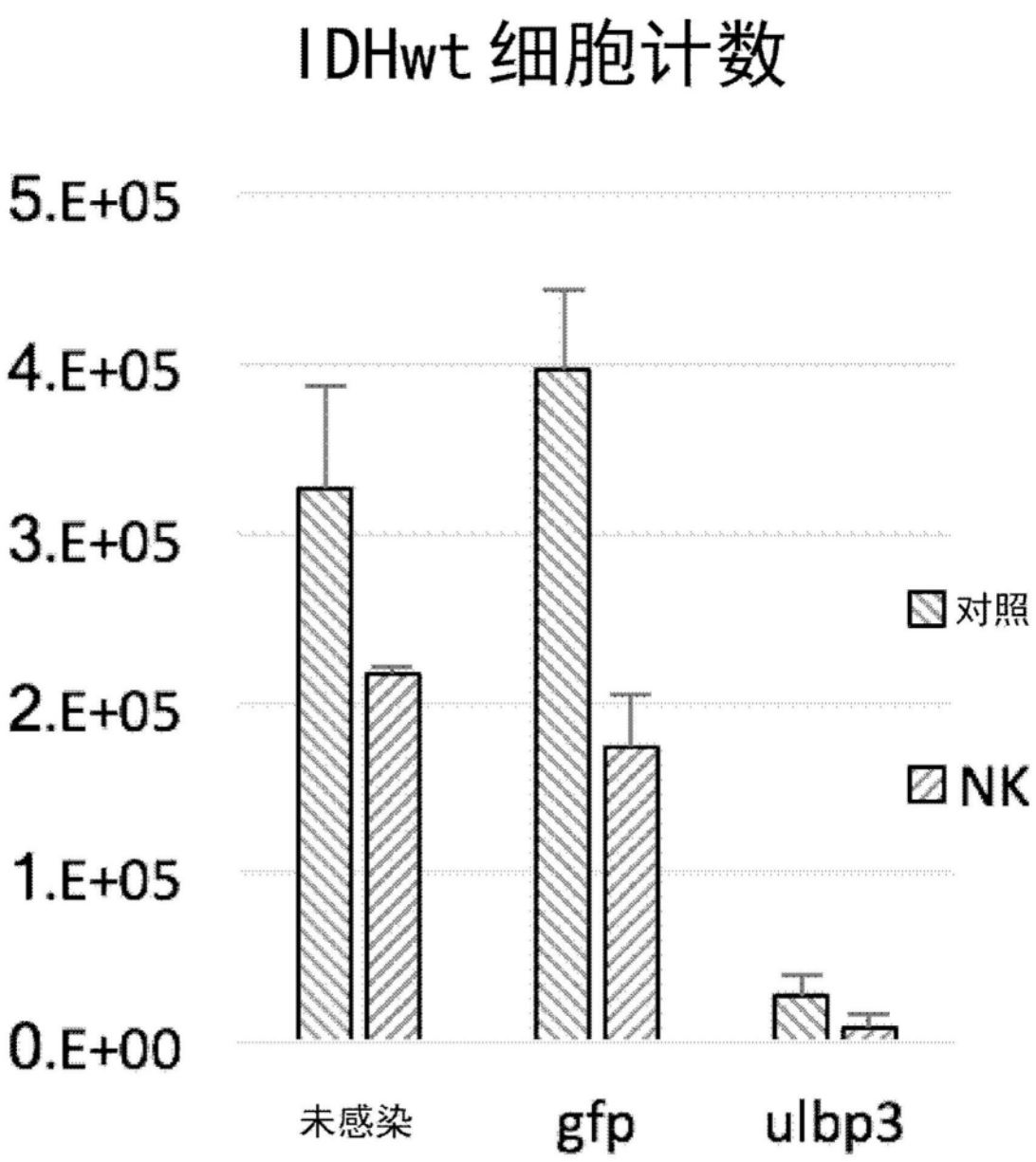


图9A

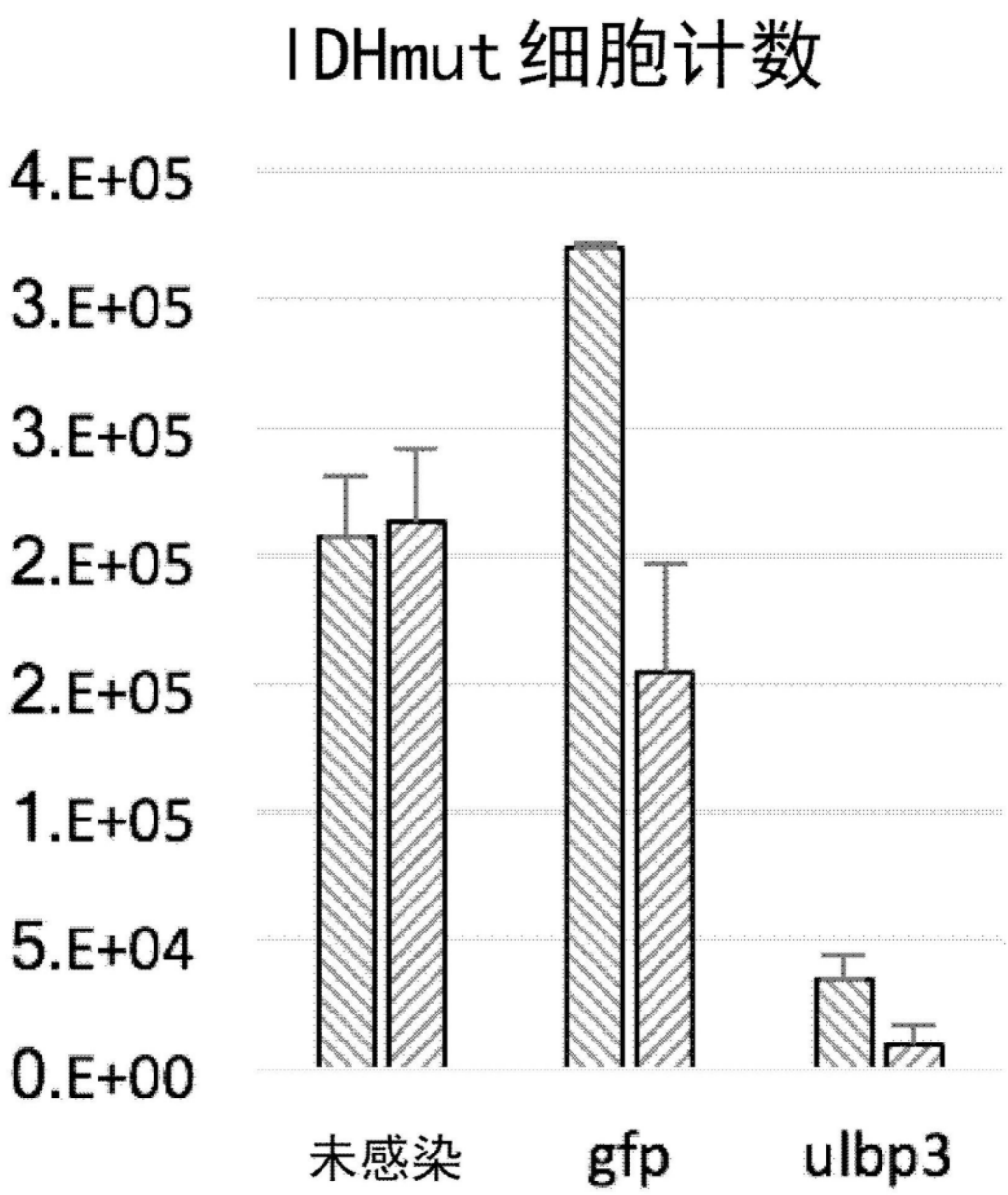

IDHmut细胞计数
4.E+05
3.E+05
3.E+05
2.E+05
2.E+05
1.E+05
5.E+04
0.E+00
未感染
gfp
ulbp3

图9B

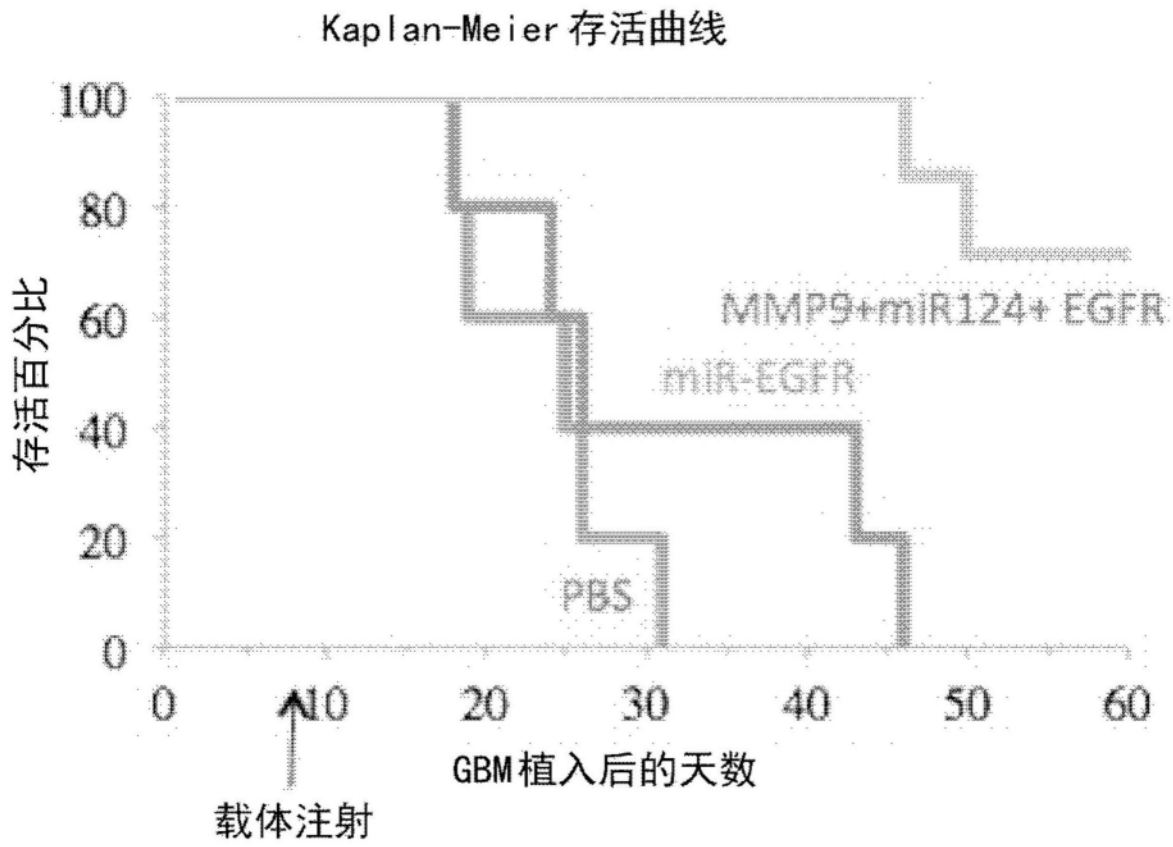

Kaplan-Meier 存活曲线
100
80
60
40
20
0
存活百分比
MMP9+miR124+ EGFR
miR-EGFR
PBS
0
10
20
30
40
50
60
GBM植入后的天数
载体注射

图9C

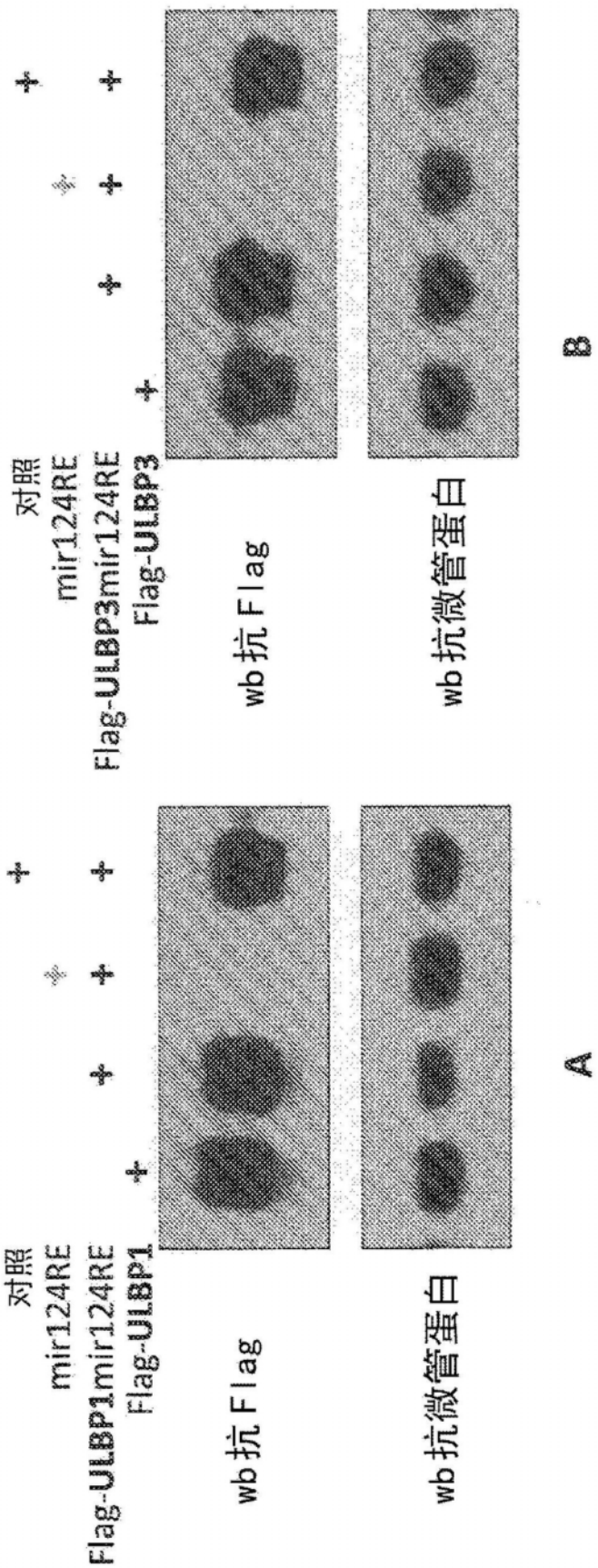

对照
mir124RE
Flag-ULBP1mir124RE
Flag-ULBP1
wb抗Flag
wb抗微管蛋白
A
对照
mir124RE
Flag-ULBP3mir124RE
Flag-ULBP3
wb抗Flag
wb抗微管蛋白
B

图10

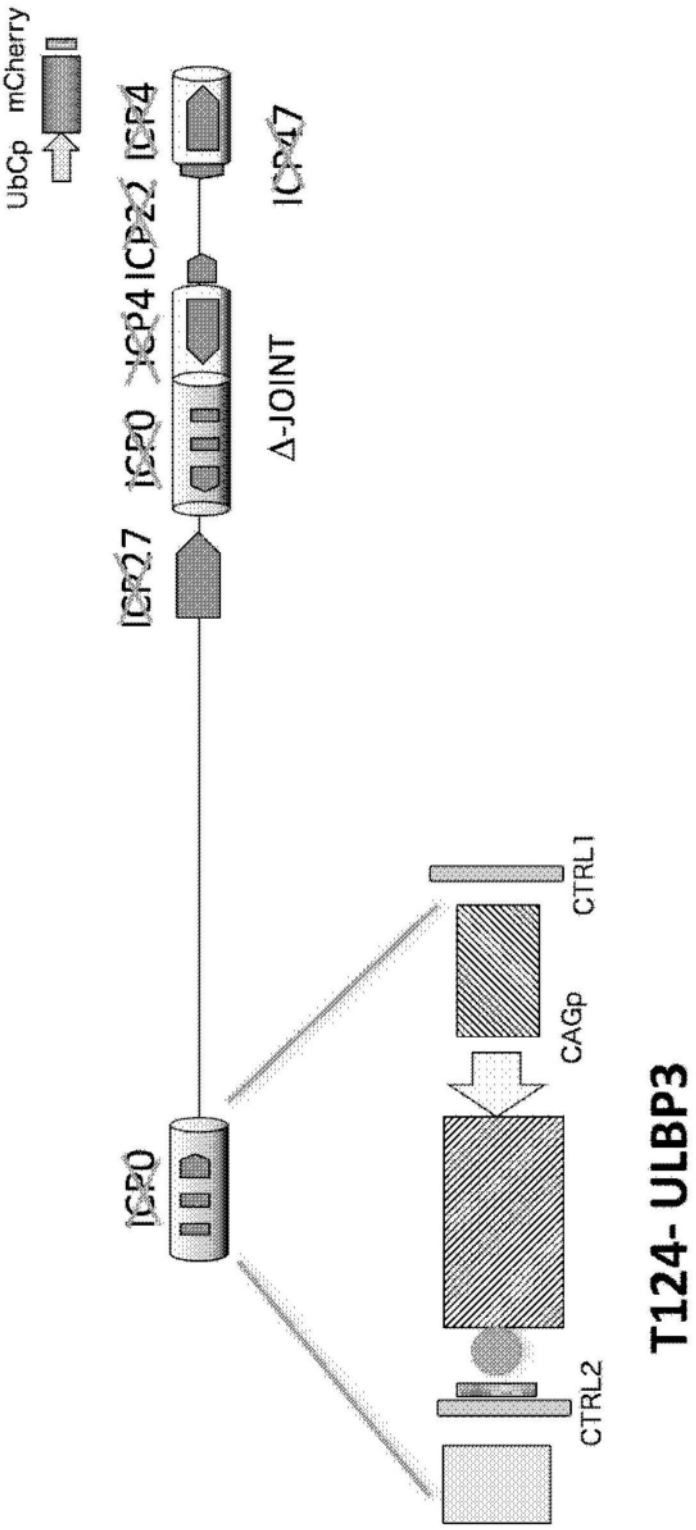

UbCp
mCherry
ICP4
ICP22
ICP47
ICP4
ICP0
Δ-JOINT
ICP27
ICP0
CTRL1
CAGp
CTRL2
T124- ULBP3

图11

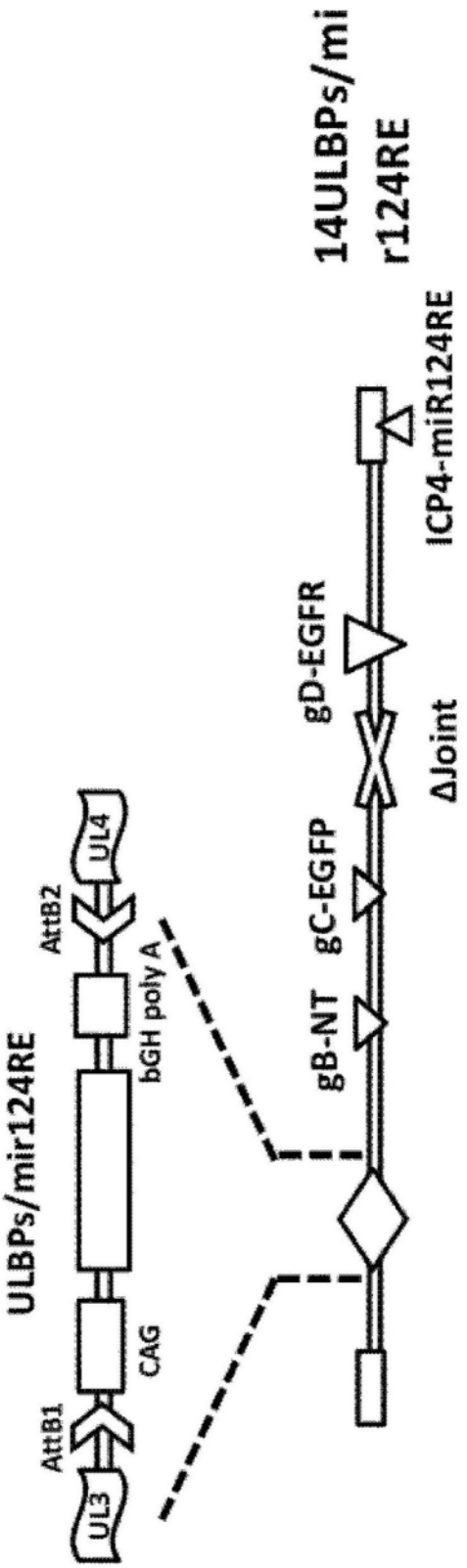

14ULBPs/mi
r124RE
ICP4-miR124RE
ΔJoint
gD-EGFR
gC-EGFP
gB-NT
bGH poly A
AttB2
UL4
ULBPs/mir124RE
CAG
AttB1
UL3

图12A

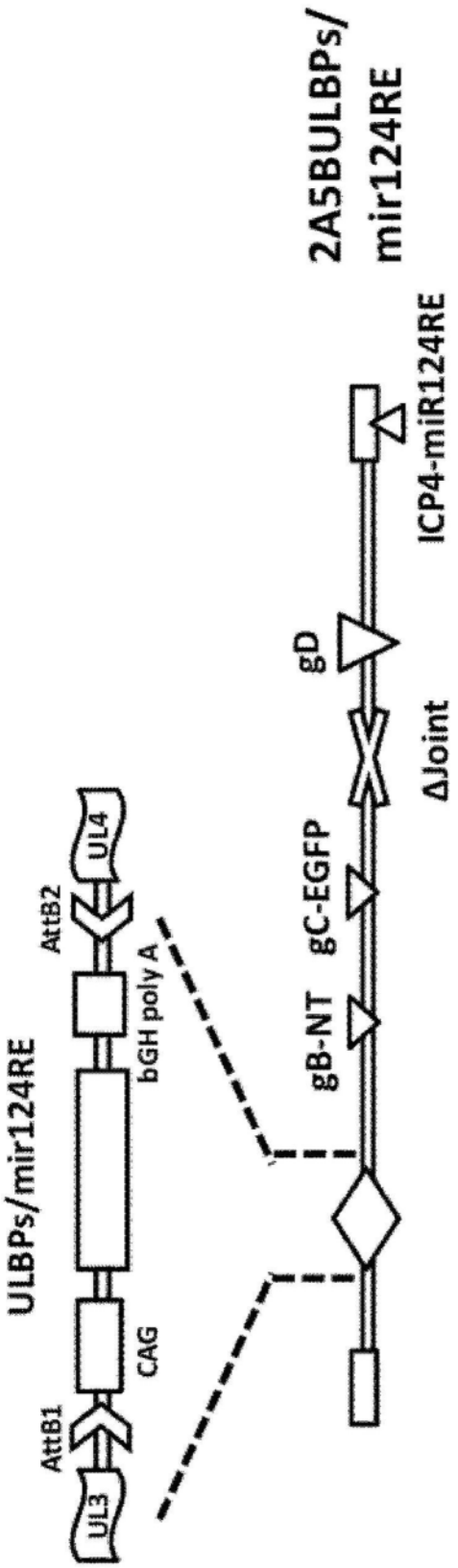

2A5BULBPs/
mir124RE
ICP4-miR124RE
gD
ΔJoint
gC-EGFP
gB-NT
bGH poly A
AttB2
UL4
ULBPs/mir124RE
CAG
AttB1
UL3

图12B

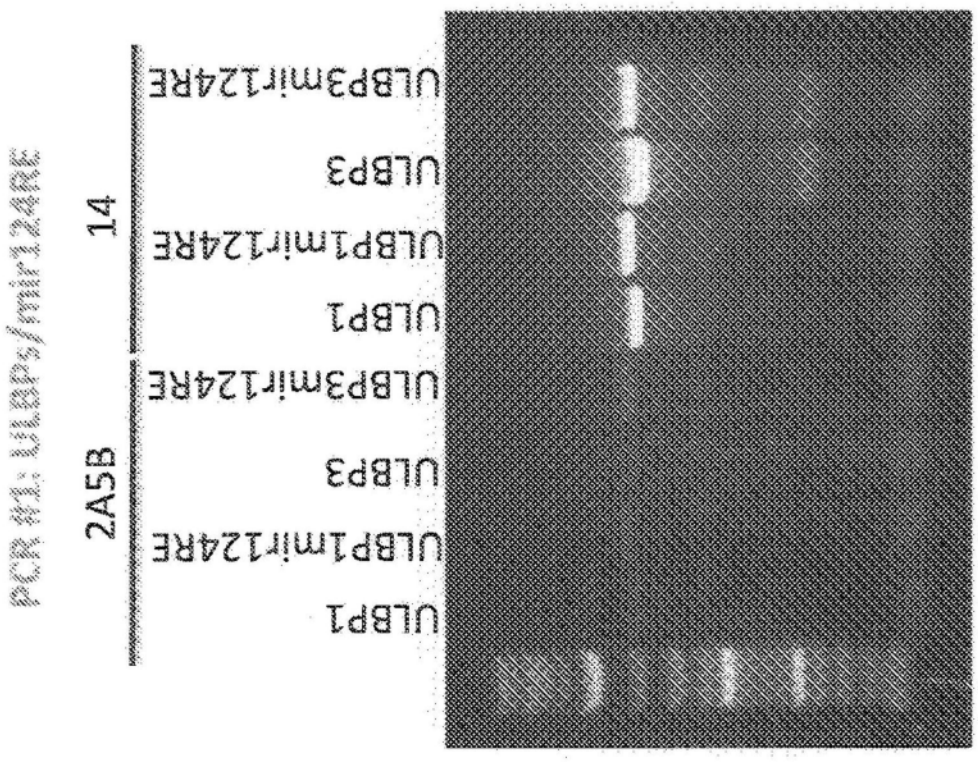

PCR #1: ULBPs/mir124RE
14
2A5B
ULBP3mir124RE
ULBP3
ULBP1mir124RE
ULBP1
ULBP3mir124RE
ULBP3
ULBP1mir124RE
ULBP1

图13A

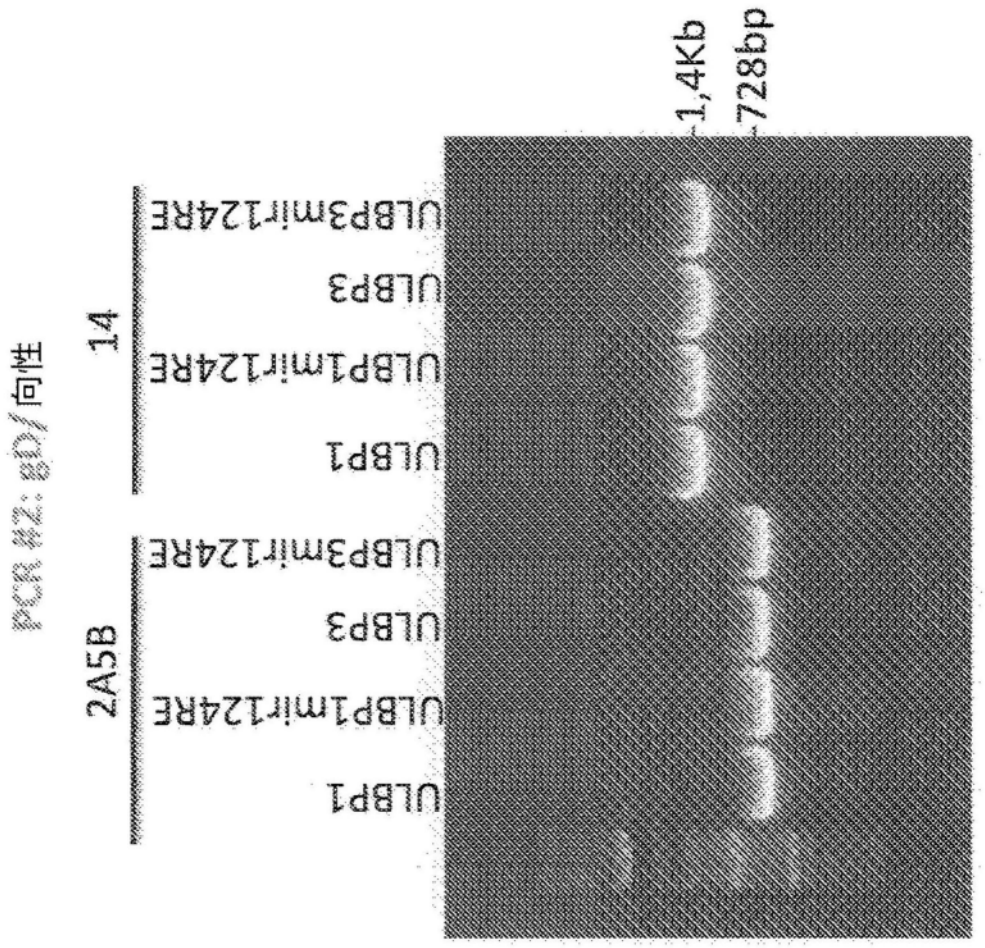

1,4Kb
728bp
PCR #2: 8D/向性
14
2A5B
ULBP3mir124RE
ULBP3
ULBP1mir124RE
ULBP1
ULBP3mir124RE
ULBP3
ULBP1mir124RE
ULBP1

图13B

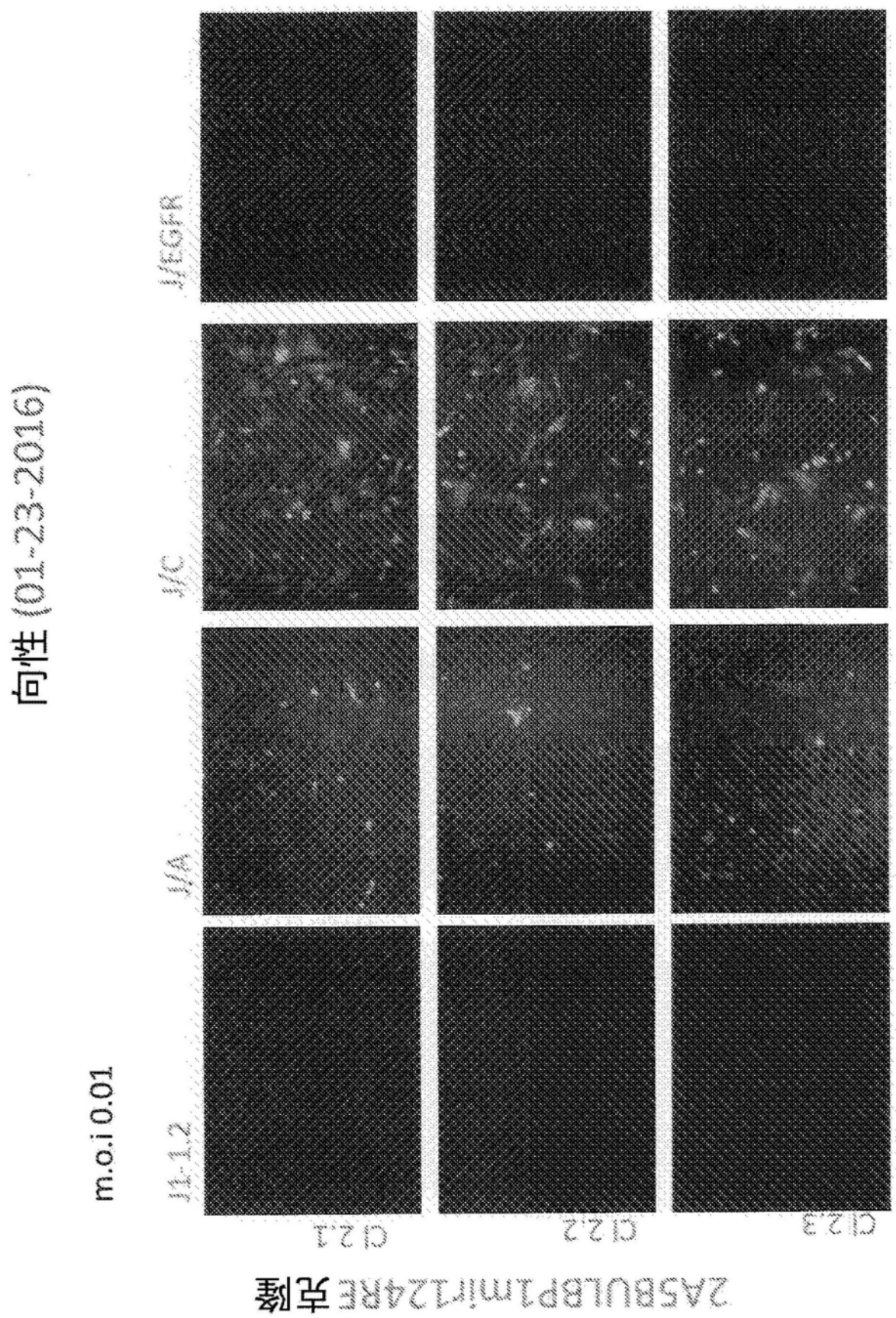

克隆 2A5BULBP1mirl24RE
Cl 2.1
Cl 2.2
Cl 2.3
J1-1.2
J/A
J/C
J/EGFR
m.o.i 0.01
向性 (01-23-2016)

图14

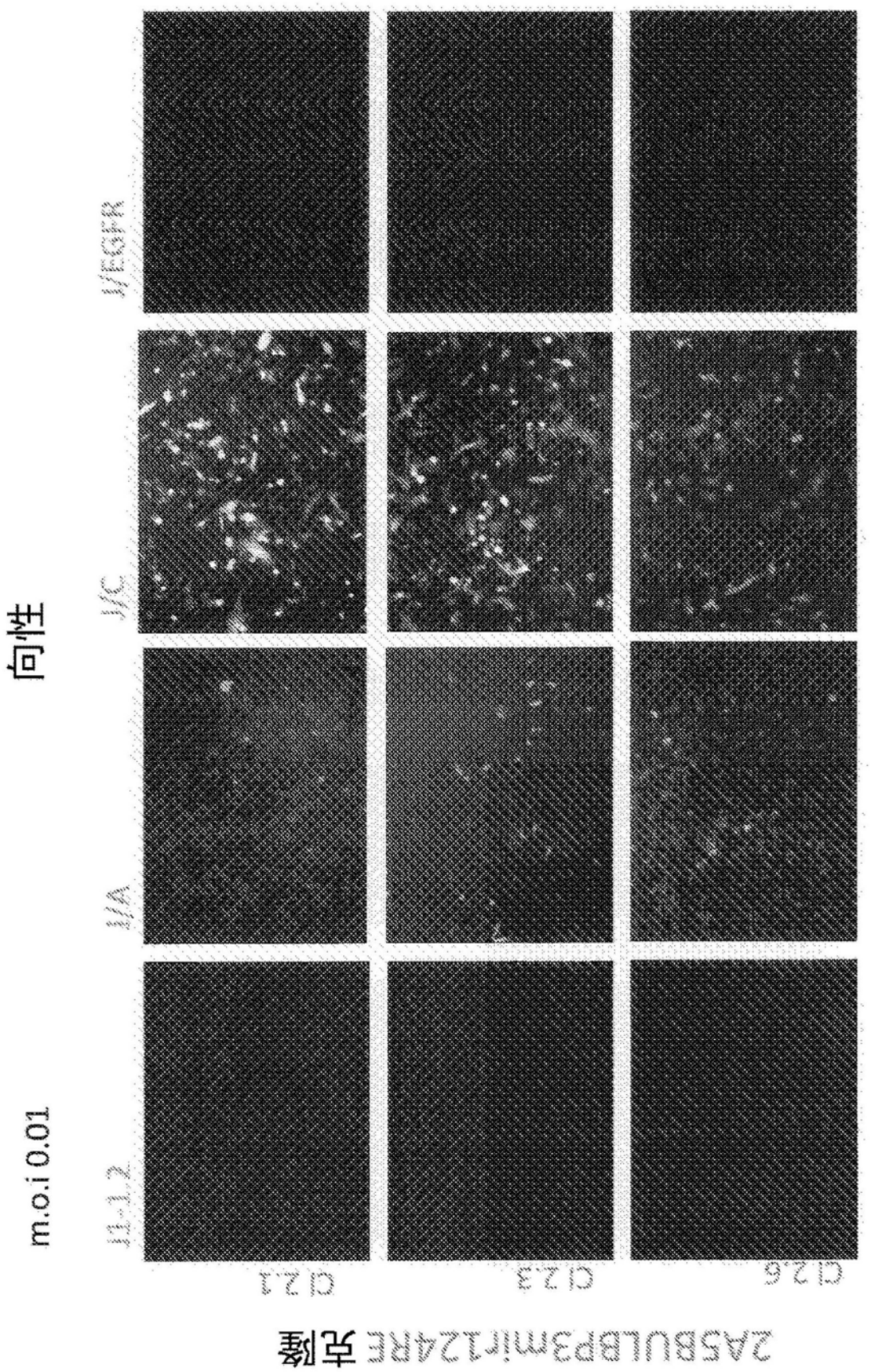

克隆
2A5BULBP3mirL24RE
Cl 2.6
Cl 2.3
Cl 2.1
m.o.i 0.01
H-1.2
1/A
J/C
J/EGFR
向性

图15

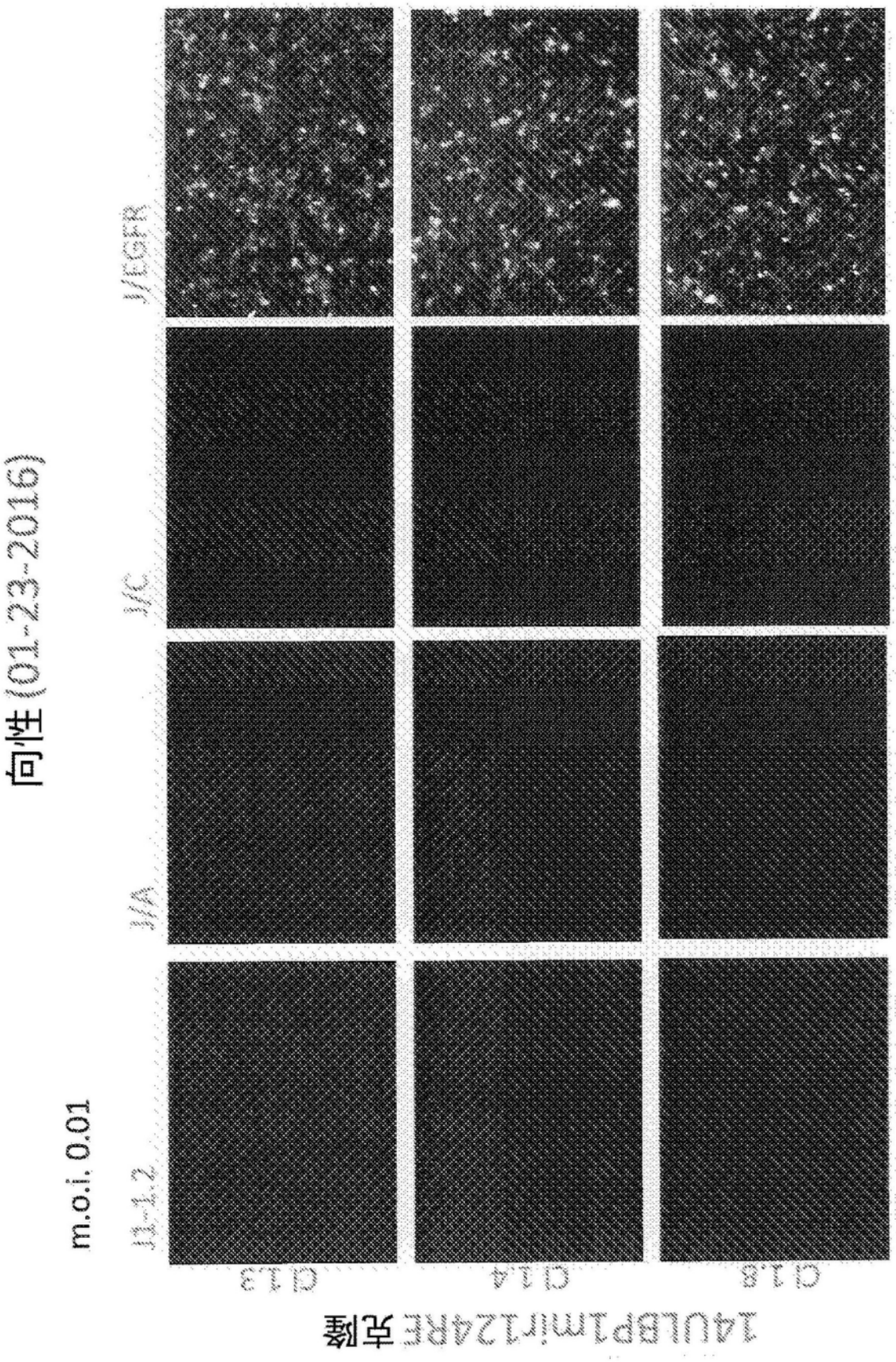

14ULBP1mir124RE 克隆
Cl 1.3
Cl 1.4
Cl 1.8
J1-1.2
m.o.i. 0.01
J/A
J/C
J/EGFR
向性 (01-23-2016)

图16

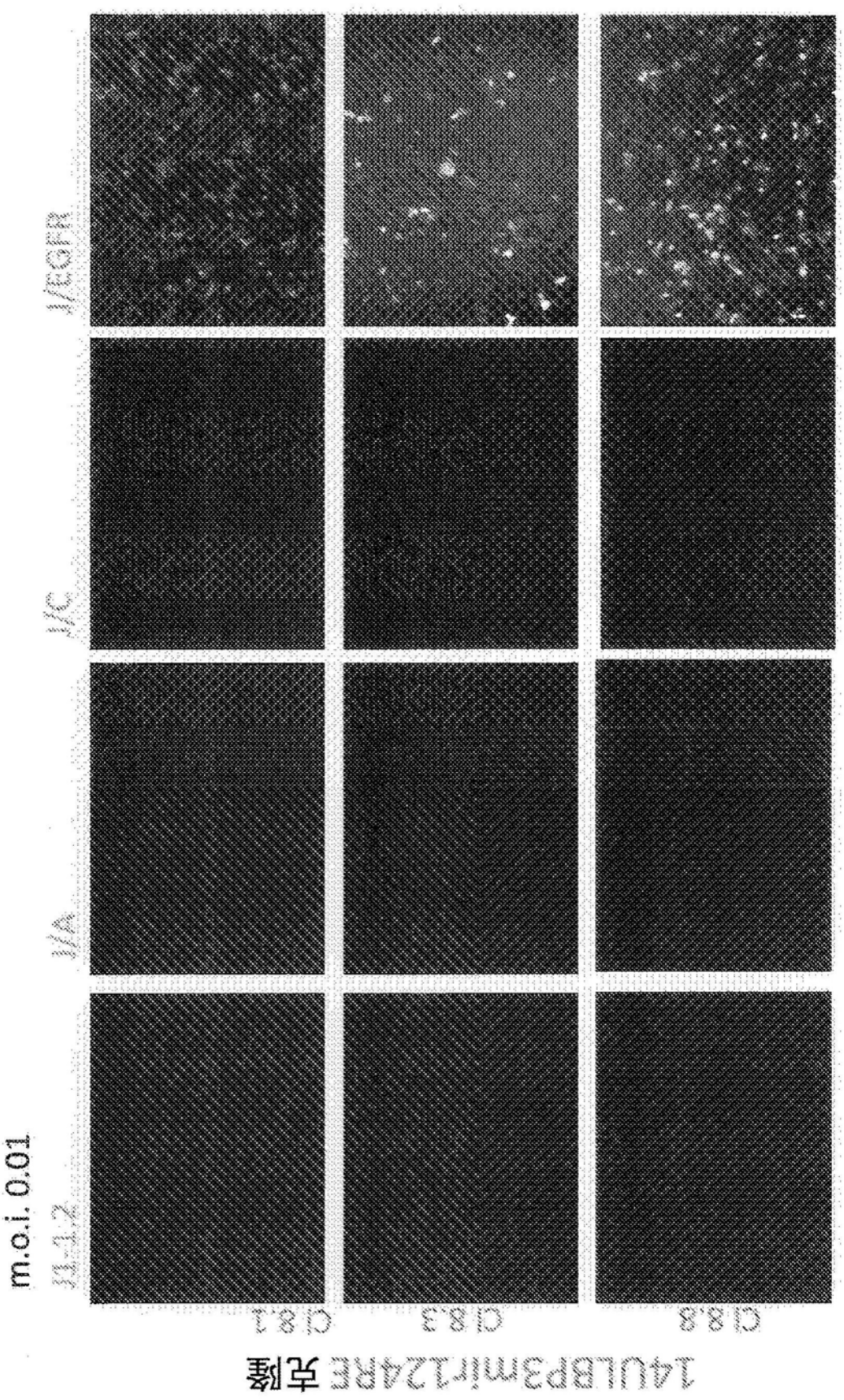


图17

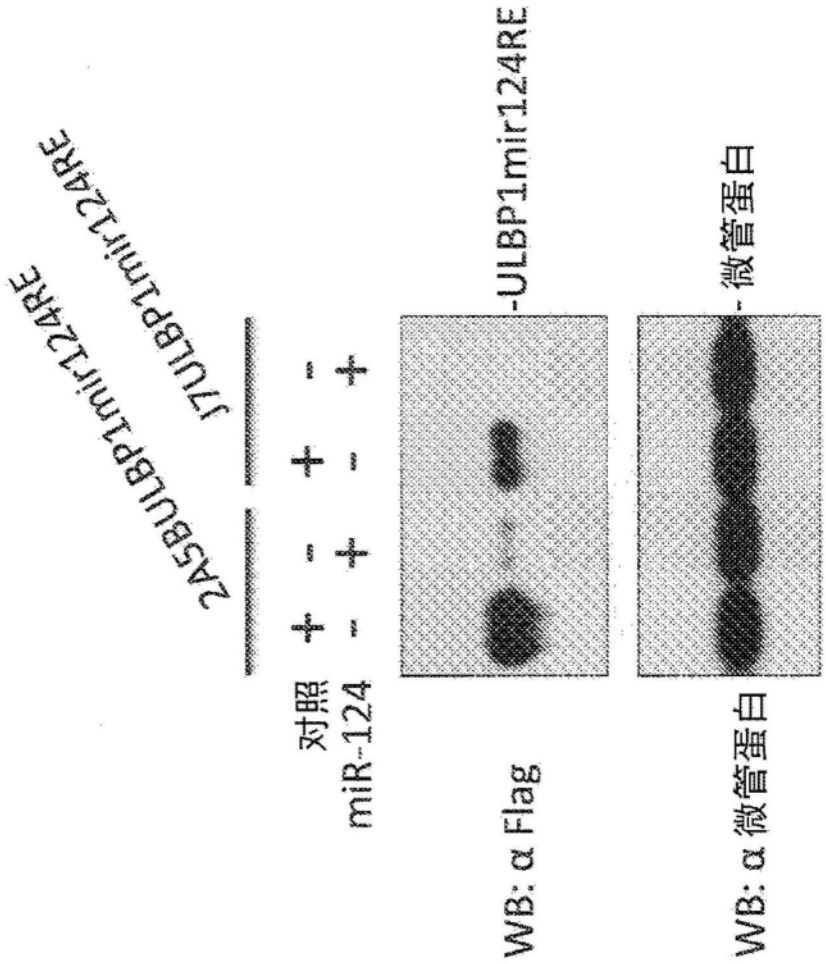

2A5BULBP1mir124RE
J7ULBP1mir124RE
对照 + - + - +
miR-124 - + - + -
-ULBP1mir124RE
- 微管蛋白
WB: α Flag
WB: α 微管蛋白

图18

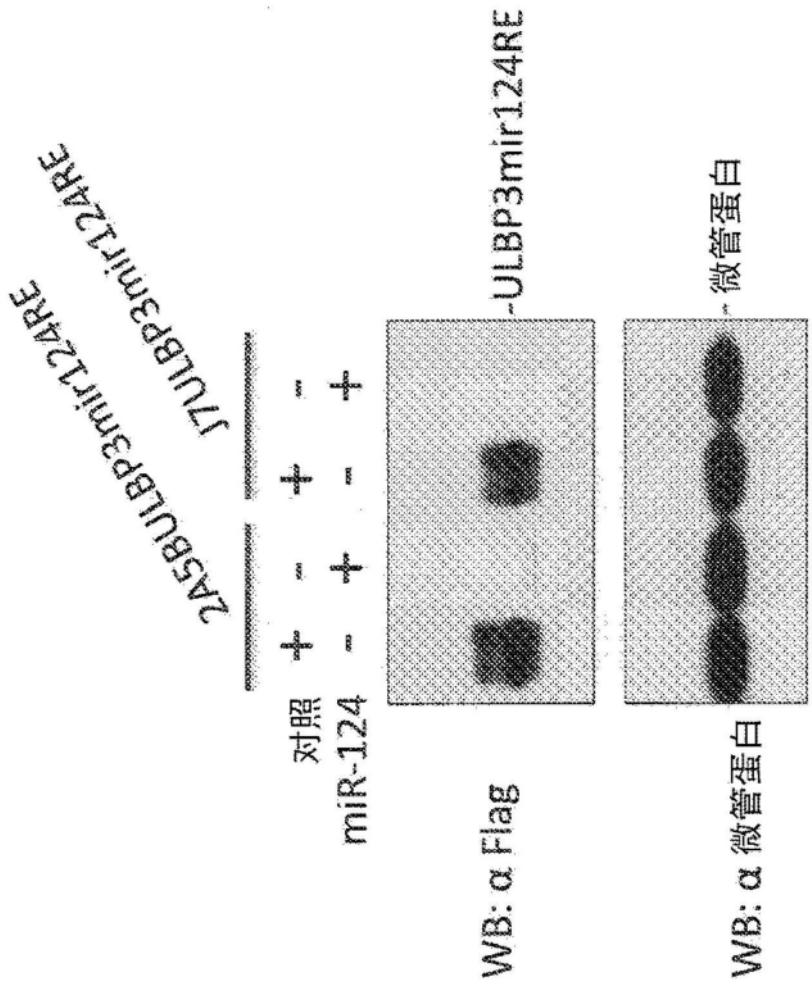

2A5BULBP3mir124RE
J7ULBP3mir124RE
对照 + - + - +
miR-124 - + - + -
-ULBP3mir124RE
微管蛋白
WB: α Flag
WB: α 微管蛋白

图19

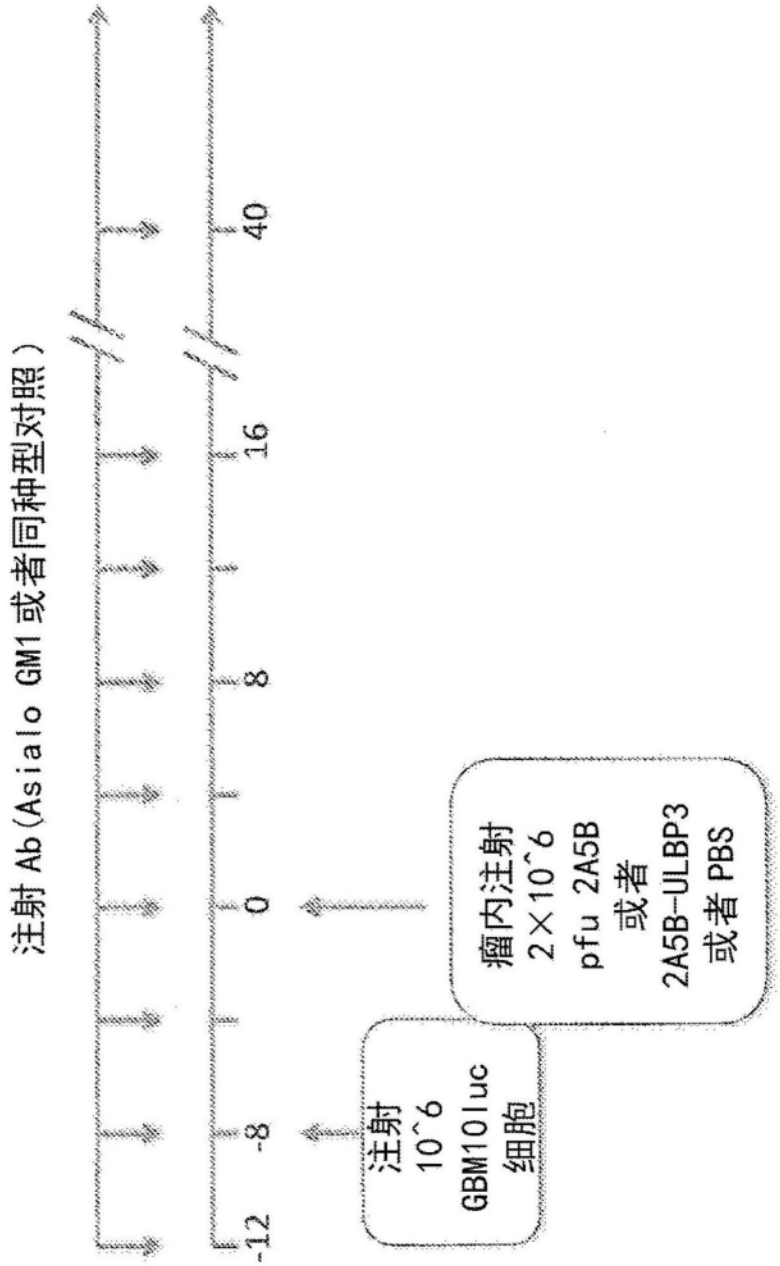

注射 Ab(Asialo GM1 或者同种型对照)
-12
-8
0
8
16
40
注射
10^6
GBM10luc
细胞
瘤内注射
2×10^6
pfu 2A5B
或者
2A5B-ULBP3
或者 PBS

图20

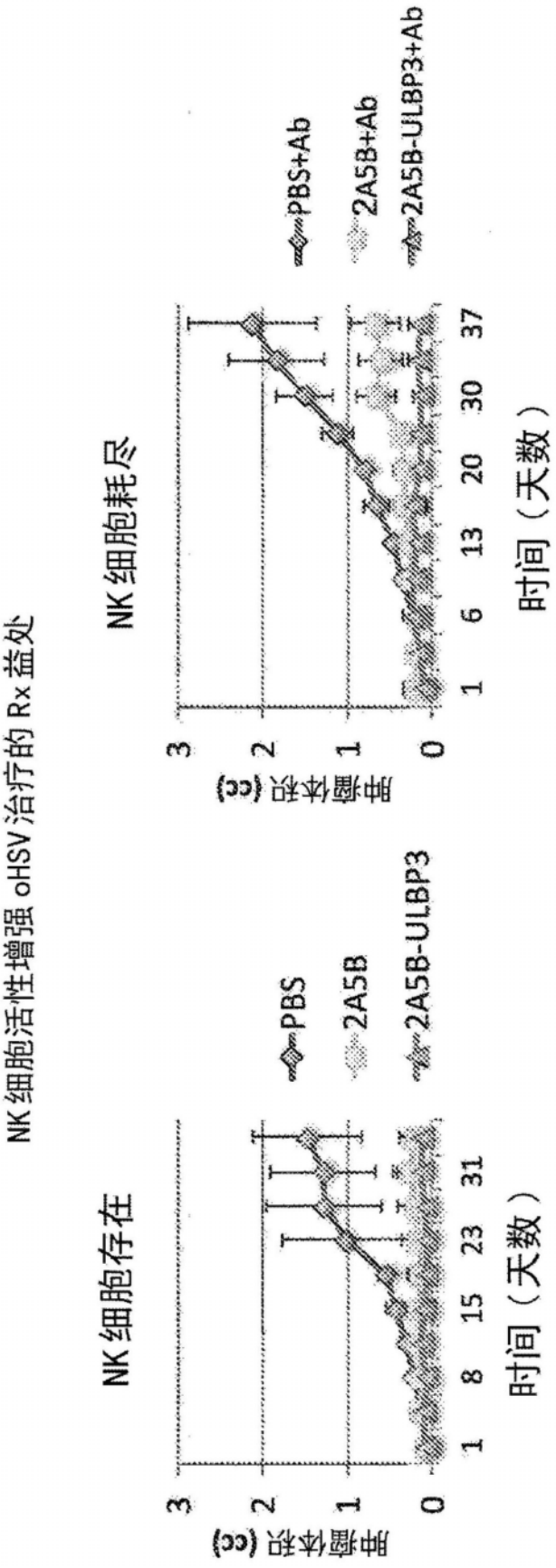

NK细胞活性增强 oHSV治疗的 Rx 益处
NK细胞存在
NK细胞耗尽
肿瘤体积 (cc)
时间（天数）
PBS
2A5B
2A5B-ULBP3
PBS+Ab
2A5B+Ab
2A5B-ULBP3+Ab
0
1
2
3
1
8
15
23
31
1
6
13
20
30
37

图21

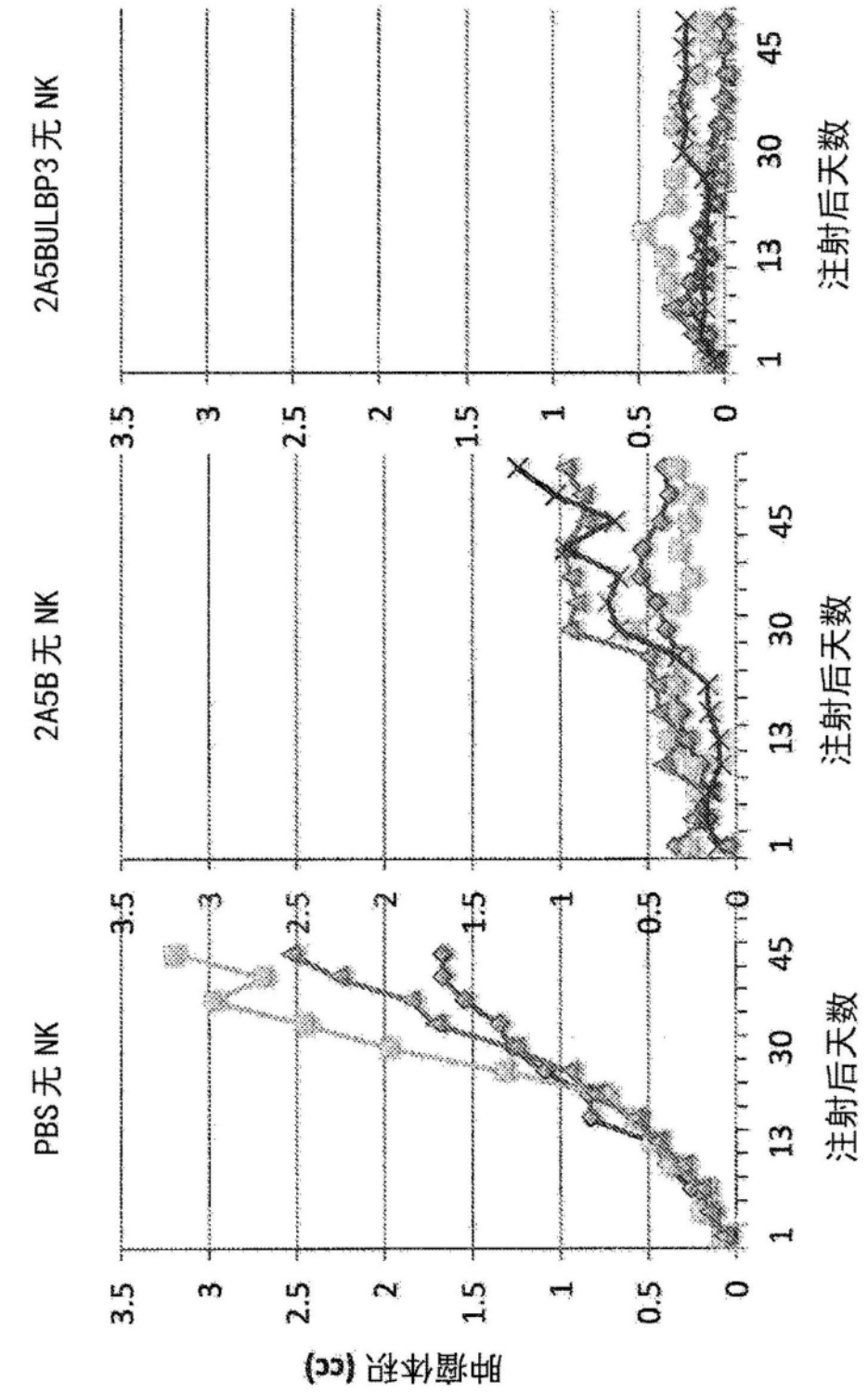

PBS 无 NK
2A5B 无 NK
2A5BULBP3 无 NK
肿瘤体积 (cc)
注射后天数
注射后天数
注射后天数
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
1
13
30
45

图22A

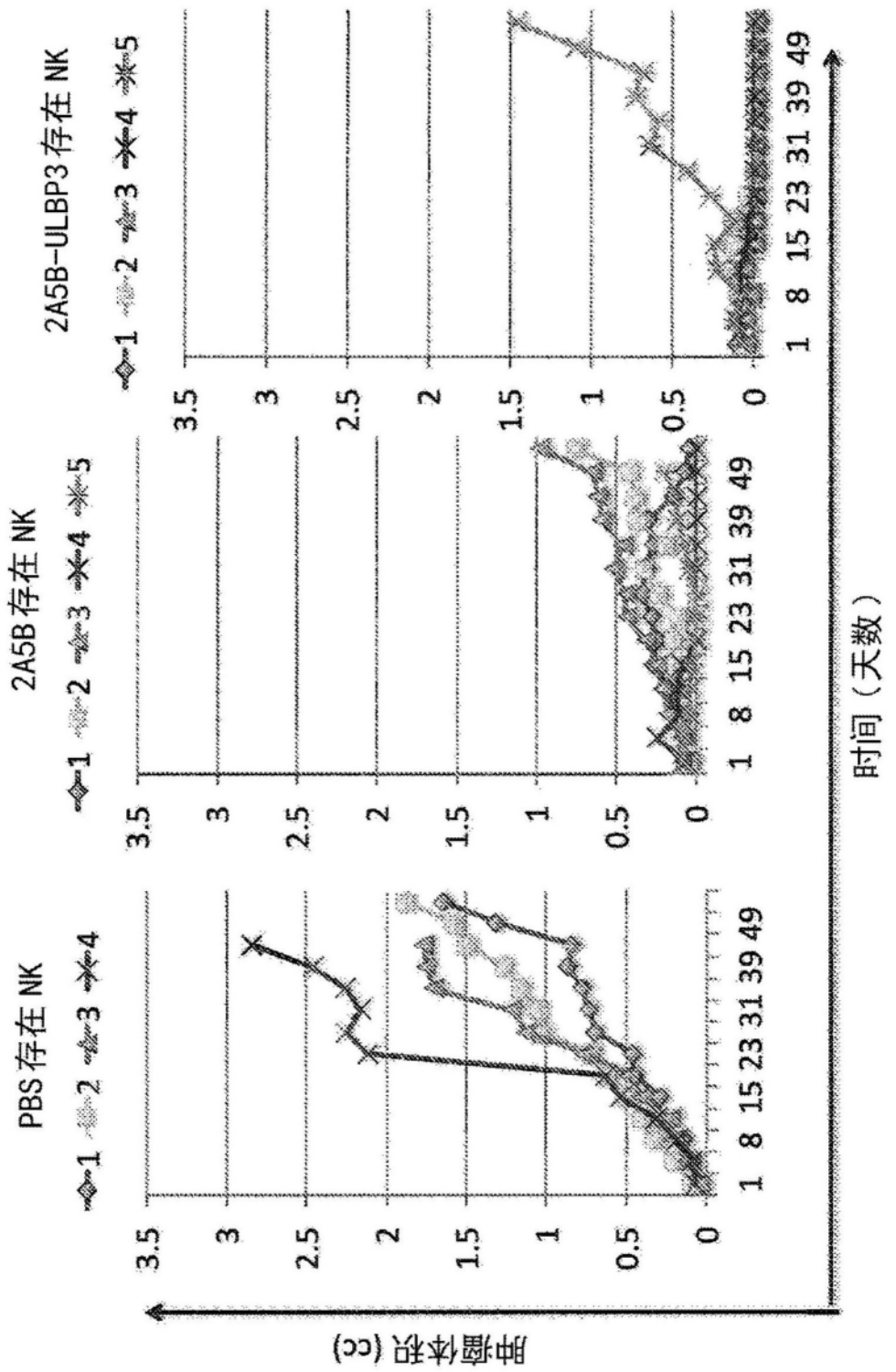

PBS 存在 NK
2A5B 存在 NK
2A5B-ULBP3 存在 NK
1
2
3
4
5
肿瘤体积 (cc)
时间（天数）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
1 8 15 23 31 39 49

图22B