

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380104308.0

[51] Int. Cl.

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010 年 1 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 100579579C

[22] 申请日 2003.10.1

[21] 申请号 200380104308.0

[30] 优先权

[32] 2002.10.1 [33] US [31] 60/416,660

[32] 2002.10.1 [33] US [31] 60/414,649

[86] 国际申请 PCT/US2003/031320 2003.10.1

[87] 国际公布 WO2004/030631 英 2004.4.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.26

[73] 专利权人 诺华疫苗和诊断公司

地址 美国特拉华州

[72] 发明人 W·M·卡瓦诺 D·L·斯隆

M·L·麦克占

[56] 参考文献

US 6200959B1 2001.3.13

US 6451303B1 2002.9.17

Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus – like particles. Rueda et al. Vaccine, Vol. 19. 2001

Photochemical inactivation of recombinant baculovirus. Weightman et al. Journal of Virological Methods, Vol. 81. 1999

审查员 张 建

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 3 页 说明书 49 页 附图 22 页

[54] 发明名称

抗癌及抗感染性疾病组合物及其使用方法

[57] 摘要

本发明提供了通过给予受试者非致病性病毒来治疗和/或预防肿瘤的方法和组合物。本发明还提供了通过给予受试者非致病性病毒来治疗和/或预防感染性疾病的方法和组合物。

1. 包含非致病性杆状病毒家族病毒的组合物在制备治疗或预防动物的癌症或癌症症状用的药剂中的用途，其中，所述非致病性杆状病毒家族病毒包含 gp64。

2. 权利要求 1 所述的用途，其中，所述包含含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒的组合物在低于 500000 PFU 或 500000 PFU 等价量时就可以有效地导致体外试验中 50%以上与其接触的细胞死亡。

3. 权利要求 1 所述的用途，其中，所述含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒是核型多角体病毒。

4. 权利要求 3 所述的用途，其中，所述含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒是苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒。

5. 权利要求 1 所述的用途，其中，所述癌症选自肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌、肾癌或皮肤癌。

6. 权利要求 1 所述的用途，其中，所述癌症症状选自肿瘤的生长、异常的细胞增生、肿瘤的转移、血管生成、细胞死亡、细胞浸润、体重下降、出血、呼吸困难、骨折、免疫力下降或疲乏。

7. 权利要求 1 所述的用途，其中，所述组合物以以下方式制得：

(a) 将浓度为 5-10 $\mu\text{g/ml}$ 的三甲基补骨脂素加入到所述含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒中并在 365nm 和 6W 的紫外线下照射 15 分钟加以灭活该含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒；

(b) 将所述灭活的含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒制成所述组合物。

8. 权利要求 7 所述的用途，其中，所述包含含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒的组合物在低于 500000 PFU 或 500000 PFU 等价量时就可以有效地抑制体外试验中 50%以上与其接触的细胞的生长。

9. 权利要求 1 所述的用途，其中，所述动物是人。

10. 权利要求 1 所述的用途，其中，所述含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒是灭活病毒、病毒颗粒、病毒体、病毒样颗粒、病毒包含体或病毒成分。

11. 权利要求 10 所述的用途，其中，所述含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒是病毒成分，该病毒成分包含至少两种病毒蛋白。

12. 权利要求 10 所述的用途，其中，所述含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病

毒是病毒成分，所述病毒成分包含核酸、脂质或糖中的一种或多种。

13. 权利要求 1 所述的用途，其中，所述含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒是灭活病毒。

14. 权利要求 13 所述的用途，其中，所述含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒经由以下方式被灭活：热灭活、化学灭活、紫外灭活或上述灭活的组合。

15. 如权利要求 13 所述的用途，其特征在于，所述含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒经由以下方式被灭活：补骨脂素灭活、紫外线灭活或二者的结合。

16. 包含灭活的非致病性杆状病毒家族病毒的组合物在制备在动物体内诱导免疫应答以抗癌症用的组合物中的用途，其中，所述非致病性杆状病毒家族病毒包含 gp64。

17. 权利要求 16 所述的用途，其中，所述免疫应答诱导 T 细胞记忆反应。

18. 权利要求 16 所述的用途，其中，所述免疫应答促进树突细胞的成熟。

19. 包含一定量的非致病性杆状病毒家族病毒的组合物在制备在癌细胞内导致细胞死亡的组合物中的用途，其中，所述非致病性杆状病毒家族病毒包含 gp64。

20. 权利要求 19 所述的用途，其中所述包含含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒的组合物在低于 500000 PFU 或 500000 PFU 等剂量时就可以有效地导致体外试验中 50%以上与其接触的细胞死亡。

21. 含一定量的非致病性杆状病毒家族病毒的组合物在制备导致一群癌细胞中的部分细胞死亡用的组合物中的用途，其中，所述非致病性杆状病毒家族病毒包含 gp64。

22. 权利要求 21 所述的用途，其中，所述癌细胞群中的所述部分细胞不超过所述细胞群的 20%。

23. 权利要求 21 所述的用途，其中，所述癌细胞群包括外周血细胞、肿瘤细胞、NK 细胞或巨噬细胞。

24. 权利要求 16、19 或 21 所述的用途，其中，所述含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒是灭活病毒。

25. 一种基本上由含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒和药学上可接受的载体组成的组合物。

26. 权利要求 25 所述的组合物，其中，所述含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒通过选自如下一组的至少两种方法灭活：基因灭活、化学灭活、光化学灭活、紫外线灭活、热灭活或放射线灭活。

27. 一种基本上由含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒、一种或多种外周血单核细胞和药学上可接受的载体组成的组合物。

28. 权利要求 25 或 27 所述的组合物，其中，所述含有 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒是灭活的病毒。

29. 一种制备基本上由非致病性杆状病毒家族病毒组成的抗癌组合物的方法，其中，所述非致病性杆状病毒家族病毒包含 gp64，所述方法包括：

(a) 使含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒与第一灭活剂接触以有效地灭活有活性的病毒；

(b) 使含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒与第二灭活剂接触以有效地灭活有活性的病毒；

(c) 使所述含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合；以及

(d) 通过体外试验确定所述含 gp64 的非致病性杆状病毒家族病毒是无活性的。

抗癌及抗感染性疾病组合物及其使用方法

发明领域

本发明涉及肿瘤治疗领域，更具体地说，本发明涉及非致病性病毒作为有效抗癌药物的应用。

发明背景

缩写单词表

A549	- 人肺上皮肿瘤细胞系
AcNPV	- 苜蓿银纹夜蛾(<i>Autographa californica</i>)核型多角体病毒
BMDC	- 骨髓衍生的树突细胞
BV422	- 表达 CCL21 的重组杆状病毒
BV762	- 表达 Raf 的重组杆状病毒
CCL21	- C-C 基序配体 21 趋化因子；次级淋巴组织趋化因子
CD86	- 树突细胞成熟的标记物
CR	- 完全有效
CTL	- 细胞毒 T 细胞溶解
DC	- 树突细胞
FACS	- 荧光激活细胞分选
GM-CSF	- 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
GV	- 颗粒体病毒
HIV	- 人免疫缺陷病毒
i.t.	- 肿瘤内
mCCL21	- 鼠 CCL21
MHC	- 主要组织相容性复合物
MHC II	- MHC II 类分子
MLA-DR	- MHC I 类分子抗原
MOI	- 感染复数
NPV	- 核型多角体病毒

PBMC	- 外周血单核细胞
PFU	- 噬斑形成单位
qd	- 每天 每天(每日给药)
rhCCL21	- 重组人 CCL21
s.c.	- 皮下注射
Sf(Sf9)	- 草地夜蛾
Tn(Tn5)	- 粉纹夜蛾
UV	- 紫外线
VLP	- 病毒样颗粒

发明背景

调节免疫应答已经成为一种重要的肿瘤治疗策略。目前在设计肿瘤疫苗及免疫治疗措施时注意力主要集中在鉴定肿瘤细胞特异性的抗原上。利用肿瘤特异性抗原或表达肿瘤特异性抗原的基因所具有的独特的肿瘤免疫原性可以通过疫苗免疫来诱导出肿瘤特异性的免疫应答。疫苗接种方法也包括适应性细胞免疫治疗方法,其中抗原提呈细胞经改造后可提呈肿瘤相关抗原。其他的肿瘤免疫治疗措施包括给予细胞因子和趋化因子,这些因子在抗肿瘤治疗中可作为佐剂或药物产生疗效,因为它们具有扩增和补充免疫效应细胞的能力。见 Homey 等, (2002) Nat Rev Immunol 2: 175-84; Parmiani 等, (2002) J Natl Cancer Inst 94: 805-18; Bronte (2001) Curr Gene Ther 1: 53-100; 以及 Fehniger 等, (2002) Cytokine Growth Factor Rev 13: 169-83。

免疫治疗措施虽然具有上述优点,但是要想取得成功还受到下列因素的限制: (1) 肿瘤特异性的抗原性,因此这种治疗方法还只限于某些类型的肿瘤; (2) 肿瘤细胞提呈抗原的能力弱; 以及(3)肿瘤细胞可以产生免疫抑制因子来逃避免疫监视。因此,在本领域中一直需要找到一种有效而广谱的肿瘤治疗措施。为了满足这一需求,本发明提供了新型的免疫刺激方法以治疗和预防肿瘤。

发明概述

本发明提供了诱导动物产生免疫应答的方法,该方法包括给予动物一定量的组合物,该组合物包含能有效诱导动物产生免疫应答的灭活的非致病性病毒。

本发明还提供了导致细胞死亡的方法,该方法包括将含有一定量的非致病性病毒的组合物给予细胞以导致细胞的死亡。

另外,本发明还提供了在动物体内刺激 CTL 反应的方法,该方法包括将含有一定量的非致病性病毒的组合物给予动物以刺激动物体内的 CTL 反应,其中非致病性的病毒是昆虫特异性病毒。

本发明提供了抑制动物体内肿瘤生长的方法,该方法包括将一定量的含有昆虫特异性的非致病性病毒的组合物给予动物以有效抑制动物体内肿瘤的生长。

本发明还提供了影响动物体内肿瘤缓解的方法,该方法包括将一定量的含有非致病性病毒的组合物给予动物以有效地影响肿瘤的缓解。

本发明还提供了抑制动物体内肿瘤转移的方法,该方法包括将一定量的含有非致病性病毒的组合物给予动物以有效地抑制肿瘤在动物体内的转移。

本发明提供了使动物对再次接种的肿瘤耐受的方法,该方法包括将含有非致病性病毒的组合物给予动物。

另外,本发明还提供了抑制动物体内的非肿瘤性增生性疾病的方法,该方法包括将含有非致病性病毒的组合物给予动物。

本发明还提供了抑制动物体内的异常增生或化生的方法,该方法包括将一定量的含有非致病性病毒的组合物给予动物以有效地抑制动物体内的异常增生。

本发明还提供了抑制患病个体的一种或多种肿瘤症状的方法,该方法包括将一定量的含有非致病性病毒的组合物给予患病个体以有效地抑制其体内的一种或多种肿瘤症状。

另外,本发明还提供了保护动物不受感染性疾病感染的方法,该方法包括将一定量的含有非致病性灭活病毒的组合物给予动物以有效地保护动物不受感染性疾病的感染。

本发明还提供了抑制动物体内感染性疾病的方法,该方法包括将一定量的含有非致病性病毒的组合物给予动物以有效地防止动物发生感染性疾病。

本发明提供了导致一群细胞发生死亡的方法,该方法包括使细胞群中的部分细胞与含有一定量的非致病性病毒的组合物接触以有效地导致该细胞群发生细胞死亡。

本发明提供了治疗疾病患者疾病的方法,该方法包括灭活非致病性病毒,其中非致病性病毒通过加入浓度约为 5-10 μ g/ml 的三甲基补骨脂素(trioxalen)并在约 365nm 和 6W 的紫外线下照射 15 分钟加以灭活,将灭活的非致病性病毒制备成药物组合物;以及将药物组合物给予患者。

本发明还提供了预测一种化合物在体内的抗肿瘤活性的方法,该方法包括使化合物与肿瘤细胞和外周血单核细胞接触;以及测定肿瘤细胞的死亡率。能引起被接触

肿瘤细胞死亡的化合物被认为是具有体内活性的化合物。

另外，本发明提供了阻止个体产生肿瘤的方法，该方法包括将一定量的含有非致病性病毒的组合物给予个体以有效地防止个体发生肿瘤。

另外，本发明提供了包含非致病性病毒和外周血单核细胞(PBMC)的组合物。

本发明还提供了包含非致病性病毒的组合物，其中的非致病性病毒至少通过两种不同的方法灭活。

本发明还提供了包含非致病性病毒和至少一种 PBMC 的组合物，其中的非致病性病毒用选自如下一组的两种或两种以上的方法灭活：基因灭活、化学灭活、光化学灭活、紫外线灭活、热灭活或放射线灭活。

本发明提供了制备包含非致病性病毒的抗肿瘤或抗感染性疾病组合物的过程。该过程包括将病毒暴露于第一灭活剂以有效地灭活活性病毒，将病毒暴露于第二灭活剂以有效地灭活活性病毒，将病毒与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合，以及用体外试验证明病毒是无活性的。

本发明还提供了包含一种非致病性的灭活病毒和至少一种抗原以及至少一种佐剂的药物组合物，其中的抗原与非致病性的灭活病毒明显不同。

另外，本发明还提供了包含佐剂组合物的免疫刺激组合物。佐剂组合物含有非致病性的灭活病毒和至少一种抗原。该抗原与佐剂组合物不同，另外，免疫刺激组合物还能够提高机体对抗原的免疫应答。

本文所描述的方法涉及人体的治疗，但是这些方法也可用于治疗需要治疗的任何哺乳动物。在某些实施方式中，可用本发明的方法治疗或预防的肿瘤和非肿瘤性疾病包括而限于肺、乳腺和皮肤的肿瘤和非肿瘤性疾病。在某些实施方式中，感染性疾病也可被治疗或预防，其中包括病毒感染。

本发明还提供了可用于本文所描述的抗癌方法中的非致病性病毒，这些非致病性病毒包括活病毒、灭活病毒、病毒颗粒、病毒体、病毒样颗粒、病毒包含体或病毒成分。在某些实施方式中，病毒成分包括肽、蛋白、核酸、脂质、糖及其混合物。在某些实施方式中，病毒成分是 gp16。

在某些实施方式中，非致病性病毒是昆虫特异性病毒。在某些实施方式中，昆虫特异性病毒是杆状病毒科的病毒。例如，本发明的非致病性病毒包括核型多角体病毒或颗粒体病毒。在某些实施方式中，非致病性的病毒是苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒。

在某些实施方式中，为了治疗肿瘤将非致病性病毒以及选择添加的抗原和/或佐剂

通过瘤内注射和/或瘤旁注射给予哺乳动物受试者。在某些实施方式中, 为了治疗非肿瘤性增生性疾病将非致病性病毒以及选择添加的抗原和/或佐剂通过病变部位内注射和/或病变部位旁注射给予哺乳动物受试者。治疗方案可以是多次注射非致病性病毒, 还可以选择添加其他抗癌治疗措施。

附图简述

图 1 是一个线形图, 描述的是表达 CCL21 的杆状病毒可在 3LL 肺癌鼠模型内抑制肿瘤的生长以及诱导肿瘤的完全缓解。如实施例 2 所描述, CCL21 给药方案包括以所示的浓度在瘤内注射 6 次。随着注射剂量的增加肿瘤被抑制的程度及完全有效发生的几率也增加。24 天时采集数据进行单因子变异数分析 (One way ANOVA analysis)。白蛋白组与治疗组相比 $P < 0.001$; $25 \mu\text{g mCCL21}$ 组与 $6 \mu\text{g /Alb mCCL21}$ 组相比 $P < 0.01$; $25 \mu\text{g mCCL21}$ 组与 $25 \mu\text{g rhCCL21}$ 组相比 $P > 0.05$ 。mCCL21, 鼠 CCL21; rhCCL21, 重组人 CCL21; B Gold, 杆状病毒表达的重组鼠 CCL21, 作为参考点 (“Gold Standard”); Alb, 白蛋白; qd, 每天 (每日给药); CR, 完全有效。

图 2 是一个线形图, 描述的是注射表达 CCL21 的杆状病毒后 4T1 乳腺癌鼠模型中肿瘤生长的抑制, 如实施例 3 所描述。rhCCL21, 重组人 CCL21; qd, 每天 (每日给药)。

图 3 是一个柱形图, 描述的是注射表达 CCL21 的杆状病毒后自发性 4T1 肺癌转移的抑制, 如实施例 6 所描述。实心柱, 未进行肿瘤手术切除的动物; 阴影线柱, 最末一次注射 CCL21 后 1 天进行肿瘤手术切除的动物。

图 4 是一个线形图, 描述的是给予表达 CCL21 的杆状病毒可以使动物对再次接种的肿瘤耐受, 如实施例 5 所描述。简言之, 在 Balb/c 小鼠体内建立 4T1 肿瘤, 其中一部分小鼠通过在瘤内注射表达 CCL21 的杆状病毒进行治疗。最后一次注射 CCL21 后 1 天, 通过手术切除肿瘤。切除肿瘤后 1 天, 在原肿瘤部位的对侧皮下注射 4T1 细胞给小鼠再次接种肿瘤。空白鼠是指未进行肿瘤接种也未进行 CCL21 处理的小鼠; Alb + Surg + Re-chlg, 先接种 T41 肿瘤再进行白蛋白处理的小鼠; hCCL21 + Surg + Re-chlg, 先接种 T41 肿瘤再进行 CCL21 处理的小鼠。在 Alb + Surg + Re-chlg 组中, 10 只小鼠中有 1 只对肿瘤具有完全的抵抗力。在 hCCL21 + Surg + Re-chlg 组, 10 只小鼠中有 6 只对肿瘤具有完全的抵抗力。

图 5A-5B 说明了杆状病毒诱导的对再接种肿瘤的抵抗力。在 3LL 肿瘤模型中, 用表达 CCL21 的杆状病毒成功处理的动物对同种肿瘤的再次接种具有抵抗力, 生存

期延长。图 5A 总结了一个试验的结果,在该试验中,用表达鼠重组 CCL21 的杆状病毒处理后动物体内的肿瘤完全缓解(见图 1),在最后一次给予表达 CCL21 的杆状病毒后 60、70 和 80 天在原肿瘤位置的对侧给小鼠再次接种同种肿瘤。在至少 70 天内动物对再次接种的肿瘤具有抵抗力。图 5B 总结了另一个试验的结果,在该试验中,用表达 CCL21 的杆状病毒处理诱导肿瘤完全缓解("肿瘤加强")后 30 天给动物接种肿瘤,然后在最后一次给予表达 CCL21 的杆状病毒后 80、120、160 和 200 天在原肿瘤位置的对侧给小鼠再次接种同种肿瘤。这些结果表明利用肿瘤加强可使动物在至少 200 天内对再次接种的肿瘤具有抵抗力。

图 6 是一个线形图,描述的是酵母或大肠杆菌产生的 CCL21 在 3LL 肺癌模型中不能诱导肿瘤缓解。hCCL21-B(HBPG1),杆状病毒表达的重组人 CCL21,lot# HBPG1; hCCL21-B 1/2 (HBPG1),杆状病毒表达的重组人 CCL21,lot# HBPG1,稀释到 hCCL21 (HBPG1)浓度的一半; hCCL21-B conc. (HBPG1),来源于浓缩溶液(10 mg/ml)的杆状病毒表达的重组人 CCL21,lot# HBPG1; hCCL21-Y (HYPG4),酵母表达的重组人 CCL21,lot# HYPG4; hCCL21-E(HEDS4),大肠杆菌表达的重组人 CCL21,lot# HEDS4; qd,每天(每日给药)。用白蛋白处理的小鼠与用 hCCL21-B 或 hCCL21-B new 处理的小鼠相比,其肿瘤的生长受到抑制, $P < 0.01$;与用 hCCL21-B conc 或 hCCL21-B 1/2 处理的小鼠相比,其肿瘤的生长也受到抑制, $P < 0.05$ 。

图 7 是一个线形图,描述的是在体内无活性的杆状病毒表达的 CCL21 制剂在体外的趋化活性。趋化活性的分析基本按照 PCT 国际专利文献 WO 00/38706 描述的方法进行。体内活性的评价描述于实施例 2-6。HBDS2.p,杆状病毒来源的重组人 CCL21,lot# HBDS2.p; MBDS2.c,杆状病毒来源的重组鼠 CCL21,lot# MBDS2.c; HBPG1,杆状病毒来源的重组人 CCL21,lot# HBPG1; HBPG1 + HBDS2.vp,用乙炔吡啶处理的等比例的 HBPG1 和 HBDS2 混合物; HYPG4,酵母来源的重组人 CCL21,lot# HYPG4; HEDS4,大肠杆菌来源的重组人 CCL21,lot# HEDS4。

图 8 描述的是一个蛋白质印迹试验结果,其中所示的样品与抗 gp64 抗体杂交。条带 1,纯化的杆状病毒;条带 2,未感染的 Tn5 细胞培养物的条件培养基;条带 3,感染野生型杆状病毒的 Tn5 细胞培养物的条件培养基;条带 4,感染表达重组人 CCL21 的 BV422 的 Tn5 细胞培养物的条件培养基;条带 5,未感染的 Tn5 细胞团;条带 6,感染野生型杆状病毒的 Tn5 细胞团;条带 7,感染 BV422 的 Tn5 细胞团;条带 8,杆状病毒来源的人重组 CCL2,lot# HBPG1 过滤液,去掉 >50 kDa ($5\mu\text{g}$ 蛋白质)的杂蛋白;条带 9,含有 >50 kDa ($5\mu\text{g}$ 蛋白质)杂蛋白的条带 8 的样品过滤

液残留物；条带 10，含有杂蛋白（10 μ g 蛋白质）的条带 8 的样品过滤液残留物；条带 11，5 μ g 未过滤的杆状病毒来源的重组人 CCL21，lot# HBPG1；条带 12，5 μ g 未过滤的杆状病毒来源的重组人 CCL21，lot# HBDS4；条带 13，5 μ g 未过滤的杆状病毒来源的重组人 CCL21，lot# HBMC1；条带 14，5 μ g 未过滤的杆状病毒来源的重组人 CCL21，lot# HBDS1。

图 9 是一个线形图，描述的是经过过滤去掉高分子杂蛋白后的杆状病毒表达的 CCL21 的抗肿瘤活性。纯化的杆状病毒是 CCL21 制备物的污染物（图 8），与杆状病毒表达的 CCL21 制备物具有一样的肿瘤抑制活性。

图 10A 是一个线形图，描述的是当肿瘤细胞在体外与所示的组合物接触后 PBMC 介导的对肿瘤细胞的毒性，如实施例 8 所描述。细胞团所诱导的细胞毒反应比细胞上清液所诱导的细胞毒反应要高很多。感染表达 CCL21 的杆状病毒或对照杆状病毒 BV762 的细胞都表现出明显的细胞毒活性。GAM，未用细胞培养物调整的生长分析培养基（对照）；BV422，表达 CCL21 的杆状病毒；V762，表达 Raf 的杆状病毒。

图 10B 是一个线形图，描述的是当肿瘤细胞在体外与所示的经 0.2 μ m 滤膜过滤的组合物接触后 PBMC 介导的对肿瘤细胞的毒性，如实施例 8 所描述。通过过滤去掉高分子物质可使细胞毒活性显著下降。细胞团样品显示出残留的低度到中度的细胞毒活性。

图 11A 是一个柱形图，描述的是树突细胞经所示的刺激后 CD86 和 MHC II 表达的变化。实施例 9 描述了鼠骨髓衍生的树突细胞的制备方法和分析方法。表达 HIV gag 蛋白（VLP）的痘苗病毒作为阳性对照。与 VLP 一样，活的杆状病毒可诱导 CD86 和 MHC II 的表达，这两个分子是 DC 成熟的标志。黑色柱，CD86 的表达；灰色柱，MHC II 的表达。

图 11B 是一个柱形图，描述的是树突细胞经所示的刺激后 CD86 和 MHC II 表达的变化。实施例 9 描述了人单核细胞来源的树突细胞的制备方法和分析方法。表达 HIV gag 蛋白（p55 VLP）的痘苗病毒作为阳性对照。与 p55 VLP 一样，活的杆状病毒可诱导 DC 的成熟。黑色柱，CD86 的表达；灰色柱，HLA-DR 的表达。

图 12 描述的是铬释放试验的结果，试验方法见实施例 10 的描述。表达 HIV gag 蛋白（VLP）的痘苗病毒作为阳性对照。与 VLP 一样，活的杆状病毒可作为一种高效的佐剂诱导细胞毒 T 细胞的杀伤活性。

图 13 描述的是当肿瘤细胞在体外与所示的组合物接触后 PBMC 介导的对肿瘤细胞的毒性，如实施例 8 所描述。

图 14 描述的是 PBMC 细胞毒活性与体内抗肿瘤活性的关系。

图 15 描述的是用抗 gp64 单克隆抗体阻断杆状病毒的肿瘤细胞杀伤效应。见实施例 13。

图 16 描述的是灭活杆状病毒在体外诱导的 PBMC 介导的肿瘤细胞杀伤作用。见实施例 14。

图 17 表明肿瘤细胞是杆状病毒的主要靶位。见实施例 15。

图 18 描述的是杆状病毒在肺癌动物模型中的肿瘤生长抑制效应。见实施例 16。

图 19 描述的是杆状病毒在体内和体外诱导的对致病性病毒感染的保护作用。细胞在体外和体内用水泡性口炎病毒 (VSV) 感染。见实施例 17。

图 20 描述的是旁观者效应。当肿瘤细胞群中 20% 的细胞与杆状病毒接触后就可以达到最大杀伤效应。

发明详述

A1. 非致病性病毒的抗肿瘤活性

治疗肿瘤的免疫学方法包括以趋化因子作为治疗性药物。趋化因子是一族同源性蛋白质，其功能包括：(a) 介导淋巴细胞的迁移和活化；(2) 调节血管生成；(c) 以及维持免疫平衡和次级淋巴器官的结构。见 Baggiolini 等, (1997) *Annu Rev Immunol* 15: 675-705; Jung & Littman (1999) *Curr Opin Immunol* 11: 319-25; 以及 Homey 等, (2002) *Nat Rev Immunol* 2: 175-84。

如实施例 1-6 所描述，在研究利用次级淋巴组织趋化因子（本文称为“CCL21”；本领域中也称为 SLC、Exodus-2 和 6C-kine）进行肿瘤的免疫治疗的过程中，本发明的发明者惊奇地发现非致病性的病毒是具有高活性的抗肿瘤因子。见实施例 7。

因此，本发明提供了方法以治疗需进行抗癌治疗的患者，其中包括通过给予患者非致病性的病毒以抑制肿瘤的生长，抑制肿瘤的转移以及诱导对肿瘤抵抗力。值得注意的是，本文所描述的肿瘤治疗方案不需要鉴别出肿瘤特异性的抗原。因此，非致病性病毒的应用范围很宽，对多种类型的肿瘤都有疗效。见实施例 2-6。

虽然发明者不希望固定于特定的操作模式，但是发明者认为非致病性病毒的抗癌活性应该归功于，至少部分归功于其免疫刺激活性。例如，杆状病毒在体外和体内都可诱导树突细胞的成熟和细胞毒 T 细胞(CTL)反应。见实施例 9-10。另外参见 Gronowski 等, (1999) *J Virol* 73: 9944-51。

本文所用的术语“病毒”用于描述一种有效的抗肿瘤组合物，包括活病毒、灭活

病毒、病毒颗粒、病毒包含体、病毒体、病毒样颗粒、病毒成分及其混合物。

病毒体和病毒样颗粒(VLPs)通常包含非致病性病毒的一种或多种蛋白质,还可以选择添加磷脂。在某些实施方式中,病毒体和VLPs是非复制型的,不含有任何的天然病毒基因组。病毒蛋白可以是通过重组方法制备的,也可以是从完整病毒中分离的。VLPs在下面的文献中还有进一步描述:WO 03/024480, WO 03/024481, Niikura等, (嵌合重组戊型肝炎病毒样颗粒作为提呈外源表位的口服疫苗载体“Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes”, *Virology* (2002) 293: 273-280); Lenz等, (乳头状瘤病毒样颗粒诱导树突细胞的急性活化“Papilloma rivurs-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells”, *Journal of Immunology* (2001) 5246-5355); Pinto等, (人乳头状瘤病毒(HPV)-16 L1 诱导的细胞免疫应答,用重组 HPV-16 L1 病毒样颗粒免疫健康志愿者“Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus(HPV)-16 L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles”, *Journal of Infectious Diseases* (2003) 188: 327-338); 以及 Gerber等, (人乳头状瘤病毒样颗粒与大肠杆菌热稳定性的外毒素突变体 R192G 或 CpG 联合使用时是一种有效的口服免疫原“Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG”, *Journal of Virology* (2001) 75 (10): 4752-4760)。病毒体在下面的文献中有进一步的描述: Gluck等, (未来开发疫苗的新技术平台“New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future”, *Vaccine* (2002) 20: B10-B16)。

术语“活病毒”是指感染性与天然病毒相似或一样的病毒。活病毒尤其可以感染其天然的宿主细胞。

术语“灭活病毒”是指在天然宿主细胞内无法复制的病毒,下文有进一步的描述。例如,非致病性的病毒在哺乳动物宿主细胞内不能复制,同样被灭活后在其天然宿主细胞内也无法复制。使用灭活病毒可降低人们对使用活病毒安全性的担心。“灭活剂”是指用于灭活病毒的试剂。

术语“病毒颗粒”是指天然形式经改造或修饰后的病毒,因而在天然宿主细胞内无复制能力。制备病毒颗粒的方法是本领域所熟知的。可通过电镜、免疫原性分析和标准噬菌斑形成试验来评价病毒样颗粒的结构完整性和功能完整性。例如, Hamakubo等, WO 02/06305 描述了去核杆状病毒样颗粒的制备方法。

美国专利 No. 5, 750, 383 描述了利用标记获救系统制备杆状病毒颗粒的方法。

该方法利用了遗传修饰的杆状病毒,这种病毒缺乏病毒复制所必需的基因(如 gp64),只能在能弥补其遗传缺陷的细胞内繁殖。

术语“病毒包含体”是指包含多个包被在病毒编码蛋白晶体内的病毒颗粒的结构。蛋白晶体一旦裂解,多个病毒颗粒就会释放出来,每个病毒颗粒随后都可以感染宿主细胞。

病毒,特别是杆状病毒可用本领域熟知的技术制备。在体外用培养基培养克隆细胞系,接种病毒后在适于病毒复制的条件下孵育足够的时间。培养条件如细胞密度、感染复数、时间、温度、培养基等都不是关键的因素,本领域的技术人员可以很容易地确定选用何种条件。

制备杆状病毒的典型方法见实施例 1 的描述,该方法利用了草地夜蛾(Sf)细胞。其他有代表性的宿主细胞及扩增方法见美国专利 Nos. 5, 405, 770 (*Heliothis subflexa* 细胞系)和 6, 379, 958 (草地夜蛾细胞系,该细胞系可提高杆状病毒的产量)的描述。

经过孵育以后,产生出的病毒用本领域常规的技术回收,其中包括聚乙二醇(PEG)沉淀、超速离心以及色谱纯化,例如利用离子交换树脂、排阻层析、亲和层析或结合使用。见美国专利申请 No. 2002/0015945 (色谱纯化);美国专利 No. 6, 194, 192 (病毒吸附到含硫酸岩藻糖的多糖上)。

术语“病毒成分”用于本文中是指非致病性病毒来源的保留了其亲本活病毒的抗肿瘤和/或抗感染性疾病活性的分子。在某些实施方式中,病毒成分抗肿瘤活性的大小及特异性与其亲本活病毒一样。术语“病毒成分”包括病毒的任何成分,如蛋白、肽、核酸、脂质、糖及其他生物活性分子及其混合物。在某些实施方式中,病毒成分分是 gp64。

例如,病毒成分可以是病毒外壳蛋白或病毒核蛋白核心的 DNA 相关蛋白。典型的杆状病毒外壳蛋白见如下文献的描述: Pearson 等, (1988) *Virology* 167: 407-13; Summers & Smith (1978) *Virology* 84: 390-402; Thiem & Miller (1989) *J Virol* 63: 2008-18 以及 Vialard & Richardson (1993) *J Virol* 67: 5859-66。典型的杆状病毒 DNA 相关蛋白见 Tweeten 等 (1980) *J Virol* 33: 866-876; Wilson 等 (1987) *J Virol* 61: 661-6 以及 Rohrmann (1992) *J Gen Virol* 73 (Pt 4): 749-61 的描述。

病毒成分还可以是存在于病毒包含体内的蛋白和多糖,其中包括成熟包含体的包含体基质以及花萼外层。典型的杆状病毒包含体蛋白包括多角体和花萼。

本文说明非致病性病毒具有很高的抗肿瘤活性和/或抗感染性疾病活性,本领域的技术人员在阅读本说明书后可以很容易地鉴定、纯化或者制备和使用具有亲本活病

毒抗肿瘤活性和/或抗感染性疾病活性的病毒成分。例如，美国专利 No. 6, 001, 806 描述了一种生物化学方法，该方法首先裂解杆状病毒感染的昆虫细胞并分离其中的不同组分，然后利用其中的洗脱组分鉴定可被亲本活病毒识别的具有抗病毒活性的糖蛋白。

另外，利用本领域熟知的重组方法可以很容易地制备病毒蛋白和核酸，并且同样可以检测其抗肿瘤活性和/或抗感染性疾病活性。例如，病毒核酸可被克隆、合成、改变、突变等。用于分离核酸的标准重组 DNA 和分子克隆技术在下列参考书中有描述：Sambrook 等(编) (1989) 分子克隆：实验室手册 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Silhavy 等, (1984) 基因融合试验技术 (Experiments with Gene Fusions), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover & Hames (1995) DNA 克隆：操作方法 (DNA Cloning: A Practical Approach), 第二版, IRL Press at Oxford University Press, Oxford/New York; 以及 Ausubel(编) (1995) 分子生物学简明手册 (Short Protocols in Molecular Biology), 第三版, Wiley, New York。重组制备的多肽也可以用本领域技术人员所熟知的多种标准方法纯化和鉴定，见 Schröder & Lübke (1965) 肽 (The Peptides), Academic Press, New York; Schneider & Eberle (1993) 肽 1992：第 22 届欧洲多肽论坛论文集 (Peptides, 1992: Proceedings of the Twenty-Second European Peptide Symposium), 9 月 13-19 日, 1992, Interlaken, Switzerland. Escom, Leiden; Bodanszky (1993) 肽合成原理 (Principles of Peptide Synthesis), 第二版, Springer-Verlag, Berlin, New York; 以及 Ausubel(编) (1995) 分子生物学简明手册 (Short Protocols in Molecular Biology), 第三版, Wiley, New York。

特别是 AcNPV 完整序列已经清楚(Kool 和 Vlak, 1993)，因此利用已知的方法可以很容易地系统分析所有的 AcNPV 蛋白，包括重组表达和抗肿瘤活性的检测。

为了更容易地鉴定具有活性的病毒成分，本发明还提供了一种体外分析方法用于筛选候选病毒成分。见实施例 8。该分析方法包括用外周血单核细胞 (PBMC) 诱导细胞毒活性。如本文所描述，非致病性病毒可诱导 PBMC 对肿瘤细胞的细胞毒活性，这种活性与其在体内所观察到的抗肿瘤活性是相关的。候选病毒成分包括非致病性病毒的生化组分、纯化的或重组的病毒蛋白、纯化的或合成的核酸、病毒体、病毒样颗粒等。

本文所用的术语“非致病性的”用于描述病毒，是指该病毒不能感染其哺乳动物宿主，在某些实施方式中，非致病性病毒不能感染任何哺乳动物宿主。在某些实施

方式中，非致病性病毒对人没有感染性。为了便于描述，除非特别说明，术语“非致病性的”病毒包括灭活病毒、病毒颗粒、病毒包含体、病毒体、病毒样颗粒、病毒成分及其混合物。

术语“感染性”通常是指对宿主细胞或生物体有害的特性，例如通过基因的表达和/或通过宿主内的复制对宿主细胞或生物体造成损伤。与此定义相一致的是，非致病性并不排除可以进入哺乳动物细胞，但是进入以后对宿主细胞或生物体的健康没有影响。然而在某些实施方式中，非感染性的病毒不能进入哺乳动物细胞。

非致病性病毒如杆状病毒在哺乳动物宿主细胞内是转录静止的。因此，在某些实施方式中，非致病性病毒是一类被目前的基因治疗方法排除在外的病毒，因为其携带的外源基因也不表达。

非致病性病毒的例子包括而不限于昆虫特异性病毒、两栖动物特异性病毒以及植物特异性病毒。可用于本文所描述的方法中的典型病毒包括杆状病毒家族的病毒（例如核型多角体病毒（NPV），其中包括苜蓿银纹夜蛾 NPV，以及颗粒体病毒（GV），其中包括草地夜蛾颗粒体病毒），多分 DNA 病毒科的病毒（如姬蜂病毒（*ichnoviruses*），其中包括 *Campoplex sonorensis virus*，以及茧蜂病毒（*bracoviruses*），其中包括 *Cotesia Melanoscela virus*），囊泡病毒，四病毒科和罗达病毒科（如野田村病毒，其中包括日本库蚊病毒和禽兽棚病毒（*Flock House Virus*））。可用于本发明的许多非致病性病毒在昆虫中都可以找到。见 Fields 等编，（1996），*Virology*, Lippincott-Rave Publishers, Philadelphia, Pennsylvania.

术语“感染性疾病”是指对其宿主有害的因子（如病毒、真菌或细菌）。在某些实施方式中是指对人有害的因子。“抗感染性疾病”的措施是指可预防、改善或根除感染性疾病和/或其致病因子的治疗措施。

感染性疾病的例子包括而不限于 HIV、西尼罗河病毒、甲型、乙型、丙型肝炎、天花、结核、水泡性口炎病毒（VSV）、呼吸道合胞体病毒（RSV）、人乳头状瘤病毒（HPV）、SARS、流感、埃博拉病毒、病毒性脑膜炎、疱疹、炭疽、莱姆病以及大肠杆菌等。

在某些实施方式中，非致病性病毒是杆状病毒。如下面实施例所描述的，本发明证明杆状病毒是一种高活性的肿瘤生长抑制因子，可促进肿瘤的完全缓解。本发明还证明杆状病毒可用于抑制肿瘤的转移，提高动物对再次接种肿瘤的抵抗力，如实施例 5-6 的描述。

如本文所述，术语“肿瘤再次接种”是指癌或肿瘤已被治疗或切除的动物再次接

种新的肿瘤。与本文上面所提供的定义相一致的是，术语“杆状病毒”包括杆状病毒颗粒和杆状病毒成分。

杆状病毒的宿主特异性已得到彻底研究。虽然已知杆状病毒可感染 30 多种鳞翅类昆虫，但是它不能感染已经研究过的其他昆虫细胞和超过 35 种哺乳动物细胞系。见 Tjia 等, (1983) *Virology* 125: 107-17; Volkman & Goldsmith (1983) *Appl Environ Microbiol* 45: 1085-1093; 以及 Mdntosh & Shamy (1980) *Intervirology* 13: 331-41。但是，杆状病毒确实可以进入哺乳动物细胞，在宿主细胞核内也可以检测到病毒 DNA。见 Groner 等, (1984) *Intervirology* 21: 203-9; Tjia 等, (1983) *Virology* 125: 107-17; 以及 Volkman & Goldsmith (1983) *Appl Environ Microbiol* 45: 1085-93。

术语“非致病性的”病毒还可以指天然形式是具有致病性的但是经修饰后是非致病性的病毒。这种修饰包括基因修饰（如打断病毒复制所必需的基因，如本文所描述的杆状病毒基因 gp64；和/或打断病毒启动子使其在宿主内无转录活性）。例如，杆状病毒物种特异性的致病性部分是由于杆状病毒启动子在鳞翅类昆虫以外的物种内保持静默。当异源启动子插入到杆状病毒基因组时，被修饰的病毒就可以在非鳞翅类昆虫细胞系内启动基因的表达，其中包括各种哺乳动物细胞系。见 Boyce & Bucher (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2348-52; Carbonell 等, (1985) *J Virol* 56: 153-60; Carbonell & Miller (1987) *Appl Environ Microbiol* 53: 1412-7; 以及 Hofmann 等, (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10099-103。在哺乳动物细胞内原本有活性的病毒启动子同样也可以被修饰成无活性的启动子，这样病毒在哺乳动物细胞内就是非致病性的。制备碱基对改变、缺失或小片段插入的位点特异性突变方法也是本领域所熟知的，例如本文上面所提到的参考文献所描述的方法。

确定经修饰的病毒和未经修饰的病毒是否是非致病性的可以通过本领域所熟知的确定病毒感染性和复制能力的方法很容易地加以分析。典型的方法见 Tjia 等, (1983) *Virology* 125: 107-17; Volkman & Goldsmith (1983) *Appl Environ Microbiol* 45: 1085-93; Mdntosh & Shamy (1980) *Intervirology* 13: 331-41; 以及美国专利 No. 6, 248, 514 等的描述。

本发明还提供了具有抗癌活性和/或抗感染性疾病活性和/或佐剂活性的非致病性病毒，其中包括活病毒、灭活病毒、病毒颗粒、病毒体、VLPs、病毒包含体以及病毒成分。本发明还提供了筛选可用于本文所描述的治疗方法中的非致病性病毒的方法。

为了筛选具有抗癌活性的非致病性病毒，候选非致病性病毒用实施例 8 所描述的

体外或体内肿瘤细胞溶解试验和/或实施例所描述的体内抗癌活性试验模型来检测。在某些实施方式中，先用体外试验进行初步筛选，然后在相关的动物模型内评价那些具有体外活性的病毒在体内是否也具有抗癌活性。

为了筛选具有佐剂活性的非致病性病毒，需要检测候选非致病性病毒增强抗原免疫原性的能力。免疫原性可通过检测 T 细胞介导的反应来确定。检测 T 细胞反应的经典方法包括体外细胞毒性试验或体内延迟型超敏试验。在某些实施方式中，CCL21 联合非致病性病毒可在体外诱导 PBMC 对肿瘤细胞的细胞毒活性，这种活性与其在体内的抗肿瘤活性相关。另外也可以用其他抗原来代替 CCL21。另外还可以通过检测受试者血清中抗原特异性的抗体和/或证明抗原特异性的抗血清或免疫细胞具有保护作用来分析免疫原性。在某些实施方式中，非致病性病毒可使抗原的免疫原性至少提高约 2 倍、约 5 倍、约 10 倍、约 25 倍或约 100 倍。

在某些实施方式中，非致病性的病毒是被灭活的，如下文将要进一步描述的。具有抗癌活性的非致病性病毒可用各种灭活方法使其不再具有感染天然宿主细胞的能力。利用本文所描述的试验，本领域的技术人员可选择能保持病毒抗癌活性的灭活方法。在某些实施方式中，灭活方法可以保持病毒进入细胞的能力但是病毒基因组却失去了转录和/或复制能力。在某些实施方式中，对病毒进行基因修饰使其能进入细胞但是不能进行正常的转录和/或复制。

A2. 非致病性病毒的抗感染性疾病活性

目前所用的治疗感染性疾病的方法包括使用一些能引起副作用的药物。另外，许多有效的治疗措施包括疫苗只对单一感染因子或其密切相关的因子具有特异性。本发明的发明者惊奇地发现非致病性病毒也具有很高的抗感染性疾病的能力。见实施例 17。

为了筛选具有抗感染性疾病活性的非致病性病毒，利用本领域技术人员所熟知的体外或体内抗感染性疾病检测方法检测候选非致病性病毒。例如，对于结核来说，可用 TB 模型或体外巨噬细胞模型检测病毒的抗感染性疾病活性。Abe 等, (Journal of Immunology, 2003, 171: 1133-1139)描述了适于检测化合物抗感染性疾病活性的其他方法。

在某些实施方式中，先用体外试验进行初步筛选，然后在相关的动物模型内评价那些具有体外活性的病毒在体内是否也具有抗感染性疾病活性。

因此，本发明还提供了通过给予患者非致病性病毒对需要进行抗感染性疾病治疗的患者进行治疗的方法。值得注意的是，本文所描述的具有抗感染性疾病活性的非

致病性病毒并不依赖于感染因子特异性抗原的鉴定。而且非致病性病毒具有很宽的使用范围。

虽然发明者不希望固定于特定的操作模式，但是发明者认为非致病性病毒的抗感染性疾病活性应该归功于，至少部分归功于其免疫刺激活性。例如，杆状病毒在体外和体内都可诱导树突细胞的成熟和细胞毒 T 细胞(CTL)反应。见实施例 9-10。

B. 治疗方面的应用

本发明提供了通过给予受试者非致病性病毒以治疗荷瘤哺乳动物受试者的方法。本文所描述的方法可用于抑制癌的生长，包括癌的完全缓解，抑制癌的转移以及提高受试者对癌的抵抗力。

本发明提供了通过给予受试者非致病性病毒以治疗患有的一种或多种感染性疾病的动物的方法。本文所描述的方法可用于抑制病毒的复制、抑制真菌的生长。

术语“癌的生长”通常是指预示癌向更高阶段发展的多个指数中的任意一个指数。因此，用于评价癌生长抑制效应的指数包括而不限于存活癌细胞数量的减少、癌体积的缩小或形态的改变（如通过 CT、超声或其他影像方法确定）、肿瘤生长的延迟、肿瘤血管的破坏、迟发型超敏皮肤试验结果的改善、细胞毒 T 细胞活性的升高以及肿瘤特异性抗原表达水平的下降。

术语“肿瘤生长的延迟”是指肿瘤生长到特定大小所需要的时间减少。例如，治疗可以延迟肿瘤体积增加到测量开始时（第 0 天）体积的 3 倍所需要的时间或者肿瘤生长到 1cm^3 所需要的时间。

术语“对癌的抵抗力”是指受试者对癌生长抵抗能力的提高，特别是已有癌的生长。另外，术语“对癌的抵抗力”也指受试者体内癌生长易感性的降低。对癌的抵抗力与获得性免疫应答的诱导有关，如下文所描述。

本文所用的术语“受试者”包括任何哺乳动物种。在某些实施方式中，本发明的方法优选用于治疗哺乳动物的癌和/或感染性疾病，如人以及那些濒临灭绝的对人类具有经济价值和/或社会价值的哺乳动物。

术语“癌”通常是指肿瘤，包括原发肿瘤和转移瘤。在某些实施方式中，肿瘤是实体瘤。术语“肿瘤”包括实体瘤和任何组织的癌，其中包括而限于乳腺癌；结肠癌；直肠癌；肺癌；鼻咽癌；喉癌；食管癌；胃癌；胰腺癌；肝癌；胆囊癌；胆管癌；小肠癌；泌尿道肿瘤包括肾癌、膀胱癌和尿路上皮癌；女性生殖道肿瘤包括宫颈癌、子宫癌、卵巢癌（如绒毛膜癌和妊娠滋养细胞疾病）；男性生殖道肿瘤包括前列腺癌、精囊癌、睾丸和生殖细胞肿瘤；内分泌腺肿瘤包括甲状腺癌、肾上腺

癌和脑下垂体癌；皮肤癌（如血管瘤和黑色素瘤）；骨癌或软组织癌；血管癌（如卡波西肉瘤）；脑肿瘤、神经肿瘤、眼肿瘤和脑脊膜肿瘤（如星形细胞瘤、胶质瘤、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、神经瘤、神经母细胞瘤、神经鞘瘤和脑膜瘤）。

术语“肿瘤”还包括造血系统恶性肿瘤来源的实体瘤，如白血病，其中包括绿色瘤、浆细胞瘤、血小板瘤和蕈样肉芽肿病和皮肤 T 细胞淋巴瘤/白血病、多发性骨髓瘤以及淋巴瘤，其中包括何杰金氏淋巴瘤和非何杰金氏淋巴瘤。

本文所用的术语“癌”还包括非肿瘤性的增生性疾病。因此，本发明的方法还可用于治疗或预防增生、化生，或者更特殊的发育异常（对这些异常增生性疾病的综述见 Robbins & Angell (1976)基础病理学(Basic Pathology)，第二版，68-79 页，W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania）。

增生是一种受控形式的细胞增殖，其中包括组织或器官内细胞数量的增加，但是其结构或功能没有改变。作为一个非限定性的例子，子宫内膜增生通常先发于子宫内膜癌。化生是另一种受控形式的细胞生长，其中一种类型的成年细胞或完全分化的细胞被另一种类型的成年细胞所替代。化生发生于上皮或结缔组织。不典型的化生包含某些无序的化生上皮。发育异常通常是癌的前兆，主要见于上皮；它是一种最常见的无序形式的非肿瘤性细胞生长，包括细胞一致性的丧失以及细胞结构定位的丧失。发育异常的细胞通常具有异常巨大而深染的细胞核，呈现多形性。发育异常通常常见于慢性刺激或慢性炎症时，常见于宫颈、呼吸道、口腔和胆囊。虽然癌前病变可以发展成恶性肿瘤，但是它可以稳定相当长一段时间，甚至在刺激因素消失后或损伤受到宿主免疫系统攻击后可以复原。

因此，如本文所述给予受试者非致病性病毒可以激发固有的抗癌免疫应答或癌特异性的适应性免疫应答。术语“免疫系统”包括所有的细胞、组织、系统、结构和过程，其中包括非特异性的部分和特异性的部分，可以提供一种防卫机制来抵抗含抗原性分子的细胞，抗原性分子包括而限于肿瘤、致病原以及自身反应细胞。因此免疫应答包括固有的免疫应答、获得性免疫应答或者二者的结合。

术语“固有的免疫系统”包括吞噬细胞如中性粒细胞、单核细胞、组织巨噬细胞、库弗细胞、肺泡巨噬细胞、树突细胞和小胶质细胞。固有的免疫系统可介导非特异性的免疫应答。固有的免疫系统在起始和指导适应性免疫系统的反应中扮演重要角色。见 Janeway (1989) Cold Spring Harb Symp Quant Biol 54: 1-13; Romagnani (1992) Immunol Today 13: 379-381; Fearon & Locksley (1996) Science 272: 50-53; 以及 Fearon (1997) Nature 388: 323-324。固有的反应包括树突细胞的成熟、巨噬细胞的活化、细

胞因子或趋化因子的分泌和/或 NF κ B 信号通路的活化。

术语“适应性免疫系统”是指对宿主体内的特异性免疫具有影响的细胞和组织。这些细胞包括自然杀伤细胞（NK）和淋巴细胞（如 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞）。术语“适应性免疫系统”还包括抗体产生细胞及其产生的抗体。

术语“适应性免疫应答”是指对抗原的特异性反应，包括体液免疫应答（如抗原特异性抗体的产生）和细胞介导的免疫应答（如淋巴细胞的增殖），如下文所定义的。适应性免疫应答还包括系统免疫和体液免疫。

术语“细胞介导的免疫”和“细胞介导的免疫应答”是指淋巴细胞提供的免疫防卫机制，如 T 淋巴细胞接近其靶细胞时所产生的防卫反应。细胞介导的免疫应答还包括淋巴细胞的增殖。测定“淋巴细胞的增殖”就是测定淋巴细胞接触特异性抗原后的增殖能力。淋巴细胞增殖是指 B 细胞、T 辅助细胞或 CTL 的增殖。

本文所用的术语“CTL 反应”是指抗原特异性细胞溶解和杀伤表达特异性抗原的细胞的能力。如本文所描述，本领域熟知的标准 CTL 分析方法可用于测定 CTL 的活性。

术语“系统免疫应答”用于本文中是指淋巴结、脾或肠道相关淋巴组织内的免疫应答，其中免疫系统的细胞，如 B 细胞被活化。例如，系统免疫应答包括血清免疫球蛋白(IgGs)的产生。另外，系统免疫应答是指血流中循环的抗原特异性的抗体以及系统免疫器官如脾和淋巴结中的抗原特异性的细胞。

术语“体液免疫”或“体液免疫应答”是指获得性免疫，其中经抗原刺激后可分泌抗体分子。

本文所用的术语“癌特异性的”是用于描述适应性免疫应答，是指受试者内细胞介导的免疫应答或体液免疫应答，其中发生的反应是受试者内已有的癌特异性的。如果固有免疫应答和适应性免疫应答所包含的免疫细胞类型是唯一的，那么就期望激发固有免疫应答的方法也能激发适应性免疫应答。但是在某些实施方式中，给予非致病性病毒既可以激发固有免疫应答，又可以激发适应性免疫应答。

在某些实施方式中，本文所描述的利用非致病性病毒进行治疗的方法可以和其他一种或多种肿瘤治疗方法一起使用。例如，在给予非致病性病毒之前或之后可以将肿瘤或异常增生的细胞手术切除。同样，本发明的非致病性病毒也可以和其他的药剂一同给药或制成一种制剂，例如抗血管生成因子、化疗药和/或其他的免疫刺激因子。可与非致病性病毒联合使用的典型药剂包括而不限于甲氨蝶呤、他莫昔芬、nelandron、尼鲁米特、阿霉素、5 氟尿嘧啶（5FU）、细胞因子如干扰素 α （IFN- α ）、

干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 2 (IL2)、白细胞介素 4 (IL4)、白细胞介素 6 (IL6)、以及肿瘤坏死因子 (TNF)。感染性疾病还可以通过给予抗病毒药物、抗生素或抗真菌药物治疗。

本发明还涉及用于在哺乳动物受试者包括人体内诱导细胞毒 T 细胞介导的免疫应答的方法和组合物。在某些实施方式中, 本发明涉及利用非致病性病毒诱导细胞毒 T 细胞介导的免疫应答。因此, 本发明提供了制备含有非致病性病毒和抗原的抗原性制剂的方法。术语“抗原”是指能通过与 T 细胞或 B 细胞受试者相互作用而活化淋巴细胞(正性或负性)的物质。正性活化可导致免疫应答, 负性活化导致免疫耐受。抗原可以是蛋白质、脂质、核酸或其混合物。抗原可以是异源抗原(如在宿主体内一般情况下不存在的抗原)或自身抗原(自体抗原)。

本发明还提供了使用本文所描述的抗原制剂作为治疗性和/或预防性药物的方法。例如, 这种抗原制剂可给予哺乳动物受试者以治疗疾病, 其中对于 HIV 感染或流感来说 CTL 反应是很重要; 另外, 这种抗原制剂还可用于治疗或预防细菌感染、寄生虫感染等。

在某些实施方式中, 本发明提供了在需要治疗的个体体内抑制肿瘤的一种或多种症状的方法。该方法包括给予个体一定量的包含非致病性病毒的组合物以有效地抑制癌症的一种或多种症状。

癌症症状是本领域技术人员所熟知的, 包括生理指标和物理指标。生理指标包括而限于肿瘤的生长、异常的细胞增生、肿瘤的转移、血管生成、细胞死亡或细胞浸润。物理指标包括而限于体重下降、出血、呼吸困难、骨折、免疫力下降或疲乏。

如本文所描述, 给予受试者非致病性病毒还可以激发抗感染性疾病免疫应答。如上所述, 所激发的免疫应答包括固有免疫应答、适应性免疫应答或者二者都存在。

本发明还提供了保护动物不受感染性疾病影响的方法, 该方法包括给予动物有效量的包含非致病性病毒的组合物。在某些实施方式中, 非致病性病毒是用任何方法或本文所描述的方法灭活的。根据下面所描述的实施例可以看到给予无活性的非致病性病毒可产生抗感染性因子(如病毒、真菌或细菌)的保护作用。非致病性病毒还可以和其他疫苗、抗病毒药物、抗真菌药物、抗细菌药物或其混合物一起使用。

C. 治疗性组合物和方法

本发明还提供了药物组合物及其使用方法。本发明的非致病性病毒可制备成安全有效的具有本文所描述的抗肿瘤和/或抗感染性疾病和/或佐剂活性的制剂。

本发明还提供了用于治疗或预防感染性疾病和/或癌的组合。在某些实施方式中,组合物包含非致病性病毒和外周血单核细胞(PBMC)。在某些实施方式中,PBMC是从动物或人体内分离出来的,在体外与非致病性病毒接触,然后再以混合物或组合物的形式输入到动物或人体内。在某些实施方式中,PBMC是从被治疗动物或人体外的其他动物或人体内分离的,或者本发明的组合物被输入到被治疗动物或人体内。

在某些实施方式中,组合物包含非致病性病毒以及至少一种肿瘤细胞。肿瘤细胞可以是治疗个体或动物自身的,也可以是同种异体的。

在某些实施方式中,组合物包含非致病性病毒、至少一种肿瘤细胞以及至少一种PBMC。在某些实施方式中,非致病性病毒是无活性的病毒。

C. 1. 病毒灭活

在某些实施方式中,本发明的方法所用的非致病性活病毒可在给予受试者前被灭活。如上面所定义的,非致病性病毒在哺乳动物宿主内不能复制。灭活可使病毒在其天然宿主细胞内失去复制能力,从而增加了其安全性。

病毒灭活可用任何适宜的方法完成,其中包括而限于破坏病毒包被的脂质或蛋白组分、对病毒进行改造以使其无法识别靶细胞、破坏病毒的核酸和/或改造病毒使其失去复制能力。典型的病毒灭活方法包括而限于巴氏消毒法、用去污剂(如Triton-X100[®])处理、用二乙烯亚胺(BEI)进行烷基化、光化学灭活、紫外线灭活、辐射灭活、物理裂解(如超声、电子束);基因灭活以及上述方法的联合。见 Rueda等,(2000) Vaccine 19: 726-34 和 Henzler & Kaiser (1998) Nat Biotechnol 16:1077-9。在某些实施方式中,灭活并不能显著降低病毒的抗原性和/或活性。病毒灭活以后可用标准的方法来确定其感染性。

“基因灭活”用于本文中是指对病毒的核酸(如基因)进行改造。这种改造包括删除一个或多个基因、突变至少一个基因;创造温度敏感突变株、灭活基因等。温度敏感突变株是指该突变株在某个温度下是允许的,而在另一个温度下是受限的(如抑制病毒的复制)。对于杆状病毒来说,制备温度敏感突变株可用于使病毒在室温(约 25°C)下繁殖和制备,而进入到具有更高内部温度的动物体内时病毒就变成了无活性的。在某些实施方式中,温度敏感突变株在约 16-28°C、约 20-28°C、约 25-28°C 或 27°C 的范围内是允许的,而在约 30-45°C、约 32-40°C、约 35-38°C、约 37°C 温度下是受限的。在某些实施方式中,受限温度是约 28°C、约 29°C、约 30°C、约 31°C、约 32°C、约 33°C、约 34°C、约 35°C、约 36°C 或约 37°C 以上的任何温度。在某

些实施方式中, 温度敏感突变株在动物或人体内是无活性的。在某些实施方式中, 当病毒处于受限温度时温度敏感突变株与野生型病毒相比其活性降低约 100%、约 90%、约 80%、约 70%、约 60%、约 50%、约 40%、约 30%、约 20%或约 10%。

稳定敏感突变株可包含任何突变的基因, 该基因的突变可使病毒在一种温度下的活性比另一种温度下的活性降低。可被突变的基因或蛋白包括而限于鸟苷酰基转移酶、RNA 三磷酸酶、ATP 酶、蛋白激酶(如 PK-1)等。下面的文献中描述了一些温度敏感突变株的例子: Jin 等, *Journal of Virology*, (1998), 卷 72, pp. 10011-10019 和 McLachlin 等, *Virology*, (1998), 卷 246, pp.379-391, 本文都已纳入作为参考。

如果病毒经加热处理后足以被灭活则巴氏消毒法是一种简单的灭活方法。在某些实施方式中, 在保证可灭活病毒的情况下加热的持续时间应该尽量短以使对病毒蛋白的损伤降到最低。另外, 可通过使用稳定剂和柠檬酸钠、蔗糖和/或甘氨酸使对病毒的损伤降到最低。

另外, 化学灭活, 如用温和的胃蛋白酶在低 pH 条件下处理或者用去污剂处理, 可用于破坏脂双层, 因此可用于灭活包膜病毒, 其中包括杆状病毒。见美国专利 Nos. 4, 820, 805 和 4, 764, 369。氮丙啶二元乙烯亚胺是一种强力烷化剂, 可通过与核酸而不是蛋白上的亲核基团相互作用而灭活病毒。

在本发明的某些实施方式中, 病毒灭活可通过光化学反应进行。按照这种方法, 将辐射致敏的化合物加到非致病性病毒的脂质悬液中, 然后将混合物在紫外灯下照射或者用离子化射线(γ 射线或 X 射线)照射。

补骨脂素及其衍生物以及具有与补骨脂素类似的线性三环结构的化合物可诱发光敏作用。补骨脂素是一种双功能的光反应分子, 在长波紫外线的照射下可与核酸形成共价键。补骨脂素可嵌入到 DNA 双螺旋内, 然后通过光反应使 DNA 分子的两条链发生交联。见 Hwang 等, (1996) *Biochem Biophys Res Commun* 219: 191-7。交联使 DNA 分子无法复制或转录。商品化的补骨脂素化合物有 8-甲氧补骨脂素(甲氧沙林)和 4, 5', 8 三甲基补骨脂素(trioxalen)。使用补骨脂素进行光化学灭活最有效的波长在 320 nm 到 380 nm 之间, 最大有效波长在 33 nm 到 360 nm 之间。见 Pathak, M (1974), 阳光与人类(*Sunlight and Man*), Pathak, M & Fitzpatrick, T 编, University of Tokyo Press, Tokyo。

其他光致敏试剂包括卤代补骨脂素、异补骨脂内脂、呋喃并色酮和香豆素, 这些化合物都含有一个卤素取代基和一个水溶性基团, 如第四氮离子或磷离子。据信在补骨脂素分子上加入卤原子取代基, 特别是溴原子取代基可以提高致敏剂与 DNA 的

结合常数, 因为溴原子可提供疏水特性。在某些实施方式中, 可以使用溴化光致敏剂, 因为只需要一个光子就可以活化溴化致敏剂, 而非溴化的补骨脂素需要两个光子才能使 DNA 交联。见美国专利 No. 5, 418, 130。

光化学灭活的典型方法见实施例 11 的描述, 该方法联合使用 trioxalen 和长波紫外线照射。见 Weightman & Banks (1999) *J Virol Methods* 81: 179- 82 和 Cotton 等, (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6094-8。

为了保持病毒的抗原性, 用补骨脂素灭活活病毒时应在非氧化的环境下进行。通过去除灭活培养基中的氧和其他氧化物, 由于紫外线照射而引起的抗原降解可得到最大限度的避免。见美国专利 No. 5, 106, 619。同样, 通过使用抗氧化剂/淬灭剂可使短波紫外线照射时产生的自由基和其他活性氧成分降到最少, 从而可以使蛋白的损伤大大减少。见 Marx 等, (1996) *Photochem Photobiol* 63: 541-6。

在本发明的某些实施方式中, 病毒灭活可以通过改造病毒的基因来完成, 从而使病毒受到损伤或无法复制。例如, 对病毒进行基因改造使病毒的必需基因发生一个或多个温度敏感型的突变。在允许温度 (如 25°C) 下用 Sf9 或 Tn5 细胞制备和扩增病毒。当病毒在治疗时被导入到哺乳动物受试者内时, 温度不再是允许温度了, 这样温度敏感基因就很难表达, 或者表达的基因产物没有功能, 因此病毒是残缺的。

可被制备的典型温度敏感突变可在病毒感染所必需的基因上进行。例如, 编码 PKIP 的基因发生温度敏感型的突变, 这个蛋白可与病毒编码的蛋白激酶相互作用, 调节病毒晚期基因的转录。在非允许温度下, 携带这种突变的病毒在感染宿主时是有缺陷的。见 McLachlin 等(1998) *Virology* 246: 379 和 Partington 等, (1990) *Virology* 175: 91。

病毒是否被灭活可通过证明其在天然宿主细胞内的复制能力是否丧失来确定。可利用标准的噬菌斑试验来证明一个样品的感染性。在没有合适的方法来证明某种病毒是否具有感染性时, 就需要通过灭活一个具有相似的生物物理特性和结构特性的模型病毒来证明其是否被灭活。见 Henzler & Kaiser (1998) *Nat Biotechnol* 16: 1077-9。为了使病毒完全灭活, 本发明所用的灭活方法可以包括使病毒与灭活刺激物连续接触。

C. 2. 载体

如本文所描述, 非致病性病毒可以是活病毒、灭活病毒、病毒颗粒、病毒包含体、病毒成分或其混合物。为了促进非致病性病毒向受试者癌细胞内的转移, 可以给予一种能在受试者体内激发抗癌和/或抗感染性疾病反应的组合物, 该组合物包含: (a)

有效量的非致病性病毒；以及(b) 药学上可接受的载体。在适当的条件下可同时使用两个或两个以上的载体。

本文所用的术语“载体”是指可用于将病毒、病毒样颗粒、病毒成分、病毒蛋白转运到细胞的浆膜或穿过细胞的浆膜的化合物或一组化合物。

用于转运非致病性病毒或病毒成分的典型载体包括脂质体、纳米微球(Manome等, 1994; Saltzman 和 Fung, 1997)、氨基葡糖多聚糖(见美国专利 No. 6, 106, 866)、脂肪酸(见美国专利 No. 5, 994, 392)、脂肪乳剂(见美国专利 No. 5, 651, 991)、脂质和脂质衍生物(见美国专利 No. 5, 786, 387)、胶原(见美国专利 No. 5, 922, 356)、多糖及其衍生(见美国专利 No. 5, 688, 931)、纳米悬液(见美国专利 No. 5, 858, 410)、聚合微胶粒或聚合物(见美国专利 Nos. 4, 551, 482、5, 714, 166、5, 510, 103、5, 490, 840 和 5, 855, 900)以及多核糖体(见美国专利 No. 5, 922, 545)。

为了转录病毒成分, 载体还可以用基因治疗载体, 其中包括病毒载体和质粒载体。适于基因表达的病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒(AAVs)、逆转录病毒、假型逆转录病毒、疱疹病毒、痘苗病毒和 Semiliki 森林病毒。载体还可以包含病毒样颗粒、蛋白运送载体, 其中包括 Pro-Ject (Pierce Biotechnology, INC.) 和 Profect (Targeting Systems)以及 Chariot (Active Motif)等。

可以选择载体使非致病性病毒在需要治疗部位达到稳定的生物利用度。术语“稳定的生物利用度”涉及的因素包括而不限于非致病性病毒从载体内的延迟释放、非致病性病毒的代谢稳定性、包含非致病性病毒的组合物的系统转运以及非致病性病毒的有效剂量。

能达到稳定的生物利用度的典型组合物包括而不限于基质聚合物, 其中包括膨胀的可生物降解的基质聚合物(美国专利 Nos. 6, 335, 035; 6, 312, 713; 6, 296, 842; 6, 287, 587; 6, 267, 981; 6, 262, 127 和 6, 221, 958), 聚合物包被的微粒子(美国专利 Nos. 6, 120, 787 和 6, 090, 925), 多元醇:油悬液(美国专利 No. 6, 245, 740), 多孔颗粒(美国专利 No. 6, 238, 705), 乳胶/蜡包被颗粒(美国专利 No. 6, 238, 704), 壳聚糖微胶囊, 以及微球乳剂(美国专利 No. 6, 190, 700)。

C.3. 剂型、剂量和给药途径

本发明组合物的适宜给药剂型包括水性的和非水性的无菌注射液, 其中包含抗氧化剂、缓冲物质、抑菌剂、抗生素和抗真菌药(如 parabens, 氯代丁醇, 酚, 抗坏血酸, 硫柳汞)、将制剂的渗透压调整到与受试者体液一致的溶质(如糖, 盐和多元醇), 悬浮剂和增厚剂。制剂可置于单次剂量的包装内, 也可置于多次剂量的包装内, 如

密封的安瓿和小玻璃瓶，可以储存在冷冻条件下活冻干条件下，在使用前只需加入无菌液体载体就可以注射了。

注射到宿主体内的组合物包括无菌水溶液或分散液以及可制备成无菌注射液或分散液的无菌粉末。可注射的组合物应当是液体的，其流动性应当达到可以很容易地用注射器注射的程度。适宜的溶剂包括水、乙醇、多元醇（如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇）及其混合物。可以使用包被如卵磷脂和/或通过降低颗粒的直径来维持组合物的流动性。

本发明的非致病性病毒可通过瘤内注射、瘤旁注射、系统注射、胃肠外途径（如静脉注射、肌肉注射、动脉内注射和输液）、口服、透真皮注射（局部给药）、鼻内途径（吸入）以及粘膜内注射的方式给药。选择何种给药方式要根据载体的类型、组合物的疗效、需治疗的部位以及患者的状况而定。

本文所用的术语“蛋白运送载体”是指可促使蛋白质转运到细胞膜或跨过细胞膜的物质。

在某些实施方式中，非致病性病毒是被直接注射到肿瘤内或肿瘤旁部位。术语“肿瘤旁部位”是指离肿瘤外缘约 15cm 以内的部位、约 10cm 以内的部位、约 5cm 以内的部位、约 1cm 以内的部位或者约 0.1cm 以内的部位。本发明的非致病性病毒可以注射到一个或多个肿瘤或肿瘤旁部位内。在某些实施方式中，本发明的非致病性病毒可以注射到肿瘤和/或肿瘤周围的多个位点内。

在某些实施方式中，如果癌的生长是非肿瘤性的，那么非致病性病毒可以注射到病变部位或病变周围部位。术语“病变周围部位”是指非肿瘤性增生外缘约 15cm 以内的部位、约 10cm 以内的部位、约 5cm 以内的部位、约 1cm 以内的部位或者约 0.1cm 以内的部位。本发明的非致病性病毒可以注射到一个或多个病变和/或病变旁部位内。在某些实施方式中，本发明的非致病性病毒可以注射到非肿瘤性增生部位和/或非肿瘤性增生部位周围的多个位点内。

在组合物是用于治疗感染性疾病的实施方式中，非致病性病毒可通过系统途径给药。在某些实施方式中，非致病性病毒被局部注射到损伤部位内。

本发明涉及给予患者有效量的非致病性病毒。术语“有效量”用于本文中是指足以激发出抗癌活性，包括抗肿瘤活性和/或抗非肿瘤性增生活性的非致病性病毒的量。如本文所描述，典型的抗癌活性包括而不限于癌细胞的溶解、癌生长的抑制、癌转移的抑制和/或对癌的抵抗力。在某些实施方式中，“有效量”是指体外试验中可有效抑制癌的生长、转移、诱导对癌的抵抗力、诱导细胞溶解、细胞死亡等所需要的

一种药物的量。在某些实施方式中，“有效量”的药物抑制癌的生长、转移、诱导对癌的抵抗力、诱导细胞溶解、细胞死亡至少提高 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2 倍、5 倍、10 倍或 100 倍。

本文中的术语“有效量”是用于描述足以激发抗感染性疾病活性的非致病性病毒的量。在某些实施方式中，与对照相比，“有效量”的非致病性病毒可以使病毒的复制至少被抑制 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2 倍、5 倍、10 倍或 100 倍。

本发明的治疗性组合物中实际包含的活性成分的量可以是不同的，只要该剂量的组合物在特定的患者体内可以达到预期的治疗效果。为了激发出预期的活性，可以选择不同的给药方案。可以进行单次注射，也可以进行多次注射。剂量和给药方案的选择要根据不同的因素来确定，其中包括治疗性组合物的活性、剂型、给药途径、与其他药物或治疗措施的联合、被治疗的疾病类型以及被治疗患者的健康状况及用药史。确定和调整有效给药剂量以及确定何时和如何调整都是医学领域技术人员所熟知的。

可用各种方法来计算非致病性病毒的给药剂量。对非致病性活病毒来说，可用噬菌斑形成单位来计算剂量。对于无活性的非致病性病毒来说，由于不能形成噬菌斑，其剂量用 PFU 的等价量来表示。本文所用的术语“PFU 等价量”是指非致病性病毒的量。PFU 等价量定义为 1 PFU 的病毒被灭活后所得到的病毒的量。

[00155] 另一种确定病毒给药量的方法是基于样品中存在的病毒颗粒数目。可用任何方法对颗粒进行计数，如电镜。也可以通过体外试验所得到的有效量来推算出非致病性病毒，包括灭活病毒的给药量。体外试验可以是本领域技术人员所熟知的测定抗癌活性或抗感染性疾病活性的任何试验，其中包括而不限于测定细胞毒性、细胞死亡、细胞在软琼脂上的生长能力等的试验。在某些实施方式中，剂量是指可使细胞毒活性或细胞死亡比对照组增加至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 99%的量。在某些实施方式中，剂量是指可使细胞在软琼脂上的生长能力比对照组至少降低 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 99%的量。

其他有关剂型、剂量和给药方案的指导原则描述于 Berkow 等, (1997) Merck 医学情报手册(The Merck Manual of Medical Information), Home 编, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, New Jersey; Goodman 等, (1996) Goodman & Gilman 治疗学的药理基础(Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics)第 9 版, McGraw-Hill Health Professions Division, New York; Ebadi (1998) CRC 临床药

理学手册(CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology), CRC Press, Boca Raton, Florida; Katzung (2001) 基础和临床药理学(Basic & Clinical Pharmacology), 第8版, Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York; Remington 等, (1975) Remington 药理学(Remington's Pharmaceutical Sciences), 第15版, Mack Pub. Co., Easton, Pennsylvania; Speight 等, (1997) Avery 药物治疗: 疾病管理中药物特性、选择、治疗用途和经济价值指导手册(Avery's Drug Treatment: A Guide to the Properties, Choice, Therapeutic Use and Economic Value of Drugs in Disease Management), 第4版, Adis International, Auckland/Philadelphia, Pennsylvania.

在某些实施方式中, 通过体外或体内试验来检测组合物以确定其“有效量”。例如, 在本文所描述的诱导细胞死亡的方法中, 适用的试验包括而限于细胞体外存活能力分析试验, 其中包括 TUNEL 分析或其他荧光分析方法如 Cell-Titer Blue (Promega Corp); 监测 DNA 片段化的试验; 以及细胞色素 C 释放试验、软琼脂生长试验、接触抑制试验和及肿瘤在裸鼠体内的生长试验; 给动物注射本发明的组合物后接种肿瘤并监测肿瘤缓解情况的试验和转基因小鼠试验, 其中转基因小鼠被接种了肿瘤并监测其缓解情况; 本文所描述的体内试验; 测定细胞穿过屏障的体外试验如 Matrigel 试验(见 Cancer Res. 2003 Aug 1; 63 (15): 4632-40; Am J Chin Med. 2003; 31 (2): 235-46); Yang 等, (Cancer Res. 61, 5284-5288, July 1, 2001)所描述的体外侵袭性和体内转移性分析试验。

本发明包含非致病性病毒的组合物还可以包含一种或多种用于增强药物组合物疗效的佐剂。这些佐剂包括而限于: (1) 铝盐(明矾), 如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等; (2) 水包油乳剂(其中含有或不含有其他特异性的免疫刺激因子如胞壁酰肽(见下文)或细菌细胞壁成分), 如(a) MF59 (国际公开号 No. WO 90/14837), 其中含有 5% 角鲨烯、0.5% Tween 80 和 0.5% Span 85 (虽然不是必须的, 但是还可以添加不同剂量的 MTP-PE (见下文)), 用微射流匀质仪如 Model 110Y 微射流匀质仪 (Microfluidics, Newton, Mass.) 制备成亚微粒, (b) SAF, 其中含有 10% 角鲨烯、0.4% Tween 80、5% Pluronic 封闭的聚合物 L121 和 thr-MDP (见下文), 或者经过微射流匀质化制备成亚微粒, 或者激烈搅拌成大颗粒乳剂, 以及(c) RibiTM 佐剂系统(RAS),

(Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.), 其中含有 2% 角鲨烯、0.2% Tween 80 和一种或多种选自以下细胞壁成分: monophosphorylipid A(MPL)、双分枝菌酸海藻糖 (TDM) 和细胞壁骨架(CWS), 优选 MPL+CWS (DetoxTM) (在 1999 年 6 月 24 日公开的国际申请 WO 99/30739 中有关于适宜亚微粒水包油乳剂的进一步描述); (3) 皂甙佐

剂, 如 StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, Mass.) 或从它衍生的颗粒如 ISCOMs (免疫刺激复合物); (4) 完全福氏佐剂(CFA)和不完全福氏佐剂(IFA); (5) 细胞因子如白细胞介素(IL-1、IL-2 等)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)等; (6) 细菌 ADP 核糖酰化毒素的脱毒突变株, 如霍乱毒素 (CT)、百日咳毒素(PT)或大肠杆菌的热稳定毒素(LT), 特别是 LT-K63 (其中野生型蛋白上的 63 位氨基酸被赖氨酸替代)、LT-R72 (其中野生型蛋白上的 72 位氨基酸被精氨酸替代)、CT-S109 (其中野生型蛋白上的 109 位氨基酸被丝氨酸替代), CpG 家族分子来源的佐剂, CpG 二核苷酸和包含 CpG 基序的合成寡核苷酸 (见 Krieg 等, *Nature*, 374: 546 (1995)和 Davis 等, *J. Immunol.*, 160: 870-876 (1998)) 以及 PT-K9/G129 (其中野生型蛋白上的第 9 位氨基酸被赖氨酸替代, 129 位氨基酸被甘氨酸替代) (见国际专利申请 Nos. W093/13202 和 W092/19265); 以及(7)可作为免疫刺激因子增强组合物疗效的其他物质。

胞壁酰肽包括但不限于 N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-正胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-甘油-3-hydroxyphosphoryloxy)-乙基酰胺(MTP-PE)等。

国际专利公开号 No. WO 98/50071 描述了病毒样颗粒 (VLPs) 可以作为佐剂用于增强与 VLP 共同注射的抗原的免疫应答。St. Clair 等描述了蛋白结晶在增强体液免疫应答和细胞免疫应答方面的应用(St. Clair, N.等, *Applied Biol. Sci.*, 96: 9469-9474, 1999)。

通过阅读本发明的说明书, 本领域的技术人员可以很容易地理解通过给予非致病性病毒进行治疗的方法可以加以变通以激发出抗癌反应和/或抗感染性疾病反应。

根据长久以来形成的惯例, 术语“一个”、“一种”和“这种”可用于指单数, 也可用于指复数。当本文所用的术语“约”和可测量数值联用时, 如肿瘤周围的距离或病变周围的距离, 是指特定数值上下 20%、10%、5%、1%或 0.1%的变化, 只要这种变化的数值能够实施本发明描述的方法或者说能够实施本发明。在某些实施方式中, “约”是指特定数值上下 10%的变化。

D1. 预测体内的活性

要预测体内的抗肿瘤活性常常是困难而偶然的。本发明提供了预测体内抗肿瘤活性的方法。在某些实施方式中, 该方法包括使化合物与肿瘤细胞和外周血单核细胞接触, 然后测定肿瘤细胞的死亡率。在某些实施方式中, 化合物是非致病性病毒或

非致病性的昆虫特异性病毒。任何方法都可用于测定细胞的死亡率，例如测定细胞凋亡情况、坏死情况、细胞的存活能力等。可用于本发明的肿瘤细胞包括但不限于肺癌细胞（如 A549 细胞、3LL-HM 细胞）、乳腺癌细胞（如 4T1 细胞；MT901 细胞；MAT BIII 细胞）、前列腺癌细胞、结肠癌细胞、皮肤癌细胞（如 B16 黑色素瘤细胞）、胰腺癌细胞、肝癌细胞、脑癌细胞、骨癌细胞（如 MG-63 细胞）、胃癌细胞或食管癌细胞等。

E.1 释放试验

在一种药物上市以前，政府的有关机构，如食品药品监督管理局(FDA)，通常需对这种药物进行严格的质量控制以确保该药物所含有的成分与其被 FDA 或其他政府机构批准的药物所含有的成分一样。这种质量控制通常通过释放试验来完成以确保该药物符合监督者制定的法规。

本发明提供了用于上市的抗癌和抗感染性疾病组合物的制备过程。在某些实施方式中，组合物包含一种或多种非致病性病毒。在某些实施方式中，非致病性病毒是苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒。在某些实施方式中，非致病性病毒包括灭活病毒、病毒颗粒、病毒体、病毒样颗粒、病毒包含体或病毒成分。在某些实施方式中，制备过程包括进行组合物的释放试验以确保组合物的安全性、毒性和有效性符合处方的指导原则。

制备抗癌和抗感染性疾病组合物的过程包括使组合物与第一灭活剂接触以有效地灭活有活性的病毒，使组合物与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合，通过体外试验确定灭活病毒、病毒颗粒、病毒体、病毒样颗粒、病毒包含体或病毒成分是无活性的。在某些实施方式中，每个灭活步骤后都要检测所述病毒、病毒颗粒、病毒体、病毒样颗粒、病毒包含体或病毒成分被灭活的情况。

在某些实施方式中，制备过程还包括对组合物随机取样以分析安全性、有效性或毒性中的一种或多种。在某些实施方式中，随机取得的样品的安全性和/或有效性和/或有效性与第二种抗癌或抗感染性疾病化合物的安全性和/或有效性和/或有效性比较。比较所得到的数据用于上市前药品评价。

在某些实施方式中，通过噬菌斑形成试验来确定病毒、病毒颗粒、病毒体、病毒样颗粒、病毒包含体或病毒成分是否已被灭活。在某些实施方式中，噬菌斑形成试验用的是 Sf 细胞。在某些实施方式中，制备过程还包括对灭活病毒、病毒颗粒、病毒体、病毒样颗粒、病毒包含体或病毒成分进行计数。计数可用本领域技术人员所熟知的任何方法进行。在某些实施方式中，计数用 EM 进行。

下面的实施例用于说明本发明，并不以任何方式构成对本发明的限定。本领域的技术人员应该清楚在本发明的精神和范围内可以对本发明作出修改。

实施例

实施例 1. 重组杆状病毒的制备

将编码人 CCL21 的全长序列(GenBank 登录号 No. NM 002989)克隆到杆状病毒运送载体 pVL1392 (Pharmingen of San Diego, California)内，按照厂商推荐的方法与 BACULOGOLD® WT 基因组 DNA(Pharmingen of San Diego, California)共转染。利用这种方法获得的重组杆状病毒在 Sf9 细胞内通过噬菌斑纯化进行亚克隆以制备几株表达人 CCL21 的分离株。挑选出一个克隆，因为这个克隆与其亲本病毒相比具有异常的表达特征。这个杆状病毒分离株的扩增以较低的感染复数(MOI)进行以制备出高滴度低传代的病毒种用于蛋白的制备。表达 CCL21 的杆状病毒被命名为 BV422。其他重组杆状病毒用同样的方法制备。例如，制备出表达胞内 Raf 蛋白的杆状病毒，命名为 BV762。

用感染复数 (MOI) 为 2-10 的杆状病毒感染无蛋白培养基内的粉纹夜蛾(Tn5)细胞 48 小时以制备蛋白质和出芽的杆状病毒。含有重组 CCL21 的 BV422 培养上清通过离心收获，过滤澄清后通过色谱柱进行纯化。

实施例 2. 肺癌动物模型内的肿瘤生长抑制

9-11 周龄的 C57BL/6 小鼠在接种肿瘤细胞前最少要适应环境 7 天。在小鼠右腹部皮下接种 2×10^5 处于传代早期 (<10 代) 的 3LL-HM 肿瘤细胞。每周测量两次肿瘤的大小。肿瘤生长到 $50-100\text{mm}^3$ (一般在接种后 7 天可以达到这个体积)，将小鼠随机分组。给荷瘤小鼠的肿瘤内注射杆状病毒表达的 CCL21。调整给药剂量和给药方案以达到最大的肿瘤抑制效应。一旦有任何一组的肿瘤体积达到 3000mm^3 (对照组小鼠一般在接种后 33-35 天可达到这个体积)就将小鼠处死。

如图 1 所示，瘤内注射杆状病毒表达的 CCL21 可导致 3LL 肿瘤生长的延迟。优化 CCL21 的剂量以达到完全抑制肿瘤生长的效果。以相对高的剂量注射 2 次或 3 次的给药方案与以相对低的剂量注射 6 次的给药方案所达到的效果一致。单次注射也可以观察到某种程度的肿瘤抑制。

实施例 3. 乳腺癌模型内的肿瘤生长抑制

9-11 周龄的 Balb/c 小鼠在接种肿瘤细胞前最少要适应环境 7 天。在小鼠右腹部皮下接种 2×10^5 处于传代早期 (<10 代) 的 4T1 细胞。每周测量两次肿瘤的大小。肿瘤生长到 $50-100\text{mm}^3$ (一般在接种后 7 天可以达到这个体积), 将小鼠随机分组。给荷瘤小鼠的肿瘤内注射杆状病毒。调整给药剂量以确定最佳有效剂量。一旦有任何一组的肿瘤体积达到 3000mm^3 (对照组小鼠一般在接种后 33-35 天可达到这个体积) 就将小鼠处死。如图 2 所示, 瘤内注射 CCL21 可导致 4T1 肿瘤生长的延迟。

实施例 4. 黑色素瘤模型内的肿瘤生长抑制

鼠黑色素瘤细胞系 B16-BL6 用于在 6-8 周龄的粉红色雌性 BDF-1 小鼠(Charles River Laboratories of Boston, Massachusetts)皮下建立肿瘤模型。为了建立皮肤肿瘤, 在第 0 天将 0.2ml 含 10^6 B16-BL6 细胞的培养基注射到 6-8 周龄的雌性 BDF-1 小鼠背部。在细胞注射之前及之后利用台盼蓝排出试验分析细胞的存活能力。注射之前的死细胞数一般不超过细胞总数的 10%。6 天之后肿瘤的直径一般可达到 $5-10\text{mm}$ 。

杆状病毒表达的 CCL21 按照实施例 1 描述的方法制备。在第 3 天和第 4 天, 于离每个肿瘤约 3mm 的部位皮下注射杆状病毒。每日测量肿瘤的体积, 连续测量 3 周。当肿瘤体积达到 4000mm^3 处死小鼠。

实施例 5. 对再接种肿瘤的抵抗力

按照上述方法制备和用杆状病毒处理荷瘤小鼠。给那些肿瘤完全被抑制的小鼠或在最后一次注射杆状病毒后 2 天将未完全抑制的肿瘤手术切除的小鼠再次接种肿瘤。腹腔注射 $200\mu\text{l}$ 氯胺酮/赛拉嗪混合物 (4:1 的氯胺酮/赛拉嗪, 用磷酸盐缓冲液稀释 10 倍) 以麻醉小鼠, 切除肿瘤后用订书钉封闭伤口。切除肿瘤后 1 到 4 天在原肿瘤部位以外的其他部位皮下注射 2×10^5 4T1 细胞以再次接种肿瘤。每周测量 2 次再次接种的肿瘤体积。将肿瘤生长被完全抑制的小鼠平均分成两组。一组在原肿瘤的对侧腹部皮下注射 1×10^5 细胞再次接种同种肿瘤, 另一组在小鼠的左腹部皮下接种 1×10^5 不同种的肿瘤细胞 (B16F10)。监测再接种部位肿瘤的生长状况。用杆状病毒处理小鼠可诱导小鼠对再次接种的 3LL-HM 肿瘤细胞产生抵抗力, 但是却不能诱导小鼠对不同种的肿瘤细胞产生抵抗力。

实施例 6. 抑制肿瘤的转移

[00185] 按照实施例 3 所描述的方法制备荷瘤小鼠并用杆状病毒处理。当对照组

的小鼠由于肺转移而出现病危信号时处死小鼠。常规的观察指标包括呼吸困难、毛发油腻及体重下降。取小鼠的肺并保存在 Buoin 溶液中。观察是否发生了肺转移。图 3 显示杆状病毒表达的 CCL21 可显著抑制肿瘤的转移。

实施例 7. 杆状病毒的抗肿瘤活性

如实施例 2-3 和 5-6 所描述, 杆状病毒表达的 hCCL21 的抗肿瘤活性主要是由于杆状病毒而不是 CCL21。如图 6 所示, 经过滤的杆状病毒表达的 CCL21 制备物不足以影响 3LL 肿瘤模型的缓解。经过过滤以后所有样品中 CCL21 的浓度没有发生变化。有些但不是所有杆状病毒表达的 CCL21 制备物同样是无效的。

与体内试验所观察到的疗效出现变化相反, 所有的 CCL21 制备物在体外都可以有效诱导淋巴细胞的趋化作用。见表 1 和图 7。这些结果说明杆状病毒表达的 CCL21 内的高分子杂蛋白对于达到较高的抗肿瘤活性是必需的, 但不是 CCL21 在体外诱导趋化作用所必需的。

表 1. 重组 CCL21 制备物的活性

CCL21 来源物种	外源蛋白表达宿主	Lot#	体外趋化活性	体内抗肿瘤活性
小鼠	杆状病毒	MBAY1	+	+
小鼠	杆状病毒	MBMC1	+	+
小鼠	杆状病毒	MBDS1	+	-
小鼠	杆状病毒	MBDS2	+	+
人	杆状病毒	HBDS1	+	-
人	杆状病毒	HBMC1	+	-
人	杆状病毒	HBDS2	+	+
人	杆状病毒	HBDS3	+	+
人	杆状病毒	HBPG1	+	+
人	杆状病毒	HBDS4	+	+
小鼠	大肠杆菌	PeProTech	+	-
人	大肠杆菌	HEDS1	+	-
人	大肠杆菌	HEDS4	+	-
人	大肠杆菌	HEPG3	+	-
人	大肠杆菌	PeProTech ¹	+	-
人	中国仓鼠卵巢(CHO)细胞	HCDS1	+	-
人	酵母	HYPG4	+	-

¹ 可从 PreproTech EC Ltd. of Rocky Hill, New Jersey 购买

如实施例 1 所描述，杆状病毒是杆状病毒表达的 CCL21 制备物中的污染物。以能特异性识别杆状病毒 gp64 蛋白的抗体为探针利用蛋白印迹分析杆状病毒表达的 CCL21。如图 8 所示，可以在杆状病毒表达的 CCL21 制备物中检测到 gp64。另外，具有抗肿瘤活性的杆状病毒表达的 CCL21 批次含有的活病毒滴度相对较高，而无活性的批次含有的活病毒滴度相对较低（表 2）。

表 2. 病毒滴度与杆状病毒表达的 CCL21 制备物的抗肿瘤活性相关

批次	浓度 (mg/ml)	PFU/ml	给药方案 (μ g/剂)	PFU/剂	转移的总 PFU	活性
HBDS4(过滤的)	0.5	<20	25	<1	<6	—
HBDS4 ¹	0.5	<30	25	<1.5	<9	—
HBDS4 ²	0	600	25	30	180	—
HBMC1	0.5	1.0×10^4	100	5.0×10^2	3.0×10^3	—
HBDS1	1.8	1.0×10^6	25	1.4×10^4	8.3×10^4	+/-
HEPG3+bv ³	0.5	1.3×10^6	25	6.5×10^4	3.9×10^4	+
HBDS4	0.8	5.0×10^5	25	1.6×10^4	9.00×10^4	+
HBPG1	1.8	2.7×10^7	25	3.8×10^5	2.00×10^6	+

¹ 小组分；² 大组分；³bv，杆状病毒

图 9 显示在不存在 CCL21 的情况下，将与 CCL21 制备物中污染的病毒滴度相同的纯化活杆状病毒注射到肿瘤内所达到的肿瘤抑制效果与污染杆状病毒的 CCL21 一样。

实施例 8. 杆状病毒诱导的体外细胞毒活性

按照实施例 1 所描述的方法制备杆状病毒。以未感染的 Sf9 细胞作为对照。离心以后收集上清和细胞团。样品用培养基按 1:11 稀释到初始病毒滴度 5×10^6 PFU/ml，分析其细胞毒活性。

人肺上皮细胞 A549 接种到 96 孔组织培养板中，设 3 复孔，与系列稀释的杆状病毒感染或未感染的 Sf9 细胞及其上清共孵育。24 小时去掉培养基，细胞用新鲜培养基洗涤。24 到 48 小时后通过结晶紫染色分析细胞的存活能力，用分光镜定量。

如图 10A 所示，细胞团所诱导的细胞毒反应比上清更强。未感染细胞的上清没有

细胞毒活性。图 10B 显示杆状病毒表达上清用 0.2 μ m 的滤膜过滤后（去掉内含的杆状病毒）其细胞毒活性显著降低，与体内活性的丧失相似。本文所描述的体外细胞毒试验可用于预测体内抗癌活性。参见图 13。

实施例 9. 杆状病毒活化树突细胞的成熟

树突细胞(DC)培养物内添加野生型的杆状病毒可诱导 DC 细胞的成熟，其表现是活化标记分子在细胞表面表达水平的升高。如图 11A 和 11B 所示，杆状病毒可活化鼠骨髓衍生的 DC 和人单核细胞来源的 DC。

按照标准的方法制备骨髓衍生的鼠 DC。简言之，从 6-8 周龄的雌性 Balb/c 或 C57BI/6(Charles River Laboratories of Holster, California)小鼠体内分离其骨髓，用添加 10%细胞培养级二甲亚砜(DMSO)的热灭活胎牛血清冷冻（-80℃）保存，细胞密度为 2×10^7 细胞/ml。细胞冻存管快速解冻后洗涤去除 DMSO。将细胞接种到 150mm 悬浮培养皿中，培养基用 20ml 添加 200U/ml 鼠 GM-CSF(PreproTech of Rocky Hill, New Jersey)的补充 RPMI 培养基(Sigma- ALDRICH of St. Louis, Missouri)。在培养的第 3 天，再次添加鼠 GM-CSF，在第 5 天，离心去掉一半培养基，用含 GM-CSF 的新鲜培养基替换。用移液管小心吸取收获 BMDC。

在第 6 天时加入杆状病毒和其他对照试剂。细胞继续孵育 18 小时，然后分析细胞和上清液。通过 FACS 分析 BMDC 表面的分子标记，通过测定第 6 天加入刺激因子前标记未成熟 DC 的标记物来确定其成熟情况，其中包括 CD11c、CD11b、H-2Kd、I-Ad (表达低)、CD80 (表达低)和 CD86 (表达低)。细胞与各种刺激因子共孵育过夜后洗涤细胞，用抗 CD11c 抗体和抗 CD86 抗体或抗 I-A 抗体双染，然后用流式细胞仪分析。采用门技术圈出 CD11c 阳性的活细胞群。刺激表达为平均荧光强度 (MFI) 除以只用 GM-CSF 处理的染色细胞的 MFI。图 11A 显示用杆状病毒刺激后 DC 活化标记分子 CD86 和 MHC II 的表达显著升高(用抗 I-A 抗体检测)。经杆状病毒刺激后 CD80 和 CD40 的表达同样升高。

人源 DC 来源于外周血单核细胞，是用抗 CD-14 抗体包被的磁珠(Miltenyi Biotec of Auburn, California)从健康志愿者外周血棕黄层中纯化出来的。用含白细胞介素 4 和 GM-CSF (1000U/ml, 购自 PreproTech of Rocky Hill, New Jersey) 的培养基培养 3-4 天后收获未成熟的 DC。通过 FACS(Pharmingen of San Diego, California)分析发现，培养物中超过 90%的细胞都是 CD1a 阳性的。用门技术(gating)圈出 CD11a 阳性的活细胞通过 FACS 分析 DC 表面的活化标记分子。图 11B 显示杆状病毒可诱导 CD86

和 HLA-DR++表达水平升高。

实施例 10. 杆状病毒在体内活化 CTL

用杆状病毒和可溶性蛋白抗原 (HIV p24)免疫小鼠可诱导出很强的抗原特异性 CTL 反应。第三次免疫后 2 周取免疫小鼠的脾。将所取的脾混合, 这样每个样品中有 5 个脾。免疫小鼠的脾细胞在 24 孔板中培养, 每孔 5×10^6 个细胞。将这些细胞中的 1×10^6 细胞用下列物质致敏: (1)合成的 p7g 肽, 这是一种 H-2Kd 限制性 CTL 表位, 相当于 HIV-1SF2p24gag 的 199-208 位氨基酸; 以及(2) pGagb 肽, 这是一种 H-2Db 限制性 CTL 表位, 相当于 HIV-1SF2p55gag 的 390-398 位氨基酸。肽的浓度为 $10 \mu\text{M}$, 37°C 处理 1 小时。然后洗涤脾细胞, 与剩余的 4×10^6 未处理的细胞共培养。脾细胞用 2ml 脾细胞培养基培养, 培养基中含有: 添加 100 mM L-谷氨酰胺(Gibco of Grand Island, New York)的 RPMI 1640 (Sigma- Aldrich of St. Louis, Missouri)和 α -Mem (最低要求标准培养基 α , 添加 L-谷氨酰胺、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)(1:1)、10% 热灭活胎牛血清(Hyclone of Logan, Utah)(在 56°C 水浴中孵育 30 分钟灭活)、100 U/ml 青霉素、 $10 \mu\text{g/ml}$ 链霉素、10 ml/L 100mM 丙酮酸钠和 $50 \mu\text{M}$ 2-巯基乙醇。另外, 在细胞开始培养前以 5% 大鼠 T-Stim IL2 (大鼠 T-Stim: Collaborative Biomedical Products of Bedford, Massachusetts)作为 IL2 源添加到培养基中。

经过 6-7 天的刺激, 收集脾细胞作为效应细胞进行铬释放试验。约 1×10^6 SV/Balb 或 MC57 靶细胞用 200 μl 含 $50 \mu\text{Ci}$ ^{51}Cr 的培养基培养, 加入 $1 \mu\text{M}$ 校正肽 p7g 孵育 60 分钟后洗涤, 以细胞-靶位不配对的肽作为阴性对照。效应细胞以不同的效应细胞: 靶细胞比例与 5×10^3 靶细胞在 200 μl 培养基中共培养 4 小时, 培养板用的是 96 孔圆底或 V 形底组织培养板。两个复孔的每分钟计数平均值用于计算特异性释放百分率。图 12 显示杆状病毒可诱导细胞毒 T 细胞反应。

实施例 11. 光化学方法灭活杆状病毒

2 升粉纹夜蛾(Tn)细胞悬浮培养物感染杆状病毒。在 28°C 孵育 3 天后收获被感染的细胞, 800 $\times$ g 离心 10 分钟使上清液澄清。收获的培养基中的杆状病毒滴度用草地夜蛾 (Tn) 细胞通过噬菌斑形成试验来确定, 如 King & Possee (1992), 杆状病毒表达系统: 实验室手册(The Baculovirus Expression System:A Laboratory Manual), Chapman & Hall, London 所描述。

用二甲亚砜(DMSO)制备 0.2mg/ml 的 trioxalen 储存液。感染细胞悬液中加入约

5-10 μ g/ml 的 trioxalen, 温和震荡使其分散到细胞悬液内。然后将细胞悬液倒入一个无缝的不锈钢托盘(如约 1cm 深)内, 将托盘置于旋转平台上。将一个长波紫外灯(365 nm, 6W)直接放到托盘上空, 离液面 1cm。紫外照射进行约 15 分钟或足以灭活病毒的时间。

为了评价病毒灭活情况, 用昆虫细胞测定 trioxalen/UV 灭活样品的滴度。例如, 从细胞悬液中取样, 系列稀释后感染 Sf9 细胞。接种后约 16 小时换液以使 DMSO 诱导的细胞毒性降到最低。接种后 7 天在显微镜下观察细胞以评价细胞的病理状况, 如果是阴性的, 将细胞再传代 2 次以进一步确定病毒的灭活情况。还可以检测培养物以评价细胞的细胞毒性。

实施例 12. 预测体内抗肿瘤效应的体外试验

用细胞毒性试验和体内鼠肿瘤模型分析各批次的 CCL21, 下文描述了两种试验的方法。细胞毒活性系数在下文也有描述。通过测定体内试验结束时的肿瘤大小来确定哪个批次是有活性的, 哪个批次是无活性的。

诱导 PBMC 细胞毒活性的试验

[00210] 诱导 PBMC 细胞毒活性的试验分析的是某种活化物质所诱导的细胞毒(或细胞抑制)反应, 如细胞因子(IL-2 或 β -IFN)或抗粘附靶细胞系(A549 或 MG-63 细胞)的杆状病毒(BV), 所用的是效应细胞(PBMC)和靶细胞的共培养技术。孵育以后, 通过 Alamar blue 染色定量检测靶细胞的存活能力。试验用的材料包括:

生长培养基(GM): (含 Earle 盐的 Eagle's MEM, 2.2 g/L 碳酸氢钠, 胎牛血清(FBS), L-谷氨酰胺, 青霉素和链霉素):

MEM.....	500 ml
FBS.....	50 ml
L-谷氨酰胺(200mM).....	5 ml
青霉素(10, 000 U/ml)/链霉素(10, 000 μ g /ml)/mix.....	5 ml

生长/分析培养基(GAM): (RPMI 1640 w/o pH 指示剂, 胎牛血清(FBS), L-谷氨酰胺):

RPMI 1640.....	500 ml
FBS.....	50 ml

L-谷氨酰胺(200 mM)..... 5 ml

PBMC 制备培养基: (RPMI 1640 w/o pH 指示剂, 0.5% BSA 成分 V):

RPMI 1640..... 500 ml

BSA (7.5% BSA 溶液)..... 37 ml

STV 溶液: (盐水 A, 胰蛋白, 依地酸(Na_4EDTA)):

NaCl..... 8.00 g

KCl..... 0.40 g

D-葡萄糖 1.00 g

NaHCO_3 0.58 g

胰蛋白 1:250..... 0.50 g

Na_4EDTA 0.20 g

0.5%酚红..... 0.9 ml

玻璃蒸馏水..... 添加到总体积为 1.0 L

磷酸缓冲盐水: (PBS, 无钙无镁)

KCl..... 0.2 g

NaCl..... 8.0 g

KH_2PO_4 0.2 g

Na_2HPO_4 1.14 g

玻璃蒸馏水..... 添加到总体积为 1.0 L

Alamar Blue 染色培养基: 添加 Alamar blue (Biosource International) 的 RPMI 1640。

A549 细胞

A549 人肺癌细胞得自美国典型培养物收集中心, 处于第 76 代(ATCC CCL 185)。扩增细胞, 然后将低传代的细胞冷冻保存。A549 细胞的主种子用液氮冷冻保存。

A549 工作培养物

A549 细胞以粘连单层生长, 传代时必须用胰酶消化。倒掉 T-175 培养瓶中的培养基, 细胞单层用 10-15ml PBS 洗涤两次, 然后每瓶中加入 3-5ml STV, 孵育 3-4 分

钟直到细胞开始脱离，温和吹打脱离的细胞。每瓶中加入 5ml 生长培养基，用移液管轻轻吹打细胞制备单细胞悬液，然后将细胞转移到含新鲜生长培养基的 50ml 离心管内轻轻混合。将不同比例的细胞混合物(1:5、1: 10 或 1:20 的分别培养 2、3 和 4 天的细胞)加入到含 $40 \pm 5\text{ml}$ 、 37°C 预热的新鲜生长培养基的 T175 培养瓶内。

MG-63 细胞

人骨肉瘤细胞系 MG-63 得自美国典型培养物收集中心(ATCC CRL 1427)。MG-63 细胞的主种子用液氮冷冻保存。

MG-63 工作培养物

工作培养物每 3 天或 4 天分裂一次。细胞生长到融合的单细胞层后每 3 天按 1:6 的比例传代或者每 4 天按 1:8 的比例传代。

传代过程：

MG-63 以粘连单层生长，传代时必须用胰酶消化。吸去 T-175 培养瓶中的培养基，细胞单层用 10-15ml PBS 洗涤两次，每瓶中加入 $4 \pm 0.1\text{ml}$ STV，然后在 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $5 \pm 1\%$ CO_2 中孵育 3-5 分钟直到细胞开始脱离，温和吹打使细胞脱离培养瓶壁。

用移液管上下吹打 STV 内的细胞制备均匀的细胞悬液，然后将细胞转移到含新鲜生长培养基的 50ml 离心管内轻轻混合。将不同比例的细胞混合物(1:6 或 1:8)加入到含 $40 \pm 5\text{ml}$ 、 37°C 预热的新鲜生长培养基的培养瓶内。

PBMC 细胞

PBMC 采自志愿者。

制备 A549 或 MG-63 细胞用于 PBMC 诱导的细胞毒试验

去掉 T-175 培养瓶内 A549 或 MG-63 工作培养物的培养基。细胞单层用 10-15ml PBS 洗涤两次，然后每瓶中加入 3-5ml STV，孵育 5 分钟或者直到细胞开始脱离，温和吹打使细胞脱离培养瓶壁。每瓶中加入 5ml 生长培养基，用移液管轻轻吹打细胞制备单细胞悬液，然后将细胞转移到 50ml 圆锥形试管内，再加入 25ml 生长培养基，反转试管以混合细胞，得到细胞浓缩物。测定细胞浓缩物中细胞的密度。简言之，将细胞悬液按 1:3 稀释，然后用 Z1 型 Coulter 计数器计数。计数 A549 细胞时把计数器的阈值设定为 8 微米，计数 MG-63 细胞时计数器的阈值也设定为 8 微米。

用生长分析培养基将 A549 细胞浓缩到 50,000 细胞/ml，将 MG-63 细胞浓缩到 65,000 细胞/ml。所需要的总细胞数等于所需要的培养基总体积乘以接种密度。所需要的细胞浓缩物的体积(C)等于所需要的细胞总数除以浓缩物的密度。所需要添加的生长/分析培养基的体积(GAM)等于所需要的培养基的体积减去细胞浓缩物的体

积。用于 PBMC 诱导的细胞毒试验的靶细胞接种密度由(C)和(GAM)决定。

在一次性 Erlenmeyer 培养瓶或组织培养玻璃器皿中制备细胞悬液。在 15 分钟内将细胞加到分析板中。每孔内加入 100 μ l 细胞悬液(每孔 5000 个 A549 细胞或者 6500 个 MG-63 细胞)。分析板加盖后在湿润的 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、5 $\pm$ 0.5% CO₂ 孵育箱中孵育 18 到 24 小时。

在转移板内进行初始样品制备和系列稀释

初筛试验

为了提高检测到 PBMC 细胞毒活性诱导因子的几率, 先制备相对较高浓度的样品。在随后的试验中根据样品的活性逐渐降低样品的浓度。

低浓度的 CCL21 样品:

用 PBS (无钙无镁) 将低蛋白浓度的 CCL21 样品 (3000 μ g/ml 以下) 稀释到 400 到 600 μ g/ml 之间。加入 FBS 和 L-谷氨酰胺使样品中 FBS 的浓度达到 10%, L-谷氨酰胺的浓度达到 1%。将 240 μ l 的样品加到 96 孔板的第一孔中。用含 10% FBS 和 1% L-谷氨酰胺的 PBS 在 96 孔转移板内倍比稀释样品。

准备使用高浓度进行试验的样品(蛋白、活性、细胞或病毒)按照低浓度蛋白样品的试验方法进行制备, 或者直接加入生长/分析培养基进行制备。将 240 μ l 的样品加到 96 孔板的第一孔中。用生长分析培养基在 96 孔转移板内倍比稀释样品。

杆状病毒样品:

BV 样品用生长/分析培养基(GAM)稀释到 1: 2 到 1: 10, 按照上述方法用 GAM 进行系列稀释。

β -IFN 或 IL-2:

小玻璃瓶内的 β -IFN 或 IL-2 样品用适当的稀释剂(注射用盐水或注射用水)从新配制。0.25 mg/ml 从新配制的 β -IFN 等于 13.9 μ M, 1.1 mg/ml 从新配制的 IL-2 等于 64.7 μ M。用生长分析培养基 (GAM) 进一步稀释 200, 000 IU/ml 的细胞因子制备成工作液。批号为 IFN-01-001 的 β -IFN 按 1:35.75 的比例用 GAM 稀释, 批号为 MLAPM006 的 IL-2 按 1: 91.75 的比例用 GAM 稀释。然后用 GAM 稀释到试验所需的浓度。IL-2 的试验浓度为 2000IU/ml, β -IFN 的试验浓度为 2000 IU/ml。

高浓度的 CCL21 样品:

上述 3 mg/ml 的 CCL21 样品用 GAM 稀释到 200 到 600 μ g/ml 的试验浓度。

将稀释的样品转移到靶细胞(分析)板上:

将稀释板内的样品转移到分析(细胞)板内。样品的最终浓度为原稀释板浓度的

1/2。用具有板到板转移程序的移液器进行样品的转移。在制备 PBMC 的同时孵育分析板。

用于测定试验样品对靶细胞的直接细胞毒性的毒性对照板：

取两个一样的转移板（稀释板），将培养基加到 2 个细胞板内。第一个板内加入 50 μ l PBMC 制备物用于诱导的细胞毒性试验，第二个板内加入 50 μ l PBMC 制备培养基用于测定被测样品的直接细胞毒活性。

从人外周血中分离外周血单核细胞（PBMC）

制备 1:10 稀释的漂白溶液（3 升）。所有接触血的试管和移液管都要漂白过夜。将烧杯干燥并将所有物品弃于收集生物危害品的容器。在处理血液前将 50ml 试管的盖子去掉（防止血液污染盖子）。将血液加入到 250ml 可降解的聚合羧酸盐培养瓶内，用等量的 HBSS 稀释。在加入血液前 30 分钟将约 17ml ficoll-plaque 溶液加到 50ml 聚苯乙烯试管内。血液会在 ficoll-plaque 溶液之上分层，并且不会破坏 ficoll 层。每 3ml ficoll-plaque 加入 4ml 血液/HBSS（即每个 50ml 试管内加入 17ml ficoll 和 23 ml 血液/HBSS）。

在室温下 1800rpm（400 $\times$ g）离心试管 30 分钟（Sorval GLC-2B 离心机）。用 25ml 的血清学移液管尽可能多地吸取顶层的液体，留约 5ml 的体积在第二层顶部。用 5ml 血清学移液管去掉第一层的剩余部分。然后用 5ml 的无菌血清学移液管收集含 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的第二层，转移到另一个 50ml 试管内。收集物用 3 倍体积的不含添加物的 RPMI 稀释，所得到的溶液 900rpm（100 $\times$ g）离心 15-20 分钟（第一次洗涤）。用血清学移液管将上清去掉，细胞用 40ml RPMI 重悬，900rpm 重复离心一次（第二次洗涤）。用血清学移液管将上清去掉，细胞用 40ml PBMC 制备培养基（含 0.5% BSA 的 RPMI）重悬。准确记录重悬细胞的总体积。用 Coulter 计数器对细胞进行计数以确定细胞的浓度--用 PBMC 制备培养基按 1:5 的比例稀释浓缩的细胞用于计数）。

确定达到合适细胞浓度所需要的重悬体积。细胞毒性试验所需要的细胞浓度为 2×10^6 细胞/ml，冷冻 PBMC 理想的细胞密度为 10×10^6 细胞/ml。最终的重悬体积等于细胞浓度乘以总体积再除以最终所需的细胞浓度（2 或 10×10^6 细胞/ml）。

剩余的重悬细胞 900rpm 再次离心（第三次洗涤）。去掉上清液，将细胞重新悬浮到终体积。用 Coulter 计数器确定细胞的浓度（用 PBMC 制备培养基按 1:10 的比例稀释浓缩的细胞用于计数）。

试验用的 PBMC 制备物

细胞重悬到 PBMC 制备培养基内直接用于分析试验。将细胞用 PBMC 制备培养基按 1:2 的比例稀释使细胞终浓度达到 1×10^6 细胞/ml。将细胞加到分析板中与 50 μ l/孔的靶细胞混合 (50000PBMC/孔)。用多道移液器添加 PBMC。分析板置于 37℃、5%CO₂ 中孵育 3 到 4 天。

用于冻存的 PBMC 制备物

将细胞重悬到含 10% DMSO 的 FBS (热灭活的) 中, 以 10×10^6 细胞/ml 的浓度冻存。细胞分装到 2ml 的无菌冻存管中, 加入异丙醇后冷冻到 -70℃ 冰箱的冻存盒内。用 Coulter 计数器确定最终的细胞浓度。

解冻冻存的 PBMC 用于试验

在 37℃ 水浴中快速融化 PBMC 冻存管。细胞用 13ml RPMI 1640 重悬, 装入圆锥形离心管后 900 rpm (100 $\times$ g) 离心 15-20 分钟。用血清学移液管去掉上清, 细胞重悬到 13ml PBMC 制备培养基中 (含 0.5% BSA 的 RPMI)。用 Coulter 计数器计数以确定细胞的浓度 (用 PBMC 制备培养基按 1:5 的比例稀释浓缩的细胞用于计数)。

确定达到合适细胞浓度所需要的重悬体积。细胞毒性试验所需要的细胞浓度为 2×10^6 细胞/ml, 冷冻 PBMC 理想的细胞密度为 10×10^6 细胞/ml。最终的重悬体积等于细胞浓度乘以总体积再除以最终所需的细胞浓度 (2 或 10×10^6 细胞/ml)。剩余的重悬细胞 900rpm 再次离心。去掉上清液, 将细胞重新悬浮到终体积。

用 Coulter 计数器确定细胞的浓度 (用 PBMC 制备培养基按 1:10 的比例稀释浓缩的细胞用于计数)。将细胞用生长分析培养基按 1:2 的比例进一步稀释使细胞终浓度达到 1×10^6 细胞/ml。将细胞加到分析板中与 50 μ l/孔的靶细胞混合 (50000 PBMC/孔)。用多道移液器添加 PBMC。分析板置于 37℃、5%CO₂ 中孵育 3 到 4 天。

用 Alamar Blue 染色分析板

孵育 3 到 4 天后, 从分析板上吸去培养基。每孔加入 100 μ l Alamar Blue 染色液 (含 10% Alamar Blue、0.5% BSA 的 RPMI), 分析板再孵育 2 到 3 小时。用分光光度计 (测定 570nm-630nm 处的吸光度) 或荧光光度计 (测定 530nm 处的激发光和 590nm 处的发射光)。

检测活性

检测活性定义为参照孔的反应除以 PBMC 样品孔的反应。在大多数情况下, 参照孔是无 PBMC 的样品对照孔, 其中所含的样品浓度与 PBMC 样品孔一样, 通常用最大的样品浓度 (系列稀释中的第一孔)。在某些情况下, 如果样品量不足以设无 PBMC 的对照板, 则参照孔用含或不含 PBMC 的 PBS/生长培养基。

如果有足够量的样品来设置无 PBMC 的对照板,则活性设定为直接的细胞毒反应/诱导的细胞毒反应。如图 14 所示,体外的试验结果与体内的试验结果一致。

实施例 13. 抗-gp64 单克隆抗体阻断杆状病毒的肿瘤细胞杀伤效应

杆状病毒起始材料(CΔ3)用抗-gp64 抗体处理。简言之, 1-500 μ g 纯化的抗-gp64 鼠单克隆抗体(克隆 1.3A, 由 Dr. DONALD Jarvis, U. of WY 提供) 或 Ig 对照抗体与不同感染复数的重组杆状病毒在一定的体积内混合。在室温下于暗处使抗体与病毒结合约 15 小时, 在进行噬菌斑形成试验或细胞毒试验前将样品冷藏 1-2 天。按照上面所描述的方法用细胞毒试验检测样品。见图 15。

实施例 14. 灭活杆状病毒在体外诱导 PBMC 介导的肿瘤细胞杀伤作用

杆状病毒起始材料(CΔ3)通过 trioxalen 和紫外线处理加以灭活。杆状病毒通过补骨脂素和紫外线照射进行光灭活(Weightman, S. A.和 Banks, M. J. Virol. Met. 81: 179-182 (1999))。将含杆状病毒的昆虫细胞培养培养基(3ml, 约 6E7 pfu) 转移到 6 孔培养板(Costar)内。用二甲亚砜(DMSO)制备 2mg/ml 的 4, 5', 8-三甲基补骨脂素(trioxalen)储存液, 然后加到每个孔内, 终浓度达到 100 μ g/ml。然后在培养板上 1.5cm 处放置一个手提灯(Model UVL- 56, UVP, Upland, CA)用紫外线(365nm)照射培养板 15 分钟。对照样品包括不含补骨脂素的 DMSO 和含补骨脂素但未进行紫外线照射的 DMSO。照射以后将培养基转移到 10 MWCO 透析筒(Slidalizer, Pierce)内, 用磷酸缓冲盐透析。所有样品都用 Sf9 细胞进行噬菌斑形成试验。按照上面所描述的方法检测样品的细胞毒活性, 结果见图 16。

实施例 15. 肿瘤细胞是杆状病毒的主要靶细胞

完整的 A549 靶细胞单层培养物经杆状病毒处理 3 小时后用生长分析培养基洗涤 3 次。同时, 效应细胞(PBMC) 也用杆状病毒处理 3 小时后用生长分析培养基洗涤 3 次。按照如下组合将杆状病毒处理的和未处理的靶细胞与效应细胞混合: 1) 单独的未处理靶细胞; 2) 未处理靶细胞和效应细胞; 3) 杆状病毒处理的靶细胞和未处理的 PBMC; 以及 4) 未处理的靶细胞与杆状病毒处理的 PBMC。

孵育 4 天后按照 SOP 中所描述的方法测定靶细胞的存活能力。利用 Alamar Blue 荧光确定的细胞存活能力, 取每组中 16 个孔平均值(试验在 96 孔板内进行)。结果见图 17。

实施例 16. 利用杆状病毒抑制肺癌动物模型内肿瘤的生长

8-10 周龄的 C57BL/6 小鼠在接种肿瘤细胞前最少要适应环境 7 天。在小鼠右腹部皮下接种 2×10^5 处于传代早期 (<10 代) 的 3LL-HM 肿瘤细胞。每周测量两次肿瘤的大小。肿瘤生长到 $50-100\text{mm}^3$ (一般在接种后 7 天可以达到这个体积) 时, 将小鼠随机分组, 同一天给小鼠的肿瘤内注射第一次杆状病毒。给药方案为每日一次, 连续 6 天。小鼠分为如下 4 组: 1) 白蛋白阴性对照, 单次剂量为 $25\mu\text{g}$ (0.5 mg/ml); 2) 活病毒阳性对照(滴度约为 $1 \times 10^7/\text{ml}$); 3) 活病毒阴性对照(滴度约为 $800/\text{ml}$); 以及 4) 灭活病毒(滴度约为 $800/\text{ml}$)。每周测量两次肿瘤的大小, 连续测定 4 周。当肿瘤体积达到 2500 mm^3 或小鼠出现下列任何一种症状时处死小鼠: 体重下降超过 20%; 肿瘤溃疡面积超过肿瘤表面积的 30% 或者虽然低于 30% 但是肿瘤出现破溃、出血或流脓; 严重的呼吸困难或处于垂死状态。

如图 18 所示, 瘤内注射杆状病毒可导致 3LL 肿瘤生长的延迟。

实施例 17. 利用杆状病毒在体外和体内产生抗感染性因子的保护作用。

活杆状病毒已经表明可诱导鼠细胞系和人细胞系分泌干扰素 (IFN), 并且可在鼠体内诱导抗脑心肌炎病毒感染的保护作用。但是用紫外线将杆状病毒灭活后其感染性和 IFN 诱导活性丧失(Gronowski 等, J Virology, Dec. 1999, p. 9944-9951 卷 73, No. 12)。

为了研究杆状病毒对感染因子的影响, 用水泡性口炎病毒(VSV)在体内和体外感染细胞。如图 19 所示, 用 Sf9 和杆状病毒或 Sf9 和杆状病毒培养上清处理的细胞或培养基可在体外产生最大的抗 VSV 保护效应。如图 19 所示, 灭活的杆状病毒在体内和体外都可以产生抗致病性病毒感染的保护效应。

实施例 18: 旁观者效应

为了确定肿瘤细胞的抑制是否是直接的作用 (即每个细胞必须被非致病性病毒感染), 将感染的肿瘤细胞与未感染的肿瘤细胞按不同比例混合。

A549 或 MG-63 细胞系或 PBMC 与活化剂量的杆状病毒接触 3 到 5 小时, 然后将剩余的或未结合的病毒从应答细胞内洗去。经洗涤的 BV 处理细胞与未处理的应答细胞按不同比例混合。BV 处理的和未处理的 PBMC 混合物加到未处理的 A549 或 MG-63 靶细胞内, 另外, BV 处理的 A549 或 MG-63 细胞混合物加到未处理的 PBMC

内。BV 未处理的细胞和 BV 处理的细胞按照一样的方法处理。

PBMC 在 CO₂ 培养箱内不断振摇使之处于悬浮状态才能被 BV 感染。细胞经离心、倒掉上清、再悬浮（3 次）洗涤后与未处理的 PBMC 混合。BV 处理 A549 和 MG-63 靶细胞的方式有两种，一种是完整单层细胞用 BV 处理，再用新鲜的生长培养基温和洗涤，然后将未处理的靶细胞加到分析板内；另一种方式是如上面所描述的 PBMC 那样在悬浮状态下处理。

如果将杆状病毒从 A549 和 MG-63 靶细胞中洗掉后很久再加入 PBMC，则细胞毒试验中所检测到的细胞毒反应快速消失。对于 A549 细胞来说，去掉杆状病毒后 20 小时细胞毒反应完全消失，对于 MG-63 细胞来说，细胞毒反应基本消失（数据未列出）。

原位洗涤杆状病毒处理的靶细胞单层，然后与未处理的细胞混合，立即加入 PBMC 可对 A549 和 MG-63 细胞产生旁观者效应。

在悬浮状态下用 BV 处理 PBMC 或 A549 细胞再经过离心洗涤（3 个循环的离心、去上清、再悬浮）可有效地消除细胞毒反应。

BV 处理 MG-63 细胞并离心洗涤对 MG-63 靶细胞的细胞毒反应影响较小。

在振摇使之处于悬浮状态下用 BV 处理 PBMC 再经过离心洗涤好像可以非特异性地刺激抗 MG-63 靶细胞的细胞毒反应（在含 0% BV 处理细胞的孔内），但是对 A549 细胞没有这种作用。

如图 20 所示，当总细胞体积是 20% 的感染细胞和 80% 的非感染细胞时，可以观察到最大反应。因此，未感染的细胞可被大家所熟知的旁观者效应杀伤（即靠近靶细胞可促进非靶细胞（未感染细胞）的死亡）。

参考文献

下面所列出的参考文献以及本说明书所引用的所有参考文献都已纳入本文作为参考，其目的在于为本发明所用的方法、技术和/或组合物提供背景资料或者说明这些方法、技术和/或组合物。

Ausubel F 编，(1995)，分子生物学简明手册(Short Protocols in Molecular Biology)，第三版，Wiley，New York

Baggiolini M，Dewald B & Moser B (1997). 人类趋化因子的更新(Human chemokines: an update). Annu Rev Immunol 15: 675-705.

Berkow R, Beers MH & Fletcher AJ (1997) Merck 医学情报手册(The Merck Manual

of Medical Information), Home 编, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, New Jersey

Bodanszky M (1993) 肽合成原理(Principles of Peptide Synthesis), 第二版, Springer-Verlag, Berlin, New York

Boyce FM & Bucher NL (1996). 杆状病毒介导的基因向哺乳动物细胞的转移 (Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells). *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2348-2352.

Bronte V (2001). 用于癌症免疫治疗的遗传疫苗(Genetic vaccination for the active immunotherapy of cancer). *Curr Gene Ther* 1: 53-100.

Carbonell LF, Klowden MJ & Miller LK (1985). 杆状病毒介导的细菌基因在双翅类细胞和哺乳动物细胞中的表达(Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells). *J Virol* 56: 153-160.

Carbonell LF & Miller LK (1987). 杆状病毒与非目标生物的相互作用: 病毒负载受体基因不在两种哺乳动物细胞系中表达(Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines). *Appl Environ Microbiol* 53: 1412-1417.

Cotten M, Wagner E, Zatloukal K, Philips S, Curiel DT & Birnstiel ML (1992). 利用缺陷或化学钝化的腺病毒颗粒的内体破坏活性进行受体介导的小和大(48kb)基因构建物的高效运送(High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene constructs) using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles). *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6094-6098.

Ebadi MS (1998) CRC 临床药理学手册(CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology), CRC Press, Boca Raton, Florida

Fearon DT (1997) 寻找天生免疫性的智慧(Seeking Wisdom in Innate Immunity). *Nature* 388: 323-324.

Fearon DT & Locksley RM (1996) 获得性免疫应答中天生免疫性的有益作用(The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response). *Science* 272: 50-53.

Fehniger TA, Cooper MA & Caligiuri MA (2002). 白介素-2 和白介素-15: 癌症的免疫治疗(Interleukin-2 and Interleukin-15: immunotherapy for cancer). *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 169-183.

Fields B, Knipe D & Howley P (1996). Virology, 卷 1, 第三版, Lippincott-Rave Publishers, Philadelphia, Pennsylvania.

Glover DM & Hames BD (1995) DNA 克隆: 操作方法(DNA Cloning:A Practical Approach), 第二版, IRL Press at Oxford University Press, Oxford/New York

Goodman LS, Gilman A, Hardman JG, Gilman AG & Limbird LE (1996) Goodman & Gilman 治疗学的药理基础(Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics)第 9 版, McGraw-Hill Health Professions Division, New York

Groner A, Granados RR & Burand JP (1984). 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒与两种非许可细胞系的相互作用(Interaction of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus with two nonpermissive cell lines). *Intervirology* 21: 203-209.

Gronowski AM, Hilbert DM, Sheehan KC, Garotta G & Schreiber RD (1999). 杆状病毒在哺乳动物细胞中激发抗病毒作用(Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells). *J Virol* 73: 9944- 9951.

Henzler HJ & Kaiser K (1998). 在生物技术和制药过程中避免病毒污染(Avoiding viral contamination in biotechnological and pharmaceutical processes). *Nat Biotechnol* 16: 1077-1079.

Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schlag P & Strauss M (1995). 通过杆状病毒载体向人类肝细胞有效转移基因(Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors). *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10099-10103.

Homey B, Muller A & ZLOTNIK A (2002). 细胞因子: 癌症的免疫治疗剂(Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer). *Nat Rev Immunol* 2: 175-184.

Hwang GS, Kim JK & Choi BS (1996). 通过 NMR 和松弛基质静化分析与 DNA 双链体交联的补骨脂素的结构(The solution structure of a psoralen cross-linked DNA duplex by NMR and relaxation matrix refinement). *Biochem Biophys Res Commun* 219: 191-197.

Janeway CA, Jr. (1989) 靠近渐进线? 免疫学的发展和革命(Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54: 1-13.

Jung S & Littman DR (1999). 淋巴器官稳定中的细胞因子受体(Chemokine receptors in lymphoid organ homeostasis). *Curr Opin Immunol* 11: 319-325.

Katzung BG (2001) 基础和临床药理学(Basic & Clinical Pharmacology), 第 8 版

Lange Medical Books/ McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York.

King L & Possee R (1992). 杆状病毒表达系统：实验室手册(The Baculovirus Expression System:A Laboratory Manual), Chapman & Hall, London.

Kool M & Vlak JM (1993). 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒基因组的结构和功能组织(The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome). *Arch Virol* 130: 1- 16.

Manome Y, Abe M, Hagen MF, Fine HA & Kufe DW (1994). 调控单纯疱疹病毒胸苷激酶基因表达并使人乳腺癌细胞对更昔洛韦敏感的 DF3 基因的增强子序列(Enhancer sequences of the DF3 gene regulate expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and confer sensitivity of human breast cancer cells to ganciclovir.) *Cancer Res* 54: 5408-5413.

Marx G, Mou X, Freed R, Ben-Hur E, Yang C & Horowitz B (1996). 在 UVC 照射以使病毒失活的过程中用芦丁保护纤维蛋白原(Protecting fibrinogen with rutin during UVC irradiation for viral inactivation). *Photochem Photobiol* 63: 541-546.

Mcintosh AH & Shamy R (1980). 在哺乳动物细胞系中对杆状病毒进行生物研究(Biological studies of a baculovirus in a mammalian cell line). *Intervirology* 13: 331-341.

McLachlin JR, Yang S & Miller LK (1998). 与病毒编码的蛋白质激酶相互作用的蛋白质 PKIP 中有缺陷的杆状病毒突变体(A baculovirus mutant defective in PKIP, a protein which interacts with a virus-encoded protein kinase). *Virology* 246: 379- 391.

Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM & Anichini A (2002). 用肽基疫苗免疫治疗癌症：我们已经取得了什么？我们还将得到什么？(Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going?) *J Natl Cancer Inst* 94: 805-818.

Partington S, Yu H, Lu A & Carstens EB (1990). 分离苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒的温度敏感突变体：许多晚期基因表达缺陷的杆状病毒突变体的表型特征(Isolation of temperature sensitive mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: phenotype characterization of baculovirus mutants defective in very late gene expression). *Virology* 175: 91-102.

Pathak M (1974). 阳光与人类(Sunlight and Man), M Pathak & T Fitzpatrick, eds. University of Tokyo Press, Tokyo.

PCT 国际申请号. WO 00/38706

Pearson MN, Russell RL, Rohrmann GF & Beaudreau GS (1988). 杆状病毒的主要结构蛋白 p39: 免疫细胞化学特征和基因定位(p39, a major Baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location). *Virology* 167: 407-413.

Remington JP, Osol A, Anderson JT, Hoover JE & Skolaut MW (1975) Remington 药理学(Remington's Pharmaceutical Sciences), 第 15 版, Mack Pub. Co. , Easton, Pennsylvania.

Rohrmann GF (1992). 杆状病毒结构蛋白(Baculovirus structural proteins). *J Gen Virol* 73 (Pt 4): 749-761.

Romagnani S (1992) Th1 和 Th2 应答的诱导: “天然”免疫应答的关键作用?(Induction of Th1 and Th2 Responses: A Key Role for the 'Natural'Immune Response?) *Immunol Today* 13: 379-381.

Rueda P, Fominaya J, Langeveld JP, Bruschke C, Vela C & Casal JI (2000). 不同杆状病毒失活过程对猪微小病毒样颗粒完整性和免疫原性的作用(Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles). *Vaccine* 19: 726-734.

Saltzman WM & Fung LK (1997). 用于癌症化疗的聚合植入物(Polymeric implants for cancer chemotherapy). *Adv Drug Deliv Rev* 26: 209-230.

Sambrook 等编, (1989) 分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Schneider CH & Eberle AN (1993) 肽 1992: 第 22 界欧洲多肽论坛论文集(Peptides, 1992:Proceedings of the Twenty-Second European Prptide Symposium), 9 月 13-19 日, 1992, Interlaken, Switzerland. Escom, Leiden

Schreiber RD, Hicks LJ, Celada A, Buchmeier NA & Gray PW (1985). 差异调节噬菌体活性和抗病毒活性的鼠科动物 γ 干扰素的单克隆抗体(Monoclonal antibodies to murine gamma-interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity). *J Immunol* 134: 1609-1618.

Schröder E & Lübke K (1965) 肽(The Peptides). Academic Press, New York.

Silhavy TJ, Berman ML & Enquist LW (1984) 基因融合试验技术(Experiments with Gene Fusions), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Speight TM, Holford NHG & Avery GS (1997) Avery 药物治疗: 疾病管理中药物

特性、选择、治疗用途和经济价值指导手册(Avery's Drug Treatment:A Guide to the Propertie , Choice , Therapeutic Use and Economic Value of Drugs in Disease Management), 第4版, Adis International, Auckland/Philadelphia, Pennsylvania

Summers MD & Smith GE (1978). 杆状病毒的结构和多肽(Baculovirus structural polypeptides). *Virology* 84: 390-402.

Thiem SM & Miller LK (1989). 杆状病毒苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒主要衣壳蛋白基因的鉴定、序列和转录图谱(Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus). *J Virol* 63: 2008-2018.

Tjia ST, zu Altenschildesche GM & Doerfler W (1983). 哺乳动物细胞的大量培养物中不存在苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(ACNPV)的 DNA (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (ACNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells). *Virology* 125: 107-117.

Tweeten K, Bulla L & Consigli R (1980). 衍生自颗粒体病毒核壳的强碱性蛋白质的特性(Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis-virus nucleocapsids). *J Virol* 33: 866-876.

美国专利申请公开号 2002/0015945

美国专利 No. 4, 551, 482

美国专利 No. 4, 764, 369

美国专利 No. 4, 820, 805

美国专利 No. 5, 106, 619

美国专利 No. 5, 405, 770

美国专利 No. 5, 418, 130

美国专利 No. 5, 490, 840

美国专利 No. 5, 510, 103

美国专利 No. 5, 651, 991

美国专利 No. 5, 688, 931

美国专利 No. 5, 714, 166

美国专利 No. 5, 750, 383

美国专利 No. 5, 786, 387

美国专利 No. 5, 855, 900

美国专利 No. 5, 858, 410
美国专利 No. 5, 922, 356
美国专利 No. 5, 922, 545
美国专利 No. 5, 994, 392
美国专利 No. 6, 001, 806
美国专利 No. 6, 090, 925
美国专利 No. 6, 106, 866
美国专利 No. 6, 120, 787
美国专利 No. 6, 190, 700
美国专利 No. 6, 194, 192
美国专利 No. 6, 221, 958
美国专利 No. 6, 238, 704
美国专利 No. 6, 238, 705
美国专利 No. 6, 245, 740
美国专利 No. 6, 248, 514
美国专利 No. 6, 262, 127
美国专利 No. 6, 267, 981
美国专利 No. 6, 287, 587
美国专利 No. 6, 296, 842
美国专利 No. 6, 312, 713
美国专利 No. 6, 335, 035
美国专利 No. 6, 379, 958

Vialard JE & Richardson CD (1993). 位于编码核壳相关磷蛋白的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒多角体蛋白基因下游的含有 1639 个核苷的开放读框(The 1, 629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein). *J Virol* 67: 5859-5866.

Volkman L & Goldsmith P (1983). 与非靶脊椎动物宿主细胞相互作用的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒的体外研究(In vitro survey of *Autographa Californica* nuclear polyhedrosis virus interaction with nontarget vertebrate host cells. *Appl Environ Microbiol*) 45: 1085-1093.

Weightman SA & Banks M (1999). 重组杆状病毒的光化学灭活(Photochemical inactivation of recombinant baculovirus). *J Virol Methods* 81: 179-182.

Wilson ME, Mainprize TH, Friesen PD & Miller LK (1987). 编码富含精氨酸的小多肽的杆状病毒基因的定位、转录和序列(Location, transcription, and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide). *J Virol* 61: 661-666.

应当理解的是本发明的各种详细描述在不脱离本发明的范围的情况下可以做出修改。而且，上述的说明书只是为了说明的目的，并不意味着对权利要求所定义的本发明的限制。

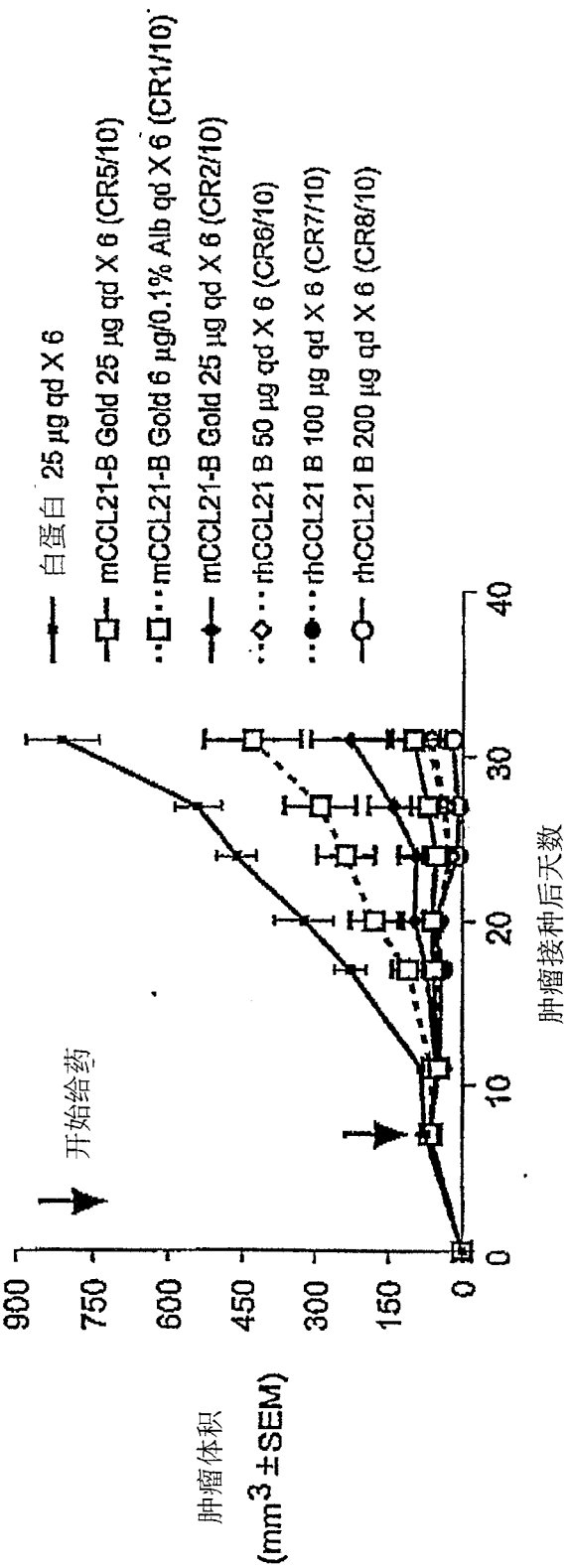


图 1

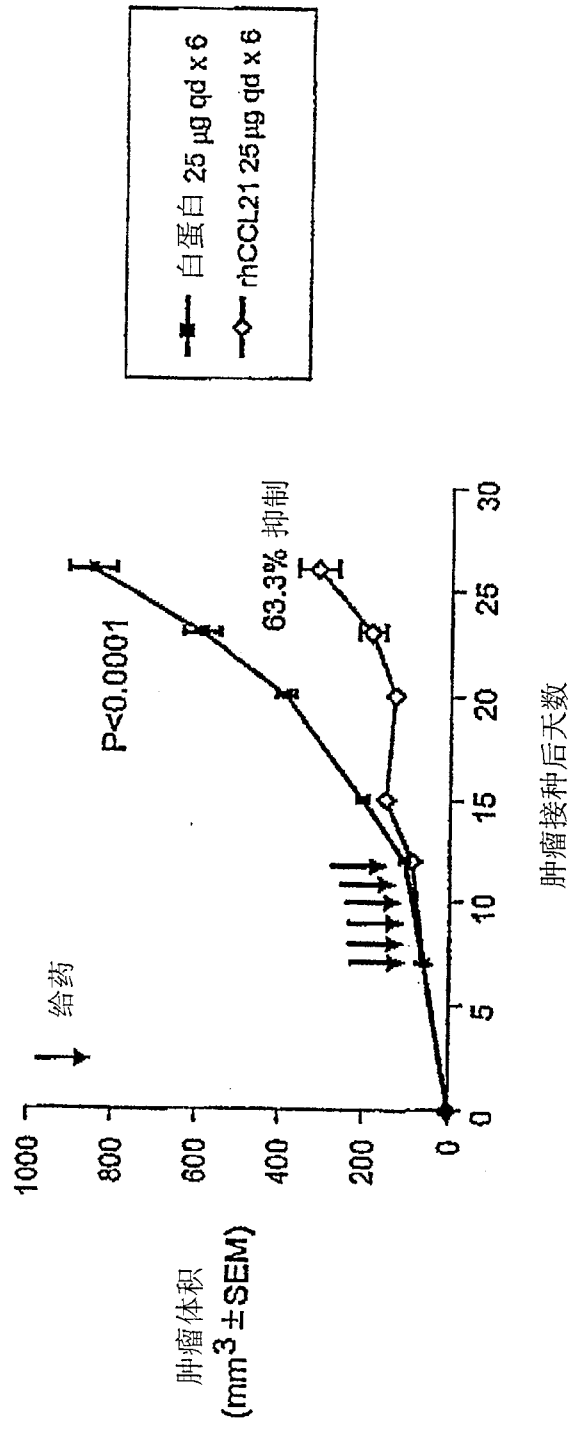


图 2

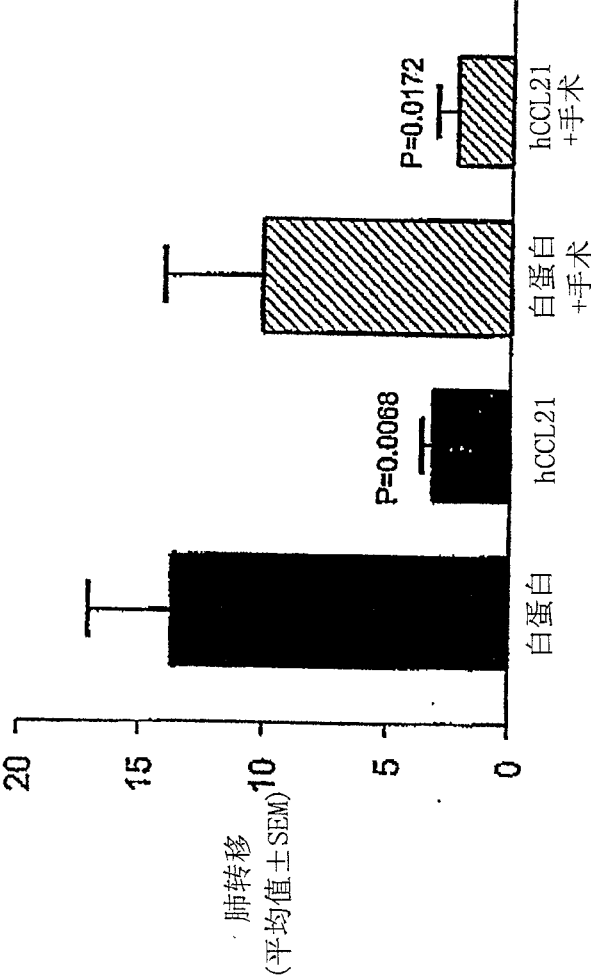


图 3

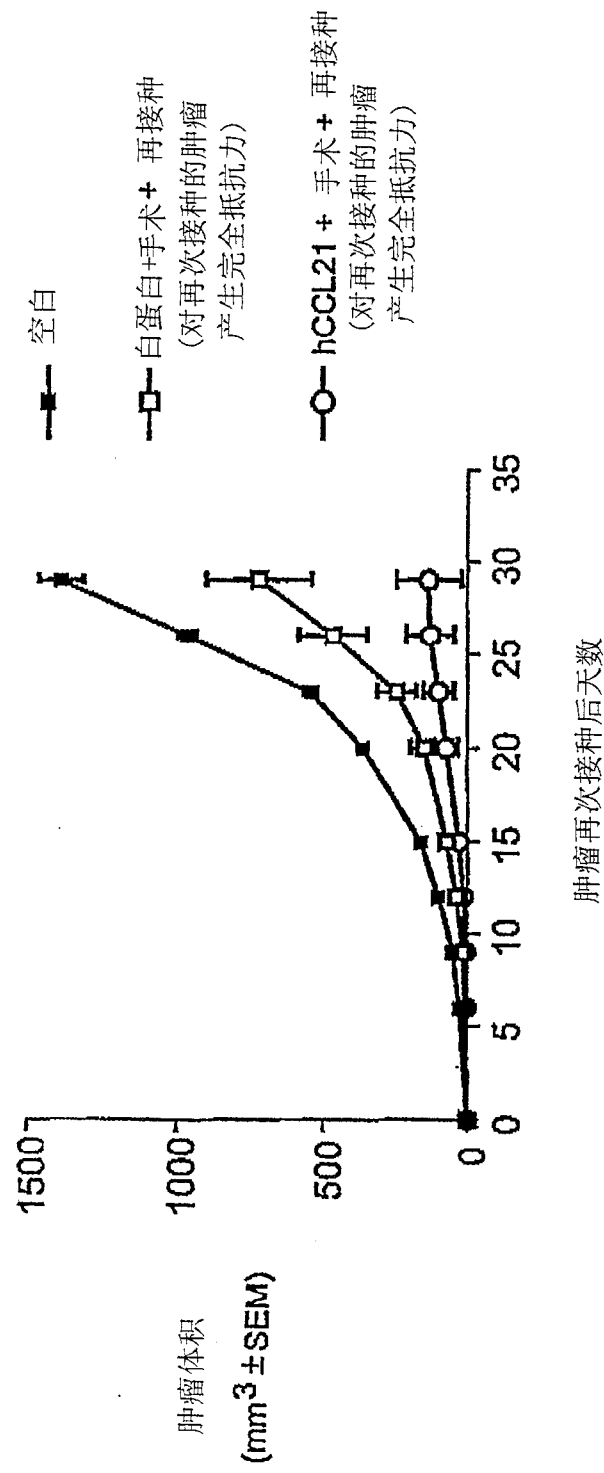


图 4

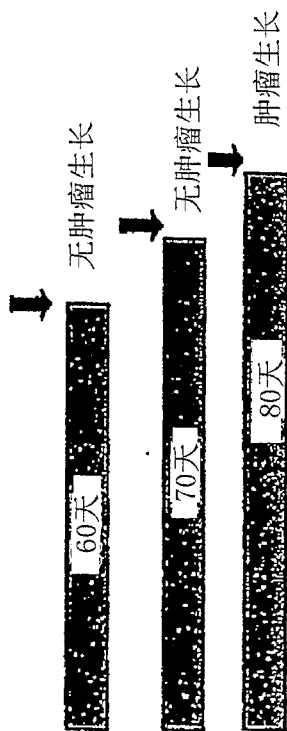


图 5A

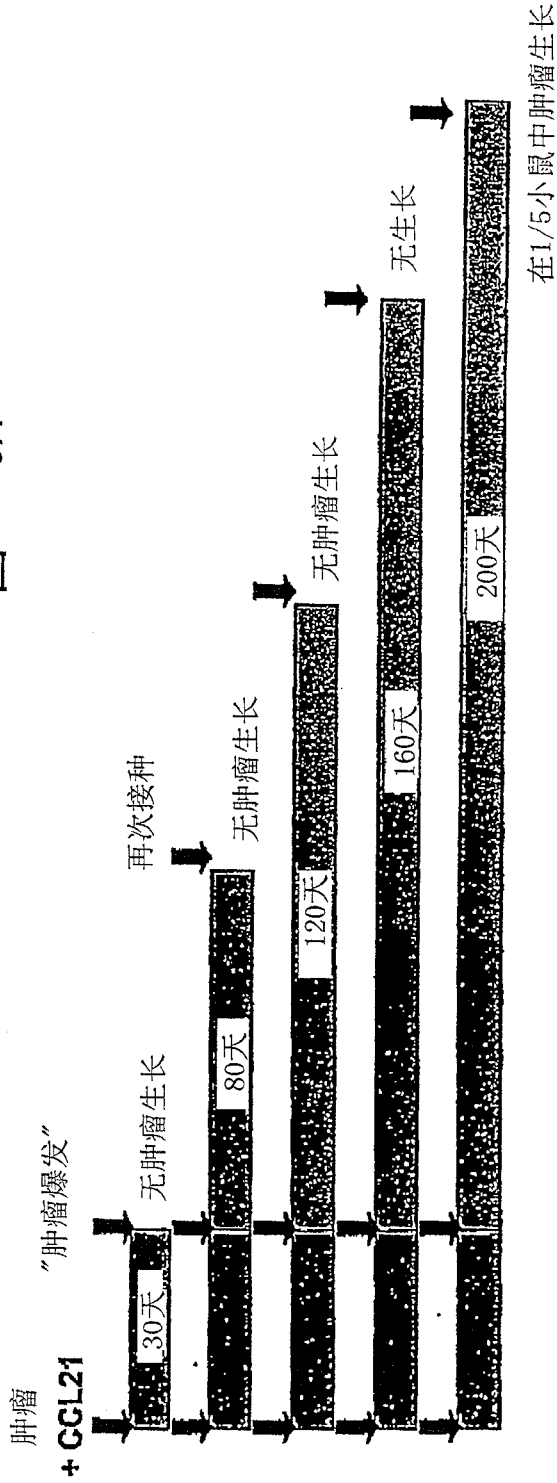


图 5B

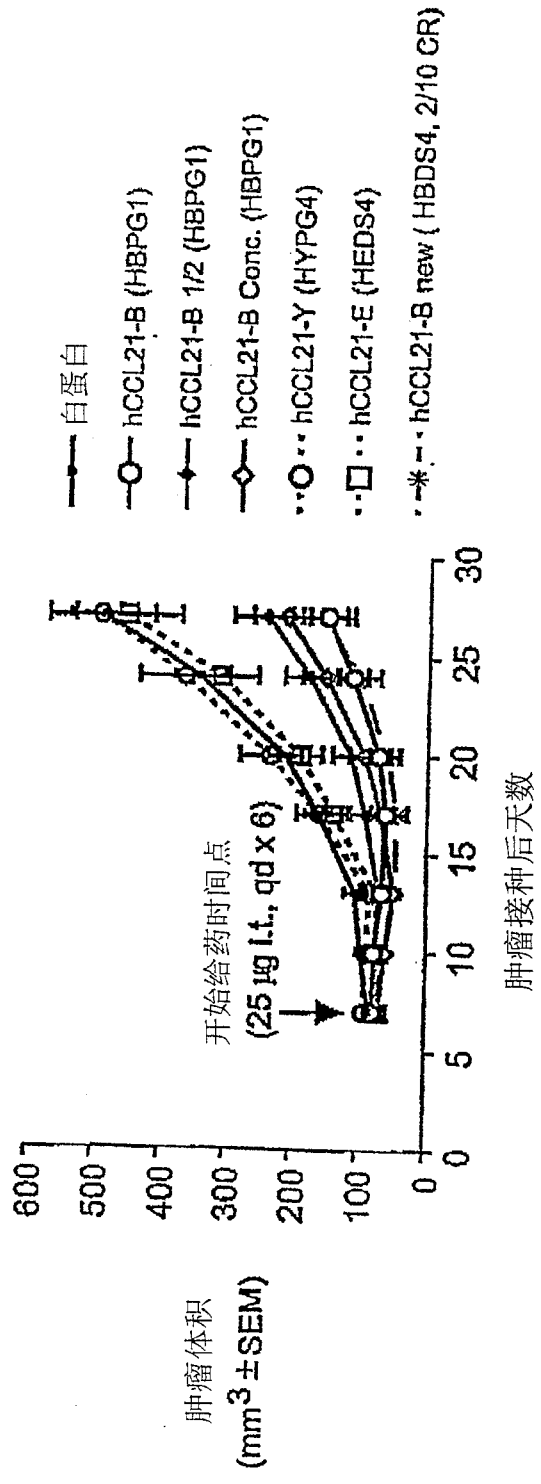


图 6

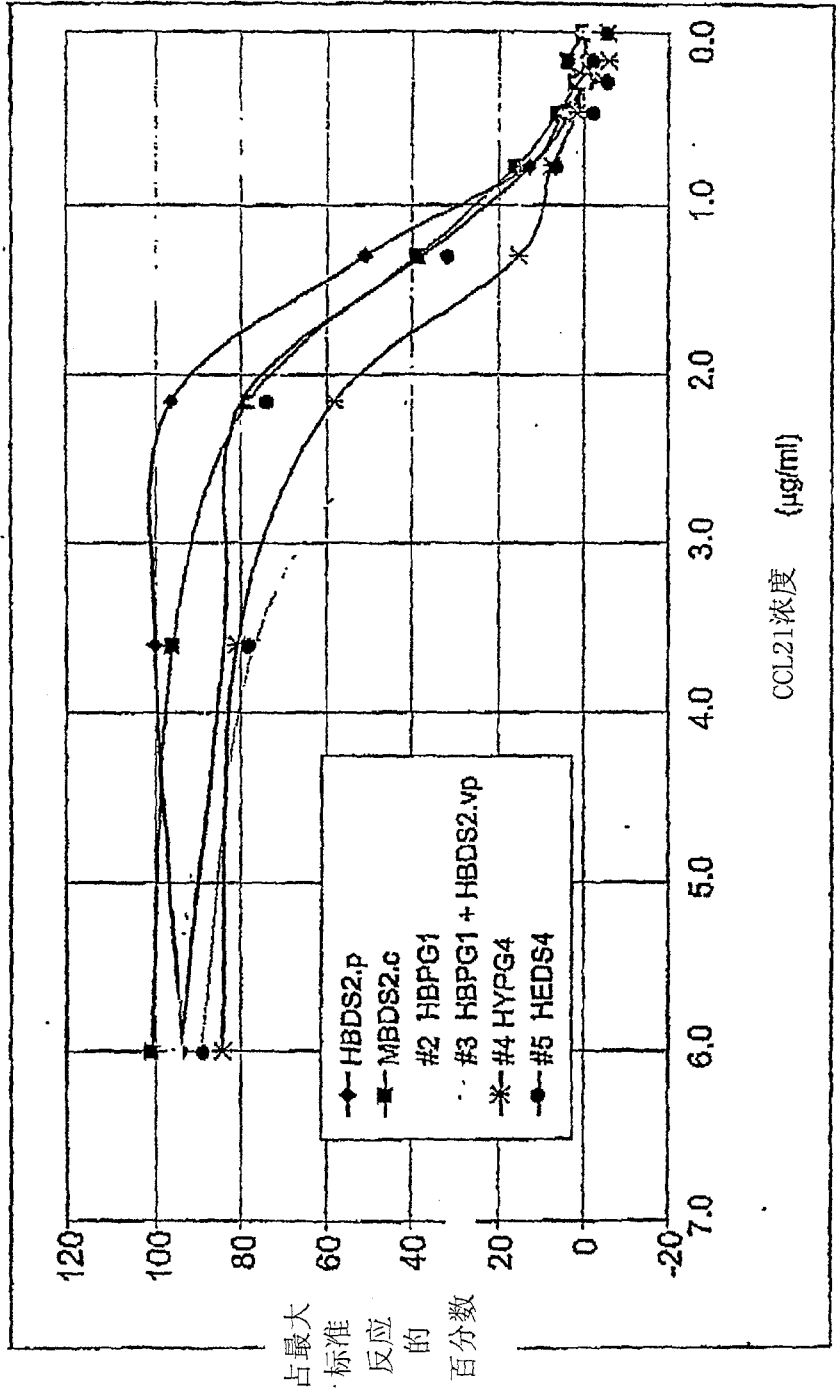
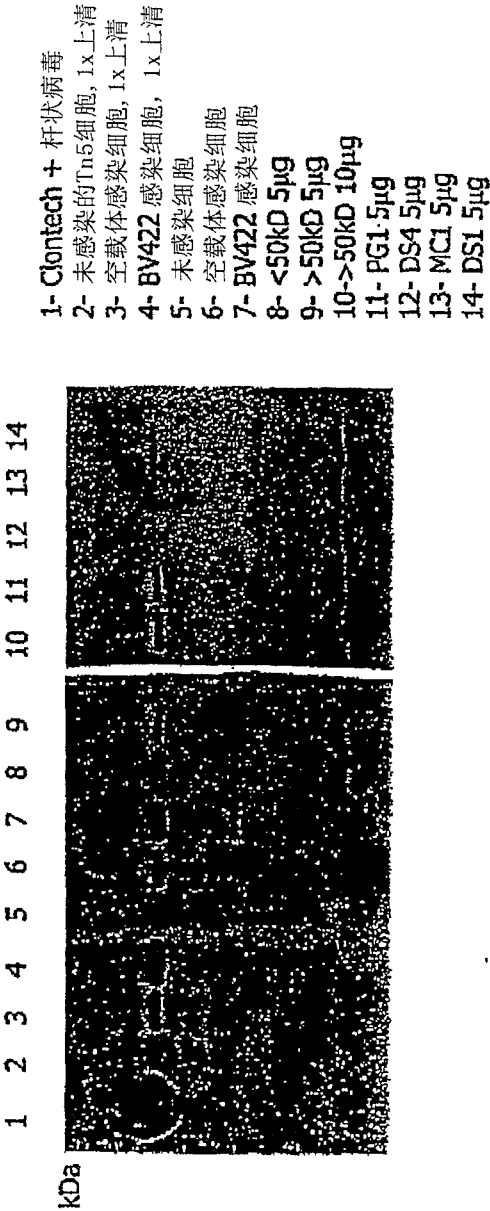


图 7



图

8

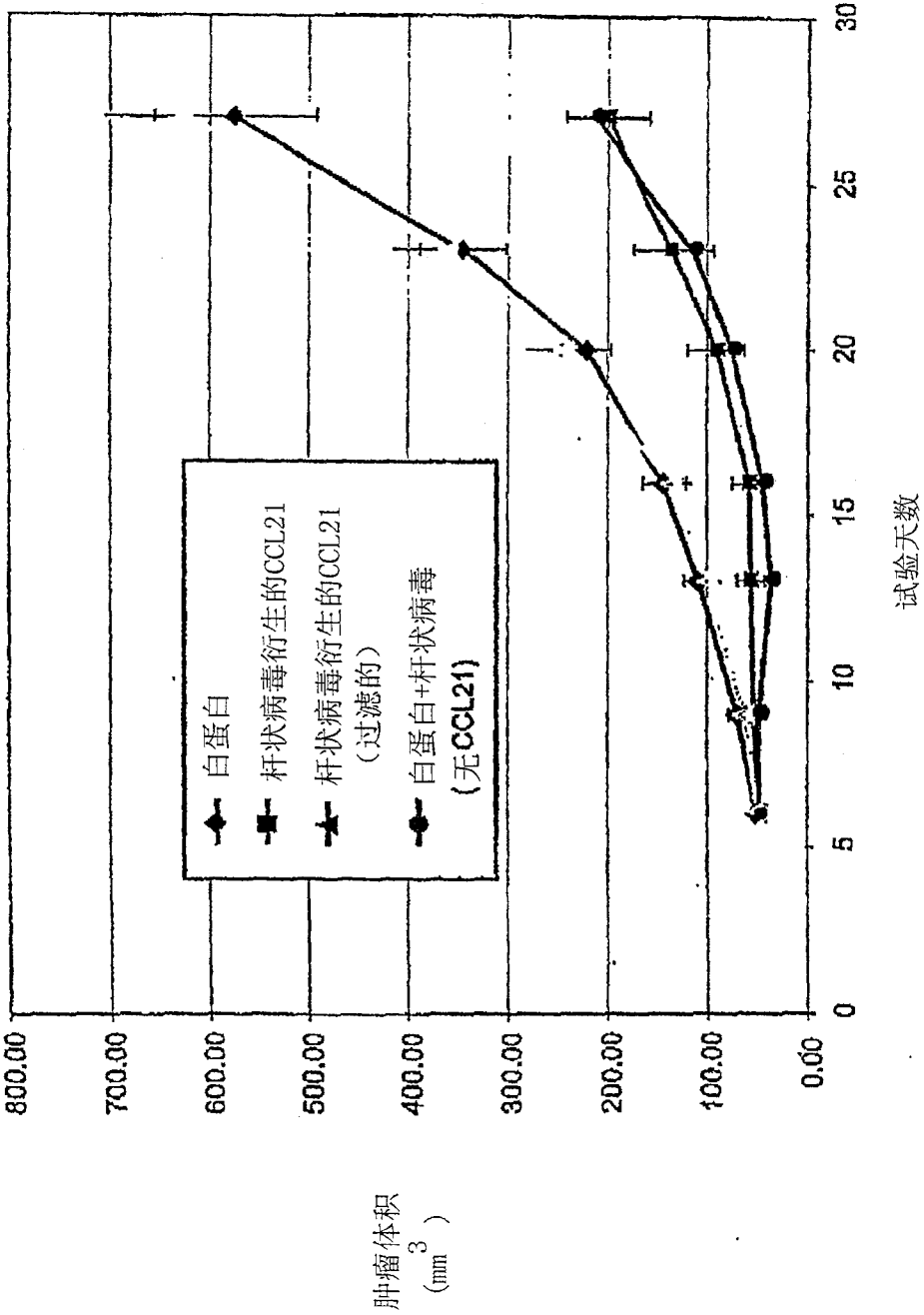


图 9

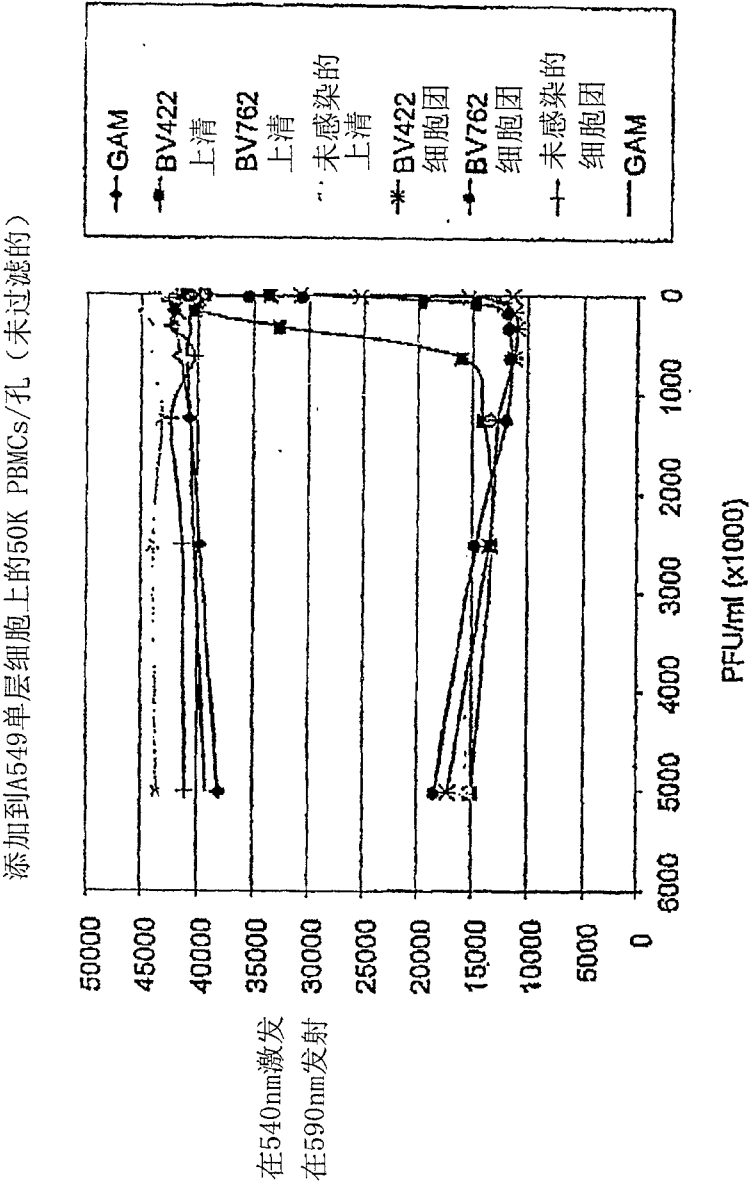


图 10A

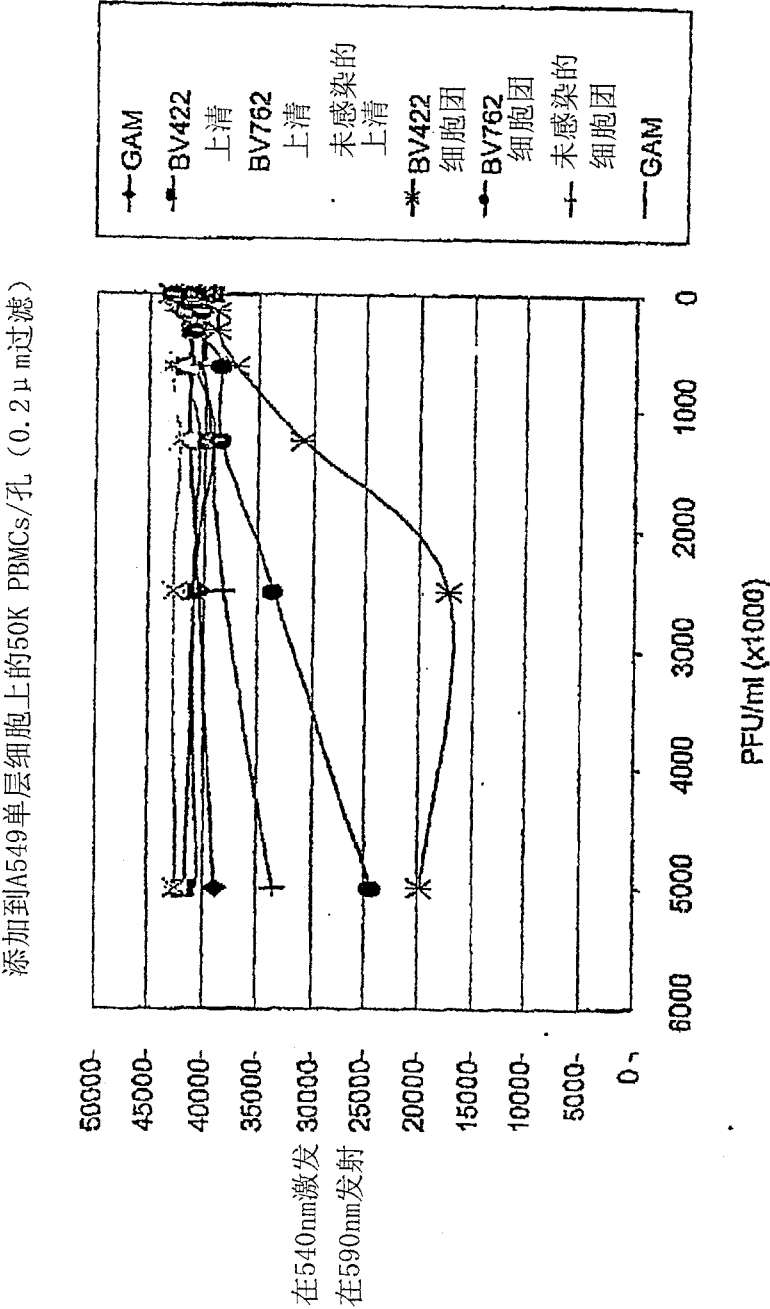


图 10B

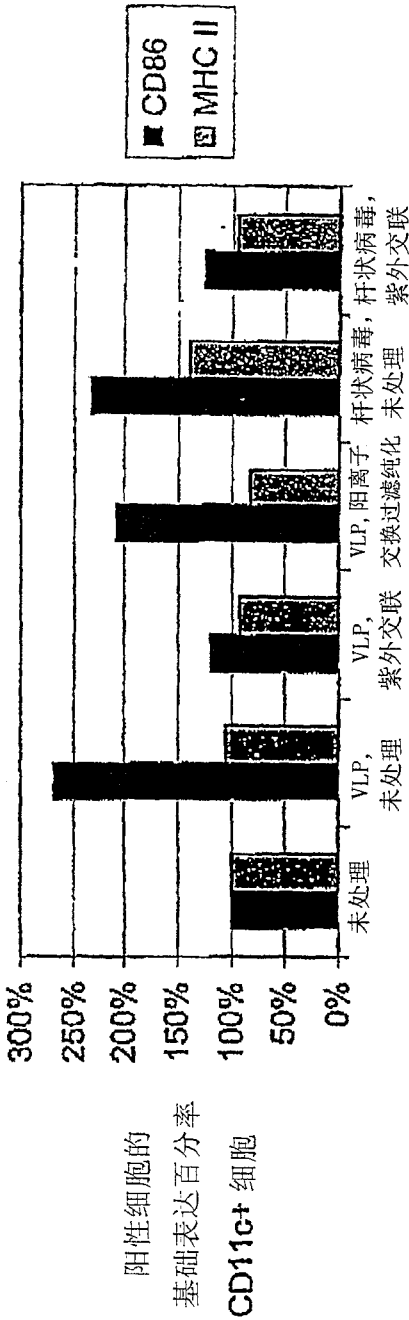


图 11A

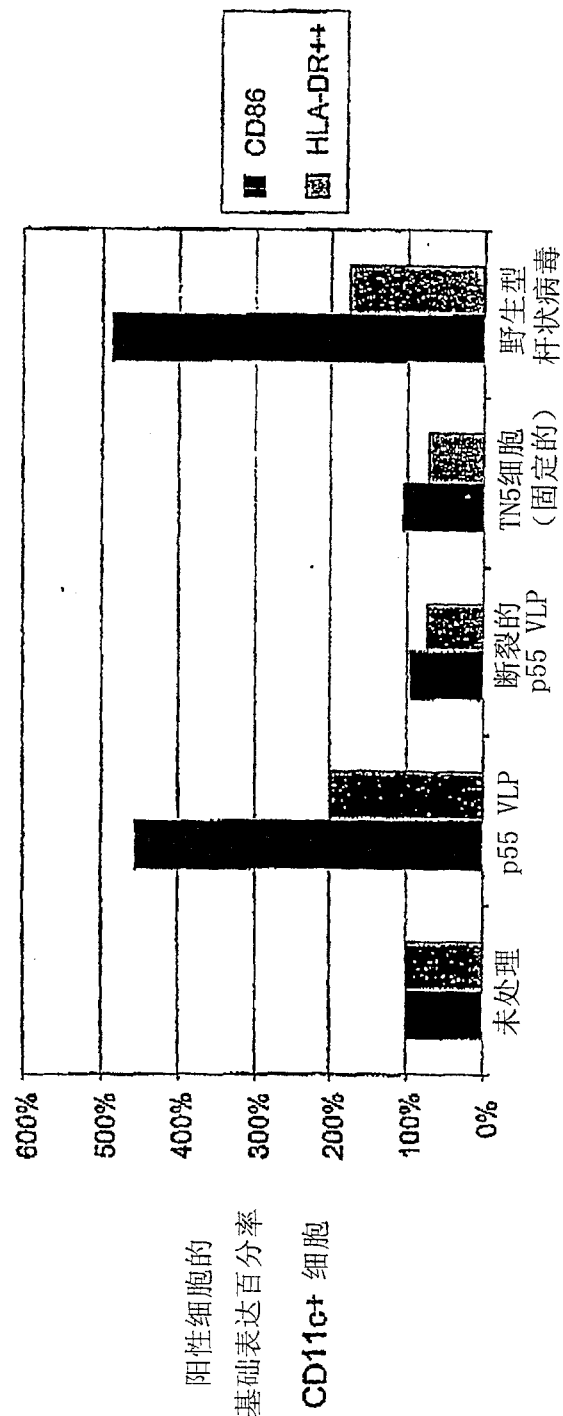


图 11B

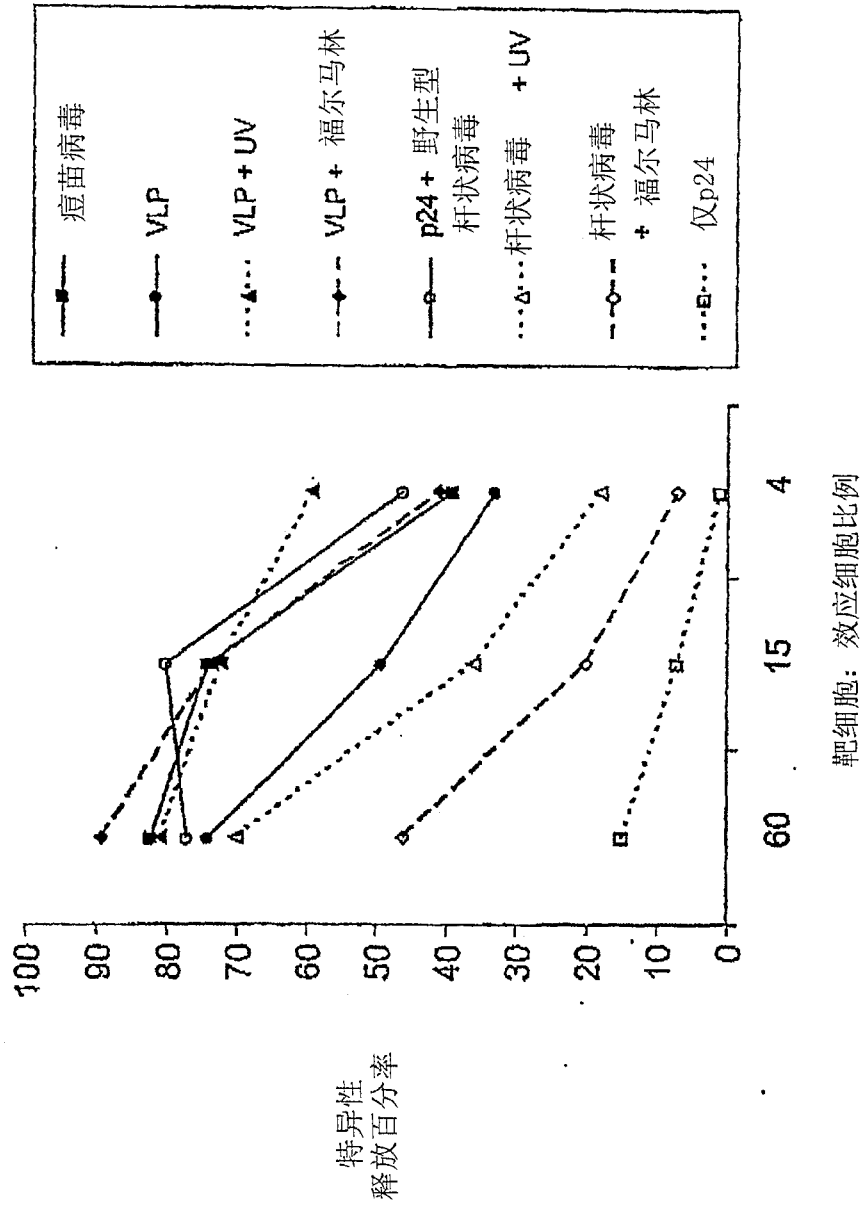


图 12

杆状病毒诱导对A549细胞的PBMC依赖的细胞毒性

PBMCs + BV

仅BV

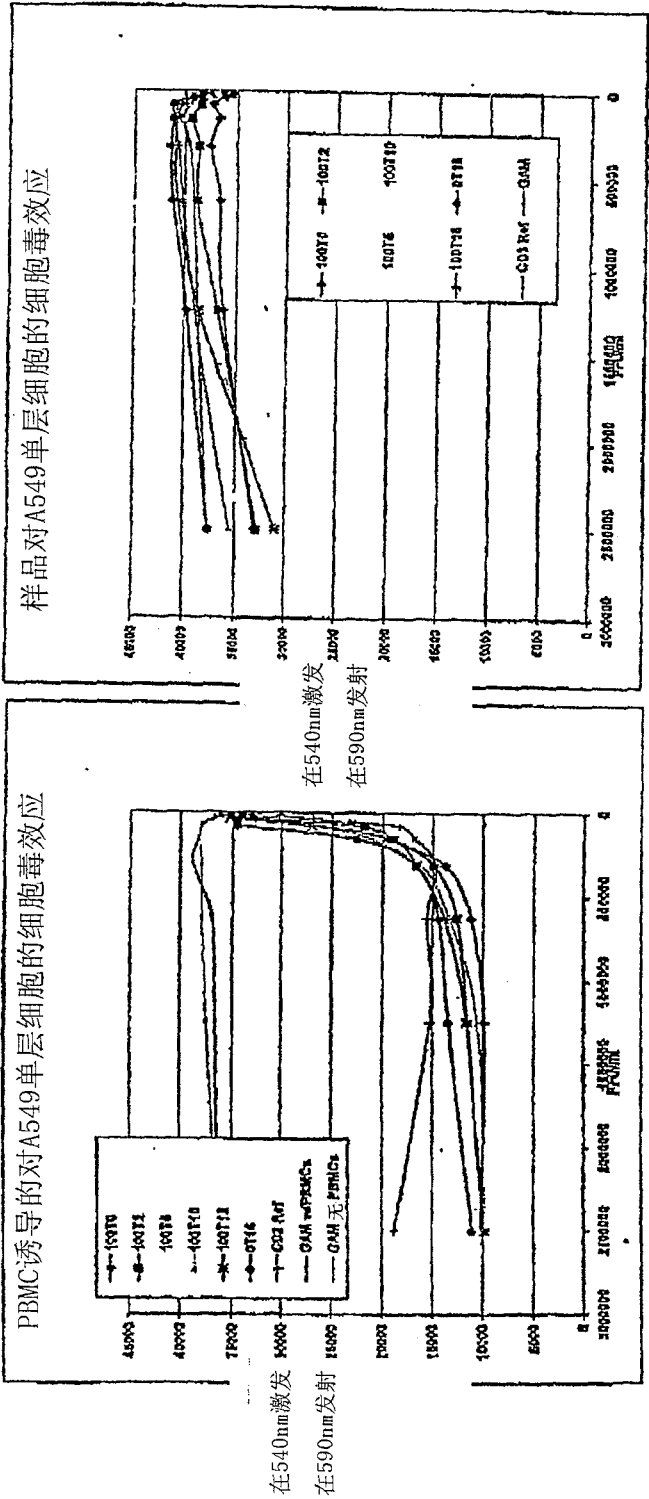


图 13

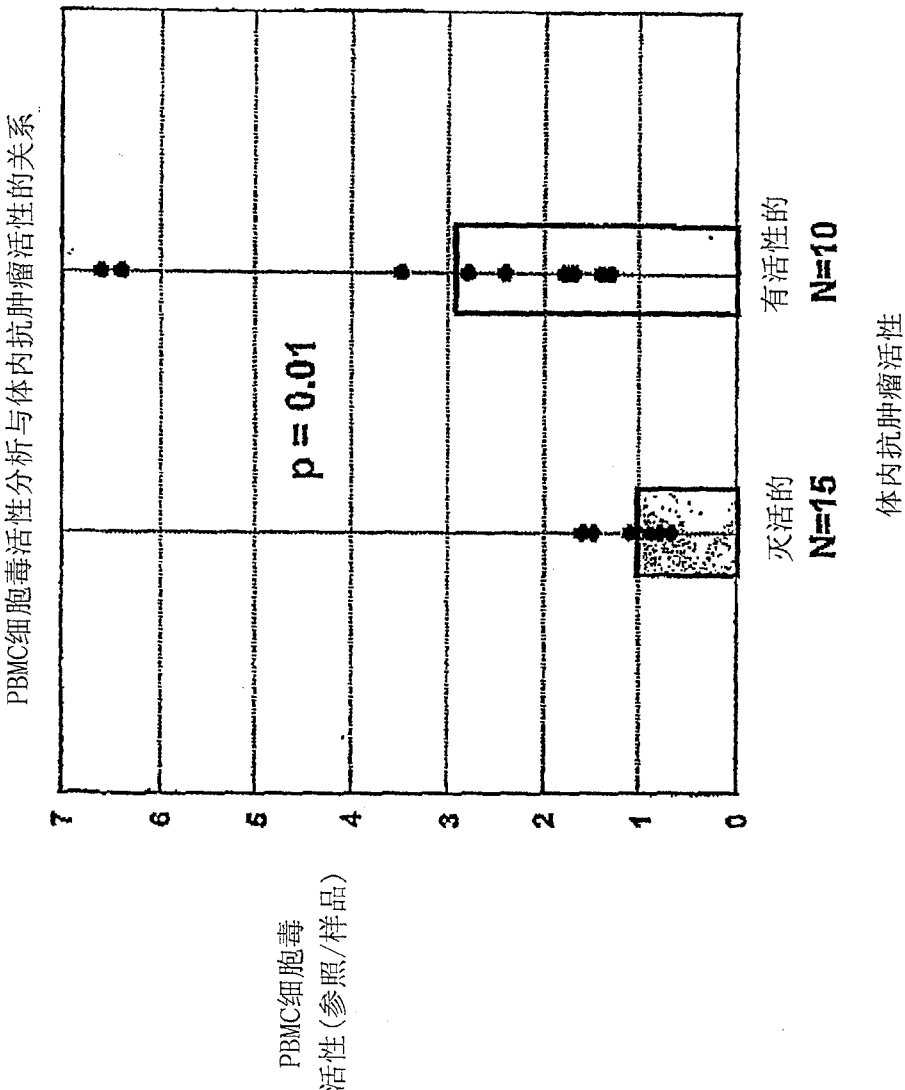


图 14

抗GP64单克隆抗体阻断杆状病毒诱导的肿瘤细胞体外杀伤作用

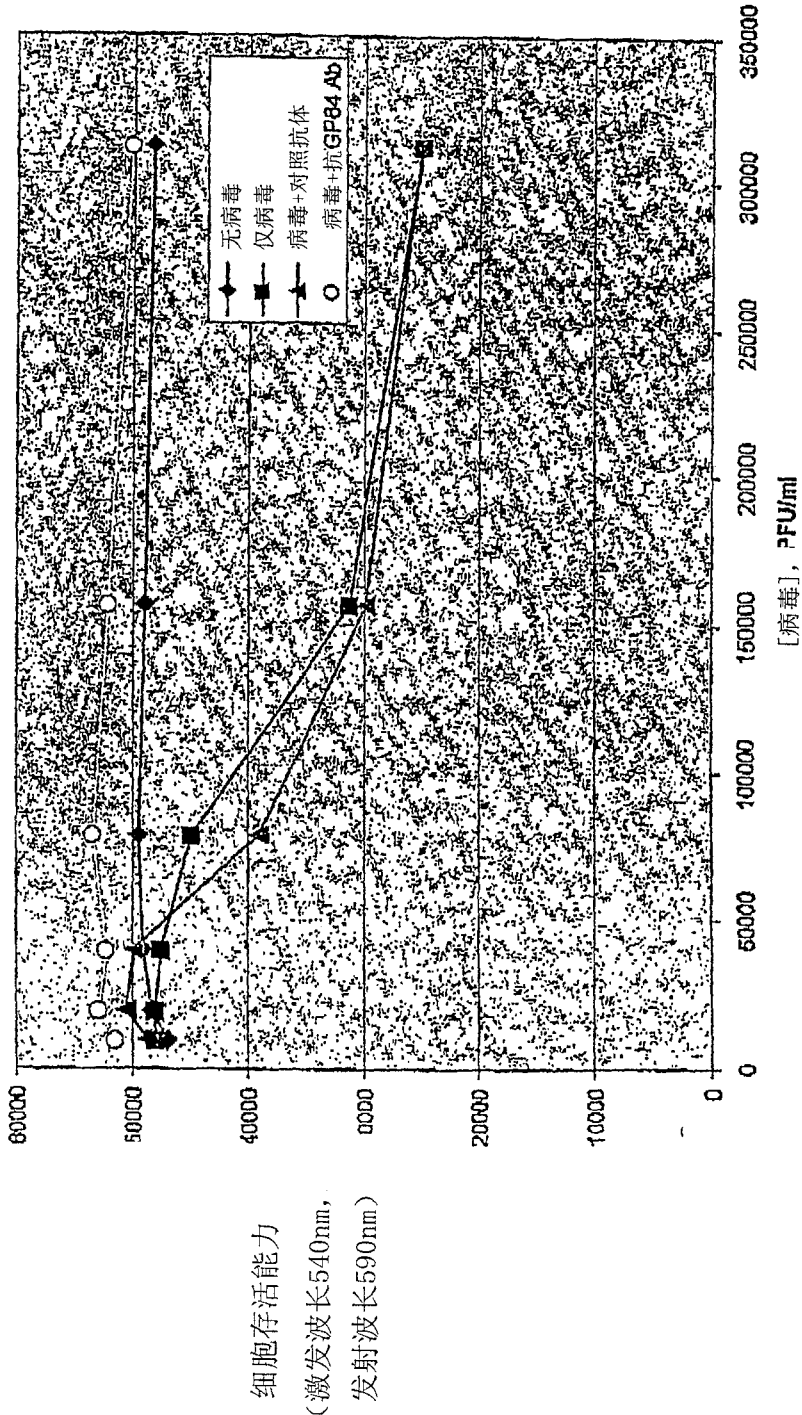


图 15

“灭活的”杆状病毒在体外诱导PBMC介导的肿瘤细胞杀伤作用

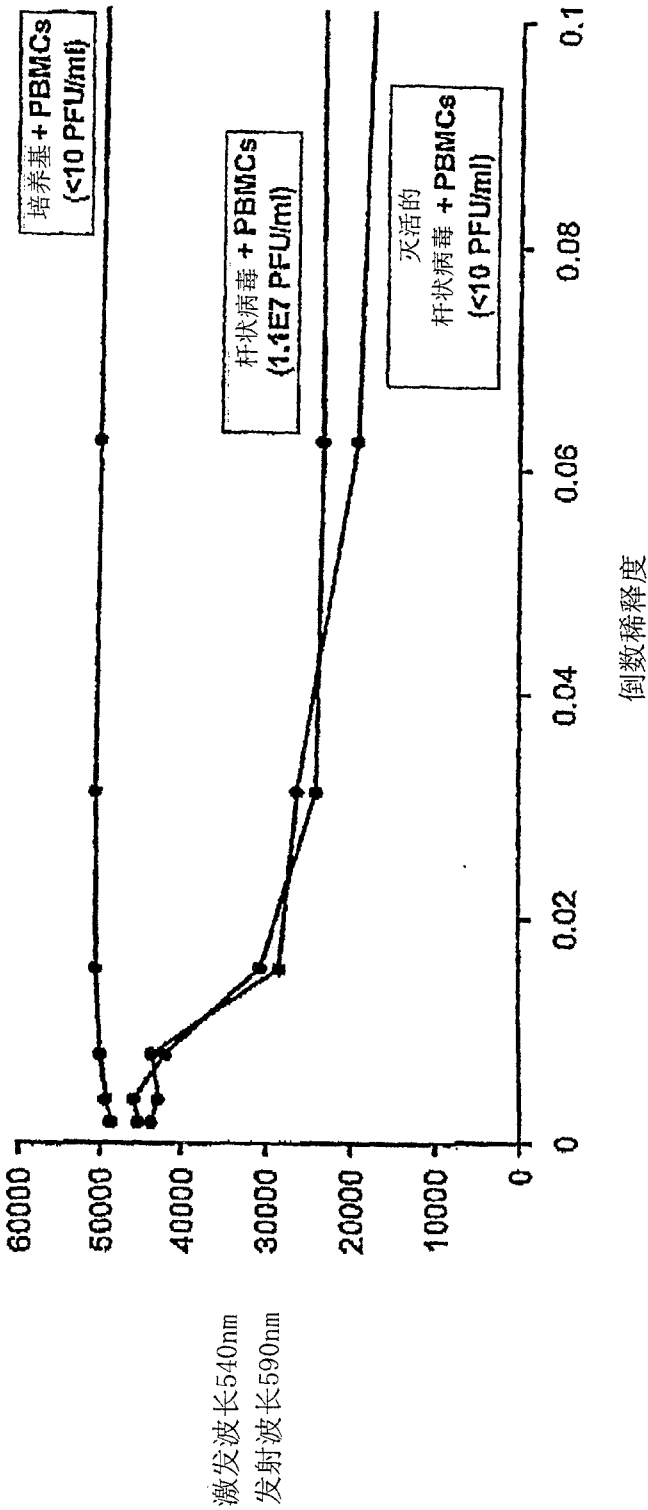


图 16

肿瘤细胞是杆状病毒的主要靶位

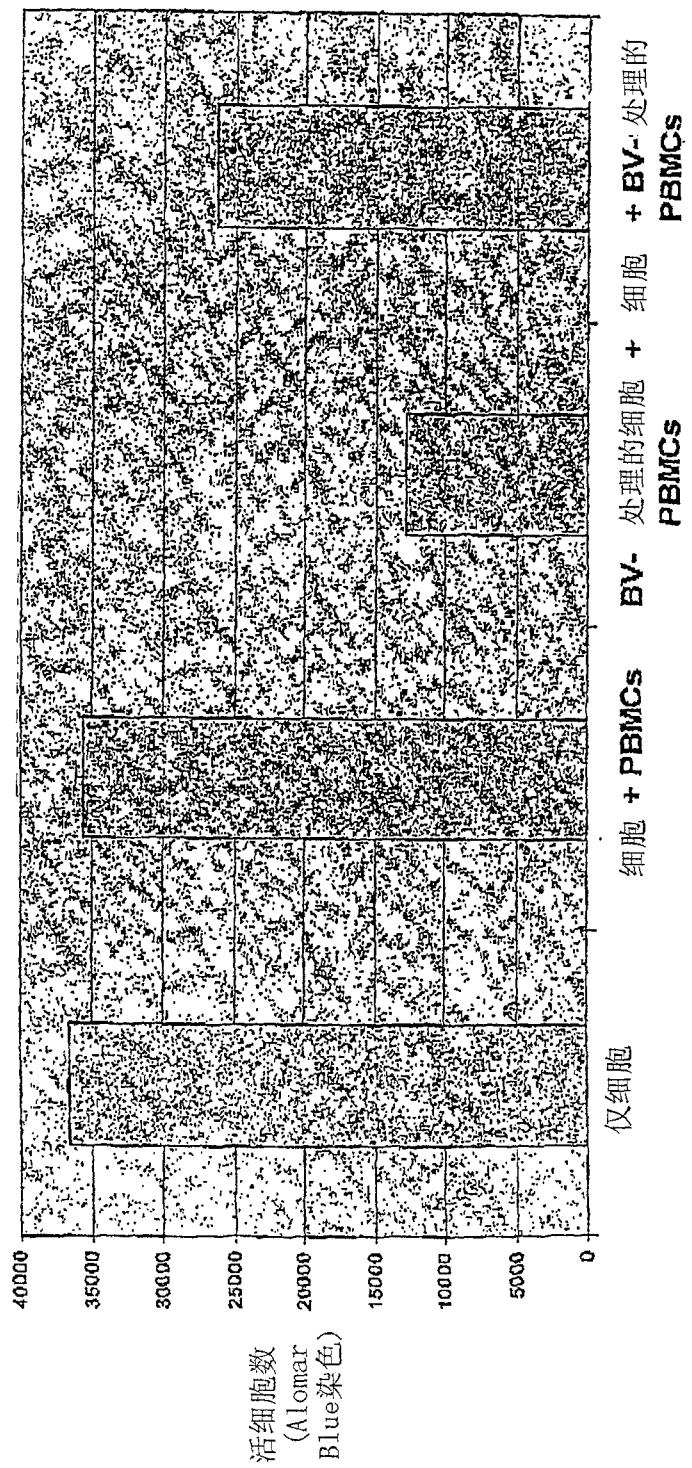


图 17

灭活病毒在体内是有效的

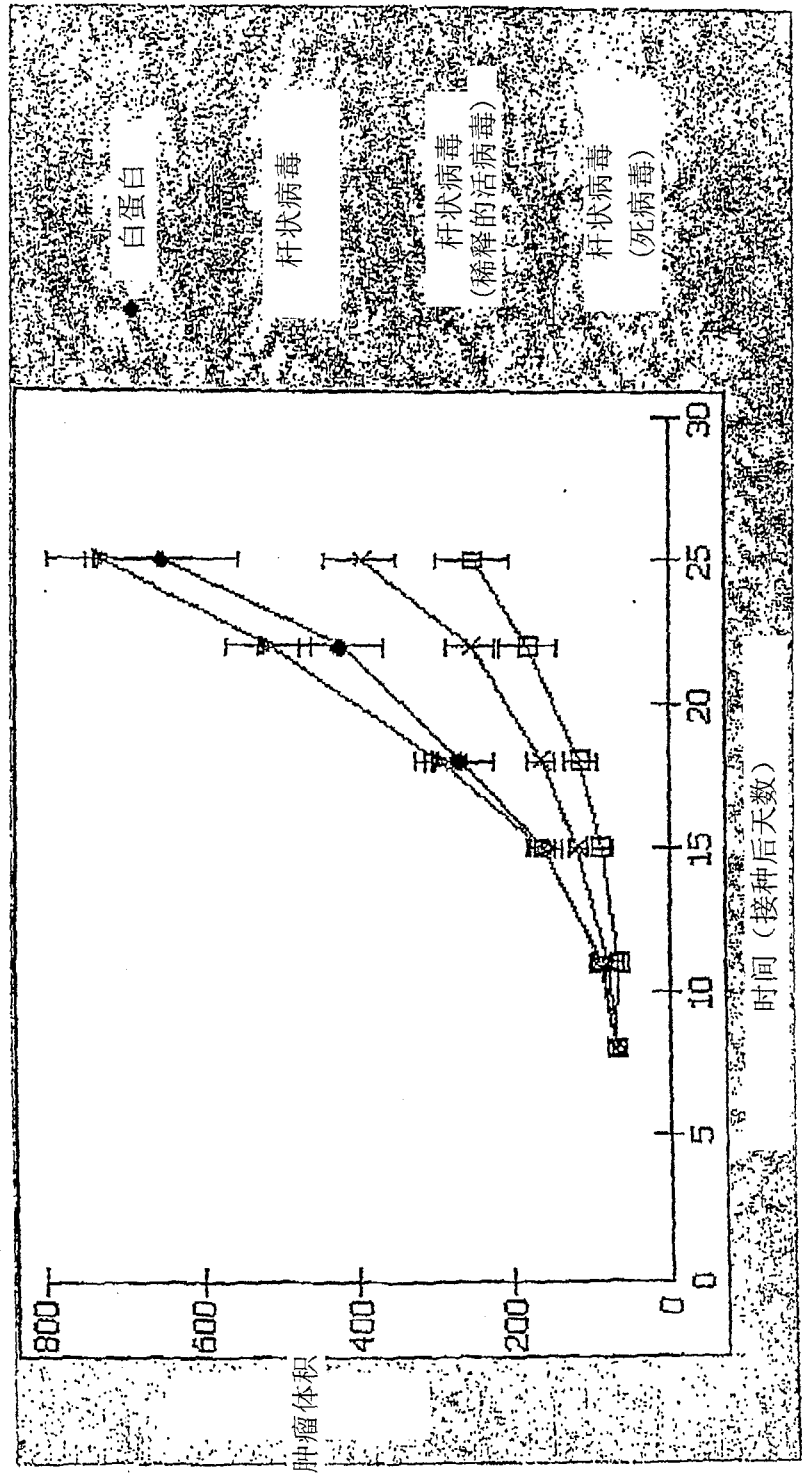


图 18

BV在体外和体内都能诱导抗致病性病毒感染的保护作用

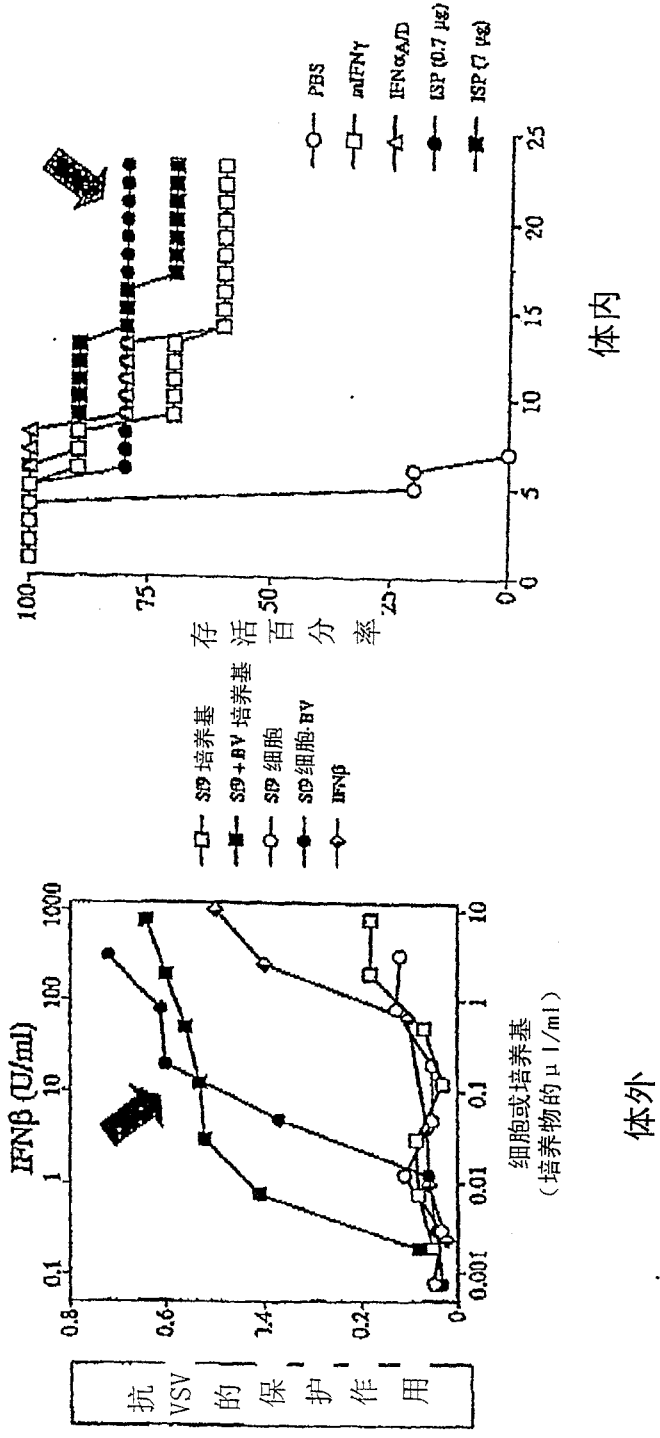


图 19

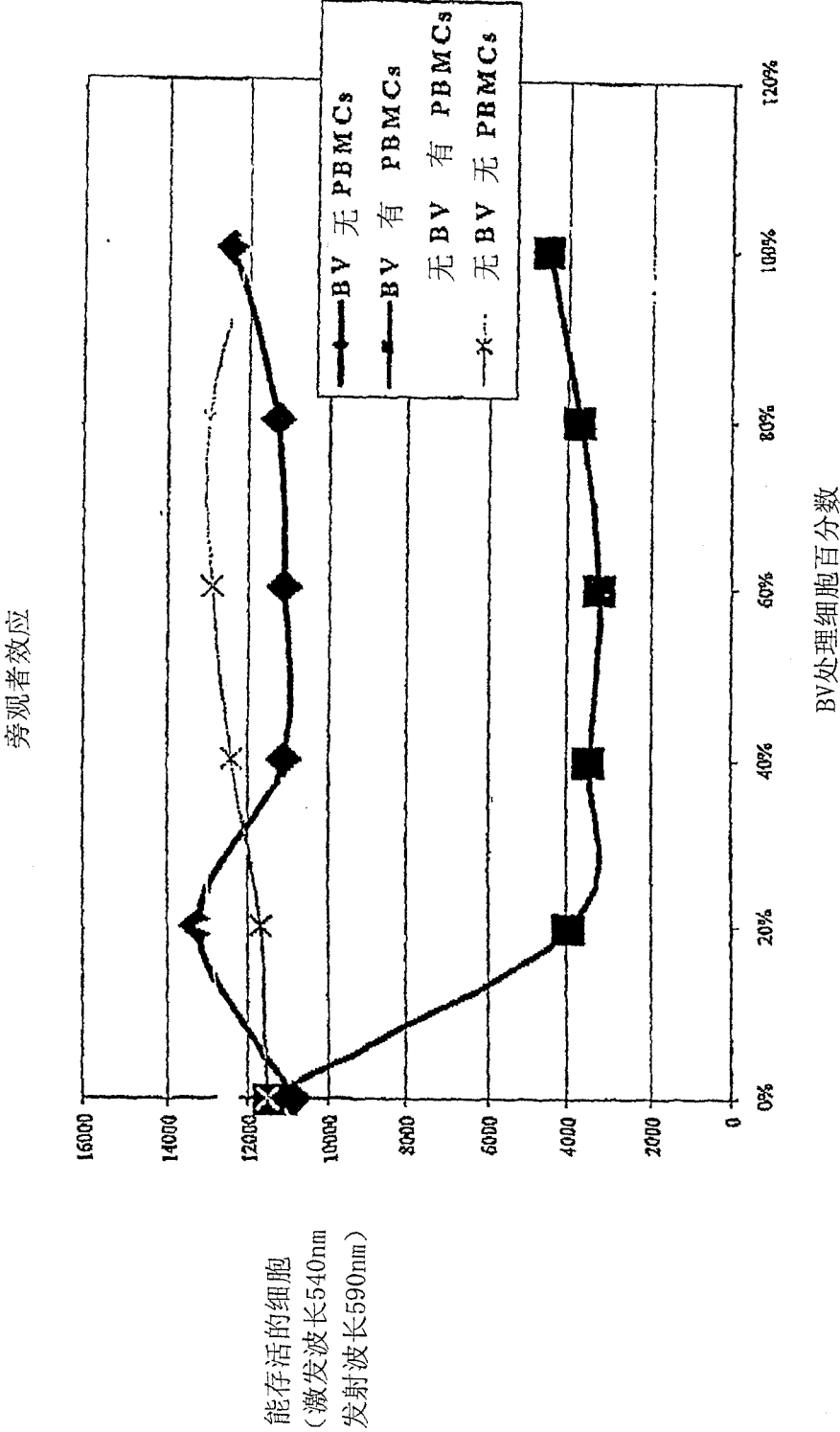


图 20