



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118853594 A

(43) 申请公布日 2024.10.29

(21) 申请号 202410528631.4

C12N 15/39 (2006.01)

(22) 申请日 2017.08.09

C12N 15/13 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/863 (2006.01)

62/372,408 2016.08.09 US

A61K 35/76 (2015.01)

62/519,010 2017.06.13 US

A61P 35/00 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201780062335.8 2017.08.09

(71) 申请人 希望之城

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 Y·方 N·陈

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

专利代理人 王健 林晓红

(51) Int.Cl.

C12N 7/01 (2006.01)

权利要求书1页 说明书86页

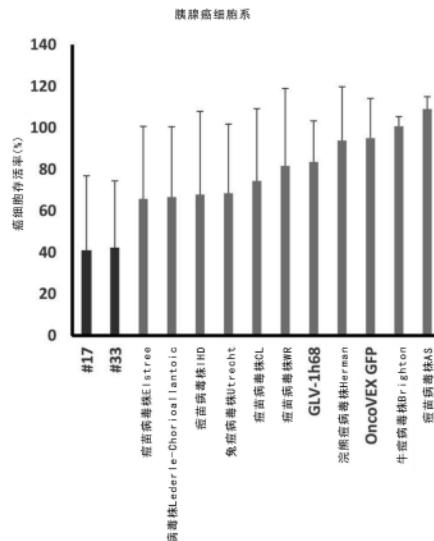
序列表(电子公布) 附图96页

(54) 发明名称

嵌合痘病毒组合物及其用途

(57) 摘要

本文提供的尤其是病毒组合物及其施用方法。所提供的病毒组合物尤其包括治疗有效量的嵌合痘病毒，并且特别用于治疗癌症的方法。本文提供的嵌合痘病毒可进一步包括转基因。



1.一种嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包含:

(i)来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段:牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS;

(ii)一种或多种抗癌核酸序列;或

(iii)编码可检测的部分的核酸序列。

2.权利要求1的嵌合痘病毒,其中所述一种或多种抗癌核酸序列形成所述嵌合痘病毒的非必需基因的一部分。

3.一种治疗有此需要的对象的癌症的方法,所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的权利要求1或2的嵌合痘病毒,从而治疗所述对象的癌症。

4.权利要求3的方法,其中所述癌症是乳腺癌、结肠癌、肾癌、白血病、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、肝癌、胃癌或肉瘤。

5.权利要求3或4的方法,其中所述癌症是三阴性乳腺癌。

6.一种形成嵌合痘病毒的方法,所述方法包括:(i)用至少两种选自以下的痘病毒株感染细胞:牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS;以及(ii)使所述至少两个痘病毒株复制,从而形成所述嵌合痘病毒。

7.一种抑制细胞的细胞增殖的方法,所述方法包括使细胞与权利要求1或2的嵌合痘病毒接触。

8.权利要求7的方法,其中所述细胞是癌细胞。

9.权利要求8的方法,其中所述癌细胞是乳腺癌细胞、结肠癌细胞、肾癌细胞、白血病细胞、肺癌细胞、黑素瘤细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、胰腺癌细胞、脑癌细胞、肝癌细胞、胃癌细胞或肉瘤细胞。

10.权利要求8或9的方法,其中所述癌细胞是三阴性乳腺癌细胞。

## 嵌合痘病毒组合物及其用途

本申请是2017年8月9日提交的题为“嵌合痘病毒组合物及其用途”的中国专利申请201780062335.8的分案申请。

### 相关申请的交叉引用

本申请要求2016年8月9日提交的美国临时申请No.62/372,408和2017年6月13日提交的美国临时申请No.62/519,010的优先权，其全部内容通过引用并入本文并用于所有目的。

### 引用以ASCII文件提交的“序列表”、表格或计算机程序列表附录

在2017年8月8日创建的文件48440-606001W0\_ST25中编写的序列表，696,239字节，机器格式IBM-PC,MS-Windows操作系统，在此通过引用并入本文。

## 背景技术

癌症是美国第二大死因。近年来，在癌症免疫疗法方面取得了很大进展，包括免疫检查点抑制剂、具有嵌合抗原受体的T细胞和溶瘤病毒。溶瘤病毒是天然存在的或经遗传修饰的病毒，其感染癌细胞、在癌细胞中复制并最终杀死癌细胞，同时不伤害健康细胞。然而，作为独立治疗的溶瘤病毒的临床益处仍然有限。本领域需要利用溶瘤病毒的有益特征同时最大化安全性和临床结果的新组合物。尤其是，本文公开了本领域中针对这些和其他问题的解决方案。

## 发明内容

一方面，提供了嵌合痘病毒，其包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列，其中所述核酸序列包括来自至少两个痘病毒毒株的核酸片段，所述痘病毒毒株选自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

一方面，提供了编码如本文所述的嵌合痘病毒的分离的核酸。

一方面，提供了药物组合物，其包含治疗有效量的如本文所述的嵌合痘病毒。

另一方面，提供了治疗由此需要的对象中的癌症的方法，该方法包括给对象施用治疗有效量的如本文所述的嵌合痘病毒，从而治疗对象中的癌症。在实施方案中，癌症是乳腺癌、结肠癌、肾癌、白血病、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、肝癌、胃癌或肉瘤。

另一方面，提供了一种形成嵌合痘病毒的方法，该方法包括：用至少两种选自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的痘病毒株感染细胞；并允许所述至少两个痘病毒株复制，从而形成嵌合痘病毒。

一方面，提供了抑制细胞的细胞增殖的方法，该方法包括使细胞与如本文所述的

嵌合痘病毒接触。

一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段:牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS;(ii)一种或多种抗癌核酸序列;或(iii)编码可检测部分的核酸序列。

另一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS的核酸片段;(ii)一种或多种抗癌核酸序列;或(iii)编码可检测部分的核酸序列。

另一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段;(ii)一种或多种抗癌核酸序列;或(iii)编码可检测部分的核酸序列。

另一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:3具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS的核酸片段;(ii)一种或多种抗癌核酸序列;或(iii)编码可检测部分的核酸序列。

一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段:牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS;(ii)一种或多种抗癌核酸序列;(iii)一种或多种核酸结合序列;或(iv)编码可检测部分的核酸序列。

另一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS的核酸片段;(ii)一种或多种抗癌核酸序列;(iii)一种或多种核酸结合序列;或(iv)编码可检测部分的核酸序列。

另一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段;(ii)一种或多种抗癌核酸序列;(iii)一种或多种核酸结合序列;或(iv)编码可检测部分的核酸序列。

另一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:3具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘

苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS的核酸片段; (ii) 一种或多种抗癌核酸序列; (iii) 一种或多种核酸结合序列; 或 (iv) 编码可检测部分的核酸序列。

## 附图说明

图1. 与亲本个体野生型病毒株和对照病毒GLV-1h68和OncovEX GFP相比,新型嵌合正痘病毒分离株#33 (SEQ ID NO:1) 和#17 (SEQ ID NO:3) 显示出优异的癌细胞杀伤能力。

图2. 与亲本个体野生型病毒株和对照病毒GLV-1h68和OncovEX GFP相比,新型嵌合副痘病毒分离株#189 (SEQ ID NO:2) 显示出优异的癌细胞杀伤能力。

图3. 与其亲本病毒株和对照病毒GLV-1h68和OncovEX GFP相比,新型嵌合正痘病毒分离株#17 (SEQ ID NO:3) 和#33 (SEQ ID NO:1) 在胰腺癌细胞系中显示出有效的癌细胞杀伤能力。

图4. 与其亲本病毒株和对照病毒GLV-1h68和OncovEX GFP相比,新型嵌合副痘病毒分离株#189 (SEQ ID NO:2) 在胰腺癌细胞系中显示出有效的癌细胞杀伤能力。

图5A-5C. 新型嵌合病毒分离株#33 (SEQ ID NO:1) 和#189 (SEQ ID NO:2) 在胃癌细胞系中显示出优异的细胞杀伤活性。每种病毒以0.01、0.1和1.0的MOI感染癌细胞。感染后96小时的细胞活力再次以MOI绘制MKN-45 (图5A), OCUM-2M (图5B) 和KATO-3 (图5C) 胃细胞系。

图6A-6D. HOV-189 (SEQ ID NO:2) 在体外的细胞毒性作用在三阴性乳腺癌细胞系中都是时间和剂量依赖性的。(图6A) Hs578T.LD50, MOI 0.396 (SD 0.113), (图6B) BT549.LD50, MOI 1.636 (SD 0.539), (图6C) MDA-MB-468.LD50, MOI 0.185 (SD 0.071), (图6D) MDA-MB-231.LD50, MOI 1.712 (SD 1.263)。LD50 (96小时), 半数致死剂量; MOI, 感染复数; SD, 标准差。

图7. 在三阴性乳腺癌细胞系中复制HOV-189 (SEQ ID NO:2)。在低感染复数 (MOI 0.01) 下, 在体外BT549、Hs578T和MDA-MB-231细胞系中发生了有效的病毒复制。MDA-MB-468 中的HOV-189 复制在MOI 0.01下较差。在MOI 10中, MDA-MB-468 中的HOV-189 复制比其他三种细胞系保持几乎低两个对数。

图8. 与对照相比,在MDA-MB-468异种移植物中以低至 $10^3$ PFU每个肿瘤的剂量肿瘤内注射HOV-189 (SEQ ID NO:2) 有效地降低了相对肿瘤大小。向肿瘤注射PBS (对照)、 $10^3$ PFU每个肿瘤、 $10^4$ PFU每个肿瘤或 $10^5$ PFU每个肿瘤, 初始肿瘤体积为约 $100\text{--}150\text{mm}^3$ 。大约每3天测量肿瘤大小, 并且治疗效果在注射后维持6周。

图9. 与经PBS注射的对照相比,在用肿瘤内注射HOV-189 (SEQ ID NO:2) 处理的裸鼠中未观察到相对体重的显著降低。大约每3天测量体重。

图10A-10C. HOV-189 (SEQ ID NO:2) 在体内感染MDA-MB-468肿瘤。针对羊传染性口疮病毒的多克隆抗体的免疫荧光检测显示在肿瘤内注射HOV-189后1周收获的MDA-MB-468 异种移植肿瘤组织的病毒感染。(图10A) 对照肿瘤, 10X, (图10B) 来自 $10^5$ PFU治疗组的肿瘤, 10X, (图10C) 来自 $10^5$ PFU治疗组的肿瘤, 60X。(ORF和DAPI复染)。

图11. 肿瘤内注射HOV-189 (SEQ ID NO:2) 对远端未经注射的肿瘤产生肿瘤抑制作用(tumoristatic effect)。在MDA-MB-468异种移植物中产生的第二乳腺肿瘤用 $10^5$ PFU的单次肿瘤内注射HOV-189进行处理, 而未注射第四乳腺肿瘤。用PBS注射对照肿瘤。大约每3

天测量肿瘤大小。

图12A-12L.通过在含有100 $\mu$ L RPMI、5% FBS、1% 抗生素-抗真菌溶液的每孔中铺板3 $\times$ 10<sup>3</sup>个癌细胞,对PANC-1、MiaPaCa-2、BxPC-3、SU.86.86、Capan-1和AsPC-1癌细胞系进行24小时细胞毒性测定。然后以1、0.1和0.01的感染复数(MOI)加入20 $\mu$ L所示病毒。通过向所有孔中加入20 $\mu$ L CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay并在孵育1小时后进行比色读数来进行每日细胞活力测定。实验结果标准化为仅培养基和MOI 0对照。该实验重复三次。呈现的是显示用#33以1、0.1或0.01的MOI处理的PANC-1(图12A)、MiaPaCa-2(图12C)、BxPC-3(图12E)、SU.86.86(图12G)、Capan-1(图12I)和AsPC-1(图12K)随时间的细胞存活百分比。还给出了比较用所示病毒处理的癌细胞PANC-1(图12B)、MiaPaCa-2(图12D)、BxPC-3(图12F)、SU.86.86(图12H)、Capan-1(图12J)和AsPC-1(图12L)在120小时的细胞存活百分比的柱状图。进行统计分析,将#33与其他实验组进行比较,如在每个时间点使用单因素方差分析(One-Way ANOVA)所示。对于SU.86.86(图12H),在每个MOI下使用非配对t检验进行统计学分析。

图13A-13L.通过在含有2mL RPMI、10% FBS、1% 抗生素-抗真菌溶液的每孔铺板5 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞,对PANC-1、MiaPaCa-2、BxPC-3、SU.86.86、Capan-1和AsPC-1癌细胞系进行24小时病毒复制曲线,重复三次。然后吸出培养基并以500 $\mu$ L RPMI、2.5% FBS、1% 抗生素-抗真菌溶液中的感染复数(MOI)0.01加入#33、OncoVEX GFP、GLV-1h68或#189,达1小时,每20分钟摇动。在1小时时,吸出培养基并加入1.5mL RPMI、2.5% FBS、1% 抗生素-抗真菌溶液。在24、48和72小时,收集细胞和上清液,并在三次冷冻和解冻循环后,重复两次进行连续稀释。重复两次该实验。呈现的是显示用如所示病毒处理的PANC-1(图13A)、MiaPaCa-2(图13C)、BxPC-3(图13E)、SU.86.86(图13G)、Capan-1(图13I)和AsPC-1(图13K)癌细胞随时间的PFU/百万细胞的图。还给出了比较PANC-1(图13B)、MiaPaCa-2(图13D)、BxPC-3(图13F)、SU.86.86(图13H)、Capan-1(图13J)和AsPC-1(图13L)处理的癌细胞中每种病毒在每个时间点的PFU/百万细胞的条形图。在每个时间点使用单因素方差分析比较#33与其他实验组的统计学分析。

图14A-14C.十八只无胸腺Nude-Foxn1<sup>nug</sup>雌性裸鼠(Envigo, Indianapolis, IN)植入了2 $\times$ 10<sup>6</sup>个MiaPaCa-2的双侧腹肿瘤。一旦肿瘤尺寸达到400mm<sup>3</sup>,左侧肿瘤注射50 $\mu$ L PBS(3只小鼠)、以大约1 $\times$ 10<sup>5</sup> PFU/剂注射#33(5只小鼠)、#33-(SE) hNIS或#33-(SE) hNIS-E9LmiR100t(5只小鼠)。每周记录两次净重量变化百分比(图14A)和经注射肿瘤的变化百分比(图14B)和未经注射肿瘤的变化百分比(图14C),持续43天。

图15A-15C.二十六只无胸腺Nude-Foxn1<sup>nug</sup>雌性裸鼠(Envigo, Indianapolis, IN)植入了1.25 $\times$ 10<sup>6</sup>个PANC-1的双侧腹肿瘤。一旦肿瘤尺寸达到约250mm<sup>3</sup>,左侧肿瘤注射50 $\mu$ L PBS(4只小鼠)、以约1 $\times$ 10<sup>3</sup>PFU/剂注射#33(6只小鼠)、#33-(SE) hNIS(6只小鼠)、#33-(SE) hNIS-E9LmiR100t(5只小鼠)、或#33-(H5) Fluc2。每周记录两次净重量变化百分比(图15A)和经注射肿瘤的变化百分比(图15B)和未经注射肿瘤的变化百分比(图15C),持续43天。

图16.每周两次,一只PBS对照小鼠和3只#33-(H5) Fluc2注射的小鼠腹膜内注射溶于150 $\mu$ L PBS的4.28mg荧光素。7分钟后,在标准暴露下获得荧光素酶成像。在每个时间点记录相对单位并相对于作为背景的PBS对照小鼠进行分析。

图17A-17D.通过在含有100 $\mu$ L McCoy's 5A培养基、5% FBS、1% 抗生素-抗真菌溶

液的每孔铺板 $3 \times 10^3$ 个细胞,对HT-29和HCT-116癌细胞系进行24小时细胞毒性测定。然后以感染复数(MOI)1、0.1和0.01加入20 $\mu\text{L}$ 病毒:#33、#33-(SE) hNIS、#33-(H5) Emerald、OncoVEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189。通过向所有孔中加入20 $\mu\text{L}$  CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay并在孵育1小时后进行比色读数来进行每日细胞活力测定。实验结果标准化为仅培养基和MOI 0对照。该实验重复三次。呈现的是显示用#33以MOI 1、0.1或0.01处理的HT-29(图17A)和HCT-116(图17C)随时间的细胞存活百分比的图。还呈现的是比较用所示病毒处理的HT-29(图17B)和HCT-116(图17D)癌细胞在120小时的细胞存活百分比的柱状图。进行统计学分析,将#33与其他实验组进行比较,在每个时间点使用单因素方差分析。

图18A-18F.通过在100 $\mu\text{L}$  RPMI、5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液的每孔铺板 $3 \times 10^3$ 个细胞,对SW620、SW480和COLO 320DM癌细胞系进行细胞毒性测定。然后以感染复数(MOI)1、0.1和0.01加入20 $\mu\text{L}$ 病毒:#33、#33-(SE) hNIS、#33-(H5) Emerald、OncoVEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189。通过向所有孔中加入20 $\mu\text{L}$  CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay并在孵育1小时后进行比色读数来进行每日细胞活力测定。实验结果标准化为仅培养基和MOI 0对照。该实验重复三次。呈现的是显示用#33以MOI 1、0.1或0.01处理的SW620(图18A)、SW480(图18C)和COLO 320DM(图18E)随时间的细胞存活百分比的图。还呈现的是比较用所示病毒处理的SW620(图18B)、SW480(图18D)和COLO 320DM(图18F)癌细胞在120小时的细胞存活百分比的柱状图。进行统计分析,将#33与其他实验组进行比较,在每个时间点使用单因素方差分析。比较栏上方的“NS”表示“不显著”。

图19A-19B.通过在100 $\mu\text{L}$  F-12K培养基、5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液的每孔铺板 $3 \times 10^3$ 个细胞,对LoVo癌细胞系进行细胞毒性测定。然后以感染复数(MOI)1、0.1和0.01加入20 $\mu\text{L}$ 病毒:#33、#33-(SE) hNIS、#33-(H5) Emerald、OncoVEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189。通过向所有孔中加入20 $\mu\text{L}$  CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay并在孵育1小时后进行比色读数来进行每日细胞活力测定。实验结果标准化为仅培养基和MOI 0对照。该实验重复三次。图19A显示用#33以MOI 1、0.1或0.01处理的LoVo癌细胞随时间的细胞存活百分比。图19B显示比较用所示病毒处理的LoVo癌细胞在120小时的细胞存活百分比的柱状图。进行统计分析,将#33与其他实验组进行比较,在每个时间点使用单因素方差分析。比较栏上方的“NS”表示“不显著”。

图20A-20D.通过在含有2mL McCoy's 5A培养基、10% FBS、1%抗生素-抗真菌溶液的每孔铺板 $5 \times 10^5$ 个细胞,对HT-29和HCT-116癌细胞系进行24小时病毒复制曲线,重复三次。然后吸出培养基并在500 $\mu\text{L}$  McCoy's 5A培养基、2.5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液中以感染复数(MOI)0.01加入#33、#33-(SE) hNIS、#33-(H5) Emerald、OncoVEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189达1小时,每20分钟摇动。在1小时时,吸出培养基并加入1.5mL McCoy's 5A培养基、2.5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液。在24、48和72小时,收集细胞和上清液,并在三次冷冻和解冻循环后,重复两次进行连续稀释。重复两次重复该实验。呈现的是显示对于HT-29(图20A)和HCT-116(图20C)随时间的PFU/百万细胞的图。还给出了比较HT-29(图20B)和HCT-116(图20D)处理的癌细胞中每种病毒在每个时间点的PFU/百万细胞的条形图。在每个时间点使用单因素方差分析进行比较#33与其他实验组的统计学分析。

图21A-21D.通过在含有2mL RPMI、10% FBS、1%抗生素-抗真菌溶液的每孔铺板

5x10<sup>5</sup>个细胞,对SW620和SW480癌细胞系进行24小时病毒复制曲线,重复三次。然后吸出培养基并在500μL RPMI、2.5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液中以感染复数(MOI)0.01加入#33、#33-(SE)hNIS、#33-(H5)Emerald、OncoVEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189达1小时,每20分钟摇动。在1小时时,吸出培养基并加入1.5mL RPMI、2.5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液。在24、48和72小时,收集细胞和上清液,并在三次冷冻和解冻循环后,进行重复两次连续稀释。重复两次重复该实验。呈现的是显示用如所示病毒处理的SW620(图21A)和SW480(图21C)癌细胞随时间的PFU/百万细胞的图。还给出了比较SW620(图21B)和SW480(图21D)处理的癌细胞中每种病毒在每个时间点的PFU/百万细胞的条形图。在每个时间点使用单因素方差分析进行比较#33与其他实验组的统计学分析。

图22.用病毒#33或#33-(SE)hNIS感染的HCT-116癌细胞的免疫组织化学分析。感染后24小时拍摄图像,MOI为0.01.

图23.用病毒#33或#33-(SE)hNIS感染的HT-29癌细胞的免疫组织化学分析。感染后24小时拍摄图像,MOI为0.01.

图24.14只无胸腺Nude-FOXN1<sup>nug</sup>雌性裸鼠(Envigo, Indianapolis, IN)植入了5×10<sup>6</sup>个HT-29的双侧腹肿瘤。一旦肿瘤尺寸达到约200mm<sup>3</sup>,两侧肿瘤注射50μL PBS(4只小鼠)、以约1×10<sup>5</sup>PFU/剂注射#33(5只小鼠)或#33-(H5)Fluc2(5只小鼠)。每周记录两次净重量变化百分比和肿瘤的变化百分比,持续42天。图24显示HT-29肿瘤随时间的变化百分比。当将PBS对照与#33(3只小鼠)和#33-(H5)Fluc2进行比较时,注意到肿瘤体积变化百分比的显著差异(分别为p=0.02和p=0.03)。

图25.每周两次,一只PBS对照小鼠和3只经#33-(H5)Fluc2注射的小鼠腹膜内注射溶于150μLPBS的4.28mg荧光素。7分钟后,在标准暴露下获得荧光素酶成像。在每个时间点记录相对单位并相对于作为背景的PBS对照小鼠进行分析。

图26.19只无胸腺Nude-FOXN1<sup>nug</sup>雌性裸鼠(Envigo, Indianapolis, IN)植入了5×10<sup>6</sup>个HCT-116的双侧腹肿瘤。一旦肿瘤尺寸达到约200mm<sup>3</sup>,两侧肿瘤注射50μL PBS(2只小鼠)、以约1×10<sup>5</sup>PFU/剂注射#33(3只小鼠)、#33-(SE)hNIS或#33-(H5)Fluc2。每周记录两次净重量变化百分比和肿瘤的变化百分比,持续42天。图25显示HCT-116肿瘤随时间的变化百分比。当将PBS对照与#33(3只小鼠)、#33-(SE)hNIS和#33-(H5)Fluc2进行比较时,注意到肿瘤体积变化百分比的显著差异(分别为p=0.0002,p=0.0001和p=0.0002)。

图27.每周两次,一只PBS对照小鼠和3只经#33-(H5)Fluc2注射的小鼠腹膜内注射溶于150μLPBS的4.28mg荧光素。7分钟后,在标准暴露下获得荧光素酶成像。在每个时间点记录相对单位并相对于作为背景的PBS对照小鼠进行分析。

图28A-28C.感染后72小时,溶瘤病毒介导的肺癌和肺成纤维细胞的细胞毒性。将5000个A549、H2199或HF1成纤维细胞的细胞铺板在96孔板的每个孔中。第二天,细胞被多种病毒(#33、#33-(H5)Emerald、#189、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>)以所示感染复数(MOI;0、0.001、0.01、0.1、1MOI)感染或空白感染(mock-infected)。在感染后72小时,使用CellTiter96AQ<sub>ueous</sub> One Solution(Promega;Cat#G3581)测定细胞活力。相对于空白感染细胞的存活率计算经感染的A549细胞(图28A)、H2199细胞(图28B)或HF1成纤维细胞(图28C)的存活率。

图29.如右侧肿瘤中所示,在单次注射1000PFU的病毒(#33-(H5)Emerald、GLV-1h68或肿瘤内OncoVEX<sup>GFP</sup>)后,在A549异种移植模型中跨天数的GFP图像。

图30.A549异种移植模型中跨天数的小鼠重量。在肿瘤细胞A549注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或 $5$ ),以便在每组获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ ),并且向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹腔注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。每周称重两次小鼠并显示其重量的变化百分比。每条线代表单个小鼠的重量。

图31A-31B.A549异种移植模型中的肿瘤消退。在肿瘤细胞A549注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或 $5$ ),以便在每组获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ ),并且向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹腔注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。使用数字卡尺每周两次测量经注射(图31A)和未经注射(图31B)的肿瘤体积。每条线代表单个小鼠的肿瘤体积。

图32.A549异种移植模型中经注射病毒的肿瘤体积。在肿瘤细胞A549注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或 $5$ ),以便在每组获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ ),并且向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹腔注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。使用数字卡尺每周两次测量肿瘤体积。每条线代表具有标准偏差的各个治疗组中经注射的肿瘤的平均体积。统计学分析:在第24天的单因素方差分析(\*= $p<0.05$ )。

图33.A549异种移植模型中未经注射的肿瘤的体积。在肿瘤细胞A549注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或 $5$ ),以便在每组获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ ),并且向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹腔注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。使用数字卡尺每周两次测量未经注射的肿瘤的肿瘤体积。每条线代表具有标准偏差的各个治疗组中经注射的肿瘤的平均体积。统计学分析:在第24天的单因素方差分析(\*= $p<0.05$ )。

图34A-34B.肿瘤体积的倍数变化。在肿瘤细胞A549注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或 $5$ ),以便在每组获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ ),并且向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹腔注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。使用数字卡尺每周两次测量肿瘤体积。经注射(图34A)和未经注射(图34B)的肿瘤的肿瘤体积的倍数变化通过用病毒注射时(即第0天)的肿瘤体积标准化的肿瘤体积来计算在不同时间点的肿瘤体积。在图34A-34B中,每条线代表具有标准偏差的各个治疗组中的平均肿瘤体积。统计学分析:在第24天的单因素方差分析(\*= $p<0.05$ )。

图35A-35B.经注射和未经注射的肿瘤(A549模型)中病毒的生物学分布。在肿瘤细胞A549注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=3$ ),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ ),并且向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>)。病毒注射后6天后,收获肿瘤以及正常器官。将收获的组织称重,切成小块并使用Bullet Blender Gold匀浆器在1ml PBS中匀浆。将匀浆物进行3轮冻融循环,然后进行1分钟超声处理。将匀浆物以1000rpm离心3分钟并收集上清液。将上清液连续稀释,并使用标准噬斑测定法测定病毒滴度。图35A显示经注射的肿瘤中每种病毒的肿瘤PFU/g。图35B显示未经注射的肿瘤中每种病毒的肿瘤PFU/g。

图36. 小鼠卵巢中的病毒滴度(A549模型)。在肿瘤细胞A549注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=3$ ),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ ),并且向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncovEX GFP、T-VEC<sup>TM</sup>)。病毒注射后6天,收获肿瘤以及正常器官。将收获的组织称重,切成小块并使用Bullet Blender Gold匀浆器在1ml PBS中匀浆。将匀浆物进行3轮冻融循环,然后进行1分钟超声处理。将匀浆物以1000rpm离心3分钟并收集上清液。将上清液连续稀释,并使用标准噬斑测定法测定病毒滴度。图36显示每种病毒的组织(卵巢)PFU/g。ND代表未检测到。

图37. 病毒注射后20天血液中的病毒滴度。在肿瘤细胞A549注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=3$ ),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ ),并且向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncovEX GFP、T-VEC<sup>TM</sup>)。通过面部静脉穿刺从小鼠( $n=3$ )收集血液。在3次冻融循环后,连续稀释血液并使用标准噬斑测定法测定病毒滴度。图37显示了每种注射病毒的血液PFU/mL。ND代表未检测到。

图38. 嵌合病毒#33在杀伤肺癌细胞(A549)方面比亲代病毒更有效。细胞毒性测定:将5000个细胞铺板在96孔板的每个孔中。第二天,用所示的感染复数(MOI)的嵌合病毒#33或亲代病毒感染细胞或空白感染细胞。在感染后72小时,使用CellTiter96AQ<sub>ueous</sub> One Solution(Promega;Cat#G3581)测定细胞活力。相对于空白感染的细胞的存活率计算经感染细胞的存活率。

图39. 治疗后的体重变化。培养人肺癌细胞A549,胰蛋白酶处理,用PBS洗涤,并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每 $100\mu\text{L}$   $5 \times 10^6$ 个细胞。将 $100\mu\text{L}$ 细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或5),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后,仅向每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒。将小鼠每周称重两次,并绘制其重量的变化百分比。每条线代表单个小鼠的重量。

图40. 肿瘤消退。培养人肺癌细胞A549,胰蛋白酶处理,用PBS洗涤,并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每 $100\mu\text{L}$   $5 \times 10^6$ 个细胞。将 $100\mu\text{L}$ 细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或5),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后,仅向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒。使用数字卡尺每周两次测量(经注射和未经注射)肿瘤体积( $\text{volume} = \{( \text{长度})^2 \times \text{宽度}/2\}$ )。每条线代表单个小鼠的肿瘤体积。

图41. 感染后7天经注射和未经注射肿瘤中的病毒滴度。培养人肺癌细胞A549,胰蛋白酶处理,用PBS洗涤,并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每 $100\mu\text{L}$   $5 \times 10^6$ 个细胞。将 $100\mu\text{L}$ 细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或5),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后,仅向每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒。病毒注射后6天,收获肿瘤以及正常器官。将收获的组织称重,切成小块并使用Bullet Blender Gold匀浆器在1ml PBS中匀浆。将匀浆物进行3轮冻融循环,然后进行1分钟超声处理。将匀浆物以1000rpm离心3分钟并收集上清液。将上清液连续稀释,并使用标准噬斑测定法测定病毒滴度。

图42. 病毒的生物学分布。培养人肺癌细胞A549，胰蛋白酶处理，用PBS洗涤，并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周，将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或5)，以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后，仅向每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射 $10^3$ PFU的所示病毒。病毒注射后6天，收获肿瘤以及正常器官。将收获的组织称重，切成小块并使用Bullet Blender Gold匀浆器在1ml PBS中匀浆。将匀浆物进行3轮冻融循环，然后进行1分钟超声处理。将匀浆物以1000rpm离心3分钟并收集上清液。将上清液连续稀释，并使用标准噬斑测定法测定病毒滴度。

图43. 经注射小鼠血液中的病毒滴度。在肿瘤内注射1000pfu的所示病毒后，在不同时间点从携带A549肿瘤的小鼠的面静脉收集血液。使用标准噬斑测定技术滴定血液样品中的病毒。注射后第10天尿液中无可检测到的病毒。

图44. 经病毒注射后小鼠的存活率。培养人肺癌细胞A549，胰蛋白酶处理，用PBS洗涤，并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周，将小鼠分成不同的处理组( $n=4$ 或5)，以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后，仅向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3$ PFU的所示病毒。使用数字卡尺每周测量肿瘤体积两次，当双侧肿瘤之一超过肿瘤负荷( $3000\text{mm}^3$ )或小鼠由于病毒处理而生病(损失>20%体重)时将小鼠安乐死。

图45A-45C. 嵌合#33和亲本痘病毒在A549中的细胞毒性效力的比较。图45A计算所有病毒杀死50%A549细胞所需病毒的MOI( $LD_{50}$ )并进行比较。图45B用#33或亲本病毒以MOI 0.03pfu感染细胞，并在感染后24小时测定病毒滴度相对于输入病毒的倍数增加，并在病毒之间进行比较。图45C用图45B中的病毒感染A549细胞，在感染后12小时和18小时收集来自经感染的孔的上清液。通过噬菌斑测定法测定上清液中的病毒滴度并在病毒之间进行比较。

图46A-46B. 用#33或#33- (H5) Emerald (其J2R(TK)基因被Emerald(绿色)表达盒替换)以不同的MOI感染A549细胞。图46A将5000个细胞铺板在96孔板的每个孔中。第二天，用不同MOI的嵌合病毒#33或#33- (H5) Emerald (其J2R(TK)基因被Emerald(绿色)表达盒替换)感染细胞。在感染后72小时使用CellTiter96AQ<sub>ueous</sub> One Solution(Promega; Cat#G3581)测定细胞活力。相对于空白感染细胞的存活率计算经感染细胞的存活率。图46B用#33或#33- (H5)以MOI 0.03pfu感染A549细胞，并在所示时间点测定病毒滴度相对于输入病毒的倍数增加。

图47A-47B. 图47A成像：培养人肺癌细胞A549，胰蛋白酶处理，用PBS洗涤，并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周，将小鼠分成不同的处理组( $n=5$ )，以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后，仅向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3$ 噬斑形成单位(PFU)的#33- (H5) Emerald或PBS。使用小动物成像设备(LagoX成像系统)每周两次对小鼠进行绿色荧光(激发:465和发射:530nm)成像，并使用AMIView图像处理软件处理图像。图47B使用AMIView图像处理软件在不同时间点计算每个肿瘤的Emerald的平均荧光强度(MFI)。比较经注射和未经注射肿瘤的平均MFI( $n$

=5只小鼠/组) .

图48A-48D.图48A培养人肺癌细胞A549,胰蛋白酶处理,用PBS洗涤,并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组(n=7),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后,仅向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的#33-(H5) Emerald或PBS。将小鼠每周称重两次,并绘制其重量的变化百分比。每条线代表单个鼠标的重量。图48B使用数字卡尺每周两次测量肿瘤体积( $\text{volume} = \{(长度)^2 \times 宽度/2\}$ )。每条线代表单个小鼠的肿瘤体积。统计:不成对的T检验;\*\*\*\*=P<0.0001.\*\*33-GFP是指用#33-(H5) Emerald处理的动物。图48C绘制了每个处理组中各个小鼠的肿瘤体积。图48D当任一双侧肿瘤超过肿瘤负荷(3000 $\text{mm}^3$ )时对小鼠实施安乐死,并将病毒处理组的存活曲线与PBS处理组的存活曲线进行比较。统计:对数秩(Mantel Cox)测试;\*\*\*\*=P<0.0001.

图49A-49C.图49A培养人肺癌细胞A549,胰蛋白酶处理,用PBS洗涤,并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组(n=7),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后,仅向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^3\text{PFU}$ 的所示病毒。在病毒注射后第7天和第56天,对来自病毒处理组的3只小鼠实施安乐死并收集它们的器官以及肿瘤。通过噬斑测定确定收获器官中的病毒滴度,并在肿瘤和器官之间进行比较。统计:单因素方差分析;\*\*\*=P<0.0001.ND=无法检测到。图49B将肿瘤切片(病毒注射后7天)针对痘苗病毒染色。深色染色代表肿瘤切片的病毒感染区域。每个部分都来自一个单独的小鼠。图49C使用原位细胞死亡检测荧光素(Roche)对病毒注射后第7天获得的肿瘤切片进行凋亡细胞染色。对于“阳性对照”,在室温下用重组Dnase I(300U/ml)处理肿瘤切片10分钟。灰色信号代表凋亡细胞。

图50.OVCAR8细胞的体外细胞毒性(感染后72小时)。将5000个OVCAR8(人卵巢癌)细胞铺板在96孔板的每个孔中。第二天,用嵌合病毒#33或TK-缺失的#33(#33/TK-)或#33病毒感染细胞,其中miR100和Let-7c靶序列插入必需病毒基因E9L或D4R中。以所示的感染复数(MOI)进行感染。在感染后72小时使用CellTiter96AQ<sub>ueous</sub> One Solution(Promega;Cat#G3581)测定细胞活力。相对于空白感染细胞的存活率计算感染细胞的存活率。

图51.OVCAR8细胞中病毒的生长动力学。用指定病毒在6孔板中以0.03pfu的MOI感染OVCAR8细胞。感染后24、48和72小时收集来自经感染的孔的细胞裂解物。通过噬斑测定确定细胞裂解物中的病毒滴度,并绘制相对于输入病毒的病毒滴度的倍数增加。

图52.小鼠重量变化百分比。培养人卵巢癌细胞OVCAR8,胰蛋白酶处理,用PBS洗涤,并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组(PBS组n=8,其它所有组n=7),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后,仅向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射 $10^5\text{PFU}$ 的所示病毒或PBS。将小鼠每周称重两次,并绘制其重量的变化百分比。每条线代表单个小鼠的重量。

图53.肿瘤体积。培养人卵巢癌细胞OVCAR8,胰蛋白酶处理,用PBS洗涤,并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺

裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组 (PBS组n=8,其它所有组n=7),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积 (~ 200mm<sup>3</sup>)。分选后,仅向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射10<sup>5</sup>PFU的所示病毒或PBS。使用数字卡尺每周两次测量肿瘤体积(体积 = {(长度)<sup>2</sup> × 宽度/2})。绘制了每个处理组中针对单个小鼠的经病毒注射和未经病毒注射的肿瘤的体积。

图54A-54B. 经注射和未经注射的肿瘤的平均肿瘤体积。培养人卵巢癌细胞OVCAR8,胰蛋白酶处理,用PBS洗涤,并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每100μL 5×10<sup>6</sup>个细胞。将100μL细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组 (PBS组n=8,其它所有组n=7),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积 (~ 200mm<sup>3</sup>)。分选后,仅向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射10<sup>5</sup>PFU的所示病毒或PBS。使用数字卡尺每周两次测量肿瘤体积 (volume = {(长度)<sup>2</sup> × 宽度/2})。绘制了每个处理组的具有SD的平均肿瘤体积。图54A和54B分别显示了经注射和未经注射的肿瘤的平均肿瘤体积。

图55. 感染后7天器官中的病毒滴度。培养人卵巢癌细胞OVCAR8,胰蛋白酶处理,用PBS洗涤,并重悬于1:1PBS和基质胶中以获得每100μL 5×10<sup>6</sup>个细胞。将100μL细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧以使得每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组 (n=3),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积 (~ 200mm<sup>3</sup>)。分选后,仅向每只小鼠的右侧肿瘤肿瘤内注射10<sup>5</sup>PFU的所示病毒。在病毒注射后第7天,将小鼠安乐死并收获它们的器官以及肿瘤。通过噬斑测定确定收获器官中的病毒滴度,并在肿瘤和器官之间进行比较。注意:在正常器官(肺、肝、卵巢、肾、脾和脑)和未经注射的肿瘤中未检测到病毒。

图56.OVCAR8肿瘤和小鼠器官中的miR100. 将携带OVCAR8异种移植物的无胸腺裸鼠 (n=3) 安乐死并收获它们的器官以及肿瘤。将收获的组织匀浆,并使用miRNeasy mini试剂盒 (Qiagen) 分离总RNA。进行实时pcr以确定裂解物中miR-100的水平。

图57.OVCAR8肿瘤和小鼠器官中的Let-7c。将携带OVCAR8异种移植物的无胸腺裸鼠 (n=3) 安乐死并收获它们的器官以及肿瘤。将收获的组织匀浆,并使用miRNeasy mini试剂盒 (Qiagen) 分离总RNA。进行实时pcr以确定裂解物中Let-7c的水平。

## 具体实施方式

本文描述了嵌合痘病毒组合物,其组合来自不同病毒物种的有利特征以产生新型杂合嵌合痘病毒,其优于单个野生型病毒。申请人已经产生了来自不同属的嵌合痘病毒。与其亲本单个野生型病毒相比,嵌合正痘病毒和副痘病毒分离株在一组NCI 60癌细胞系中显示出优异的杀伤能力。另外,利用来自痘病毒科的不同属的成员在抗原性上不同的事实,在该研究中产生的有效嵌合正痘病毒和有效嵌合副痘病毒可潜在地组合成同一治疗方案以实现最大治疗有效性。

### I. 定义

虽然在此示出并描述了本发明的不同实施方案和不同方面,但是本领域技术人员显然了解这些实施方案和各个方面只是举例说明本发明。本领域技术人员在不偏离本发明精神的范围内可以进行多种变化、改变和替代。应理解本文所述的本发明的实施方案的各

种替代选择可用于实践本发明。

本文使用的段落标题只是为了编写目的,不应理解为限制所述主题。本申请书中引用的包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、手册和论文的全部文献或者一部分文献均通过引用以其任何目的全部并入本文。

除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。参见,例如,Singleton等,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY 2nd ed.,J.Wiley&Sons (New York, NY 1994);Sambrook等,Molecular Cloning,ALABORATORY MANUAL,Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)。与本文描述的那些类似或等同的任何方法、装置和材料均可用于实践本发明。提供以下定义是为了便于理解本文中频繁使用的某些术语,并不意味着限制本公开的范围。

术语“分离株”或“分离的”当用于核酸、病毒或蛋白质时,是指所述核酸、病毒或者蛋白质基本上不含其在天然状态下结合的其它细胞组分。其可以是例如均质状态,并且可以是干燥的或者在水溶液中。纯度和均质性典型地用分析化学技术确定,如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱。制备物中存在的主要种类的蛋白质是基本上纯化的。

本文使用的“核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”或语法等同是指至少两种核苷酸共价连接在一起。术语“核酸”是指脱氧核糖核苷酸或者核糖核苷酸及单链或双链形式的聚合物,及其互补序列。术语“多核苷酸”是指核苷酸线性序列。术语“核苷酸”典型地是指多核苷酸的单一单位,即单体。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或者其经修饰的版本。本文的多核苷酸的例子包括单链和双链DNA、单链和双链RNA(包括siRNA)及具有单链和双链DNA和RNA的混合物的杂交分子。该术语也包含含有已知核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键的核酸,其是合成的、天然存在的和非天然存在的,其具有与参考核酸相似的结合特性,并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。这种类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、以及2-O-甲基核糖核苷酸。

核酸可包括非特异性序列。如本文所用,术语“非特异性序列”是指含有一系列未设计成与任何其他核酸序列互补或仅部分互补的残基的核酸序列。举例来说,非特异性核酸序列是在与细胞或生物体接触时不起抑制性核酸的作用的核酸残基序列。“抑制性核酸”是能够结合到靶核酸(例如mRNA,可翻译成蛋白质)并减少靶核酸(例如来自DNA的mRNA)的转录或减少靶核酸(例如mRNA)的翻译或改变转录物剪接(例如单链吗啉寡核苷酸)的核酸(例如DNA、RNA、核苷酸类似物的聚合物)。

“标记的核酸或寡核苷酸”是通过接头或化学键共价结合于标记或者通过离子键、范德华力、静电或者氢键非共价结合于标记的核酸或寡核苷酸,由此所述核酸的存在可以通过检测与核酸结合的标记的存在而检测。或者,使用高亲和性相互作用的方法可以实现相同结果,其中一对结合配偶体中的一个结合于另一个,例如生物素、链霉抗生物素蛋白。在实施方案中,硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主链包括如本文所公开并且是本领域公知的可检测的标记。

词语“互补”或“互补性”是指一个多核苷酸中的核酸与第二多核苷酸中的另一核酸形成碱基对的能力。例如,序列A-G-T与序列T-C-A互补。互补性可以是部分的,其中仅一些核酸根据碱基配对匹配,或完全的,其中所有核酸根据碱基配对匹配。

当核酸与另一核酸序列处于功能关系时,它是“可操作地连接的”。例如,如果前序

列或分泌前导序列的DNA表达为参与多肽分泌的前蛋白，则其与多肽的DNA可操作地连接；如果启动子或增强子影响序列的转录，则它与编码序列可操作地连接；或者如果核糖体结合位点被定位以便于翻译，则它与编码序列可操作地连接。通常，“可操作地连接”意指连接的DNA序列彼此接近，并且在分泌前导序列的情况下，邻近且处于阅读相(reading phase)。但是，增强子不必是邻近的。通过在方便的限制性位点连接来完成连接。如果不存在这样的位点，则根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

术语“基因”是指参与产生蛋白质的DNA区段；它包括编码区(前导区和尾随区)之前和之后的区域以及各个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。前导序列、尾随序列以及内含子包括在基因转录和翻译过程中必需的调控元件。此外，“蛋白质基因产物”是由特定基因表达的蛋白质。

本文使用术语“表达”或“表达的”与基因相关时，是指该基因的转录和/或翻译产物。DNA分子在细胞中的表达水平可以基于细胞内存在的相应mRNA的量或者由细胞产生的该DNA编码的蛋白质的量而确定。非编码核酸分子(例如siRNA)的表达水平可以通过本领域公知的标准PCR或Northern印迹方法检测(参见Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.1-18.88)。

本文提供的“siRNA”、“小干扰RNA”，“小RNA”或“RNAi”是指形成双链RNA的核酸，当在与基因或靶基因相同的细胞中表达时，该双链RNA具有降低或抑制基因或靶基因表达的能力。杂交形成双链分子的核酸的互补部分通常具有基本或完全的相同性。在一个实施方案中，siRNA或RNAi是指与靶基因具有基本或完全相同性并形成双链siRNA的核酸。在实施方案中，siRNA通过与互补细胞mRNA相互作用抑制基因表达，从而干扰互补mRNA的表达。通常，核酸的长度为至少约15-50个核苷酸(例如，双链siRNA的每个互补序列长度为15-50个核苷酸，且双链siRNA的长度为约15-50个碱基对)。在其他实施方案中，长度为20-30个碱基核苷酸，优选长度为约20-25个或约24-29个核苷酸，例如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或长度为30个核苷酸。siRNA的非限制性实例包括核酶、RNA诱饵、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)和核仁小RNA(snoRNA)。

当与参考例如细胞或核酸、蛋白质或载体一起使用时，术语“重组”表示细胞、核酸、蛋白质或载体已通过引入异源核酸或蛋白质或天然核酸或蛋白质的替代物而被修饰，或细胞衍生自如此修饰的细胞。因此，例如，重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞内未发现的基因，或表达异常表达、表达不足或根本不表达天然基因。转基因细胞和植物是表达异源基因或编码序列的那些，通常是重组方法的结果。

当与核酸的部分相关使用时，术语“异源的”表示核酸包含两个或更多个在自然界中彼此不存在相同关系的子序列。例如，核酸通常是重组产生的，其具有来自无关基因的两个或更多个序列，其被排列以产生新的功能性核酸，例如来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区。类似地，异源蛋白质表明该蛋白质包含两个或更多个在自然界中彼此不存在相同关系的子序列(例如，融合蛋白)。

术语“外源的”是指源自给定细胞或生物体外的分子或物质(例如，化合物、核酸或蛋白质)。例如，本文提及的“外源启动子”是不是源自其表达的细胞或生物的启动子。相反，术语“内源的”或“内源启动子”是指给定细胞或生物体天然或源自其的分子或物质。

当应用于核酸或蛋白质时，术语“分离的”表示核酸或蛋白质基本上不含与其天然

状态相关的其他细胞组分。它可以是,例如,在均相状态下,且可以是干燥或水溶液。纯度和均匀性通常使用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法测定。作为制剂中存在的主要物质的蛋白质是基本上纯化的。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用指氨基酸残基的聚合物,其中在实施方案中,聚合物可以与不由氨基酸组成的部分缀合。该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存在的氨基酸的人工化学模拟物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。“融合蛋白”是指一种嵌合蛋白,其编码重组表达为单个部分的两个或更多个分开的蛋白质序列。

术语“肽基”和“肽基部分”是指单价肽。

术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团结合的 $\alpha$ 碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。此类类似物具有经修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。术语“非天然存在的氨基酸”和“非天然氨基酸”是指在自然界中未发现的氨基酸类似物、合成氨基酸和氨基酸模拟物。

氨基酸在本文中可以通过它们通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号表示。同样,核苷酸可以通过它们通常接受的单字母代码来指代。

“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定的核酸序列,“保守修饰的变体”是指那些编码相同或基本相同的氨基酸序列的核酸。由于遗传密码的简并性,许多核酸序列将编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在密码子指定为丙氨酸的每个位置,密码子可以改变为所述的任何相应密码子而不改变编码的多肽。

这种核酸变异被称为“沉默变异”,其是保守修饰的变异的一种。本文的编码多肽的每一个核酸序列也描述该核酸的每一个可能的沉默变异。本领域技术人员知道核酸中的每个密码子(除了AUG,其通常是甲硫氨酸的唯一密码子,及TGG,其通常是色氨酸的唯一密码子)均可以被修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异均隐含在每个所述的序列中。

对于氨基酸序列,本领域技术人员理解在编码的序列中改变、添加或缺失一个氨基酸或者少量氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的单个取代、缺失或添加如果所述改变导致一个氨基酸被化学相似的氨基酸取代是“保守修饰的变体”。提供功能相似氨基酸的保守取代表是本领域公知的。这种保守取代的变体是额外的,不排除本发明的多态性变体、种间同系物和等位基因。

下述8组每个都含有彼此是保守取代的氨基酸:1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7)丝氨

酸(S)、苏氨酸(T)；和8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见例如,Creighton, Proteins (1984))。

术语“相同”或“相同性”百分比在两个或多个核酸或多肽序列上下文中,是指当在比较窗或者指定区域进行最大相应性比较和对比时,两个或多个序列或亚序列是相同的,或者具有所指出的百分比的相同氨基酸残基或核苷酸残基(即,在所指出的区域约60%相同性,优选65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、或99%或更高的相同性),其使用下述用默认参数的BLAST或BLAST 2.0序列比较算法或者通过手工对比和肉眼检查而测量(参见例如NCBI网站<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>等)。这些序列然后被称为“基本上相同的”。该定义还涉及或可以应用于测试序列的互补序列。该定义还包括具有缺失和/或添加的序列,以及具有取代的序列。如下所述,优选算法可以解决空位等。优选地,相同性存在于长度为至少约25个氨基酸或核苷酸的区域上,或更优选地长度为50-100个氨基酸或核苷酸的区域上。

本文所用的术语“胸苷激酶基因”,“TK基因”,“TK”,“J2R基因”或“J2R”是指编码能够维持胸苷激酶多肽活性的胸苷激酶多肽的胸苷激酶基因的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与胸苷激酶多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的胸苷激酶基因相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,胸苷激酶基因与对应于登录号DQ121394鉴定的核酸序列的83422-83955位的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,胸苷激酶基因包括SEQ ID NO:4的核酸序列。在实施方案中,胸苷激酶基因是SEQ ID NO:4的核酸序列。在实施方案中,胸苷激酶基因是突变的。在实施方案中,胸苷激酶基因被部分缺失。在实施方案中,胸苷激酶基因包括SEQ ID NO:5的核酸序列。在实施方案中,胸苷激酶基因包括SEQ ID NO:5的核酸序列。

本文所用的术语“F14.5L基因”,“F14.5L序列”,“F14.5L”等是指编码能够维持F14.5L多肽活性的F14.5L多肽的F14.5L基因的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与F14.5L多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的F14.5L基因相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,F14.5L基因与对应于登录号KX781953鉴定的核酸序列的44428-44279位的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,F14.5L基因包括SEQ ID NO:6的核酸序列。在实施方案中,F14.5L基因是SEQ ID NO:6的核酸序列。在实施方案中,F14.5L基因是突变的。在实施方案中,F14.5L基因被部分缺失。在实施方案中,F14.5L基因包括SEQ ID NO:7的核酸序列。在实施方案中,F14.5L基因包括SEQ ID NO:7的核酸序列。

本文所用的术语“D4R基因”,“尿嘧啶DNA糖基化酶基因”等是指编码能够维持尿嘧啶DNA糖基化酶多肽活性的尿嘧啶DNA糖基化酶多肽的尿嘧啶DNA糖基化酶基因的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与尿嘧啶DNA糖基化酶多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的尿嘧啶DNA糖基化酶基因相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、

100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,尿嘧啶DNA糖基化酶基因与对应于登录号DQ439815鉴定的核酸序列的102720-103376位的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,尿嘧啶DNA糖基化酶基因包括SEQ ID NO:8的核酸序列。在实施方案中,尿嘧啶DNA糖基化酶基因是SEQ ID NO:8的核酸序列。

本文所用的术语“E9L基因”,“DNA聚合酶基因”等是指编码能够维持DNA聚合酶多肽活性的DNA聚合酶多肽的DNA聚合酶基因的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与DNA聚合酶多肽多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的DNA聚合酶基因相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,DNA聚合酶基因与对应于登录号AY243312鉴定的核酸序列的56656-53636位的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,DNA聚合酶基因包括SEQ ID NO:12的核酸序列。在实施方案中,DNA聚合酶基因是SEQ ID NO:12的核酸序列。

本文所用的术语“人钠碘共输送体基因”,“hNIS基因”,“NIS基因”等是指编码能够维持人钠碘共输送体多肽活性的人钠碘共输送体多肽的人钠碘共输送体基因的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与人钠碘共输送体多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的人钠碘共输送体基因相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,人钠碘共输送体基因与对应于登录号NM\_000453鉴定的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,人钠碘共输送体基因包括SEQ ID NO:13的核酸序列。在实施方案中,人钠碘共输送体基因是SEQ ID NO:13的核酸序列。

本文所用的术语“Emerald基因”或“Emerald序列”是指编码能够维持Emerald多肽活性的Emerald多肽的Emerald基因的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与Emerald多肽多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的Emerald基因相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,Emerald基因与对应于登录号KF293661鉴定的核酸序列的3215-3931位的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,Emerald基因包括SEQ ID NO:14的核酸序列。在实施方案中,Emerald基因是SEQ ID NO:14的核酸序列。

如本文所用,术语“萤火虫荧光素酶基因”或“萤火虫荧光素酶序列”是指编码能够维持萤火虫荧光素酶多肽活性的萤火虫荧光素酶多肽的萤火虫荧光素酶基因的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与萤火虫荧光素酶多肽多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的萤火虫荧光素酶基因相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,萤火虫荧光素酶基因与对应于登录号KF990214鉴定的核酸序

列的3129-4781位的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,萤火虫荧光素酶基因包括SEQ ID NO:15的核酸序列。在实施方案中,萤火虫荧光素酶基因是SEQ ID NO:15的核酸序列。

本文所用的术语“mCherry基因”或“mCherry序列”是指编码能够维持mCherry多肽活性的mCherry多肽的mCherry基因的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与mCherry多肽多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的mCherry基因相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,mCherry基因与对应于登录号KX446949鉴定的核酸序列的1073-1783位的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,mCherry基因包括SEQ ID NO:16的核酸序列。在实施方案中,mCherry基因是SEQ ID NO:16的核酸序列。

本文所用的术语“H5启动子”,“H5”等是指编码能够维持H5启动子多肽活性的H5启动子多肽的H5启动子的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与H5启动子多肽多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的H5启动子相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,H5启动子与对应于登录号FJ386852鉴定的核酸序列的7-76位的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,H5启动子包括SEQ ID NO:18的核酸序列。在实施方案中,H5启动子是SEQ ID NO:18的核酸序列。

如本文所用,术语“SE启动子”,“SE”等是指编码能够维持SE启动子多肽活性的SE启动子多肽的SE启动子的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与SE启动子多肽多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的SE启动子相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,SE启动子包括SEQ ID NO:19的核酸序列。在实施方案中,SE启动子是SEQ ID NO:19的核酸序列。

如本文所用,术语“11K启动子”,“11K”等是指编码能够维持11K启动子多肽活性的11K启动子多肽的11K启动子的任何重组或天然存在的形式,或其变体或同源物(例如,与11K启动子多肽多肽相比具有至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)。在一些方面,与天然存在的11K启动子相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,在50、100、150或200个连续核酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核酸序列相同性。在实施方案中,11K启动子与对应于登录号KF179385鉴定的核酸序列的40734-40771位的核酸序列或与其具有实质相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,11K启动子包括SEQ ID NO:20的核酸序列。在实施方案中,11K启动子是SEQ ID NO:20的核酸序列。

抗体是具有复杂内部结构的大的复杂分子(分子量~150,000或者大约1320个氨基酸)。天然抗体分子含有两个相同多肽链对,每对具有一个轻链和一个重链。每个轻链和

重链由两个区域组成:参与结合靶抗原的可变(“V”)区,及与免疫系统的其它组分相互作用的恒定(“C”)区。轻链和重链可变区在3维空间中一起形成结合抗原(例如细胞表面上的受体)的可变区。在每个轻链或重链可变区内,有3个短区段(平均10个氨基酸长度),称为互补决定区(CDR)。抗体可变结构域中的这六个CDR(3个来自轻链,3个来自重链)在3维空间中折叠形成实际的抗体结合位点,其停靠(dock)在靶抗原上。CDR的位置和长度已被Kabat,E.et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987精确限定。未包含在CDR中的可变区部分称为构架(FR),其形成CDR的环境。

根据在本领域中通常已知的含义使用术语“抗体”。抗体例如以完整免疫球蛋白存在或者作为一些用各种肽酶消化而产生的充分表征的片段存在。因此,例如胃蛋白酶在铰链区二硫键以下消化抗体产生F(ab)' 2,其是Fab二聚体,Fab本身是通过二硫键与V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>连接的轻链。F(ab)' 2可以在温和条件下还原以打破铰链区的二硫键,由此将F(ab)' 2二聚体转化为Fab' 单体。Fab' 单体基本上是具有部分铰链区的Fab(参见Fundamental Immunology (Pauley., 3d ed.1993))。尽管各种抗体片段是基于完整抗体的消化而限定,但是本领域技术人员理解这种片段可以经化学从头合成或者用重组DNA方法学从头合成。因此,本文所用术语抗体还包括由修饰完整抗体产生的抗体片段或者用重组DNA方法学从头合成的抗体片段(例如单链Fv)或者用噬菌体展示文库鉴别的抗体片段(参见例如McCafferty et al., Nature 348:552-554(1990))。

示例性免疫球蛋白(抗体)结构单位包含四聚体。每个四聚体由两个相同的多肽链对组成,每对具有一个“轻”链(大约25kD)和一个“重”链(大约50-70Kd)。每条链的N-末端限于一个大约100-110个或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链(VL)或者轻链可变区和可变重链(VH)或重链可变区分别是指这些轻链和重链区。Fc(即片段可晶体化区域)是免疫球蛋白的“基底”或“尾部”,且典型地由两个重链组成,所述两个重链根据抗体类别贡献2或3个恒定结构域。通过结合特定蛋白质,Fc区保证每个抗体产生针对给定抗原的合适免疫应答。Fc区还结合各种细胞受体,如Fc受体,和其它免疫分子,如补体蛋白。

本文提供的术语“抗原”是指能够结合本文提供的抗体结合结构域的分子。本文提供的“抗原结合结构域”是结合抗原(表位)的抗体区域。如上所述,所述抗原结合结构域通常由每个重链和轻链的一个恒定结构域和一个可变结构域组成(分别为VL、VH、CL和CH1)。在抗原结合结构域的N末端形成抗体决定簇(paratope)或抗原结合位点。抗原结合结构域的两个可变结构域通常结合抗原上的表位。

抗体例如以完整免疫球蛋白存在或者作为一些用各种肽酶消化而产生的充分表征的片段存在。因此,例如胃蛋白酶在铰链区二硫键以下消化抗体产生F(ab)' 2,其是Fab二聚体,Fab本身是通过二硫键与VH-CH1连接的轻链。F(ab)' 2可以在温和条件下还原以打破铰链区的二硫键,由此将F(ab)' 2二聚体转化为Fab' 单体。Fab' 单体基本上是具有部分铰链区的Fab(参见Fundamental Immunology (Pauley., 3d ed.1993))。尽管各种抗体片段是基于完整抗体的消化而限定,但是本领域技术人员理解这种片段可以经化学从头合成或者用重组DNA方法学从头合成。因此,本文所用术语抗体还包括由修饰完整抗体产生的抗体片段或者用重组DNA方法学从头合成的抗体片段(例如单链Fv)或者用噬菌体展示文库

鉴别的抗体片段(参见例如McCafferty et al., Nature 348:552-554(1990))。

单链可变片段(scFv)典型地是免疫球蛋白的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)经10到大约25个氨基酸的短接头肽连接的融合蛋白。接头通常富含甘氨酸以具有柔性,及具有丝氨酸或苏氨酸以具有溶解性。接头可以将VH的N末端与VL的C末端连接,或者反之亦然。

抗体的表位是抗体所结合的抗原的区域。如果两种抗体每种彼此竞争性抑制(阻断)另一种抗体与抗原结合,则两种抗体结合相同表位或者重叠表位。也就是说,如在竞争结合测定中测得(参见例如Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990),一种抗体的1、5、10、20或100倍过量抑制另一种抗体的结合的至少30%,但是优选50%、75%、90%或甚至99%。或者,如果抗原中降低或消除一种抗体的结合的基本上所有氨基酸突变也降低或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同表位。如果降低或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变也降低或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有重叠表位。

为制备本发明的合适抗体(例如重组、单克隆或多克隆抗体)及用于本发明,可以使用本领域已知的许多技术(参见例如,Kohler&Milstein,Nature 256:495-497(1975);Kozbor et al., Immunology Today 4:72(1983);Cole et al., pp.77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R.Liss, Inc. (1985);Coligan, Current Protocols in Immunology (1991);Harlow&Lane, Antibodies, ALaboratory Manual (1988);and Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice(2d ed.1986))。编码感兴趣抗体的重链和轻链的基因可以从细胞中克隆,例如,编码单克隆抗体的基因可以从杂交瘤克隆并用于产生重组单克隆抗体。也可以从杂交瘤或浆细胞制备编码单克隆抗体的重链和轻链的基因文库。重链和轻链基因产物的随机组合产生具有不同抗原特异性的抗体的一个大集合(参见例如,Kuby, Immunology (3rd ed.1997))。产生单链抗体或重组抗体的技术(美国专利4,946,778,美国专利4,816,567)可以被适应性修改以产生针对本发明多肽的抗体。另外,转基因小鼠或其它生物体如其它哺乳动物也可以用于表达人源化抗体或人类抗体(参加例如美国专利5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016,Marks et al., Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg et al., Nature 368:856-859(1994);Morrison, Nature 368:812-13(1994);Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51(1996);Neuberger, Nature Biotechnology 14:826(1996);以及Lonberg&Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93(1995))。或者,可以使用噬菌体展示技术鉴别特异性结合选定的抗原的抗体和异聚Fab片段(参见例如,McCafferty et al., Nature 348:552-554(1990);Marks et al., Biotechnology 10:779-783(1992))。也可以使抗体制成双特异性的,即能够识别两种不同抗原(参见例如,WO 93/08829,Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659(1991);以及Suresh et al., Methods in Enzymology 121: 210(1986))。抗体也可以是复共轭对缀合物,例如两个共价连接的抗体或者免疫毒素(参见例如,美国专利4,676,980, WO 91/00360; WO 92/200373; 和EP 03089)。

短语“特异性(或选择性)结合于抗体”或者“特异性(或选择性)与……免疫反应”当指蛋白质或肽时,是指确定蛋白质存在的结合反应,通常是在蛋白质和其它生物制品的异质群体中。因此,在所指定的免疫测定条件下,特定的抗体结合于特定蛋白质是背景的至少两倍,更典型地是背景的10-100倍以上。在这种条件下与抗体的特异性结合典型需要根

据其对于一特定蛋白质的特异性而选择的抗体。例如,可以选择多克隆抗体以获得仅特异性与选定的抗原免疫反应而不与其它蛋白质免疫反应的抗体亚集。这一选择可以通过去除与其它分子交叉反应的抗体而实现。可以使用各种免疫测定形式来选择特异性与特定蛋白质免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定通常用于选择与蛋白质特异性免疫反应的抗体(参见例如Harlow&Lane,Using Antibodies,A Laboratory Manual(1998),其描述了可以用于确定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件)。

“接触”以其普通含义使用,且是指使至少2种独立种类(例如化合物,包括生物分子或细胞)变为足够接近以反应、相互作用或者物理接触的过程。但是应理解,所产生的反应产物可以直接从添加的试剂之间的反应产生,或者从一或多个添加的试剂的中间体产生,所述中间体可以在反应混合物中产生。

术语“接触”可以包括使2个种类反应、相互作用或者物理接触,其中所述2个种类可以是例如本文描述的抗体结构域和抗体结合结构域。在实施方案中,接触包括例如使本文所述抗体结构域与抗体结合结构域相互作用。

“患者”或者“有需要的对象”是指患有或者易于患有可以通过给予本文提供的组合物或药物组合物治疗的疾病或病症的活生物体。非限制性例子包括人、其它哺乳动物、牛、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、奶牛、鹿,及其它非哺乳动物。在一些实施方案中,患者是人。

术语“疾病”或“病症”是指能够用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的患者或对象的状态或健康状态。疾病可能是癌症。在一些其他情况下,“癌症”是指人癌症和癌、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病,包括实体癌和淋巴癌、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌和肝癌(包括肝细胞癌)、淋巴瘤(包括急性B淋巴母细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(如Burkitt's、小细胞、和大细胞淋巴瘤)、霍奇金淋巴瘤、白血病(包括AML、ALL和CML)或多发性骨髓瘤)。

如本文所用,术语“癌症”是指在哺乳动物中发现的所有类型的癌症、新生物(neoplasm)或恶性肿瘤,包括白血病、癌和肉瘤。可用本文提供的化合物或方法治疗的示例性癌症包括乳腺癌、结肠癌、肾癌、白血病、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、肝癌、胃癌或肉瘤。

术语“白血病”广义上是指造血器官的进行性恶性疾病,且通常由血液和骨髓中的白细胞及其前体的扭曲增殖和发育而鉴定。白血病临幊上通常基于如下而分类:(1)疾病持续时间和特点-急性或慢性;(2)涉及的细胞类型;髓样(骨髓内产生的)、淋巴样(淋巴生成的)或单核细胞的;和(3)血液中异常细胞数目的增加或不增加-白血病性或非白细胞性(亚白血病的)。可以用本文提供的化合物或方法治疗的白血病的示例包括例如,急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病(acute granulocytic leukemia)、慢性粒细胞白血病(chronic granulocytic leukemia)、急性早幼粒细胞白血病、成人T细胞白血病、白细胞不增多性白血病、leukocythemic leukemia、嗜碱粒细胞性白血病、干细胞性白血病、牛白血病、慢性髓细胞白血病(chronic myelocytic leukemia)、皮肤白血病、干细胞性白血病(embryonal leukemia)、嗜酸性白血病、Gross'白血病、多毛细胞白血病、成血细胞性白血病(hemoblastic leukemia)、成血细胞性白血病(hemocytoblastic leukemia)、组织细胞性白血病、干细胞白血病、急性单核细胞白血病、白细胞减少性白血病。

病、淋巴性白血病、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、成淋巴白血病、淋巴样白血病、淋巴肉瘤细胞性白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞白血病、小原粒型白血病、单核细胞性白血病、原始粒细胞性白血病、粒细胞性白血病、骨髓性粒细胞白血病、粒单核细胞白血病、Naegelei 白血病、血浆细胞白血病、多发性骨髓瘤、浆细胞白血病、前髓细胞性白血病、Rieder 细胞白血病、Schilling's 白血病、干细胞白血病、亚白血病性白血病或未分化细胞白血病。

术语“肉瘤”通常是指这样的肿瘤，其由类似于胚性结缔组织的物质组成并且通常由包埋在纤丝状或同质物质中的紧密堆积的细胞组成。可以用本文提供的化合物或方法治疗的肉瘤包括软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、Abemethy's 肉瘤、脂肪肉瘤、脂肉瘤、软组织腺泡状肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄形肉瘤、绿色瘤肉瘤、绒毛膜癌、胚胎性肉瘤、肾母细胞瘤肉瘤 (Wilms' tumor sarcoma)、子宫内膜肉瘤、间质肉瘤、Ewing's 肉瘤、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、髓细胞瘤、粒细胞肉瘤、Hodgkin's 肉瘤、皮肤特发性多发性色素沉着出血性肉瘤、B 细胞成免疫细胞肉瘤、淋巴瘤、T 细胞成免疫细胞肉瘤、Jensen's 肉瘤、Kaposi's 肉瘤、Kupffer 细胞肉瘤、血管肉瘤、白血病性肉瘤、恶性间叶瘤、骨周肉瘤、网状细胞肉瘤、Rous 肉瘤、浆液囊性肉瘤、滑膜肉瘤或者毛细血管扩张性肉瘤。

术语“黑素瘤”是指从皮肤和其它器官的黑素细胞系统产生的肿瘤。可以用本文提供的化合物或方法治疗的黑素瘤包括例如，肢端黑素瘤、无黑色素黑素瘤、良性幼年型黑素瘤、Cloudman's 黑素瘤、S91 黑素瘤、Harding-Passey 黑素瘤、幼年型黑素瘤、恶性雀斑样黑素瘤、恶性黑素瘤、结节性黑素瘤、甲下黑素瘤 (subungual melanoma) 或者表面扩散性黑素瘤。

术语“癌”是指由上皮细胞组成的恶性新生长，其倾向于浸润周围组织并且产生转移。可以用本文提供的化合物或方法治疗的癌的示例包括例如，甲状腺髓样癌、家族性甲状腺髓样癌、腺泡癌 (acinar carcinoma)、腺泡癌 (acinous carcinoma)、囊性腺样癌、腺样囊性癌、腺癌、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌 (basal cell carcinoma)、基底细胞癌 (carcinoma basocellulare)、基底细胞样癌、基底鳞状细胞癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管原癌、髓样癌 (cerebriform carcinoma)、胆管细胞癌、绒毛膜癌、胶体癌、粉刺状癌、子宫体癌、筛状癌、胸廓癌、皮肤癌、柱状细胞癌 (cylindrical carcinoma)、柱状细胞癌 (cylindrical cell carcinoma)、导管癌 (duct carcinoma)、导管癌 (ductal carcinoma)、硬癌、胚胎性癌、髓样癌 (encephaloid carcinoma)、鳞状细胞癌 (epidermoid carcinoma)、腺样基底细胞癌、外植癌、溃疡性癌、硬癌 (carcinoma fibrosum)、凝胶状癌 (gelatiniform carcinoma)、胶样癌、巨细胞癌 (giant cell carcinoma)、巨细胞癌 (carcinoma gigantocellulare)、腺癌、颗粒细胞癌、发母质癌、多血癌、肝细胞癌、Hurthle 细胞癌、胶样癌、肾上腺样癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、Krompecher's 癌、Kulchitzky 细胞癌、大细胞癌、豆状癌 (lenticular carcinoma)、豆状癌 (carcinoma lenticulare)、脂瘤样癌、淋巴上皮癌、髓样癌 (carcinoma medullare)、髓样癌 (medullary carcinoma)、黑色素癌、软癌、粘液癌 (mucinous carcinoma)、粘液癌 (carcinoma muciparum)、克鲁肯伯格瘤、粘液表皮样癌、粘液癌 (carcinoma mucosum)、粘液癌 (mucous carcinoma)、粘液瘤样癌、鼻咽癌、燕麦细胞癌、骨化性癌 (carcinoma ossificans)、骨质癌 (osteoid carcinoma)、乳头状癌、门静脉周癌、浸润前癌、棘细胞癌、粉刺癌、肾细胞癌、贮

备细胞癌、肉瘤样癌、Schneiderian癌、硬癌 (scirrhous carcinoma)、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、马铃薯状癌、球状细胞癌、梭形细胞癌、髓样癌 (carcinoma spongiosum)、鳞状癌、鳞状细胞癌、绳捆癌 (string carcinoma)、血管扩张性癌 (carcinoma telangiectaticum)、血管扩张性癌 (carcinoma telangiectodes)、过渡细胞癌、结节性皮癌 (carcinoma tuberosum)、小管癌、结节性皮癌 (tuberous carcinoma)、疣状癌或绒毛状癌。

术语“相关”或“与……相关”用在与疾病(例如,癌症、哮喘、溃疡性结肠炎、肠易激综合征、关节炎、葡萄膜炎、坏疽性脓皮病或结节性红斑)相关的物质或物质活性或功能上下文时是指疾病由所述物质或物质活性或功能导致(全部或部分),或者所述疾病症状由所述物质或物质活性或功能导致(全部或部分)。

如本文所定义,术语“免疫检查点”,“免疫检查点蛋白”或“检查点蛋白”可互换使用,并且是指能够调节生理免疫应答的持续时间和幅度(例如,减弱和/或消除持续免疫细胞活化、hus调节正常免疫稳态)的组合物(分子)。免疫检查点蛋白可以刺激(增加)免疫应答。在实施方案中,检查点蛋白是细胞受体。刺激性检查点分子的实例包括但不限于肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员(例如CD27、CD40、OX40、糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因(GITR)和CD137)、B7-CD28超家族成员(例如CD28本身和诱导型T细胞共刺激分子(ICOS))。或者,免疫检查点蛋白可以抑制(降低)免疫应答。抑制性检查点分子的实例包括但不限于腺苷A2A受体(A2AR)、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)、杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)、LAG3、PD-1、TIM-3和T细胞活化(VISTA)蛋白的V-结构域免疫球蛋白抑制剂。

同样地,本文提供的“免疫检查点抑制剂”或“检查点抑制剂”是指相对于不存在抑制剂时检查点蛋白的活性或功能,能够抑制、负面影响(例如,降低)检测点蛋白活性或功能(例如,降低检查点蛋白表达或降低检查点蛋白的活性)的物质(例如,抗体或其片段、小分子)。检查点抑制剂可以至少一部分地、部分或完全阻断刺激,减少、预防或延迟激活,或失活、脱敏或下调信号转导或酶活性或检查点蛋白的量。检查点抑制剂可以抑制检查点蛋白,例如通过结合,部分或完全阻断、降低、预防、延缓、失活、脱敏或下调的检查点蛋白的活性。在实施方案中,检查点抑制剂是抗体。在实施方案中,检查点抑制剂是抗体片段。在实施方案中,检查点抑制剂是抗体变体。在实施方案中,检查点抑制剂是scFv。在实施方案中,检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体。在实施方案中,检查点抑制剂是抗PD1抗体。在实施方案中,检查点抑制剂是抗PD-L1抗体。在实施方案中,检查点抑制剂是抗LAG-3抗体。在实施方案中,检查点抑制剂是抗IgG1k抗体。在实施方案中,检查点抑制剂是抗CD25抗体。在实施方案中,检查点抑制剂是抗IL2R抗体。在实施方案中,检查点抑制剂形成溶瘤病毒的一部分。检查点抑制剂的非限制性实例包括伊匹木单抗、pembrolizumab、nivolumab、talimogene laherparepvec、durvalumab、daclizumab、avelumab和atezolizumab。

术语“异常”用在本文是指不同于正常。当用于描述酶活性时,异常是指活性高于或低于正常对照或正常非患病对照样品的平均值。异常活性可以指导疾病的活性的量,其中使异常活性回到正常或非疾病相关的量(例如使用本文描述的方法)导致疾病或者一或多种疾病症状的降低。

“对照”或“标准对照”是指用作参考的样品、测量或值,其通常是已知的参考用于

与测试样品、测量或值进行比较。例如,可以从怀疑患有特定疾病(例如癌症)的患者中取出测试样品,并将其与已知的正常(非患病)个体(例如标准对照对象)进行比较。标准对照还可以表示从没患有给定疾病的相似个体(例如标准对照对象)的群体(即标准对照群体)收集的平均测量或值,例如具有相似医疗背景、相同年龄、重量等的健康个体。标准对照值也可以从同一个体获得,例如从疾病发作前的来自患者的较早获得的样品中获得。例如,对照可以被设计基于药理学数据(例如半衰期)或者治疗测量(例如比较副作用)而比较治疗益处。对照对于确定数据的显著性也是有价值的。例如,如果一给定参数的数值在对照中是广泛变化的,则测试样品中的差异不被认为是显著的。技术人员将认识到,可以设计标准对照以评估任何数量的参数(例如RNA水平、蛋白质水平、特定细胞类型、特定体液、特定组织、滑膜细胞、滑液、滑膜组织、成纤维细胞样滑膜细胞、巨噬细胞样滑膜细胞等)。

本领域技术人员将理解哪种标准对照在给定情况下最合适并且能够基于与标准对照值的比较来分析数据。标准对照对于确定数据的显著性(例如统计学显著性)也是有价值的。例如,如果一给定参数的数值在对照中是广泛变化的,则测试样品中的差异不被认为是显著的。

术语“诊断”是指对象中存在疾病(例如癌症)的相对概率。类似地,术语“预后”是指相对于疾病状态在对象中可能发生某种未来结果的相对概率。例如,在本发明的上下文中,预后可以指个体发展疾病(例如癌症)或疾病的可能严重性(例如,疾病持续时间)的可能性。如医学诊断领域的任何技术人员将理解的,这些术语不是绝对的。

“生物学样品”或者“样品”是指从对象或者患者获得的材料。生物学样品包括组织切片如活检和尸检样品,以及为组织学目的采集的冷冻切片。这种样品包括体液如血液和血液部分或产品(例如血清、血浆、血小板、红细胞等)、痰、组织、培养的细胞(例如原代培养物、移植植物和转化的细胞)、粪便、尿、滑膜液、关节组织、滑膜组织、滑膜细胞、成纤维细胞样滑膜细胞、巨噬细胞样滑膜细胞、免疫细胞、造血细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、T细胞等。生物学样品典型地得自真核生物,如哺乳动物,如灵长类,例如黑猩猩或人;奶牛;狗;猫;啮齿类,例如豚鼠、大鼠、小鼠;兔;或鸟;爬行动物;或鱼。

本文所用“细胞”是指进行代谢或其它功能足以保持或复制其基因组DNA的细胞。细胞可以用本领域公知方法鉴别,包括例如,存在完整细胞膜,由特定染料染色,能产生后代的能力,或者在配子情况下,能与第二种配子组合产生活的后代的能力。细胞可以包括原核和真核细胞。原核细胞包括但不限于细菌。真核细胞包括但不限于酵母细胞及衍生自植物和动物的细胞,例如哺乳动物细胞、昆虫细胞(例如斜纹夜蛾)和人细胞。细胞当是天然不粘附的或者被处理例如用胰蛋白酶化处理而不粘附表面时是有用的。

术语“复制”根据其通常的含义使用,并且是指细胞或病毒产生子代的能力。本领域普通技术人员将立即理解,当与DNA结合使用时,术语复制是指从一个原始DNA分子产生两个相同的DNA复制品的生物学过程。因此,术语“复制”包括传代和再感染子代细胞。在实施方案中,与其亲本病毒相比,本文提供的嵌合痘病毒具有增加的溶瘤活性。在实施方案中,相对于亲本病毒(用于形成本文提供的嵌合病毒的病毒之一)的溶瘤活性,溶瘤活性(在感染细胞中诱导细胞死亡的能力)增加超过1.5倍、2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、100倍、10000倍、100000倍。

如本文所用的“协同量”是指产生协同作用(即作用大于累加作用)的第一量(例

如,第一嵌合痘病毒的量)和第二量(例如,第二嵌合痘病毒的量)的总和。因此,本文中可互换使用的术语“协同”、“协同作用”、“协同的”、“组合协同作用量”和“协同治疗作用”是指组合施用的嵌合痘病毒的测量作用,其中测量的作用大于单独作为单一药剂施用的每种嵌合痘病毒的个体作用的总和。

在实施方案中,当与第二嵌合痘病毒分开使用时,协同量可以是第一嵌合痘病毒量的约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。在实施方案中,当与第一嵌合痘病毒分开使用时,协同量可以是第二嵌合痘病毒量的约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。

术语“病毒”或“病毒颗粒”根据其在病毒学中的通常含义使用,并且是指包括病毒基因组(例如DNA、RNA、单链、双链)、病毒衣壳和相关蛋白质的病毒体,并且在包膜病毒(例如疱疹病毒、痘病毒)的情况下,包膜包含脂质和任选存在的宿主细胞膜组分和/或病毒蛋白质。

术语“痘病毒”根据其在病毒学中的通常含义使用,并且是指能够感染脊椎动物和无脊椎动物的痘病毒科的成员,其在宿主的细胞质中复制。在实施方案中,痘病毒病毒体的直径为约200nm,长度为约300nm,并且具有单个线性双链区段的DNA基因组,通常为130-375千碱基。术语痘病毒包括但不限于痘病毒科的所有属(例如,betaentomopoxvirus、亚塔痘病毒属、cervidpoxvirus、gammaentomopoxvirus、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属、crocodylidpoxvirus、alphaentomopoxvirus、山羊痘病毒属、正痘病毒属、禽痘病毒属、和副痘病毒属)。在实施方案中,痘病毒是正痘病毒属(例如天花病毒、痘苗病毒、牛痘病毒、猴痘病毒)、副痘病毒属(例如羊传染性口疮病毒、假牛痘病毒、牛流行性口炎病毒)、亚塔痘病毒属(例如塔纳痘病毒、雅巴猴痘病毒)或软疣痘病毒属(例如传染性软疣病毒)。在实施方案中,痘病毒是正痘病毒属(例如牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株

Lederle-Chorioallantoic、或痘苗病毒株AS)。在实施方案中,痘病毒是副痘病毒属(例如羊传染性口疮病毒株NZ2或假牛痘病毒株TJS)。

在嵌合痘病毒的背景下使用的术语“嵌合”根据其在病毒学中的通常含义使用,并且是指通过连接来自两种或更多种不同微生物(例如,来自同一亚科的两种病毒,来自不同亚科的两种病毒)的核酸片段而产生的杂合微生物(例如,嵌合痘病毒)。在实施方案中,组合的来自至少两个痘病毒株的核酸片段含有复制所必需的必需基因。在实施方案中,来自至少两个痘病毒株之一的核酸片段含有复制所必需的必需基因。本文包括其实施方案提供的嵌合痘病毒可包括一种或多种转基因(即,非天然的病毒基因组的核酸序列)。例如,本文包括其实施方案提供的嵌合痘病毒可包括抗癌核酸序列、核酸结合序列、编码可检测部分的核酸序列或其任何组合。在实施方案中,嵌合痘病毒包括核酸序列,其包括抗癌核酸序列、核酸结合序列和编码可检测部分的核酸序列。在实施方案中,嵌合痘病毒包括核酸序列,其包括抗癌核酸序列和编码可检测部分的核酸序列。在实施方案中,嵌合痘病毒包括核酸序列,其包括核酸结合序列和编码可检测部分的核酸序列。在实施方案中,嵌合痘病毒包括核酸序列,其包括抗癌核酸序列和核酸结合序列。

术语“噬斑形成单位”根据其在病毒学中的通常含义使用,并且是指每单位体积的病毒颗粒可形成的细胞单层中的噬斑的量。在一些实施方案中,所述单位基于感染单层易感细胞时可能形成的噬斑数。例如,在实施方案中,1,000PFU/ $\mu$ l表示1 $\mu$ l包含病毒颗粒的溶液含有足够的病毒颗粒以在细胞单层中产生1000个感染性噬斑。在实施方案中,噬斑形成单位缩写为“PFU”。

术语“感染复数”或“MOI”根据其在病毒学中的通常含义使用,并且是指在给定区域或体积中感染剂(例如,痘病毒)与靶(例如,细胞)的比率。在实施方案中,假设面积或体积是同质的。

术语“牛痘病毒株Brighton”根据其通常的普通含义使用,并且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的牛痘病毒株 Brighton或其变体,其维持牛痘病毒株 Brighton活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的牛痘病毒株 Brighton或其变体,其基因组与牛痘病毒株 Brighton基因组具有序列相同性(例如与牛痘病毒株 Brighton基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。牛痘病毒株 Brighton可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与牛痘病毒株 Brighton相比增加或减少)牛痘病毒株 Brighton活性、表达、细胞靶向或感染性。牛痘病毒株 Brighton可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,牛痘病毒株 Brighton是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-302<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。在实施方案中,牛痘病毒株 Brighton是指由分类学鉴定为参考号265872的病毒株、其变体或同源物。

术语“浣熊痘病毒株Herman”根据其通常的普通含义使用,且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的浣熊痘病毒株 Herman或其变体,其维持浣熊痘病毒株 Herman活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的浣熊痘病毒株 Herman或其变体,其基因组与浣熊痘病毒株 Herman基因组具有序列相同性(例如与浣熊痘病毒株

Herman基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。浣熊痘病毒株Herman可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与浣熊痘病毒株Herman相比增加或减少)浣熊痘病毒株Herman活性、表达、细胞靶向或感染性。浣熊痘病毒株Herman可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,浣熊痘病毒株Herman是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-838<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。在实施方案中,浣熊痘病毒株Herman是指由参考号NC\_027213的核酸序列编码的病毒株。

术语“兔痘病毒株Utrecht”根据其通常的普通含义使用,并且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的兔痘病毒株Utrecht或其变体,其维持兔痘病毒株Utrecht活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的兔痘病毒株Utrecht或其变体,其基因组与兔痘病毒株Utrecht基因组具有序列相同性(例如与兔痘病毒株Utrecht基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。兔痘病毒株Utrecht可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与兔痘病毒株Utrecht相比增加或减少)兔痘病毒株Utrecht活性、表达、细胞靶向或感染性。兔痘病毒株Utrecht可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,兔痘病毒株Utrecht是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-1591<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。在实施方案中,兔痘病毒株Utrecht是指由分类学鉴定为参考号45417的病毒株、其变体或同源物。

术语“痘苗病毒株WR”根据其通常的普通含义使用,且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株WR或其变体,其维持痘苗病毒株WR活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株WR或其变体,其基因组与痘苗病毒株WR基因组具有序列相同性(例如与痘苗病毒株WR基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。痘苗病毒株WR可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与痘苗病毒株WR相比增加或减少)痘苗病毒株WR活性、表达、细胞靶向或感染性。痘苗病毒株WR可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,痘苗病毒株WR是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-1354<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。在实施方案中,痘苗病毒株WR是指由分类学鉴定为参考号10254的病毒株、其变体或同源物。

术语“痘苗病毒株IHD”根据其通常的普通含义使用,且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株IHD或其变体,其维持痘苗病毒株IHD活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株IHD或其变体,其基因组与痘苗病毒株IHD基因组具有序列相同性(例如与痘苗病毒株IHD基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。痘苗病毒株IHD可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与痘苗病毒株IHD相比增加或减少)痘苗病毒株IHD活性、表达、细胞靶向或感染性。痘苗病毒株IHD可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,痘苗病毒株IHD是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-156<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。在实施方案中,痘苗病毒株IHD是指由分类学鉴定为参考号10251

的病毒株、其变体或同源物。

术语“痘苗病毒株Elstree”根据其通常的普通含义使用,且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株Elstree或其变体,其维持痘苗病毒株Elstree活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株Elstree或其变体,其基因组与痘苗病毒株Elstree基因组具有序列相同性(例如与痘苗病毒株Elstree基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。痘苗病毒株Elstree可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与痘苗病毒株Elstree相比增加或减少)痘苗病毒株Elstree活性、表达、细胞靶向或感染性。痘苗病毒株Elstree可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,痘苗病毒株Elstree是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-1549<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。

术语“痘苗病毒株CL”根据其通常的普通含义使用,且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株CL或其变体,其维持痘苗病毒株CL活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株CL或其变体,其基因组与痘苗病毒株CL基因组具有序列相同性(例如与痘苗病毒株CL基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。痘苗病毒株CL可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与痘苗病毒株CL相比增加或减少)痘苗病毒株CL活性、表达、细胞靶向或感染性。痘苗病毒株CL可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,痘苗病毒株CL是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-1774<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。

术语“痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic”根据其通常的普通含义使用,且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或其变体,其维持痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或其变体,其基因组与痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic基因组具有序列相同性(例如与痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic相比增加或减少)痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic活性、表达、细胞靶向或感染性。痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-118<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。

术语“痘苗病毒株AS”根据其通常的普通含义使用,且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株AS或其变体,其维持痘苗病毒株AS活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的痘苗病毒株AS或其变体,其基因组与痘苗病毒株AS基因组具有序列相同性(例如与痘苗病毒株AS基因组具有约65%、70%、75%、80%、

85%、90%、95%、99%或100%相同性)。痘苗病毒株AS可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与痘苗病毒株AS相比增加或减少)痘苗病毒株AS活性、表达、细胞靶向或感染性。痘苗病毒株AS可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,痘苗病毒株AS是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-2010<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。

术语“羊传染性口疮病毒株NZ2”根据其通常的普通含义使用,且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的羊传染性口疮病毒株NZ2或其变体,其维持羊传染性口疮病毒株NZ2活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的羊传染性口疮病毒株NZ2或其变体,其基因组与羊传染性口疮病毒株NZ2基因组具有序列相同性(例如与羊传染性口疮病毒株NZ2基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。羊传染性口疮病毒株NZ2可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与羊传染性口疮病毒株NZ2相比增加或减少)羊传染性口疮病毒株NZ2活性、表达、细胞靶向或感染性。羊传染性口疮病毒株NZ2可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,羊传染性口疮病毒株NZ2是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-1548<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。在实施方案中,羊传染性口疮病毒株NZ2是指由分类学鉴定为参考号10259的病毒株、其变体或同源物。

术语“假牛痘病毒株TJS”根据其通常的普通含义使用,且是指具有相同或相似名称的病毒株及其功能片段和同源物。该术语包括重组或天然存在形式的假牛痘病毒株TJS或其变体,其维持假牛痘病毒株TJS活性(例如至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%内)。该术语包括重组或天然存在形式的假牛痘病毒株TJS或其变体,其基因组与假牛痘病毒株TJS基因组具有序列相同性(例如与假牛痘病毒株TJS基因组具有约65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%相同性)。假牛痘病毒株TJS可以指具有突变氨基酸残基的变体,所述突变氨基酸残基调节(例如,与假牛痘病毒株TJS相比增加或减少)假牛痘病毒株TJS活性、表达、细胞靶向或感染性。假牛痘病毒株TJS可以如本文所述进行修饰。在实施方案中,假牛痘病毒株TJS是指由ATCC(美国典型培养物保藏中心)鉴定为参考号ATCC VR-634<sup>TM</sup>的病毒株、其变体或同源物。

在实施方案中,牛痘病毒株Brighton是牛痘病毒株Brighton ATCC VR-302<sup>TM</sup>。在实施方案中,浣熊痘病毒株Herman是浣熊痘病毒株Herman ATCC VR-838<sup>TM</sup>。在实施方案中,兔痘病毒株Utrecht是兔痘病毒株Utrecht ATCC VR-1591<sup>TM</sup>。在实施方案中,痘苗病毒株WR是痘苗病毒株WR ATCC VR-1354<sup>TM</sup>。在实施方案中,痘苗病毒株IHD是痘苗病毒株IHD ATCC VR-156<sup>TM</sup>。在实施方案中,痘苗病毒株Elstree是痘苗病毒株Elstree ATCC VR-1549<sup>TM</sup>。在实施方案中,痘苗病毒株CL是痘苗病毒株CL ATCC VR-1774<sup>TM</sup>。在实施方案中,痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic是痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic ATCC VR-118<sup>TM</sup>。在实施方案中,痘苗病毒株AS是痘苗病毒株AS ATCC VR-2010TM。在实施方案中,羊传染性口疮病毒株NZ2是羊传染性口疮病毒株NZ2 ATCC VR-1548<sup>TM</sup>。在实施方案中,假牛痘病毒株TJS是假牛痘病毒株TJS ATCC VR-634<sup>TM</sup>。在实施方案中,牛痘病毒株Brighton是指由分类学鉴定为参考号265872的病毒株、其变体或同源物。

在本公开中,“包含”、“含有”和“具有”等可以具有美国专利法中赋予它们的含义,

并且可以表示“包括”等。“基本上由……组成”同样具有美国专利法中赋予的含义，并且该术语是开放式的，允许存在多于所述的那些，只要所述的基本或新颖特征不会因所述内容的存在而改变，但不包括现有技术实施方案。

## II. 病毒组合物

一方面，提供了嵌合痘病毒，其包含与SEQ ID N0:1或SEQ ID N0:2具有至少70%序列相同性的核酸序列，其中所述核酸序列包括来自至少两个选自以下的痘病毒株的核酸片段：牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

如本文所述的嵌合痘病毒可包括转基因。如本文所用，“转基因”是指源自给定细胞、生物体或病毒外部的核酸序列。因此，本文提供的转基因不是痘病毒天然的或起源于痘病毒。本文提供的转基因可以编码蛋白质或可以是非编码核酸序列。本文提供的转基因可包括抗癌核酸序列(例如，核酸结合序列和编码可用于治疗癌症的多肽的核酸序列)或编码可检测部分的核酸序列。因此，在实施方案中，本文所述的嵌合痘病毒包括一种或多种抗癌核酸序列或编码可检测部分的核酸序列。在实施方案中，本文所述的嵌合痘病毒包括一种或多种抗癌核酸序列和编码可检测部分的核酸序列。

在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少71%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少72%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少73%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少74%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少75%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少76%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少77%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少78%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少79%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少80%的序列相同性。

在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少81%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少82%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少83%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少84%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少85%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少86%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少87%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少88%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少89%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少90%的序列相同性。

在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少91%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少92%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少93%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少94%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少95%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少96%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少97%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少98%的序列相同性。在实施方案中，核酸序列与SEQ ID N0:1具有至少99%的序列相同性。



案中,核酸序列与SEQ ID NO:1具有89%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:1具有90%的序列相同性。

在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有91%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有92%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有93%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有94%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有95%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有96%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有97%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有98%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有99%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列是SEQ ID NO:2的序列。

在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:1具有约71%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:1具有约72%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:1具有约73%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:1具有约74%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:1具有约75%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:1具有约76%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:



2具有约97%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有约98%的序列相同性。在实施方案中,核酸序列与SEQ ID NO:2具有约99%的序列相同性。

核酸序列可以具有至少70%的序列相同性,并且具有至少70%序列相同性的核酸序列可以是连续的。在实施方案中,核酸序列具有至少70%的序列相同性,并且具有至少70%序列相同性的核酸序列是非连续序列。如本文提供的“非连续序列”是指包括与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2不具有序列相同性的一种或多种序列片段的序列。在实施方案中,非连续序列是包含通过与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2没有序列相同性的序列片段将与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的第一序列片段和与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的第二序列片段连接的序列。在实施方案中,非连续序列是包含多个序列片段的序列,所述序列片段与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%的序列相同性,所述序列片段通过与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2没有序列相同性的多个序列片段连接。在实施方案中,嵌合痘病毒还包括核苷酸插入、缺失或突变。

在实施方案中,核酸片段来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS。

在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和浣熊痘病毒株Herman的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和兔痘病毒株Utrecht的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株WR的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株IHD的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株Elstree的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株WR的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株IHD的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株Elstree的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht和羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株WR和痘苗病毒株IHD的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株WR和痘苗病毒株Elstree的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株WR和痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株WR和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic的核酸片段。在实施方

案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株WR和痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株WR和羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株WR和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD和痘苗病毒株Elstree的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD和痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD和痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD和羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree和痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree和痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree和羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株CL和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株CL和痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株CL和羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株CL和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株AS和羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自痘苗病毒株AS和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。在实施方案中,核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来

自浣熊痘病毒株Herman的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株WR的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少70%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少70%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少70%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自浣熊痘病毒株Herman的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株WR的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少80%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自浣熊痘病毒株Herman的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株WR的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少90%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少90%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒

株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自浣熊痘病毒株Herman的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株WR的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株IHD的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少95%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少95%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自牛痘病毒株Brighton的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自浣熊痘病毒株Herman的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自兔痘病毒株Utrecht的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株WR的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗

病毒株IHD的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Elstree的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株CL的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:1具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic或痘苗病毒株AS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自羊传染性口疮病毒株NZ2的核酸片段。在实施方案中,嵌合痘病毒包括与SEQ ID NO:2具有至少98%的序列相同性的核酸序列,并且其中核酸序列包括来自假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

在实施方案中,嵌合痘病毒是溶瘤病毒。如本文所用,溶瘤病毒是能够靶向和消除癌细胞的病毒。在实施方案中,溶瘤病毒靶向肺癌细胞。在实施方案中,溶瘤病毒靶向卵巢癌细胞。在实施方案中,溶瘤病毒靶向胰腺癌细胞。在实施方案中,溶瘤病毒相对于非癌细胞优先靶向癌细胞。

在实施方案中,miRNA结合序列形成嵌合痘病毒的DNA聚合酶基因的一部分。在实施方案中,痘病毒包括miRNA结合序列。在实施方案中,痘病毒包括多个miRNA结合序列。在实施方案中,多个miRNA结合序列互不相同。在实施方案中,多个miRNA结合序列是相同的。在实施方案中,miRNA结合序列的长度为约22个核苷酸。在实施方案中,miRNA结合序列的长度为至少22个核苷酸。在实施方案中,miRNA结合序列的长度为22个核苷酸。在实施方案中,miRNA结合序列的长度为约22个核苷酸。在实施方案中,多个miRNA结合序列中的每一个的长度为至少22个核苷酸。在实施方案中,多个miRNA结合序列中的每一个的长度为约22个核苷酸。在实施方案中,多个miRNA结合序列中的每一个的长度为22个核苷酸。

一方面,提供了编码如本文所述的嵌合痘病毒的分离的核酸。在实施方案中,分离的核酸是SEQ ID NO:1。在实施方案中,分离的核酸是SEQ ID NO:2。

### III. 包括转基因的病毒组合物

本文包括其实施方案提供的嵌合痘病毒可包括转基因。与缺乏所述转基因的嵌合痘病毒相比,本文提供的嵌合痘病毒中包含的转基因可以增加嵌合痘病毒的溶瘤活性。相对于健康(非癌)细胞,转基因可以进一步增加嵌合痘病毒在癌细胞中差异表达/复制的能力。当嵌合痘病毒包括转基因时,嵌合痘病毒的核酸包括抗癌核酸序列、核酸结合序列、编码可检测部分的核酸序列或其任何组合。因此,一方面提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段:牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS,羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS;(ii)一种或多种抗癌核酸序列;或(iii)编码可检测部分的核酸序列。

一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括:(i)来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘

病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段；(ii)一种或多种抗癌核酸序列；或(iii)编码可检测部分的核酸序列。

一方面，提供了嵌合痘病毒，其包含与SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列，其中所述核酸序列包括：(i)来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段；(ii)一种或多种抗癌核酸序列；或(iii)编码可检测部分的核酸序列。

一方面，提供了嵌合痘病毒，其包含与SEQ ID NO:3具有至少70%序列相同性的核酸序列，其中所述核酸序列包括：(i)来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段；(ii)一种或多种抗癌核酸序列；或(iii)编码可检测部分的核酸序列。

如本文所用，术语“抗癌核酸序列”或“多个抗癌核酸序列”是指具有抗肿瘤特性和/或抑制癌细胞生长或增殖的能力和/或提供相对于健康细胞用于在癌细胞中选择性表达本文包括其实实施方案提供的嵌合痘病毒的核酸序列。抗癌核酸序列可暂时或永久地抑制癌症的进展或减缓其进展。抗癌核酸序列的实例包括编码蛋白质的序列，所述蛋白质的表达直接或间接地抑制癌细胞生长。例如，本文提供的抗癌核酸序列可编码蛋白质，其相对于健康细胞在癌细胞中以较高水平表达(例如，钠碘共输送体)。在另一个非限制性实例中，抗癌核酸序列可以编码能够去抑制抗肿瘤免疫应答的多肽(抗体)(例如，抗PD-L1抗体或其片段)。在实施方案中，抗癌核酸序列包括能够相对于健康细胞增加癌细胞中嵌合痘病毒的表达/复制的核酸序列。因此，在实施方案中，相对于癌细胞，在健康细胞中包含抗癌核酸序列的嵌合痘病毒的表达(例如，转录，翻译)速率降低。在实施方案中，包含抗癌核酸序列的嵌合痘病毒在健康细胞中不以可检测的量表达。在实施方案中，抗癌核酸序列是核酸结合序列。在实施方案中，抗癌核酸序列包括核酸结合序列。

如本文所用，“核酸结合序列”是指能够与至少部分互补的细胞核酸(例如，DNA、RNA、miRNA)结合(杂交)的核酸序列，其中相对于癌细胞，健康细胞中存在的细胞核酸的量增加。本文提供的核酸结合序列可以形成嵌合痘病毒所包含的核酸的一部分，并且可以与嵌合痘病毒的基因可操作地连接。在细胞核酸与核酸结合序列结合后，可以靶向嵌合痘病毒基因进行降解(水解)，从而降低嵌合痘病毒的表达/复制。在实施方案中，核酸结合序列是DNA结合序列。在实施方案中，核酸结合序列是RNA结合序列。在实施方案中，核酸结合序列是miRNA结合序列。因此，在实施方案中，抗癌核酸序列是核酸结合序列。在实施方案中，抗癌核酸序列是DNA结合序列。在实施方案中，抗癌核酸序列是RNA结合序列。在实施方案中，抗癌核酸序列是miRNA结合序列。

如本文所用的“编码可检测部分的核酸序列”是指编码可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理手段检测的组合物的核酸序列。编码可检测部分的核酸序列可编码荧光部分。荧光部分的非限制性实例是mCherry、Emerald和萤火虫荧光素酶。

一方面，提供了嵌合痘病毒，其包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列，其中所述核酸序列包括：(i)来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段：牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-

Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; (ii) 一种或多种抗癌核酸序列; (iii) 一种或多种核酸结合序列; 或 (iv) 编码可检测部分的核酸序列。

另一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括: (i) 来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段; (ii) 一种或多种抗癌核酸序列; (iii) 一种或多种核酸结合序列; 或 (iv) 编码可检测部分的核酸序列。

另一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括: (i) 来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段; (ii) 一种或多种抗癌核酸序列; (iii) 一种或多种核酸结合序列; 或 (iv) 编码可检测部分的核酸序列。

另一方面,提供了嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:3具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包括: (i) 来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段; (ii) 一种或多种抗癌核酸序列; (iii) 一种或多种核酸结合序列; 或 (iv) 编码可检测部分的核酸序列。

在实施方案中,核酸序列包括: (i) 来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; 以及 (ii) 一种或多种抗癌核酸序列。在实施方案中,核酸片段来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS。在实施方案中,核酸片段来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

在实施方案中,核酸序列包括: (i) 来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; 和 (ii) 一种或多种核酸结合序列。在实施方案中,核酸片段来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和牛痘病毒株AS。在实施方案中,核酸片段来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

在实施方案中,核酸序列包括: (i) 来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; 和 (ii) 编码可检测部分的核酸序列。在实施方案中,核酸片段来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株

Lederle-Chorioallantoic和牛痘病毒株AS。在实施方案中,核酸片段来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

在实施方案中,核酸序列包括: (i) 来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; (ii) 一种或多种抗癌核酸序列; 和 (iii) 编码可检测部分的核酸序列。在实施方案中,核酸片段来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS。在实施方案中,核酸片段来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

在实施方案中,核酸序列包括: (i) 来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; (ii) 一种或多种抗癌核酸序列; 和 (iii) 一种或多种核酸结合序列。在实施方案中,核酸片段来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS。在实施方案中,核酸片段来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

抗癌核酸序列(转基因)可形成本文包含的实施方案提供的嵌合痘病毒的基因组的一部分。嵌合痘病毒基因组包含痘病毒表达和复制所需要的基因。嵌合痘病毒的表达和复制所需要的基因在本文中被称为“必需基因”。嵌合痘病毒的表达和复制不需要的基因在本文中被称为“非必需基因”。抗癌核酸序列可以通过插入基因或者可以与基因可操作地连接而整合入嵌合痘病毒基因组中。在将抗癌核酸序列插入嵌合痘病毒基因后,可以缺失基因(例如,非必需基因)或其部分。在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列形成嵌合痘病毒的非必需基因的一部分。在实施方案中,将一种或多种抗癌核酸序列插入嵌合痘病毒的非必需基因中。在实施方案中,非必需基因是胸苷激酶基因。在实施方案中,非必需基因是J2R基因。在实施方案中,非必需基因是F14.5L基因。

如上所述,抗癌核酸序列可编码用于治疗癌症的多肽。在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列独立地编码PD-L1抑制剂或钠碘共输送体。在实施方案中,PD-L1抑制剂是抗PD-L1 scFv。在实施方案中,抗PD-L1 scFv包括SEQ ID NO:17的序列。在实施方案中,抗PD-L1 scFv是SEQ ID NO:17的序列。在实施方案中,钠碘共输送体包括SEQ ID NO:13的序列。在实施方案中,钠碘共输送体是SEQ ID NO:13的序列。

本文提及的“PD-L1”或“PD-L1蛋白”包括任何重组或天然存在形式的程序性死亡配体1(PD-L1)(也称为分化簇274(CD 274))或维持PD-L1活性的其变体或同源物(例如,与PD-L1相比,活性在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内)。在一些方面,与天然存在的PD-L1蛋白相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分(例如50、100、150或200个连续氨基酸部分)上具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列相同性。在实施方案中,PD-L1蛋白与由UniProt鉴定为参考号Q9NZQ7的蛋白质或与其具有基本相同性的变体或同源物基本相同。

本文提供的术语“PD-L1抑制剂”是指与对照相比能够可检测地降低PD-L1的表达或活性水平的物质(例如,抗体、抗体片段、单链可变片段[scFv])。PD-L1的抑制的表达或活性可以是对照的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更低。在某些情况下,与对照相比,抑制是1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。PD-L1抑制剂抑制PD-L1,例如,相对于不存在PD-L1抑制剂,至少一部分、部分地或完全阻断刺激、降低、预防、或延缓活化,或失活、脱敏或下调PD-L1的信号转导、活性或量。

本文提及的术语“钠碘共输送体”、“NIS”或“hNIS”包括任何重组或天然存在形式的钠碘共输送体或维持钠碘共输送体活性的其变体或同源物(例如,与钠碘共输送体相比,活性在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内)。在一些方面,与天然存在的钠碘共输送体相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分(例如50、100、150或200个连续氨基酸部分)上具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列相同性。在实施方案中,钠碘共输送体与由UniProt鉴定为参考号Q92911的蛋白质或与其具有基本相同性的变体或同源物基本相同。在实施方案中,钠碘共输送体包括SEQ ID NO:13的序列。在实施方案中,钠碘共输送体是SEQ ID NO:13的序列。

本文提供的抗癌核酸序列的表达可以通过启动子控制。因此,在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列各自与启动子可操作地连接。在实施方案中,启动子是痘苗病毒早期启动子。在实施方案中,启动子是合成的早期启动子。在实施方案中,合成的早期启动子包括SEQ ID NO:19的序列。在实施方案中,合成的早期启动子是SEQ ID NO:19的序列。在实施方案中,启动子是痘苗病毒晚期启动子。在实施方案中,启动子是H5启动子或11K启动子。在实施方案中,H5启动子包括SEQ ID NO:18的序列。在实施方案中,H5启动子是SEQ ID NO:18的序列。在实施方案中,11K启动子包括SEQ ID NO:20的序列。在实施方案中,11K启动子是SEQ ID NO:20的序列。

本文提供的抗癌核酸序列(核酸结合序列)可以整合入嵌合痘病毒基因组中,使得其与特定的痘病毒基因处于功能关系(可操作地连接)中。例如,如果抗癌核酸序列(核酸结合序列)影响痘病毒基因的转录或翻译,则其可以与痘病毒基因可操作地连接。通常,基因在抗癌核酸序列(核酸结合序列)和痘病毒是连续的和/或处于阅读相时,它们可操作地连接。在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列(一种或多种核酸结合序列)与嵌合痘病毒的必需基因可操作地连接。在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列(一种或多种核酸结合序列)与嵌合痘病毒的DNA聚合酶基因可操作地连接。在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列(一种或多种核酸结合序列)与嵌合痘病毒的DNA聚合酶基因的3'末端可操作地连接。在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列(一种或多种核酸结合序列)与尿嘧啶DNA糖基化酶基因可操作地连接。在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列(一种或多种核酸结合序列)与尿嘧啶DNA糖基化酶基因的3'末端可操作地连接。

在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列(一种或多种核酸结合序列)独立地编码miRNA结合序列。在实施方案中,miRNA结合序列是miR100结合序列或let7c结合序列。在实施方案中,miRNA结合序列是miR100结合序列。在实施方案中,miR100结合序列包括SEQ ID NO:9的序列。在实施方案中,miR100结合序列是SEQ ID NO:9的序列。在实施方案中,miR100结合序列包括SEQ ID NO:10的序列。在实施方案中,miR100结合序列是SEQ ID NO:10的序列。在实施方案中,miRNA结合序列是let7c结合序列。在实施方案中,let7c结合序列包括

SEQ ID NO:11的序列。在实施方案中,let7c结合序列是SEQ ID NO:11的序列。

在实施方案中,一种或多种抗癌核酸序列是第一抗癌核酸序列和第二抗癌核酸序列。如本文提供的,第一抗癌核酸序列可以是第一核酸结合序列,第二抗癌核酸序列可以是第二核酸结合序列。

在实施方案中,第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,并且所述第二抗癌核酸序列(第二核酸结合序列)编码miRNA结合序列。在实施方案中,第一抗癌核酸序列形成胸苷激酶基因的一部分,且第二抗癌核酸序列(第二核酸结合序列)与尿嘧啶DNA糖基化酶基因可操作地连接。在实施方案中,第一抗癌核酸序列形成胸苷激酶基因的一部分,且第二抗癌核酸序列(第二核酸结合序列)与DNA聚合酶基因可操作地连接。

在实施方案中,第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,第二抗癌核酸序列编码PD-L1抑制剂。在实施方案中,第一抗癌核酸序列形成胸苷激酶基因的一部分,且第二抗癌核酸序列形成F14.5L基因的一部分。

在实施方案中,核酸序列包括:(i)来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段:牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS;和(ii)所述编码可检测部分的核酸序列。在实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码荧光部分。在实施方案中,编码可检测部分的核酸序列形成嵌合痘病毒的非必需基因的一部分。在实施方案中,非必需基因是胸苷激酶基因。在实施方案中,部分缺失非必需基因。

在实施方案中,编码可检测部分的核酸序列与启动子可操作地连接。在实施方案中,启动子是痘苗病毒早期启动子。在实施方案中,启动子是合成的早期启动子。在实施方案中,合成的早期启动子包括SEQ ID NO:19的序列。在实施方案中,合成的早期启动子是SEQ ID NO:19的序列。在实施方案中,启动子是痘苗病毒晚期启动子。在实施方案中,启动子是H5启动子或11K启动子。在实施方案中,H5启动子包括SEQ ID NO:18的序列。在实施方案中,H5启动子是SEQ ID NO:18的序列。在实施方案中,11K启动子包括SEQ ID NO:20的序列。在实施方案中,11K启动子是SEQ ID NO:20的序列。

在一个实施方案中,抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:10序列的miRNA结合序列,并且与尿嘧啶DNA糖基化酶基因的3'末端可操作地连接。

在一个实施方案中,抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:9序列的miRNA结合序列,并且与尿嘧啶DNA糖基化酶基因的3'末端可操作地连接。

在一个实施方案中,抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:11序列的miRNA结合序列,并且与尿嘧啶DNA糖基化酶基因的3'末端可操作地连接。

在一个实施方案中,抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:9序列的miRNA结合序列,并且与DNA聚合酶基因的3'末端可操作地连接。

在一个实施方案中,抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:11序列的miRNA结合序列,并且与DNA聚合酶基因的3'末端可操作地连接。

在一个实施方案中,嵌合痘病毒的胸苷激酶基因具有SEQ ID NO:5的序列。

在一个实施方案中,抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,其与合成的早期启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分,其中钠碘共输送体具有SEQ ID NO:13的序列

和合成的早期启动子具有SEQ ID NO:19的序列。

在一个实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码具有SEQ ID NO:14序列的荧光部分,其与H5启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分,其中H5启动子具有SEQ ID NO:18的序列。

在一个实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码具有SEQ ID NO:15序列的荧光部分,其与合成的早期启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分,其中合成的早期启动子具有SEQ ID NO:19的序列。

在一个实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码具有SEQ ID NO:15序列的荧光部分,其与H5启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分,其中H5启动子具有SEQ ID NO:18的序列。

在一个实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码具有SEQ ID NO:15序列的荧光部分,其与11K启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分,其中11K启动子具有SEQ ID NO:20的序列。

在一个实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码具有SEQ ID NO:16序列的荧光部分,其与H5启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分,其中H5启动子具有SEQ ID NO:18的序列。

在一个实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码具有SEQ ID NO:16序列的荧光部分,其与11K启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分,其中11K启动子具有SEQ ID NO:20的序列。

在一个实施方案中,第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,其与合成的早期启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分;且第二抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:10序列的miRNA结合序列,并且与尿嘧啶DNA糖基化酶基因的3'末端可操作地连接,其中碘化钠共输送体具有SEQ ID NO:13的序列,且合成的早期启动子具有SEQ ID NO:19的序列。

在一个实施方案中,第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,其与合成的早期启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分;且第二抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:9序列的miRNA结合序列,并且与尿嘧啶DNA糖基化酶基因的3'末端可操作地连接,其中碘化钠共输送体具有SEQ ID NO:13的序列,且合成的早期启动子具有SEQ ID NO:19的序列。

在一个实施方案中,第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,其与合成的早期启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分;且第二抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:11序列的miRNA结合序列,并且与尿嘧啶DNA糖基化酶基因的3'末端可操作地连接,其中碘化钠共输送体具有SEQ ID NO:13的序列,且合成的早期启动子具有SEQ ID NO:19的序列。

在一个实施方案中,第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,其与合成的早期启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分;且第二抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:9序列的miRNA结合序列,并且与DNA聚合酶基因的3'末端可操作地连接,其中钠碘共输送体具有SEQ ID NO:13的序列,且合成的早期启动子具有SEQ ID NO:19的序列。

在一个实施方案中,第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,其与合成的早期启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分;且第二抗癌核酸序列(核酸结合序列)编码具有SEQ ID NO:11序列的miRNA结合序列,并且与DNA聚合酶基因的3'末端可操作地连接,其中钠碘共输送体具有SEQ ID NO:13的序列,且合成的早期启动子具有SEQ ID NO:19的序列。

在一个实施方案中,嵌合痘病毒的F14.5L基因具有SEQ ID NO:7的序列。

在一个实施方案中,抗癌核酸序列编码抗PD-L1 scFv,其与H5启动子可操作地连接,并形成F14.5L基因的一部分,其中抗PD-L1 scFv具有SEQ ID NO:17的序列且H5启动子具有SEQ ID NO:18的序列。

在一个实施方案中,抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,其与合成的早期启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分,并且F14.5L基因具有SEQ ID NO:7的序列,其中碘化钠转运体具有SEQ ID NO:13的序列,且合成的早期启动子具有SEQ ID NO:19的序列。

在一个实施方案中,第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体,其与合成的早期启动子可操作地连接,并形成胸苷激酶基因的一部分;且第二抗癌核酸序列编码抗PD-L1 scFv,其与H5启动子可操作地连接并形成F14.5L基因的一部分,其中钠碘共输送体具有SEQ ID NO:13的序列,且合成的早期启动子具有SEQ ID NO:19的序列,抗PD-L1 scFv具有SEQ ID NO:17的序列,并且H5启动子具有SEQ ID NO:18的序列。

#### IV. 形成嵌合痘病毒的方法

另一方面,提供了一种形成嵌合痘病毒的方法,该方法包括:用至少两种选自以下的痘病毒株感染细胞:牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS;并允许该至少两种痘病毒株复制,从而形成嵌合痘病毒。

本文提供的形成嵌合痘病毒的方法可用于形成嵌合痘病毒,包括如本文所述的转基因(例如,抗癌核酸序列、核酸结合序列、编码可检测部分的核酸序列)。

在实施方案中,所述至少两个痘病毒株各自以小于约1.0的感染复数存在。在实施方案中,所述至少两个痘病毒株各自以小于约0.5的感染复数存在。在实施方案中,所述至少两个痘病毒株各自以小于约0.1的感染复数存在。在实施方案中,所述至少两个痘病毒株各自以小于约0.05的感染复数存在。在实施方案中,所述至少两个痘病毒株各自以小于约0.01的感染复数存在。

在实施方案中,嵌合痘病毒通过以下方法形成:用至少两个痘病毒株感染细胞,所述痘病毒株选自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS;并允许该至少两个痘病毒株复制,从而形成嵌合痘病毒。

在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS感染。

在实施方案中,核酸片段来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS。

在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton和浣熊痘病毒株Herman感染。在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton和兔痘病毒株Utrecht感染。在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株WR感染。在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株IHD感染。在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株Elstree感染。在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株CL感染。在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic感染。在实施方案中,用牛痘病毒株Brighton和痘苗病毒株AS感染细胞。在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton和羊传染性口疮病毒株NZ2感染。在实施方案中,细胞用牛痘病毒株Brighton和假牛痘病毒株TJS感染。

在实施方案中,用兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株WR感染细胞。在实施方案中,细胞用兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株IHD感染。在实施方案中,细胞用兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株Elstree感染。在实施方案中,细胞用兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株CL感染。在实施方案中,细胞用兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic感染。在实施方案中,细胞用兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株AS感染。在实施方案中,细胞用兔痘病毒株Utrecht和羊传染性口疮病毒株NZ2感染。在实施方案中,细胞用兔痘病毒株Utrecht和假牛痘病毒株TJS感染。

在实施方案中,细胞用痘苗病毒株WR和痘苗病毒株IHD感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株WR和痘苗病毒株Elstree感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株WR和痘苗病毒株CL感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株WR和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株WR和痘苗病毒株AS感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株WR和羊传染性口疮病毒株NZ2感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株WR和假牛痘病毒株TJS感染。

在实施方案中,细胞用痘苗病毒株IHD和痘苗病毒株Elstree感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株IHD和痘苗病毒株CL感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株IHD和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株IHD和痘苗病毒株AS感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株IHD和羊传染性口疮病毒株NZ2感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株IHD和假牛痘病毒株TJS感染。

在实施方案中,细胞用痘苗病毒株Elstree和痘苗病毒株CL感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株Elstree和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株Elstree和痘苗病毒株AS感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株Elstree和羊传染性口疮病毒株NZ2感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株Elstree和假牛痘病毒株TJS感染。

在实施方案中,细胞用痘苗病毒株CL和痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株CL和痘苗病毒株AS感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株CL和羊传染性口疮病毒株NZ2感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株CL和假牛痘病毒株TJS感染。

在实施方案中,细胞用痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和羊传染性口疮病毒株NZ2感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和假牛痘病毒株TJS感染。

在实施方案中,细胞用痘苗病毒株AS和羊传染性口疮病毒株NZ2感染。在实施方案中,细胞用痘苗病毒株AS和假牛痘病毒株TJS感染。在实施方案中,用羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS感染细胞。

在实施方案中,细胞是细胞是肾成纤维细胞。在实施方案中,细胞是上皮细胞。在实施方案中,细胞是CV-1细胞。在实施方案中,细胞是奶牛肾上皮细胞。

#### V. 药物组合物

一方面,提供了药物组合物,其包含治疗有效量的如本文包括的实施方案所述的嵌合痘病毒。在实施方案中,嵌合痘病毒包括转基因(例如,抗癌核酸序列、核酸结合序列、编码可检测部分的核酸序列或其任何组合)。

“药物可接受赋形剂”和“药物可接受载体”是指有助于将活性物质给予对象和有助于对象吸收的物质,且其可以包括在本发明组合物中而不引起患者的显著毒副作用。药物可接受赋形剂的非限制性例子包括水、NaCl、生理盐水、乳酸化Ringer's、正常蔗糖、正常葡萄糖、粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、香味剂、盐溶液(如Ringer's溶液)、醇、油、明胶、碳水化合物如乳糖、直链淀粉或淀粉、脂肪酸脂、羟甲基纤维素、聚乙烯比咯烷酮和着色剂等。这种制备物可以被灭菌,如果希望,可以与辅助制剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂和/或芳香物质等混合,这些辅助制剂不与本发明化合物发生有害反应。本领域技术人员理解其它药物赋形剂可以用于本发明。

本文包括的实施方案提供的嵌合痘病毒组合物,可以口服、胃肠道或直肠施用。施用可以是单次推注剂的形式,或者可以是例如连续输注泵。在实施方案中,本文提供的嵌合痘病毒与一种或多种赋形剂组合,例如崩解剂、填充剂、助流剂或防腐剂。在实施方案中,本文提供的嵌合痘病毒形成胶囊的一部分。合适的胶囊包括硬壳胶囊或软壳胶囊。可以使用任何基于脂质或基于聚合物的胶体来形成胶囊。可用于胶体制剂的示例性聚合物包括明胶、植物多糖或其衍生物(例如角叉菜胶)和淀粉和纤维素的改性形式(例如羟丙甲纤维素)。任选地,可以将其他成分添加到凝胶溶液中,例如增塑剂如甘油和/或山梨糖醇以降低胶囊的硬度、着色剂、防腐剂、崩解剂、润滑剂和表面处理。

嵌合痘病毒组合物可以配制成单位剂型,每剂含有,例如,约0.005mg至约2000mg定义的嵌合痘病毒,每剂具有最小的脲酶活性。术语“单位剂型”是指适合作为人对象和其他哺乳动物的单位剂量的物理上离散的单位,每个单位含有预定量的活性物质,经计算产生所需的治疗效果,并与合适的药物赋形剂结合。为了制备固体组合物如片剂,将主要活性成分与药物赋形剂混合以形成含有本发明化合物的均匀混合物的固体制剂组合物。当认为这些制剂组合物是均质的时,活性成分通常均匀地分散在组合物中,使得组合物可以容易地细分成同等有效的单位剂型,例如片剂、丸剂和胶囊剂。

在一些实施方案中,可以将本发明的片剂或丸剂添加包衣或以其他方式混合以提供具有延长作用的优点的剂型。例如,片剂或丸剂可包含内剂量和外剂量组分,后者在前者上形成包膜。这两种组分可以通过肠溶层分开,肠溶层用于抵抗胃中的崩解并允许内部组

分完整地进入十二指肠或延迟释放。多种材料可用于这种肠溶层或包衣,这些材料包括许多聚合酸和聚合酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素的材料的混合物。

可以整合入本发明组合物用于口服或注射施用的液体形式包括水溶液、适当调味的糖浆、水性或油性悬浮液、以及含有食用油(例如棉籽油、芝麻油、椰子油、或花生油)的调味乳液,以及酏剂和类似的药学载剂。

#### VI. 治疗方法

在另一个方面,提供了治疗有需要的对象中的癌症的方法,该方法包括给对象施用治疗有效量的如本文包括的实施方案所述的嵌合痘病毒,从而治疗对象中的癌症。在实施方案中,癌症是乳腺癌、结肠癌、肾癌、白血病、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、肝癌、胃癌或肉瘤。在实施方案中,癌症是乳腺癌。在实施方案中,癌症是结肠癌。在实施方案中,癌症是肾癌。在实施方案中,癌症是白血病。在实施方案中,癌症是肺癌。在实施方案中,癌症是黑素瘤。在实施方案中,癌症是卵巢癌。在实施方案中,癌症是前列腺癌。在实施方案中,癌症是胰腺癌。在实施方案中,癌症是脑癌。在实施方案中,癌症是肝癌。在实施方案中,癌症是胃癌。在实施方案中,癌症是肉瘤。在实施方案中,癌症是三阴性乳腺癌。

在实施方案中,施用包括施用第一嵌合痘病毒和第二嵌合痘病毒。在实施方案中,第一嵌合痘病毒和第二嵌合痘病毒以组合的协同量施用。在实施方案中,第一种嵌合痘病毒和第二种嵌合痘病毒同时施用。在实施方案中,顺序施用第一嵌合痘病毒和第二嵌合痘病毒。

在实施方案中,痘病毒以至少 $10^3$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以至少 $10^4$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以至少 $10^5$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以至少 $10^6$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以至少 $10^7$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以至少 $10^8$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

在实施方案中,痘病毒以 $10^3$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以 $10^4$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以 $10^5$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以 $10^6$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以 $10^7$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以 $10^8$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

在实施方案中,痘病毒以约 $10^3$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以 $10^3$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以约 $4 \times 10^4$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以 $4 \times 10^4$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以约 $5 \times 10^4$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。在实施方案中,痘病毒以 $5 \times 10^4$ 噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

一方面,提供了抑制细胞增殖的方法,该方法包括使细胞与如本文所述的嵌合痘病毒接触。在实施方案中,细胞是癌细胞。在实施方案中,癌细胞是乳腺癌细胞、结肠癌细胞、肾癌细胞、白血病细胞、肺癌细胞、黑素瘤细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、胰腺癌细胞、脑癌细胞、肝癌细胞、胃癌细胞或肉瘤细胞。在实施方案中,癌细胞是乳腺癌细胞。在实施方案中,癌细胞是结肠癌细胞。在实施方案中,癌细胞是肾癌细胞。在实施方案中,癌细胞是白血病细胞。在实施方案中,癌细胞是肺癌细胞。在实施方案中,癌细胞是黑素瘤。在实施方案中,癌细胞是卵巢癌细胞。在实施方案中,癌细胞是前列腺癌细胞。在实施方案中,癌细

胞是胰腺癌细胞。在实施方案中，癌细胞是脑癌细胞。在实施方案中，癌细胞是肝癌细胞。在实施方案中，癌细胞是胃癌细胞。在实施方案中，癌细胞是肉瘤细胞。在实施方案中，癌细胞是三阴性乳腺癌细胞。

根据本文提供的方法，向对象施用有效量的一种或多种本文提供的药剂。术语有效量和有效剂量可互换使用。术语有效量定义为产生所需生理反应(例如，治疗癌症)所需的任何量。用于施用药剂的有效量和时间可由本领域技术人员凭经验确定。施用的剂量范围足够大以产生期望的效果，其中疾病或病症的一种或多种症状受到影响(例如，减少或延迟)。剂量不应大到引起显著的不良副作用，例如不希望的交叉反应、过敏反应等。通常，剂量将随年龄、症况、性别、疾病类型、疾病或病症的程度、施用途径或是否在该方案中包括其他药物而变化，并且可由本领域技术人员确定。在任何禁忌症的情况下，个体医师可以调整剂量。剂量可以变化，并且可以每天一次或多次剂量施用，持续一天或几天。对于给定类别的药物产品，可以在文献中找到关于适当剂量的指导。例如，对于给定参数，有效量将显示增加或减少至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%，或至少100%。效力也可以表示为多少“倍”的增加或减少。例如，治疗有效量可以比对照具有至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更多的效果。确切的剂量和制剂将取决于治疗的目的，并且本领域技术人员可以使用已知技术确定(参见例如Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols.1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins)。

对于预防用途，将治疗有效量的本文所述的嵌合痘病毒组合物在早期发作之前或早期发作期间(例如，在有癌症的初始体征和症状时)施用于对象。治疗性治疗包括在诊断或发展疾病后向对象施用治疗有效量的本文所述的药剂。因此，在另一方面，提供了治疗有此需要的对象的疾病(例如，癌症)的方法。

术语“对象”、“患者”、“个体”等不是限制性的，并且通常可以互换。也就是说，被描述为“患者”的个体不一定患有给定的疾病，但可能仅仅是寻求医学建议。

如本文所用，“治疗”或“治疗”与病况、疾病或病症相关的病况、疾病或病症或症状是指获得有益或期望结果(包括临床结果)的方法。有益或期望的临床结果可包括但不限于无论是部分还是全部的减轻或改善一种或多种症状或病况，减轻病况、疾病或病症程度，稳定病况、疾病或病症状态，预防病况、疾病或病症发展，预防病况、疾病或病症扩散，延迟或减慢病况、疾病或病症进展，延迟或减缓病况、疾病或病症发作，改善或缓解病况、疾病或病症状态，和缓解。“治疗”还可以意指延长对象的存活，超过在没有治疗的情况下预期的存活。“治疗”还可以意指抑制病况、疾病或病症的进展，暂时减缓病况、疾病或病症的进展，尽管在某些情况下，其涉及永久地停止病况、疾病或病症的进展。如本文所用，术语治疗是指降低疾病或病况的一或多种表征为蛋白酶表达的症状，或者表征为蛋白酶表达的疾病或病况的症状的作用。因此，在所述方法中，治疗可以指已确立疾病、病况或者疾病或病况的症状降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。例如，如果与对照相比对象中疾病的一或多种症状降低10%，则治疗疾病的方法被认为是治疗。因此，降低可以是与天然或对照水平相比降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%，或

者10%和100%之间任何百分比的降低。应理解治疗不必需指治愈或者完全消除疾病、病况或者疾病或病况的症状。例如,如本文所用,降低或抑制包括与对照水平相比变化10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高,且这些术语可以包括但不必需包括完全消除。

无论如何配制嵌合痘病毒组合物,所需的剂量将取决于施用途径、制剂的性质、对象病况的性质(例如免疫系统的不成熟或胃肠病症)、对象的大小、体重、表面积、年龄和性别、其他药物的使用、以及主治临床医生的判断。或者或另外,剂量可表示为Pfu/kg干重。

施用可以是单次或多次(例如,2-或3-,4-,6-,8-,10-,20-,50-,100-,150-或更多倍)。用本文提供的任何组合物治疗的持续时间可以是从短至一天到宿主整个寿命(例如,多年)的任何时间长度。例如,组合物可以每周施用一次(例如,4周至数月或数年);每月一次(例如,三至十二个月或多年);或者每年一次,为期5年,10年或更长。还应注意,治疗频率可以变化。例如,本发明的组合物可以每天、每周、每月或每年施用一次(或两次、三次等)。

该组合物还可以与其他治疗剂联合施用。在实施方案中,组合物还可以与抗癌剂联合施用。其他治疗剂将根据具体病症而变化,但可包括例如饮食调整、血液透析、治疗剂如苯甲酸钠、苯乙酸盐、精氨酸、或手术方法。两种或更多种治疗剂的同时施用不需要药剂同时施用或通过相同途径施用,只要在药剂发挥其治疗效果的时间段内存在重叠即可。预期同时或顺序施用,以及在不同天或周施用。

本文所述的化合物可以彼此组合使用,与可用于治疗本文所述的疾病(例如乳腺癌、结肠癌、肾癌、白血病、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、肝癌、胃癌或肉瘤)的已知的其他活性剂(例如抗癌剂)联用,或者与可能不单独起效但可能有助于活性剂的效力的辅助剂联用。

在实施方案中,该方法包括施用治疗剂。在实施方案中,治疗剂是检查点抑制剂蛋白。在实施方案中,治疗剂是伊匹木单抗。在实施方案中,治疗剂是pembrolizumab。在实施方案中,治疗剂是nivolumab。在实施方案中,治疗剂是talimogene laherparepvec。在实施方案中,治疗剂是durvalumab。在实施方案中,治疗剂是达珠单抗。在实施方案中,治疗剂是avelumab。在实施方案中,治疗剂是atezolizumab。在实施方案中,嵌合痘病毒和治疗剂以组合的协同量施用。在实施方案中,嵌合痘病毒和治疗剂同时施用。在实施方案中,顺序施用嵌合痘病毒和治疗剂。

在一些实施方案中,共同施用包括在第二活性剂(例如抗癌剂)的0.5、1、2、4、6、8、10、12、16、20或24小时内施用一种活性剂。共同施用包括同时、大致同时施用两种活性剂(例如,彼此在约1、5、10、15、20或30分钟内),或以任何顺序依次施用。在一些实施方案中,共同施用可以通过共同制剂完成,即制备包含两种活性剂的单一药物组合物。在其他实施方案中,活性剂可以单独配制。在另一个实施方案中,活性剂和/或辅助剂可以彼此连接或缀合。

“抗癌药”使用其通常含义,是指具有抗新生物性质或者抑制细胞生长或增殖能力的组合物(例如,化合物、药物、拮抗剂、抑制剂、调节剂)。在一些实施方案中,抗癌药是化疗药。在一些实施方案中,抗癌药是本文鉴别的具有在治疗癌症方法中的用途的物质。在一些实施方案中,抗癌药是FDA或美国之外国家的类似批准机构批准用于治疗癌症的药物。抗癌剂的实例包括但不限于MEK(例如,MEK1、MEK2、或者MEK1和MEK2)抑制剂(例如XL518、CI-

1040、PD035901、司美替尼/AZD6244、GSK1120212/trametinib、GDC-0973、ARRY-162、ARRY-300、AZD8330、PD0325901、U0126、PD98059、TAK-733、PD318088、AS703026、BAY 869766)、烷化剂(例如,环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、白消安、美法仑、氮芥(mechlorethamine)、乌拉莫司汀、塞替派、亚硝基脲、氮芥(例如,mechlороethamine、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、meiphalan)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺类(例如,六甲基三聚氰胺、塞替派)、烷基磺酸酯/盐类(例如,白消安)、亚硝基脲(例如,卡莫司汀、lomusitne、司莫司汀、链脲菌素)、三氮烯类(三氮烯))、抗代谢物(例如,5-硫唑嘌呤、甲酰四氢叶酸、卡培他滨、氟达拉滨、吉西他滨、培美曲塞、雷替曲塞、叶酸类似物(例如,甲氨蝶呤)、或者嘧啶类似物(例如,氟尿嘧啶、floxouridine、阿糖胞苷)、嘌呤类似物(例如,巯嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁)等)、植物生物碱(例如,长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛、鬼臼毒素、紫杉醇、多西紫杉醇等)、拓扑异构酶抑制剂(例如,伊立替康、托泊替康、安吖啶、依托泊苷(VP16)、磷酸依托泊苷、替尼泊苷等)、抗肿瘤抗生素(例如,多柔比星、阿霉素、柔红霉素、表柔比星、放线菌素、博来霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普利霉素等)、基于铂的化合物(例如顺铂、oxaloplatin、卡铂)、蒽二酮(例如,米托蒽醌)、取代的脲(例如,羟基脲)、甲肼衍生物(例如,丙卡巴肼)、肾上腺皮质抑制剂(例如,米托坦、氨鲁米特)、表鬼臼毒素(例如,依托泊苷)、抗生素(例如,柔红霉素、多柔比星、博来霉素)、酶(例如,L-天冬酰胺酶)、促分裂原活化蛋白激酶信号传导的抑制剂(例如U0126、PD98059、PD184352、PD0325901、ARRY-142886、SB239063、SP600125、BAY 43-9006、渥曼青霉素、或LY294002、Syk抑制剂、mTOR抑制剂、抗体(例如,rituxan)、gossyphol、genasense、多酚E、Chlorofusin、全反式维甲酸(ATRA)、苔藓抑素、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)、5-氮杂-2'-脱氧胞苷、全反式维甲酸、多柔比星、长春新碱、依托泊苷、吉西他滨、伊马替尼(Gleevec.RTM.)、格列德霉素、17-N-丙烯胺基-17-去甲氧基格列德霉素(17-AAG)、flavopiridol、LY294002、硼替佐米、曲妥珠单抗、BAY 11-7082、PKC412、PD184352、20-表-1,25二羟维生素D3;5-乙炔尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇;阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;amidox;氨磷汀;氨基酮戊酸;氨柔比星;安吖啶;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管发生抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯(antarelix);抗背部化形态发生蛋白-1(anti-dorsalizing morphogenetic protein-1);抗雄激素、前列腺癌;抗雌激素;抗癌酶(antineoplaston);反义寡核苷酸;阿非科林甘氨酸盐;凋亡基因调节剂;凋亡调节物;脱嘌呤核酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;asulacrine;阿他美坦;阿莫司汀;axinastatin 1;axinastatin 2;axinastatin 3;阿扎司琼;阿扎霉素;重氮酪氨酸;浆果赤霉素III衍生物;巴览醇(balanol);巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯并二氢卟吩(benzochlorins);苯甲酰星孢菌素(benzoylstauroporine);β内酰胺衍生物;beta-alethine;betaclamycin B;白桦脂酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;双吖丙啶基精胺;双奈法德;bistratene A;比折来新;breflate;溴匹立明;布度钛;丁硫氨酸硫酸亚胺;卡泊三醇;钙感光蛋白C;喜树碱衍生物;金丝雀痘病毒IL-2;卡培他滨;咪唑羧酰胺-氨基-三唑;羧胺三唑(carboxyamidotriazole);CaRest M3;CARN 700;软骨衍生的抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);栗精胺;天蚕抗菌肽B;西曲瑞克;二氢卟吩类;氯喹喔啉磺胺;西卡前列素;顺式卟啉;克拉屈滨;氯米芬类似物;克霉唑;collismycin A;collismycin B;考布他汀A4;考布他汀类似物;conagenin;crambescidin 816;克立那托;cryptophycin 8;

cryptophycin A衍生物; curacin A; 环戊蒽醌类(cyclopentanthraquinones); cycloplatam; cypemycin; 阿糖胞苷十八烷基磷酸盐; 溶细胞因子; cytostatin; 达昔单抗; 地西他滨; 脱氢膜海鞘素B; 地洛瑞林; 地塞米松; 右异环磷酰胺(dexifosfamide); 右雷佐生; 右维拉帕米; 地吖啶; 代代宁B; didox; 二乙基去甲精胺; 二氢-5-氮胞苷; 9-dioxamycin; 二苯基螺莫司汀; 二十二醇; 多拉司琼; 去氧氟尿苷; 屈洛昔芬; 屈大麻酚; 多卡米星SA; 依布硒; 依考莫司汀; 依地福新; 依决洛单抗; 依氟鸟氨酸; 榄香烯; 乙嘧替氟; 表柔比星; 爱普列特; 雌氮芥类似物; 雌激素激动剂; 雌激素拮抗剂; 依他硝唑; 磷酸依托泊苷; 依西美坦; 法倔唑; 法扎拉滨; 芬维A胺; 非格司亭; 非那雄胺; flavopiridol; 氟卓斯汀; fluasterone; 氟达拉滨; fluorodaunorubicin hydrochloride; 福酚美克; 福美坦; 福司曲星; 福莫司汀; 钇特沙弗林(gadolinium texaphyrin); 硝酸镓; 加洛他滨; 加尼瑞克; 明胶酶抑制剂; 吉西他滨; 谷胱甘肽抑制剂; hepsulfam; heregulin; 六甲撑二乙酰胺(hexamethylene bisacetamide); 金丝桃素; 伊班膦酸; 伊达比星; 艾多昔芬; 伊决孟酮; 伊莫福新; 伊洛马司他; imidazoacridones; 咪喹莫特; 免疫刺激肽; 胰岛素样生长因子-1受体抑制剂; 干扰素激动剂; 干扰素; 白介素; 碘苄胍; 碘阿霉素; 甘薯苦醇(ipomeanol)、4-; 伊罗普拉; 伊索拉定; isobengazole; isohomohalicondrin B; 伊他司琼; jasplakinolide; kahalalide F; lamellarin-N三乙酸酯; 兰瑞肽; leinamycin; 来格司亭; 硫酸香菇多糖; leptolstatin; 来曲唑; 白血病抑制因子; 白细胞α干扰素; 亮丙瑞林+雌激素+孕酮; 亮丙瑞林; 左旋咪唑; 利阿唑; 线性多胺类似物; 亲脂性二糖肽; 亲脂性铂化合物; lissoclinamide 7; 洛铂; 蚓蚓磷脂(lombricine); 洛美曲索; 氟尼达明; 洛索蒽醌; 洛伐他汀; 洛索立宾; 勒托替康; lutetium texaphyrin; lysofylline; 溶解肽; 美坦辛; mannostatin A; 马立马司他; 马索罗酚; maspin; 基质溶解因子抑制剂; 基质金属蛋白酶抑制剂; 美诺立尔; merbarone; 美替瑞林; 甲硫氨酸酶; 甲氧氯普胺; MIF抑制剂; 米非司酮; 米替福新; 米立司亭; 错配双链RNA; 米托胍腙; 二溴卫矛醇; 丝裂霉素类似物; 米托蔡胺; 丝裂霉素成纤维细胞生长因子-皂草素; 米托蒽醌; 莫法罗汀; 莫拉司亭; 单克隆抗体, 人绒毛膜促性腺激素; 单磷酸脂A+分支杆菌细胞壁sk; 莫哌达醇; 多药耐药基因抑制剂; 基于多瘤抑制基因1的疗法; 芥子抗癌药; mycaperoxide B; 分支杆菌细胞壁提取物; myriaporone; N-乙酰地那林(N-acetyldinaline); N-取代的苯甲酰胺类; 纳法瑞林; nagrestip; 纳洛酮+喷他佐辛; napavin; naphterpin; 那托司亭; 奈达铂; 奈莫柔比星; 奈立膦酸; 中性内肽酶; 尼鲁米特; nisamycin; 一氧化氮调节剂; 一氧化二氮抗氧化剂; nitrullyn; O6-苄基鸟嘌呤; 奥曲肽; okicenone; 寡核苷酸; 奥那司酮; 昂丹司琼; oracin; 口服细胞因子诱导物; 奥马铂; 奥沙特隆; 奥沙利铂; oxaunomycin; palauamine; palmitoyl rhizoxin; 帕米磷酸; 人参三醇(panaxytriol); 帕诺米芬; parabactin; 帕折普汀; 培门冬酶; 培得星; 木聚硫钠; 喷司他丁; pentrozole; 全氟溴烷; 培磷酰胺; 紫苏子醇; phenazinomycin; 苯乙酸盐/酯; 磷酸酶抑制剂; picibanil; 毛果云香碱盐酸盐; 吡柔比星; 吡曲克辛; placetin A; placetin B; 纤溶酶原激活物抑制剂; 铂复合物; 铂化合物; 铂-三胺复合物; 吲哚美钠; 泊非霉素; 泼尼松; 丙基双吖啶酮; 前列腺素J2; 蛋白酶体抑制剂; 基于蛋白A的免疫调节剂; 蛋白激酶C抑制剂; microalgal; 蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂; 嘧啶核苷磷酸化酶抑制剂; 红紫素; 吡唑啉吖啶; 吡哆醛化血红蛋白聚氧乙烯缀合物(pyridoxylated hemoglobin polyoxyethylene conjugate); raf拮抗剂; 雷替曲塞; 雷莫司琼; ras法尼基蛋白转移酶抑制剂; ras抑制剂;

ras-GAP抑制剂;去甲基化瑞替普汀;铼Re 186依替膦酸;根霉素;核酶;RII维甲酰胺;罗谷亚胺;罗希吐碱;罗莫肽;罗喹美克;rubiginone B1;ruboxyl;沙芬戈;saintopin;SarCNU;肌植醇A;沙格司亭;Sdi 1模拟物;司莫司汀;衰老衍生抑制剂1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;sizofuran;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;solverol;生长调节素结合蛋白;索纳明;膦门冬酸;穗霉素D;螺莫司汀;斯耐潘定(splenopentin);海绵抑制素(spongistatin)1;角鲨胺;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;stipiamide;基质溶素抑制剂;sulfinosine;有效血管活性肠肽拮抗剂;suradista;舒拉明;苦马豆素;合成葡糖氨基聚糖类;他莫司汀;他莫西芬甲硫碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;喃氟啶;tellurapyrylium;端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替莫唑胺;替尼泊昔;tetrachlorodecaoxide;tetrazomine;菌体胚素(thaliblastine);噻可拉林;血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;促甲状腺激素;tin ethyl etiopurpurin;替拉扎明;titanocene bichloride;topsentin;托瑞米芬;全能干细胞因子;翻译抑制剂;维甲酸;三乙酰尿苷(triacetyluridine);曲西立滨;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄脲;酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑制剂;UBC抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦衍生的生长抑制因子;尿激酶受体拮抗剂;伐普肽;variolin B;载体系统、红细胞基因疗法;维拉雷瑛;藜芦明(veramine);verdins;维替泊芬;长春瑞滨;vinxaltine;vitaxin;伏氯唑;扎诺特隆;折尼铂;亚苄维C(zilascorb);净司他丁斯酯、亚德里亚霉素、放线菌素D、博来霉素、长春碱、顺铂、阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿考达唑;阿克罗宁;阿多来新;阿地白介素;六甲蜜胺;安波霉素;醋酸阿美蒽醌;氨鲁米特;安吖啶;阿那曲唑;氨茴霉素;天冬酰胺酶;曲林菌素;阿扎胞苷;阿替派;阿佐霉素;巴马司他;苯佐替派;比卡鲁胺;盐酸比生群;二甲磺酸双奈法德(bisnafide dimesylate);比折来辛;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素;卡普睾酮;卡醋胺;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来辛;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;克拉屈滨;甲磺酸克立那托(crisnatol mesylate);环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎胍宁;甲磺酸地扎胍宁;地吖啶;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸甲雄烷酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;嗯普氨酯;依匹哌啶;盐酸表柔比星;厄布咯唑;盐酸依索比星;雌氮芥;雌二醇氮芥磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;氯苯乙嘧胺;盐酸法罗唑啉;法扎拉滨;芬维A胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;fluorocitabine;磷喹酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸伊达比星;异环磷酰胺;iiimofosine;白介素I1(包括重组白介素II、或r1L.sub.2)、干扰素 $\alpha$ -2a;干扰素 $\alpha$ -2b;干扰素 $\alpha$ -n1;干扰素 $\alpha$ -n3;干扰素 $\beta$ -1a;干扰素 $\gamma$ -1b;异丙铂;盐酸伊立替康;醋酸来瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索蒽醌;马索罗酚;美坦辛;盐酸氮芥(mechlorethamine hydrochloride);醋酸甲地孕酮;美仑孕酮乙酸盐;美法仑;美诺立尔;巯嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啶;美妥替哌;米丁度胺;米托克星(mitocarcin);丝裂红素;米托洁林;米托马星;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托蒽醌;霉酚酸;诺考达唑;诺拉霉素;奥马铂;奥昔舒仑;培门冬酶;培利霉素;戊氮芥;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗蒽醌;普利霉素;普洛美坦;卟吩姆钠;泊非霉素;泼尼氮芥;盐酸丙卡巴肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑霉素;利波腺苷;罗谷亚胺;沙芬戈;盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;磷乙酰天冬氨酸钠;司帕霉素;

盐酸螺旋锗;螺莫司汀;螺铂;链黑霉素;链脲菌素;磺氯苯脲;他利霉素;替可加兰钠;喃氟啶;盐酸替洛蒽醌;替莫泊芬;替尼泊苷;替罗昔隆;睾内酯;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;噻替派;噻唑羧胺核苷;替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;醋酸曲托龙;磷酸曲西立滨;三甲曲沙;三甲曲沙葡萄糖醛酸盐;曲普瑞林;盐酸妥布溴唑;尿嘧啶氮芥;乌瑞替派;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸环氧长春碱;酒石酸长春瑞滨;硫酸异长春碱;硫酸长春利定;氟氯唑;长春甘酯;净司他丁;盐酸佐柔比星、停滞细胞在G2-M期和/或调节微管形成或稳定性的物质、(例如Taxol.TM(即紫杉醇)、Taxotere.TM、包含紫杉烷骨架的化合物、厄布咯唑(即R-55104)、多拉司他汀10(即DLS-10和NSC-376128)、米伏布林羟乙基磺酸盐(即作为CI-980)、长春新碱、NSC-639829、Discodermolide(即NVP-XX-A-296)、ABT-751(Abbott、即E-7010)、Altorhyrtins(例如Altorhyrtin A和Altorhyrtin C)、Spongistatins(例如Spongistatin 1、Spongistatin 2、Spongistatin 3、Spongistatin 4、Spongistatin 5、Spongistatin 6、Spongistatin 7、Spongistatin 8、和Spongistatin 9)、盐酸西马多丁(即LU-103793和NSC-D-669356)、Epothilones(例如Epothilone A、Epothilone B、Epothilone C(即desoxyepothilone A or dEpoA)、Epothilone D(即KOS-862、dEpoB、and desoxyepothilone B)、Epothilone E、Epothilone F、Epothilone B N-oxide、Epothilone A N-oxide、16-aza-epothilone B、21-aminoepothilone B(即BMS-310705)、21-hydroxyepothilone D(即Desoxyepothilone F和dEpoF)、26-fluoroepothilone、Auristatin PE(即NSC-654663)、Soblidotin(即TZT-1027)、LS-4559-P(Pharmacia、即LS-4577)、LS-4578(Pharmacia、即LS-477-P)、LS-4477(Pharmacia)、LS-4559(Pharmacia)、RPR-112378(Aventis)、硫酸长春新碱、DZ-3358(Daiichi)、FR-182877(Fujisawa、即WS-9885B)、GS-164(Takeda)、GS-198(Takeda)、KAR-2(Hungarian Academy of Sciences)、BSF-223651(BASF、即ILX-651 and LU-223651)、SAH-49960(Lilly/Novartis)、SDZ-268970(Lilly/Novartis)、AM-97(Armad/Kyowa Hakko)、AM-132(Armad)、AM-138(Armad/Kyowa Hakko)、IDN-5005(Indena)、Cryptophycin 52(即LY-355703)、AC-7739(Ajinomoto、即AVE-8063A和CS-39.HC1)、AC-7700(Ajinomoto、即AVE-8062、AVE-8062A、CS-39-L-Ser.HC1、和RPR-258062A)、Vitilevuamide、Tubulysin A、Canadensol、Centaureidin(即NSC-106969)、T-138067(Tularik、即T-67、TL-138067和TI-138067)、COBRA-1(Parker Hughes Institute、即DDE-261和WHI-261)、H10(Kansas State University)、H16(Kansas State University)、Oncocidin A1(即BT0-956和DIME)、DDE-313(Parker Hughes Institute)、Fijianolide B、Laulimalide、SPA-2(Parker Hughes Institute)、SPA-1(Parker Hughes Institute、即SPIKET-P)、3-IAABU(Cytoskeleton/Mt.Sinai School of Medicine、即MF-569)、Narcosine(也称为NSC-5366)、Nascapine、D-24851(Asta Medica)、A-105972(Abbott)、Hemiassterlin、3-BAABU(Cytoskeleton/Mt.Sinai School of Medicine、即MF-191)、TMPN(Arizona State University)、Vanadocene acetylacetone、T-138026(Tularik)、Monsatrol、Inanocine(即NSC-698666)、3-IAABE(Cytoskeleton/Mt.Sinai School of Medicine)、A-204197(Abbott)、T-607(Tularik、即T-900607)、RPR-115781(Aventis)、Eleutherobins(such as Desmethylleleutherobin、Desaetyleleutherobin、Isoeleutherobin A、and Z-Eleutherobin)、Caribaeoside、Caribaeolin、Halichondrin B、D-64131(Asta Medica)、D-

68144 (Asta Medica)、Diazonamide A、A-293620 (Abbott)、NPI-2350 (Nereus)、Taccalonolide A、TUB-245 (Aventis)、A-259754 (Abbott)、Diozostatin、(-)-Phenylahistin (即NSCL-96F037)、D-68838 (Asta Medica)、D-68836 (Asta Medica)、Myoseverin B、D-43411 (Zentaris、即D-81862)、A-289099 (Abbott)、A-318315 (Abbott)、HTI-286 (即SPA-110、三氟乙酸盐) (Wyeth)、D-82317 (Zentaris)、D-82318 (Zentaris)、SC-12983 (NCI)、Resverastatin phosphate sodium、BPR-OY-007 (National Health Research Institutes)、和SSR-250411 (Sanofi))、类固醇类(例如、地塞米松)、非那雄胺、芳香酶抑制剂、促性腺素释放激素激动剂(GnRH)如戈舍瑞林或者亮丙瑞林、肾上腺皮质类固醇类(例如、泼尼松)、孕激素(例如、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮)、雌激素(例如、己烯雌酚、炔雌醇)、抗雌激素(例如、他莫昔芬)、雄激素(例如、丙酸睾酮、氟甲睾酮)、抗雄激素(例如、氟他胺)、免疫刺激剂(例如、卡介苗(BCG)、左旋咪唑、白介素-2、 $\alpha$ -干扰素等)、单克隆抗体(例如、抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗HLA-DR、和抗VEGF单克隆抗体)、免疫毒素(例如、抗CD33单克隆抗体-加利车霉素缀合物,抗CD22单克隆抗体-假单胞菌外毒素缀合物等)、放射免疫疗法(例如、缀合于 $^{111}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 或 $^{131}\text{I}$ 的抗CD20单克隆抗体等)、雷公藤内酯、高三尖杉酯碱、更生霉素、多柔比星、表柔比星、托泊替坎、伊曲康唑、长春地辛、西立伐他汀、长春新碱、脱氧腺苷、舍曲林、匹伐他汀、伊立替康、氯法齐明、5-nonyloxytryptamine、维罗非尼、达拉非尼、埃罗替尼、吉非替尼、EGFR抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)靶向治疗或治疗剂(例如吉非替尼(Iressa<sup>TM</sup>)、埃罗替尼(Tarceva<sup>TM</sup>)、西妥昔单抗(Erbtux<sup>TM</sup>)、拉帕替尼(Tykerb<sup>TM</sup>)、帕木单抗(Vectibix<sup>TM</sup>)、凡他尼布(Caprelsa<sup>TM</sup>)、阿法替尼/BIBW2992、CI-1033/卡纽替尼、奈拉替尼/HKI-272、CP-724714、TAK-285、AST-1306、ARRY334543、ARRY-380、AG-1478、dacomitinib/PF299804、OSI-420/去甲基埃罗替尼、AZD8931、AEE788、培利替尼/EKB-569、CUDC-101、WZ8040、WZ4002、WZ3146、AG-490、XL647、PD153035、BMS-599626。

## VII. 检测方法

在另一个方面,提供了检测有此需要的对象中的癌症的方法,该方法包括使癌细胞与本文包括的实施方案所述的嵌合痘病毒接触,并允许嵌合痘病毒复制,从而检测癌细胞。在实施方案中,嵌合痘病毒包括编码可检测部分的核酸序列。在实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码荧光部分。在实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码mCherry。在实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码Emerald。在实施方案中,编码可检测部分的核酸序列编码萤火虫荧光素酶。在实施方案中,癌细胞在对象中。在实施方案中,对象是哺乳动物。在实施方案中,对象是人。

### 实施例

提供以下实施例用于说明,但不限制要求保护的发明。

#### 实施例1. 用于癌症溶瘤免疫疗法的新型有效嵌合痘病毒

癌症是美国第二大死因。近年来,在癌症免疫疗法方面取得了很大进展,包括免疫检查点抑制剂,具有嵌合抗原受体的T细胞和溶瘤病毒。

溶瘤病毒是天然存在的或经遗传修饰的病毒,其感染、复制并最终杀死癌细胞,同时使健康细胞不受伤害(1,2)。据报道,最近完成的436例具有IIIB、IIIC或IV期无法切除的黑素瘤患者的溶瘤性单纯疱疹病毒T-VEC III期临床试验符合其主要终点,接受T-VEC的患者的持久应答率为16.3%,相比之下,接受GM-CSF的患者为2.1% (3)。根据该试验的结果,

FDA于2015年10月27日批准了T-VEC。FDA对第一种溶瘤病毒的批准为一个充满希望的领域铺平了道路。

来自至少八个不同物种的溶瘤病毒构建体(包括腺病毒、单纯疱疹病毒1、新城疫病毒、呼肠孤病毒、麻疹病毒、柯萨奇病毒、塞涅卡谷病毒和痘苗病毒)已经在临床试验的各个阶段进行了测试。已经清楚的是,溶瘤病毒在癌症患者中具有良好的耐受性。然而,作为独立治疗的溶瘤病毒的临床益处仍然有限(5)。由于担心溶瘤病毒的安全性,在临床前和临床研究中仅使用高度减毒的溶瘤病毒(天然无毒或通过基因工程减毒)。由于溶瘤病毒的安全性现已得到很好的证实,现在是时候设计和测试具有最大抗肿瘤效力的溶瘤病毒。具有强烈溶瘤作用的溶瘤病毒将释放丰富的肿瘤抗原,从而产生强烈的免疫治疗效果。

痘苗病毒,痘病毒科的原型成员,用作天花疫苗来根除天花(估计只是在19和20世纪就已造成5亿人死亡)。因此,它可以说是最成功的活的生物治疗剂。全世界数百万人充分证明了痘苗病毒的安全性。痘苗病毒也是第一种在实验室中显示病毒溶瘤的溶瘤病毒。作为溶瘤病毒的痘苗病毒已经在许多临床试验中进行了测试,并且已经显示出对晚期癌症患者具有良好的耐受性(2)。一些研究表明,就溶瘤活性而言,痘苗病毒优于腺病毒(6),这是研究最充分的溶瘤病毒种类之一,并且也是中国第一个批准用于癌症治疗的溶瘤病毒(7)。除了痘苗病毒外,痘病毒科中的其他成员也被测试为溶瘤病毒,包括浣熊痘病毒(8)、羊传染性口疮病毒(9)和粘液瘤病毒(10)。

嵌合痘病毒具有结合来自不同病毒种类的有利特征的潜力,因此优于单独的野生型病毒。由于正痘病毒和副痘病毒在抗原性上不同,因此在该研究中产生的有效嵌合正痘病毒和有效嵌合副痘病毒可潜在地组合成同一治疗方案以实现最大治疗效力。申请人已经产生了嵌合正痘病毒和嵌合副痘病毒库。与其亲本单个野生型病毒相比,几种嵌合的正痘病毒和副痘病毒分离株在一组NCI 60癌细胞系中显示出优异的杀伤能力。

产生嵌合病毒库并分离单个嵌合病毒。通过用牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株WR、IHD、Elstree、CL、Lederle-Chorioallantoic和AS以每种病毒的感染复数(MOI)为0.01共感染CV-1细胞,产生嵌合正痘病毒库。为了产生嵌合副痘病毒库,用羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS以MOI为0.1共感染MDBK细胞。申请人的预实验表明,CV-1细胞对本研究中使用的所有正痘病毒敏感,并且羊传染性口疮病毒和假牛痘病毒都感染MDBK并在MDBK细胞中形成噬斑。

从用嵌合正痘病毒库感染的CV-1细胞和用嵌合副痘病毒库感染的MDBK细胞中分别挑取100个嵌合正痘病毒噬斑和100个嵌合副痘病毒噬斑。将200个噬斑在各自的细胞中进一步噬斑纯化两次,得到200个克隆纯化的单个嵌合病毒分离株。病毒#14-113是嵌合的正痘病毒分离株,而病毒#114-213是嵌合的副痘病毒分离株。

通过在NCI-60细胞系中的高通量筛选鉴定新型有效嵌合痘病毒分离株。在一组NCI-60细胞系中评估并比较了200种嵌合正痘病毒和嵌合副痘病毒分离株以及11种亲本病毒株和2种对照溶瘤病毒(GLV-1h68和OncovEX GFP)的肿瘤细胞杀伤活性(表1)。GLV-1h68是研究最充分的溶瘤痘苗病毒之一,且目前正在临床开发中。OncovEX GFP与T-VEC具有相同的骨架,T-VEC是一种溶瘤性单纯疱疹病毒-1,且也是FDA批准的第一种溶瘤病毒。用MOI为0.01的每种病毒感染每种细胞系。使用MTS测定在感染后96小时测量细胞活力。在这个高通量筛选实验中使用的病毒量(MOI 0.01)被有意保持低水平,并且优化以比较贴壁细胞系

(NCI-60组中的大多数细胞系是贴壁细胞) 中的细胞杀伤,因此可突出有效的新病毒分离株。然而,该病毒的量太低而不能在悬浮细胞系中看到任何显著且一致的细胞杀伤。因此,为了病毒比较的目的,来自6种白血病细胞系的结果未包括在分析中。

表1.NCI-60细胞系的目录

名称	物种	来源	培养物
BT549	人	乳房	贴壁
HS 578T	人	乳房	贴壁
MCF7	人	乳房	贴壁
MDA-MB-231	人	乳房	贴壁
MDA-MB-468	人	乳房	贴壁
T-47D	人	乳房	贴壁
SF268	人	CNS	贴壁
SF295	人	CNS	贴壁
SF539	人	CNS	贴壁
SNB-19	人	CNS	贴壁
SNB-75	人	CNS	贴壁
U251	人	CNS	贴壁
COLO205	人	结肠	贴壁和悬浮
HCC 2998	人	结肠	贴壁
HCT-116	人	结肠	贴壁
HCT-15	人	结肠	贴壁
HT29	人	结肠	贴壁
KM12	人	结肠	贴壁
SW620	人	结肠	贴壁
786-O	人	肾	贴壁
A498	人	肾	贴壁
ACHN	人	肾	贴壁
CAKI	人	肾	贴壁
RXF 393	人	肾	贴壁
SN12C	人	肾	贴壁
TK-10	人	肾	贴壁
UO-31	人	肾	贴壁
CCRF-CEM	人	白血病	悬浮
HL-60	人	白血病	悬浮
K562	人	白血病	悬浮
MOLT-4	人	白血病	悬浮
RPMI-8226	人	白血病	悬浮
SR	人	白血病	悬浮
A549	人	肺	贴壁
EKVV	人	肺	贴壁
HOP-62	人	肺	贴壁
HOP-92	人	肺	贴壁和悬浮
NCI-H226	人	肺	贴壁
NCI-H23	人	肺	贴壁
NCI-H322M	人	肺	悬挂

NCI-H460	人	肺	贴壁
NCI-H522	人	肺	贴壁
LOX IMVI	人	黑素瘤	半贴壁
M14	人	黑素瘤	贴壁
MALME-3M	人	黑素瘤	贴壁和悬浮
MDA-MB-435	人	黑素瘤	贴壁
SK-MEL-2	人	黑素瘤	贴壁
SK-MEL-28	人	黑素瘤	贴壁
SK-MEL-5	人	黑素瘤	贴壁
UACC-257	人	黑素瘤	贴壁
UACC-62	人	黑素瘤	贴壁
IGROV1	人	卵巢	贴壁
OVCAR-3	人	卵巢	贴壁
OVCAR-4	人	卵巢	贴壁
OVCAR-5	人	卵巢	贴壁
OVCAR-8	人	卵巢	贴壁
SK-OV-3	人	卵巢	贴壁
NCI-ADR-RES	人	卵巢	贴壁
DU145	人	前列腺	贴壁
PC-3	人	前列腺	贴壁

在100个新的嵌合正痘病毒分离株中,分离株#17 (SEQ ID NO:3) 和#33 (SEQ ID NO:1) 在NCI-60实体瘤细胞系中显示出比9个亲本正痘病毒株和2个对照病毒显著更好的细胞杀伤(图1)。在100个新的副痘病毒分离株中,分离株#189 (SEQ ID NO:2) 脱颖而出,显示出比两个亲本副痘病毒株和对照病毒显著更好的细胞杀伤(图2)。所有三种新型嵌合病毒分离株 (#17, #33和#189) 在大多数NCI-60固体癌细胞系中引起显著的细胞死亡,即使在0.01的低MOI下也是如此。通常,正痘病毒株和嵌合正痘病毒分离株比副痘病毒株和嵌合副痘病毒分离株在低MOI 0.01下杀伤癌细胞更有效。

#33和#189的基因组测序。从纯化的病毒体中分离新型痘病毒分离株#33和#189的基因组DNA,并使用 Illumina Hiseq 2500进行下一代测序,覆盖率超过1000x。通过PCR扩增空位并通过Sanger测序来测序。对#33基因组的189,415碱基对 (bps) 进行了完全测序,而189的基因组为138,203个碱基对。针对GenBank的初次BLAST表明#33和#189的基因组序列与GenBank中的任何基因组序列不同。#33比任何其他正痘病毒更接近痘苗病毒株。#189非常接近羊传染性口疮病毒NZ2株,其是亲本副痘病毒中的一种。在羊传染性口疮病毒NZ2病毒株中鉴定的所有ORF的核苷酸序列与#189中的相同。与羊传染性口疮病毒NZ2相比,#189基因组中6755位有一个“G”插入。在反向末端重复区域中,缺失一个重复元件的拷贝,并且在#189基因组中插入另一个重复元件的一个拷贝。总的来说,#33和#189都代表了新型、独特的痘病毒分离株。

**方法和材料:**细胞系:所有癌细胞系在RPMI-1640 (Mediatech, Manassas, VA) 中生长。非洲绿猴肾成纤维细胞 (CV-1) 和奶牛肾上皮细胞 (MDBK) 获自American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA), 并在DMEM (Mediatech, Manassas, VA) 中生长。所有培养基补充有10% FBS (Mediatech, Manassas, VA) 和1% 青霉素-链霉素溶液 (Mediatech, Manassas, VA)。将细胞在37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养。

**病毒:**牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、IHD、Elstree、CL、Lederle-Chorioallantoic和AS,羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS购自ATCC。使所有正痘病毒株在CV-1细胞中生长并滴定,使副痘病毒株在MDBK细胞中生长并滴定。

嵌合正痘病毒和嵌合副痘病毒库的产生和单个克隆的嵌合病毒分离株的分离:通过用牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht和痘苗病毒株WR、IHD、Elstree、CL、Lederle-Chorioallantoic和AS以每种病毒的感染复数(MOI)为0.01共感染CV-1细胞,产生嵌合正痘病毒库。为了产生嵌合副痘病毒库,用羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS以MOI为0.1共感染MDBK细胞。感染后3天收获经感染的细胞。将初始嵌合正痘病毒库在CV-1细胞中以MOI为0.1进一步传代三次,而初始嵌合副痘病毒库在MDIK细胞中以0.1的MOI进一步传代三次。从用最终嵌合正痘病毒库感染的CV-1细胞和用最终嵌合副痘病毒库感染的MDBK细胞中分别挑取100个嵌合正痘病毒噬斑和100个嵌合副痘病毒噬斑。将200个噬斑在各自的细胞中进一步噬斑纯化两次,得到200个克隆纯化的单个嵌合病毒分离株。

**高通量筛选:**将NCI-60癌细胞系和一组胰腺癌细胞系(包括PANC-1、MIA-PaCa2、BxPC3、FG、Capan-2和Su.86.86)分配到96孔板中(对于实体瘤细胞系3000个细胞/孔,且对于白血病细胞系5000/孔),在无菌条件下使用epMotion 5075的液体处理器(Eppendorf),在37°C、5% (v/v) CO<sub>2</sub>孵育过夜。然后用200个嵌合正痘病毒和嵌合副痘病毒分离株、11个亲本病毒株和2个对照溶瘤病毒GLV-1h68和OncovEX GFP以MOI 0.01感染细胞。在感染后96小时使用MTS测定(Promega)测定细胞活力。用自动BMG PHERAstar读板器(BMG LABTECH)测量490nm处的吸光度。每个实验重复进行两次。空白感染细胞的细胞活力设定为100%。

**在胃癌细胞系中的病毒细胞毒性:**将MKN-45、OCUM-2M和KATO-3细胞以每孔3000个细胞的浓度铺板到96孔板中,并在37°C、5% (v/v) CO<sub>2</sub>培养过夜。用#33、#189、GLV-1h68和OncovEX GFP以0.01、0.1和1的MOI感染细胞。使用MTS测定在37°C、5% (v/v) CO<sub>2</sub>每天监测细胞活力,持续4天。

**基因组测序:**使用Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)从纯化的病毒体中提取#33和#189的基因组DNA,并通过超声处理进行片段化。使用KAPALTP Library Preparation Kit制备文库。使用Illumina Hiseq 2500进行测序

#### 实施例2. 在胰腺癌细胞系中的高通量筛选

NCI-60癌细胞系仅含有来自8种不同器官的实体瘤(参见表1)。探究来自NCI-60癌细胞系的结果是否会在来自其他器官的实体瘤中重现。对六种胰腺癌细胞系(BxPC3、FG、MIA PaCa-2、Capan-2、PANC-1和SU.86.86)用与NCI-60癌细胞系中的高通量筛选中使用的病毒相同的病毒以0.1的MOI进行感染。在感染后96小时使用MTS测定再次测量细胞活力。嵌合正痘病毒分离株#17和#33在所有嵌合正痘病毒分离株中表现出最佳细胞杀伤作用,而嵌合副痘病毒分离株#189在所有嵌合副痘病毒分离株中表现出最佳细胞杀伤作用。如表2和图3和图4所示,它们在杀伤胰腺癌细胞系方面都比它们各自的亲本病毒株和对照病毒GLV-1h68和OncovEX GFP更好。因此,来自NCI-60癌细胞系的结果在一组胰腺癌细胞系中非常好地重现。

表2. 胰腺癌细胞存活率。(VACV=痘苗病毒)

BxPC3	FG	MIA PaCa 2	Capan 2	PANC-1	SU.86.86	平均	stdev	病毒名称
平均	平均	平均	平均	平均	平均			
20.38	18.22	24.06	109.76	20.31	52.27	40.83	36.09	# 17
4.46	26.75	52.88	85.75	13.93	69.41	42.20	32.29	# 33
31.01	60.98	102.04	113.08	57.20	30.54	65.81	34.93	VACV Elstree
20.78	40.62	104.90	104.86	68.57	60.23	66.66	33.91	VACV Lederle-Chorioallantoic
18.21	33.81	93.44	106.36	45.64	109.87	67.89	40.05	VACV IHD
16.40	66.23	90.91	93.81	43.05	100.69	68.51	33.31	兔痘病毒 Utrecht
19.57	50.96	97.52	108.60	68.27	101.81	74.46	34.78	VACV CL
17.51	75.42	102.31	123.05	68.27	103.55	81.69	37.29	VACV WR

50.01	79.85	89.31	97.55	78.14	106.86	83.62	19.70	GLV-1h68
61.29	96.76	122.32	112.34	62.99	107.42	93.85	25.91	浣熊痘病毒 Herman
63.81	99.06	114.44	80.60	108.15	104.16	95.04	19.14	OncoVEX GFP
106.79	95.12	101.38	102.37	95.09	103.55	100.71	4.71	牛痘病毒 Brighton
101.00	106.93	118.90	111.92	107.05	108.34	109.02	5.99	VACV AS

实施例3. 新型嵌合正痘病毒分离株#33和嵌合副痘病毒分离株#189在胃癌细胞系中显示出有效的细胞杀伤作用。

基于来自NCI-60癌细胞系和胰腺癌细胞系组的高通量筛选结果,选择新型嵌合正痘病毒分离株#33和嵌合副痘病毒分离株#189用于进一步表征。在三种胃癌细胞系中进一步研究了分离株#33和#189的肿瘤细胞杀伤活性。用#33、#189、GLV-1h68和OncoVEX GFP以0.01、0.1和1的MOI感染MKN-45、OCUM-2M和KATO-3细胞。使用MTS测定每天监测细胞活力,持续4天。MKN-45和OCUM-2M细胞系对#33最敏感,对OncoVEX GFP中等敏感,且对GLV-1h68最不敏感。虽然KATO-3在低MOI为0.01时对OncoVEX GFP最敏感,但#33、#189和OncoVEX GFP在较高MOI(0.1和1)下同样良好地杀伤KATO-3细胞。KATO-3细胞对GLV-1h68最不敏感。总体而言,#33最有效地杀伤胃癌细胞系,而GLV-1h68最不有效地杀伤胃癌细胞系(图5A-5C)。

如表3所示,存在于所有测序的ChPV中的90个基因与其已知功能一起列出。基因以其VACV-COP对应物命名。星号(\*)表示基因也存在于两种EnPV中。表3改编自Gubser等人(Gubser, C., Hue, S., Kellam, P., and Smith, G.L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. J Gen Virol 85, 105-117),且其全部内容并入本文针对所有目的作为参考。

表3.Chordopoxviruses的最小基因补体。缩写:IMV,细胞内成熟病毒;IEV,细胞内包膜病毒;EEV,细胞外包膜病毒

<b>ORF</b>	<b>推定功能</b>	<b>ORF</b>	<b>推定功能</b>
F9L *	未知	H6R *	DNA 拓扑异构酶 I.
F10L *	IMV 丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶	H7R	未知
F12L	IEV 蛋白	D1R *	mRNA 加帽酶, 大亚基
F13L	EEV 蛋白/磷脂酶	D2L	IMV 核心蛋白
F15L	未知	D3R *	IMV 核心蛋白
F17R	IMV 核心磷蛋白, VP11/DNA 结合蛋白	D4R *	尿嘧啶-DNA 糖基化酶
E1L *	Poly(A)聚合酶催化亚基	D5R *	核苷三磷酸酶
E2L	未知	D6R *	早期转录因子小亚基, VETF-1
E4L	聚(A)聚合酶催化亚基, rpo30/VITF-1	D7R *	RNA 聚合酶亚基 rpo18
E6R *	未知	D9R	29kDa mutT 样蛋白
E8R	未知	D10R *	29 kDa mutT 样蛋白, 基因表达的负调节物
E9L	DNA 聚合酶	D11L *	核苷三磷酸磷酸水解酶 I.
E10R	IMV 膜相关蛋白	D12L *	mRNA 加帽酶小亚基, 中间转录因子, VITF
I1L	IMV 核心/ DNA 结合蛋白	D13L *	IMV 蛋白, 利福平耐药
I2L	未知	A1L *	晚期转录因子/ VLTF-2
I3L	磷蛋白, 结合 ssDNA	A2L *	晚期转录因子/ VLTF-3
I5L	IMV 结构蛋白, VP13K	A2-5L	硫氧还蛋白样蛋白
I6L	未知	A3L *	IMV 主要核心蛋白 P4b
I7L *	IMV 核心蛋白	A4L	IMV 核心蛋白

I8R *	核苷三磷酸磷酸水解酶 II, RNA 解旋酶, NTP 酶	A5R *	RNA 聚合酶亚基 rpo19
G1L *	金属内蛋白酶/病毒体形态发生	A6L	未知
G2R	晚期转录/ IBT 依赖性蛋白质	A7L *	早期转录因子大亚基, VETF
G3L	未知	A8R	中间转录因子, VITF-3
G4L	谷氧还蛋白 2, 膜蛋白, 病毒体形态发生	A9L *	IMV 蛋白, 在形态发生中的作用
G5R *	未知	A10L *	IMV 主要核心蛋白 P4a
G5-5R	RNA 聚合酶亚基 rpo7	A11R *	未知
G6R *	未知	A12L	IMV 核心蛋白
G7L	IMV 核心蛋白, VP16K	A13L	IMV 膜相关蛋白/ p8
G8R	晚期转录因子, VLTF-1	A14L	IMV 蛋白, p16
G9R *	肉豆蔻基蛋白质	A14-5L	IMV 蛋白
L1R *	肉豆蔻酸化的 IMV 蛋白	A15L	未知
L2R	未知	A16L *	肉豆蔻基蛋白质
L3L *	未知	A17L	IMV 膜蛋白, 形态发生因子
L4R *	IMV 核心蛋白 VP8, DNA 和 RNA 结合蛋白	A18R *	DNA 解旋酶, DNA 依赖性 ATP 酶, 转录物释放因子
L5R *	未知	A19L	未知
J1R	二聚体病毒体蛋白	A20R	DNA 聚合酶持续性因子
J3R *	Poly(A)聚合酶刺激亚基, VP39	A21L *	未知
J4R	RNA 聚合酶亚基 rpo22	A22R *	Holiday 交叉(Holiday junction)解离酶
J5L *	未知	A23R *	中间转录因子, VITF-3
J6R *	RNA 聚合酶亚基 rpo147	A24R *	RNA 聚合酶亚基 rpo132
H1L	酪氨酸-丝氨酸磷酸酶, 病毒体成熟	A28L *	未知
H2R *	未知	A29L *	RNA 聚合酶亚基 rpo35
H3L *	免疫显性 IMV 包膜蛋白 p35	A30L	未知
H4L *	RNA 聚合酶相关的转录特异性因子, RAP 94	A32L *	ATP-和 GTP-结合基序 A, DNA 包装
H5R	晚期转录因子, VLTF-4	A34R	EEV 糖蛋白

应当理解,本文描述的实施例和实施方案仅用于说明目的,并且本领域技术人员可以建议对其进行各种修改或改变,并且将包括在本申请的精神和范围内以及所附权利要求的范围内。出于所有目的,本文引用的所有出版物、专利和专利申请均通过引用整体并入本文。

#### 实施例4. 新型嵌合副痘病毒HOV-189作为三阴性乳腺癌的溶瘤免疫疗法

三阴性乳腺癌(TNBC)是乳腺癌的一种侵袭性亚型,复发率高且预后差。本申请人描述了一种能够有效地杀伤TNBC的新型的基因工程的副痘病毒。

**方法:**通过同源重组产生一种新型嵌合副痘病毒(HOV-189),并通过高通量筛选鉴定。在四种TNBC细胞系中体外测定细胞毒性。通过标准噬斑测定检查病毒复制。通过将MDA-MB-468植入到无胸腺裸鼠的第二和第四乳腺脂肪垫中产生原位TNBC异种移植物,并用病毒处理。

**结果:**HOV-189在低感染复数(MOI)下显示出剂量依赖性细胞毒性,治疗后6天细胞死亡>90%。与对照组相比,在以剂量低至10<sup>3</sup>PFU肿瘤内注射后两周观察到肿瘤大小显著减少(P<0.01)。此外,清楚地证明了远位效应(非注射的远端肿瘤的缩小)。

结论:HOV-189在剂量低至 $10^3$ PFU时显示出在体外有效的细胞毒性和在体内有效的抗肿瘤作用。这些数据鼓励这种针对TNBC的高效药物的临床开发。

### 引言

每年全世界100万新诊断的乳腺癌病例中约有12-20%是三阴性<sup>11</sup>,表示它们缺乏雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体2(HER2)的表达。三阴性乳腺癌(TNBC)表现出较差的临床结果,这是由于其固有的侵略行为和缺乏有效的靶向治疗。TNBC患者在诊断后的前五年内复发和发生转移性疾病的风险高于非TNBC患者<sup>12</sup>。

目前,TNBC辅助治疗的主要依据是细胞毒性化疗,但目前已有靶向治疗的深入研究和开发,包括聚(ADP-核糖)聚合酶1(PARP1)抑制剂、PI3K抑制剂、MEK抑制剂和程序性细胞死亡配体1(PD-L1)抑制剂的研究<sup>11,13</sup>。

免疫疗法长期以来一直是许多癌症类型包括乳腺癌的研究领域。TNBC表现出增加的遗传不稳定性,新抗原率更高,并且在微环境中具有肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的频率,使得TNBC比非三重阴性疾病更具免疫原性<sup>14</sup>。这些因素使TNBC成为免疫疗法的良好候选。申请人先前在TNBC模型中研究了具有抗肿瘤作用的溶瘤痘苗病毒<sup>15</sup>。这里申请人展示了在体外和体内TNBC模型中均有效的新型嵌合副痘病毒的数据。

### 方法

细胞培养和细胞系。人三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231(由Dr.Sangkil Nam,City of Hope友情提供)、MDA-MB-468(由Dr.John Yim,City of Hope友情提供)、BT549(Dr.Yim)和Hs578T(Dr.Yim)在补充有10%胎牛血清(FBS)和100IU/ml链霉素和青霉素的RPMI 1640(Corning,Corning NY)中培养。通过Genetica Cell Line Testing(Burlington,NC)测试并验证所有TNBC细胞系。非洲绿猴肾成纤维细胞(CV-1)和MDBK细胞获自American Type Culture Collection(Mannassus,VA),并在补充有10%FBS和100IU/ml链霉素和青霉素的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM,Corning,Corning NY)中培养。所有细胞在37°C在5%CO<sub>2</sub>-湿润的培养箱中生长。

嵌合副痘病毒的开发和选择。为了产生嵌合副痘病毒库,用羊传染性口疮病毒株NZ2(ATCC)和假牛痘病毒株TJS(ATCC)共感染MDBK细胞。感染后3天收获经感染的细胞。从用嵌合副痘病毒库感染的MDBK细胞中挑取100个嵌合副痘病毒噬斑。将100个噬斑在MDBK细胞中进一步噬斑纯化两次,得到100个克隆纯化的单个嵌合病毒分离株,其与其亲本病毒一起在NCI-60细胞系中进行高通量筛选。选择对NCI-60细胞系表现出最有效的杀肿瘤特性的分离株HOV-189用于该研究。

细胞毒性测定。将MDA-MB-231、BT549和Hs578T细胞以1000个细胞/孔铺板于96孔板,并将MDA-MB-468以3000个细胞/孔铺板于96孔板并孵育过夜。MDA-MB-231细胞用0.1、1和10MOI的每种病毒感染,且MDA-MB-468、BT549和Hs578T用0.01、0.1和1MOI感染。使用CellTiter 96Aqueous One溶液(Promega,Madison,WI)在分光光度计(Tecan Spark 10M,Mannedorf,Switzerland)上在490nm每24小时三重测量细胞活力,持续1至6天。

病毒复制测定。使用标准噬斑测定定量TNBC中的病毒复制。将细胞在含有2ml生长培养基的6孔板中铺板至汇合,然后用0.01MOI的每种病毒感染。收获细胞,重复三次,连续三天。用在24孔板中用HOV-189处理的系列稀释的样品感染MDBK细胞。

原位异种移植模型。二十六个12周龄的Hsd:Athymic Nude-Foxn1<sup>nu</sup>雌性裸鼠

(Envigo, Indianapolis, IN) 在第二和第四乳腺脂肪垫中注射 $10^7$ 个MDA-MB-468细胞和6mg/ml基质胶(Corning)。当肿瘤大小达到约 $100\text{-}150\text{mm}^3$ 时,将小鼠随机分组,并肿瘤内注射单独PBS( $n=4$ )、50 $\mu\text{l}$  PBS中的 $10^3\text{PFU}$ ( $n=6$ )、 $10^4\text{PFU}$ ( $n=6$ )或 $10^5\text{PFU}$ ( $N=7$ )。治疗前各组之间肿瘤大小的变化没有显著差异。然后每三天测量肿瘤大小,持续六周。根据 $V(\text{mm}^3) = (4/3) \times (\pi) \times (a/2)^2 \times (b/2)$ 计算肿瘤体积,其中a是最小直径,且b是最大直径。肿瘤内注射后7天,每组处死2至4只小鼠,使肿瘤和器官(肺、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、卵巢、脑)在液氮中快速冷冻,并用于进一步的组织病理学染色、免疫组织化学染色和病毒噬斑测定。对于剩余的三只小鼠,仅在第二乳腺肿瘤用50 $\mu\text{l}$ PBS中的 $10^5\text{PFU}$ 处理,以观察对未经注射的第四乳腺肿瘤的影响(如果有的话)。处理后两周,收获两个肿瘤以确定每个肿瘤中的病毒滴度。

## 结果

HOV-189在体外以时间和剂量依赖性方式有效杀伤TNBC。鉴于TNBC的异质性,两种转移性来源的细胞系(MDA-MB-231和MDA-MB-468)和两种非转移性来源的细胞系(Hs578T和BT549)用HOV-189处理六天,MOI范围从0.01到10。HOV-189最有效地杀伤Hs578T(96小时的LD50:MOI 0.396)和MDA-MB-468(LD50, MOI 0.185),当用MOI 1处理时,在6天时细胞死亡>80% (图6A和6C)。虽然BT549和MDA-MB-231的LD50较高(分别为LD50, MOI 1.636和MOI 1.712),但MDA-MB-231数据显示六天后增加HOV-189的浓度导致MOI 10后细胞死亡率>90% (图6D)。

HOV-189在体外TNBC中复制。通过三天收集的经感染的细胞的标准噬斑测定,在所有四种TNBC细胞系中评估病毒复制。在MOI 0.01下在BT549、Hs578T和MDA-MB-231中发生有效的病毒复制,最大复制发生在24-48小时的时间段内(图7)。然而,尽管在低MOI下显示出有效的细胞毒性,但MDA-MB-468中的HOV-189复制在MOI 0.01下是差的。通过在MDA-MB-468系中增加浓度至MOI 10来改善病毒复制(图7)。

瘤内HOV-189注射有效地减少了原位TNBC异种移植植物中的肿瘤大小而没有显著的病毒毒性。通过将MDA-MB-468细胞植入无胸腺裸鼠的第二和第四乳腺脂肪垫中来产生原位异种移植植物。两种肿瘤均接受单次肿瘤内注射PBS或HOV-189( $10^3\text{PFU}$ 、 $10^4\text{PFU}$ 或 $10^5\text{PFU}$ )。与PBS处理的对照相比,用HOV-189处理的所有组在治疗后第13天表现出相对肿瘤大小的显著降低,并且这种治疗效果在注射后6周持续(图8)。瘤内注射耐受良好,在小鼠中没有显著的病毒毒性,如通过与对照相比处理组中缺乏显著的体重减轻所证明的(图9)。

治疗后一周和六周的HOV-189生物分布表明体内固有的肿瘤特异性。在HOV-189注射后一周和六周,每组处死2-4只小鼠用于病毒生物分布。与两个时间点的其他器官相比,经感染的肿瘤组织的病毒滴度显示出2-10 $\log$ 更高的HOV-189滴度,反映了HOV-189与正常细胞相比对癌细胞的天然趋向性(表4)。除了注射的肿瘤组织外,HOV-189仅在注射后一周在心脏和肺组织中以及在注射后六周在肺组织中检测到,这与观察到的缺乏显著的全身毒性相关。

通过免疫荧光成像证实HOV-189在原位异种移植模型中的感染和复制。在HOV-189注射后一周,针对羊传染性口疮病毒的多克隆抗体的免疫荧光检测显示与对照相比,每个肿瘤用 $10^5\text{PFU}$ 的HOV-189处理的肿瘤组织的病毒感染(图10A和10B)。此外,与DAPI复染融合的抗体检测模式与病毒工厂中的活性复制一致,因为羊传染性口疮病毒抗体定位于细胞核外的区域(图10C)。

肿瘤内HOV-189注射对远端未经注射的肿瘤产生肿瘤抑制作用。仅在第二乳腺肿瘤中用 $10^5$ PFU的HOV-189处理三只动物,而第四乳腺肿瘤未经处理。与PBS处理的对照相比,每三天测量肿瘤大小,并且在两周结束时通过标准噬斑测定法定量病毒滴度。虽然最初在经注射的肿瘤组中相对肿瘤大小增加(可能是由于注射本身的创伤),但是在第6天后肿瘤大小减少,与第13天的对照相比显著减少( $p<0.05$ )。尽管从未直接用HOV-189治疗,未经注射的肿瘤组的相对肿瘤大小保持稳定(图11)。两周结束时的病毒滴度显示经注射的肿瘤的平均滴度为 $3.37 \times 10^3$ PFU/g组织,而未经注射的肿瘤的平均滴度为 $1.15 \times 10^3$ PFU/g组织。

## 讨论

所有乳腺癌诊断中,三阴性乳腺癌(TNBC)占15-20%。它往往表现出生物学侵略性,往往影响年轻女性,并预示更高的复发和更差的总体生存<sup>16,17</sup>。与激素受体阳性疾病相反,TNBC缺乏已知的生物标志物用于开发和施用有效的靶向治疗。因此,新辅助治疗和辅助治疗的主要依据仍然是细胞毒性化疗,这可能与许多全身性副作用有关<sup>11,13</sup>。

2015年10月,美国食品和药物管理局(FDA)批准了一种名为T-VEC(talimogene laherparepvec)的单纯疱疹病毒(HSV-1)作为第一种用于人类的溶瘤病毒(OV)<sup>18</sup>。这一批准是病毒学和免疫治疗领域的一项具有里程碑意义的事件,激发了人们对其他癌症(包括TNBC)治疗进一步发展OV的兴趣。与正常细胞相比,OV表现出癌细胞的天然趋向性,利用癌细胞中的病理性紊乱,例如改变的细胞内信号传导途径和细胞表面受体的过表达以优先感染癌细胞<sup>19-21</sup>。此外,OV介导的受感染细胞的破坏释放细胞因子、肿瘤相关抗原(TAA)、损伤相关分子模式分子(DAMP)和病原体相关的分子模式(PAMP)分子,这些分子可以促进先天和适应性针对癌细胞的免疫系统<sup>20,22-26</sup>。TNBC表明微环境中遗传不稳定性增加、新抗原数量增加、且肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)数量增加<sup>14</sup>。这使得TNBC比非三重阴性疾病更具免疫原性,并且是OV诱导治疗的吸引人的候选者。

该研究表明,新型嵌合副痘病毒HOV-189在四种不同的转移性和非转移性来源的TNBC细胞系中具有体外细胞毒性作用。在无胸腺裸鼠的TNBC异种移植植物中单次肿瘤内注射HOV-189显著减小肿瘤大小而没有显著毒性的迹象。此外,还在非经注射的远端肿瘤部位检测到病毒,这些肿瘤的大小稳定。因此,HOV-189表现出全身移动和靶向远端疾病的能力,其可能在新辅助治疗和转移性环境中具有应用。

值得注意的是,用HOV-189剂量低至 $10^3$ PFU每个肿瘤体内观察到肿瘤大小的减少。这表明抗肿瘤作用不可能是病毒复制直接溶瘤的结果,因为HOV-189表现出较差的体外复制。HOV-189的基因测序揭示了其与亲本病毒之一副痘病毒羊传染性口疮病毒(ORFV)的密切关系。先前对ORFV的研究表明,ORFV处理诱导了强烈的免疫调节作用,特别是在自然杀伤(NK)细胞活化方面<sup>27,28</sup>。即使用紫外线(UV)失活的ORFV进行治疗,也会引起相似但较弱的应答,这表明病毒本身可能含有一种抗原结构成分,其能够诱导独立于其实际复制的免疫应答。鉴于HOV-189的基因序列与ORFV NZ2病毒密切相关,申请人推测HOV-189的抗肿瘤作用机制可能是免疫细胞介导的、可能是NK细胞介导的,解释了在低剂量及不良的体外复制所看到的作用。

与其他OV相比,ORFV尚未在临床治疗开发的背景下进行充分研究。从兽医学中收集了大部分关于其自然病史的知识。然而,ORFV的若干特性可能有利于将其开发为用于治疗人类癌症的OV。首先,ORFV感染不会导致人类严重的疾病<sup>29</sup>。其次,ORFV感染诱导有效的免

疫系统刺激(Th1主导的),且甚至灭活的病毒颗粒保持诱导免疫应答的能力<sup>30,31</sup>。第三,尽管针对ORF产生抗体,但中和抗体很少见,且仍可发生再感染。这意味着可以给予同一患者重复剂量<sup>28</sup>,在继续应答方面很好地改进了在临床开发中的需要血清型转换或第二剂抗原性独特的病毒的其他OV。最后,使用较低病毒滴度的ORFV的临床应答是OV开发的另一个实际改进,因为OV产生是困难的,成本和时间密集的,并且通常需要每次注射 $10^6$ 至 $10^9$ PFU的滴度。

总之,HOV-189是一种新型的野生型嵌合副痘病毒,在体外和体内均有效对抗TNBC。对于缺乏TNBC治疗的靶向治疗,HOV-189代表了该领域中免疫治疗的有希望的途径。就未来方向而言,申请人计划在其他异种移植模型中进一步进行临床前测试,以及对野生型病毒进行遗传修饰以增强肿瘤选择性和总体效力。

表4.处理后1周和6周后HOV-189在各种器官中的病毒生物分布。

	第一周病毒滴度(PFU/g 组织)				第六周病毒滴度(PFU/g 组织)			
	滴度	检测到的动物/ 总的测试的动物	SD	检测的极 限	滴度	检测到的动物/ 总的测试的动物	SD	检测的极 限
<b>肿瘤</b>	1.64 x $10^4$	3/3	1.22 $\times 10^4$		1.18 $\times 10^3$	4/4	1.24 $\times 10^3$	
<b>脑</b>	ND	0/3		$2.52 \times 10^2$	ND	0/4		$2.53 \times 10^2$
<b>心</b>	1.07 x $10^2$	1/3	1.85 $\times 10^2$		ND	0/4		$4.28 \times 10^2$
<b>肺</b>	8.96 x $10^2$	3/3	7.23 $\times 10^2$		3.33 $\times 10^1$	1/4	6.67 $\times 10^1$	
<b>肝</b>	ND	0/3		$1.14 \times 10^2$	ND	0/4		$1.12 \times 10^2$
<b>脾</b>	ND	0/3		$4.87 \times 10^2$	ND	0/4		$6.58 \times 10^2$
<b>肾</b>	ND	0/3		$2.43 \times 10^2$	ND	0/4		$2.57 \times 10^2$
<b>卵巢</b>	ND	0/3		$2.62 \times 10^3$	ND	0/4		$4.39 \times 10^2$

#### 实施例5. 重组嵌合痘病毒的构建

构建用于将外源基因表达盒插入#33嵌合痘病毒基因组的穿梭载体

为了构建胸苷激酶(TK)穿梭载体,使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物:5'-GCGCATATGATCTATGGATTACCATGGATGACAA CTC-3' (SEQ ID NO:21) 和5'-CGTTAACTCGTCTAATTAAATTCTGTAC-3' (SEQ ID NO:22) (左侧翼),5'-CAGGTAAAAGTACAGAATTAAATTAGACGAGTTAACGAGCTCGTGACGGATCCGCTAGCGG CCGCGG AGGTAATGATATGTATCAATCGGTGTAG-3' (SEQ ID NO:23) 和5'-GCGGAATTCGTAATTACTTAGTAA ATCCGCCGTACTAGG-3' (SEQ ID NO:24) (右侧翼)从#33基因组DNA中PCR扩增#33嵌合痘病毒的TK基因的左侧和右侧侧翼序列。使用基因剪接的方法通过重叠延伸将两个片段连接在一起<sup>32</sup>。所得的片段用NdeI和EcoRI消化,并克隆入相同切割的质粒pGPT得到p33NC-TK。通过测序确认穿梭载体中TK的侧翼序列。p33NC-TK含有由SacI、SalI、BamHI、NheI和NotI分离的TK的左右侧翼序列,以及由痘苗病毒(VACV)早期启动子p7.5E驱动的大肠杆菌鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(gpt)基因作为瞬时显性可选择的标记物。

类似地构建F14.5L穿梭载体。使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物:5'-GCGCATATGAGAAGATTGATAATATGAAACC TTTAAG-3' (SEQ ID NO:25) 和5'-CCTCTCTAGCTTCACTTAAACTGTATCG-3' (SEQ ID NO:26) (左侧翼),5'-GAATAATCGATACAGTTAAGTGAAGCTAGAGAGGAAGCTTGAGCTCGA GGATCCGCTAGCG

GCCGCTGAAGAGGATGCTAGAATCAAGGAGGGAGCAAG-3' (SEQ ID NO:27) 和 5'-GCGGAATTCTCCGGGCA GTGACTTTGTAGCTCTCCCAG-3' (SEQ ID NO:28) (右侧翼) 从#33基因组DNA中PCR扩增#33嵌合痘病毒的F14.5L基因的左侧和右侧侧翼序列。使用基因剪接的方法通过重叠延伸将两个片段连接在一起。将得到的片段用NdeI和EcoRI消化，并克隆到相同切割的质粒pGPT中，得到p33NC-F14.5L。通过测序确认穿梭载体中F14.5L的侧翼序列。p33NC-F14.5L包含由HindIII、SacI、XhoI、BamHI、NheI和NotI分开的F14.5L的左和右侧翼序列，和由VACV早期启动子p7.5E驱动的大肠杆菌gpt做为瞬时显性选择标记物。

#### 构建用于将微RNA靶序列与#33嵌合痘病毒的必需基因融合的穿梭载体

为了将miR-100的靶序列融合到#33嵌合痘病毒的尿嘧啶DNA糖基化酶的3'末端(由痘苗病毒中的基因D4R编码)，使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物: 5'-GCGCATATGCACGCCATATACTATTACTTATCAGATG-3' (SEQ ID NO:29) 和 5'-TTAATAAATAACCCTTGAGCCAATTATAGG-3' (SEQ ID NO:30) (左侧翼), 5'-CCTATAAATTGGGCTCAAGGGTTATTATTAACACAAGTCGGATCTACGGGTTcgatCACAGTCG GATCTACGGGTTaccggtCACAGTCGGATCTACGGGTTtcacCACAGTCGGATCTACGGGTTGCTTAGTG AAATTTTAACCTGTGTT-3' (SEQ ID NO:31) 和 5'-GCGGAATTCCCTAGTACCTACAACCCGAAGAGTTG-3' (SEQ ID NO:32) (右侧翼) 从#33基因组DNA中PCR扩增嵌合痘病毒的D4R基因的左侧和右侧侧翼序列。使用基因剪接的方法通过重叠延伸将两个片段连接在一起。将得到的片段用NdeI和EcoRI消化，并克隆到相同切割的质粒pGPT中，得到p33NCD4R-miR100t和p33NCD4R-miR100t-2。通过测序确认穿梭载体中D4R的侧翼序列。p33NCD4R-miR100t如预期的那样，含有4个拷贝的与D4R的3'末端融合的miR-100靶序列，而p33NCD4R-miR100t-2是自发突变体，其中缺失2个拷贝的miR-100靶序列。两种载体均含有由VACV早期启动子p7.5E驱动的大肠杆菌gpt作为瞬时显性选择标记物。

为了将Let-7c的靶序列与#33嵌合痘病毒的尿嘧啶DNA糖基化酶(由痘苗病毒中的基因D4R编码)的3'末端融合，使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物: 5'-GCGCATATGCACGCCATATACTATTACTTATCAGATG-3' (SEQ ID NO:33) 和 5'-TTAATAAATAACCCTTGAGCCAATTATAGG-3' (SEQ ID NO:34) (左侧翼), 5'-CCTATAAATTGGGCTCAAGGGTTATTATTAACCATACAACCTACTACCTCAcgatACCATAAC CCTACTACCTCAaccggtaACCATACAACCTACTACCTCAtcacACCATAACCTACTACCTCATGCTTAGTG AAATTTTAACCTGTGTT-3' (SEQ ID NO:35) 和 5'-GCGGAATTCCCTAGTACCTACAACCCGAAGAGTTG-3' (SEQ ID NO:36) (右侧翼) 从#33基因组DNA中PCR扩增嵌合痘病毒的D4R基因的左侧和右侧侧翼序列。使用基因剪接的方法通过重叠延伸将两个片段连接在一起。将得到的片段用NdeI和EcoRI消化，并克隆到相同切割的质粒pGPT中，得到p33NCD4R-Let7ct。通过测序确认穿梭载体中D4R的侧翼序列。p33NCD4R-Let7ct如预期的那样，含有4个拷贝的与D4R的3'末端融合的Let-7c靶序列。它含有由VACV早期启动子p7.5E驱动的大肠杆菌gpt作为瞬时显性选择标记物。

为了将miR-100的靶序列融合到#33嵌合痘病毒的DNA聚合酶的3'末端(由痘苗病毒中的基因E9L编码)，使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物: 5'-GCAGGCGCCGAGTTGAGGCGGTATATAAGAAT CTGATTATGC-3' (SEQ ID NO:37) 和 5'-TTATGCTTCGTAATGTAGGTTGAACC-3' (SEQ ID NO:38) (左侧翼), 5'-GGT

TCAAAACCTACATTTACGAAGCATAACACAAGTCGGATCTACGGGTTcgatCACAAGTCGGATCTACGGGTa ccggcgtCACAAGTCGGATCTACGGGTTcacCACAAGTCGGATCTACGGGTTAATAATTACAACAGTTGTACGT CGCTCTTG-3' (SEQ ID NO:39) 和5'-GCGCAATTGCATTGCTAATGGAT CGTTCTCTGGTAGATACG-3' (SEQ ID NO:40) (右侧翼) 从#33基因组DNA中PCR扩增嵌合痘病毒的E9L基因的左侧和右侧侧翼序列。使用基因剪接的方法通过重叠延伸将两个片段连接在一起。将得到的片段用NarI和MfeI消化，并克隆到用NarI和EcoRI切割的质粒pGPT中，得到p33NCE9L-miR100t。通过测序确认穿梭载体中的ELL的侧翼序列。p33NCE9L-miR100t如预期的那样，含有4个拷贝的与E9L的3'末端融合的miR-100靶序列。它还含有由VACV早期启动子p7.5E驱动的大肠杆菌gpt作为瞬时显性选择标记物。

为了将Let-7c的靶序列与#33嵌合痘病毒的DNA聚合酶的3'末端(由痘苗病毒中的基因E9L编码)融合，使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物：5'-GCGGGCGCCGAGTTGAGGCGGTATATAAGAACATCTGATTATGC-3' (SEQ ID NO:41) 和5'-TTATGCTTCGTAAAATGTAGGTTTGAACC-3' (SEQ ID NO:42) (左侧翼)，5'-GGTTCAAACCTACATTTACGAAGCATAAAACCATACAACTACTACCTCAcgatAACCATAAACCTACTACCTCAaccg gtAACCATAAACCTACTACCTCACacAACCATAAACCTACTACCTCAAATAATTACAACAGTTGTACGTCGC TCTTG-3' (SEQ ID NO:43) 和5'-GCGCAATTGCATTGCTAATGGATCGTTCTGGTAGATACG-3' (SEQ ID NO:44) (右侧翼) 从#33基因组DNA中PCR扩增嵌合痘病毒的E9L基因的左侧和右侧侧翼序列。使用基因剪接的方法通过重叠延伸将两个片段连接在一起。将得到的片段用NarI和MfeI消化，并克隆到用NarI和EcoRI切割的质粒pGPT中，得到p33NCE9L-Let7ct。通过测序确认穿梭载体中的E9L的侧翼序列。p33NCE9L-Let7ct如预期的那样，含有4个拷贝的与E9L的3'末端融合的Let-7c靶序列。它还含有由VACV早期启动子p7.5E驱动的大肠杆菌gpt作为瞬时显性选择标记物。

#### 将外源基因表达盒插入TK和F14.5L穿梭载体中

人钠碘共输送体(hNIS)表达盒。使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物：5'-GCGAAGCTTGAGCTAAAAATTGAAAAACTAGCG TCTTTTTGCTCGAACGACCATGGAGGCCGTGGAG-3' (SEQ ID NO:45) 和5'-GCGGATCCATAAA ATTAATTAATCAGAGGTTGTCCCTGCTGGTCTCG-3' (SEQ ID NO:46) PCR扩增具有VACV合成早期启动子(SE)的hNIS表达盒。用SacI和BamHI消化PCR片段，并克隆到相同切割的质粒p33NC-TK中，得到p33NCTK-SE-hNIS。通过测序确认hNIS表达盒的序列。

Emerald (GFP的变体)表达盒。使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物：5'-GCGAAGCTTGAGCTAAAAATTGAAAATAATAC AAAGGTTCTGAGGGTTGTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATAGTCGACCACCATGGTGAGCAAGGGC GAGGAGCTGTTCAACC-3' (SEQ ID NO:47) 和5'-GCGGGATCCATAAAATTAAATCAGTACAGCTCGTC CATGCCGAGAGTGATC-3' (SEQ ID NO:48) 从质粒Emerald-pBAD (Addgene, Cambridge, MA) PCR扩增具有VACV H5早/晚期启动子的Emerald表达盒。用SacI和BamHI消化PCR片段，并克隆到相同切割的质粒p33NC-TK中，得到p33NCTK-H5-Emerald。通过测序确认Emerald表达盒的序列。

萤火虫荧光素酶表达盒。使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物：5'-GCGAAGCTTGAGCTAGTAGAATTTCATTGTTTTCT

ATGCTATAAATAGTCGACCACC ATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCCCAGC-3' (SEQ ID NO:49) 和 5'-GCGGGATCCATAAAAATTAATTAAATCACACGGCGATCTGCCGCCCTTCT TGGCCTTAATGAG-3' (SEQ ID NO:50) 从质粒pCDNA3.1 (+)/Luc2=tdT (Addgene, Cambridge, MA) PCR扩增具有VACV 11K晚期启动子的萤火虫荧光素酶表达盒。用Sac I和BamHI消化PCR片段，并克隆到相同切割的质粒p33NC-TK中，得到p33NCTK-11K-Fluc2。通过测序确认萤火虫荧光素酶表达盒的序列。为了用VACV SE和H5启动子产生含有萤火虫荧光素酶表达盒的质粒，使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物：5'-GCGGTCGACCACCATGGAA GATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCCCAGC-3' (SEQ ID NO:51) 和 5'-GCGGGATCCATAAAAATTAATTAAATCACACGGCGATCTGCC GCCCTTCTGGCCTTAATGAG-3' (SEQ ID NO:52) 从质粒pCDNA3.1 (+)/Luc2=tdT (Addgene, Cambridge, MA) PCR扩增萤火虫荧光素酶cDNA。用SalI和BamHI消化PCR片段，并克隆到相同切割的质粒p33NCTK-SE-hNIS和p33NCTK-H5-Emerald中，取代hNIS和Emerald，分别得到p33NCTK-SE-Fluc2和p33NCTK-H5-Fluc2。通过测序确认两种载体中萤火虫荧光素酶cDNA的序列。

mCherry表达盒。使用Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) 和引物：5'-GCGGTCGACCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGG-3' (SEQ ID NO:53) 和 5'-GCGGGATCCATAAAAATTAATTAAATCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC CCGGTGGAGTGG-3' (SEQ ID NO:54) 从质粒pLV-mCherry (Addgene, Cambridge, MA) 中PCR扩增mCherry cDNA。用SalI和BamHI消化PCR片段，并克隆到相同切割的质粒p33NCTK-H5-Emerald和p33NCTK-11K-Fluc2中，取代Emerald和萤火虫荧光素酶，分别得到p33NCTK-H5-mCherry和p33NCTK-11K-mCherry。通过测序确认两种载体中mCherry cDNA的序列。

抗PD-L1单链抗体表达盒。抗PD-L1单链抗体表达盒，其包含VACV H5启动子、Igκ轻链前导序列、由(G4S)3接头序列分开的atezolizumab的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>链序列、以及C末端FLAG标签序列，其由Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa) 合成。将片段用HindIII和BamHI消化，并克隆到相同切割的质粒p33NC-F14.5L中，得到p33NCF14.5L-H5-抗PD-L1。通过测序确认抗PD-L1单链抗体表达盒的序列。

#### 重组嵌合痘病毒的产生

CV-1细胞用亲本病毒感染，感染复数(MOI)为0.1，持续1小时，然后使用jetPRIME 体外DNA和siRNA转染试剂(Polyplus-transfection Inc. New York, NY) 用转移载体转染(表5)。感染后两天，收获经感染经/转染的细胞，并选择重组病毒并如前所述进行噬斑纯化<sup>33</sup>。

表5重组嵌合痘病毒清单。

重组嵌合痘病毒	亲本病毒	转移载体	基因型
33-D4RmiR100t -2-	# 33	p33NCD4R-miR100t -2-	miR-100 的靶序列(2 个拷贝)与 D4R 的 3'末端融合
33 D4RmiR100t	# 33	p33NCD4R-miR100t	miR-100 的靶序列(4 个拷贝)与 D4R 的 3'末端融合
33 D4Rlet7ct	# 33	p33NCD4R-let7ct	Let-7c 的靶序列(4 个拷贝)与 D4R 的 3'末端融合
33 E9LmiR100t	# 33	p33NCE9L-miR100t	miR-100 的靶序列(4 个拷贝)与 E9L 的 3'末端融合
33 E9Llet7ct	# 33	p33NCE9L-let7ct	Let-7c 的靶序列(4 个拷贝)与 E9L

			的 3'末端融合
33ΔTK	# 33	p33NC-TK	TK-灭活
33-(SE)hNIS	# 33	p33NCTK-SE-hNIS	(SE)hNIS 插入 TK
33-(H5) Emerald	# 33	p33NCTK-H5-翡翠	(H5) Emerald 插入 TK
33-(SE)Fluc2	# 33	p33NCTK-SE-Fluc2	(SE)Fluc2 插入 TK
33-(H5)Fluc2	# 33	p33NCTK-H5-Fluc2	(H5)Fluc2 插入 TK
33-(11K)Fluc2	# 33	p33NCTK-11K-Fluc2	(11K)Fluc2 插入 TK
33-(H5)mCherry	# 33	p33NCTK-H5-的 mCherry	(H5)mCherry 插入 TK
33-(11K)mCherry	# 33	p33NCTK-11K-的 mCherry	(11K)mCherry 插入 TK
33-(SE)hNIS-D4RmiR100t -2-	33-(SE)hNIS	p33NCD4R-miR100t -2-	(SE)hNIS 插入 TK; miR-100 的靶序列(2 个拷贝)与 D4R 的 3'末端融合
33-(SE)hNIS-D4R-miR10 0t	33-(SE)hNIS	p33NCD4R-miR100t	(SE)hNIS 插入 TK; miR-100 的靶序列(4 个拷贝)与 D4R 的 3'末端融合
33-(SE)hNIS-D4Rlet7ct	33-(SE)hNIS	p33NCD4R-let7ct	(SE)hNIS 插入 TK; Let-7c 的靶序列(4 个拷贝)与 D4R 的 3'末端融合
33-(SE)hNIS-E9LmiR100t	33-(SE)hNIS	p33NCE9L-miR100t	(SE)hNIS 插入 TK; miR-100 的靶序列(4 个拷贝)与 E9L 的 3'末端融合
33-(SE)hNIS-E9Llet7ct	33-(SE)hNIS	p33NCE9L-let7ct	(SE)hNIS 插入 TK; Let-7c 的靶序列(4 个拷贝)与 E9L 的 3'末端融合
33ΔF14.5L	# 33	p33NC, F14.5L	F14.5L, 灭活
33-(H5)anti-PD-L1	# 33	p33NCF14.5L-H5 抗 PD-L1	(H5) 抗 PD-L1 插入 PD14.5L
33-(SE)hNISΔF14.5L	33-(SE)hNIS	p33NC, F14.5L	(SE) hNIS 插入 TK; F14.5L 灭活
33-(SE)hNIS-(H5)anti-PD- L1	33-(SE)hNIS	p33NCF14.5L-H5 抗 PD-L1	(SE) hNIS 插入 TK; (H5) 抗 PD-L1 插入 PD14.5L

#### 实施例6. 嵌合痘病毒组合物及其用途

申请人最近开发了新型溶瘤嵌合痘病毒, 使用其独特的方法产生病毒嵌合体, 然后在NCI-60细胞系和胰腺细胞系中进行高通量筛选。这些新型嵌合痘病毒利用多种亲本病毒的最佳靶向潜力, 与目前在人类临床试验中的亲本病毒和溶瘤病毒相比, 在70多种癌细胞系中显示出优异的杀肿瘤活性。在人类三阴性乳腺癌、胰腺癌和肺癌异种移植模型中, 新型嵌合痘病毒可以通过单次肿瘤内注射低至1000个噬斑形成单位的病毒来缩小肿瘤, 而没有明显的副作用。这比临床测试中的大多数溶瘤病毒低2-5个对数。此外, 嵌合痘病毒有效地从经注射的肿瘤扩散到未经注射的肿瘤, 导致优秀的远位效应(未经注射的远端肿瘤的缩小)。

为了帮助监测体外和体内的病毒感染和复制, 将Emerald (GFP的变体)、mCherry (红色荧光蛋白) 和萤火虫荧光素酶表达盒插入嵌合痘病毒中。这些光学成像基因的表达易于检测, 因此极大地有助于监测病毒在体内复制和扩散而不显著影响病毒复制和效力。

用治疗基因武装溶瘤病毒是一种广泛接受的改善溶瘤病毒抗肿瘤有效性的策略。在所有测试的治疗基因中, 人钠碘共输送体(hNIS)在临床前和临床研究中都显示出很大的希望。hNIS是存在于甲状腺滤泡细胞基底外侧表面的膜结合糖蛋白。它促进碘转运到细胞

质中,在甲状腺激素合成过程中它被有机化(organificate)。该分子已成功用于在分化型甲状腺癌的成像和治疗中积累放射性碘,产生高应答和治愈率(>90%)。已将hNIS表达盒插入嵌合痘病毒中以将非甲状腺癌转化为“甲状腺样”癌症,预期其对放射性碘或铼-188疗法有应答。因此,转化为“甲状腺样”癌症后的非甲状腺癌将使用放射性碘变得可成像,并且可能被至少三种机制破坏:溶瘤病毒的内在溶瘤活性、靶向放射疗法和由溶瘤病毒和放射疗法介导的抗肿瘤免疫应答。申请人已经表明,在用表达hNIS的嵌合痘病毒感染后,hNIS在肿瘤细胞的细胞膜上正确表达。此外,初始实验结果表明,hNIS表达盒的插入不影响体外和动物模型中亲本病毒的内在溶瘤活性。此外,申请人已经表明,表达hNIS的嵌合痘病毒在携带肿瘤的小鼠中是安全的。

免疫检查点抑制剂代表了治疗实体瘤的突破性药物,并已被批准用于治疗黑素瘤、非小细胞肺癌和肾细胞癌。这些药物需要预先存在的抗肿瘤免疫应答。通过溶瘤病毒引发免疫系统会使患者的免疫库变得敏感,从而更有利于抗PD-1/PD-L1和抗-CTLA-4疗法。将溶瘤病毒与免疫检查点抑制剂结合可以克服诱导免疫耐受的多种免疫途径。此外,溶瘤病毒促进细胞毒性CD8 T细胞向经感染的肿瘤的浸润,并通过IFN- $\gamma$ 的活化产生细胞毒性CD8 T细胞诱导CTLA-4或PD-L1的上调,从而允许抗-CTLA-4和抗PD-1/PD-L1疗法达到其最大治疗潜力。来自几项临床前研究的数据支持将溶瘤病毒疗法与检查点阻断组合。评估第一批FDA批准的溶瘤病毒T-VEC与抗-CTLA-4和抗-PD-1抗体的组合的临床试验正在进行中。初步结果令人鼓舞。为了增强由嵌合痘病毒,特别是表达hNIS的嵌合痘病毒引发的抗肿瘤免疫应答,将抗PD-L1表达盒插入嵌合痘病毒或表达hNIS的嵌合痘病毒中。申请人预计将hNIS插入溶瘤病毒使放射性碘与受感染的肿瘤细胞的核医学成像协同性杀伤肿瘤细胞,在同一载体中表达免疫刺激转基因(如抗PD-L1)将极大地增强抗肿瘤免疫应答而潜在地降低目标的自身免疫毒性。

#### 实施例7. 用溶瘤病毒疗法靶向胰腺癌

##### 细胞毒性测定

通过在100 $\mu$ L RPMI 5% FBS、1% 抗生素-抗真菌溶液中以 $3 \times 10^3$ 个癌细胞每孔铺板24小时,对癌细胞系Panc-1(图12A-12B)、MiaPaCa-2(图12C-12D)、BxPC-3(图12E-12F)、SU.86.86(图12G-图12H)、Capan-1(图12I-12J)和AsPC-1(图12K-12L)进行细胞毒性测定。然后以感染复数(MOI)1、0.1和0.01加入20 $\mu$ L病毒(#33、OncovEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189)。通过向所有孔中加入20 $\mu$ LCel11Titer 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay并在孵育1小时后进行比色读数来进行每日细胞活力测定。实验结果以仅培养基和MOI 0对照标准化。该实验重复三次。在每个时间点使用单因素方差分析比较#33与其他实验组进行统计分析。对于SU.86.86,在每个MOI使用非配对t检验进行统计分析。

##### 病毒生长曲线

通过在2mL RPMI 10% FBS、1% 抗生素-抗真菌溶液中以 $5 \times 10^5$ 个细胞每孔铺板细胞24小时,重复三次,对癌细胞系Panc-1(图13A-13B)、MiaPaCa-2(图13C-13D)、BxPC-3(图13E-13F)、SU.86.86(图13G-13H)、Capan-1(图13I-13J)和AsPC-1(图13K-13L)做病毒复制曲线。然后吸出培养基并在500 $\mu$ L RPMI 2.5% FBS、1% 抗生素-抗真菌溶液中以感染复数(MOI)0.01加入#33、OncovEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189,持续1小时,每20分钟摇动。在1小时时,吸出培养基并加入1.5mL RPMI 2.5% FBS、1% 抗生素-抗真菌溶液。在24、48和72小时,收集

细胞和上清液，并在三次冷冻和解冻循环后，进行连续稀释，重复两次。重复该实验两次。在每个时间点使用单因素方差分析比较#33与其他实验组进行统计分析。

#### 在体内治疗胰腺癌肿瘤

18只无胸腺Nude-Foxn1<sup>nu</sup>雌性裸鼠(Envigo, Indianapolis, IN)植入了 $2 \times 10^6$ 个MiaPaCa-2的双侧腹肿瘤。一旦肿瘤尺寸达到 $400\text{mm}^3$ ，左侧肿瘤以大约 $1 \times 10^5$  PFU/剂注射 $50\mu\text{L}$  PBS(3只小鼠)、#33(5只小鼠)、#33-(SE) hNIS或#33-(SE) hNIS-E9LmiR100t(5只小鼠)。HOV-33的实际剂量为 $7.8 \times 10^4$ 。HOV-33-SE/hNIS的实际剂量为 $4.5 \times 10^4$ 。HOV-33-SE/hNIS-E9L-miR100t的实际剂量为 $1.6 \times 10^5$ 。每周两次记录净重量变化百分比和经注射的肿瘤和未经注射的肿瘤的变化百分比，持续43天(图14A-14C)。在第43天处死所有小鼠并对小鼠器官进行病毒滴定。当PBS对照与#33、#33-(SE) hNIS和#33-(SE) hNIS-E9LmiR100t相比时，注意到经注射的肿瘤的显著差异(图14B；分别为 $p=0.01$ ,  $p=0.01$ , 和 $p=0.0001$ )。仅在PBS对照和#33-(SE) hNIS之间的未经注射的肿瘤组中注意到显著差异(图14C;  $p=0.03$ )。

二十六只无胸腺Nude-Foxn1<sup>nu</sup>雌性裸鼠(Envigo, Indianapolis, IN)植入了 $1.25 \times 10^6$ 个Panc-1的双侧腹肿瘤。一旦肿瘤尺寸达到约 $250\text{mm}^3$ ，左侧肿瘤以约 $1 \times 10^3$ PFU/剂注射 $50\mu\text{L}$  PBS(4只小鼠)、#33(6只小鼠)、#33-(SE) hNIS(6只小鼠)、#33-(SE) hNIS-E9LmiR100t(5只小鼠)或#33-(H5)Fluc2。HOV-33的实际剂量为 $8.6 \times 10^2$ 。HOV-33-SE/hNIS的实际剂量为 $6.3 \times 10^2$ 。HOV-33-H5Fluc的实际剂量为 $1 \times 10^4$ 。HOV-33-SE/hNIS-E9L-miR100t的实际剂量为 $1.0 \times 10^3$ 。每周两次记录净重量变化百分比和经注射的和未经注射的肿瘤的变化百分比，持续43天(图15A-15C)。所有小鼠在45天处死。当PBS对照与所有组相比时，注意到经注射的肿瘤体积变化百分比的显著差异(图15B;  $p=0.0001$ )。当PBS对照与#33、#33-(H5)Fluc2和#33-(SE) hNIS-E9LmiR100t相比时，注意到未经注射的肿瘤的显著差异(图15C；分别为 $p=0.003$ ,  $p=0.008$ ,  $p=0.002$ )。

每周两次，一只PBS对照小鼠和3只经#33-(H5)Fluc2注射的小鼠腹膜内注射在 $150\mu\text{L}$  PBS中的 $4.28\text{mg}$ 荧光素。7分钟后，在标准暴露下获得荧光素酶成像。在每个时间点记录相对单位，并相对于PBS对照小鼠作为背景进行分析(图16)。

#### 实施例8.用溶瘤病毒疗法靶向结肠癌

##### 细胞毒性测定

通过在 $100\mu\text{L}$  McCoy's 5A培养基、5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液中以 $3 \times 10^3$ /孔铺板细胞24小时，对HT-29(图17A-17B)和HCT-116(图17C-17D)癌细胞系进行细胞毒性测定。然后以感染复数(MOI)1、0.1和0.01加入 $20\mu\text{L}$ 病毒(#33、OncovEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189)。通过向所有孔中加入 $20\mu\text{L}$  Cell Titer 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay并在孵育1小时后进行比色读数来进行每日细胞活力测定。实验结果以仅培养基和MOI 0对照标准化。该实验重复三次。在每个时间点使用单因素方差分析比较#33与其他实验组进行统计分析。

通过在 $100\mu\text{L}$  RPMI、5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液中以 $3 \times 10^3$ /孔铺板细胞24小时，对SW620(图18A-18B)、SW480(图18C-18D)和COLO 320DM(图18E-F)癌细胞系进行细胞毒性测定。然后以感染复数(MOI)1、0.1和0.01加入 $20\mu\text{L}$ 病毒(#33、OncovEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189)。通过向所有孔中加入 $20\mu\text{L}$  Cell Titer 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay并在孵育1小时后进行比色读数来进行每日细胞活力测定。实验结果

以仅培养基和MOI 0对照标准化。该实验重复三次。每个时间点使用单因素方差分析比较#33与其他实验组进行统计分析。

通过在100 $\mu$ L F-12K培养基、5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液中以 $3 \times 10^3$ /孔铺板细胞24小时,对LoVo(图19A-19B)癌细胞系进行细胞毒性测定。然后以感染复数(MOI)1、0.1和0.01加入20 $\mu$ L病毒(#33、OncoVEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189)。通过向所有孔中加入20 $\mu$ L Cell Titer 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay并在孵育1小时后进行比色读数来进行每日细胞活力测定。实验结果以仅培养基和MOI 0对照标准化。该实验重复三次。在每个时间点使用单因素方差分析比较#33与其他实验组进行统计分析。

#### 病毒生长曲线

通过在2mL McCoy's 5A培养基10%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液中以 $5 \times 10^5$ 个细胞/孔铺板细胞24小时,重复三次,对HT-29(图20A-20B)和HCT-116(图20C-20D)癌细胞系进行病毒复制曲线。然后吸出培养基并在500 $\mu$ L McCoy's 5A培养基、2.5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液中以感染复数(MOI)0.01加入#33、#33-(SE)hNIS、#33-(H5)Emerald、OncoVEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189达1小时,每20分钟摇动。在1小时时,吸出培养基并加入1.5mL McCoy's 5A培养基2.5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液。在24、48和72小时,收集细胞和上清液,并在三次冷冻和解冻循环后,进行连续稀释,重复两次。重复该实验两次。在每个时间点使用单因素方差分析比较#33与其他实验组进行统计分析。

通过在2mL RPMI 10%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液中以 $5 \times 10^5$ 个细胞/孔铺板细胞24小时,重复三次,对SW620(图21A-21B)和SW480(图21C-21D)癌细胞系进行病毒复制曲线。然后吸出培养基并在500 $\mu$ L RPMI 2.5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液中以感染复数(MOI)0.01加入#33、#33-(SE)hNIS、#33-(H5)Emerald、OncoVEX<sup>GFP</sup>、GLV-1h68或#189达1小时,每20分钟摇动。在1小时时,吸出培养基并加入1.5mL RPMI 2.5%FBS、1%抗生素-抗真菌溶液。在24、48和72小时,收集细胞和上清液,并在三次冷冻和解冻循环后,进行连续稀释,重复两次。重复该实验两次。在每个时间点使用单因素方差分析比较#33与其他实验组进行统计分析。

#### HCT-116#33-(SE)hNIS免疫组织化学

#33-(SE)hNIS的体外成像在HCT-116中在24、48和72小时以MOI为1、0.1和0.01进行。将 $2 \times 10^5$ 个HCT 116细胞加入到8室载玻片的每个孔中的500 $\mu$ L 10%FBS McCoy's 5A培养基中。孵育24小时后吸出培养基,并向每个孔中的200 $\mu$ L 2.5%FBS McCoy's 5A培养基中以适当的MOI加入#33-(SE)hNIS。1小时后,吸出培养基,并用PBS洗涤细胞两次。用1mL 10% FBS McCoy's 5A培养基替换培养基。在24、48或72小时后,吸出培养基。在室温下用4%多聚甲醛固定15分钟。然后用PBS洗涤两次。用0.1%Triton X-100的PBS在冰上进行渗透5分钟。再次用PBS洗涤细胞。然后将载玻片在TNB封闭缓冲液在37°C孵育30分钟(TNB封闭缓冲液:0.1M Tris-HCl、PH7.5、0.15NaCl和0.5%Blocking Reagent-Perkin Elmer,cat FP1020)。在TNB封闭缓冲液中加入以1:50稀释的小鼠抗人碘钠共输送体(hNIS)抗体(ab 17795)并在4°C孵育过夜。然后用PBS洗涤载玻片两次,并然后在TNB封闭缓冲液中加入以1:100稀释的山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor 488)(ab150113)并在室温孵育1小时。然后用PBS洗涤细胞两次。在TNB中加入以1:200稀释的兔抗痘苗(ab35219)并在4°C孵育过夜。然后用PBS洗涤细胞两次。用TNB封闭30分钟。接下来,加入1:100稀释的山羊抗兔二抗,并在室温放置1小

时。用PBS洗涤两次后,在室温加入1:1000稀释的DAPI 5分钟。再次用PBS进行洗涤。使用EVOS自动细胞成像系统拍摄图像(图22)。

#### HT-29#33- (SE) hNIS免疫组织化学

#33- (SE) hNIS的体外成像在HCT-29中在24、48和72小时以MOI为1、0.1和0.01进行。将 $2 \times 10^5$ 个HCT 116细胞加入到8室载玻片的每个孔中的500 $\mu\text{L}$  10% FBS McCoy's 5A培养基中。孵育24小时后吸出培养基,并向每个孔中的200 $\mu\text{L}$  2.5% FBS McCoy's 5A培养基中以适当的MOI加入#33- (SE) hNIS。1小时后,吸出培养基,用PBS洗涤细胞两次。用1mL 10% FBS McCoy's 5A培养基替换培养基。在24、48或72小时后,吸出培养基。在室温下用4%多聚甲醛固定15分钟。然后用PBS洗涤两次。用0.1% Triton X-100的PBS在冰上进行渗透5分钟。再次用PBS洗涤细胞。然后将载玻片在TNB封闭缓冲液中在37°C孵育30分钟(TNB封闭缓冲液:0.1M Tris-HCl、PH7.5、0.15NaCl和0.5% Blocking Reagent-Perkin Elmer, cat FP1020)。在TNB封闭缓冲液中加入以1:50稀释的小鼠抗人碘钠共输送体(hNIS)抗体(ab 17795)并在4°C孵育过夜。然后用PBS洗涤载玻片两次,然后在TNB封闭缓冲液中加入以1:100稀释的山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor 488)(ab150113)并在室温孵育1小时。然后用PBS洗涤细胞两次。在TNB中加入以1:200稀释的免抗痘苗(ab35219)并在4°C孵育过夜。然后用PBS洗涤细胞两次。用TNB封闭30分钟。接下来,加入1:100稀释的山羊抗兔二抗,并在室温放置1小时。用PBS洗涤两次后,在室温加入1:1000稀释的DAPI 5分钟。再次用PBS进行洗涤。使用EVOS自动细胞成像系统拍摄图像(图23)。

#### 体内治疗结肠癌肿瘤

14只无胸腺Nude-Foxn1<sup>nu</sup>雌性裸鼠(Envigo, Indianapolis, IN)植入了 $5 \times 10^6$ 个HT-29的双侧腹肿瘤。一旦肿瘤尺寸达到200mm<sup>3</sup>,双侧肿瘤以大约 $1 \times 10^5$  PFU/剂注射50 $\mu\text{L}$  PBS(4只小鼠)、#33(5只小鼠)、或#33- (H5)Fluc2(5只小鼠)。每周两次记录净重量变化百分比和经注射的肿瘤和未经注射的肿瘤的变化百分比,持续42天。10天后处死各组的两只小鼠,并对器官进行病毒滴定和IHC。在第42天处死所有剩余的小鼠并对小鼠器官进行病毒滴定。当PBS对照与#33(3只小鼠)和#33- (H5)Fluc2相比时,注意到肿瘤体积变化百分比的显著差异(分别为p=0.02和p=0.03)(图24)。

每周两次,一只PBS对照小鼠和3只经#33- (H5)Fluc2注射的小鼠腹膜内注射在150 $\mu\text{L}$  PBS中的4.28mg荧光素。7分钟后,在标准暴露下获得荧光素酶成像。在每个时间点记录相对单位,并相对于PBS对照小鼠作为背景进行分析(图25)。

19只无胸腺Nude-Foxn1<sup>nu</sup>雌性裸鼠(Envigo, Indianapolis, IN)植入了 $5 \times 10^6$ 个HT-116的双侧腹肿瘤。一旦肿瘤尺寸达到200mm<sup>3</sup>,双侧肿瘤以大约 $1 \times 10^5$  PFU/剂注射50 $\mu\text{L}$  PBS(2只小鼠)、#33(3只小鼠)、#33- (SE) hNIS或#33- (H5)Fluc2。每周两次记录净重量变化百分比和经注射的肿瘤和未经注射的肿瘤的变化百分比,持续42天。10天后处死各组的两只小鼠,并对器官进行病毒滴定和IHC。在第42天处死所有剩余的小鼠并对小鼠器官进行病毒滴定。当PBS对照与#33(3只小鼠)、#33- (SE) hNIS和#33- (H5)Fluc2相比时,注意到肿瘤体积变化百分比的显著差异(图26;分别为p=0.0002、p=0.0001和p=0.0002)。

每周两次,一只PBS对照小鼠和3只经#33- (H5)Fluc2注射的小鼠腹膜内注射在150 $\mu\text{L}$  PBS中的4.28mg荧光素。7分钟后,在标准暴露下获得荧光素酶成像。在每个时间点记录相对单位,并相对于PBS对照小鼠作为背景进行分析(图27)。

### 实施例9.用溶瘤病毒疗法靶向肺癌

#### 细胞毒性测定

感染后72小时,在肺癌和肺成纤维细胞中溶瘤病毒介导的细胞毒性。将5000个A549细胞、H2199细胞或HF1成纤维细胞铺板在96孔板的每个孔中。第二天,以所示的感染复数(MOI;0、0.001、0.01、0.1、1MOI)用不同的病毒感染细胞或空白感染细胞。使用的病毒是#33、#33-(H5) Emerald、#189、GLV-1h68和OncovEX<sup>GFP</sup>。在感染后72小时使用Cell Titer 96AQ<sub>ueous</sub> One Solution(Promega;Cat#G3581)测定细胞活力。相对于空白感染细胞的存活率,计算经感染的细胞A549(图28A)、H2199(图28B)和HF1成纤维细胞(图28C)的存活率。

#### 体内治疗肺癌肿瘤

将人肺癌细胞A549培养、用胰蛋白酶处理、用PBS洗涤,并以1:1重悬于PBS和基质胶中,得到每100μL 5×10<sup>6</sup>个细胞。将100μL细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧,每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组(n=3),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积(~200mm<sup>3</sup>)。分选后,只有每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射10<sup>3</sup>个噬斑形成单位(PFU)的#33-(H5) Emerald、GLV1h68或OncovEX<sup>GFP</sup>。所有3种病毒编码绿色荧光蛋白(GFP)的基因。使用小动物成像设备(LagoX成像系统)每周两次对小鼠的绿色荧光(激发:465和发射:530nm)成像,并在AMIView图像处理软件上处理图像(图29)。

小鼠重量。将人肺癌细胞A549培养、用胰蛋白酶处理、用PBS洗涤,并以1:1重悬于PBS和基质胶中,得到每100μL 5×10<sup>6</sup>个细胞。将100μL细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧,每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组(n=4或5),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积(~200mm<sup>3</sup>)。分选后,只有每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射了10<sup>3</sup>PFU的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68, OncovEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹膜内注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。将小鼠每周称重两次并测定其重量的变化百分比(图30)。在图30中,每条线代表单个小鼠的重量。

肿瘤消退。将人肺癌细胞A549培养、用胰蛋白酶处理、用PBS洗涤,并以1:1重悬于PBS和基质胶中,得到每100μL 5×10<sup>6</sup>个细胞。将100μL细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧,每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组(n=4或5),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积(~200mm<sup>3</sup>)。分选后,只有每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射了10<sup>3</sup>PFU的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68, OncovEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹膜内注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。使用数字卡尺每周两次测量经注射(图31A)和未经注射(图31B)的肿瘤体积(体积={(长度)<sup>2</sup>×宽度/2})。在图31A和31B中,每条线代表个体小鼠的肿瘤体积。

A549异种移植模型中经病毒注射的肿瘤体积。将人肺癌细胞A549培养、用胰蛋白酶处理、用PBS洗涤,并以1:1重悬于PBS和基质胶中,得到每100μL 5×10<sup>6</sup>个细胞。将100μL细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧,每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周,将小鼠分成不同的处理组(n=4或5),以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积(~200mm<sup>3</sup>)。分选后,只有每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射了10<sup>3</sup>PFU的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68, OncovEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹膜内注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。使用数字卡尺每周两次测量肿瘤体积(体积={(长度)<sup>2</sup>×宽度/2})。在图32中,每条线代表在具有标准偏差的各个治疗组中随时间经注射的肿瘤的平均体积。统计学

分析:第24天的单因素方差分析(\*=p<0.05)。

A549异种移植模型中未经注射肿瘤的体积。将人肺癌细胞A549培养、用胰蛋白酶处理、用PBS洗涤，并以1:1重悬于PBS和基质胶中，得到每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧，每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周，将小鼠分成不同的处理组(n=4或5)，以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积(~200mm<sup>3</sup>)。分选后，只有每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射了10<sup>3</sup>PFU的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹膜内注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。在图33中，每条线代表具有标准偏差的各个治疗组中未经注射的肿瘤随时间的平均体积。统计学分析:第24天的单因素方差分析(\*=p<0.05)。

经注射和未经注射肿瘤体积的倍数变化。将人肺癌细胞A549培养、用胰蛋白酶处理、用PBS洗涤，并以1:1重悬于PBS和基质胶中，得到每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧，每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周，将小鼠分成不同的处理组(n=4或5)，以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积(~200mm<sup>3</sup>)。分选后，只有每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射了10<sup>3</sup>PFU的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>、#189、PBS对照)或腹膜内注射(i.p.)#33-(H5) Emerald。使用数字卡尺每周两次测量肿瘤体积(体积={(长度)<sup>2</sup>×宽度/2})。通过在不同时间点的肿瘤体积相对于病毒注射时(即第0天)的肿瘤体积标准化来计算肿瘤体积的倍数变化。每条线代表具有标准偏差的各个治疗组的经注射(图34A)和未经注射(图34B)的肿瘤体积的平均倍数变化。统计学分析:第24天的单因素方差分析(\*=p<0.05)。

经注射和未经注射肿瘤中病毒的生物学分布(A549模型)。将人肺癌细胞A549培养、用胰蛋白酶处理、用PBS洗涤，并以1:1重悬于PBS和基质胶中，得到每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧，每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周，将小鼠分成不同的处理组(n=3)，以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积(~200mm<sup>3</sup>)。分选后，只有每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射了10<sup>3</sup>PFU的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>)。病毒注射后6天，收获肿瘤以及正常器官。将收获的组织称重，切成小块并使用Bullet Blender Gold匀浆器在1ml PBS中匀浆。将匀浆物进行3轮冻融循环，然后进行1分钟超声处理。将匀浆物以1000rpm离心3分钟并收集上清液。将上清液连续稀释，并使用标准噬斑测定法测定病毒滴度。图35A显示了针对每种病毒的经注射肿瘤中的病毒滴度PFU/g，且图35B显示了针对每种病毒的未经注射肿瘤中的病毒滴度PFU/g。

小鼠卵巢中的病毒滴度(A549型)。将人肺癌细胞A549培养、用胰蛋白酶处理、用PBS洗涤，并以1:1重悬于PBS和基质胶中，得到每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧，每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周，将小鼠分成不同的处理组(n=3)，以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积(~200mm<sup>3</sup>)。分选后，只有每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射了10<sup>3</sup>PFU的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>)。病毒注射后6天，收获肿瘤以及正常器官。将收获的组织称重，切成小块并使用Bullet Blender Gold匀浆器在1ml PBS中匀浆。将匀浆物进行3轮冻融循环，然后进行1分钟超声处理。将匀浆物以1000rpm离心3分钟并收集上清液。将上清液连续稀释，并使用标准噬斑测定法测定病毒滴度。图36显示了每种病毒的组织(卵巢)的病毒滴

度PFU/g。\*\*ND表示未检测到病毒。

病毒注射后20天血液中的病毒滴度。将人肺癌细胞A549培养、用胰蛋白酶处理、用PBS洗涤，并以1:1重悬于PBS和基质胶中，得到每100 $\mu$ L  $5 \times 10^6$ 个细胞。将100 $\mu$ L细胞悬浮液皮下注射到无胸腺裸鼠上腹侧的每一侧，每只小鼠产生2个肿瘤。肿瘤细胞注射后3周，将小鼠分成不同的处理组(n=3)，以便在每组中获得相似的平均肿瘤体积( $\sim 200\text{mm}^3$ )。分选后，只有每只小鼠的右侧肿瘤在肿瘤内注射了10<sup>3</sup>PFU的所示病毒(#33、#33-(H5) Emerald、GLV-1h68、OncoVEX<sup>GFP</sup>、T-VEC<sup>TM</sup>)。通过面部静脉穿刺从小鼠(n=3)收集血液。在3次冷冻-解冻循环后，连续稀释血液并使用标准噬斑测定法测定病毒滴度(图37)。\*\*ND表示未检测到病毒。

### 参考文献

- [0001] 1.Chen NG&Szalay AA (2011) Oncolytic virotherapy of cancer.Cancer Management in Man:Chemotherapy,Biological Therapy,Hyperthermia and Supporting Measures,Cancer Growth and Progression,ed Minev BR(Springer,New York) ,Vol 13, pp 295-316.
- [0002] 2.Chen NG&Szalay AA(2010)Oncolytic vaccinia virus:a theranostic agent for cancer.Future Virol.5(6):763-784.
- [0003] 3.Andtbacka RH,et al.(2015)Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma.J Clin Oncol 33 (25) :2780-2788.
- [0004] 4.Anonymous (2015)First Oncolytic Viral Therapy for Melanoma.Cancer discovery.
- [0005] 5.Russell SJ,Peng KW,&Bell JC (2012) Oncolytic virotherapy.Nat Biotechnol 30(7):658-670.
- [0006] 6.Thorne SH,et al. (2007) Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum,systemically effective oncolytic poxvirus,JX-963.J Clin Invest 117(11):3350-3358.
- [0007] 7.Yu W&Fang H(2007) Clinical trials with oncolytic adenovirus in China.Curr Cancer Drug Targets 7(2):141-148.
- [0008] 8.Evgin L,et al. (2010) Potent Oncolytic Activity of Raccoonpox Virus in the Absence of Natural Pathogenicity.Mol Ther.
- [0009] 9.Rintoul JL,et al. (2012) ORFV:a novel oncolytic and immune stimulating parapoxvirus therapeutic.Mol Ther 20(6):1148-1157.
- [0010] 10.Chan WM&McFadden G (2014) Oncolytic Poxviruses.Annu Rev Virol 1(1) :119-141.
- [0011] 11.Wahba,H.A.and H.A.El-Hadaad,Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer.Cancer Biol Med,2015.12(2):p.106-16.
- [0012] 12.Curigliano,G.and A.Goldhirsch,The triple-negative subtype:new ideas for the poorest prognosis breast cancer.J Natl Cancer Inst Monogr,

2011.2011(43):p.108-10.

[0013] 13.Bianchini,G.,et al.,Triple-negative breast cancer:challenges and opportunities of aheterogeneous disease.Nat Rev Clin Oncol,2016.13(11):p.674-690.

[0014] 14.Migali,C.,et al.,Strategies to modulate the immune systemin breast cancer:checkpoint inhibitors and beyond.Ther Adv Med Oncol,2016.8(5):p.360-74.

[0015] 15.Gholami,S.,et al.,A novel vaccinia virus with dual oncolytic and anti-angiogenic therapeutic effects against triple-negative breast cancer.Breast Cancer Res Treat,2014.148(3):p.489-99.

[0016] 16.Dent,R.,et al.,Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer.Breast Cancer Res Treat,2009.115(2):p.423-8.

[0017] 17.Liedtke,C.,et al.,Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer.J Clin Oncol,2008.26(8):p.1275-81.

[0018] 18.Andtbacka,R.C.,M;Li,A;Shilkrut,M;Ross,MI,Phase 2,multicenter, randomized,open-label trial assessing efficacy and safety of talimogene laherparepvec (T-VEC) neoadjuvant treatment plus surgery vs surgery for resectable stage IIIB/C and IVM1a melanoma.J Clin Oncol,2015.33:TPS9094.

[0019] 19.Anderson,B.D.,et al.,High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus.Cancer Res,2004.64(14):p.4919-26.

[0020] 20.Kaufman,H.L.,F.J.Kohlhapp, and A.Zloza,Oncolytic viruses:a new class of immunotherapy drugs.Nat Rev Drug Discov,2015.14(9):p.642-62.

[0021] 21.Wang,G.,et al.,Infection of human cancer cells with myxoma virus requires Akt activation via interaction with a viral ankyrin-repeat host range factor.Proc Natl Acad Sci U S A,2006.103(12):p.4640-5.

[0022] 22.Benencia,F.,et al.,HSV oncolytic therapy upregulates interferon-inducible chemokines and recruits immune effector cells in ovarian cancer.Mol Ther,2005.12(5):p.789-802.

[0023] 23.Gauvrit,A.,et al.,Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response.Cancer Res,2008.68(12):p.4882-92.

[0024] 24.Guillerme,J.B.,et al.,Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells.Clin Cancer Res,2013.19(5):p.1147-58.

[0025] 25.Haen,S.P.and H.G.Rammensee,The repertoire of human tumor-associated epitopes--identification and selection of antigens and their application in clinical trials.Curr Opin Immunol,2013.25(2):p.277-83.

- [0026] 26.Tang,D.,et al.,PAMPs and DAMPs:signal Os that spur autophagy and immunity.Immunol Rev,2012.249(1):p.158-75.
- [0027] 27.Fiebig,H.H.,et al.,Inactivated orf virus(Parapoxvirus ovis) induces antitumoral activity in transplantable tumor models.Anticancer Res,2011.31(12):p.4185-90.
- [0028] 28.Rintoul,J.L.,et al.,ORFV:a novel oncolytic and immune stimulating parapoxvirus therapeutic.Mol Ther,2012.20(6):p.1148-57.
- [0029] 29.Robinson,A.J.and G.V.Petersen,Orf virus infection of workers in the meat industry.N ZMed J,1983.96(725):p.81-5.
- [0030] 30.Fachinger,V.,et al.,Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes.J Virol,2000.74(17):p.7943-51.
- [0031] 31.Friebe,A.,et al.,Characterization of immunostimulatory components of orf virus(parapoxvirus ovis).J Gen Virol,2011.92(Pt 7):p.1571-84.
- [0032] 32.Horton RM,Ho SN,Pullen JK,Hunt HD,Cai Z,Pease LR.Gene splicing by overlap extension.Methods in enzymology.1993;217:270-9.Epub 1993/01/01.PubMed PMID:8474334.
- [0033] 33.Falkner FG,Moss B.Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses.J Virol.1990;64(6):3108-11.Epub 1990/06/01.PubMed PMID:2159565.

#### P实施方案

实施方案P1.一种嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包含来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段:牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

实施方案P2.实施方案P1的嵌合痘病毒,其中所述核酸序列具有至少80%的序列相同性。

实施方案P3.实施方案P1或P2的嵌合痘病毒,其中所述核酸序列具有至少85%的序列相同性。

实施方案P4.实施方案P1-P3之一的嵌合痘病毒,其中所述核酸序列具有至少90%的序列相同性。

实施方案P5.实施方案P1-P4之一的嵌合痘病毒,其中所述核酸序列具有至少95%的序列相同性。

实施方案P6.实施方案P1-P5之一的嵌合痘病毒,其中所述核酸序列具有至少98%的序列相同性。

实施方案P7.实施方案P1-P6之一的嵌合痘病毒,其中所述核酸片段来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS。

实施方案P8.实施方案P1-P6之一的嵌合痘病毒,其中所述核酸片段来自羊传染性

口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

实施方案P9. 实施方案P1的嵌合痘病毒, 其中所述嵌合痘病毒通过以下方法形成:

(i) 用至少两种选自以下的痘病毒株感染细胞: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; 以及(ii) 使所述至少两个痘病毒株复制, 从而形成嵌合痘病毒。

实施方案P10. 实施方案P9的嵌合痘病毒, 其中所述细胞用牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS感染。

实施方案P11. 实施方案P9的嵌合痘病毒, 其中所述细胞用羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS感染。

实施方案P12. 实施方案P1-P11之一的嵌合痘病毒, 其中所述嵌合痘病毒是溶瘤病毒。

实施方案P13. 实施方案P1-P12之一的嵌合痘病毒, 其中所述痘病毒包含miRNA结合序列。

实施方案P14. 实施方案P13的嵌合痘病毒, 其中所述miRNA结合序列形成所述嵌合痘病毒的DNA聚合酶基因的一部分。

实施方案P15. 分离的核酸, 其编码实施方案P1-P14之一的嵌合痘病毒。

实施方案P16. 药物组合物, 其包含治疗有效量的实施方案P1-P14之一的嵌合痘病毒。

实施方案P17. 一种治疗有此需要的对象的癌症的方法, 所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的实施方案P1-P14之一的嵌合痘病毒, 从而治疗所述对象的癌症。

实施方案P18. 实施方案P17的方法, 其中所述癌症是乳腺癌、结肠癌、肾癌、白血病、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、肝癌、胃癌或肉瘤。

实施方案P19. 实施方案P17或P18的方法, 其中所述施用包括施用第一嵌合痘病毒和第二嵌合痘病毒。

实施方案P20. 实施方案P19的方法, 其中所述第一嵌合痘病毒包含与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列, 并且其中所述核酸序列包含来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段。

实施方案P21. 实施方案P19或P20的方法, 其中所述第二嵌合痘病毒包含与SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列, 并且其中所述核酸序列包含来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

实施方案P22. 实施方案P19-P21之一的方法, 其中所述第一嵌合痘病毒和所述第二嵌合痘病毒以组合的协同量施用。

实施方案P23. 实施方案P19-P22之一的方法, 其中所述第一嵌合痘病毒和所述第二嵌合痘病毒同时施用。

实施方案P24. 实施方案P19-P22之一的方法, 其中所述第一嵌合痘病毒和所述第

二嵌合痘病毒顺序施用。

实施方案P25. 实实施方案P19-P24之一的方法,其中所述痘病毒以至少 $10^4$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案P26. 实实施方案P19-P25之一的方法,其中所述痘病毒以至少 $10^6$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案P27. 实实施方案P19-P26之一的方法,其中所述痘病毒以约 $10^8$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案P28. 一种形成嵌合痘病毒的方法,所述方法包括: (i) 用至少两种选自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的痘病毒株感染细胞;以及 (ii) 使所述至少两个痘病毒株复制,从而形成所述嵌合痘病毒。

实施方案P29. 实实施方案P28的方法,其中所述至少两个痘病毒株各自以小于约1的感染复数存在。

实施方案P30. 实实施方案P28或P29的方法,其中所述至少两个痘病毒株各自以小于约0.1的感染复数存在。

实施方案P31. 实实施方案P28-P30之一的方法,其中所述至少两个痘病毒株各自以约0.01的感染复数存在。

实施方案P32. 实实施方案P28的方法,其中所述细胞用牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS感染。

实施方案P33. 实实施方案P28的方法,其中所述细胞用羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS感染。

实施方案P34. 实实施方案P28-P33之一的方法,其中所述嵌合痘病毒是溶瘤病毒。

实施方案P35. 实实施方案P28-P34之一的方法,其中所述痘病毒包含miRNA结合序列。

实施方案P36. 一种抑制细胞的细胞增殖的方法,所述方法包括使细胞与实施方案P1-P14之一的嵌合痘病毒接触。

实施方案P37. 实实施方案P36的方法,其中所述细胞是癌细胞。

实施方案P38. 实实施方案P37的方法,其中所述癌细胞是乳腺癌细胞、结肠癌细胞、肾癌细胞、白血病细胞、肺癌细胞、黑素瘤细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、胰腺癌细胞、脑癌细胞、肝癌细胞、胃癌细胞或肉瘤细胞。

#### 实施方案

实施方案1. 一种嵌合痘病毒,其包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列,其中所述核酸序列包含: (i) 来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段:牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; (ii) 一种或多种抗癌核酸序列;或 (iii) 编码可检测部分的核酸序列。

实施方案2. 实施方案1的嵌合痘病毒, 其中所述核酸序列包含: (i) 来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; 以及(ii)一种或多种抗癌核酸序列。

实施方案3. 实施方案1或2的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列形成所述嵌合痘病毒的非必需基因的一部分。

实施方案4. 实施方案3的嵌合痘病毒, 其中所述非必需基因是胸昔激酶基因。

实施方案5. 实施方案3的嵌合痘病毒, 其中所述非必需基因是F14.5L基因。

实施方案6. 实施方案1-5之一的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列独立地编码PD-L1抑制剂或钠碘共输送体。

实施方案7. 实施方案6的嵌合痘病毒, 其中所述PD-L1抑制剂是抗PD-L1 scFv。

实施方案8. 实施方案1-7之一的嵌合痘病毒, 其中部分所述非必需基因缺失。

实施方案9. 实施方案1-8之一的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列各自与启动子可操作地连接。

实施方案10. 实施方案9的嵌合痘病毒, 其中所述启动子是痘苗病毒早期启动子。

实施方案11. 实施方案9或10的嵌合痘病毒, 其中所述启动子是合成的早期启动子。

实施方案12. 实施方案9的嵌合痘病毒, 其中所述启动子是痘苗病毒晚期启动子。

实施方案13. 实施方案9或12的嵌合痘病毒, 其中所述启动子是H5启动子或11K启动子。

实施方案14. 实施方案1-8之一的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列与所述嵌合痘病毒的必需基因可操作地连接。

实施方案15. 实施方案1-14之一的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列与所述嵌合痘病毒的DNA聚合酶基因可操作地连接。

实施方案16. 实施方案1-15之一的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列与所述嵌合痘病毒的DNA聚合酶基因的3'末端可操作地连接。

实施方案17. 实施方案1-16之一的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列与尿嘧啶DNA糖基化酶基因可操作地连接。

实施方案18. 实施方案1-17之一的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列与尿嘧啶DNA糖基化酶基因的3'末端可操作地连接。

实施方案19. 实施方案1-18之一的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列独立地编码miRNA结合序列。

实施方案20. 实施方案19的嵌合痘病毒, 其中所述miRNA结合序列是miR100结合序列或let7c结合序列。

实施方案21. 实施方案1-20之一的嵌合痘病毒, 其中所述一种或多种抗癌核酸序列是第一抗癌核酸序列和第二抗癌核酸序列。

实施方案22. 实施方案21的嵌合痘病毒, 其中所述第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体, 且所述第二抗癌核酸序列编码miRNA结合序列。

实施方案23. 实施方案22的嵌合痘病毒, 其中所述第一抗癌核酸序列形成胸昔激酶基因的一部分, 并且所述第二抗癌核酸序列与尿嘧啶DNA糖基化酶基因可操作地连接。

实施方案24. 实施方案22的嵌合痘病毒, 其中所述第一抗癌核酸序列形成胸昔激酶基因的一部分, 并且所述第二抗癌核酸序列与DNA聚合酶基因可操作地连接。

实施方案25. 实施方案21的嵌合痘病毒, 其中所述第一抗癌核酸序列编码钠碘共输送体, 且所述第二抗癌核酸序列编码PD-L1抑制剂。

实施方案26. 实施方案25的嵌合痘病毒, 其中所述第一抗癌核酸序列形成胸昔激酶基因的一部分, 并且所述第二抗癌核酸序列形成F14.5L基因的一部分。

实施方案27. 实施方案1的嵌合痘病毒, 其中所述核酸序列包含: (i) 来自至少两种选自以下痘病毒株的核酸片段: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; 以及 (ii) 所述编码可检测部分的核酸序列。

实施方案28. 实施方案27的嵌合痘病毒, 其中所述编码可检测部分的核酸序列编码荧光部分。

实施方案29. 实施方案27或28的嵌合痘病毒, 其中所述编码可检测部分的核酸序列形成所述嵌合痘病毒的非必需基因的一部分。

实施方案30. 实施方案29的嵌合痘病毒, 其中所述非必需基因是胸昔激酶基因。

实施方案31. 实施方案29或30的嵌合痘病毒, 其中部分所述非必需基因缺失。

实施方案32. 实施方案27-31之一的嵌合痘病毒, 其中所述编码可检测部分的核酸序列与启动子可操作地连接。

实施方案33. 实施方案32的嵌合痘病毒, 其中所述启动子是痘苗病毒早期启动子。

实施方案34. 实施方案33的嵌合痘病毒, 其中所述启动子是合成的早期启动子。

实施方案35. 实施方案32的嵌合痘病毒, 其中所述启动子是痘苗病毒晚期启动子。

实施方案36. 实施方案35的嵌合痘病毒, 其中所述启动子是H5启动子或11K启动子。

实施方案37. 实施方案1-36之一的嵌合痘病毒, 其中所述核酸序列具有至少80%的序列相同性。

实施方案38. 实施方案1-37之一的嵌合痘病毒, 其中所述核酸序列具有至少85%的序列相同性。

实施方案39. 实施方案1-38之一的嵌合痘病毒, 其中所述核酸序列具有至少90%的序列相同性。

实施方案40. 实施方案1-39之一的嵌合痘病毒, 其中所述核酸序列具有至少95%的序列相同性。

实施方案41. 实施方案1-40之一的嵌合痘病毒, 其中所述核酸序列具有至少98%的序列相同性。

实施方案42. 实施方案1-41之一的嵌合痘病毒, 其中所述核酸片段来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS。

实施方案43. 实施方案1-41之一的嵌合痘病毒, 其中所述核酸片段来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS。

实施方案44. 实施方案1-43之一的嵌合痘病毒, 其中所述嵌合痘病毒通过以下方法形成: (i) 用至少两种选自以下痘病毒株感染细胞: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; 以及 (ii) 使所述至少两个痘病毒株复制, 从而形成嵌合痘病毒。

实施方案45. 实施方案44的嵌合痘病毒, 其中所述细胞用牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS感染。

实施方案46. 实施方案44的嵌合痘病毒, 其中所述细胞用羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS感染。

实施方案47. 实施方案1-46之一的嵌合痘病毒, 其中所述嵌合痘病毒是溶瘤病毒。

实施方案48. 实施方案1-47之一的嵌合痘病毒, 其中所述痘病毒包含miRNA结合序列。

实施方案49. 实施方案48的嵌合痘病毒, 其中所述miRNA结合序列形成所述嵌合痘病毒的DNA聚合酶基因的一部分。

实施方案50. 分离的核酸, 其编码实施方案1-49之一的嵌合痘病毒。

实施方案51. 药物组合物, 其包含治疗有效量的实施方案1-49之一的嵌合痘病毒。

实施方案52. 一种治疗有此需要的对象的癌症的方法, 所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的实施方案1-49之一的嵌合痘病毒, 从而治疗所述对象的癌症。

实施方案53. 实施方案52的方法, 其中所述癌症是乳腺癌、结肠癌、肾癌、白血病、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、脑癌、肝癌、胃癌或肉瘤。

实施方案54. 实施方案52或53的方法, 其中所述癌症是三阴性乳腺癌。

实施方案55. 实施方案52-54之一的方法, 其中所述施用包括施用第一嵌合痘病毒和第二嵌合痘病毒。

实施方案56. 实施方案55的方法, 其中所述第一嵌合痘病毒包含与SEQ ID NO:1具有至少70%序列相同性的核酸序列, 并且其中所述核酸序列包含来自牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS的核酸片段。

实施方案57. 实施方案55或56的方法, 其中所述第二嵌合痘病毒包含与SEQ ID NO:2具有至少70%序列相同性的核酸序列, 并且其中所述核酸序列包含来自羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS的核酸片段。

实施方案58. 实施方案55-57之一的方法, 其中所述第一嵌合痘病毒和所述第二嵌合痘病毒以组合的协同量施用。

实施方案59. 实施方案55-58之一的方法, 其中所述第一嵌合痘病毒和所述第二嵌合痘病毒同时施用。

实施方案60. 实施方案55-58之一的方法, 其中所述第一嵌合痘病毒和所述第二嵌

合痘病毒顺序施用。

实施方案61. 实实施方案52-60之一的方法, 其中所述痘病毒以至少 $10^3$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案62. 实实施方案52-61之一的方法, 其中所述痘病毒以约 $10^3$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案63. 实实施方案52-61之一的方法, 其中所述痘病毒以至少 $10^4$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案64. 实实施方案52-61之一的方法, 其中所述痘病毒以约 $4 \times 10^4$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案65. 实实施方案52-61之一的方法, 其中所述痘病毒以约 $5 \times 10^4$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案66. 实实施方案52-61之一的方法, 其中所述痘病毒以至少 $10^6$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案67. 实实施方案52-61之一的方法, 其中所述痘病毒以约 $10^8$ 个噬斑形成单位(Pfu)/kg施用。

实施方案68. 一种形成嵌合痘病毒的方法, 所述方法包括: (i) 用至少两种选自以下的痘病毒株感染细胞: 牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic、痘苗病毒株AS、羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS; 以及(ii) 使所述至少两个痘病毒株复制, 从而形成所述嵌合痘病毒。

实施方案69. 实实施方案68的方法, 其中所述至少两个痘病毒株各自以小于约1的感染复数存在。

实施方案70. 实实施方案68或69的方法, 其中所述至少两个痘病毒株各自以小于约0.1的感染复数存在。

实施方案71. 实实施方案68-70之一的方法, 其中所述至少两个痘病毒株各自以约0.01的感染复数存在。

实施方案72. 实实施方案68的方法, 其中所述细胞用牛痘病毒株Brighton、浣熊痘病毒株Herman、兔痘病毒株Utrecht、痘苗病毒株WR、痘苗病毒株IHD、痘苗病毒株Elstree、痘苗病毒株CL、痘苗病毒株Lederle-Chorioallantoic和痘苗病毒株AS感染。

实施方案73. 实实施方案68的方法, 其中所述细胞用羊传染性口疮病毒株NZ2和假牛痘病毒株TJS感染。

实施方案74. 实实施方案68-73之一的方法, 其中所述嵌合痘病毒是溶瘤病毒。

实施方案75. 实实施方案68-74之一的方法, 其中所述痘病毒包含miRNA结合序列。

实施方案76. 一种抑制细胞的细胞增殖的方法, 所述方法包括使细胞与实施方案1-49之一的嵌合痘病毒接触。

实施方案77. 实实施方案76的方法, 其中所述细胞是癌细胞。

实施方案78. 实实施方案77的方法, 其中所述癌细胞是乳腺癌细胞、结肠癌细胞、肾癌细胞、白血病细胞、肺癌细胞、黑素瘤细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、胰腺癌细胞、脑癌细胞、肝癌细胞、胃癌细胞或肉瘤细胞。

实施方案79. 实施方案77或78的方法, 其中所述癌细胞是三阴性乳腺癌细胞。

## NCI-60实体肿瘤细胞系

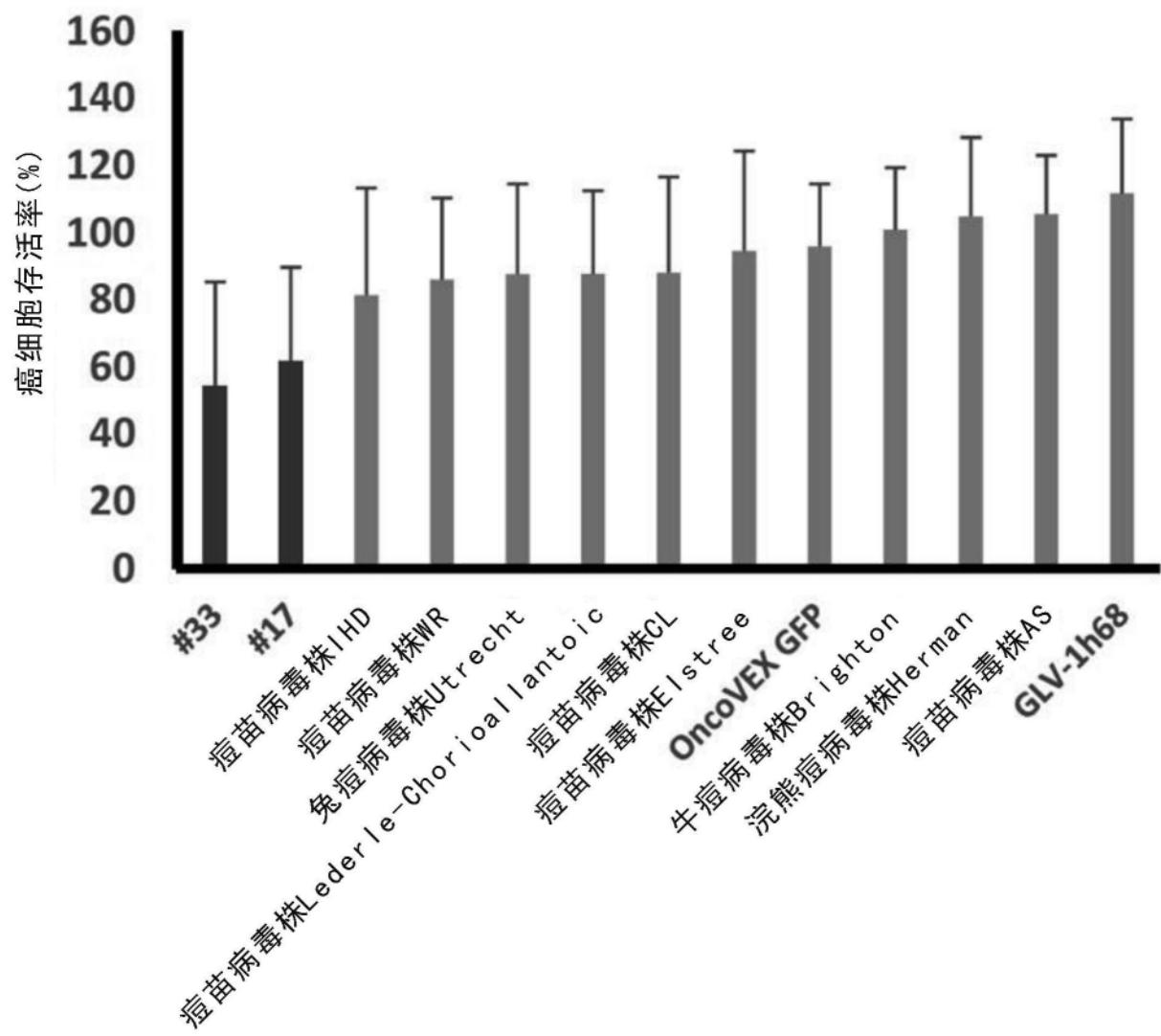


图1

## NCI-60实体肿瘤细胞系

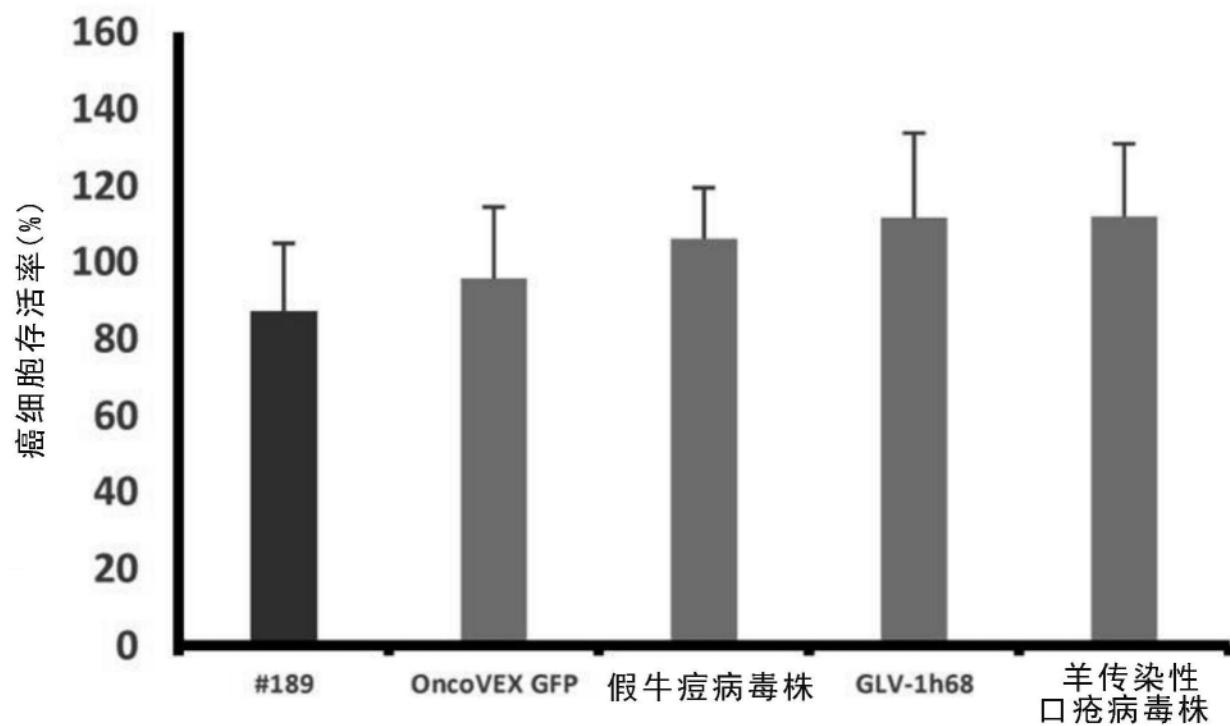


图2

## 胰腺癌细胞系

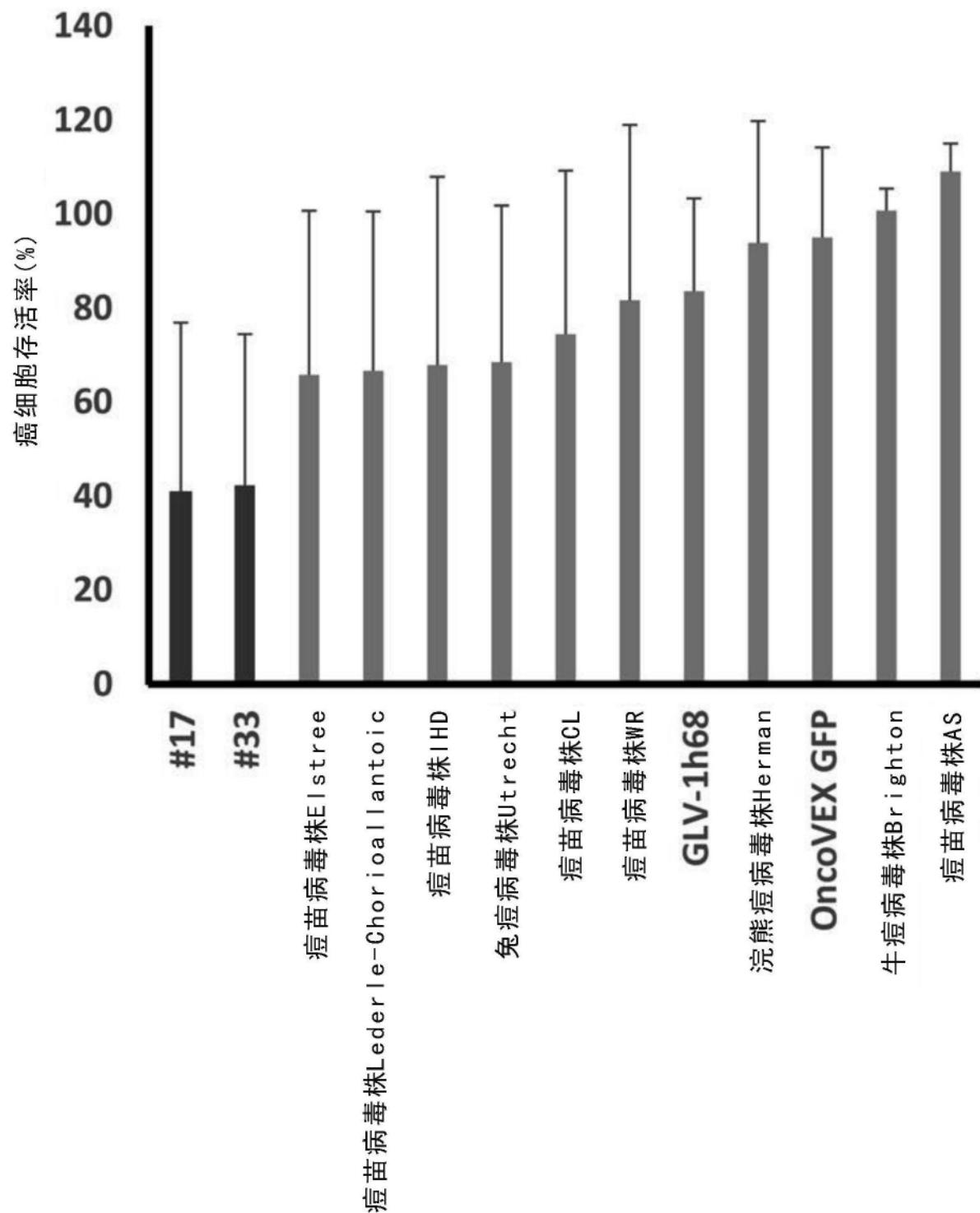


图3

## 胰腺癌细胞系

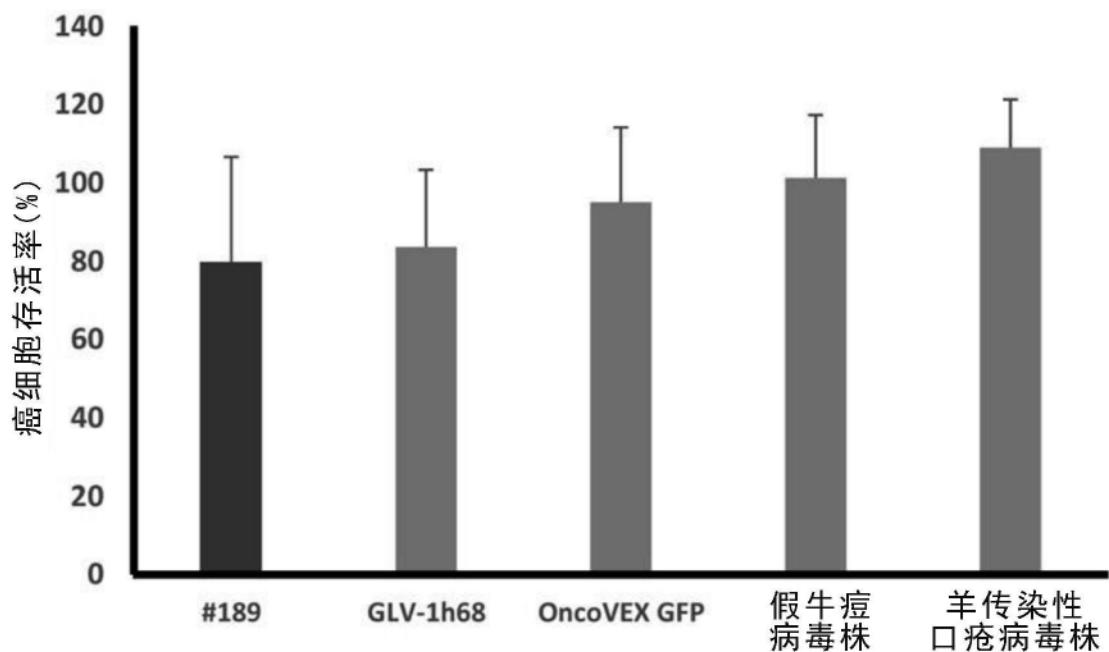


图4

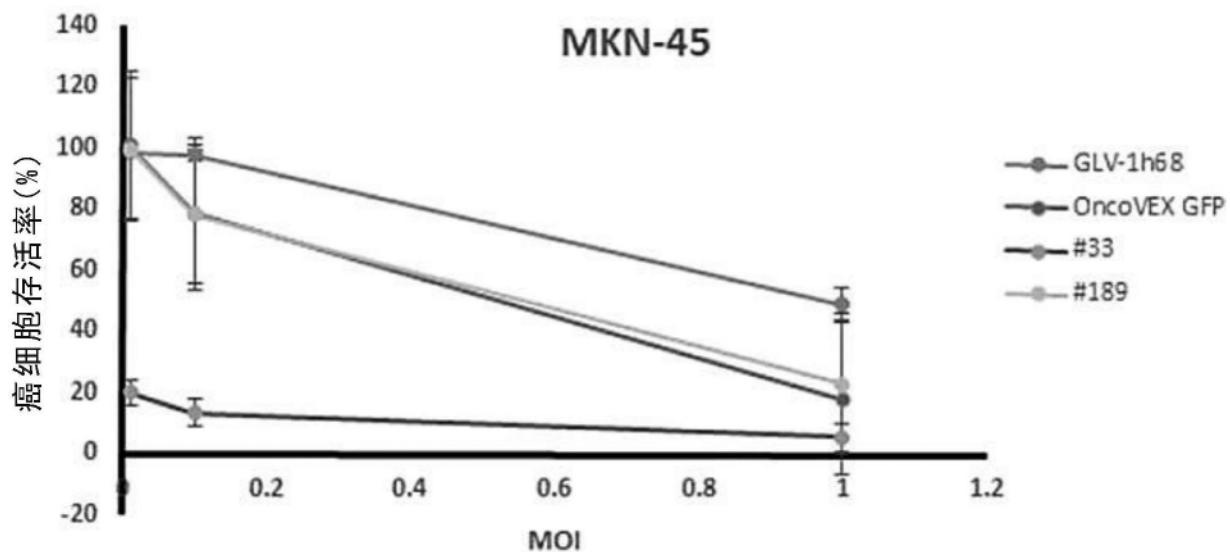


图5A

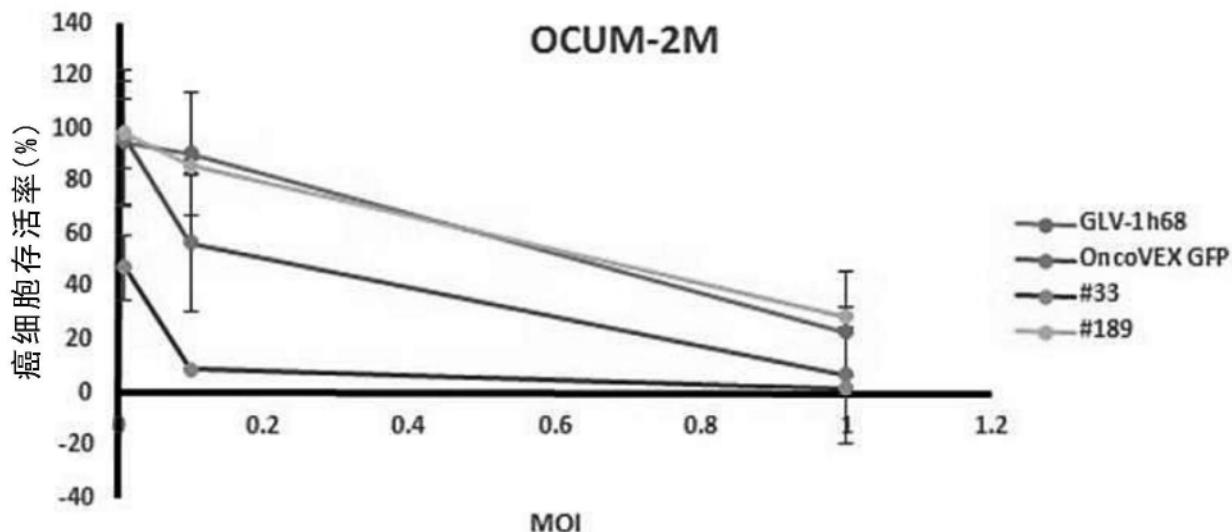


图5B

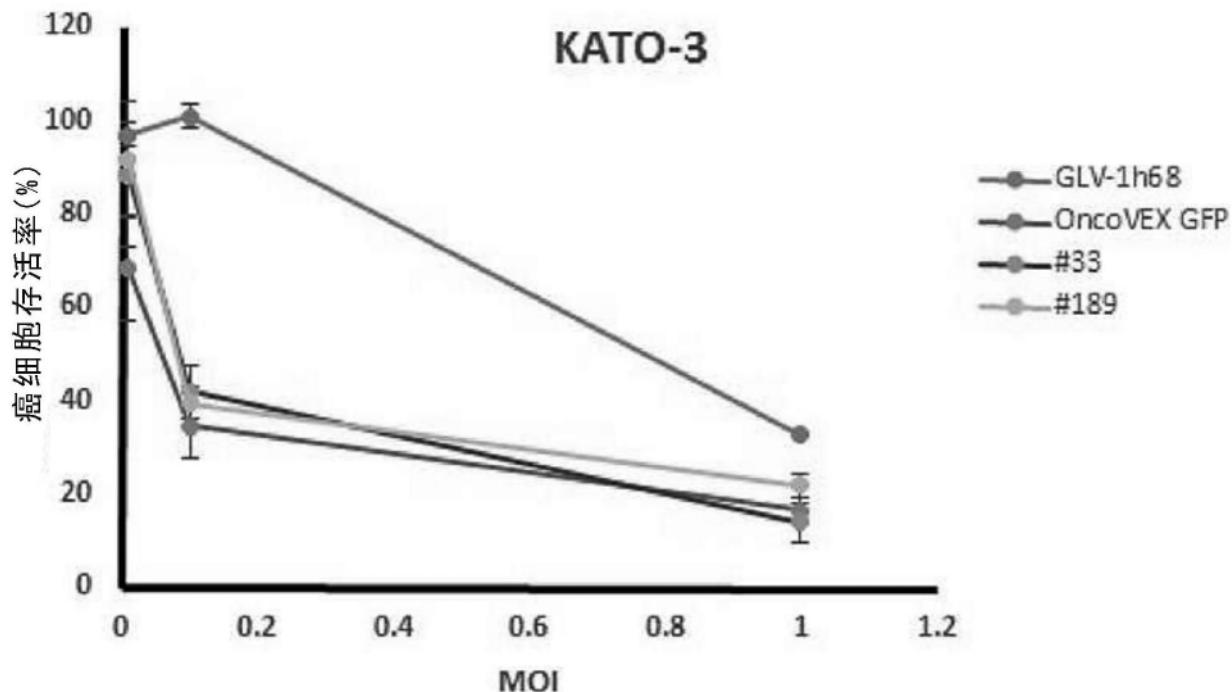


图5C

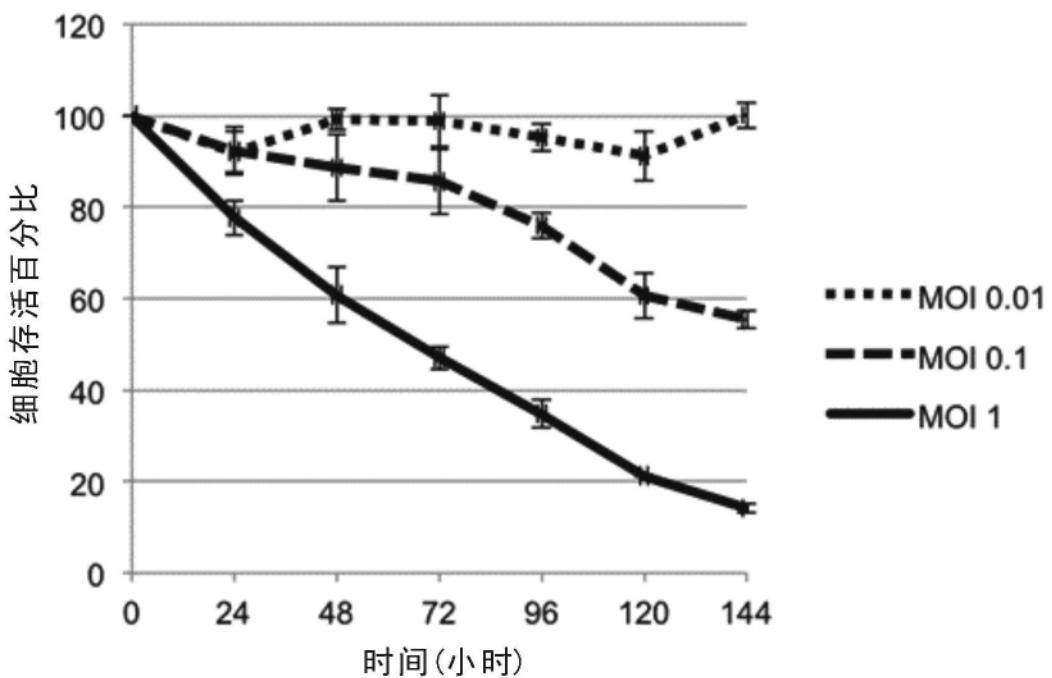
**Hs578T**

图6A

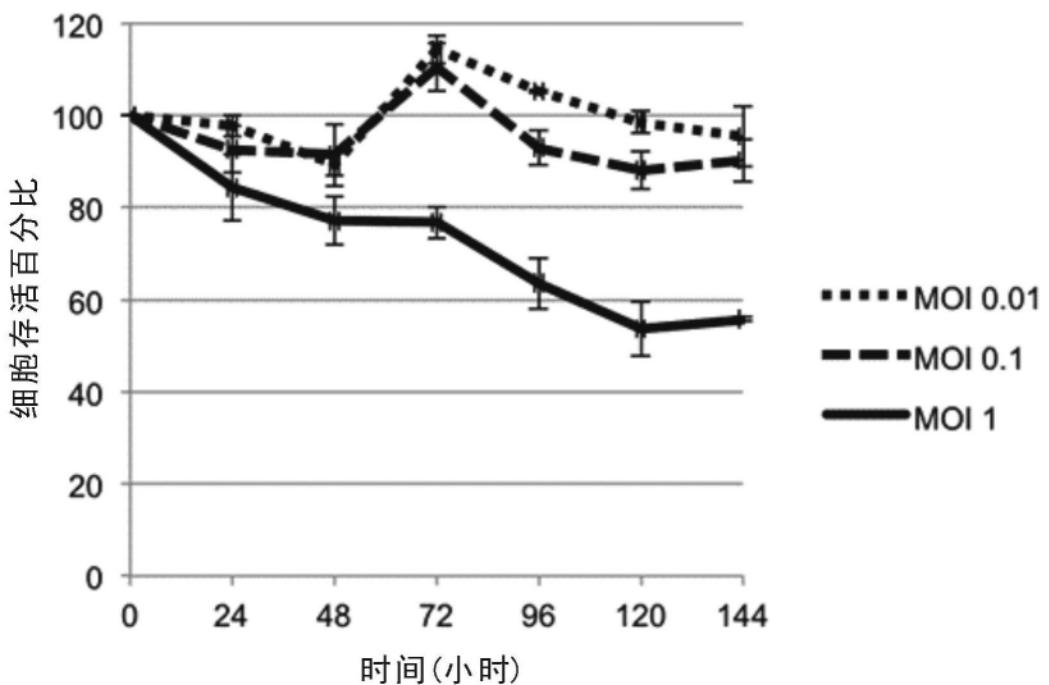
**BT549**

图6B

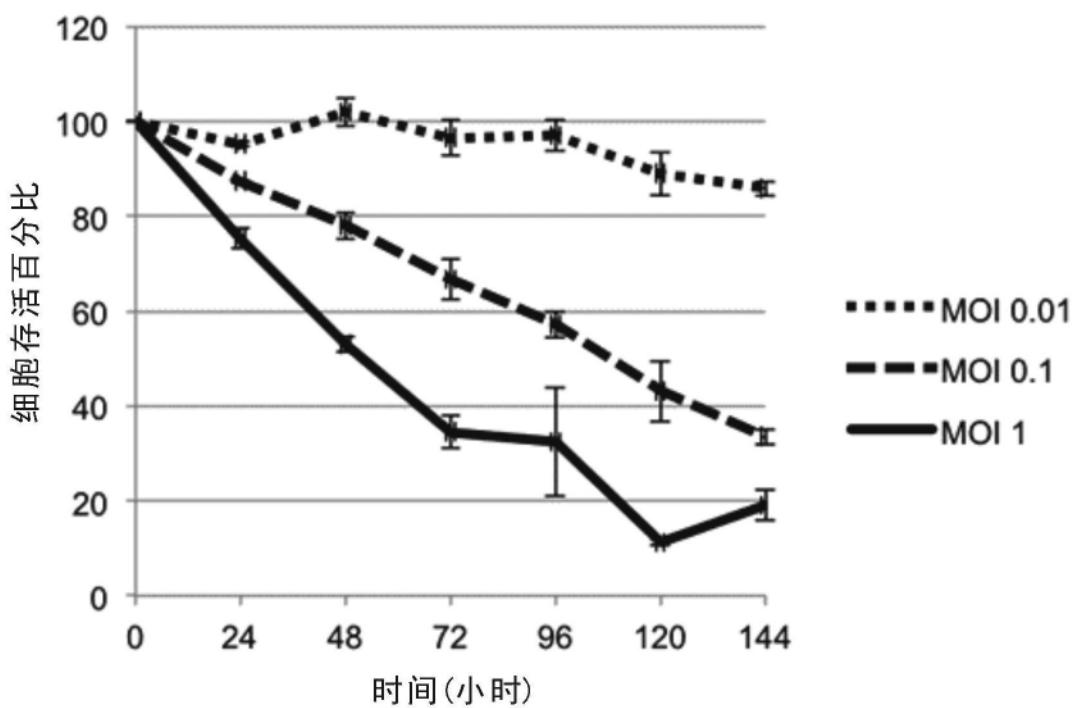
**MDA-MB-468**

图6C

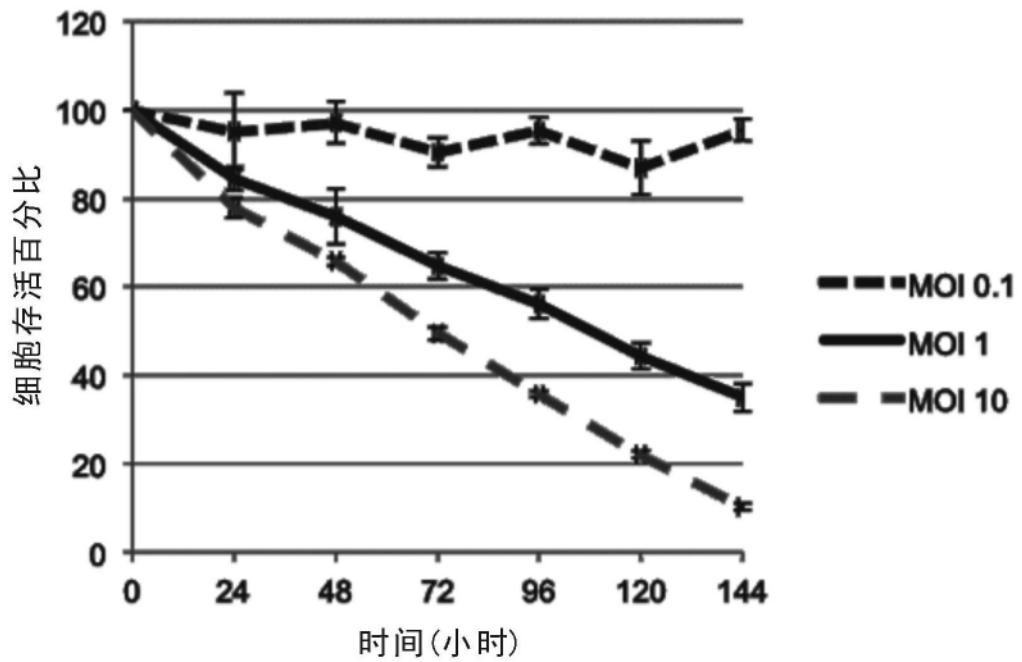
**MDA-MB-231**

图6D

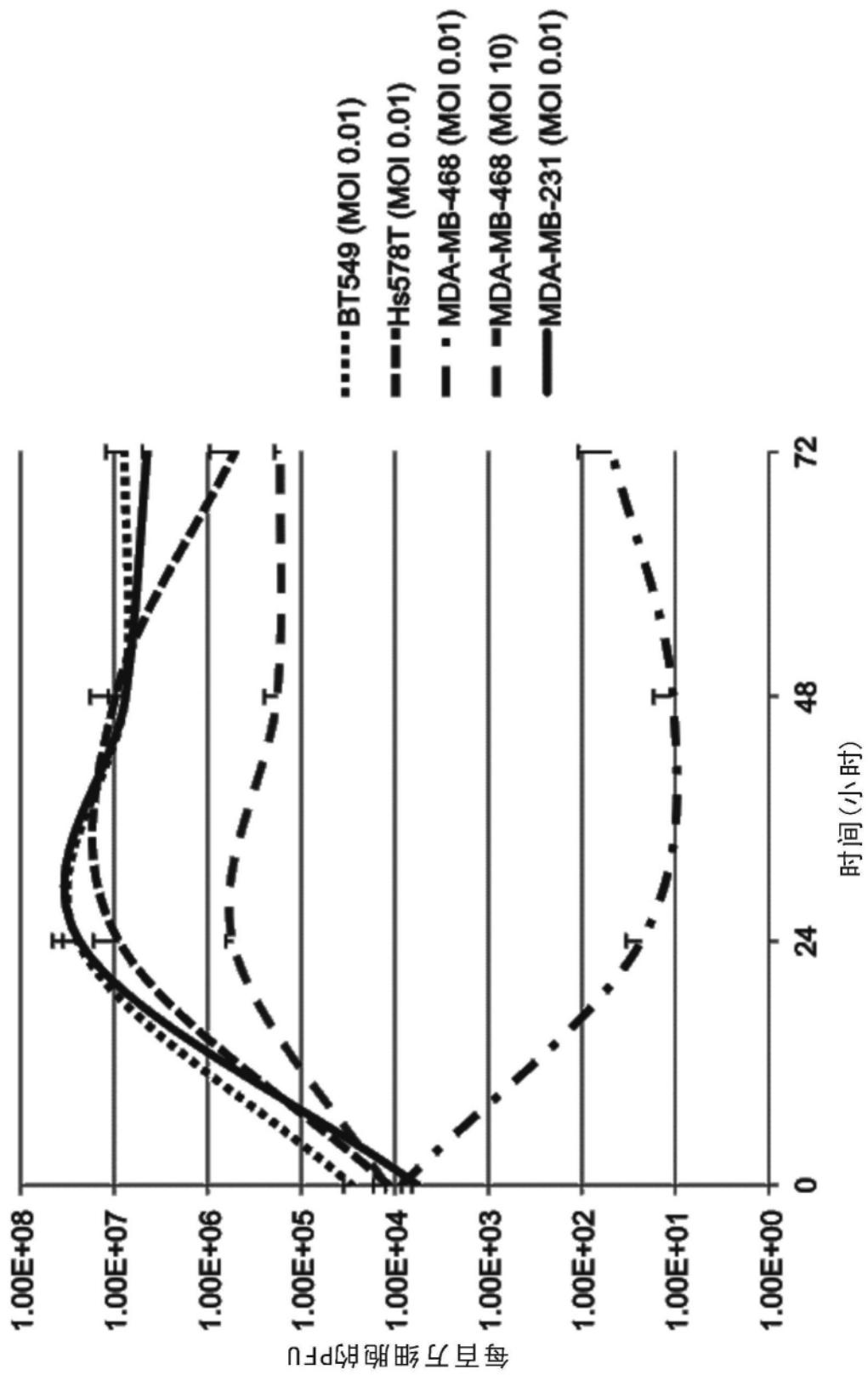


图7

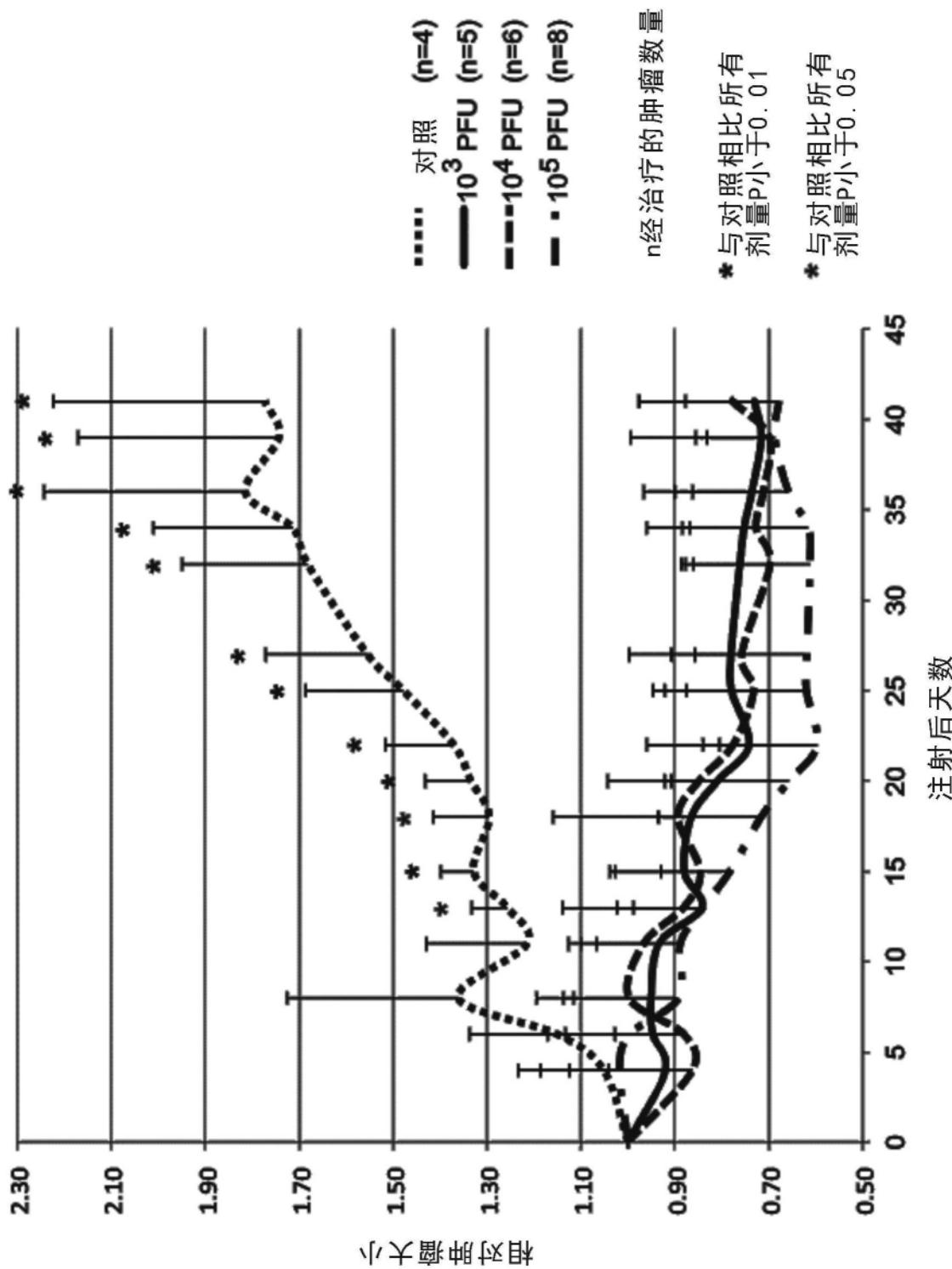


图8

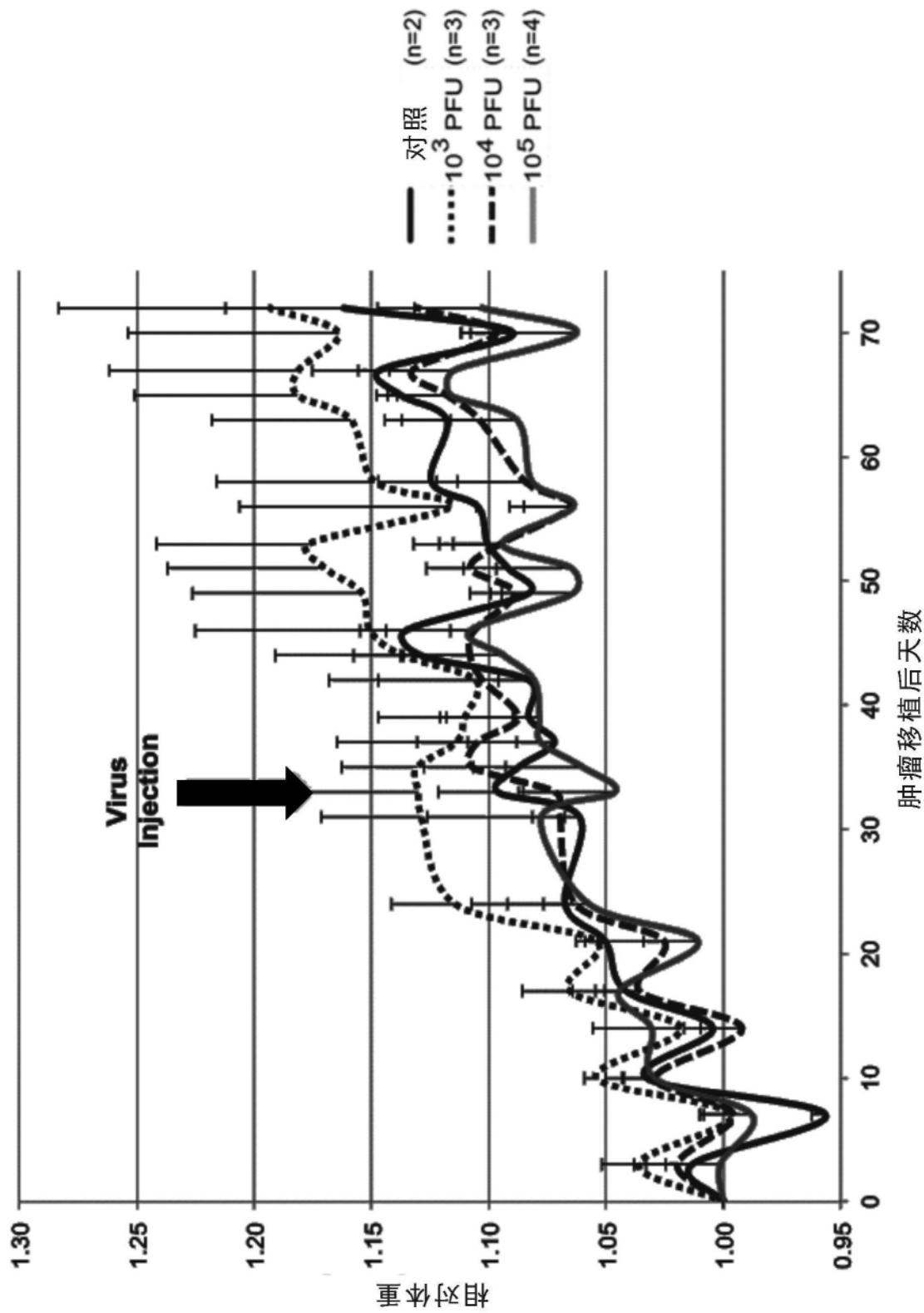


图9

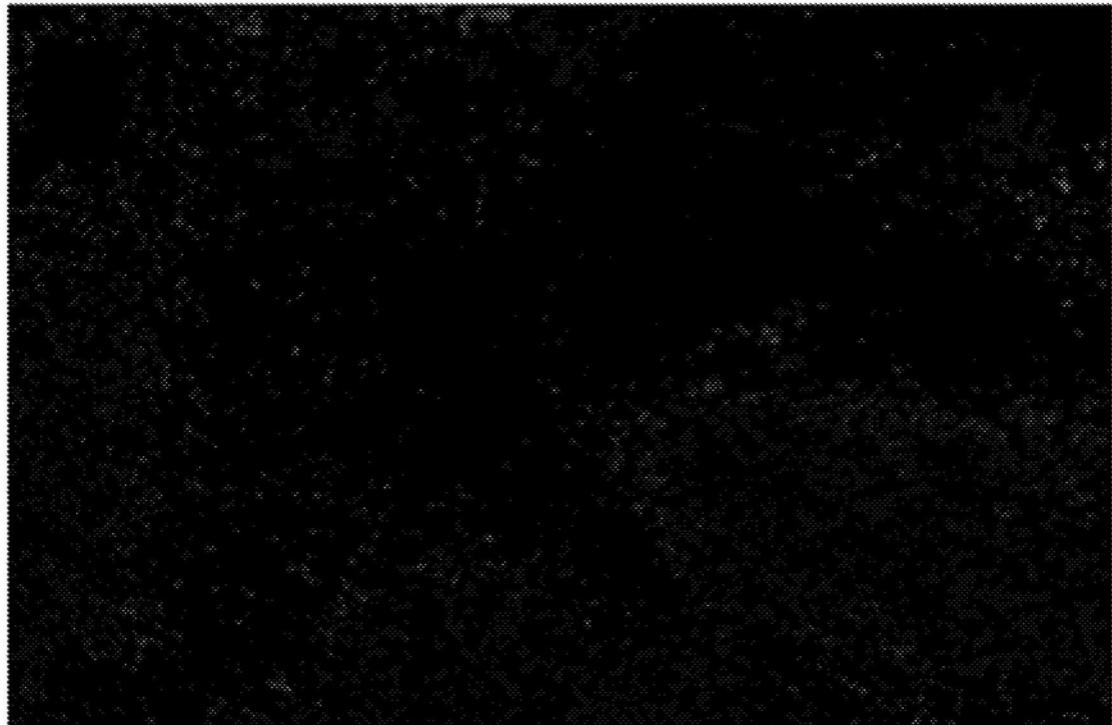


图10A



图10B



图10C

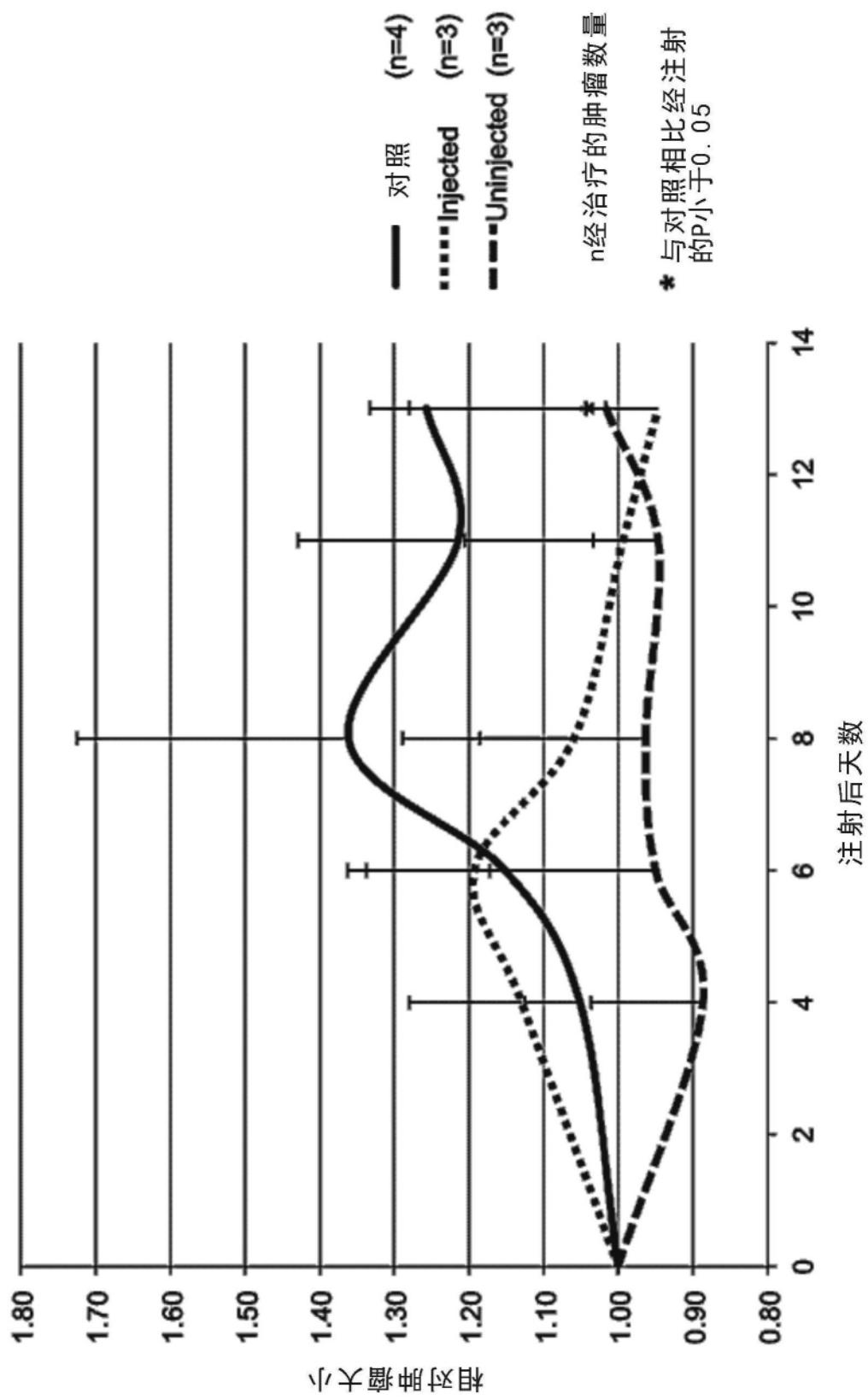


图11

#33对Panc-1的细胞毒性

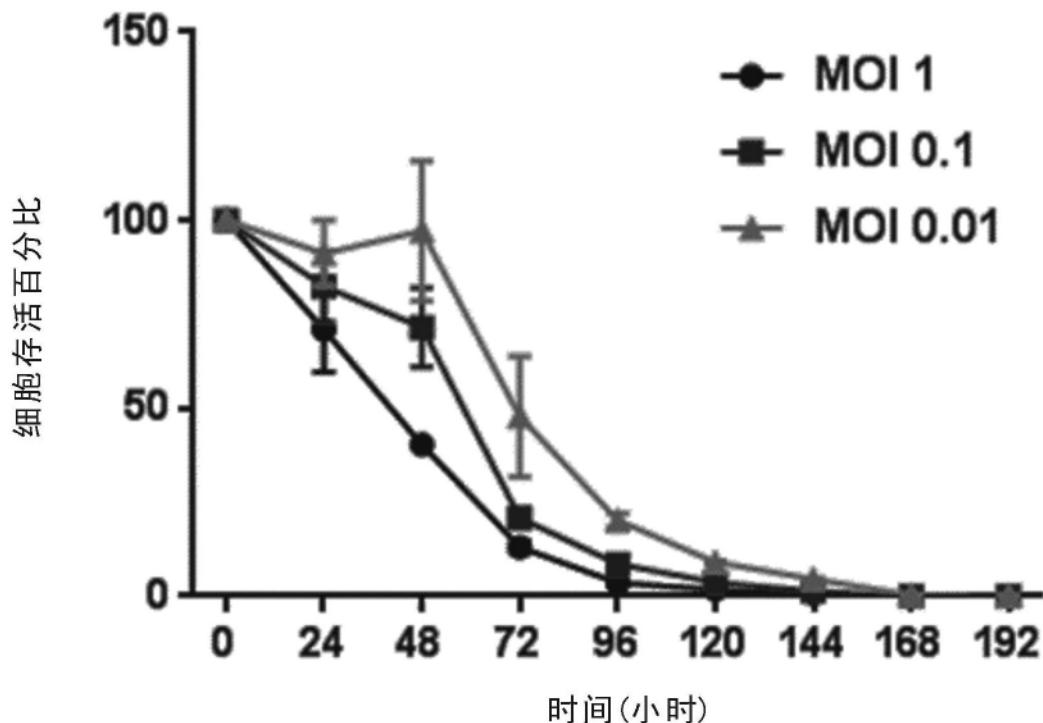


图12A

在120小时Panc-1的细胞毒性测定

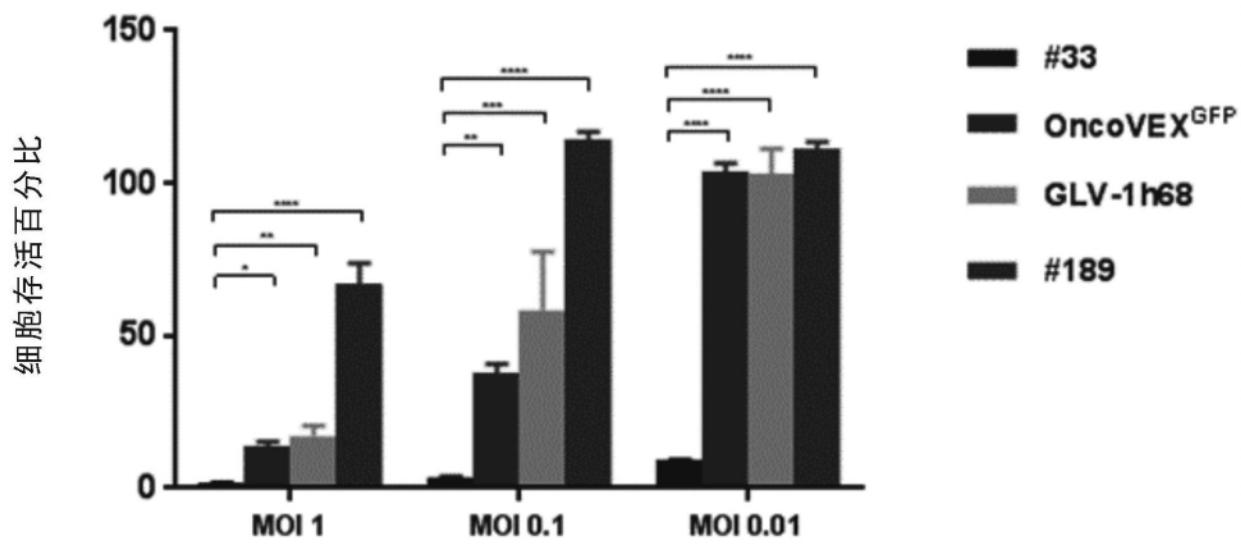


图12B

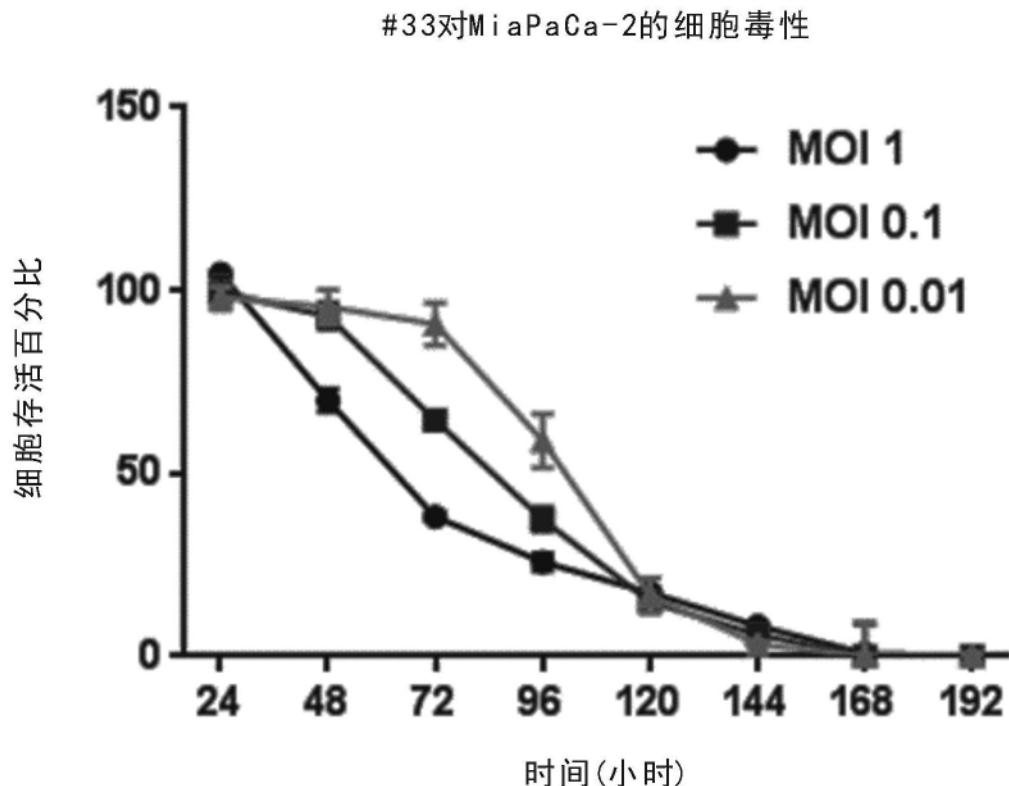


图12C

## 在120小时MiPaCa-2的细胞毒性测定

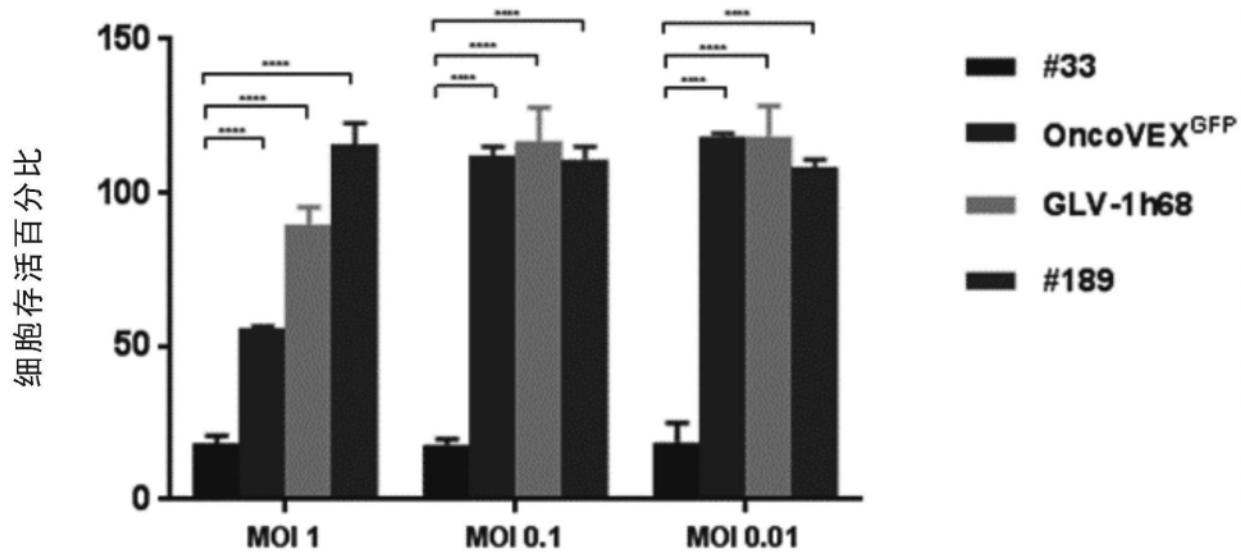


图12D

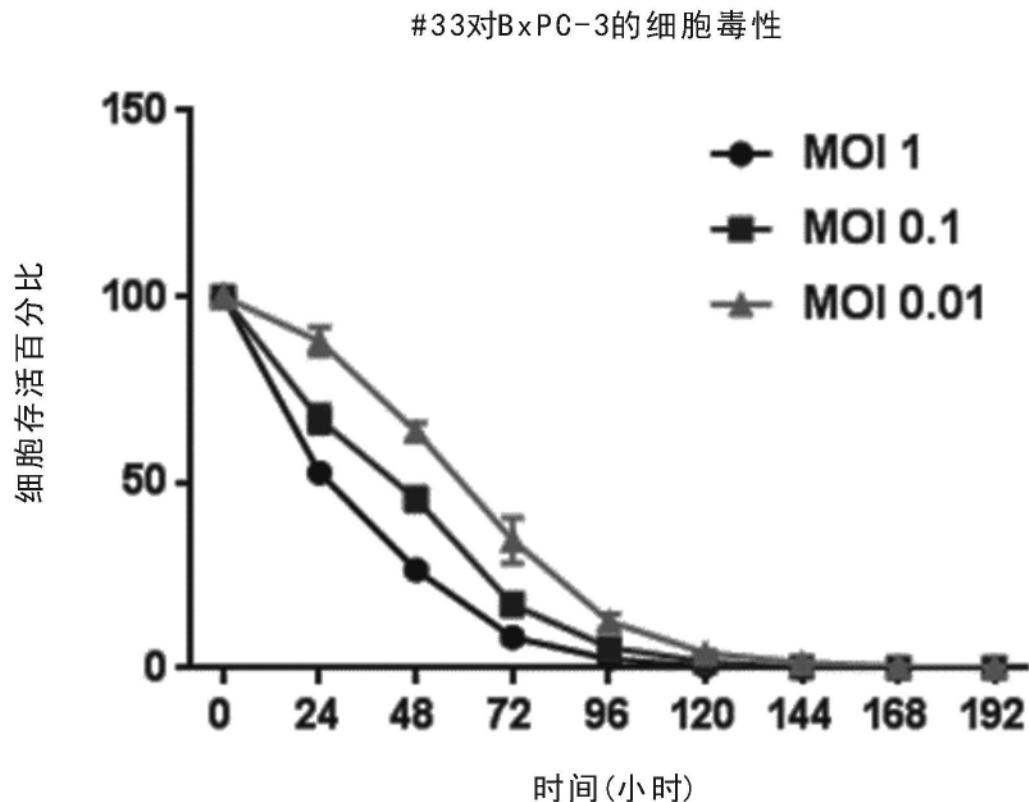


图12E

## 在120小时BxPC-3的细胞毒性测定

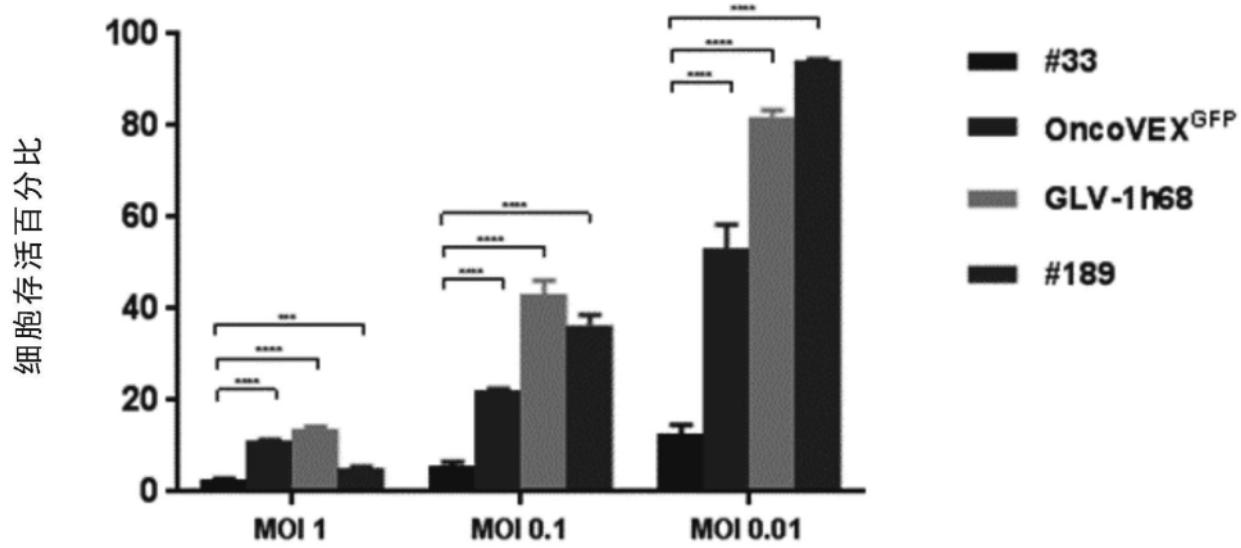


图12F

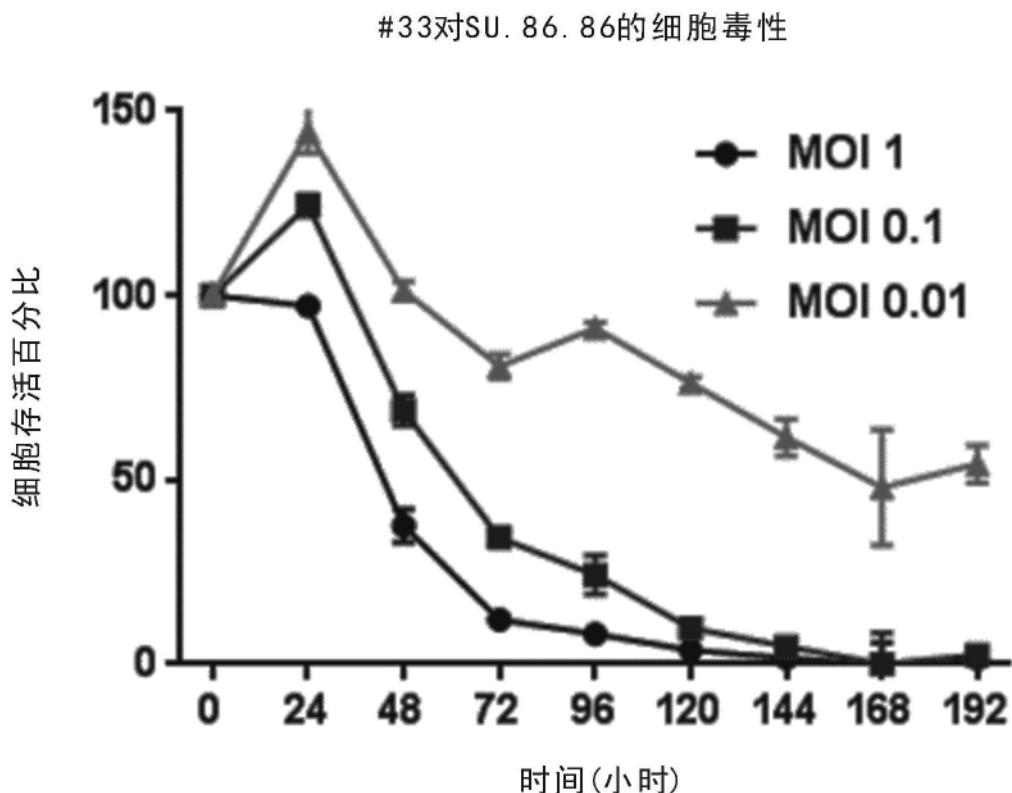


图12G

在120小时SU. 86. 86的细胞毒性测定

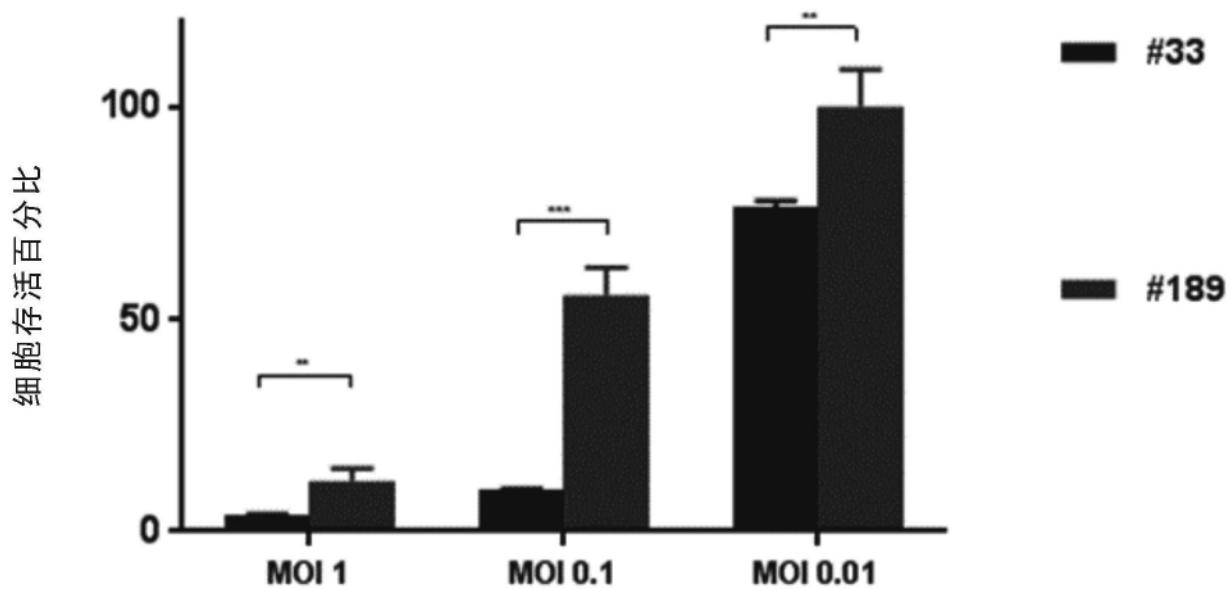


图12H

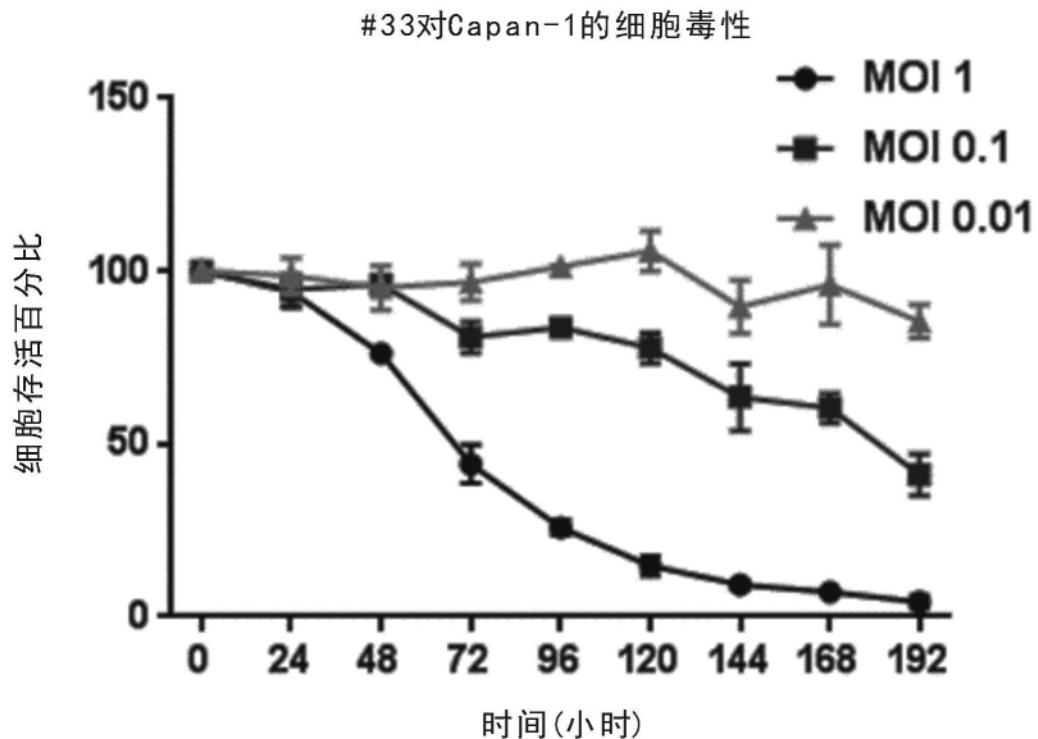


图12I

## 在120小时Capan-1的细胞毒性测定

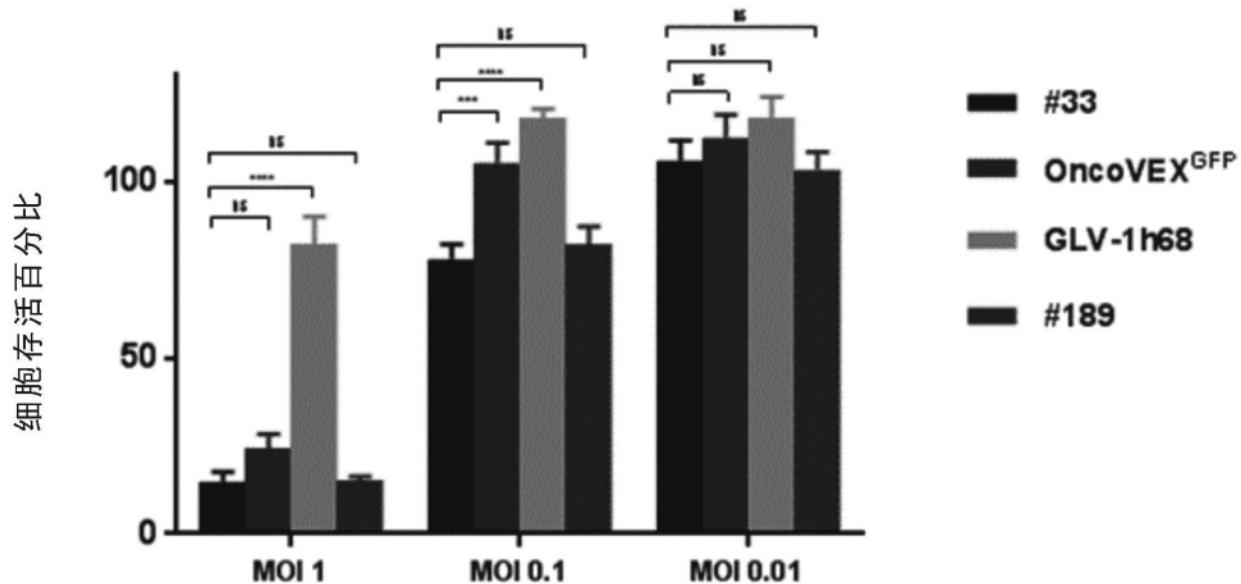


图12J

#33对AsPC-1的细胞毒性

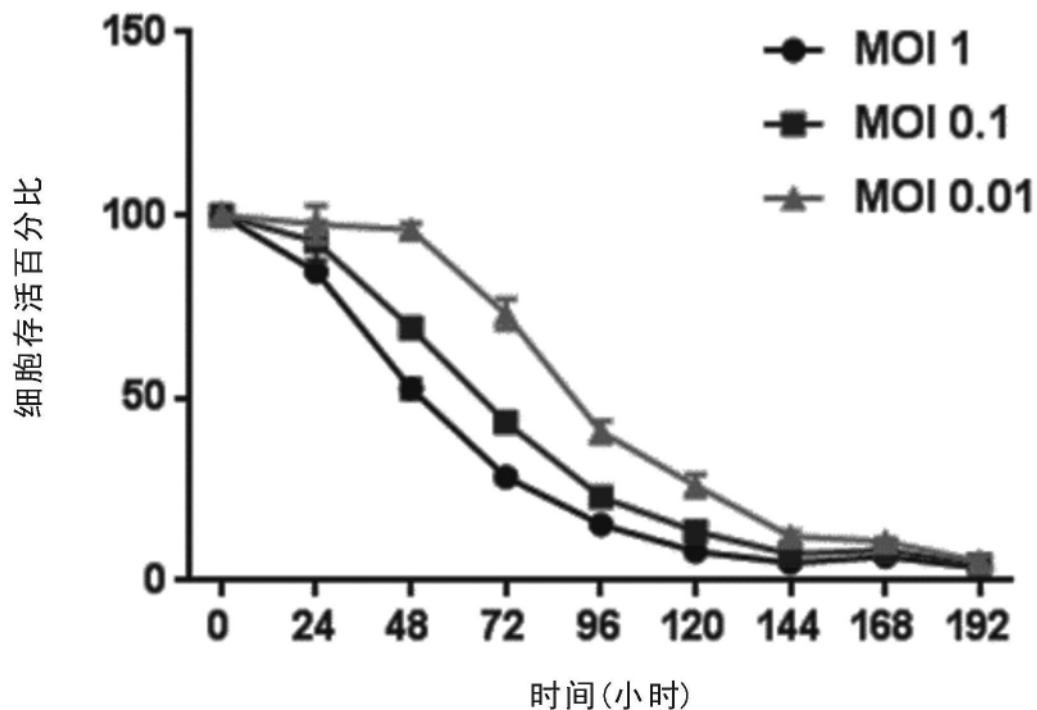


图12K

在120小时AsPC-1的细胞毒性测定

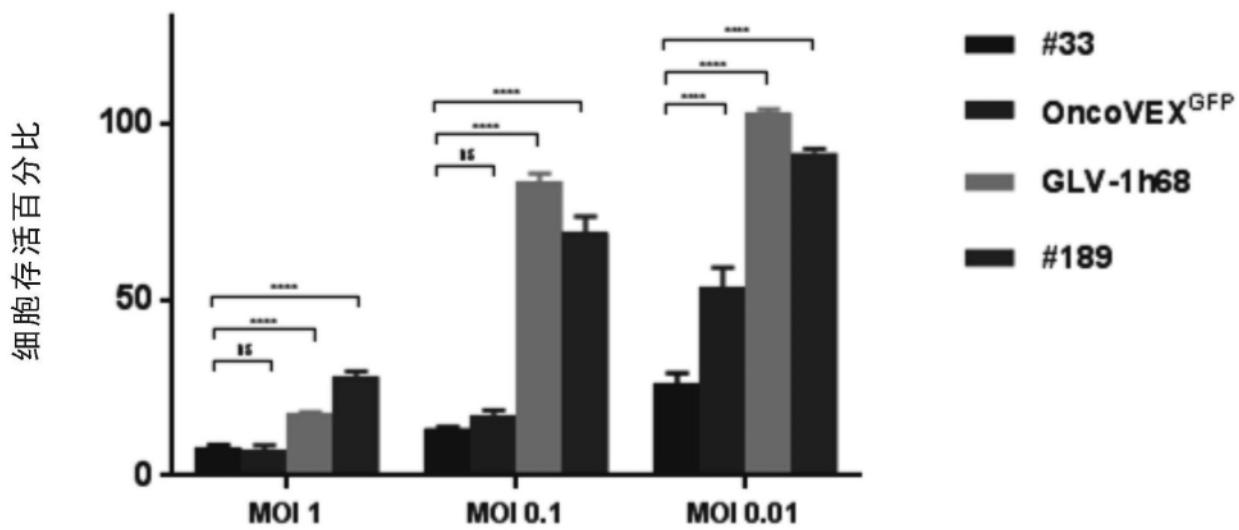


图12L

## Panc-1中的病毒复制

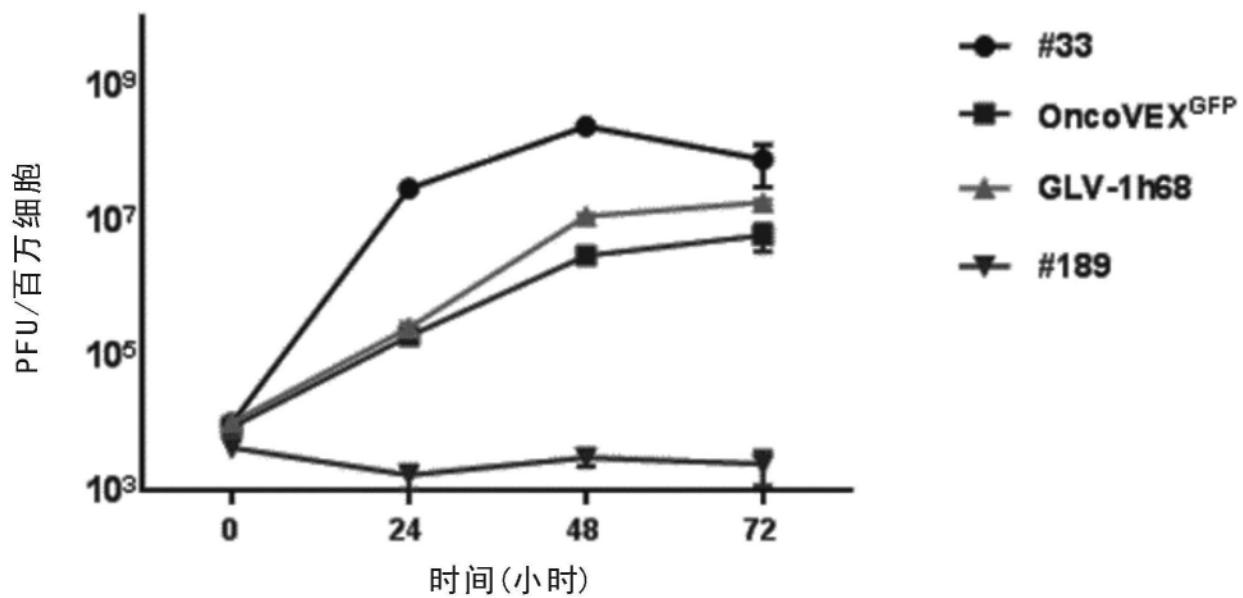


图13A

## Panc-1中的病毒复制

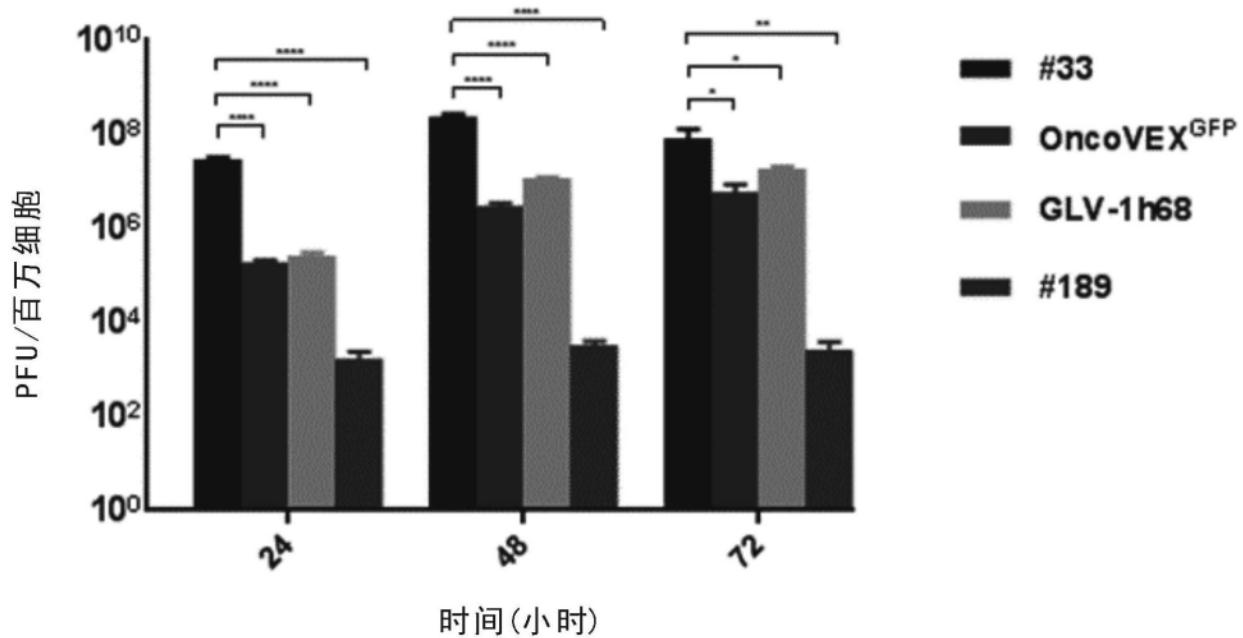


图13B

## MiaPaCa-2中的病毒复制

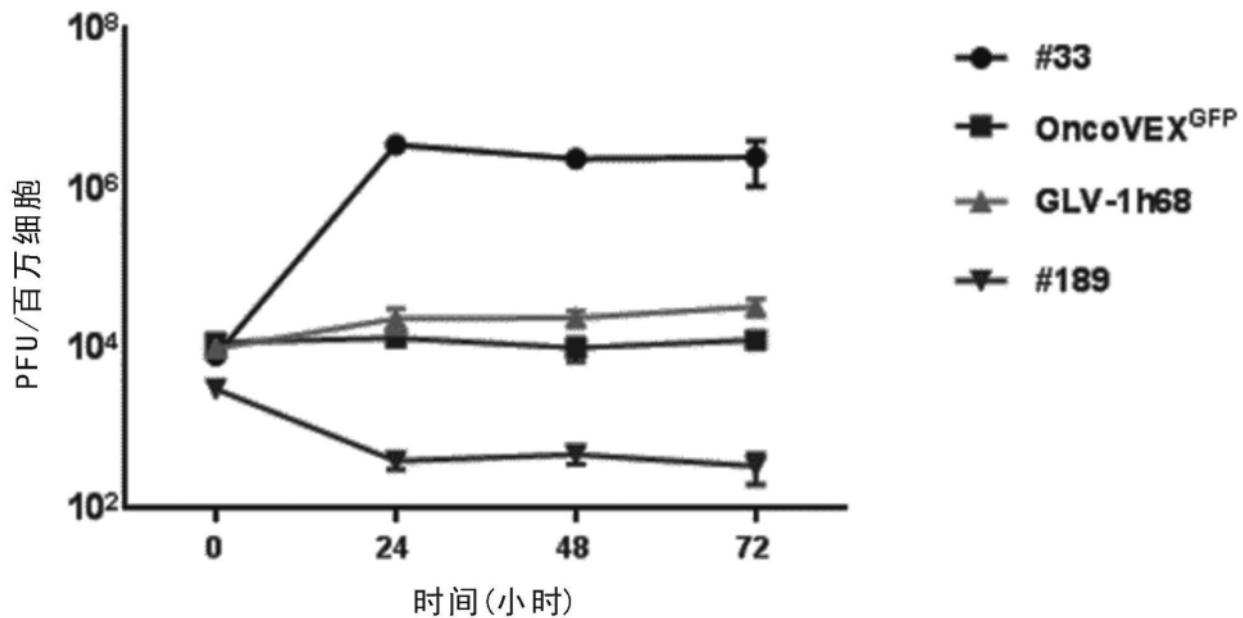


图13C

## MiaPaCa-2中的病毒复制

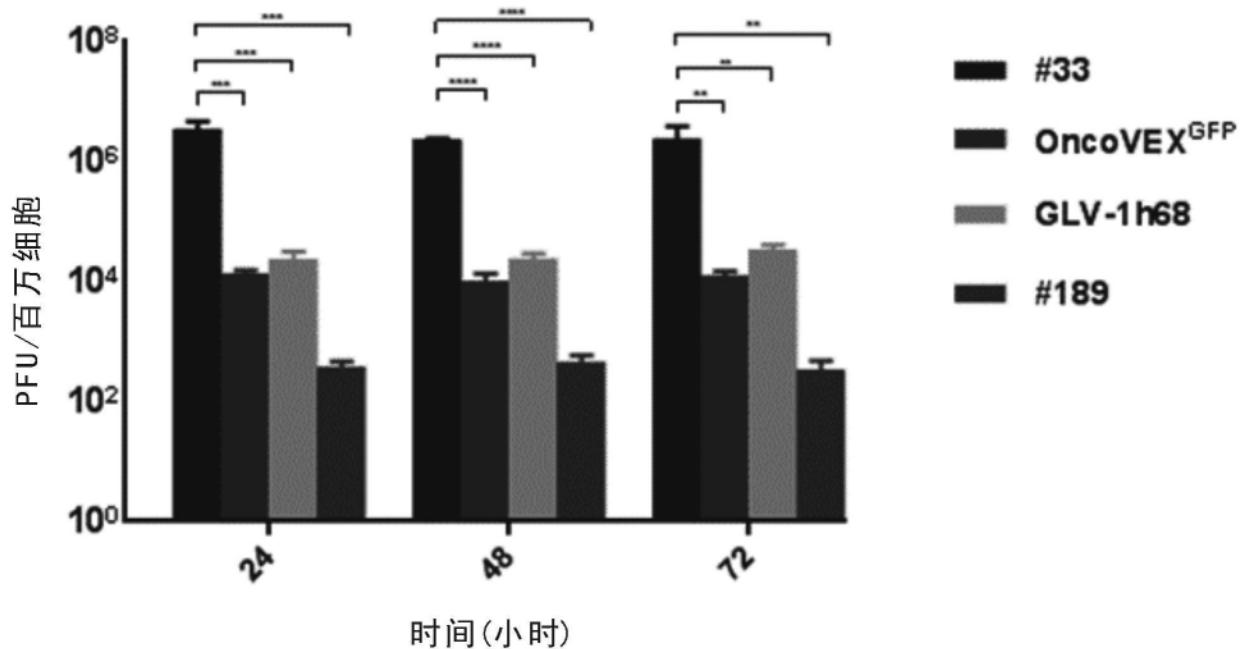


图13D

## BxPC-3中的病毒复制

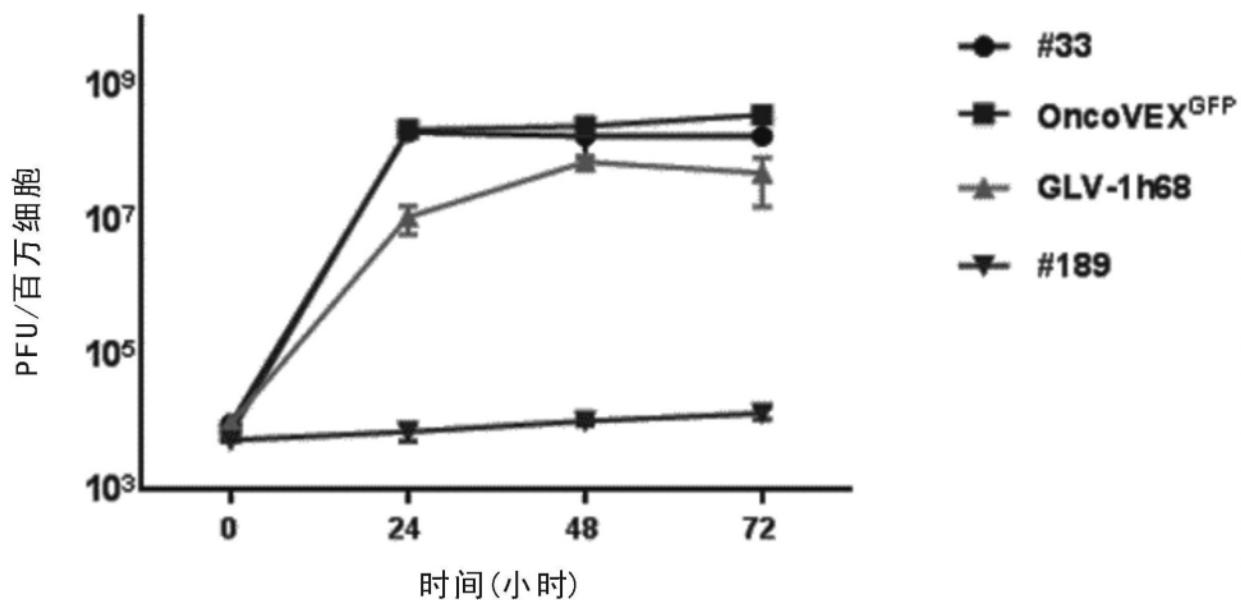


图13E

## BxPC-3中的病毒复制

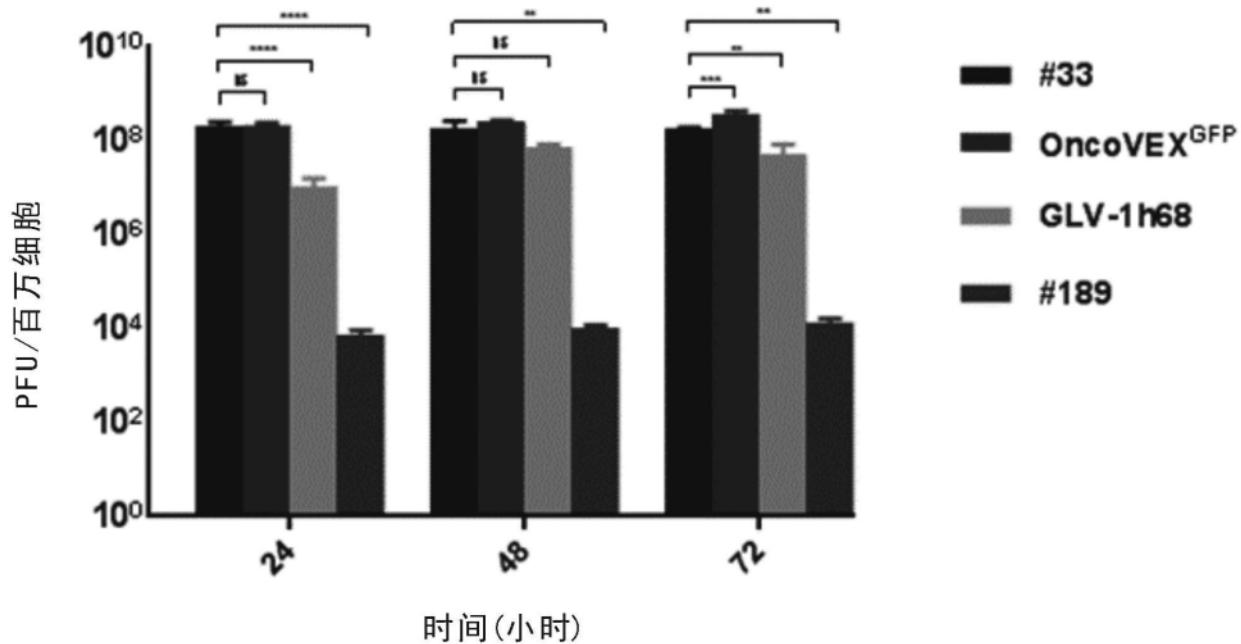


图13F

## SU. 86. 86中的病毒复制

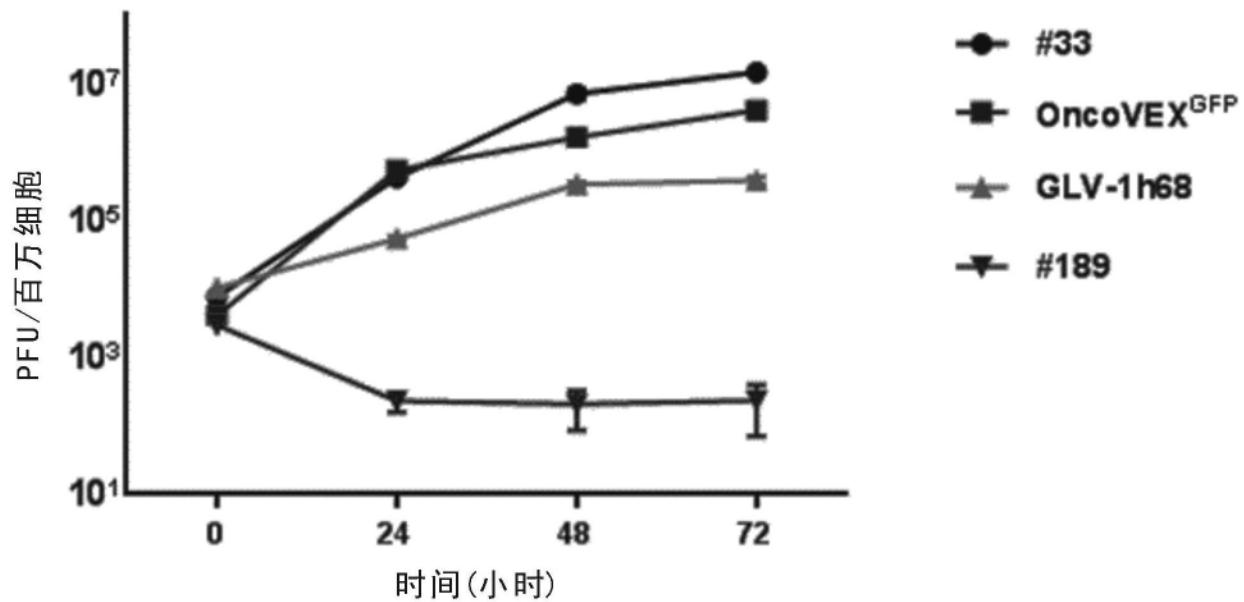


图13G

## SU. 86. 86中的病毒复制

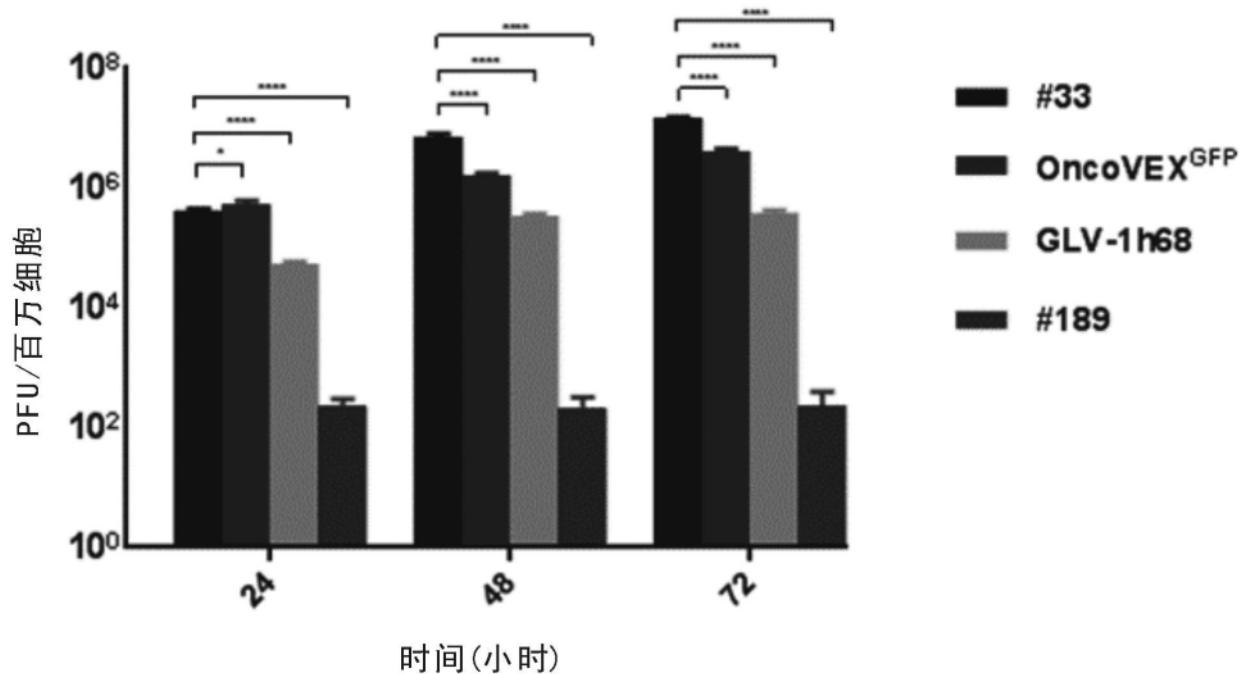


图13H

## Capan-1中的病毒复制

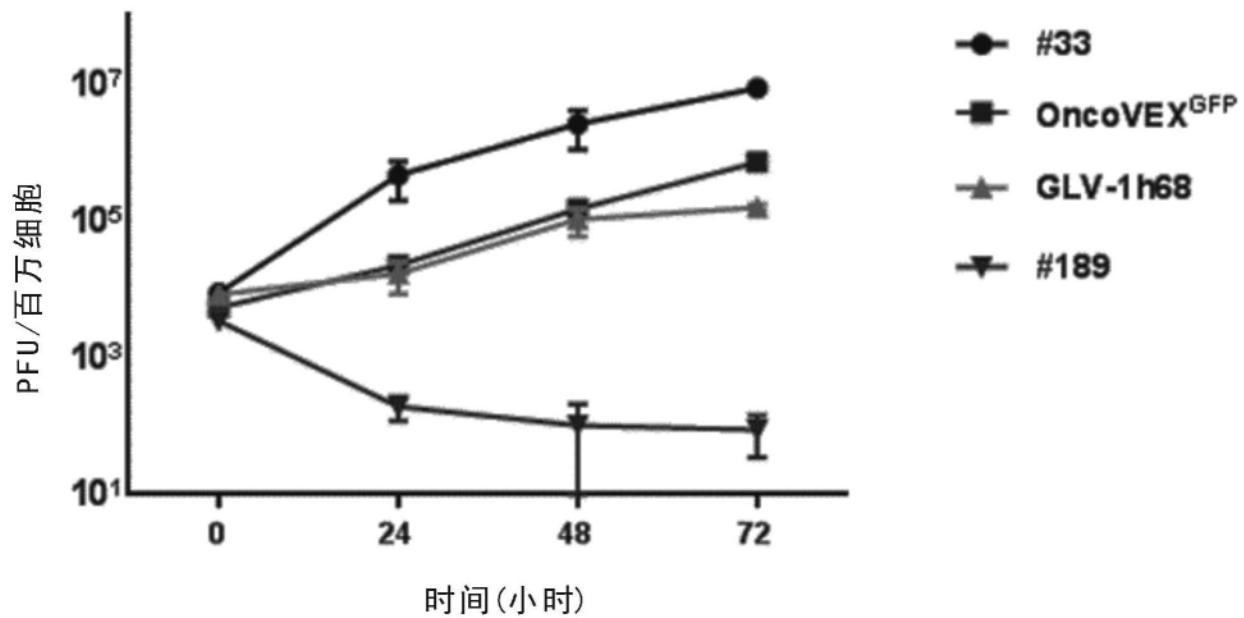


图13I

## Capan-1中的病毒复制

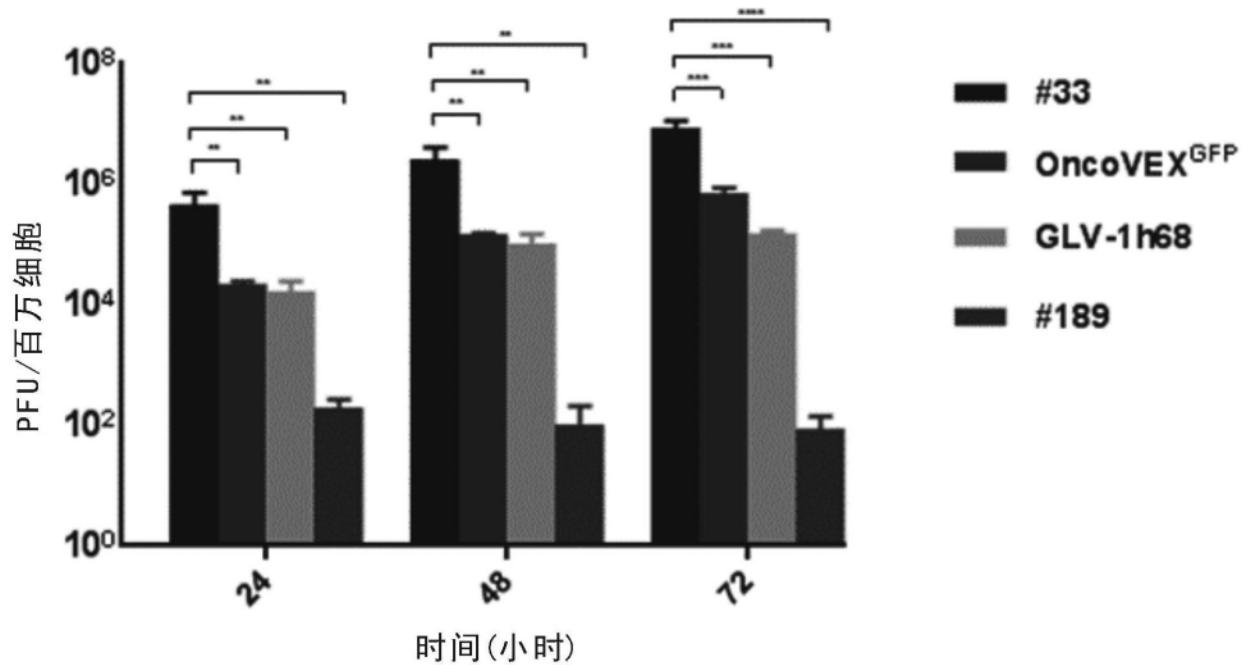


图13J

## As PC-1 中的病毒复制

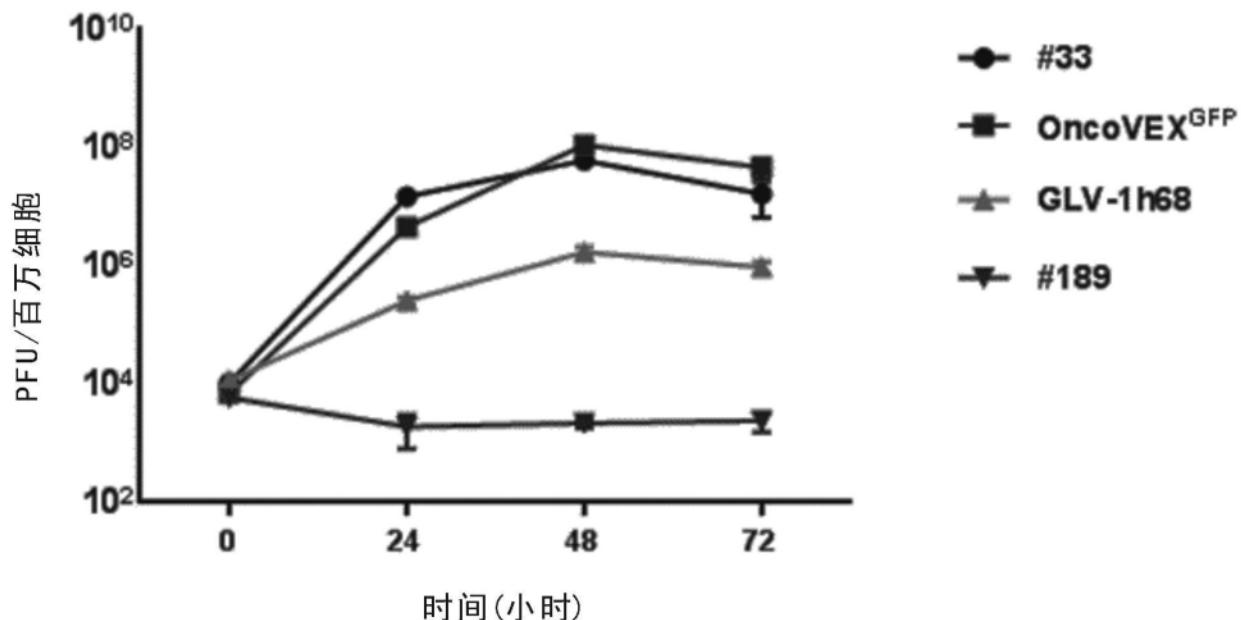


图13K

## As PC-1 中的病毒复制

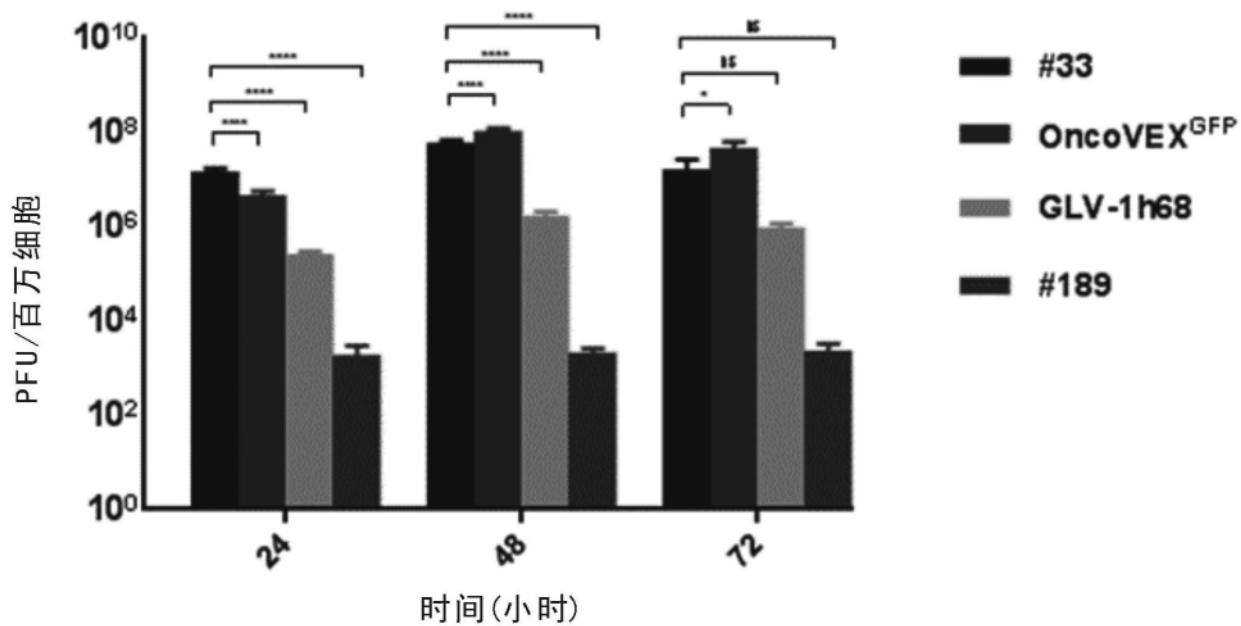


图13L

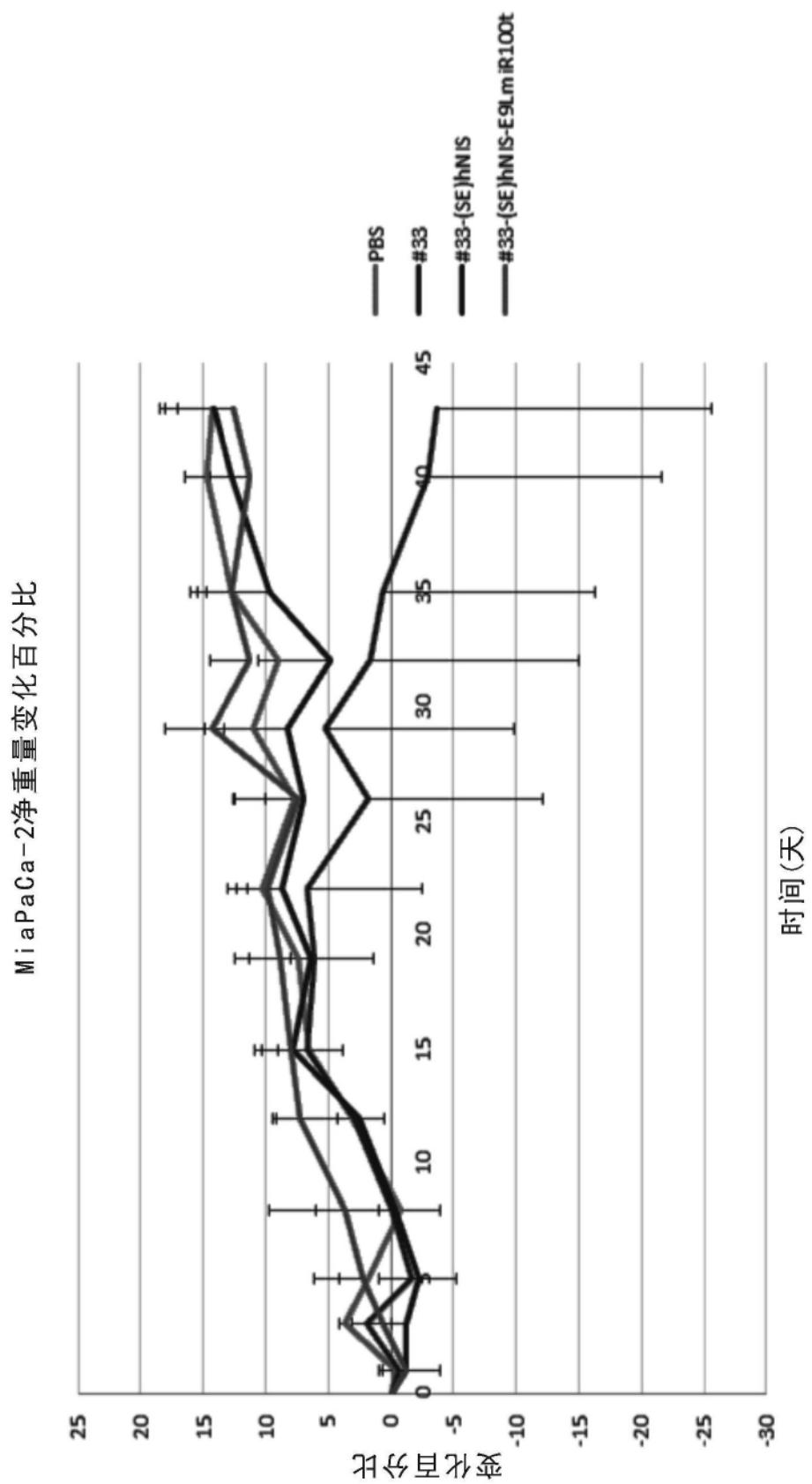


图14A

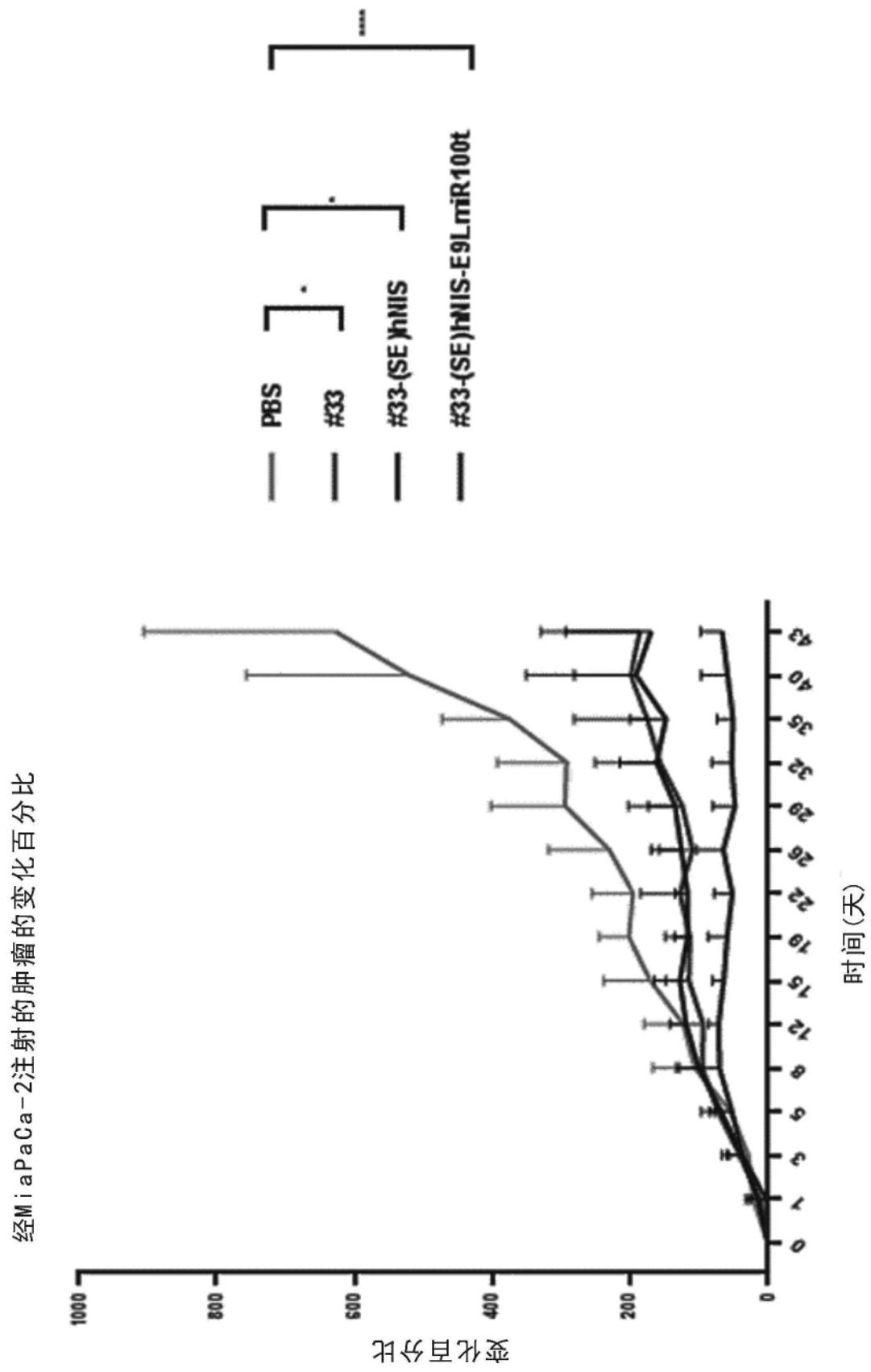
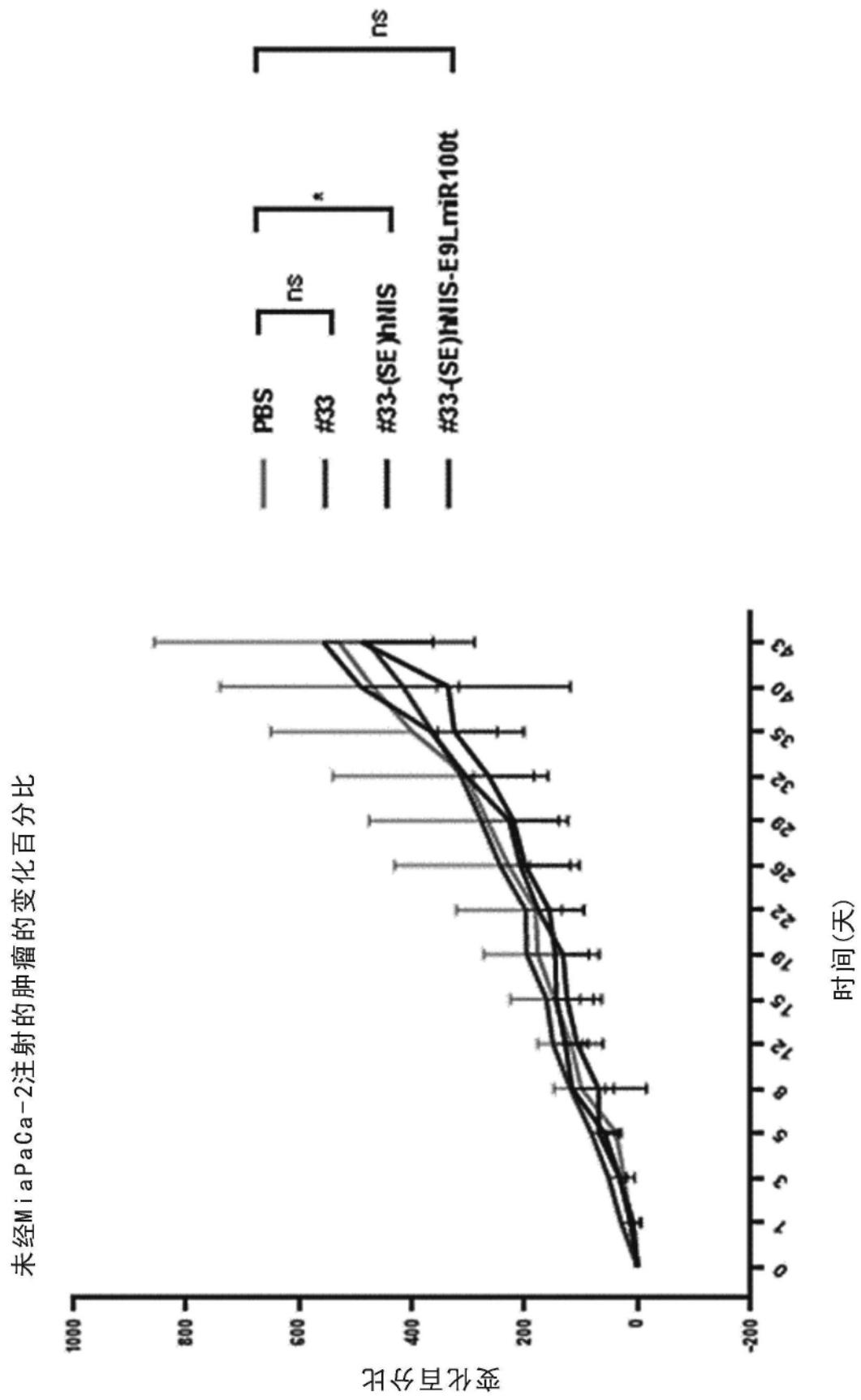


图14B



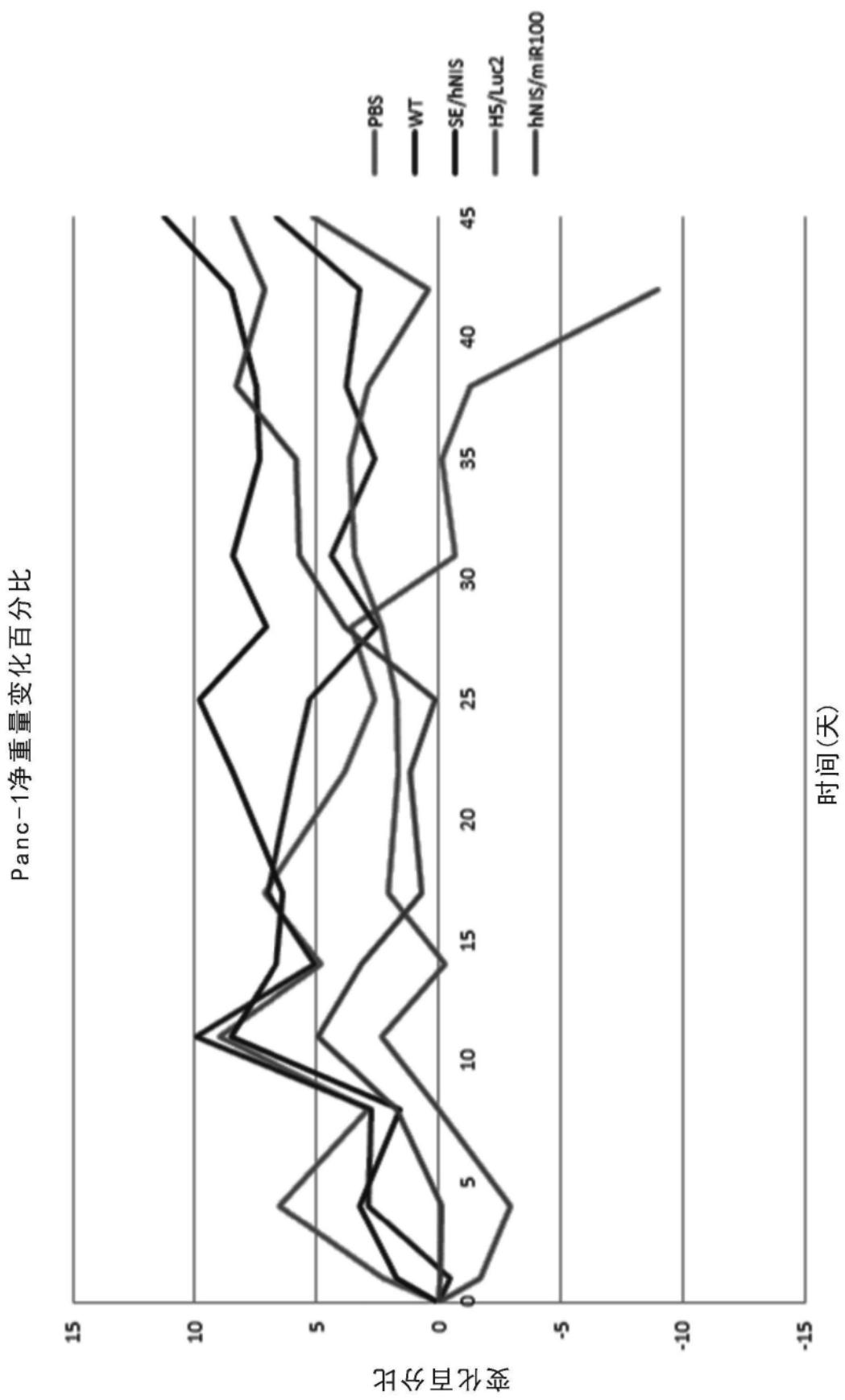


图15A

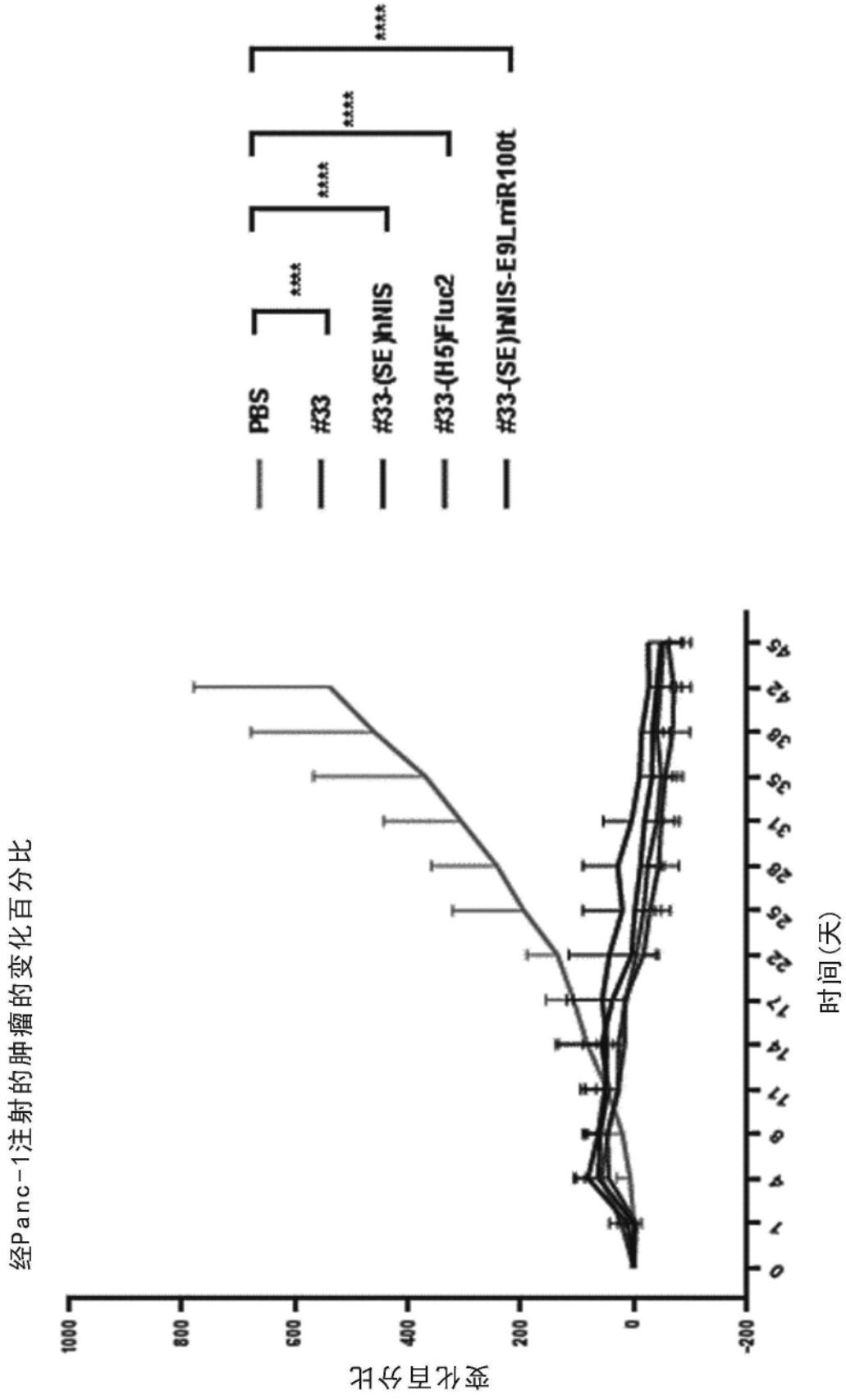


图15B

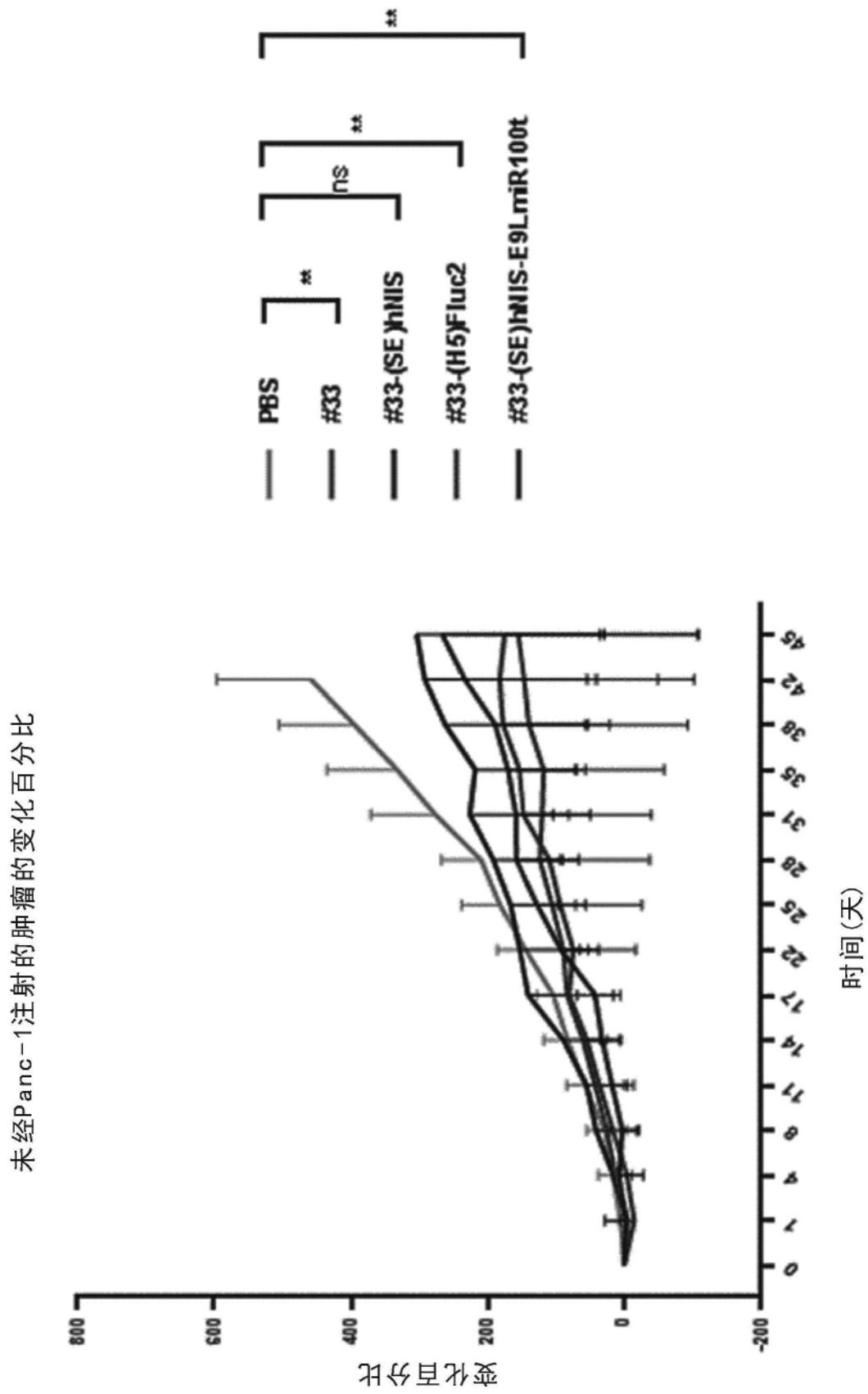


图15C

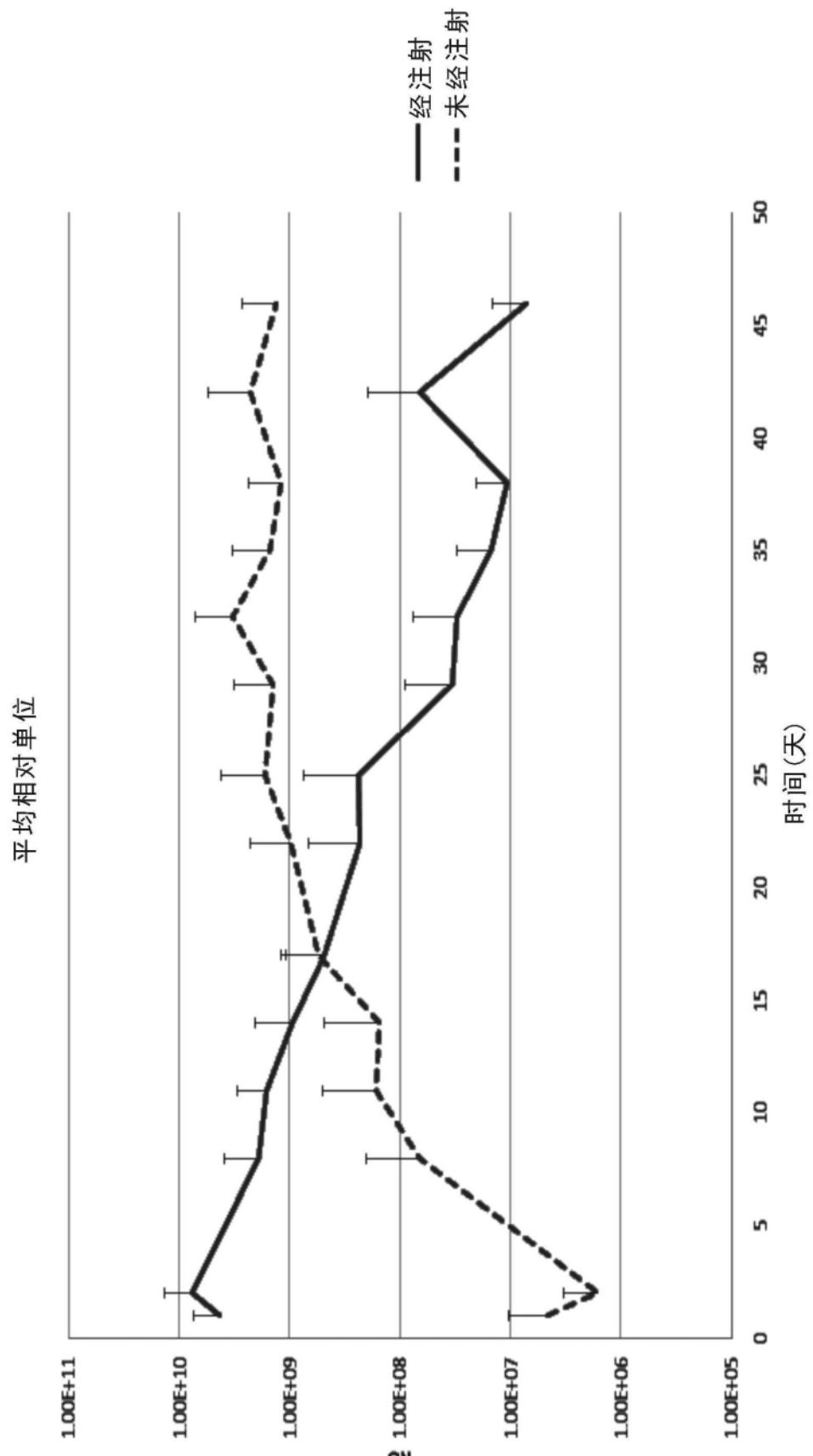


图16

#33对HT29的细胞毒性

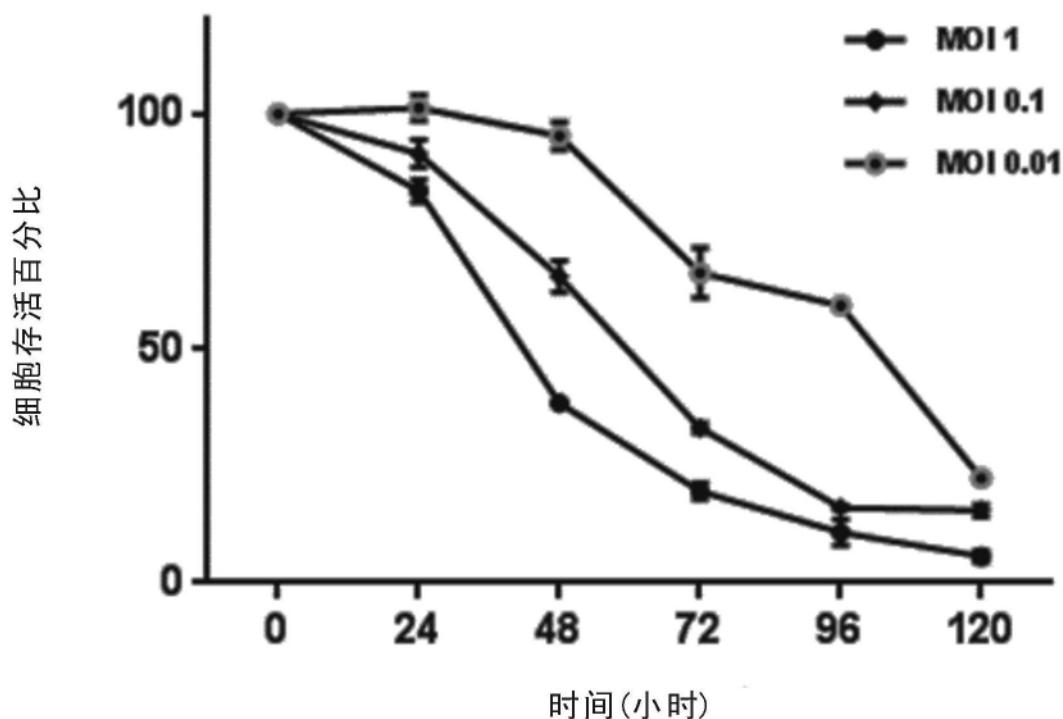


图17A

在120小时HT-29的细胞毒性测定

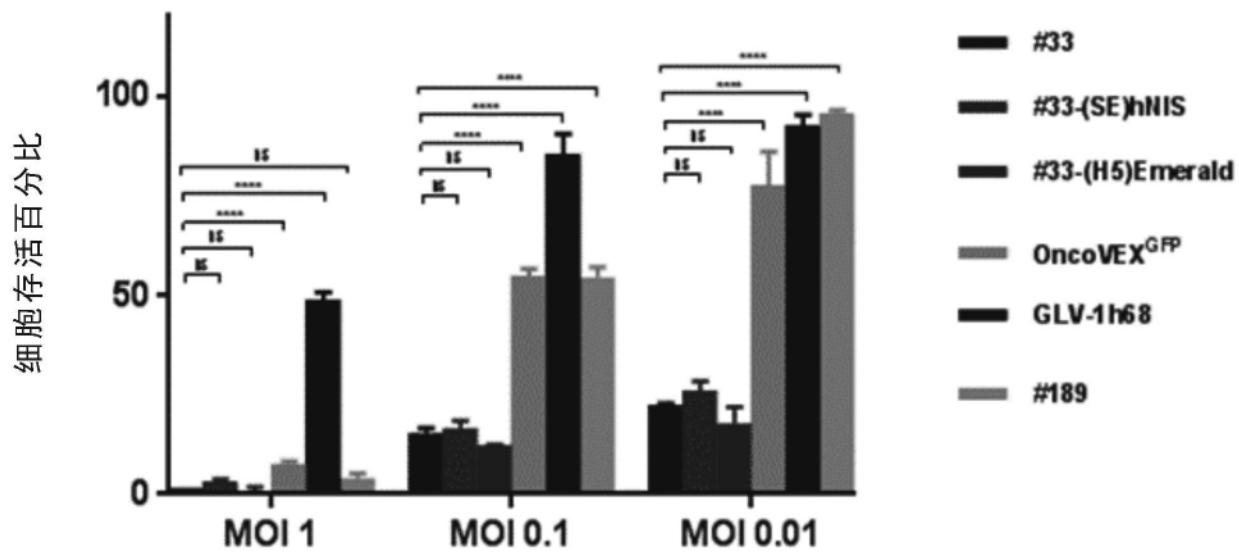


图17B

#33对HCT116的细胞毒性

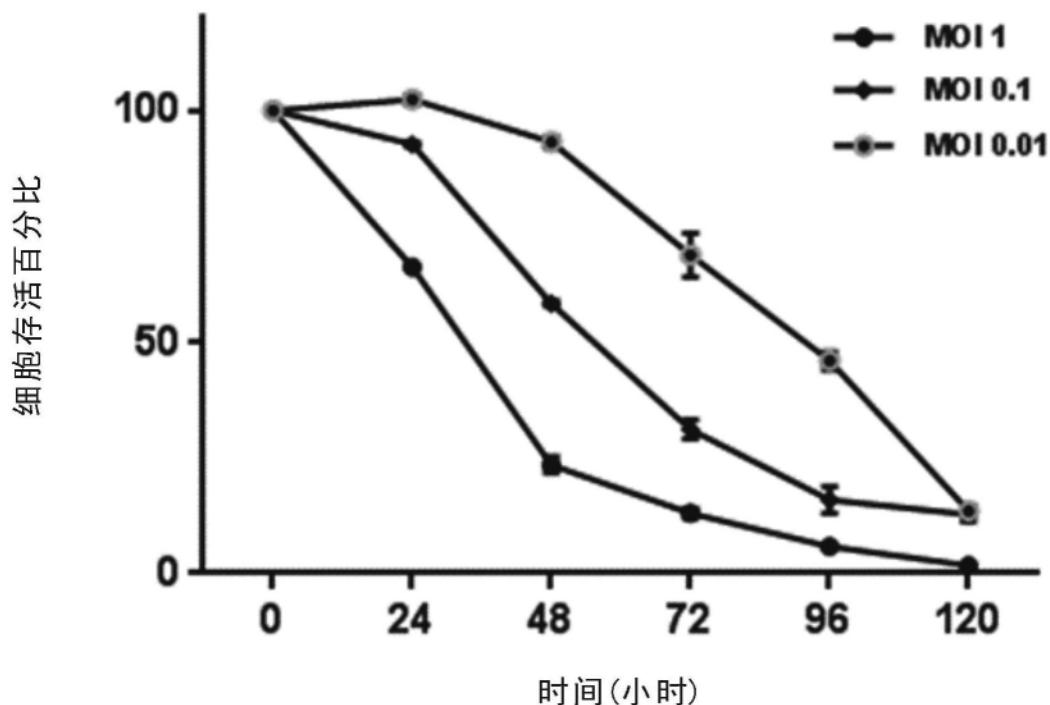


图17C

在120小时的HCT-116的细胞毒性测定

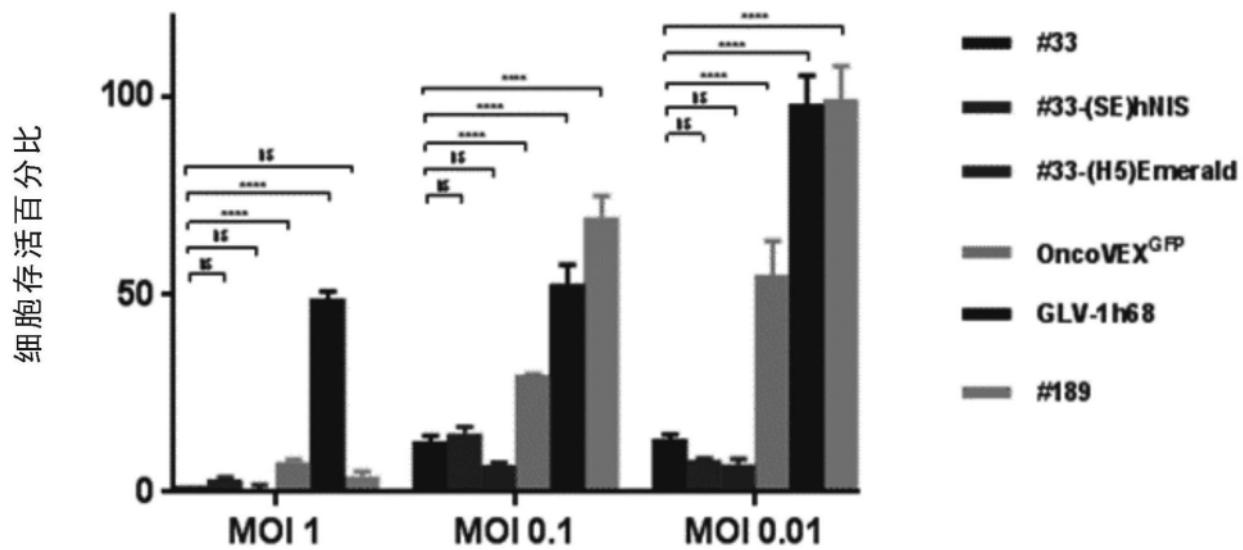


图17D

#33对SW620的细胞毒性

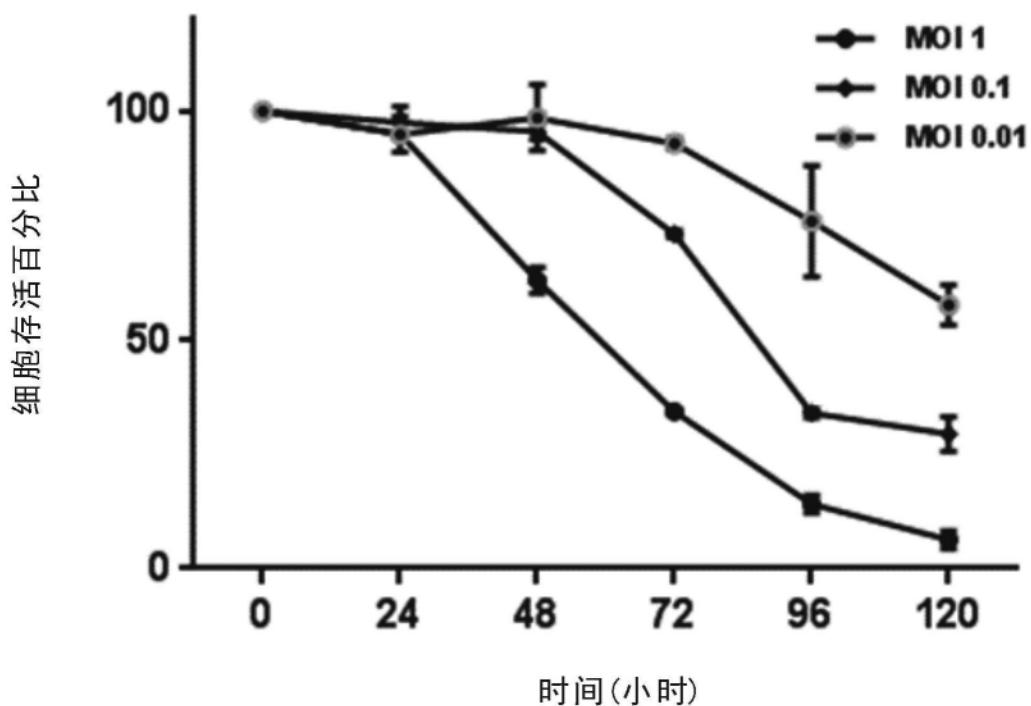


图18A

在120小时的SW620的细胞毒性测定

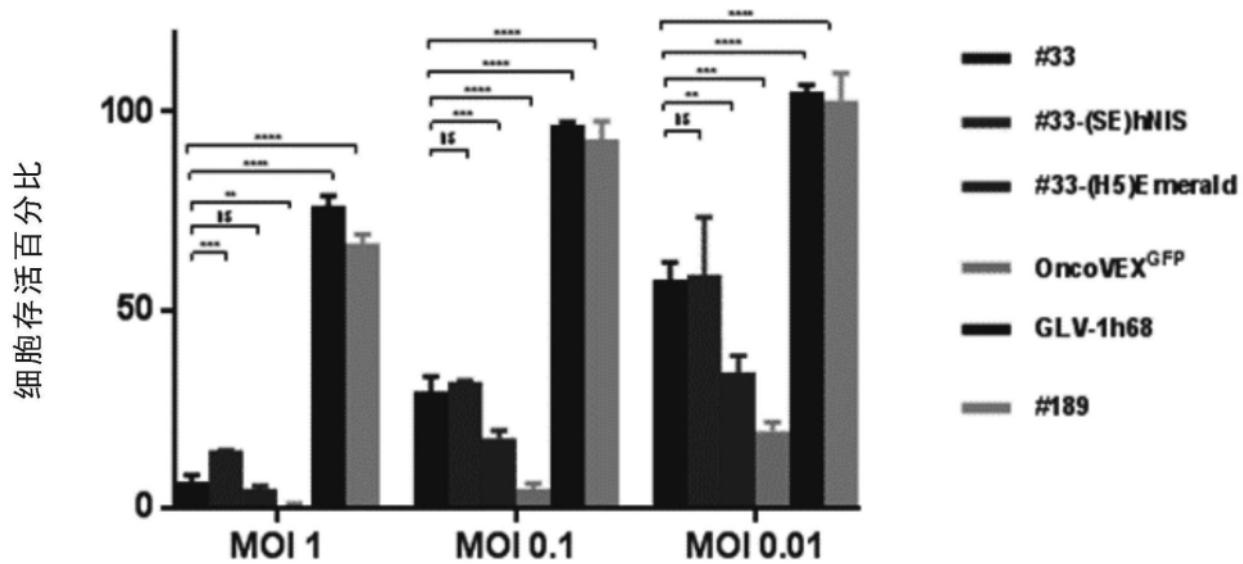


图18B

#33对SW480的细胞毒性

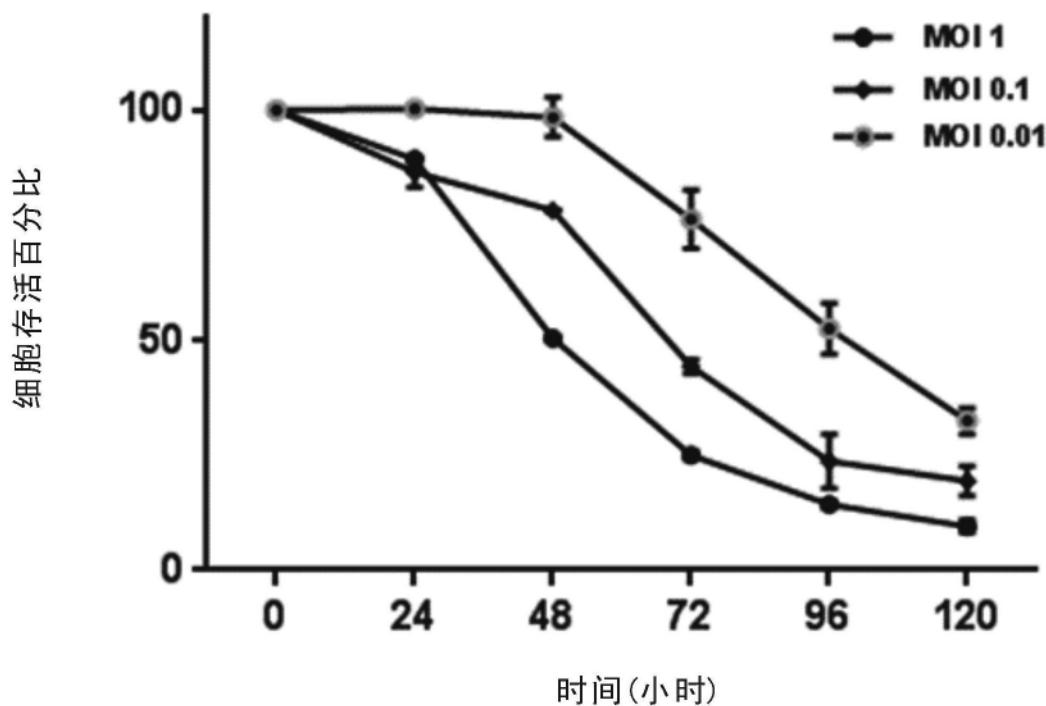


图18C

在120小时的SW480的细胞毒性测定

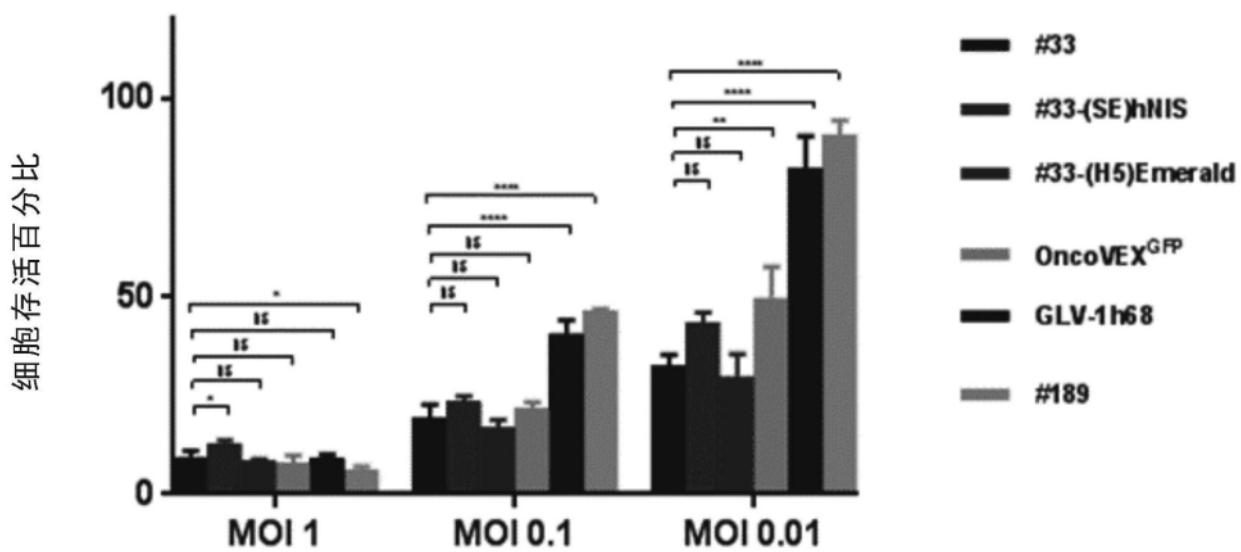


图18D

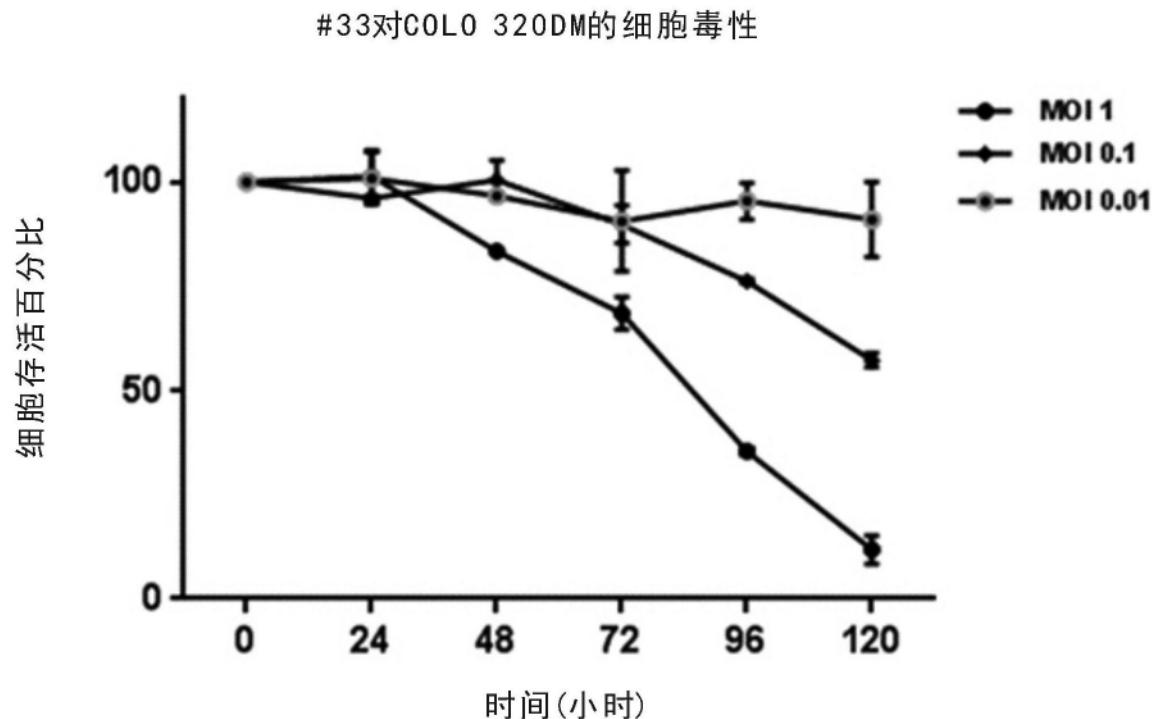


图18E

## 在120小时的COLO 320DM的细胞毒性测定

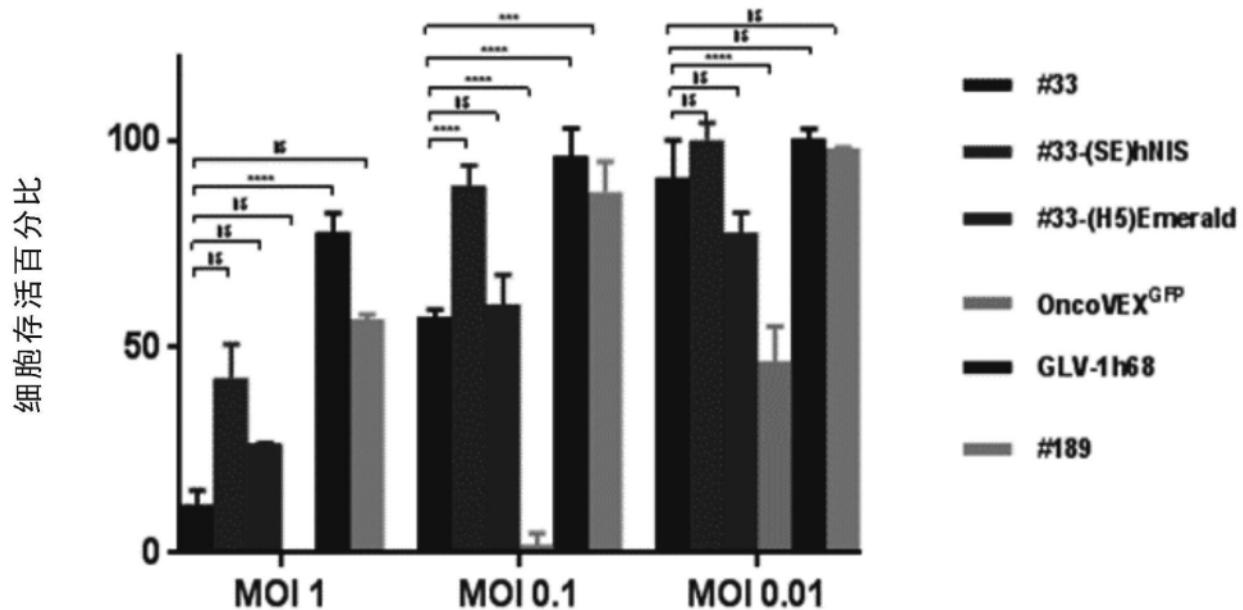


图18F

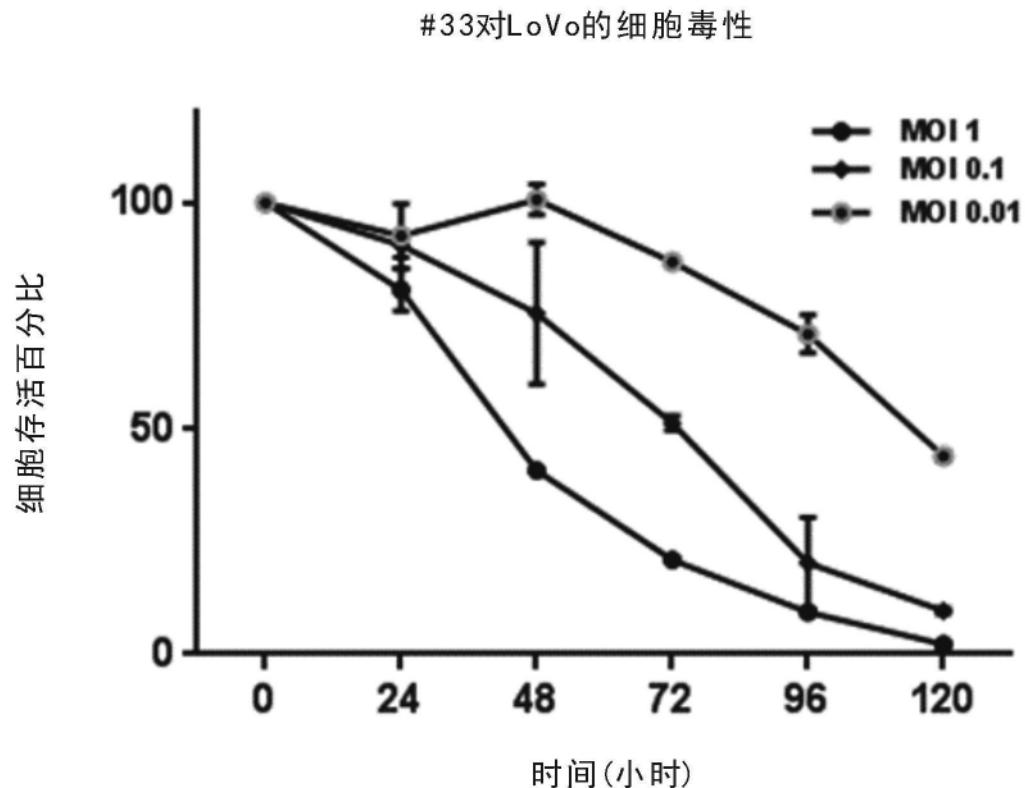


图19A

## 在120小时的LoVo的细胞毒性测定

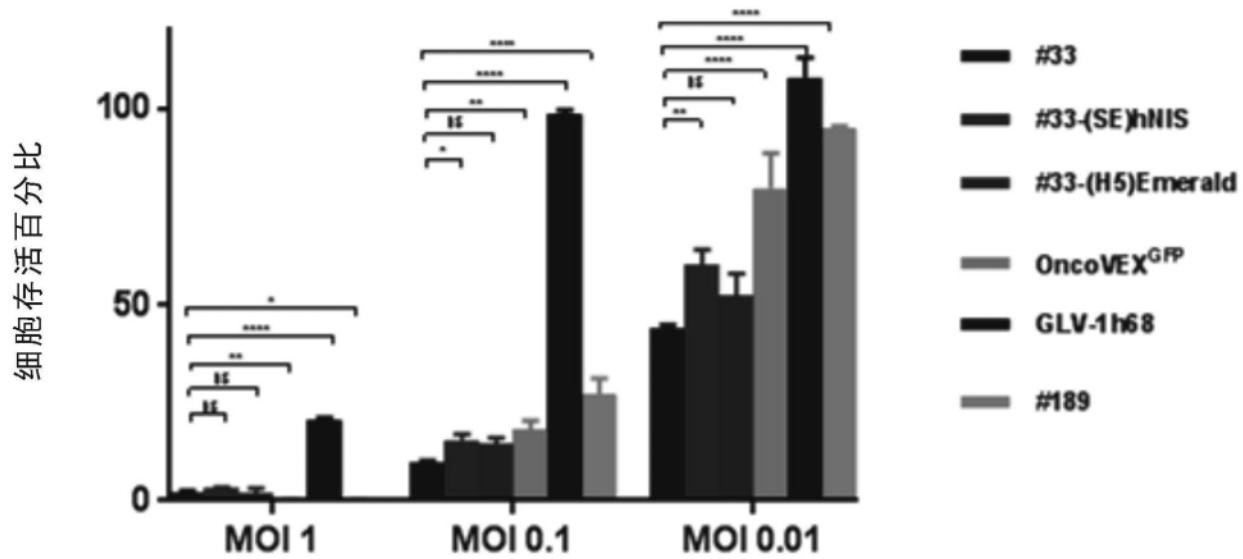


图19B

## HT-29中的病毒复制

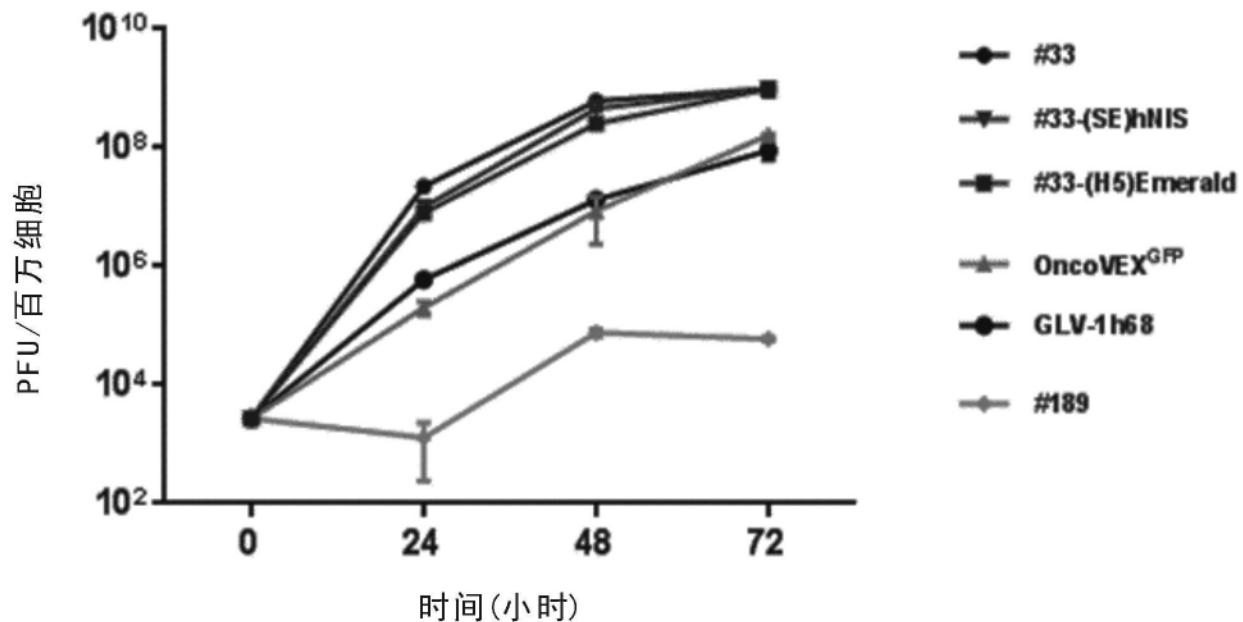


图20A

## HT-29中的病毒复制

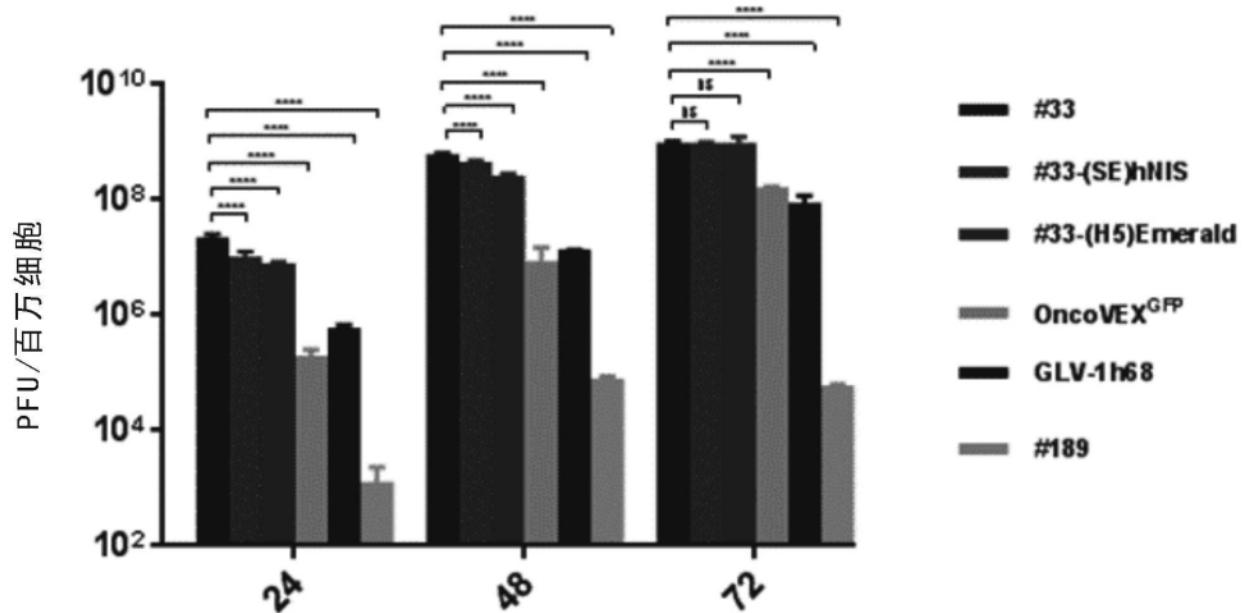


图20B

## HCT-116中的病毒复制

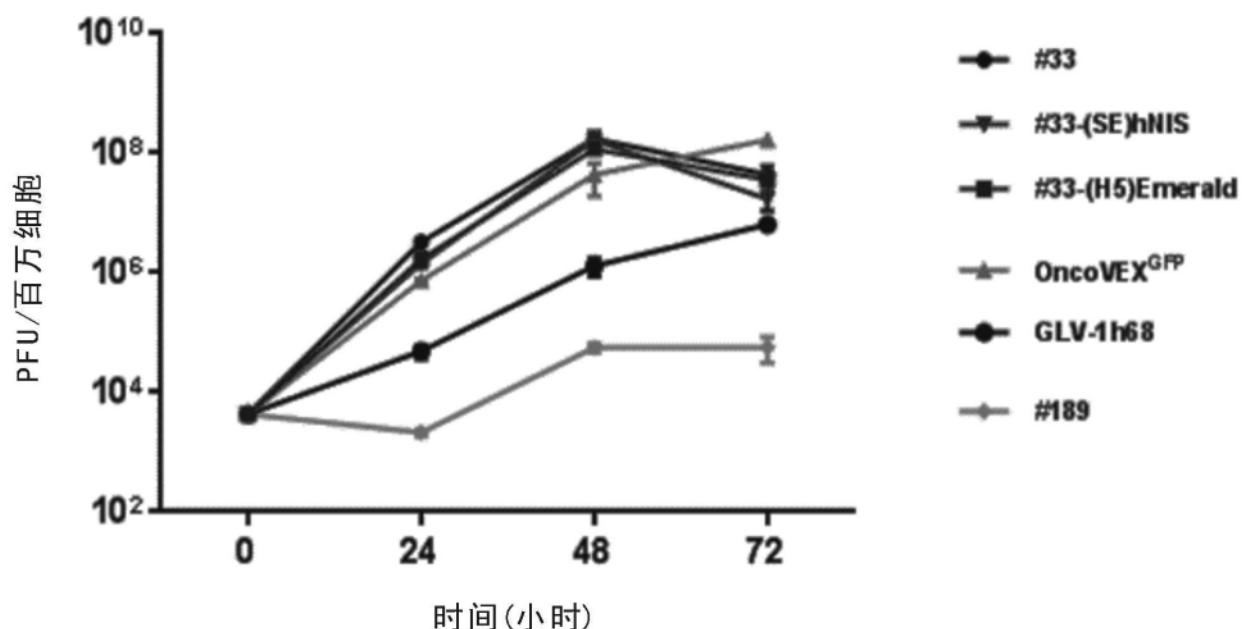


图20C

## HCT-116中的病毒复制

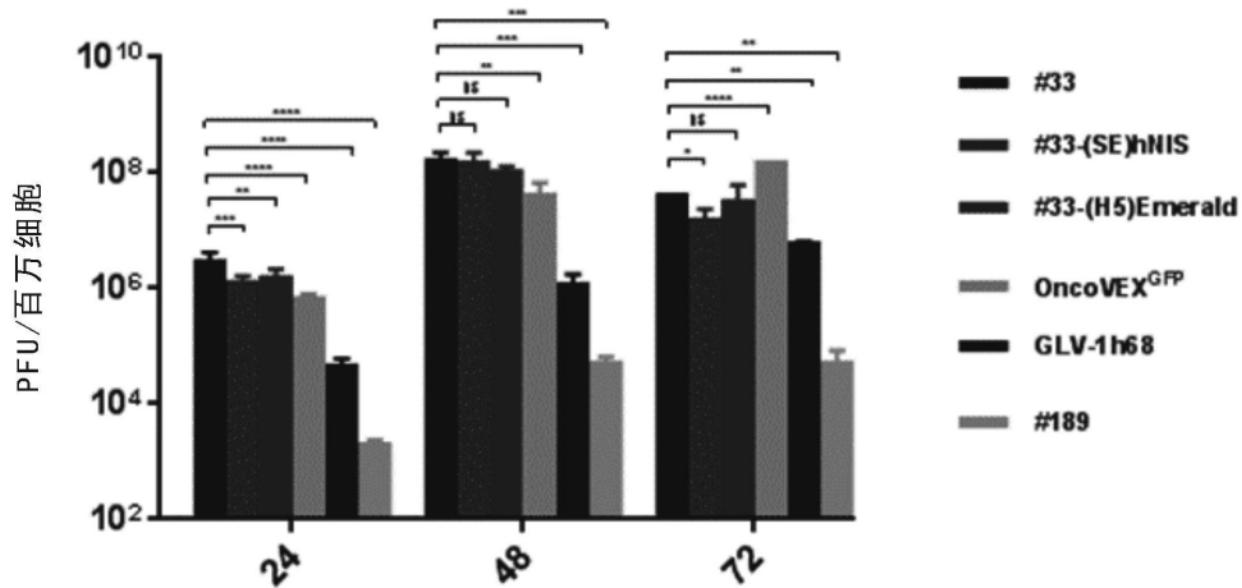


图20D

## SW620中的病毒复制

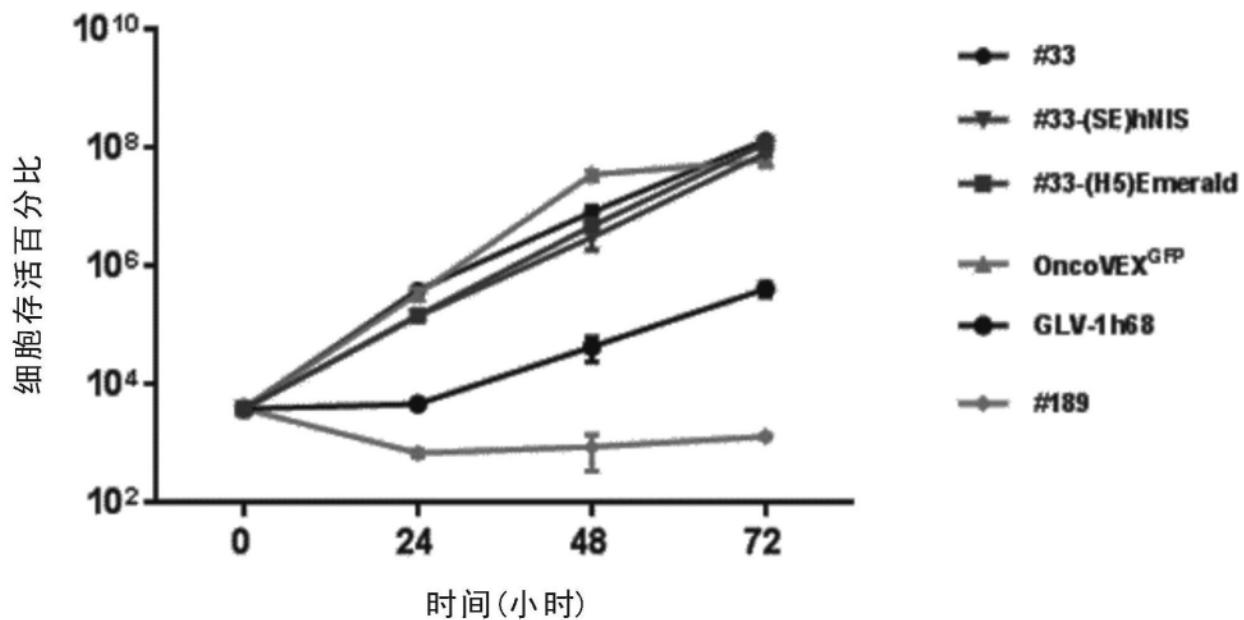


图21A

## SW620中的病毒复制

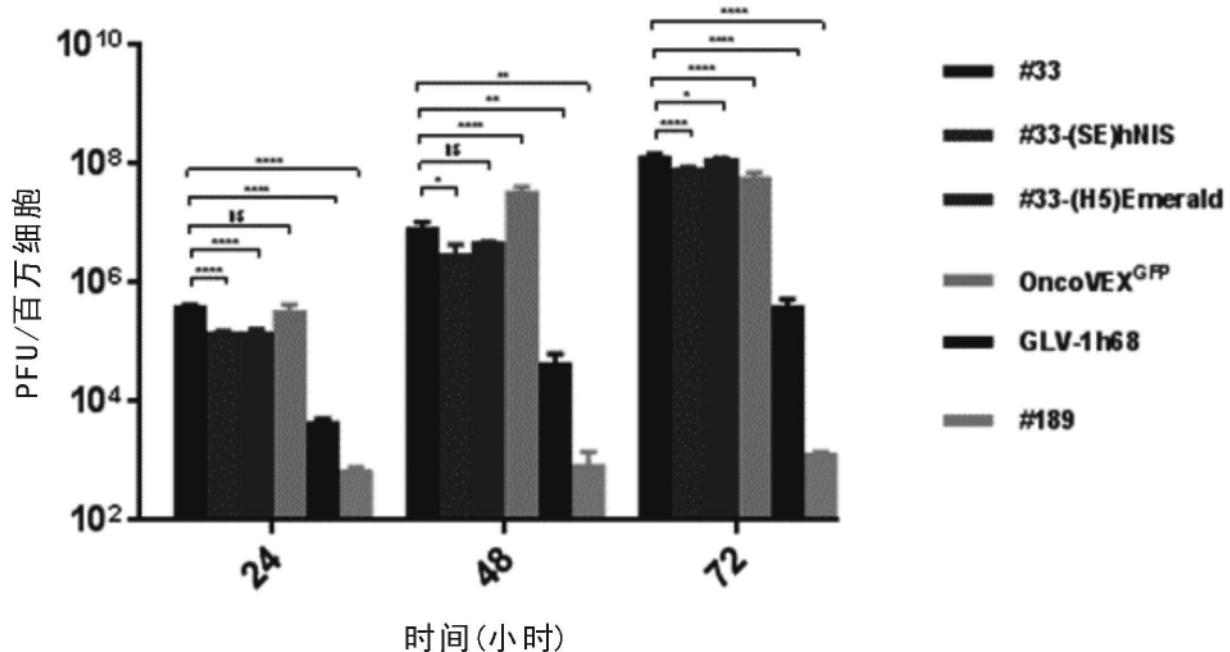


图21B

## SW480中的病毒复制

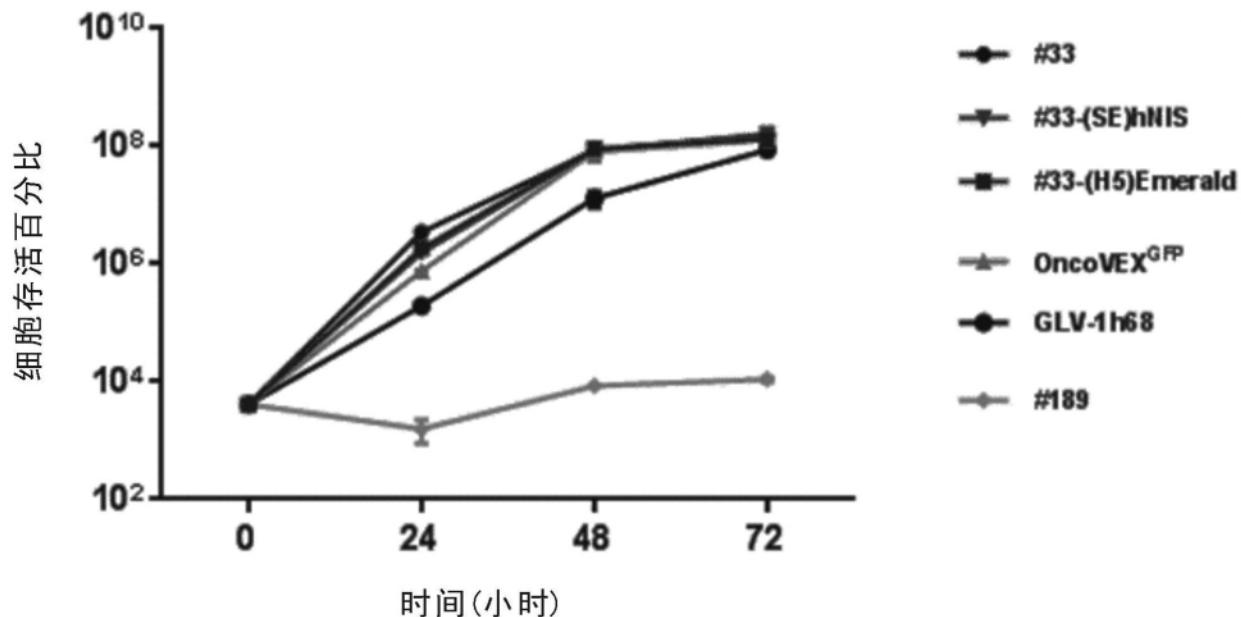


图21C

## SW480中的病毒复制

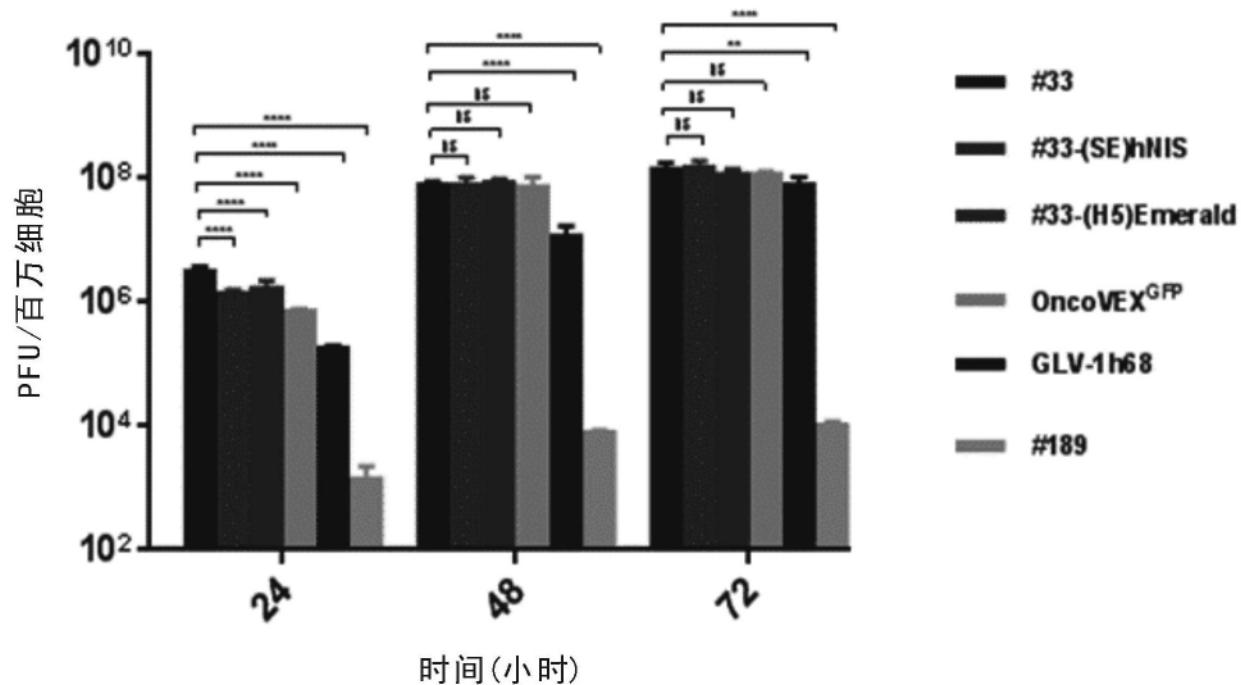


图21D

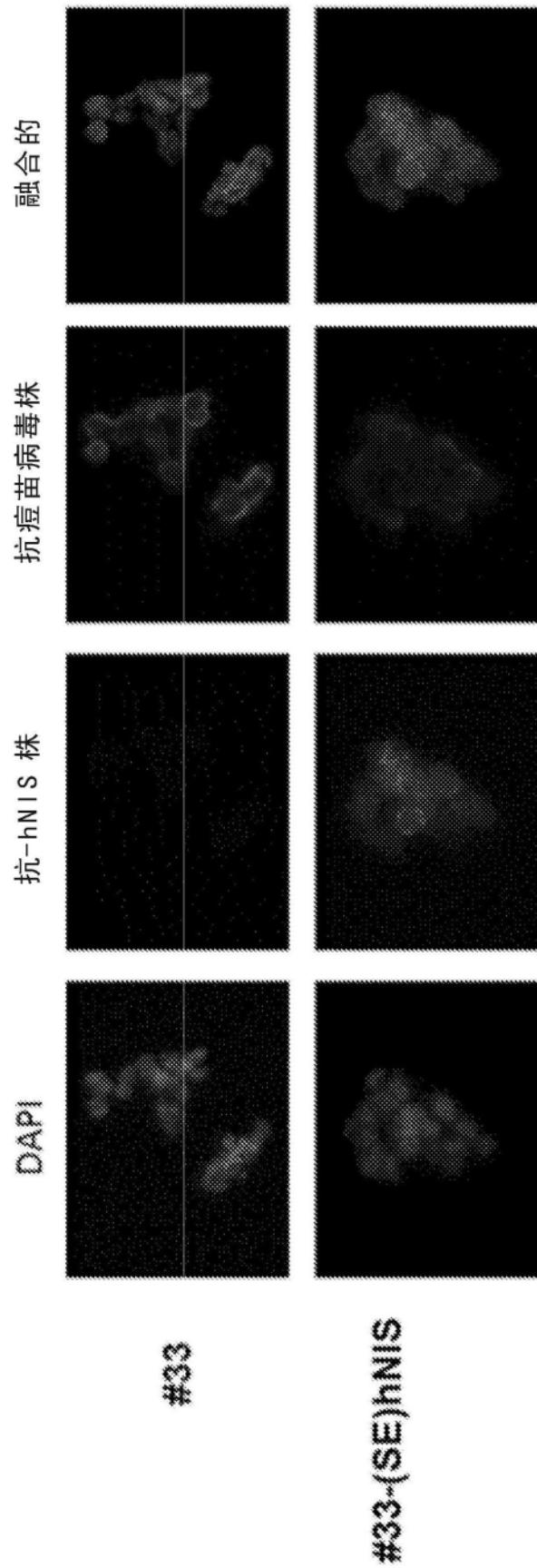


图22

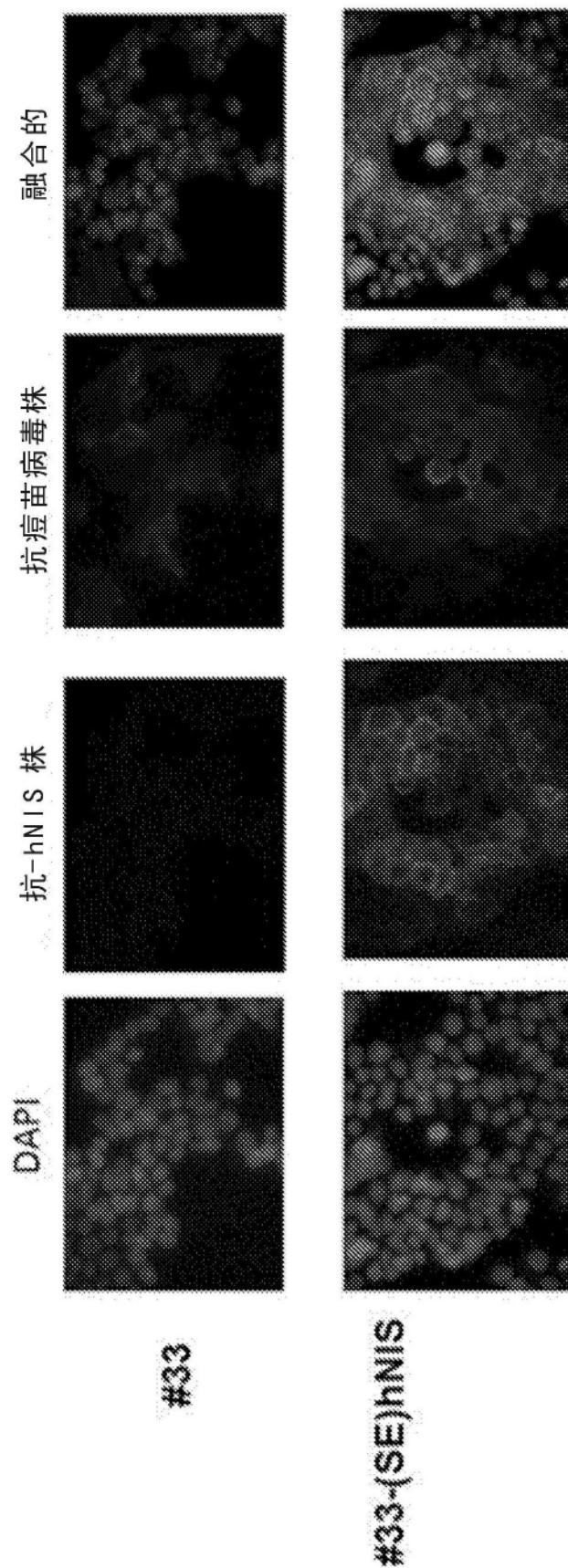


图23

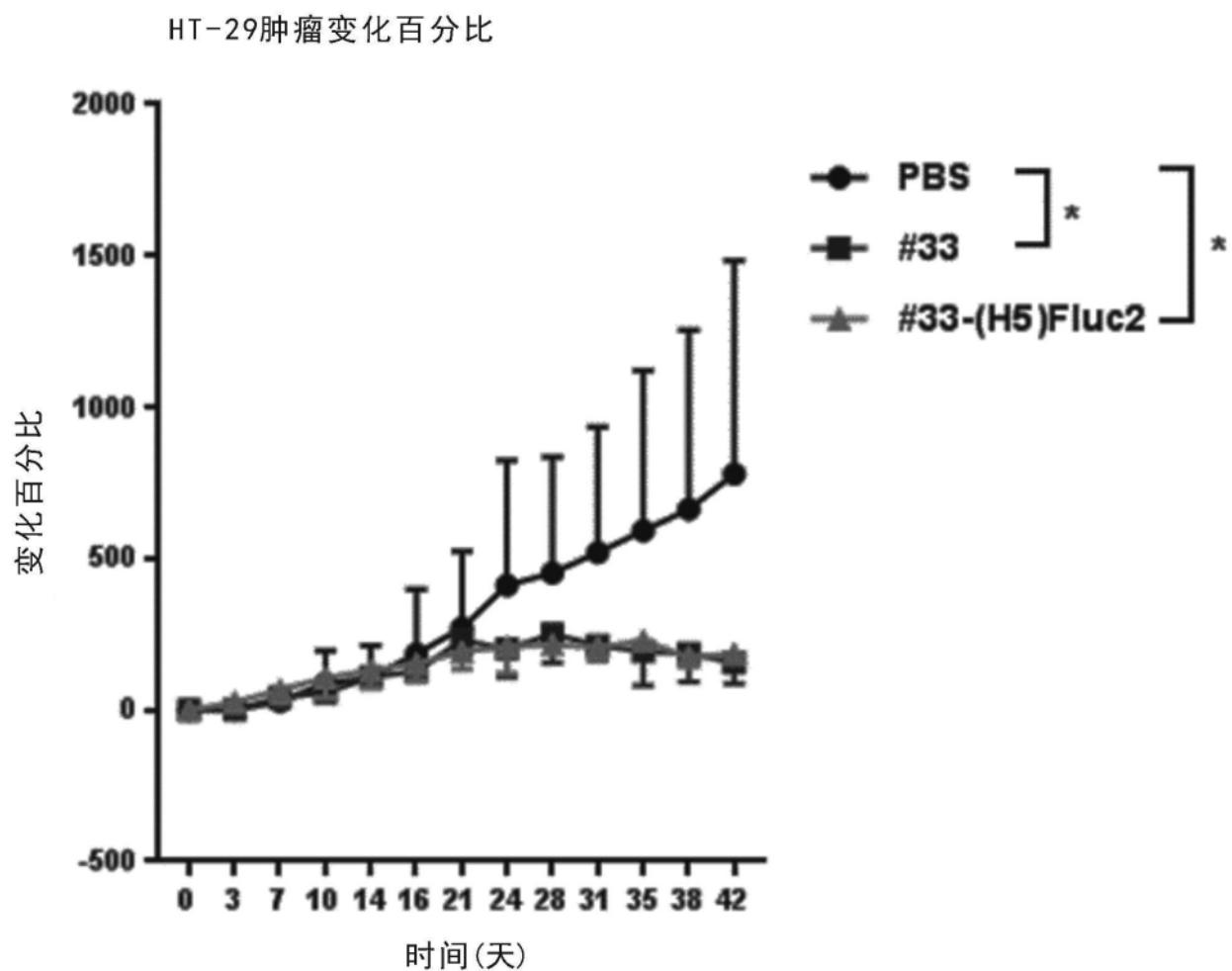


图24

HT-29平均荧光酶素相对单位

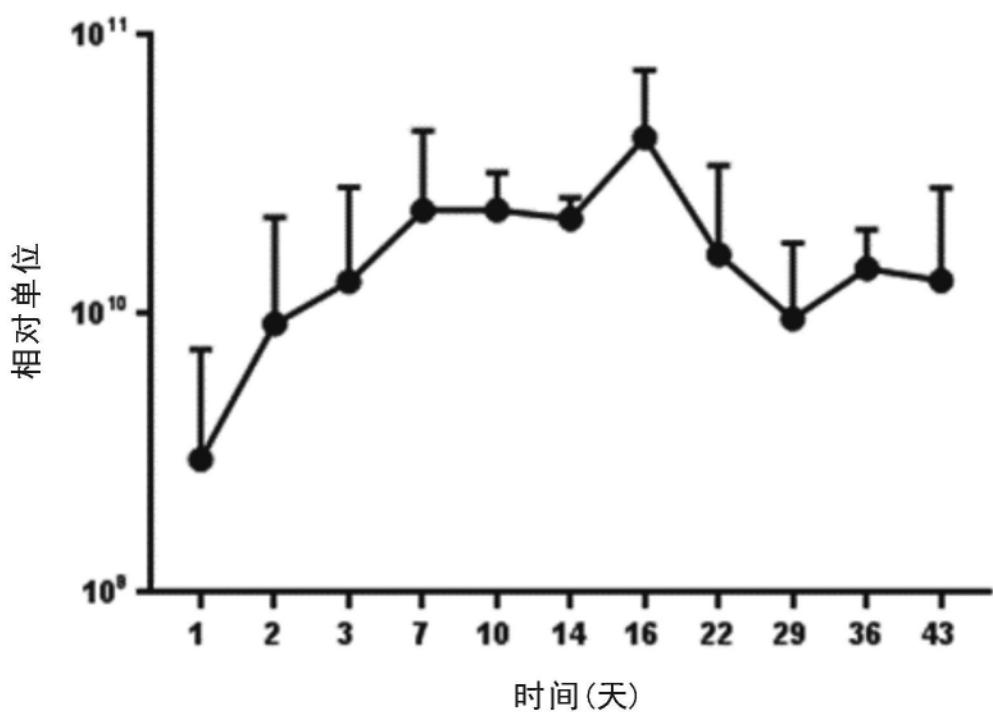


图25

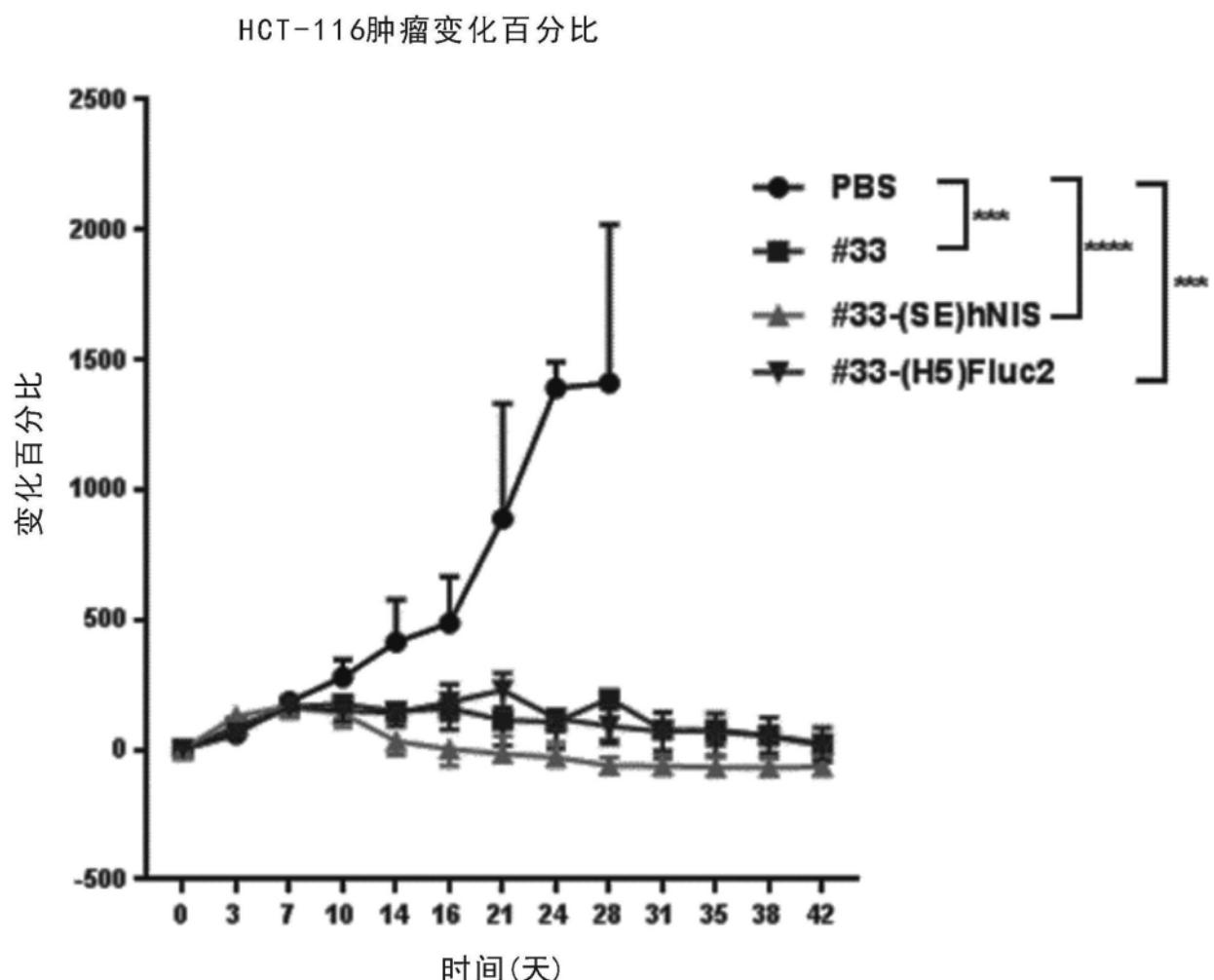


图26

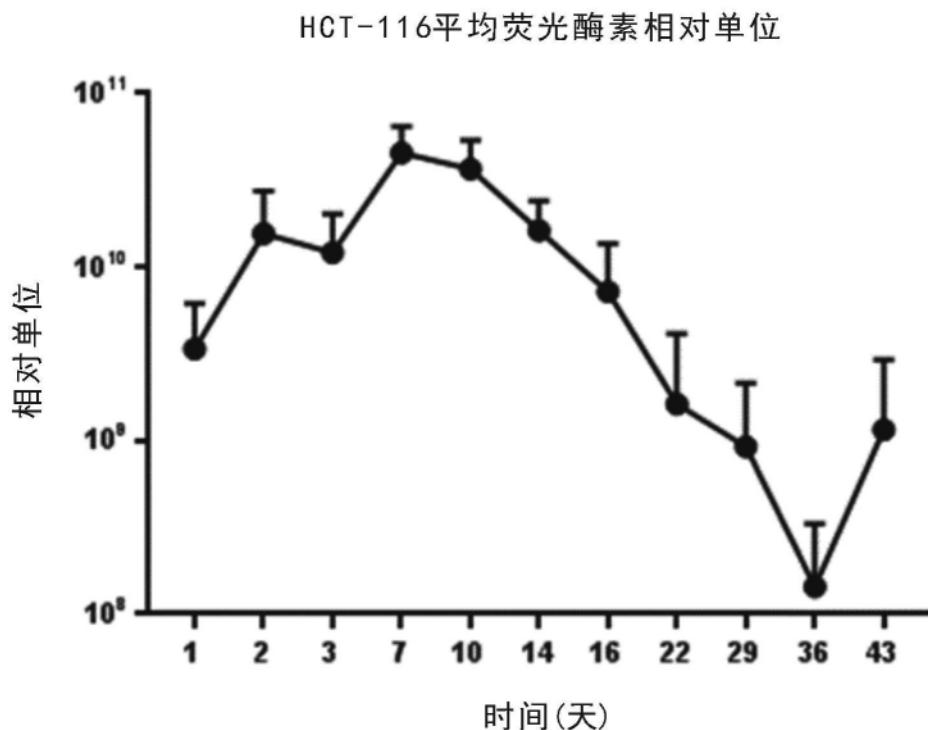


图27

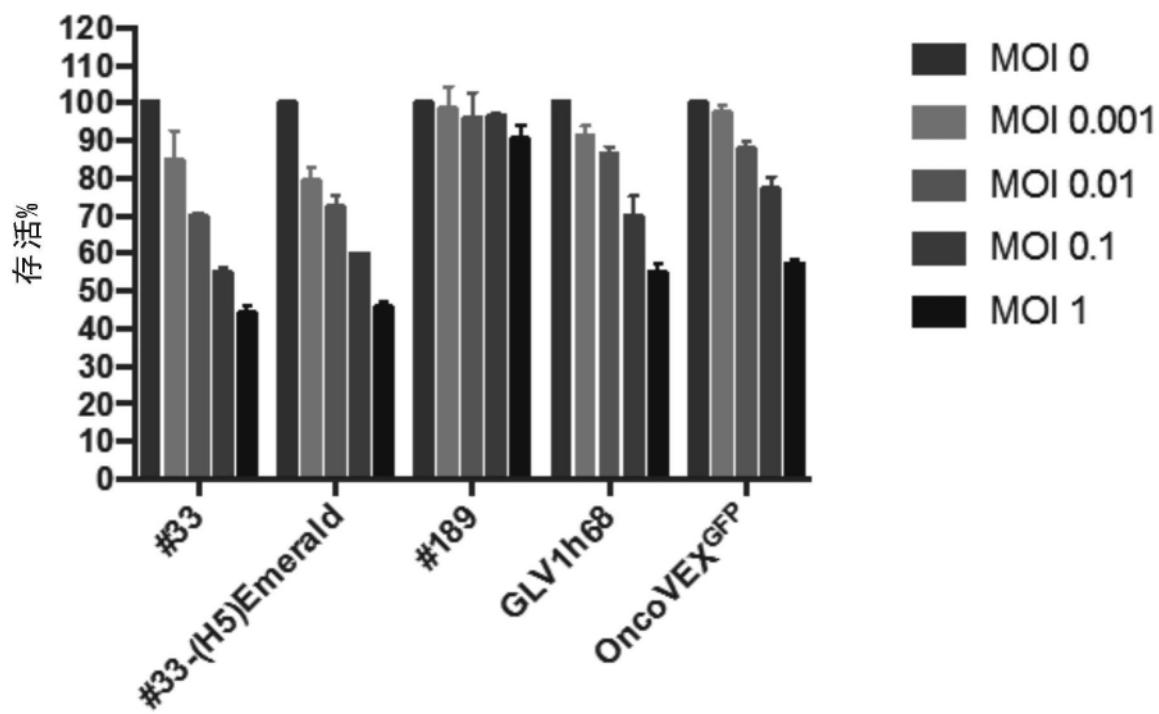
**A549**

图28A

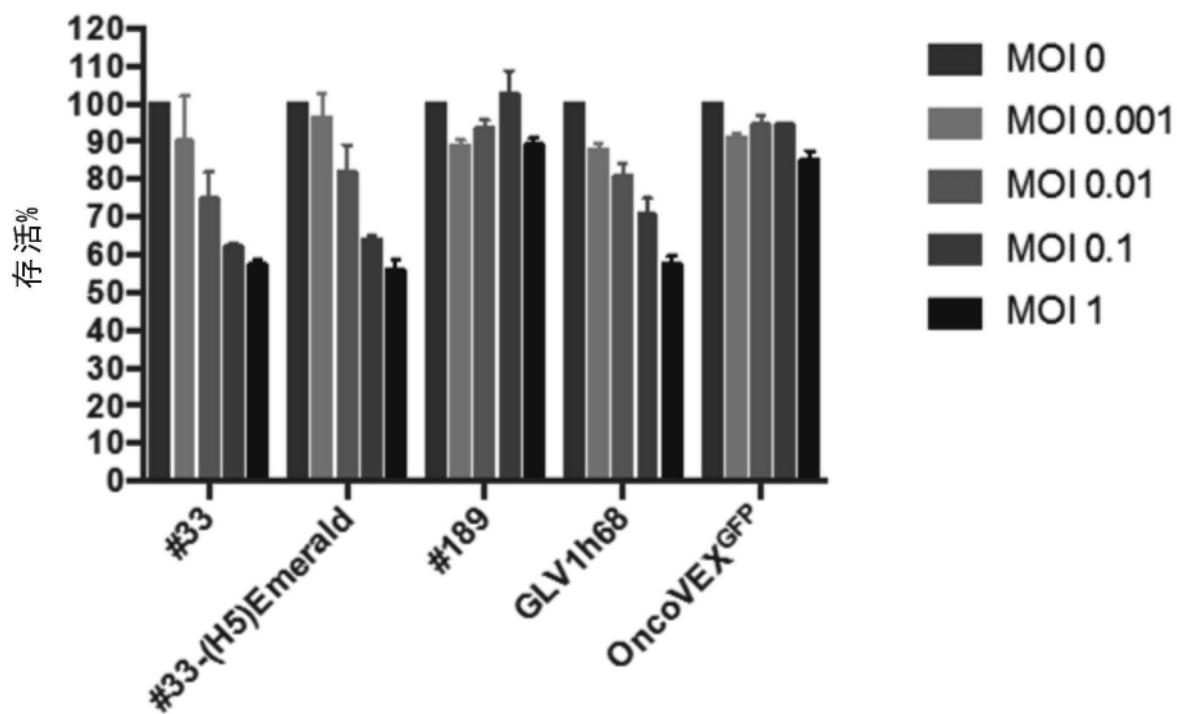
**H2199**

图28B

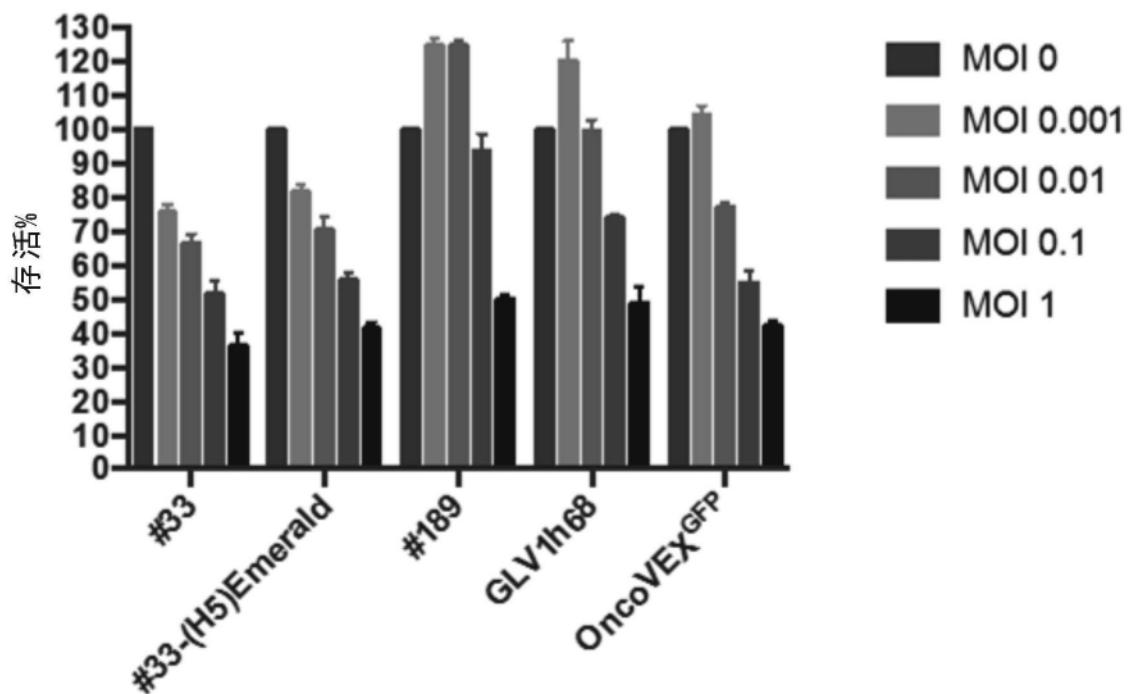
**HF1成纤维细胞**

图28C

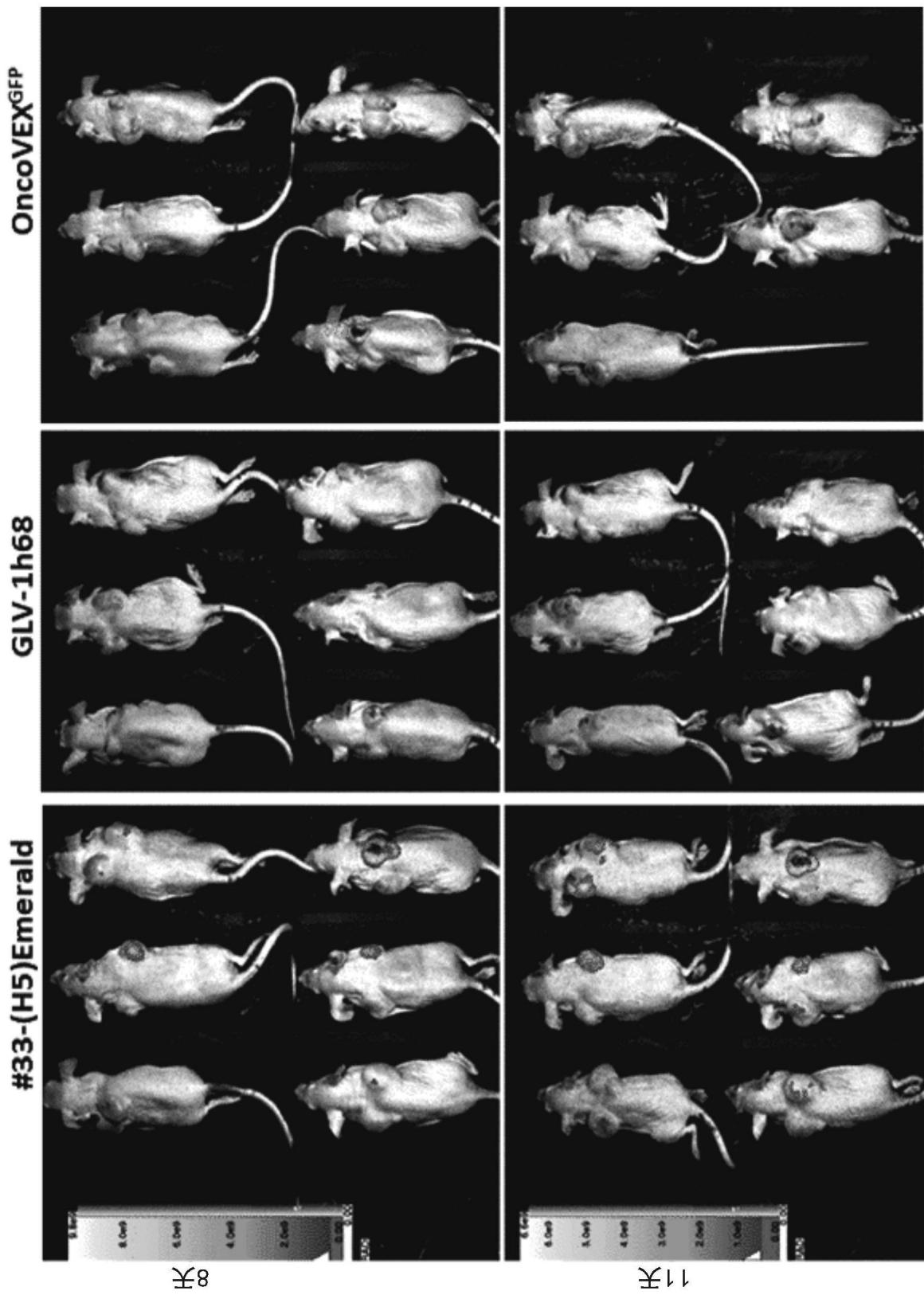


图29

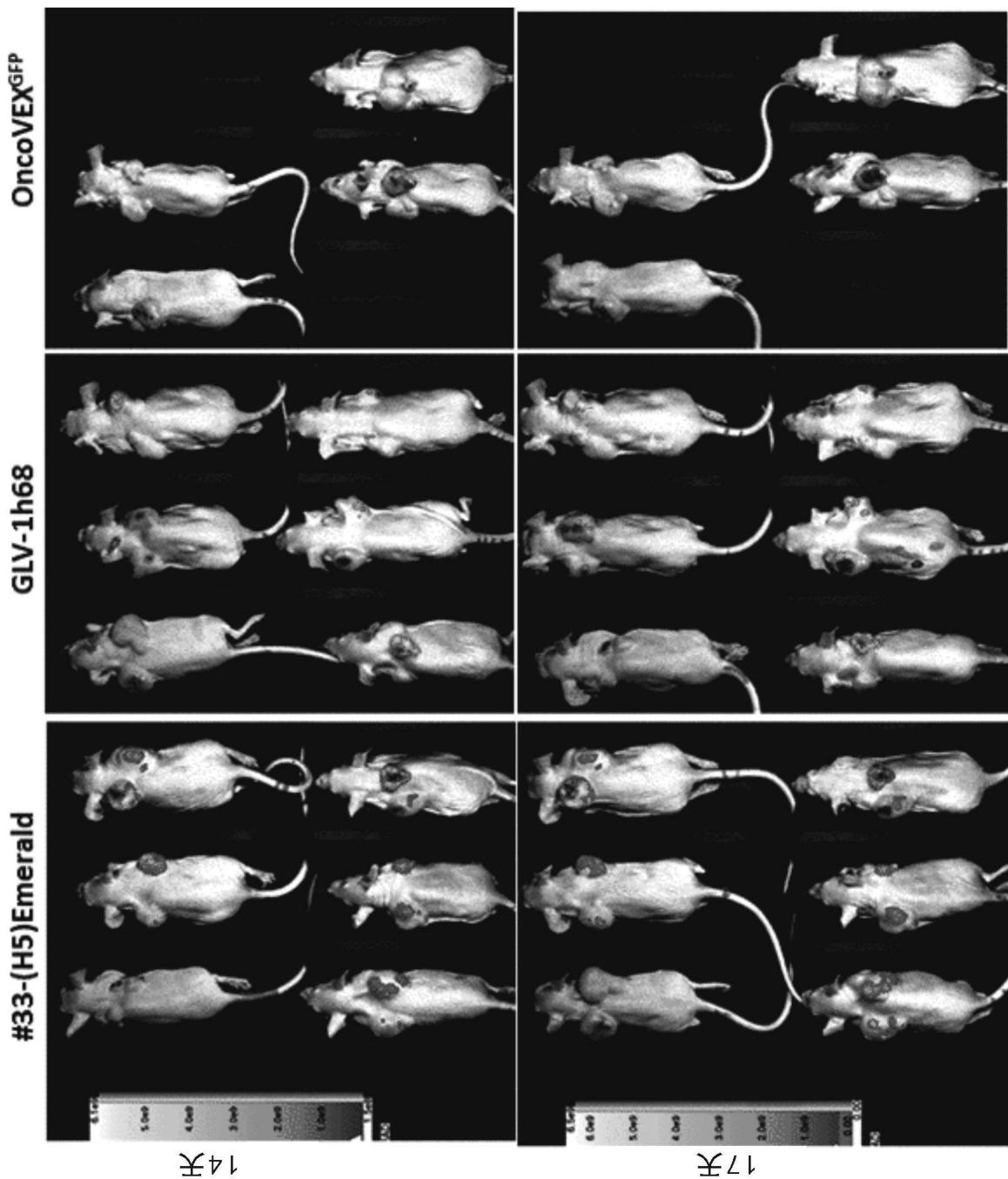


图29续

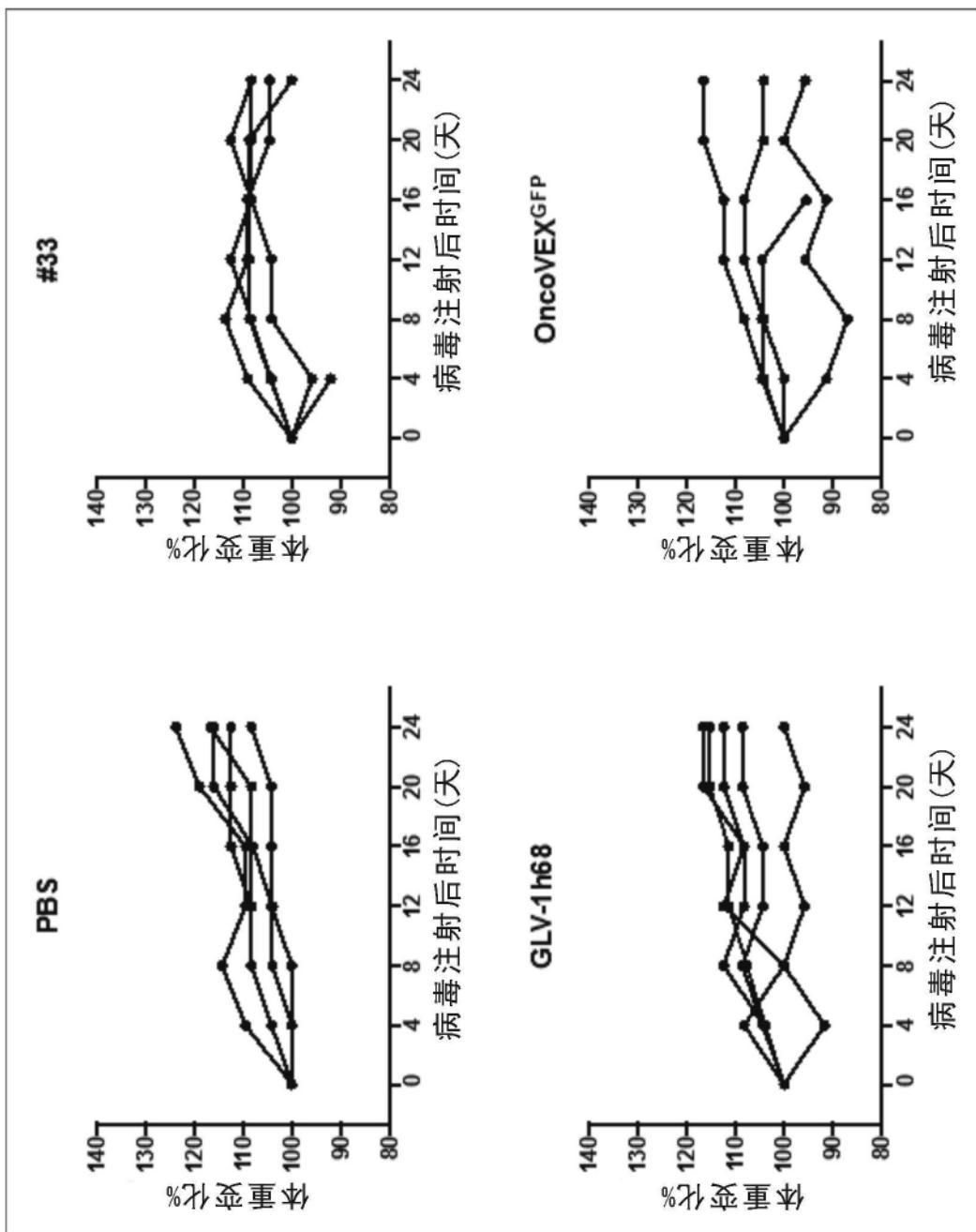


图30

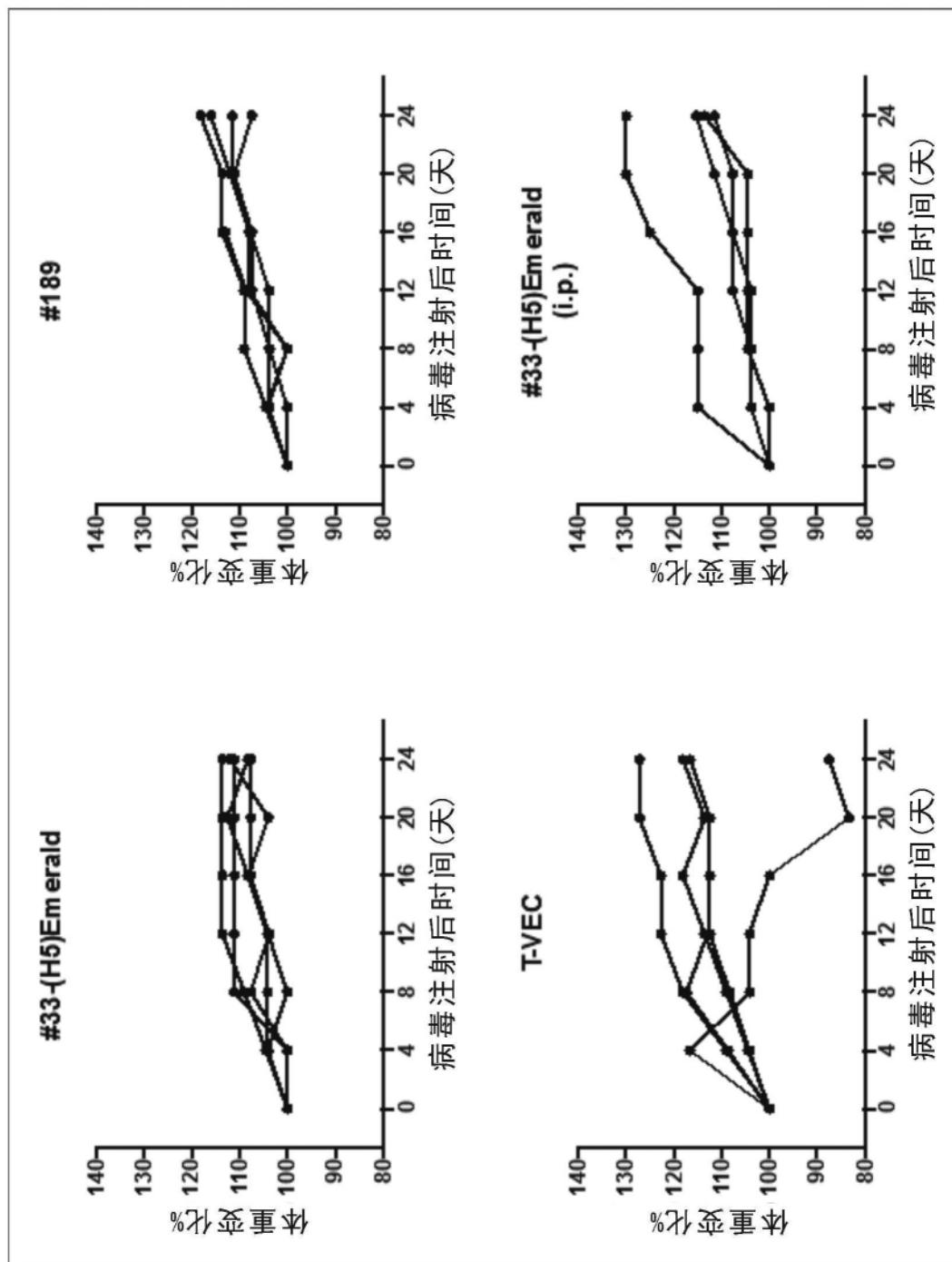


图30续

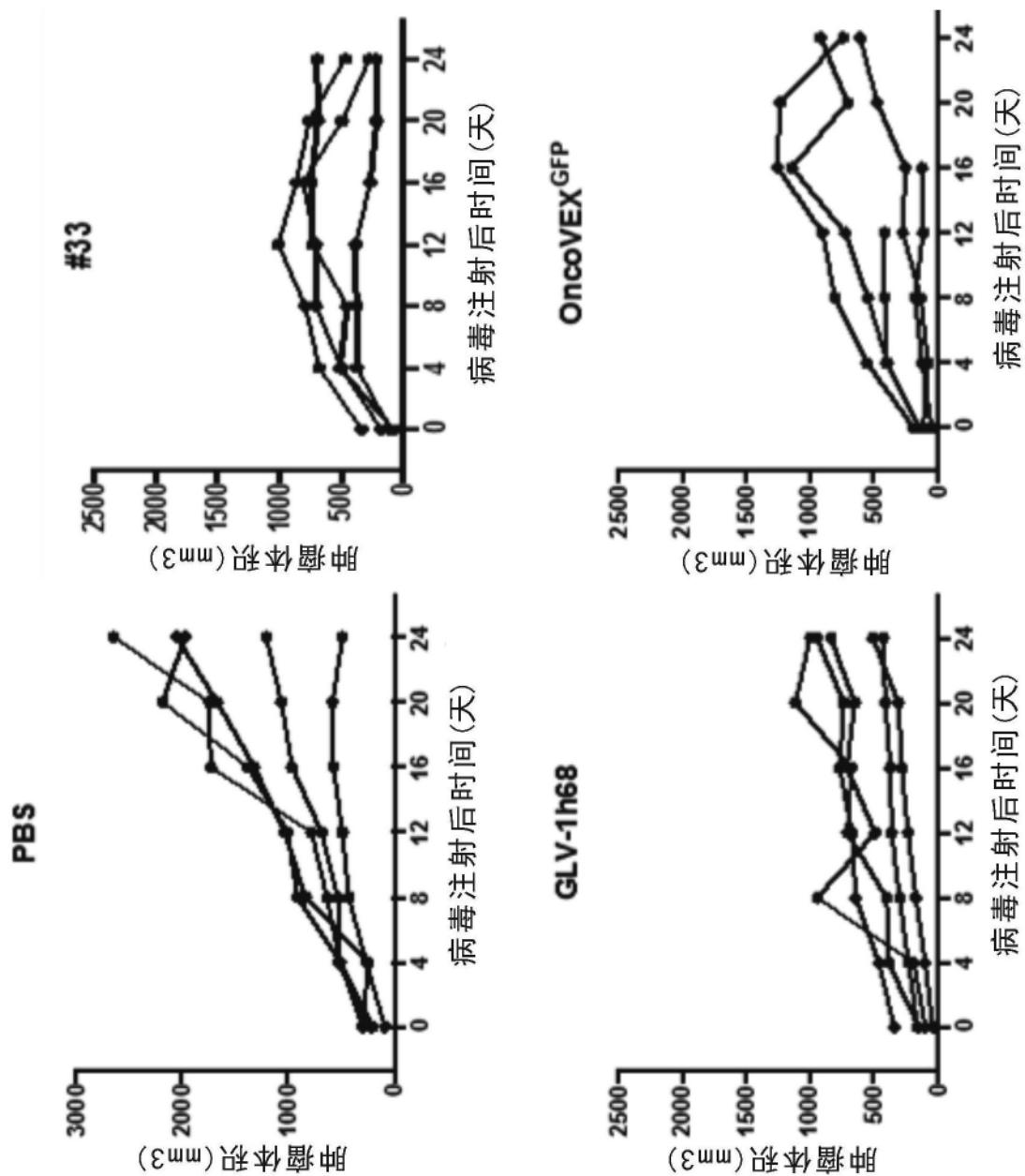


图31A

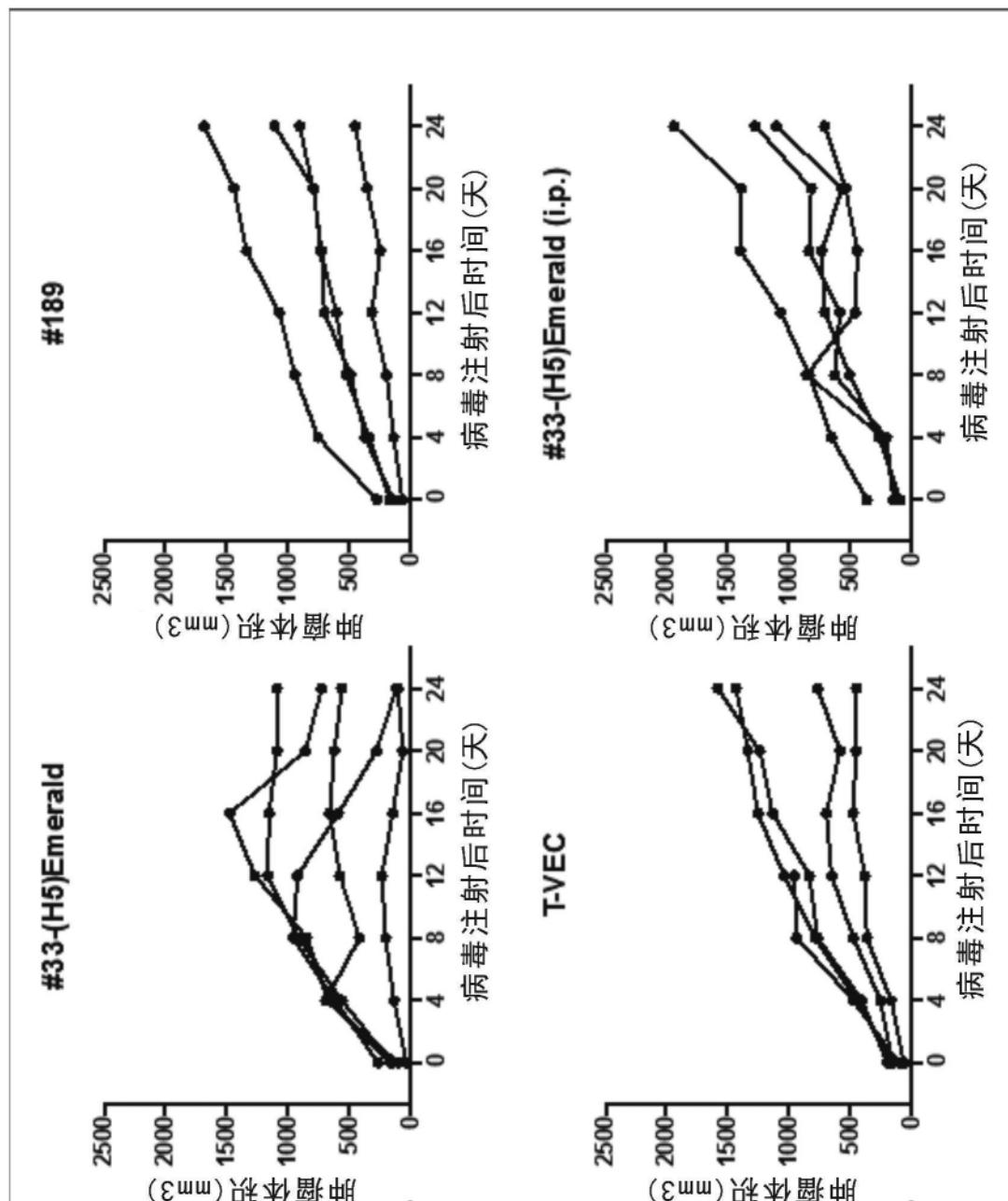


图31A续

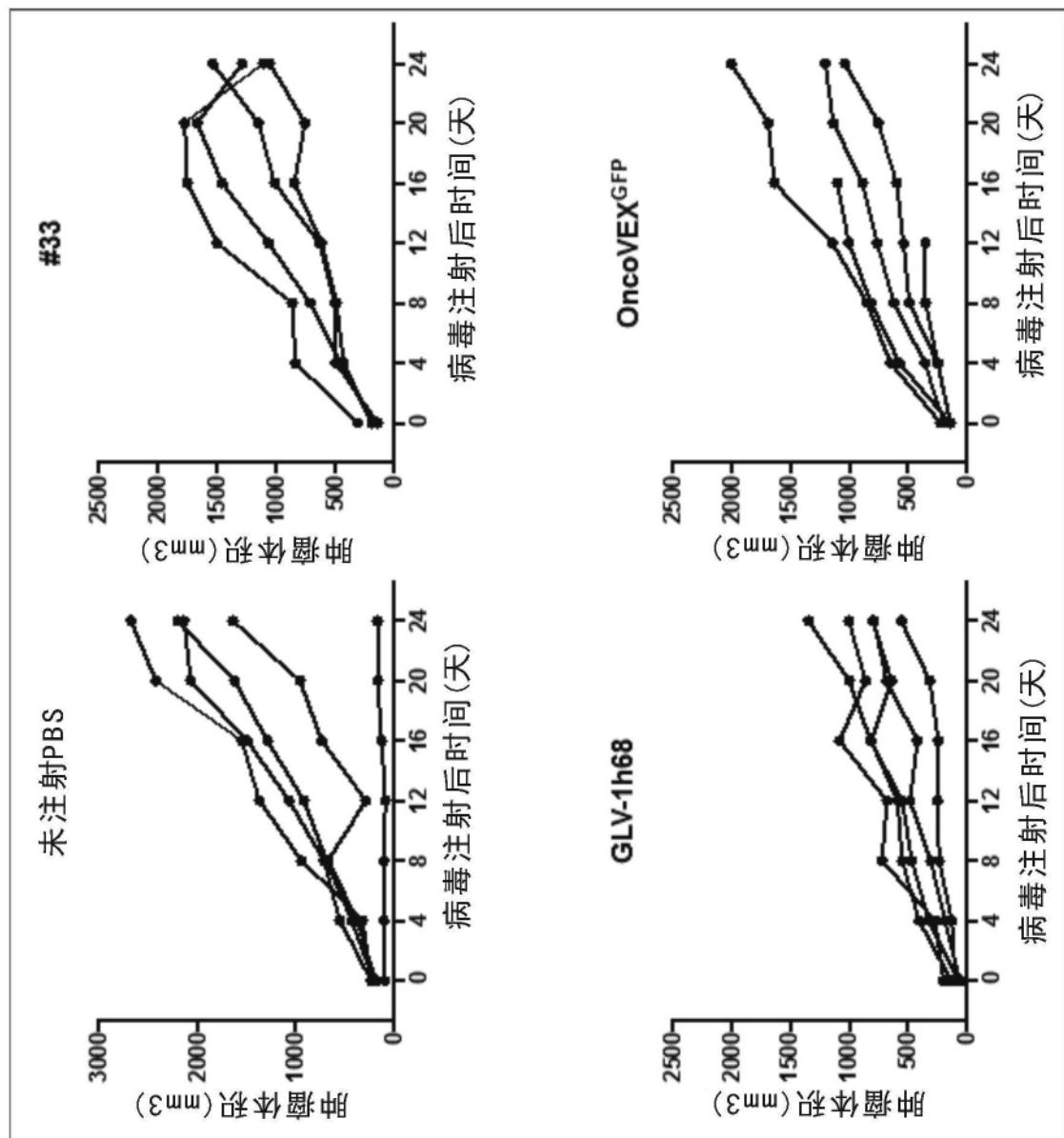


图31B

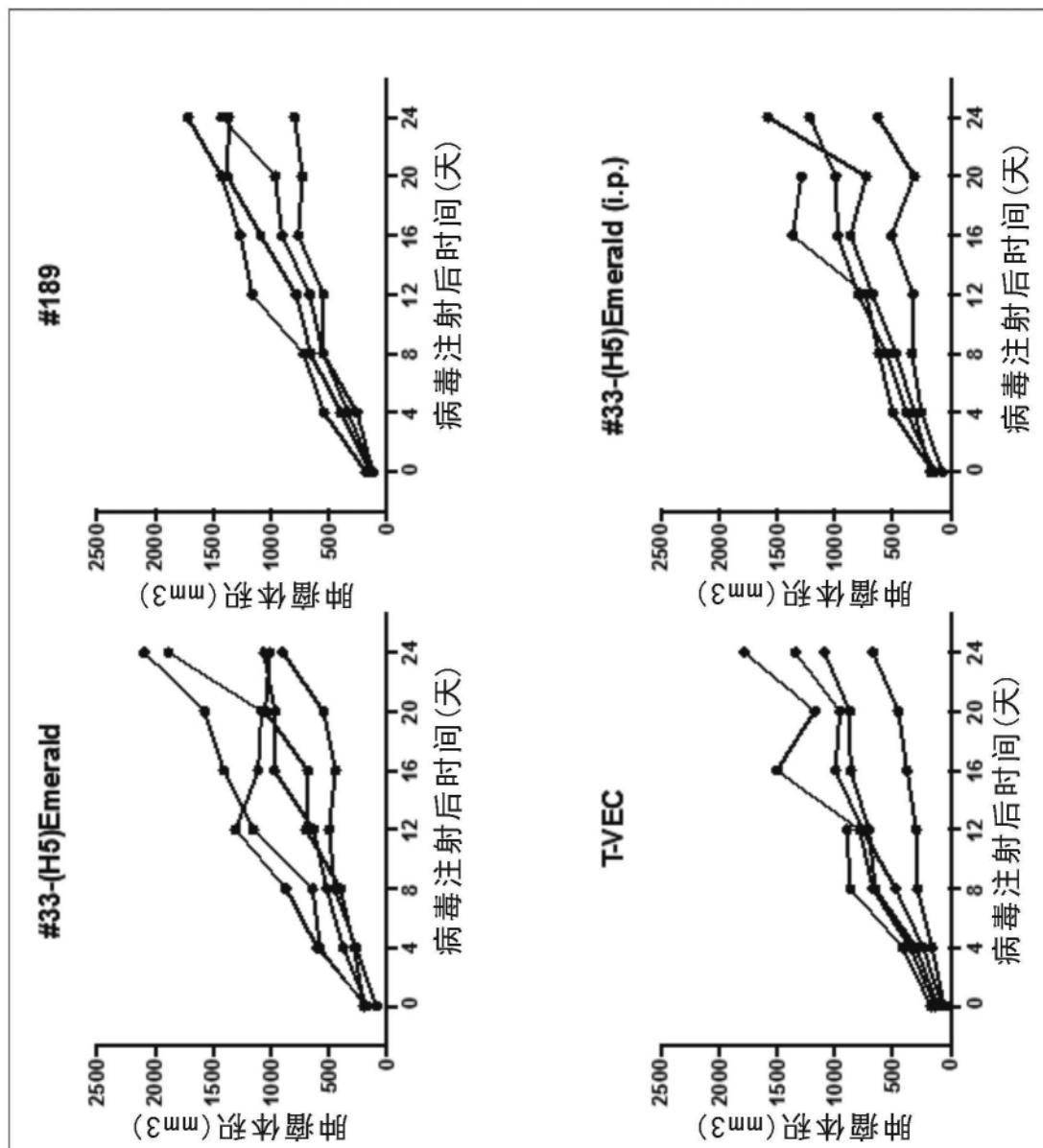


图31B续

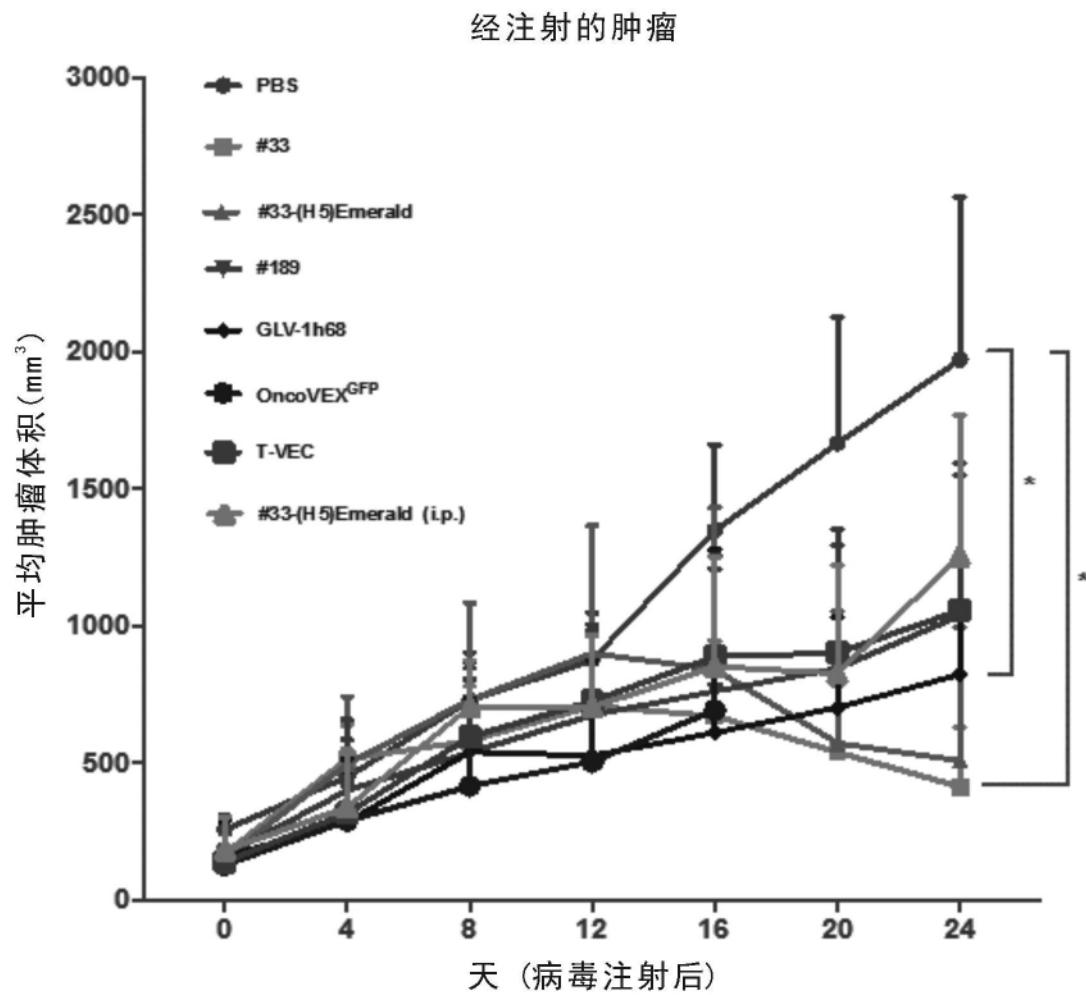


图32

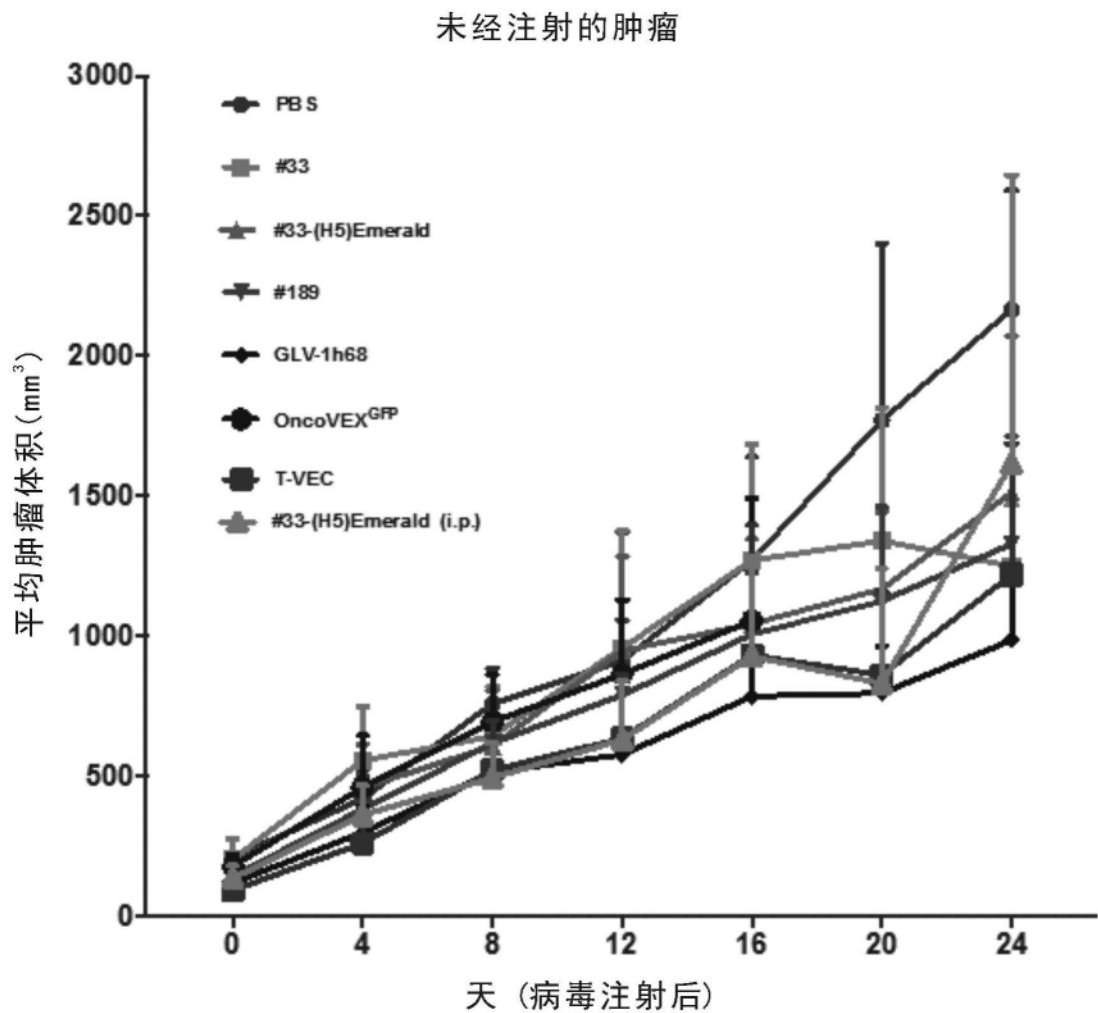


图33

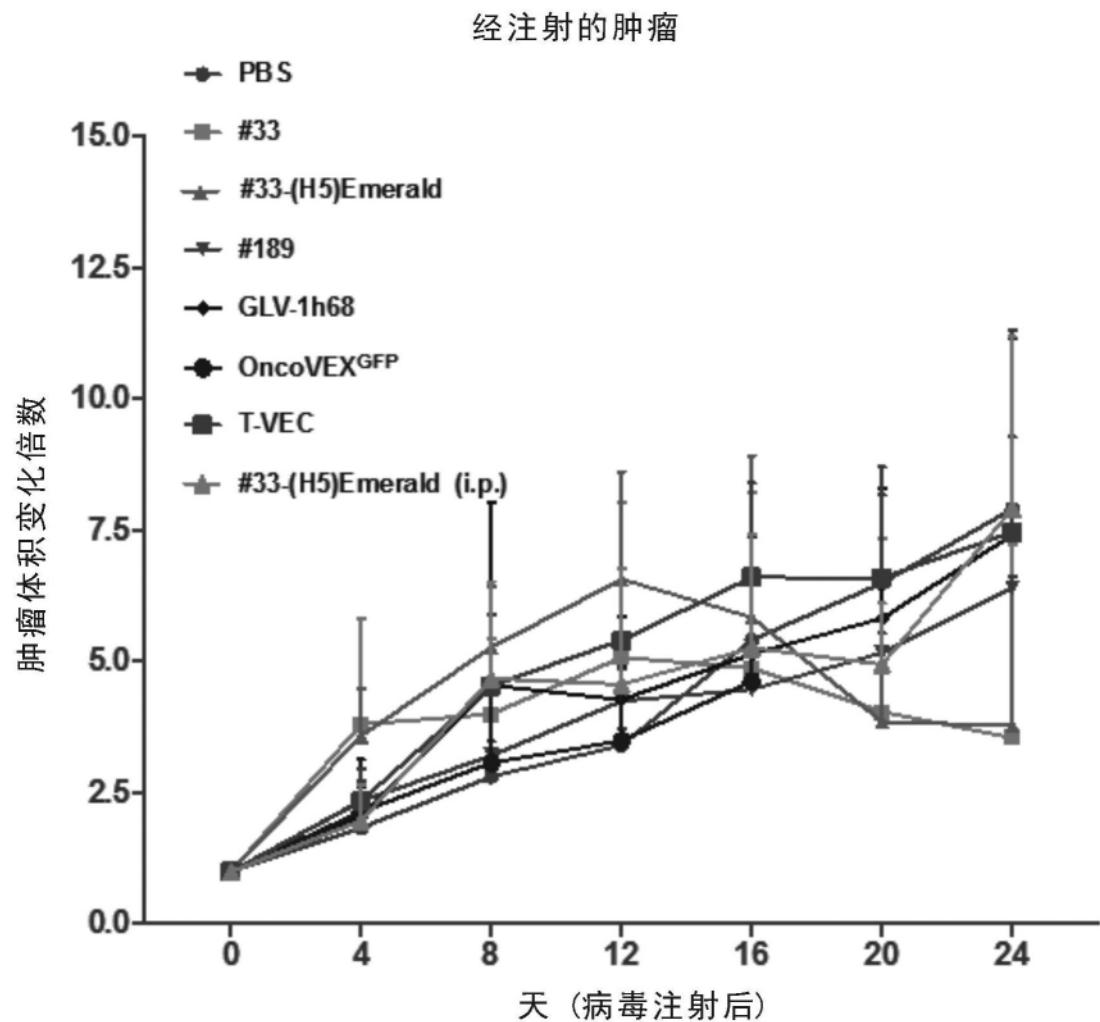


图34A

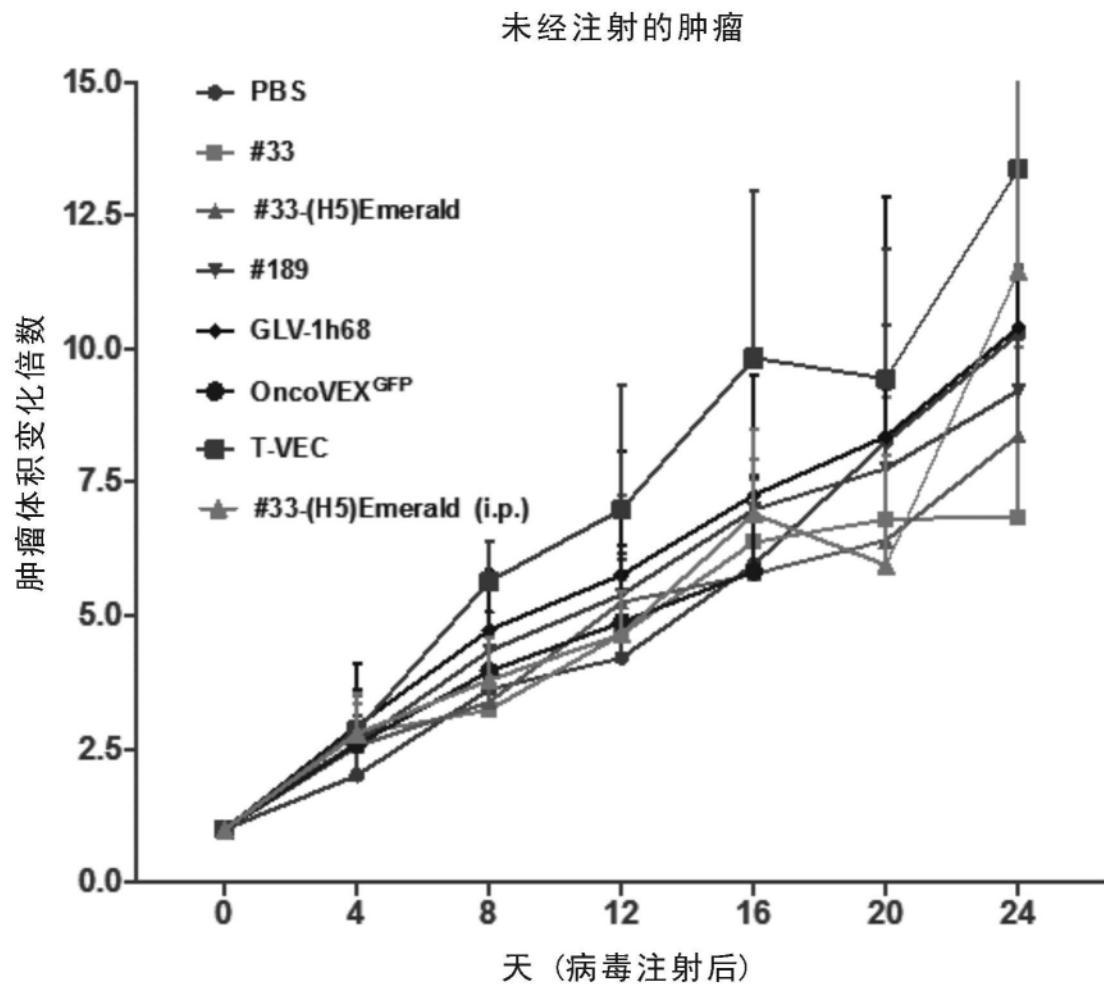


图34B

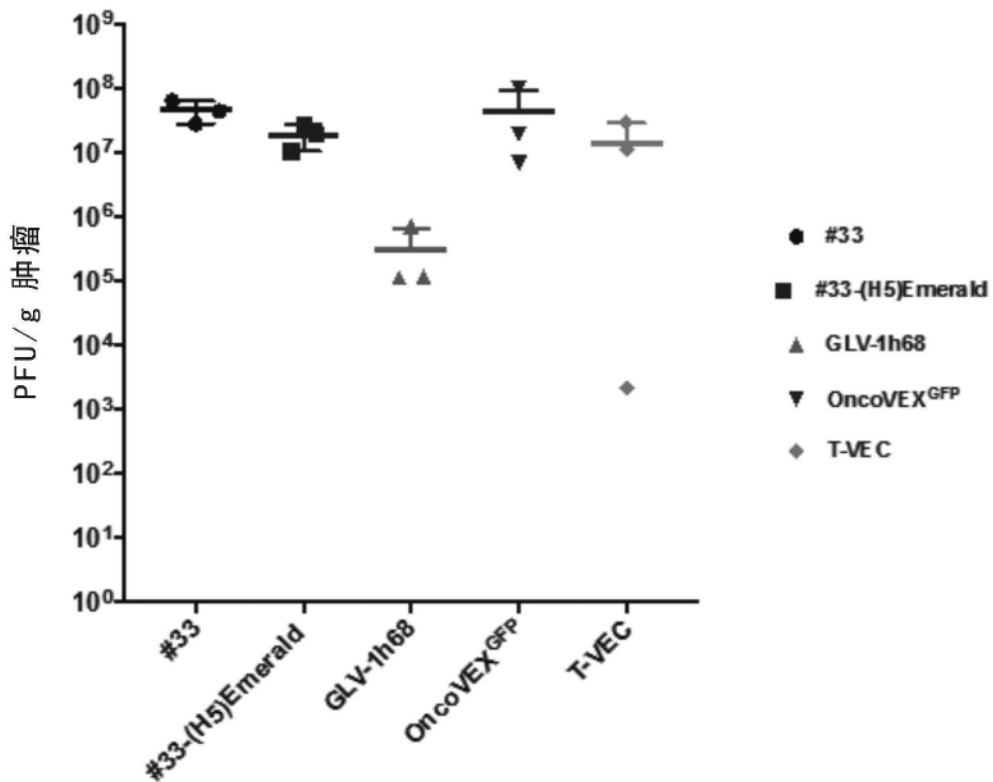


图35A

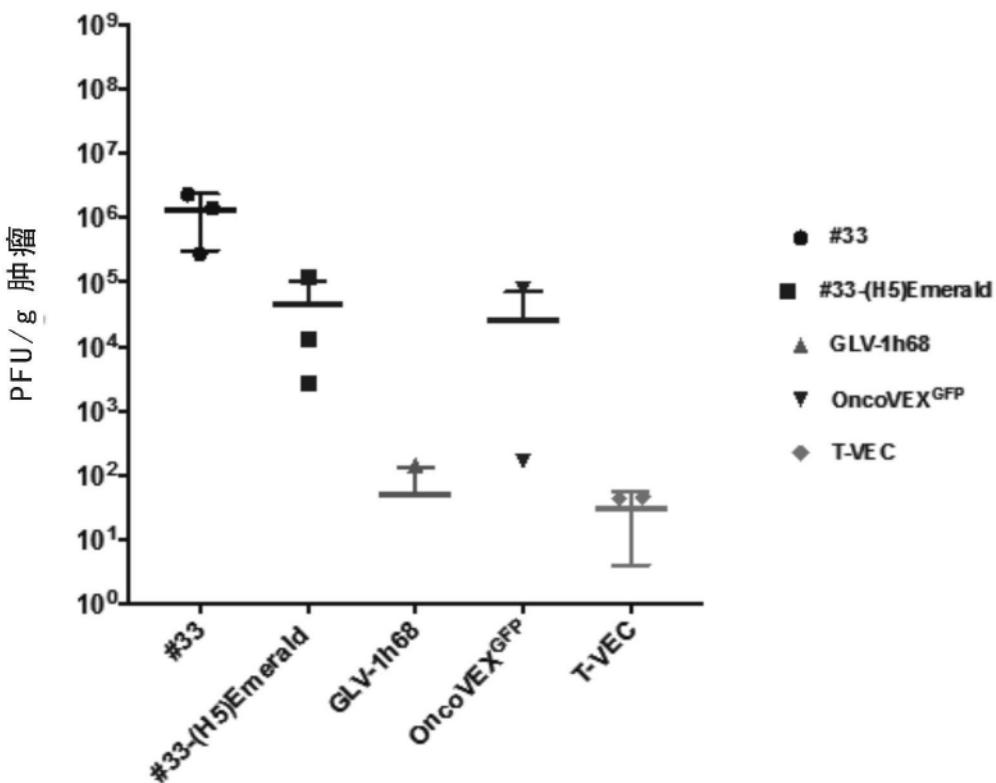


图35B

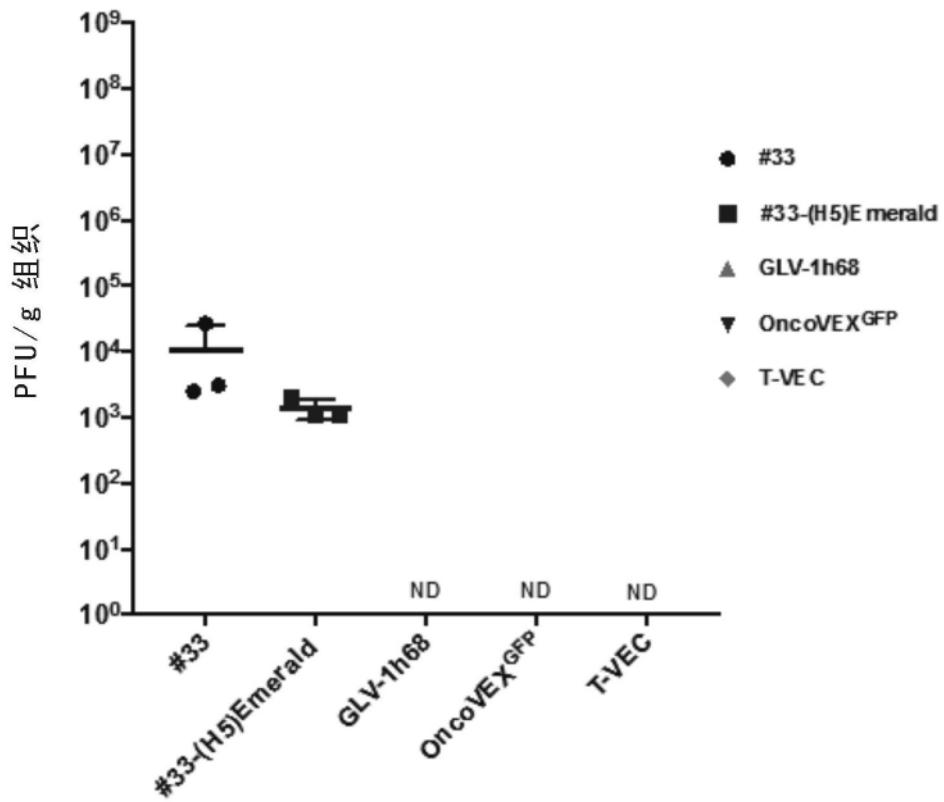


图36

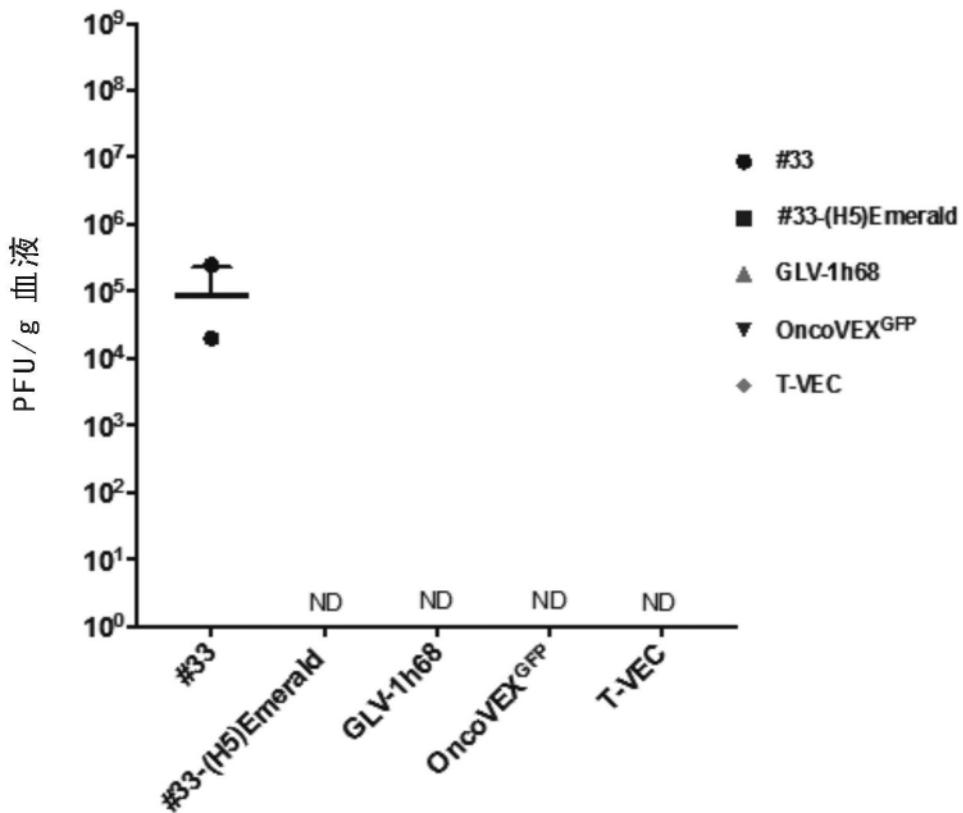


图37

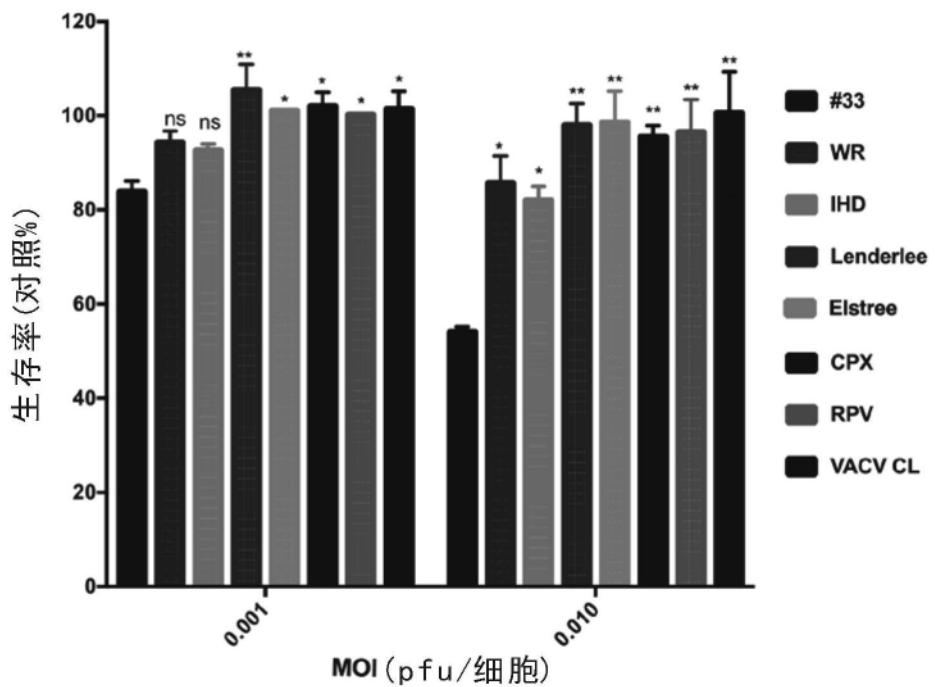
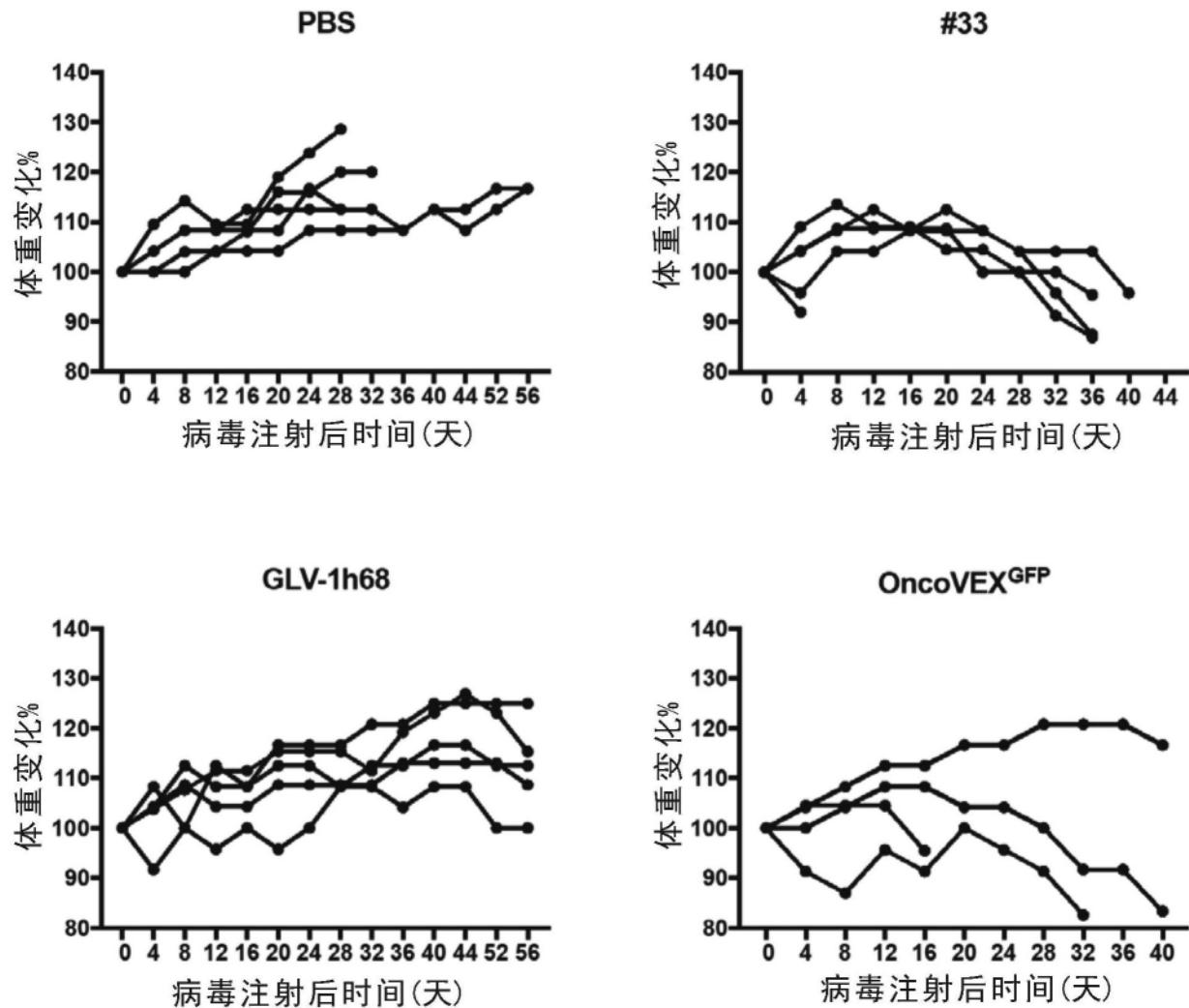


图38



冬 39

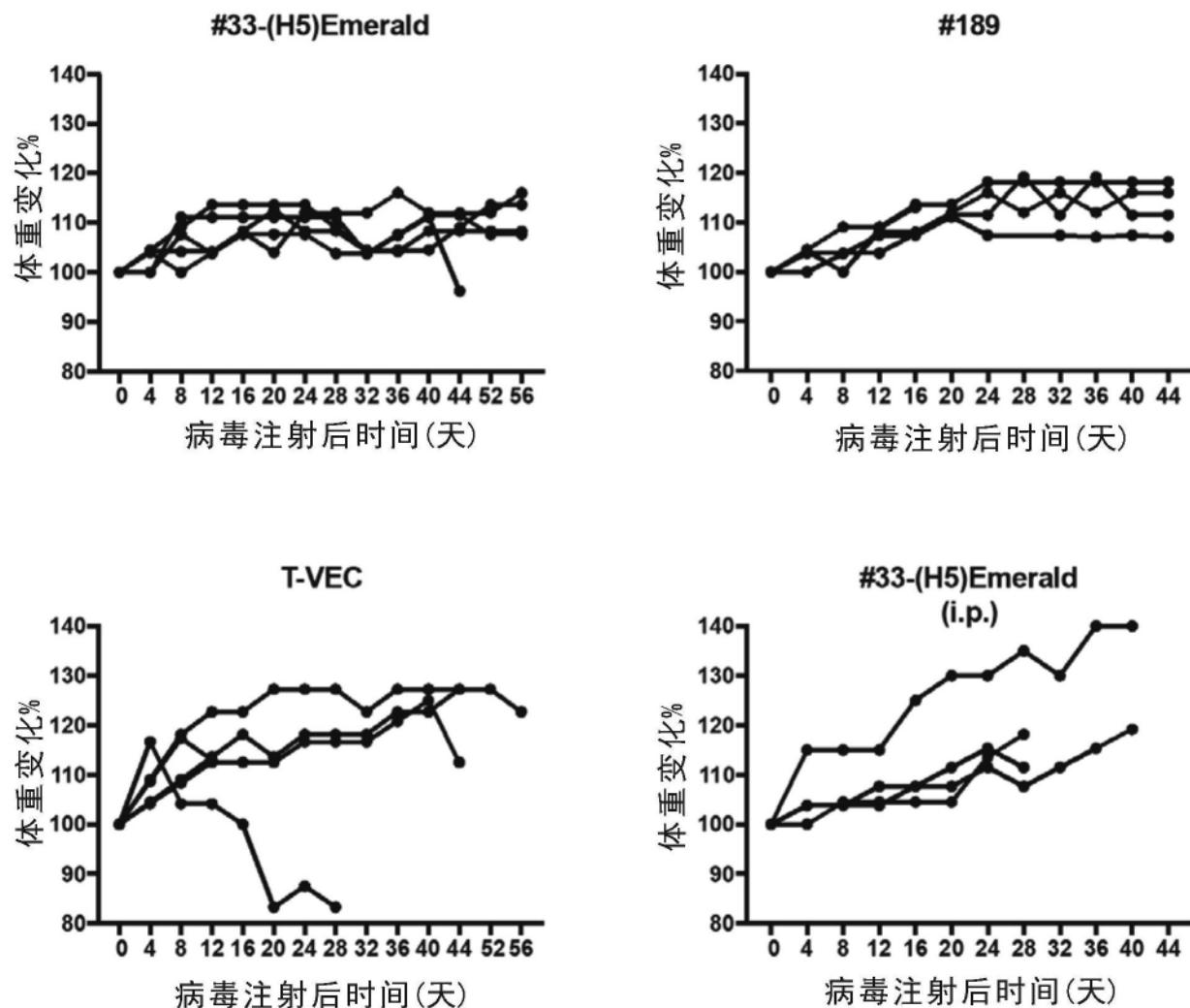


图39续

## 经病毒注射的肿瘤的体积

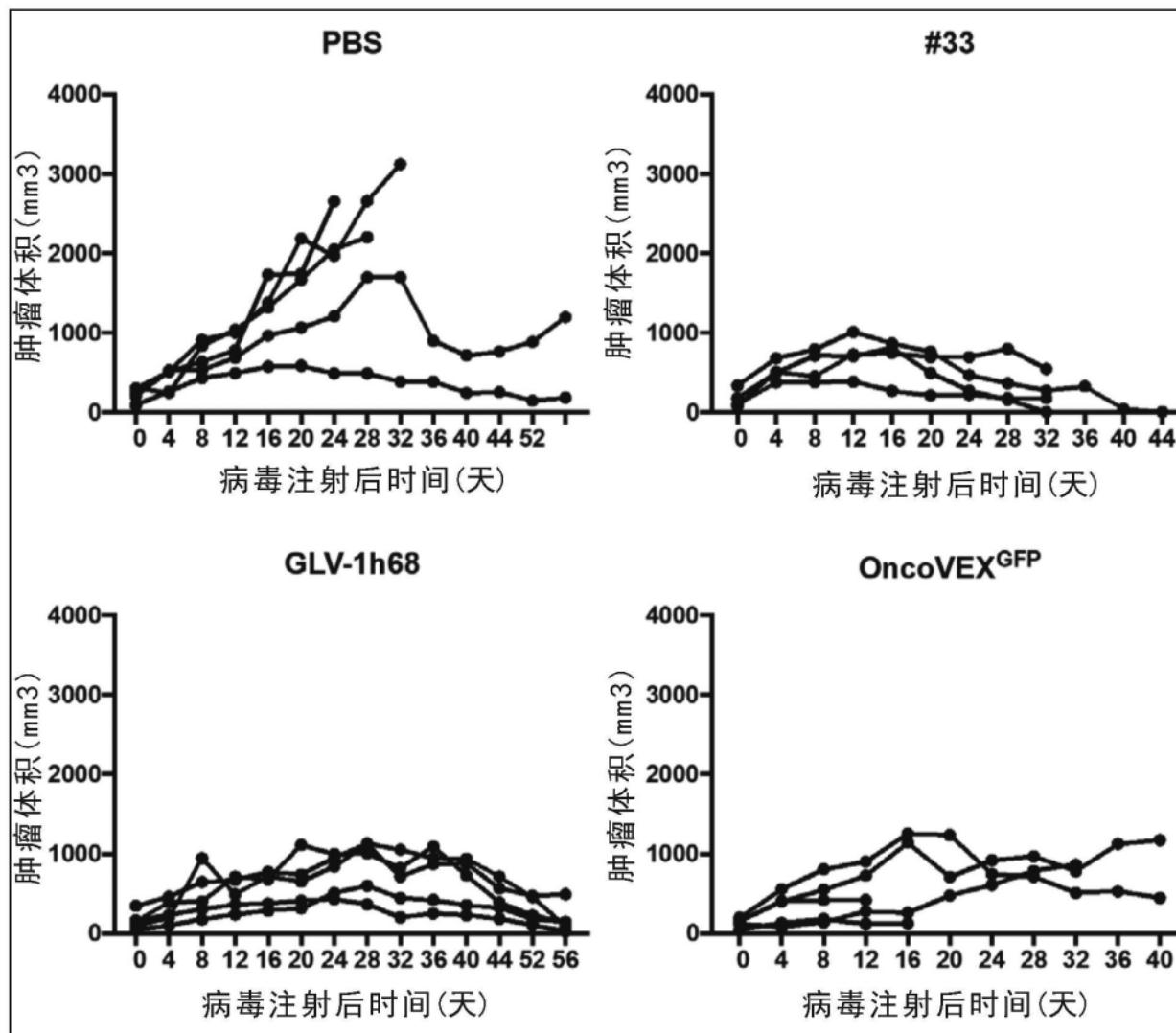


图40

## 经病毒注射的肿瘤的体积

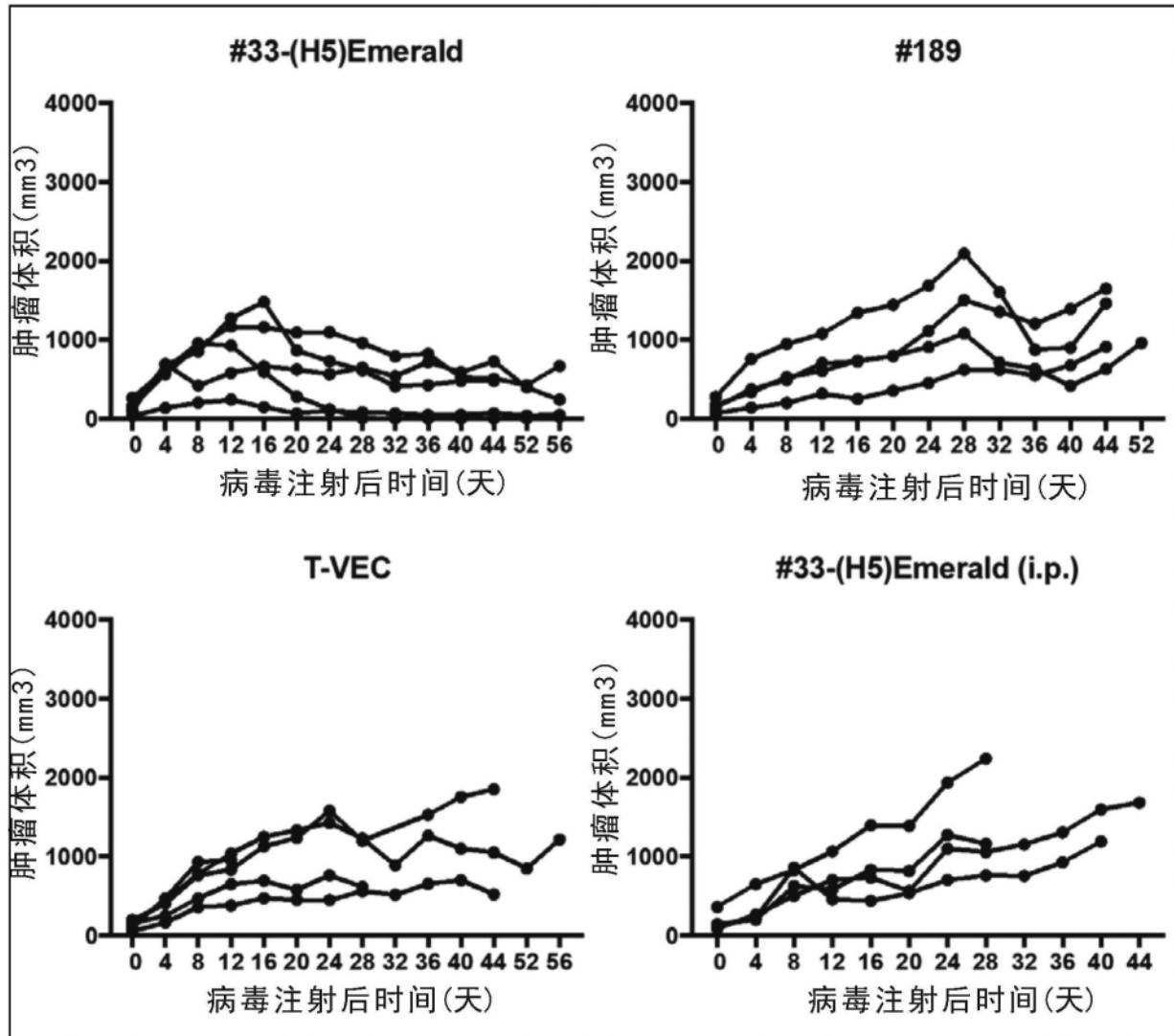


图40续

## 未经病毒注射的肿瘤的体积

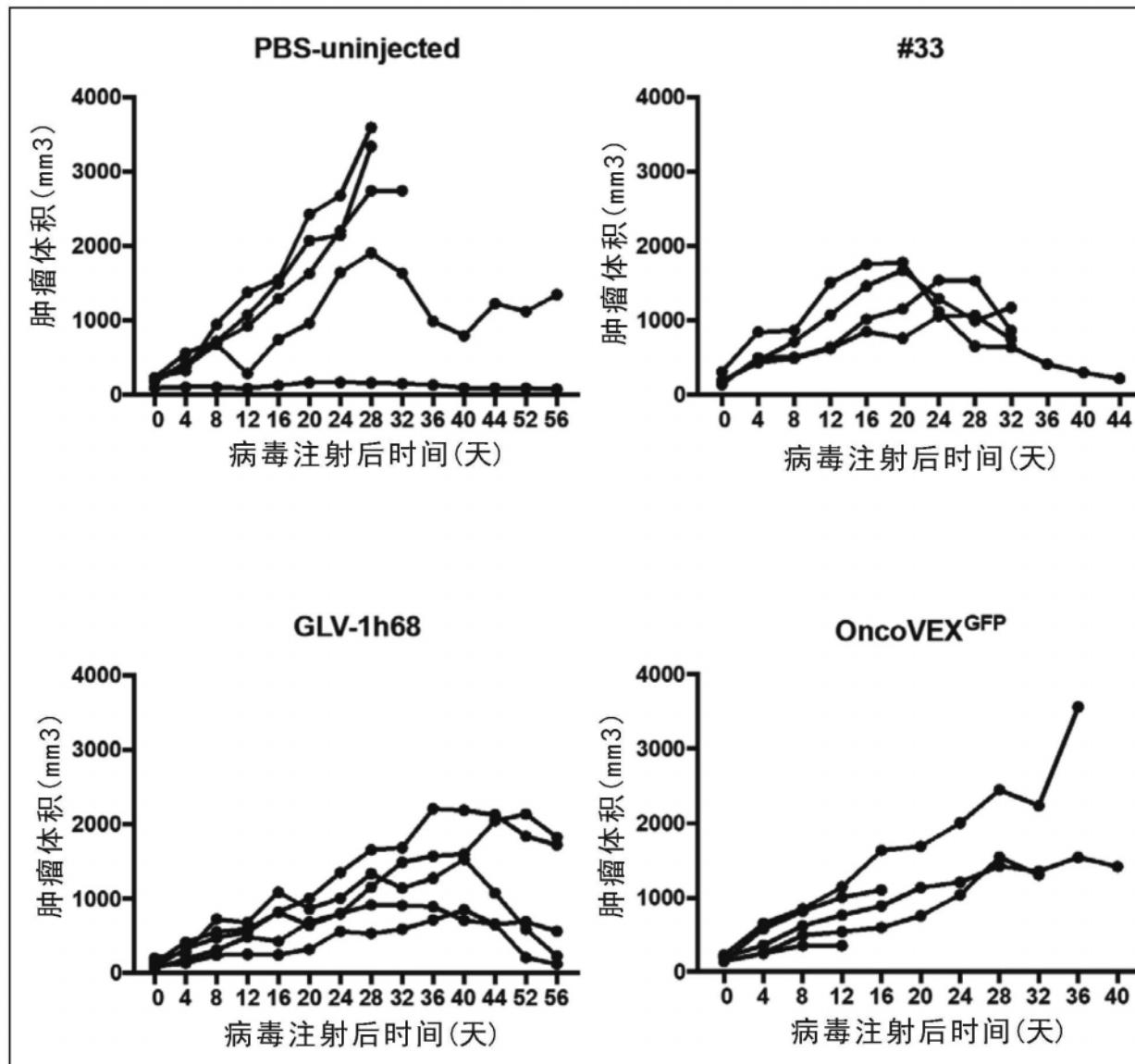


图40续

## 未经病毒注射的肿瘤的体积

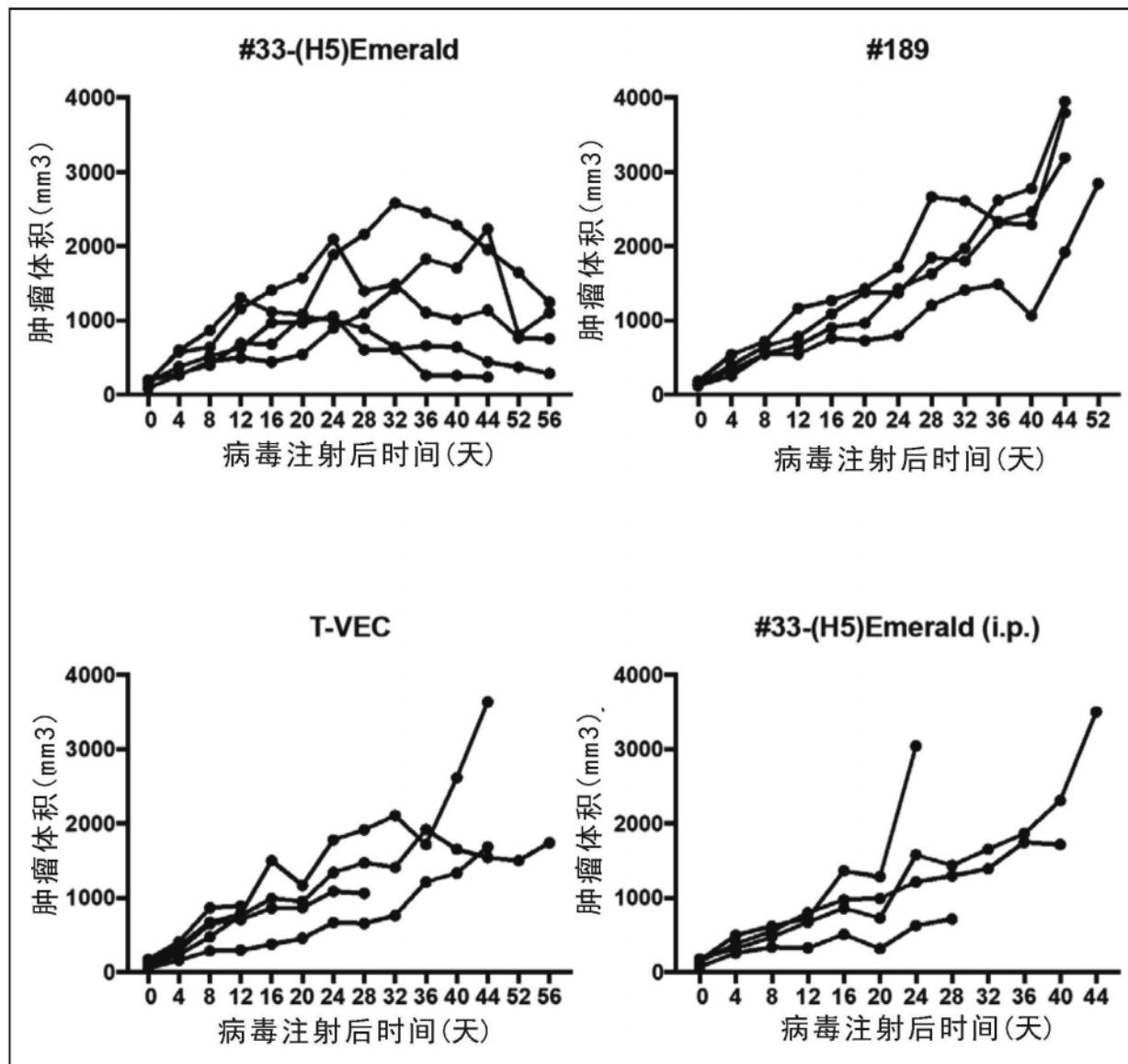


图40续

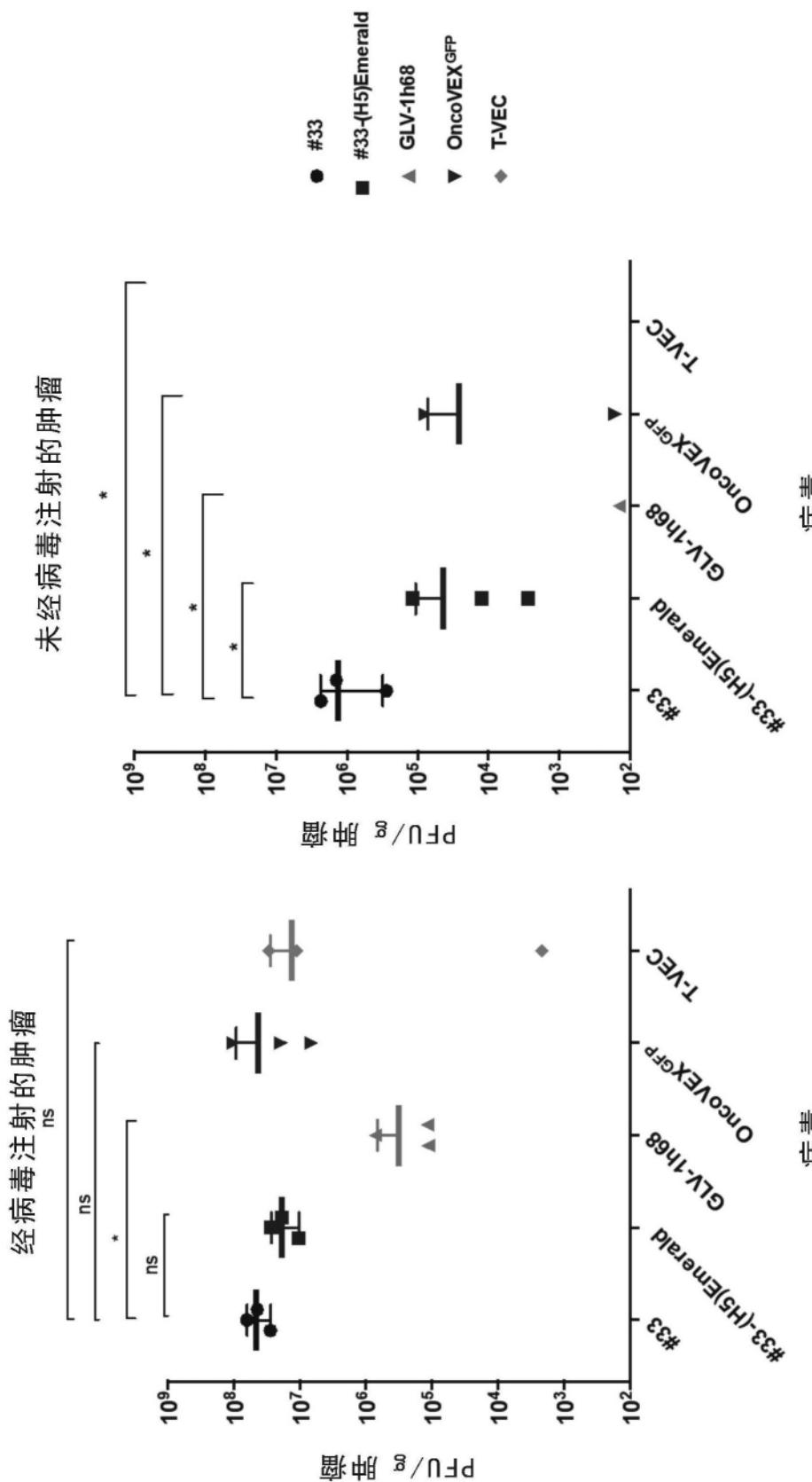


图41

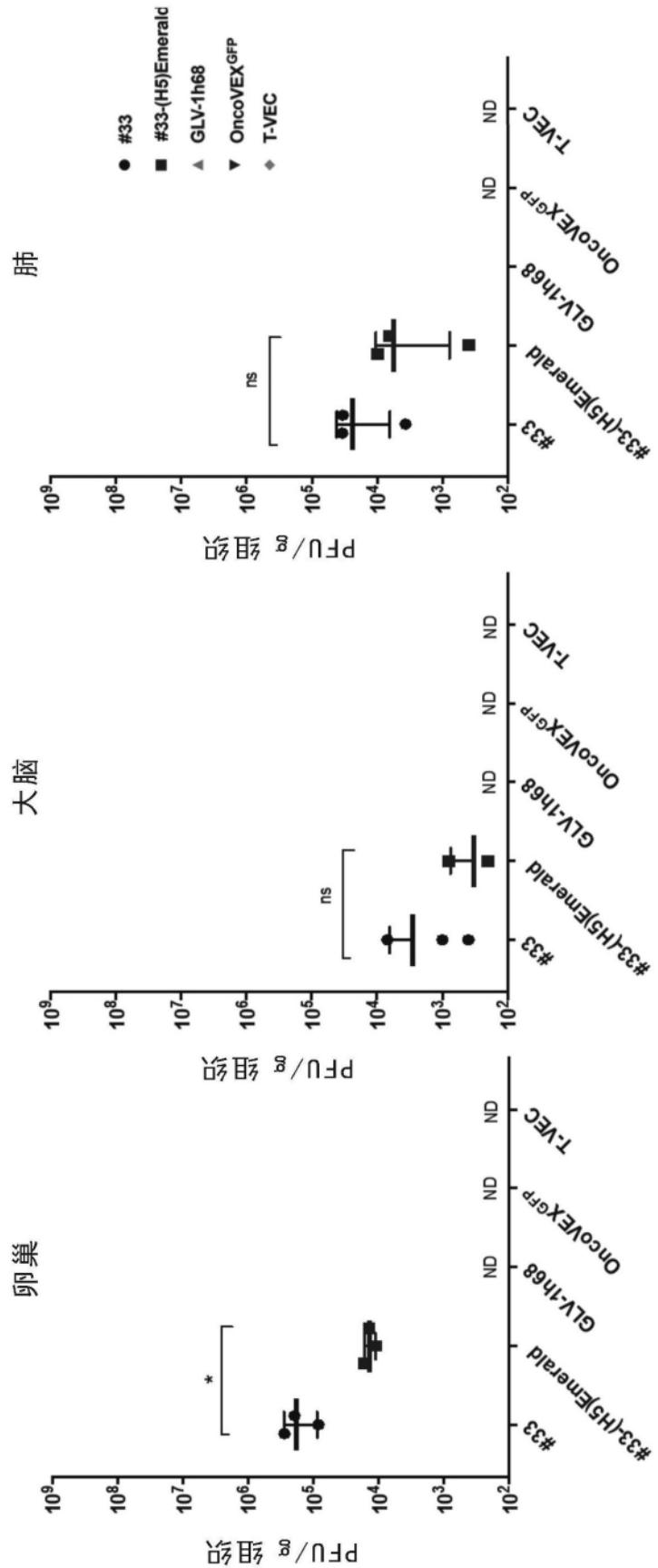


图42

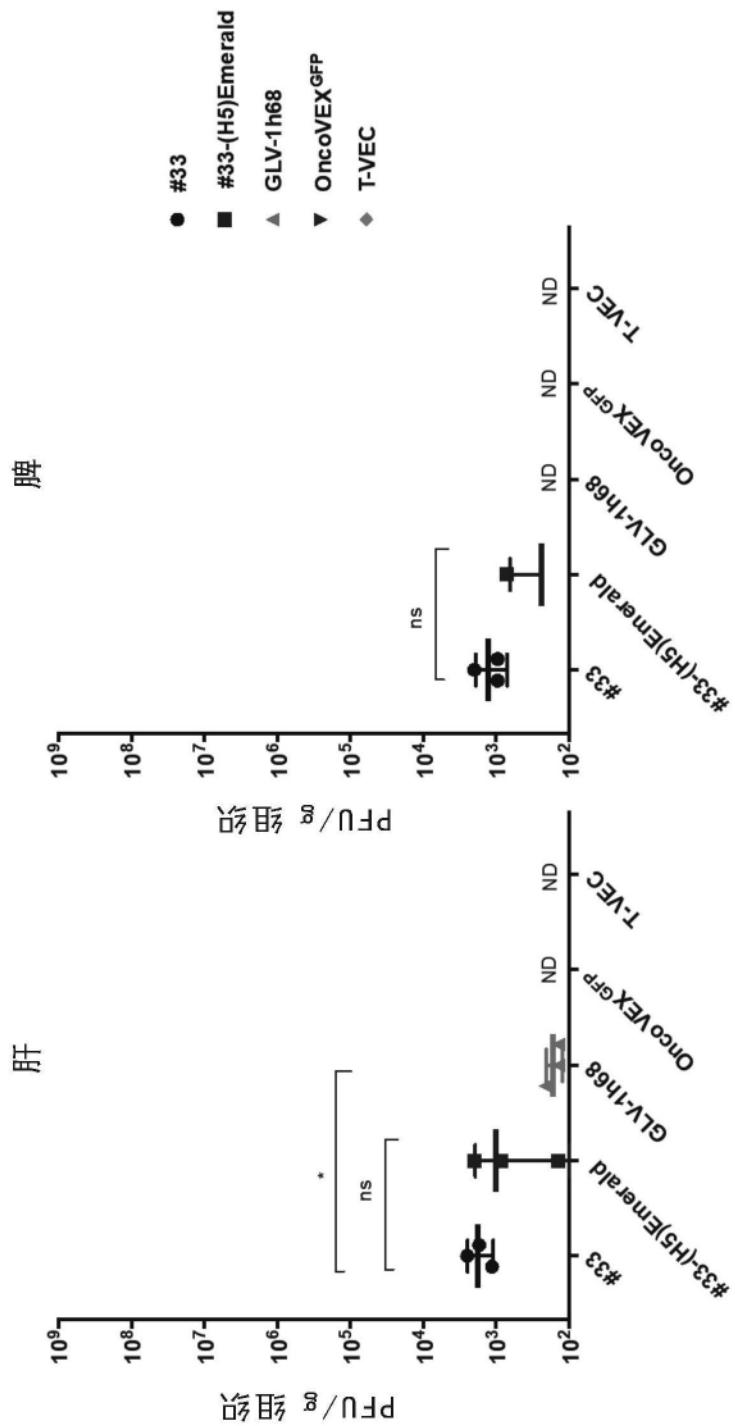


图42续

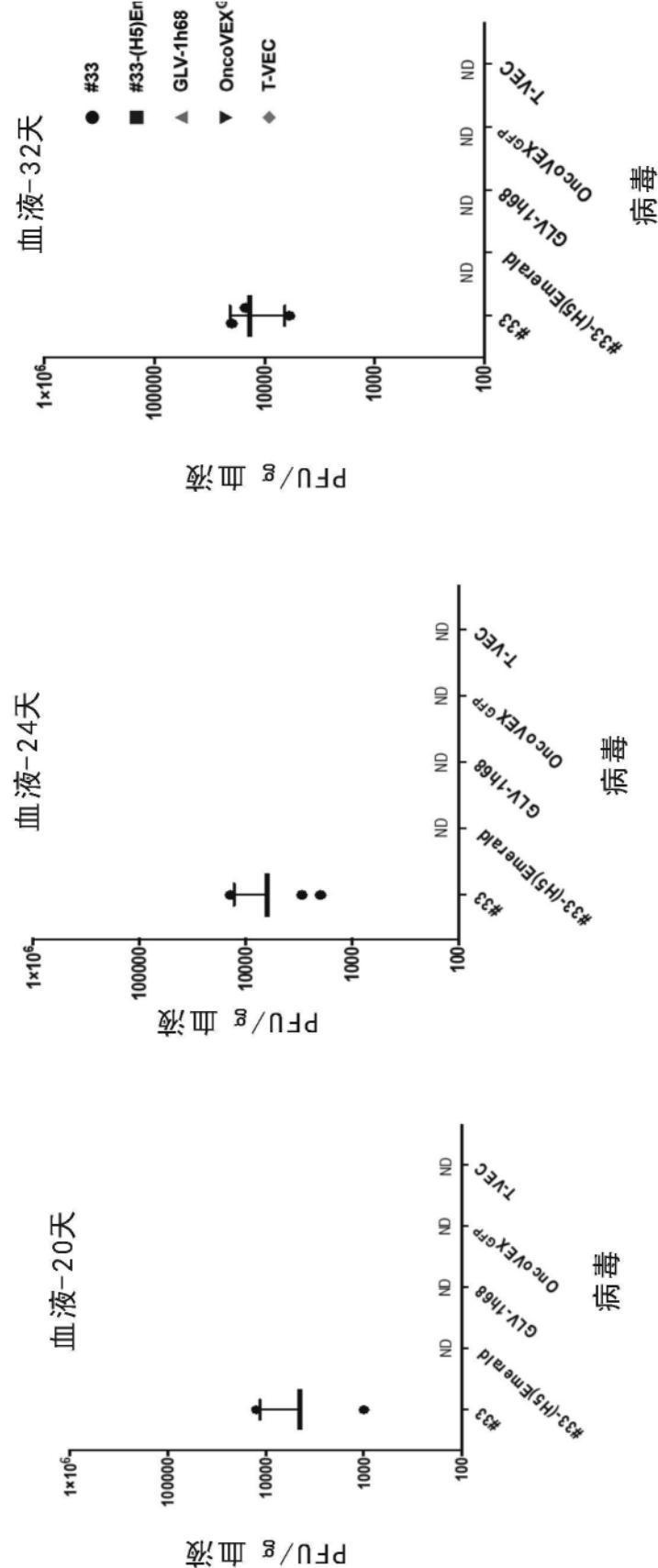


图43

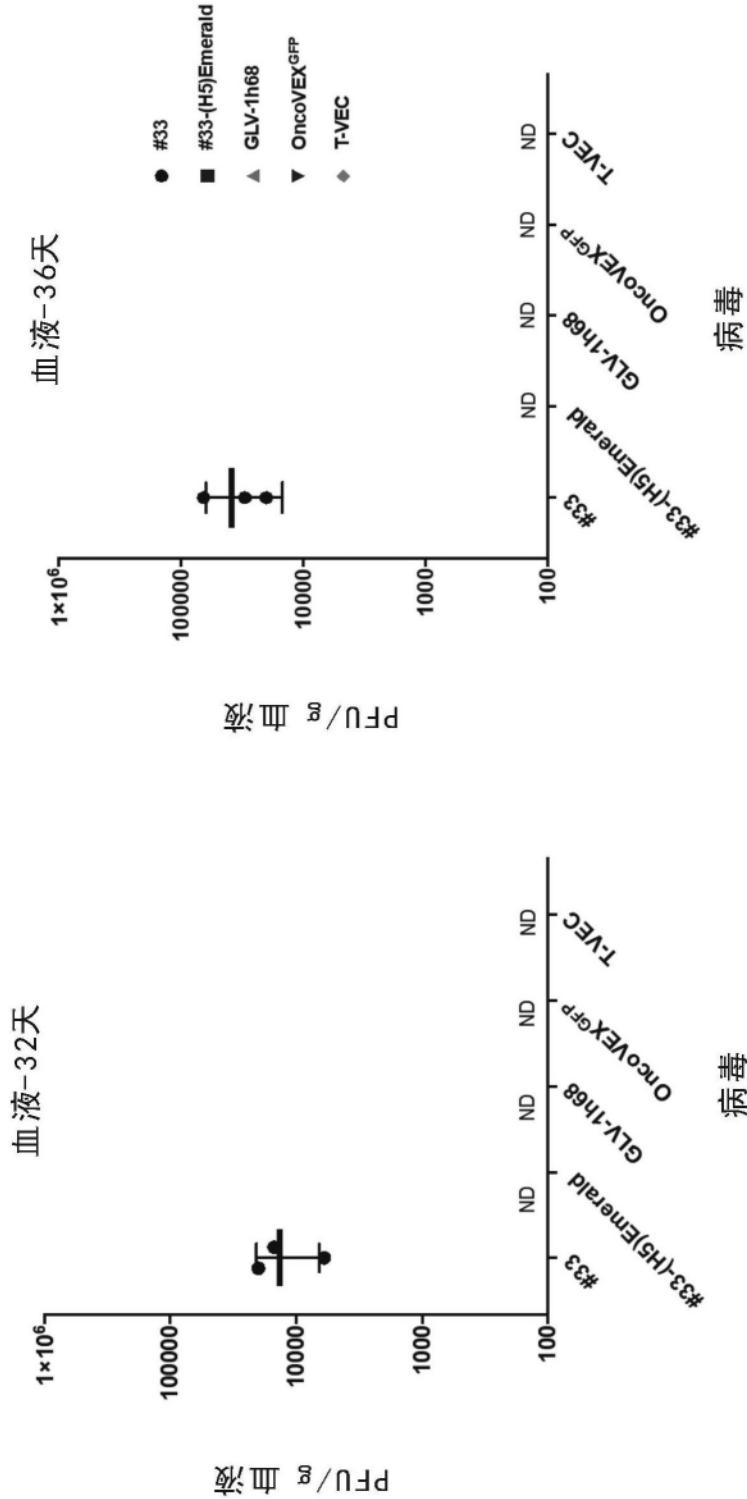


图43续

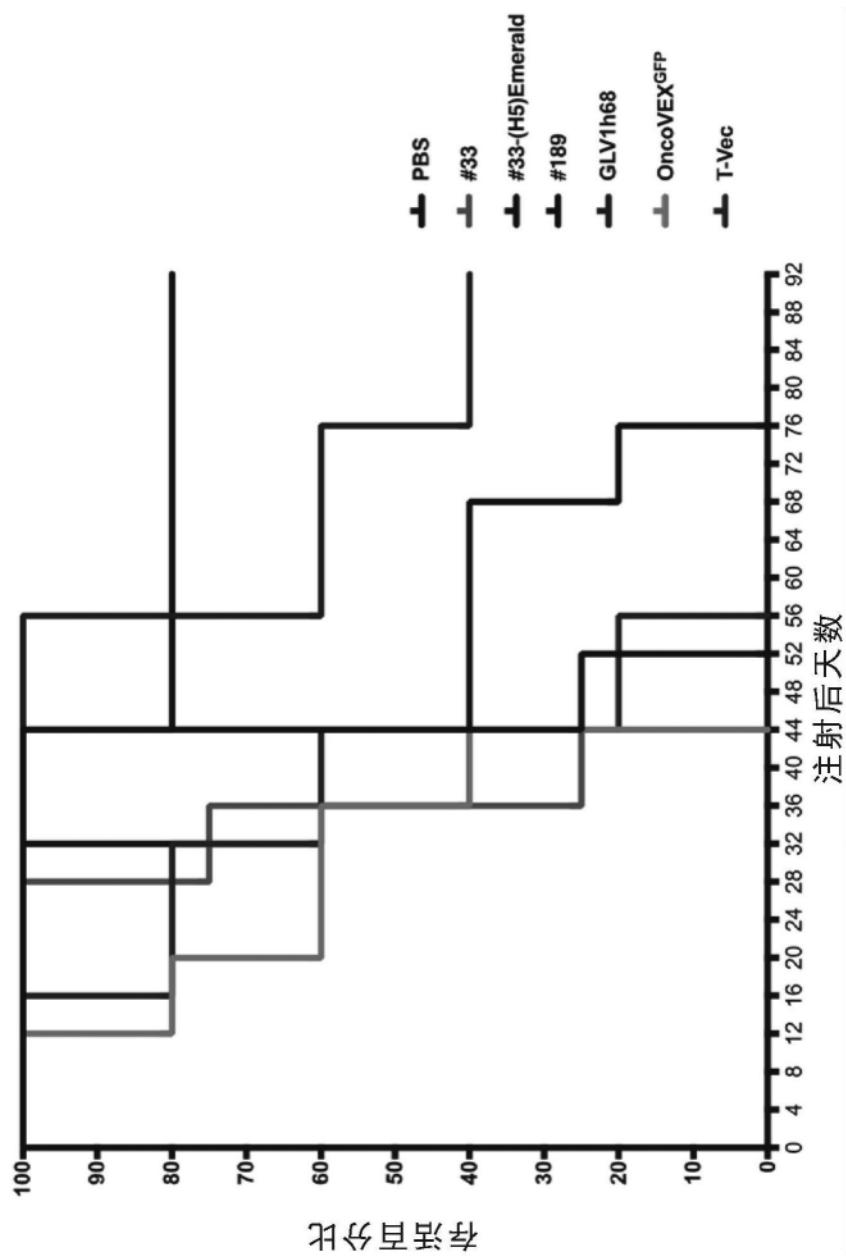


图44

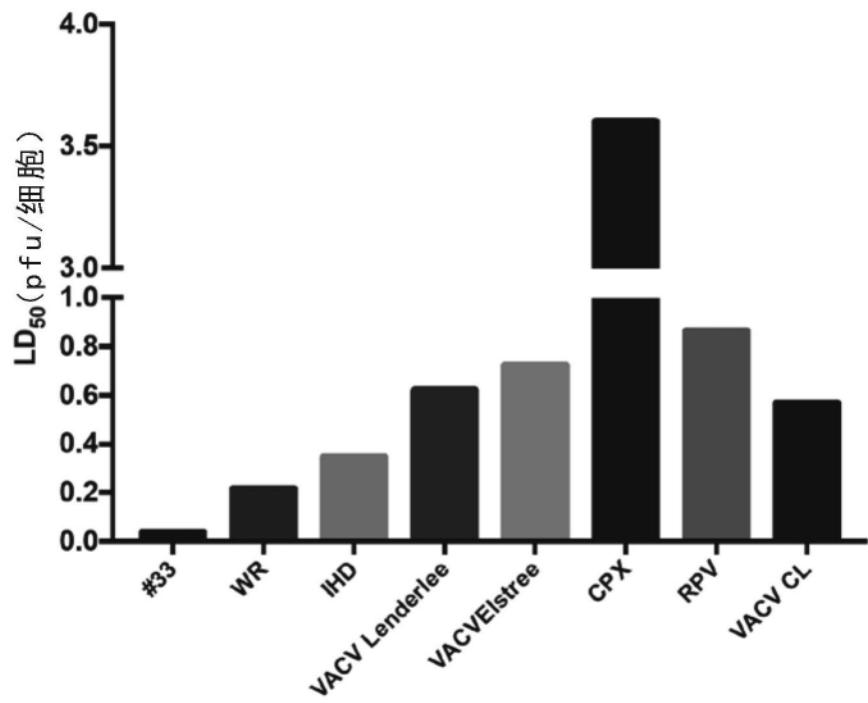


图45A

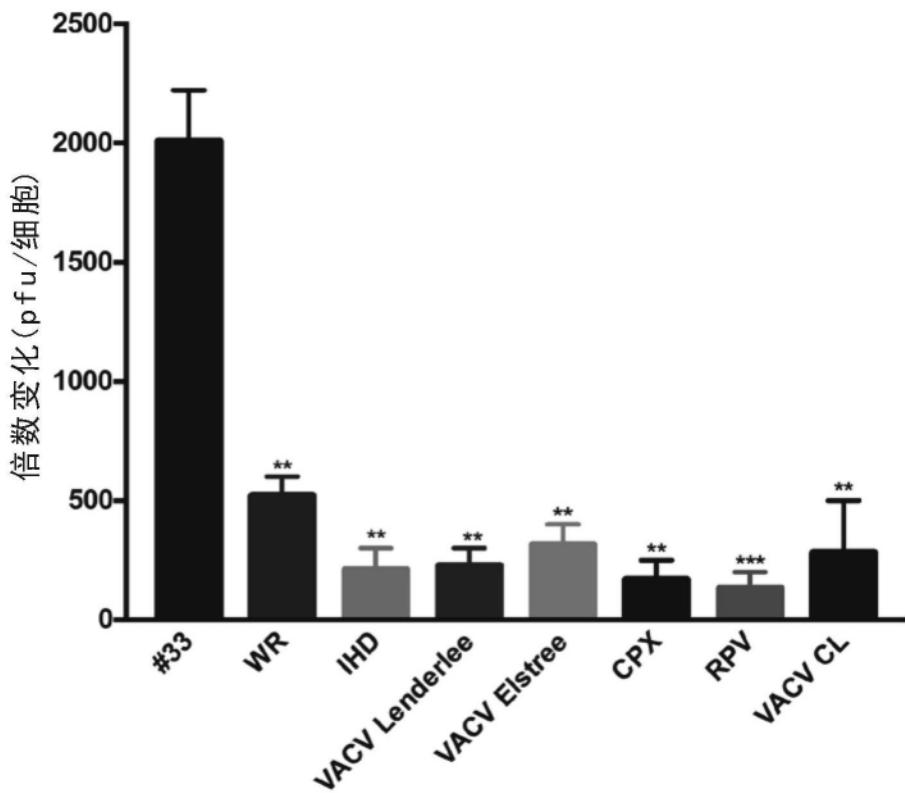


图45B

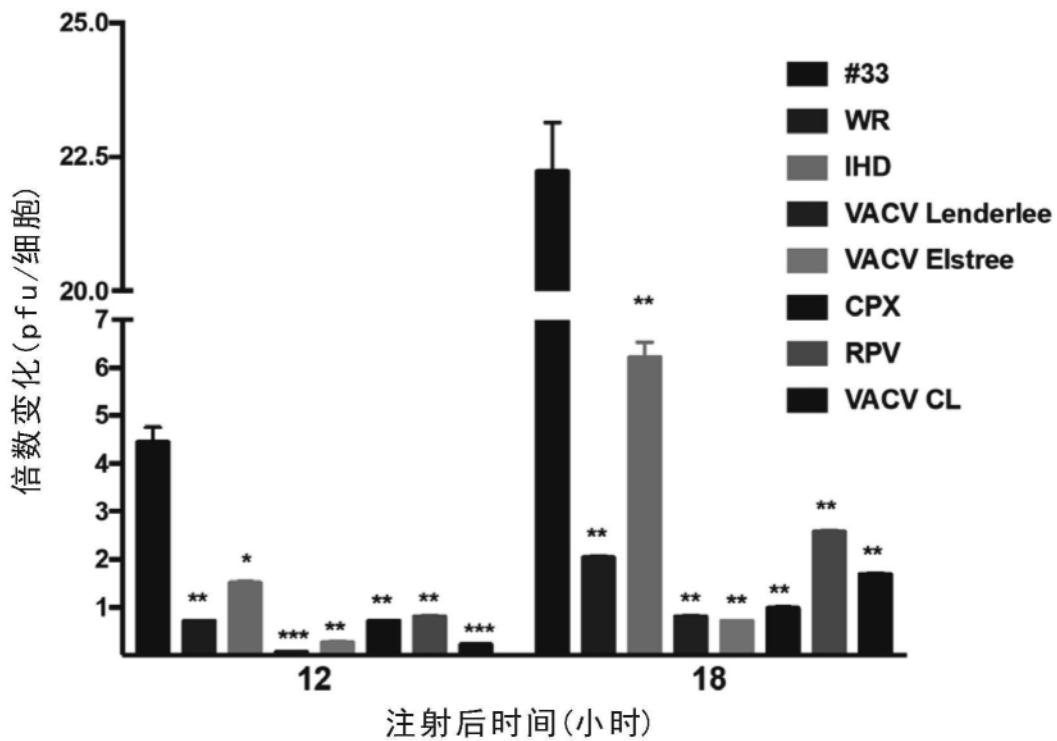


图45C

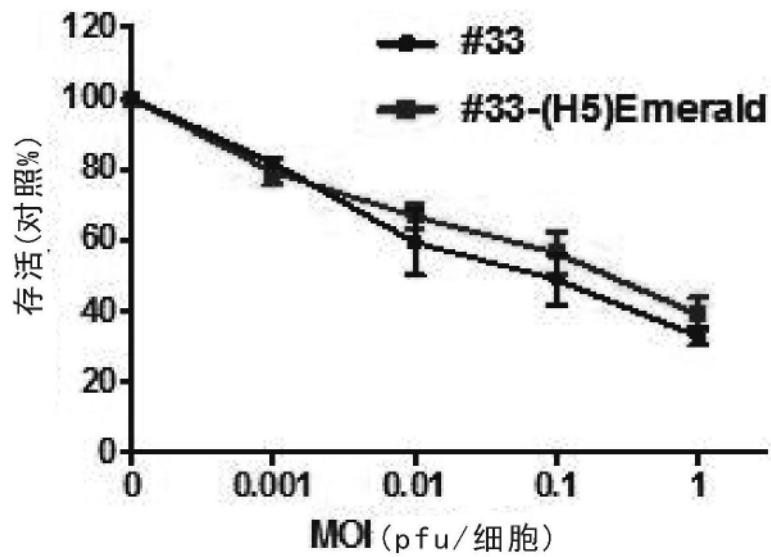


图46A

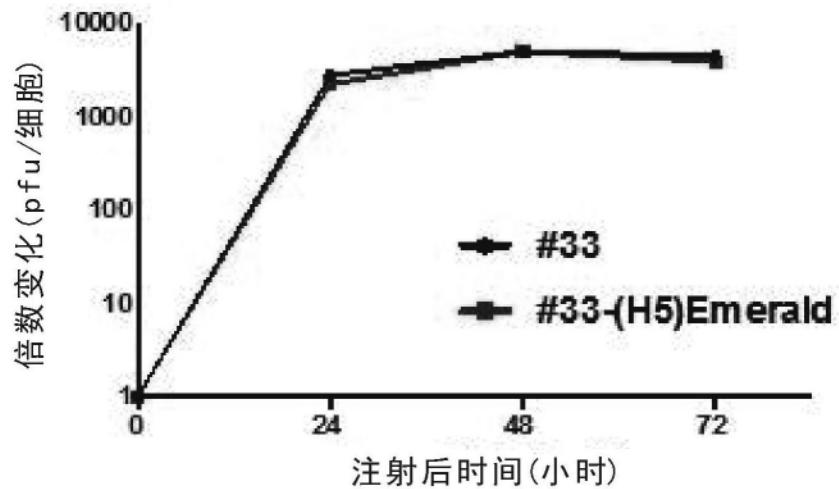


图46B

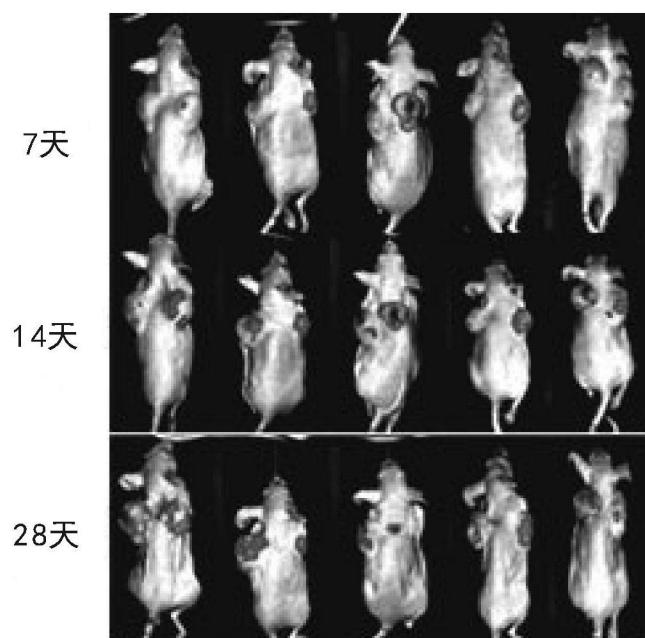


图47A

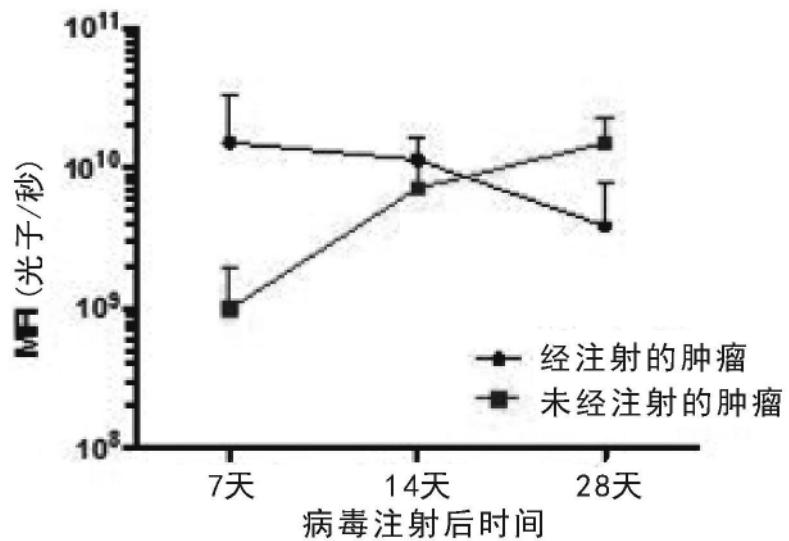


图47B

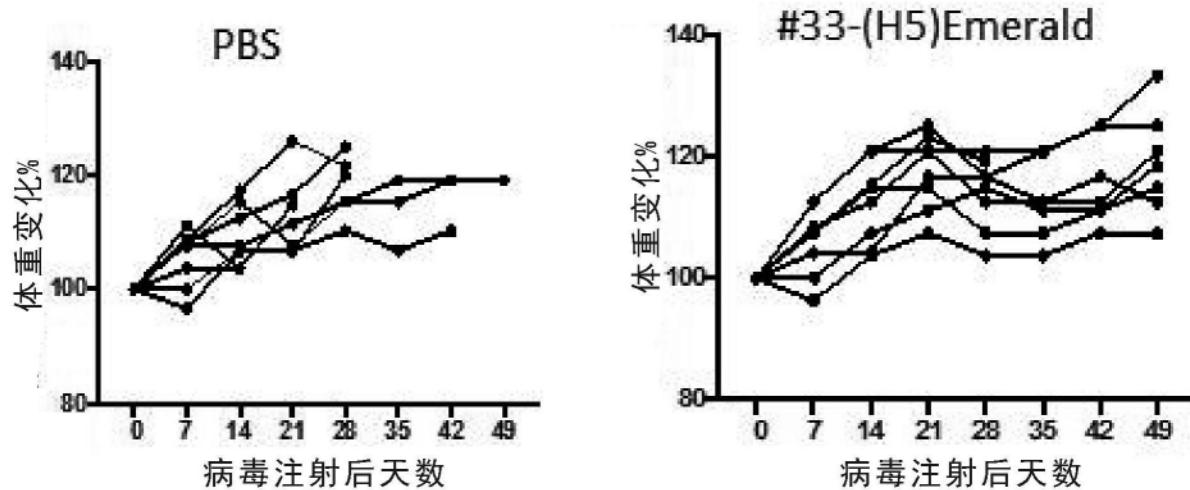


图48A

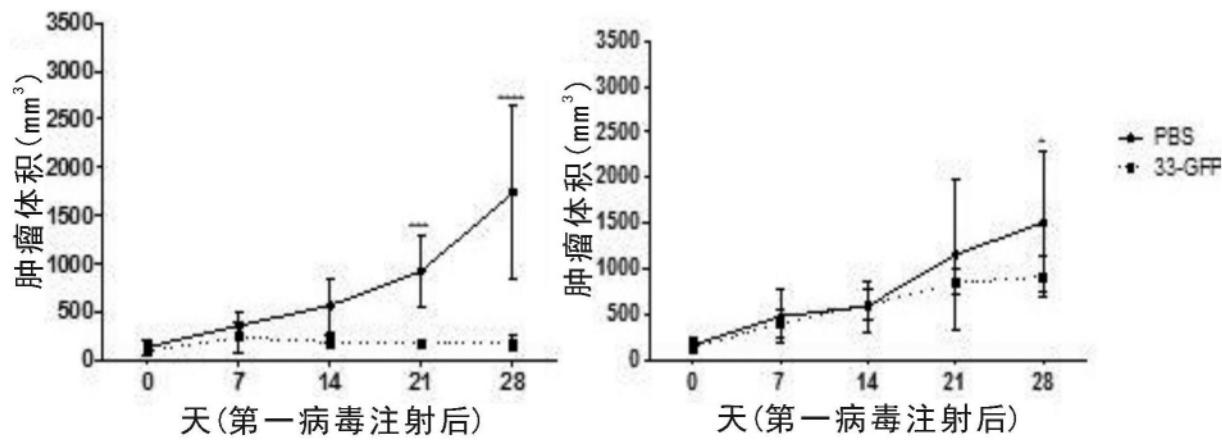


图48B

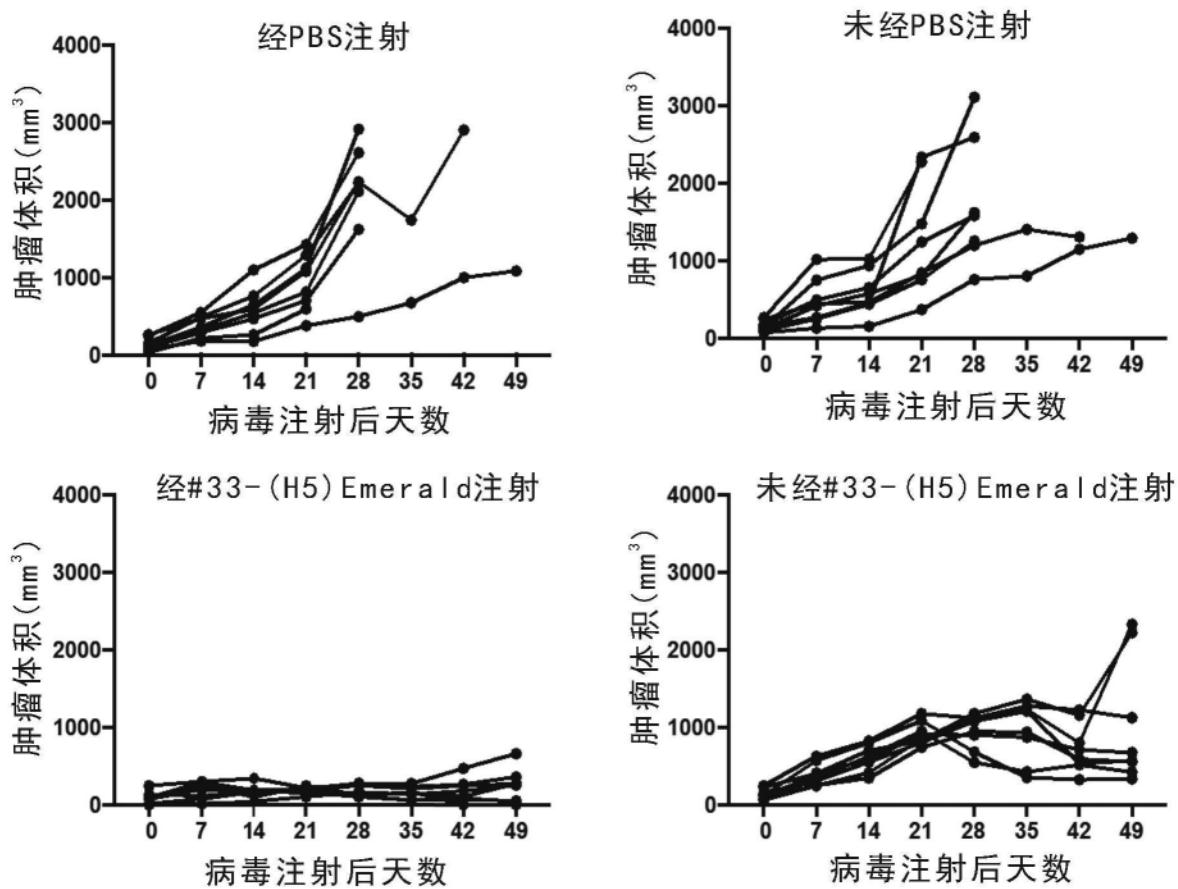


图48C

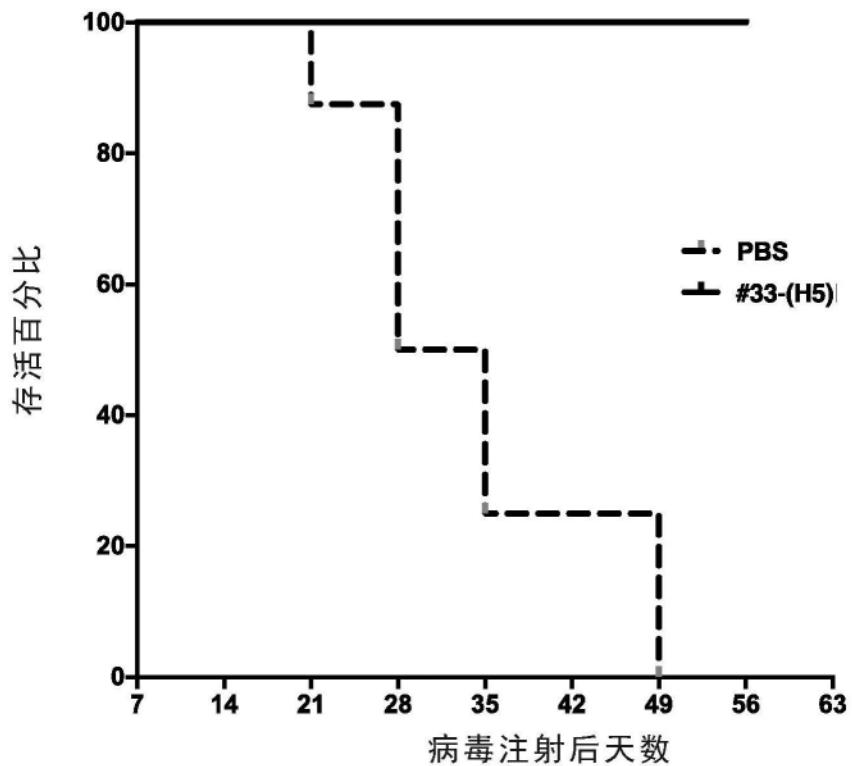


图48D

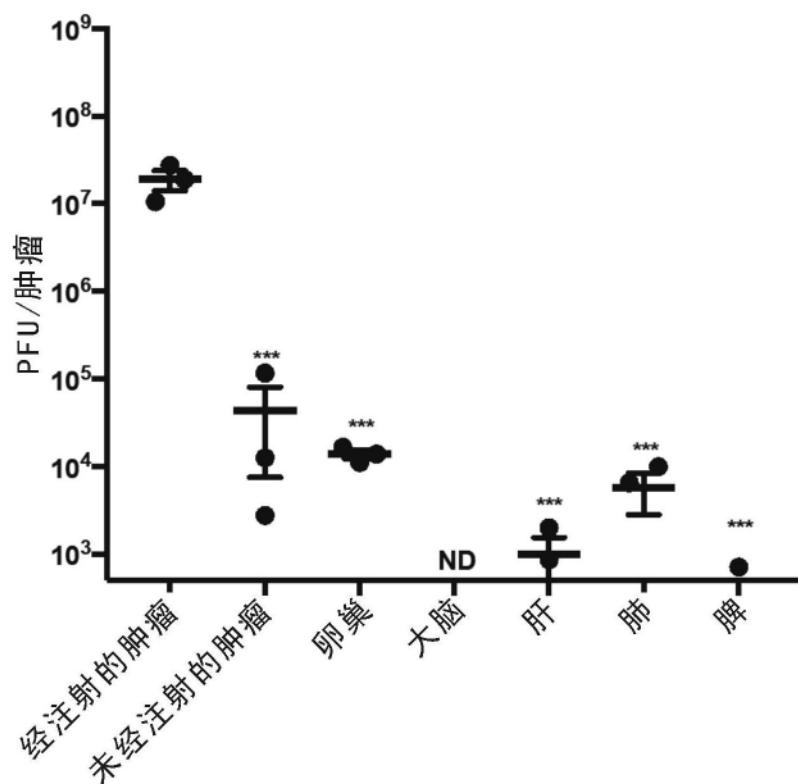


图49A

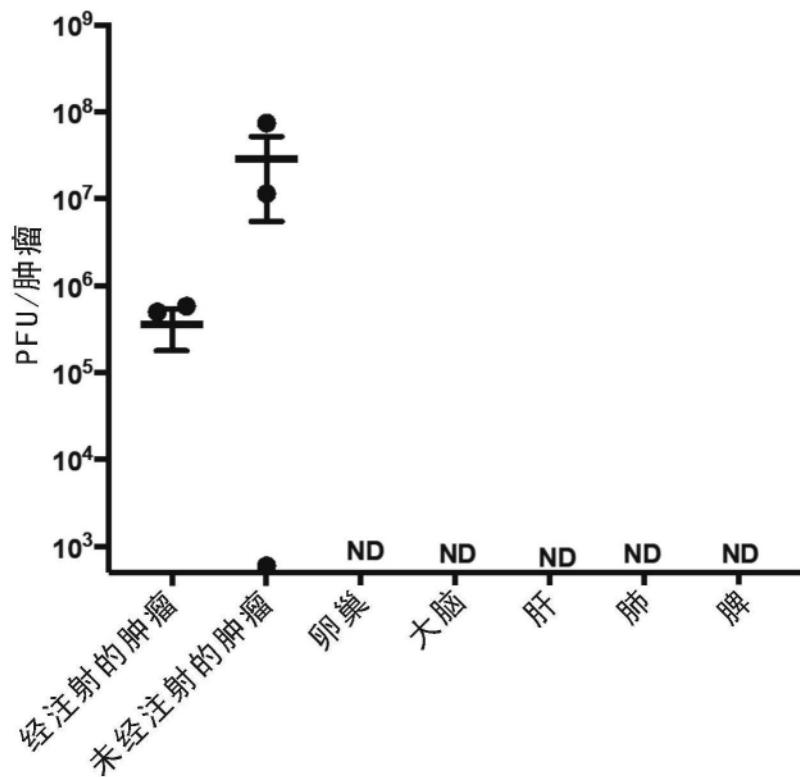


图49A续

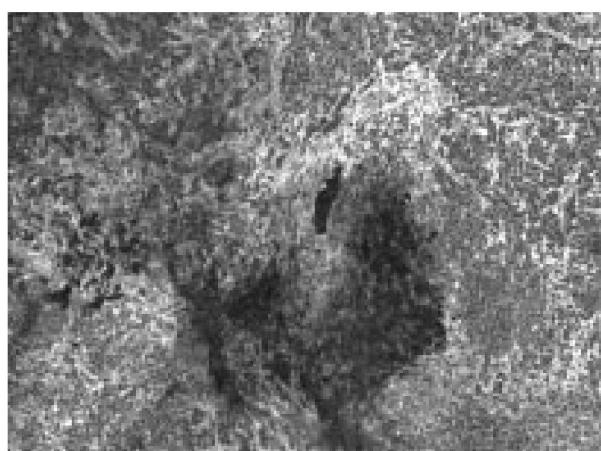
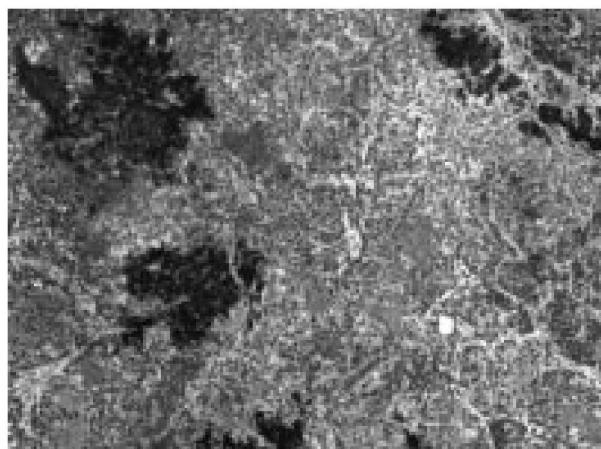


图49B

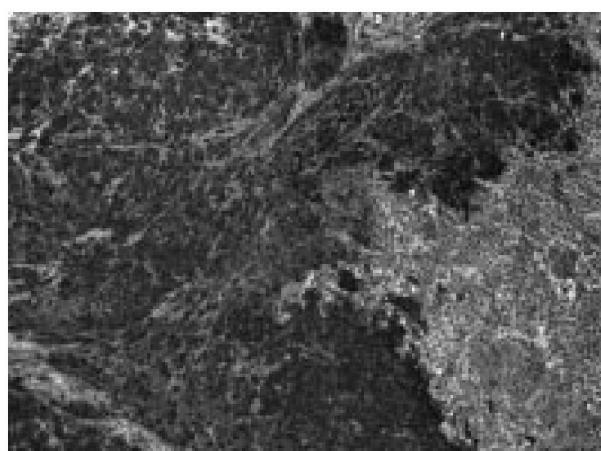
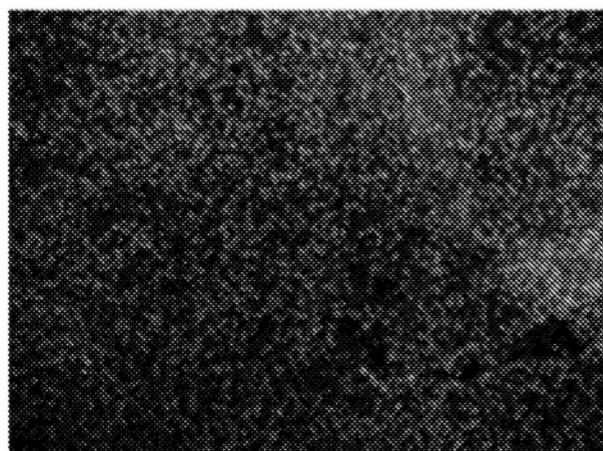


图49B续

## 阳性对照



#33-(H5)Emerald

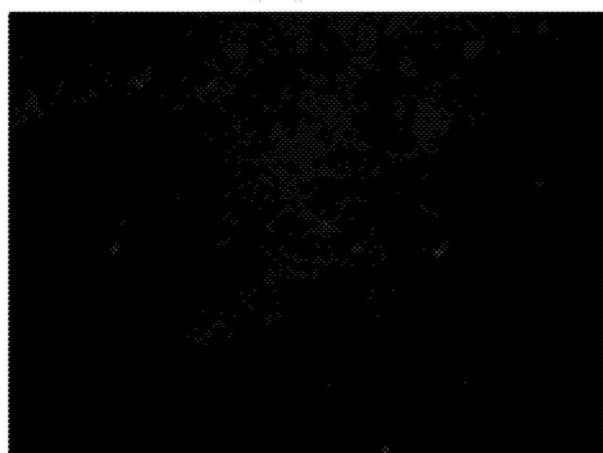


图49C

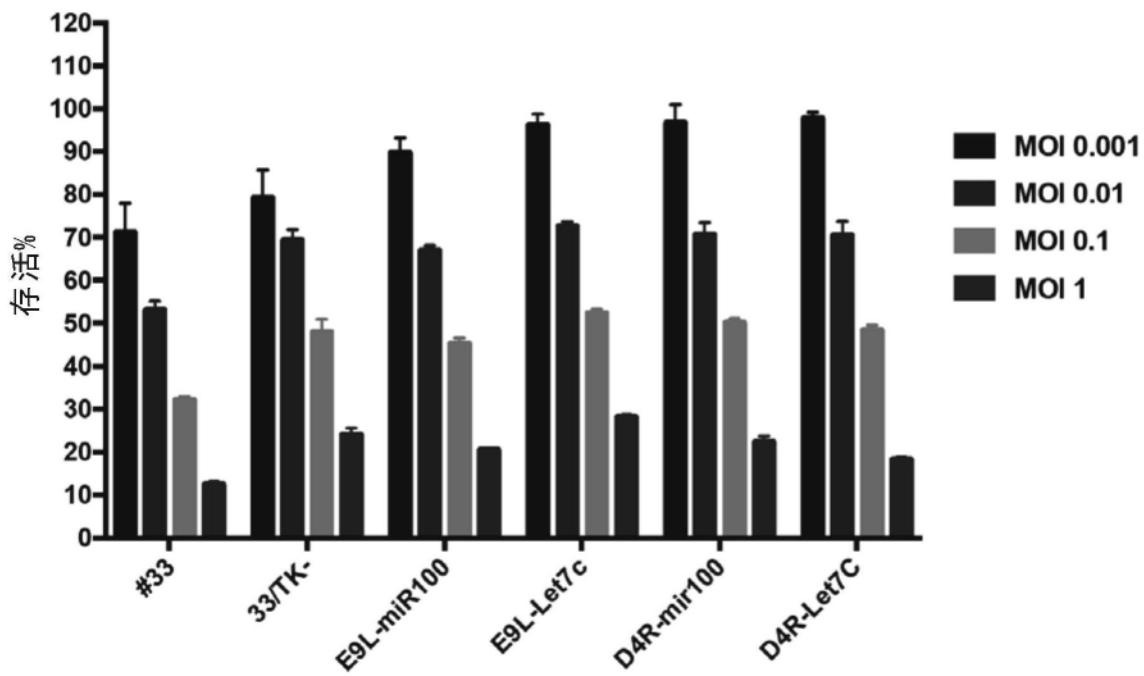
**OVCAR8**

图50

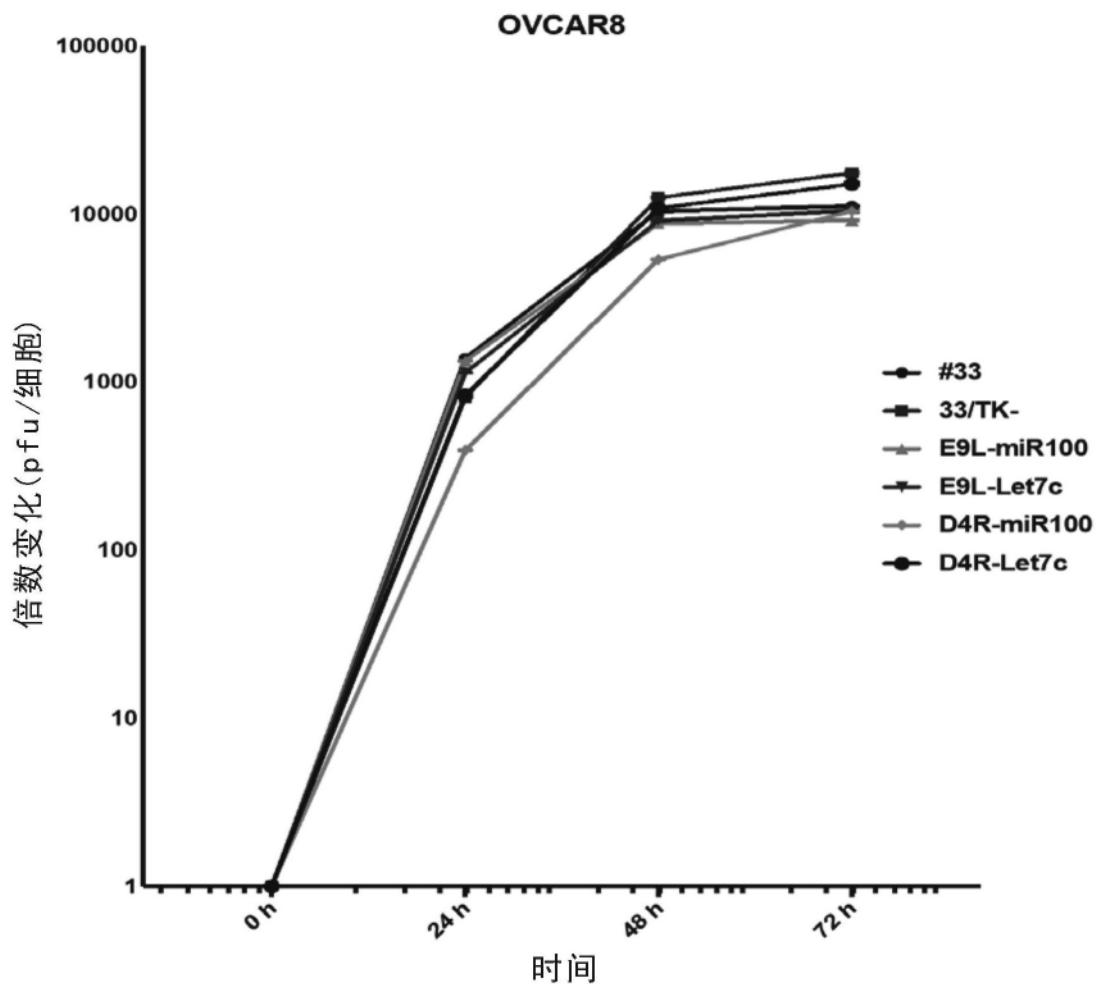


图51

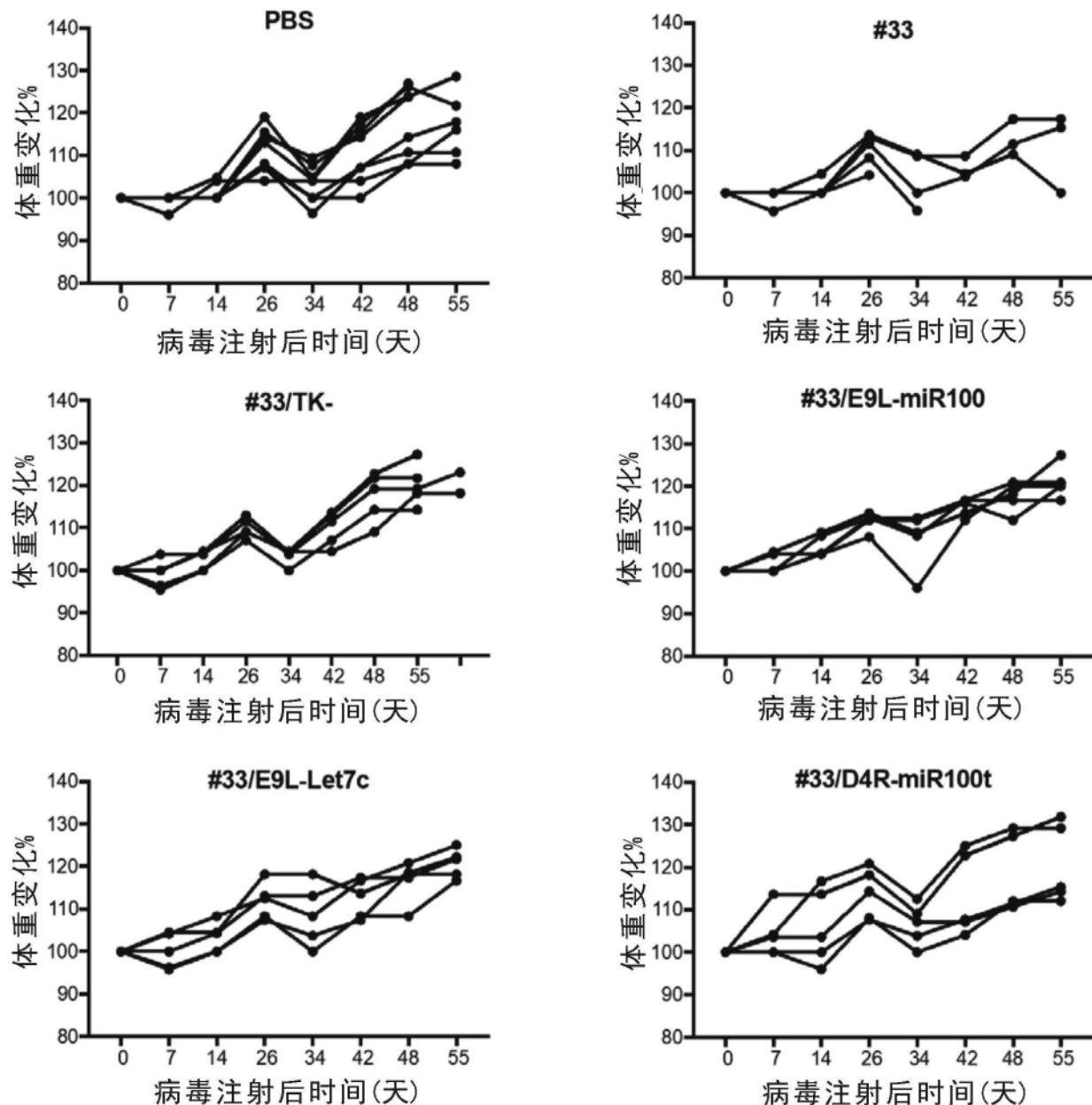


图52

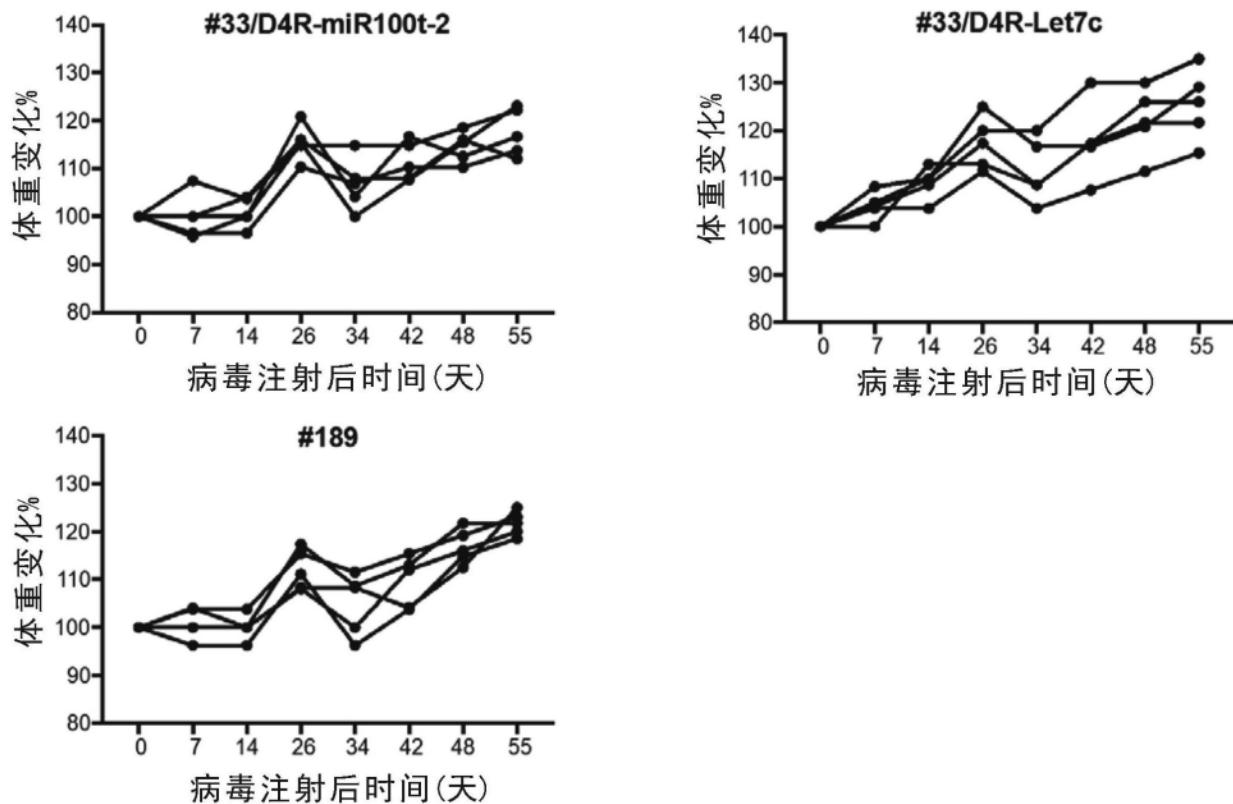


图52续

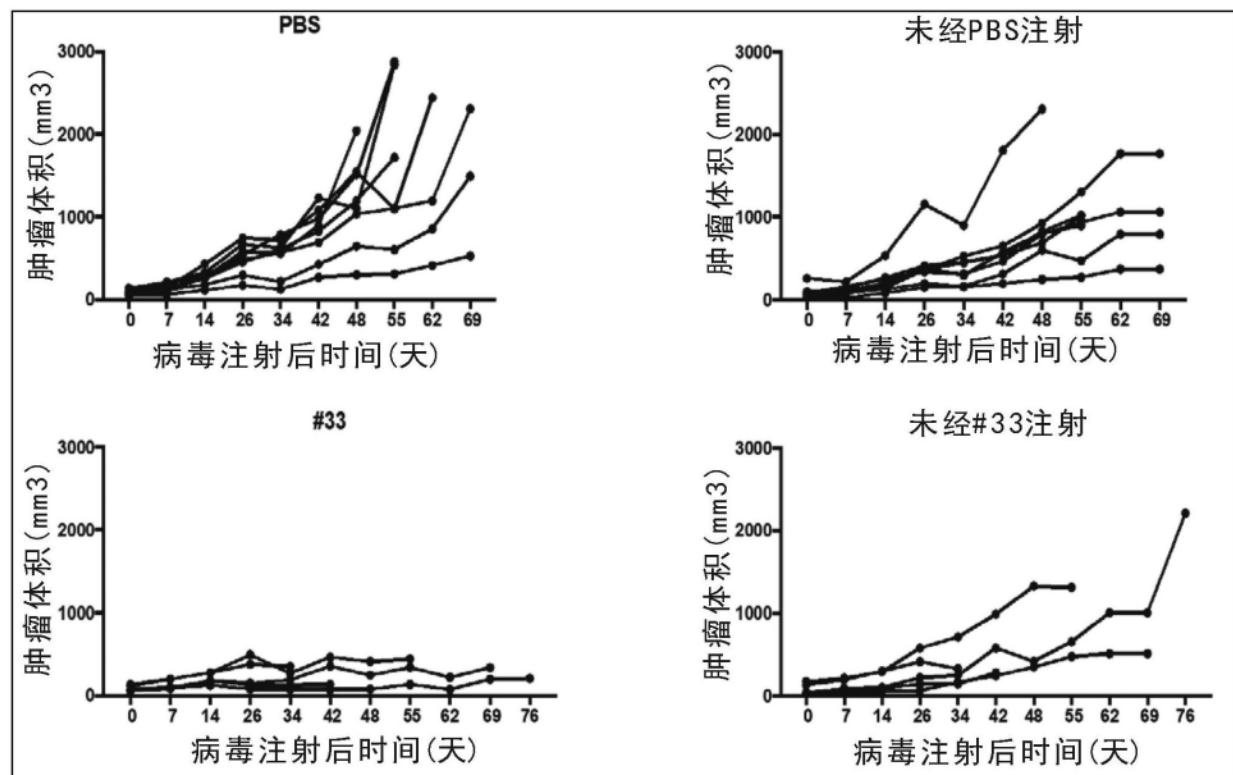


图53

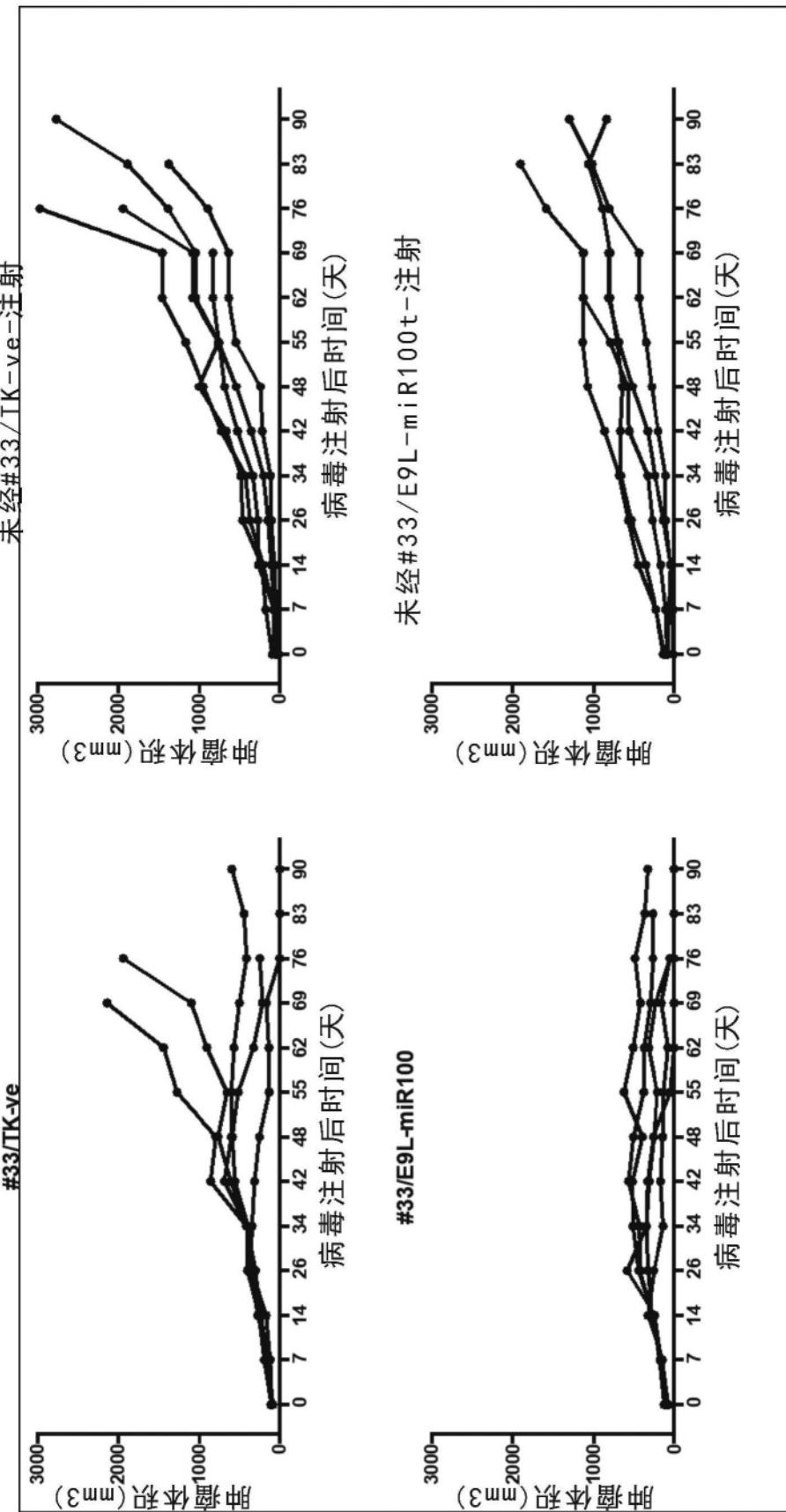


图53续

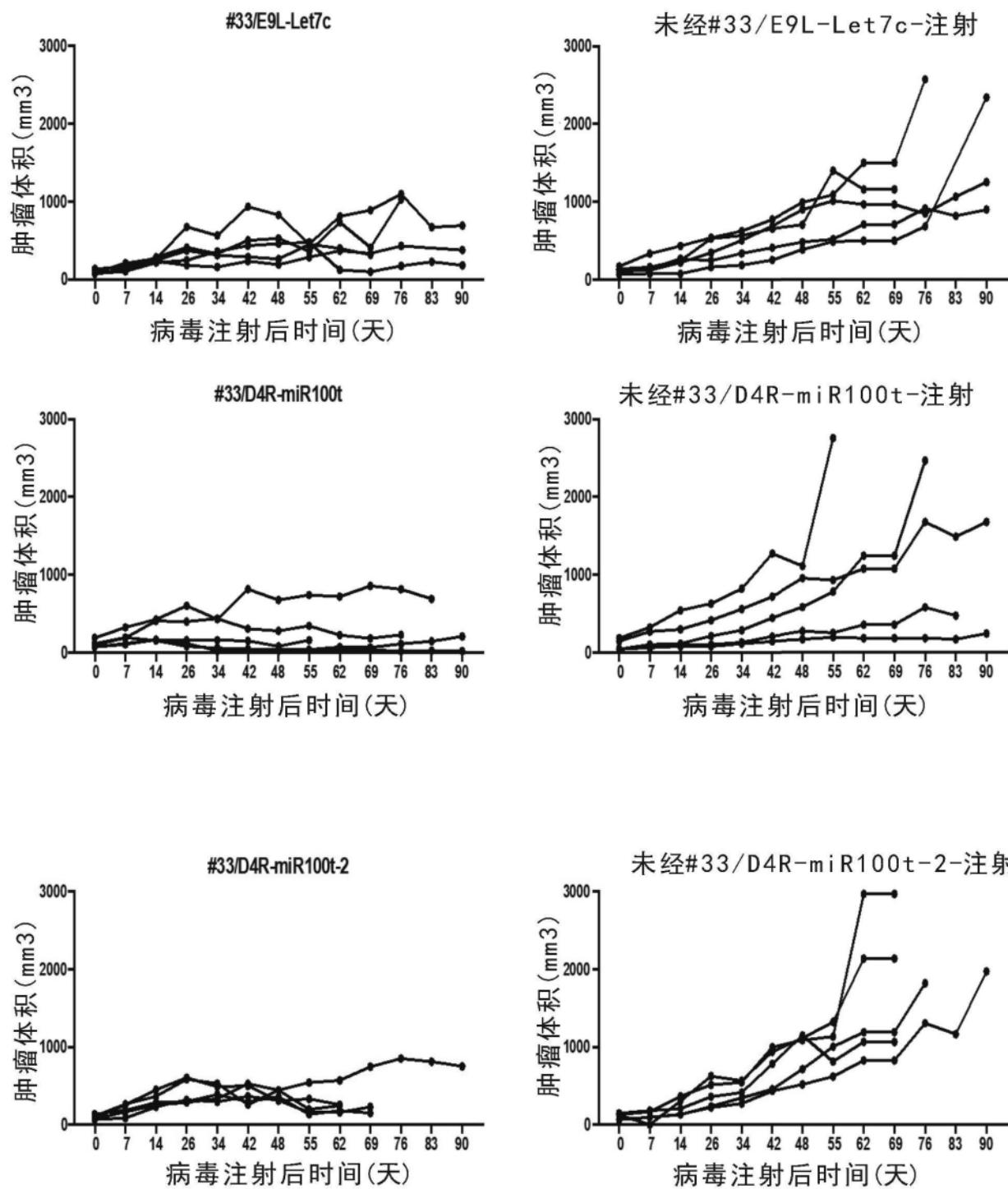


图53续

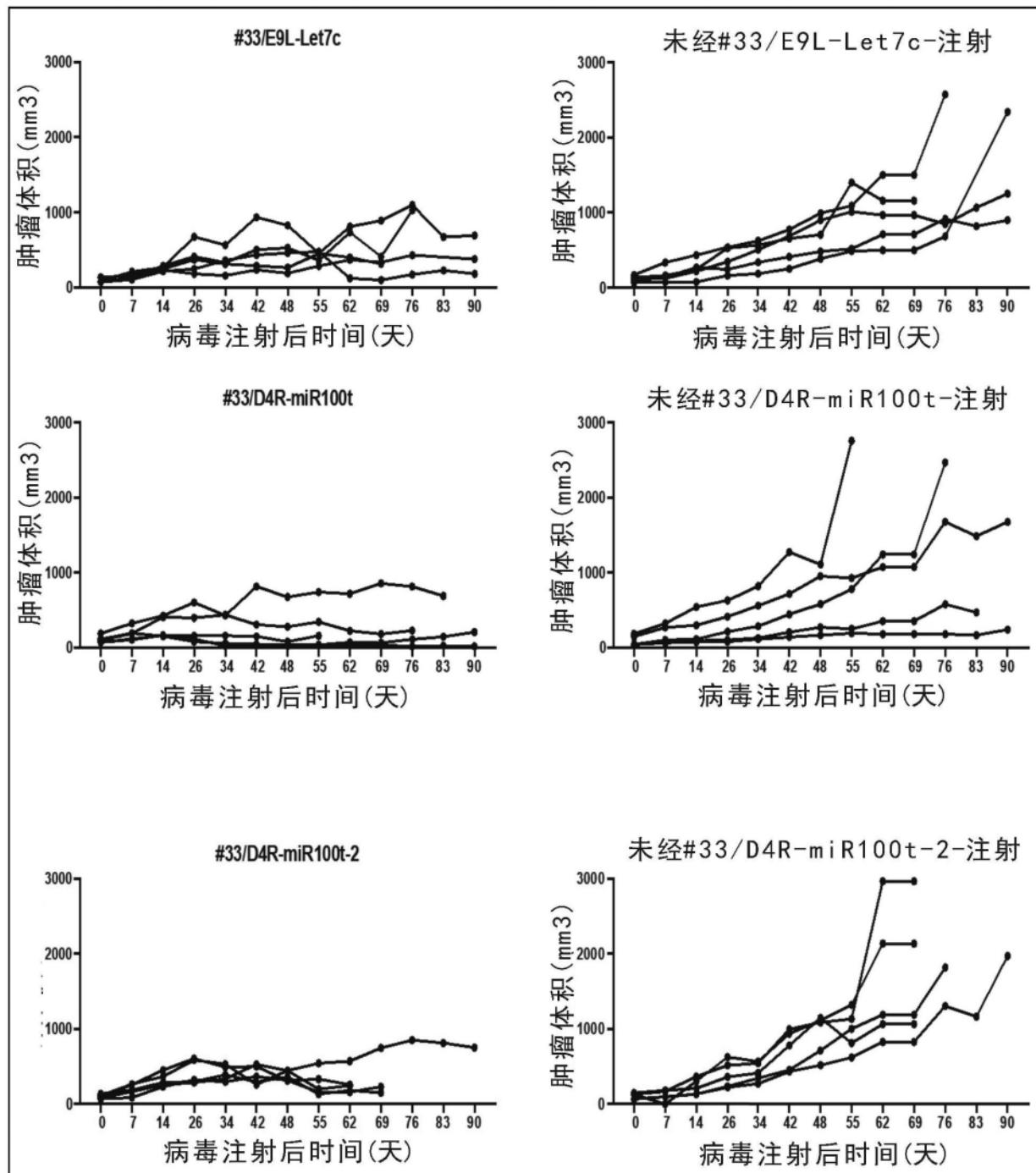


图53续

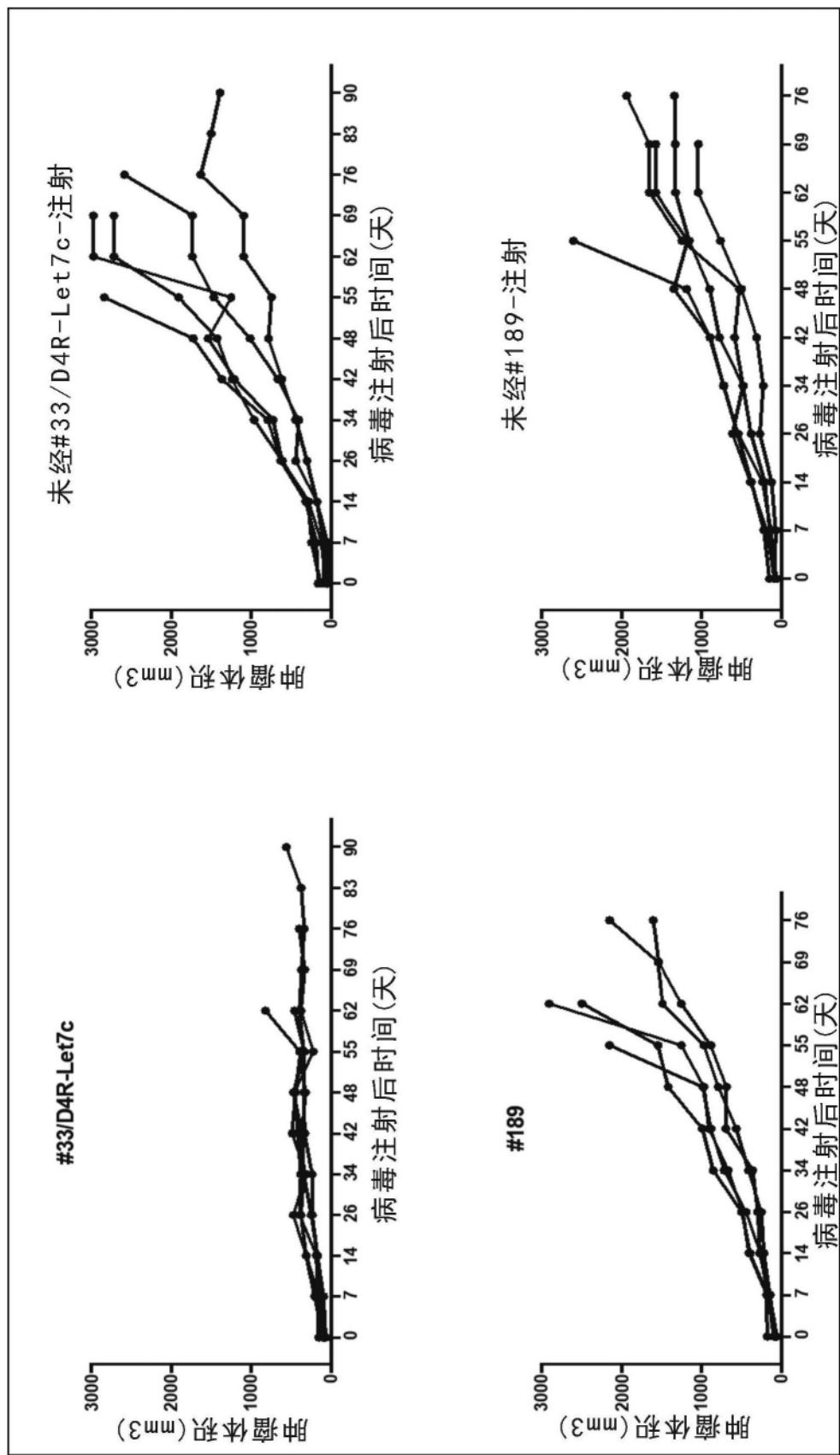


图53续

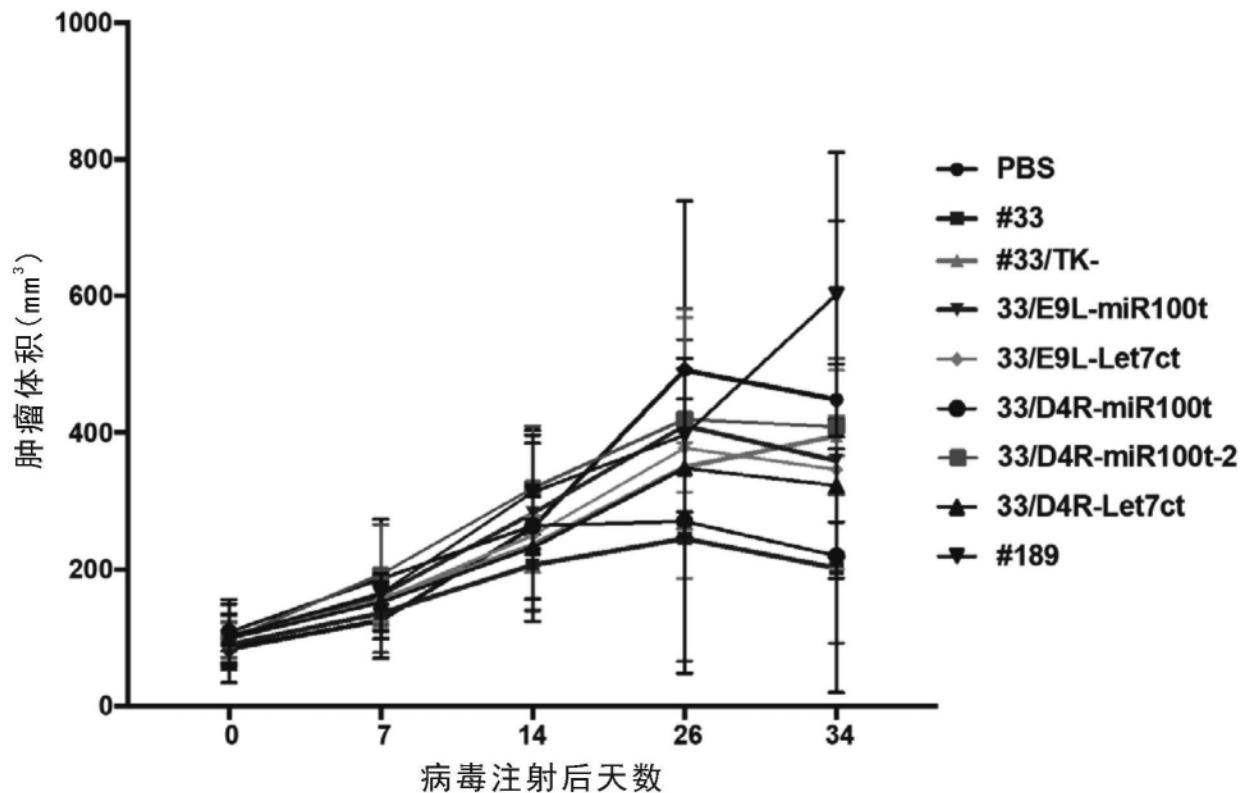


图54A

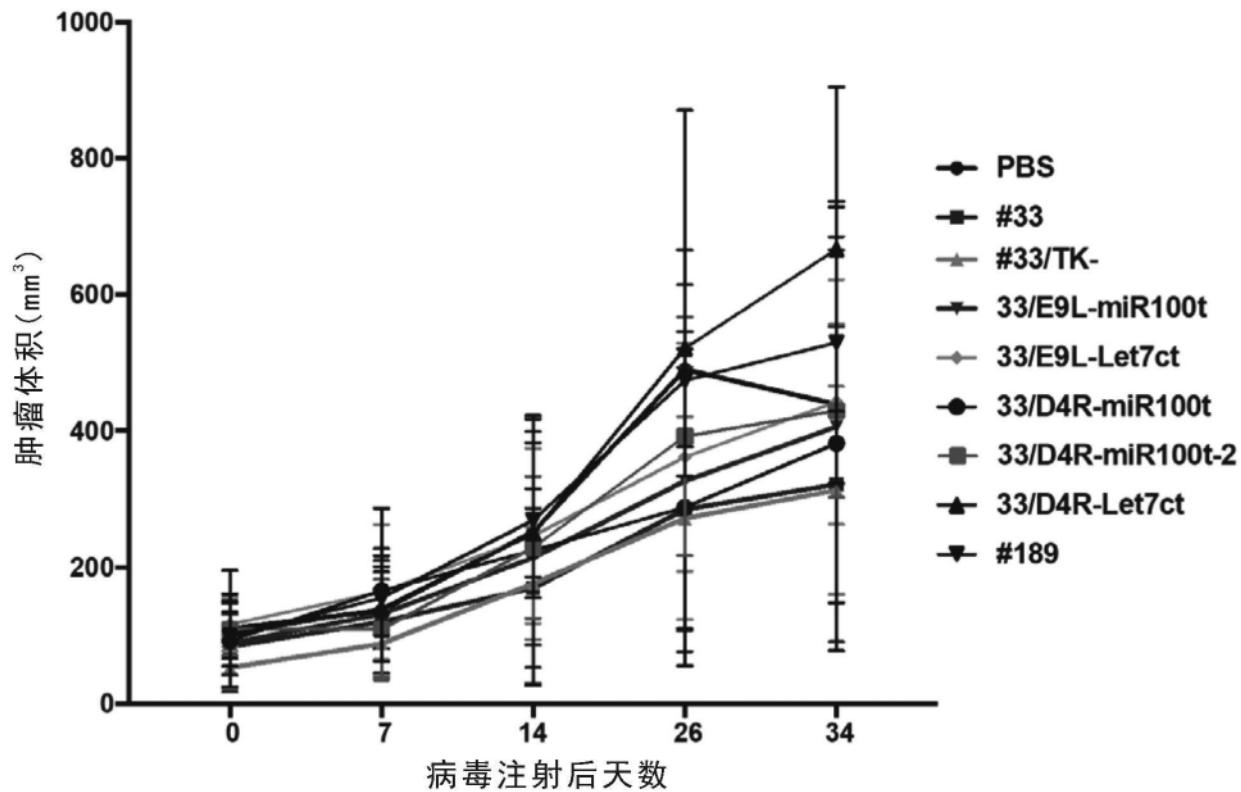


图54B

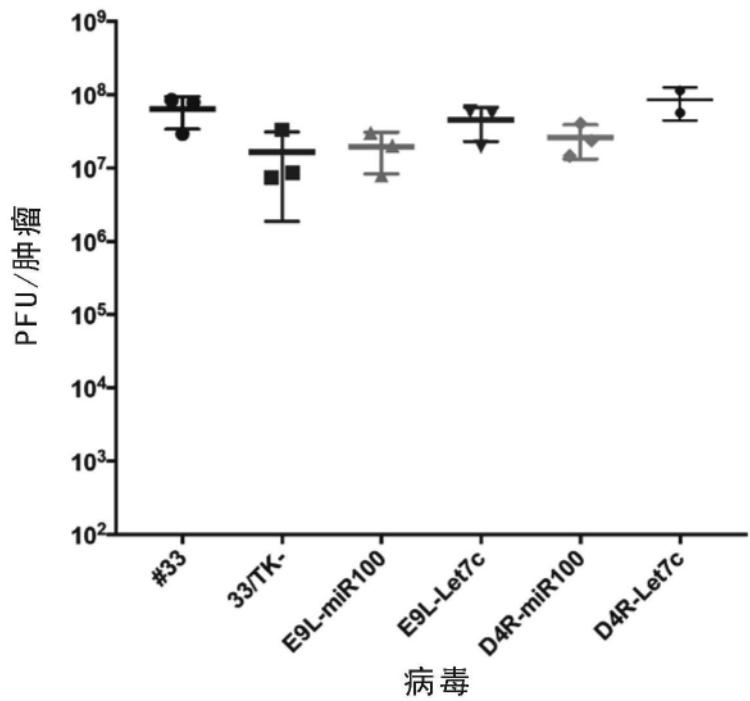


图55

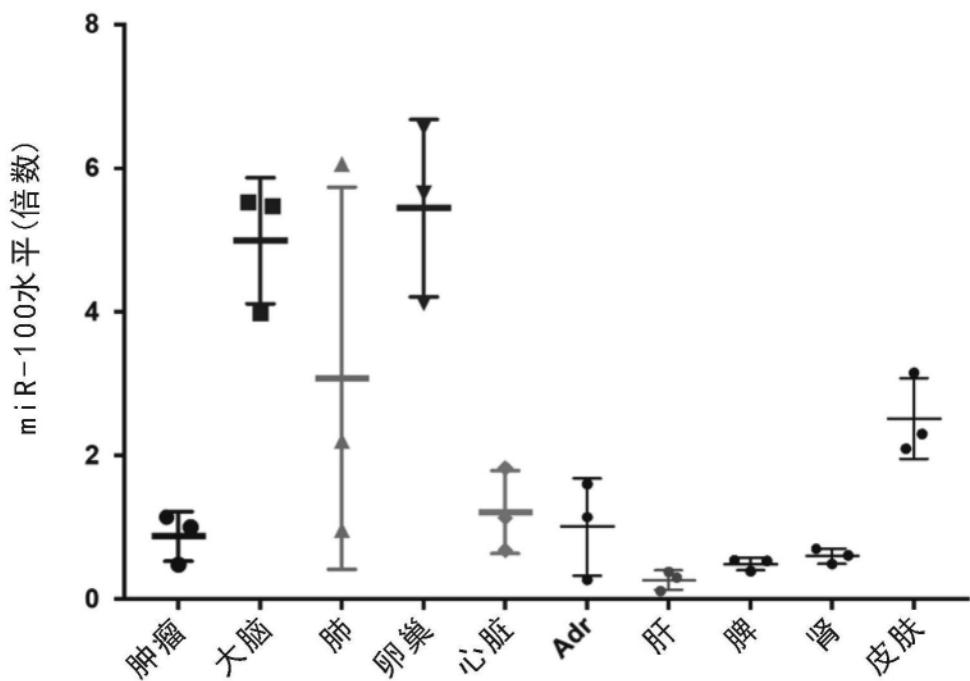


图56

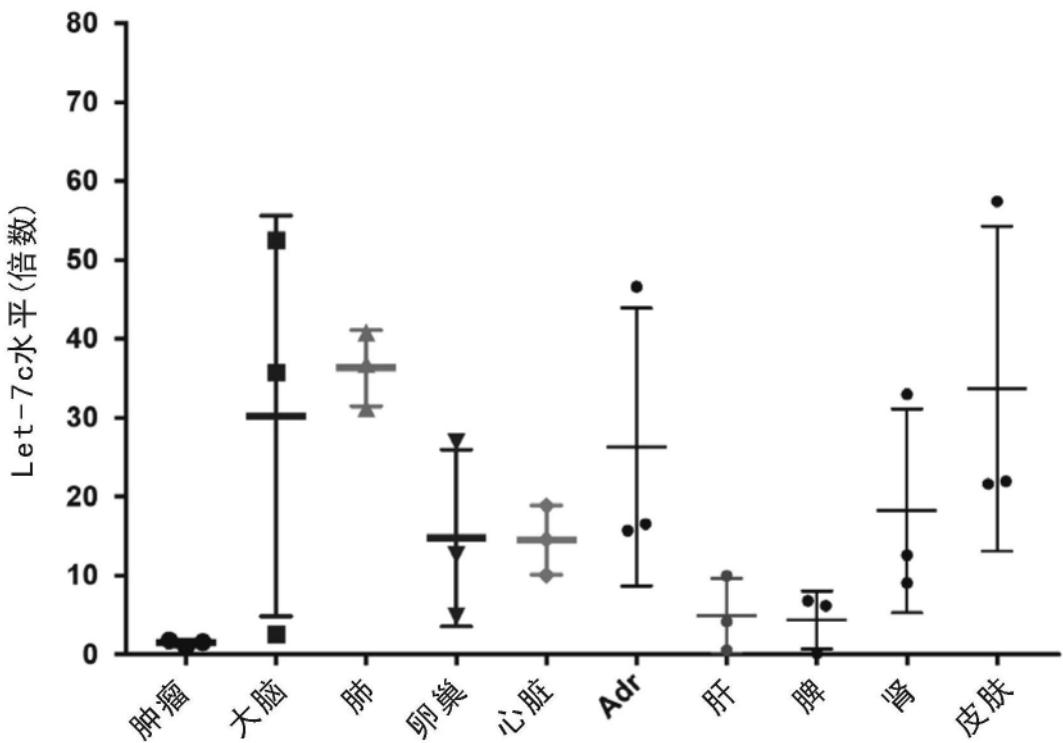


图57