

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1223402 B
CN 105658795 B

[12]

STANDARD PATENT (R) SPECIFICATION
轉錄標準專利說明書

[21] Application no. 申請編號
16111742.0

[51] Int. Cl.
C12N 15/39 (2006.01) A61K 39/285 (2006.01)

[22] Date of filing 提交日期
12.10.2016

[54] IMMUNO-ONCOLYTIC THERAPIES
免疫溶瘤療法

[30] Priority 優先權
22.08.2013 US 61/868,978

[43] Date of publication of application 申請發表日期
28.07.2017

[45] Date of publication of grant of patent 批予專利的發表日期
16.04.2021

[86] International application no. 國際申請編號
PCT/US2014/052308

[87] International publication no. and date 國際申請發表編號及日期
WO2015/027163 26.02.2015

CN Application no. & date 中國專利申請編號及日期
CN 201480058401.0 22.08.2014

CN Publication no. & date 中國專利申請發表編號及日期
CN 105658795 08.06.2016

Date of grant in designated patent office 指定專利當局批予專利日期
03.07.2020

[73] Proprietor 專利所有人
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION
匹茲堡大學聯邦系統高等教育
200 Gardner Steel Conference Center, Thackeray and
O'Hara Streets
Pittsburgh, Pennsylvania 15260
UNITED STATES OF AMERICA

[72] Inventor 發明人
THORNE, Stephen, Howard S-H 瑟尼

[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
SHANGHAI INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
Unit F, 20th Floor, Neich Tower
128 Gloucester Road
HONG KONG



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105658795 B

(45)授权公告日 2020.07.03

(21)申请号 201480058401.0
 (22)申请日 2014.08.22
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105658795 A
 (43)申请公布日 2016.06.08
 (30)优先权数据
 61/868,978 2013.08.22 US
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2016.04.22
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2014/052308 2014.08.22
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02015/027163 EN 2015.02.26
 (73)专利权人 匹兹堡大学联邦系统高等教育
 地址 美国宾夕法尼亚州
 (72)发明人 S·H·瑟尼
 (74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
 司 31100
 代理人 陶启长 杨昀

(51)Int.Cl.
 C12N 15/39(2006.01)
 A61K 39/285(2006.01)
 (56)对比文件
 AU 2012244210 B2,2012.11.15,
 AU 2012244210 B2,2012.11.15,
 CN 101790310 A,2010.07.28,
 CN 101912421 A,2010.12.15,
 WO 2011119925 A2,2011.09.29,
 SUSAN WEINTRAUB et al., "Biogenesis of vaccinia. Effects of inhibitors of glycosylation on virus-mediated activities".《VIROLOGY》.1977,第78卷第315页摘要部分.
 Delia Gutman et al., "Development of recombinant vesicular stomatitis virus for use as oncolytic vector".《Cytokine》.2011,第56卷(第1期),第84页右栏第二段.
 李锦洲等. "CEA重组痘苗病毒对实验性CEA阳性肝癌的预防和治疗作用".《郑州大学学报(医学版)》.2005,第40卷(第4期),第667-669页.

审查员 汪豪杰

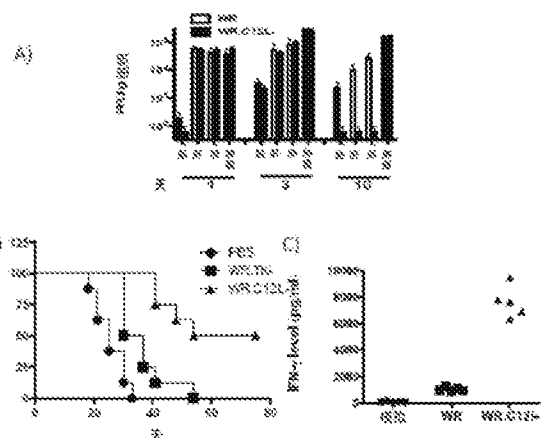
权利要求书2页 说明书38页 附图40页

(54)发明名称

免疫溶瘤疗法

(57)摘要

本发明涉及溶瘤痘苗病毒,其经修饰以促进抗肿瘤免疫力和/或减少针对所述病毒的宿主免疫力和/或抗体应答。其至少部分基于如下发现如下溶瘤痘苗病毒减少肿瘤生长:(i)携带减少T细胞免疫力(白介素-18结合蛋白)的基因的基因组缺失;(ii)用唾液酸酶处理,认为所述唾液酸酶减少TLR2活化并因此减少抗体应答;(iii)携带增强细胞毒性T淋巴细胞诱导(例如,TRIF)的基因和/或(iv)通过减少前列腺素E2来减少肿瘤髓源性抑制细胞。因此,本发明提供免疫溶瘤痘苗病毒及其在癌症治疗中应用的方法。



CN 105658795 B

1. 一种溶瘤痘苗病毒, 包含编码15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或15-PGDH活性功能结构域的核酸, 且所述溶瘤痘苗病毒呈胸苷激酶阴性。

2. 如权利要求1所述的溶瘤痘苗病毒, 还具有以下特征:

C12L基因完全或部分缺失;

病毒包膜的糖基化低于区别仅在于未修饰的病毒; 或者

包含编码干扰素 β 诱导性To11/IL-1R结构域衔接蛋白(TRIF)或TRIF活性功能结构域的核酸。

3. 如权利要求1所述的溶瘤痘苗病毒, 其特征在于, 所述溶瘤痘苗病毒还包含编码干扰素 β 诱导性To11/IL-1R结构域衔接蛋白(TRIF)或TRIF活性功能结构域的核酸。

4. 如权利要求1所述的溶瘤痘苗病毒, 其特征在于, 还具有C12L基因完全或部分缺失。

5. 如权利要求1所述的溶瘤痘苗病毒, 其特征在于, 所述溶瘤痘苗病毒包膜的糖基化低于区别仅在于未修饰的病毒。

6. 如权利要求1所述的溶瘤痘苗病毒, 其特征在于, 还具有A34R中的Lys151至Glu点突变, B5R的完全或部分缺失, A36R突变或缺失, A56R突变或缺失, 或其组合。

7. 如权利要求6所述的溶瘤痘苗病毒, 其特征在于, 所述A36R突变是A36R蛋白中的氨基酸取代或是A36R蛋白完全或部分缺失, 并且/或者所述A56R缺失是A56R蛋白完全或部分缺失。

8. 如权利要求1所述的溶瘤痘苗病毒, 其特征在于, 所述编码15-PGDH或15-PGDH活性功能域的核酸克隆在胸苷激酶基因座内。

9. 如权利要求3所述的溶瘤痘苗病毒, 其特征在于, 编码TRIF或TRIF活性功能域的核酸克隆在胸苷激酶基因座内。

10. 如权利要求1所述的溶瘤痘苗病毒, 其特征在于, 所述溶瘤痘苗病毒包括西部保留地毒株。

11. 权利要求1-10中任一项所述溶瘤痘苗病毒用于制造以下各项至少其一的药物的用途: (a) 减少癌细胞的生长, (b) 减少肿瘤生长, (c) 治疗患癌症的对象和 (d) 在对象中产生抗癌作用;

所述癌症和肿瘤选自宫颈癌、黑素瘤、肝细胞癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、白血病、淋巴瘤、肾癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、十二指肠癌、星形细胞瘤和肉瘤。

12. 如权利要求11所述的用途, 所如肉瘤为骨肉瘤, 所述星形细胞瘤为多形性成胶质细胞瘤, 所述肺癌为腺癌。

13. 如权利要求11或12所述的用途, 还包括采用下组的一种或多种试剂: 抗癌剂、免疫调节剂、抑制或降低髓源性抑制细胞水平的物质及其组合。

14. 如权利要求13所述的用途, 所述免疫调节剂包括能够抑制抗病毒免疫的物质。

15. 如权利要求13所述的用途, 所述免疫调节剂包括免疫检验点抑制剂。

16. 如权利要求15所述的用途, 所述免疫检验点抑制剂包括抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PDL1抗体或TLR激动剂。

17. 如权利要求13所述的用途, 所述免疫调节剂和所述抑制或降低髓源性抑制细胞水平的物质各自选自: 抗CD33抗体或其可变区、抗CD11b抗体或其可变区、细胞因子、趋化因子和COX2抑制剂。

18. 如权利要求17所述的用途,所述COX2抑制剂包含塞来昔布。
19. 如权利要求13的用途,所述抗癌剂包括化疗剂、放疗剂、抗血管生成剂、凋亡诱导剂、抗癌抗体、抗细胞周期蛋白依赖性激酶试剂或其组合。
20. 一种组合物,包含权利要求1-10中任一项所述的溶瘤痘苗病毒。
21. 如权利要求20所述的组合物,还包含抗癌剂、免疫调节剂、抑制或降低髓源性抑制细胞水平的物质及其组合。
22. 如权利要求21所述的组合物,所述免疫调节剂包括能够抑制抗病毒免疫的物质。
23. 如权利要求21所述的组合物,所述免疫调节剂包括免疫检验点抑制剂。
24. 如权利要求23所述的组合物,所述免疫检验点抑制剂包括抗CTLA4、抗PD-1、抗PDL1或TLR激动剂。
25. 如权利要求21所述的组合物,所述免疫调节剂和所述抑制或降低髓源性抑制细胞水平的物质各自选自:抗CD33抗体或其可变区、抗CD11b抗体或其可变区、细胞因子、趋化因子和COX2抑制剂。
26. 如权利要求25所述的组合物,所述COX2抑制剂包含塞来昔布。
27. 如权利要求21所述的组合物,所述抗癌剂包括化疗剂、放疗剂、抗血管生成剂、凋亡诱导剂、抗癌抗体、抗细胞周期蛋白依赖性激酶试剂或其组合。

免疫溶瘤疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明要求2013年8月22日提交的美国临时专利申请系列第61/868,978号的优先权,其通过引用全文纳入本文。

[0003] 1.介绍

[0004] 本发明涉及溶瘤痘苗病毒,其经修饰以促进抗肿瘤免疫力和/或减少宿主对该病毒的抗体应答。

[0005] 2.发明背景

[0006] 溶瘤病毒(OV)是具有复制性的病毒,其天然或经工程改造以对肿瘤细胞具有选择性¹⁻³。已有多重不同的病毒主链被测试为OV,包括痘苗病毒(VV)毒株。⁴⁻¹¹至少三种不同的溶瘤痘苗载体具有完全的I期测试,包括毒株vvDD^{6,7}。该VV OV, JX-594^{4,12} (Jennerex), 已于近期在II期试验中显示对于肝细胞癌(HCC), 包括全身肿瘤递送的令人高度振奋的应答^{13,14}。此外,已经报道了疱疹病毒HSV OV (T-Vec, Amgen^{15,16}) 在治疗黑素瘤中的令人振奋的III期试验结果(16%应答,相比之下对照壁为2%)。由此,已开始揭示OV在癌症治疗中的真正潜能(超过原始ONYX-015 (H-101) 腺病毒毒株^{17,18}的潜能,其维持在任何市场中的仅获批的OV治疗¹⁹)。

[0007] 即便具有该希望,采用OV的完全应答仍然罕有。值得注意的是,第一代和第二代OV毒株起先设计用于通过直接导致细胞裂解的选择性复制来摧毁肿瘤细胞。此外, JX-594和T-Vec均表达细胞因子转基因(GM-CSF), 其将被预期能够加强宿主淋巴细胞^{12, 14, 20, 21}。临床前研究已显示免疫应答在溶瘤VV的治疗活性中的至关重要性, 其中(i) 小鼠统一在VV治疗后的完全应答之后对重新攻击具有抵抗, 指示对于抗肿瘤适应性免疫力诱导的绝对必要性²²; (ii) VV的疫苗作用显示的治疗益处大于等等的DC疫苗²³; (iii) 肿瘤的VV感染产生标志性的细胞因子概况(‘排斥的免疫学恒量(Immunologic Constant of Rejection)’²⁴); (iv) VV治疗减少肿瘤中的免疫抑制性细胞的数量(MDSC、T-reg和M2巨噬细胞)²⁵; (v) 治疗引发的免疫应答在病毒被清除后能够良好根除残余的肿瘤和转移, 提供长期的免疫监督以防止复发^{22, 25, 26}; 和(vi) 在一些研究中, 实际上, 疗效似乎不需要稳健病毒复制^{27, 28}。因此, OV, 特别是VV的免疫治疗效果, 至少与直接溶瘤作用同样重要, 并且这些载体很可能应被主要视作免疫疗法。

[0008] 值得注意的是, 现有的临床载体未作为免疫疗法进行设计(除单一细胞因子的表达以外), 并且该领域仍然相对地研发不足。因此, 在增强溶瘤载体方面仍有为实现的巨大潜能, 所述增强通过优化其与宿主免疫系统的相互作用并产生能够针对相关的肿瘤抗原进行原位疫苗接种的载体来实现。或者说, 且不论成功免疫的证据²⁹⁻³¹, 大多数传统治疗性癌症疫苗方法在临床(尤其是针对较大肿瘤)方面的成功受限。因此需要新型疫苗方法, 理想地介导对于针对各肿瘤中相关的抗原的应答的诱导, 克服甚至在大肿瘤中的抑制, 并且增强对于肿瘤靶标的T细胞归巢。

3. 发明内容

[0009] 本发明涉及“免疫溶瘤性”痘苗病毒,所述痘苗病毒已经修饰以促进抗肿瘤免疫力和/或减少针对所述病毒的宿主免疫和抗体应答。其至少部分基于,发现通过已经用试剂处理的溶瘤痘苗病毒改善对肿瘤生长的抑制,其中所述试剂减少糖基化的量和/或用唾液酸酶处理(据信其能够减少TLR2活化并且减少针对该病毒的宿主抗体应答);和/或携带编码减少T细胞免疫力的产物(病毒白介素-18结合蛋白)的病毒基因组核酸的修饰或缺失;和/或携带编码(i)增强细胞毒性T淋巴细胞诱导(TRIF)和/或(ii)通过减少前列腺素E2来减少肿瘤髓源性抑制细胞(MDSC)的产物的核酸。因此,本发明提供免疫溶瘤痘苗病毒和将其应用于癌症治疗的方法。

4. 附图说明

[0010] 图1A-C. (A) 相对于WR亲本病毒显示体内肿瘤选择性的WR. Δ C12L病毒。荷载CMT-93肿瘤的C57BL/6小鼠用 5×10^8 PFU的病毒IV处理,并且,在治疗后的预定时间处死小鼠。解剖后,在均化之后,对不同组织中的病毒PFU定量。(B) WR. Δ C12L的增强的抗肿瘤作用。荷载皮下CMT-93肿瘤的小鼠用单一剂量(1×10^8 PFU)的病毒IV处理,并且随后检测存活率(定义为肿瘤体积到达 1000 mm^3 的时间,由卡尺测量来确定)。(C) 从先前用指示的病毒处理并离体暴露至WR的小鼠回收的脾细胞的IFN- γ (作为效应性T细胞生成的标志物)的生成。

[0011] 图2A-E. 痘苗病毒包膜的去糖基化。(A) 显示痘苗病毒包膜蛋白的去糖基化的免疫印迹。纯化的WR和去糖基化的WR病毒经干扰并采用抗B5R抗体进行印迹。蛋白质重量的减小对应于B5R蛋白的去糖基化。(B) 病毒包膜的去糖基化对痘苗病毒的感染性没有影响。不同的小鼠肿瘤细胞系用TK-或其去糖基化的形式以MOI为1感染,并且通过生物发光成像在感染后3小时检测病毒荧光素酶表达。采用3个独立实验的平均值+SD作图。(C) 去糖基化减少TLR2的体外活化。表达小鼠TLR2的HEK293细胞用pNiFty (TLR-信号转导报告质粒)转染。转染后24小时,细胞以MOI为1用WR或去糖基化的WR感染,并且在感染后24小时通过生物发光成像对TLR2活化定量。描述3个独立实验(以一式四份形式进行)的平均值+SD。(D) 用去糖基化的痘苗注射的小鼠的脾的淋巴细胞中消耗STAT3磷酸化。pSTAT1-pSTAT3+淋巴细胞的百分数通过流式细胞术测定。PBS和PAM (3) CSK (4) 用作对照。对不同治疗的个体小鼠和平均值 \pm SEM的值作图。(E) 痘苗包膜的去糖基化使体内肿瘤的病毒基因表达增加。随机选取荷载Renca细胞(小鼠肾腺癌)的皮下异种移植物的BALB/c小鼠,并采用单一静脉内剂量的 1×10^8 PFU/小鼠的TK-或去糖基化的TK-注射。肿瘤内的病毒基因表达动力学通过病毒荧光素酶表达的生物发光成像来监测。对12-13只动物的平均值+SD作图。*,与PBS或对照相比为显著性的, $P < 0.05$ 。#,与TK-或WR组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。 ϕ ,与PAM (3) CSK (4) 组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。

[0012] 图3A-D. 通过去糖基化融除TLR2活化导致疗效增加。(A) 采用唾液酸酶(DS)的痘病毒株WR的治疗导致体外模型中TLR2信号转导通路活化的损失(转染以表达TLR2的HEK293细胞中的NF- κ B活化)。(B) 用病毒IV递送的BALB/c小鼠,并在24小时后通过生物发光成像测定肿瘤中的病毒荧光素酶转基因表达,DS WR病毒显示对于小鼠肿瘤(4T1皮下肿瘤)的显著增强的全身性递送(N.B. 非肿瘤组织显示病毒摄取无差异)。(C) 相同模型中的抗肿瘤作用显示DS该病毒的治疗益处。(D) 在用痘苗感染后,TLR2活化的损失(TLR2敲出转基因小鼠中)导

致对抗病毒中和抗体的诱导显著减少(中和抗体检测为采用WR治疗后14天收集的小鼠血清的不同稀释物的在与WR.TK-Luc+混合之后防止病毒荧光素酶转基因表达和BSC-1细胞层的感染的能力)。

[0013] 图4A-C. (A) 代表TK-TRIF病毒的构建体的示意图,和代表TK-DAI病毒的构建体的示意图。(B) 采用ELISA试验以测定用TK-和TK-TRIF感染的细胞中的TRIF的浓度。(C) TK-DAI参照物的DAI表达的Western印迹。

[0014] 图5A-C. (A) 痘苗的TRIF表达增强I型IFN体外生成,甚至高于B18R-毒株。(B) TRIF表达增加体内CTL生成。(C) 单一IV递送 $1e8$ PFU的病毒至荷瘤皮下Renca肿瘤的BALB/c小鼠后,进一步增强的体内疗效。

[0015] 图6A-D. 表达小鼠TRIF蛋白的溶瘤痘苗病毒增强TLR-应答通路的活化和促炎性细胞因子和趋化因子的释放。(A-B) 采用TK-TRIF和TK-DAI感染之后,NF- κ B (A) 和IRF3 (B) 通路的活化。采用ELISA试验来分别测定用TK-、TK-TRIF或TK-DAI以MOI为1感染的4T1或MEF细胞的胞质和核提取物上的pIKK β 和IRF3的浓度。感染后24小时进行分析。数据以一式四份的形式获自2个独立实验,并且以倍数变化针对TK-+SD作图。虚线指示TK-活化水平。(C) TK-TRIF和TK-DAI感染之后,细胞因子和趋化因子的体外释放。在用TK-、TK-TRIF或TK-DAI (MOI为1) 感染后24小时,Renca、4T1、MC38和MEF细胞上清液中的IL-6、IP-10、TNF- α 和IFN- β 浓度通过Luminex试验评估。数据以倍数变化针对TK-+SD (2个独立实验) 的形式表示。虚线指示TK-浓度。(D) 细胞因子和趋化因子的体内瘤内浓度。带有建立的Renca皮下异种移植物的BALB/c小鼠随机分组,并用单一静脉内剂量的 1×10^8 PFU/小鼠的TK-或TK-TRIF注射。来自4-5只小鼠的倍数变化针对TK-+SD作图。虚线指示TK-浓度。*,与TK-组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。#,与TK-DAI组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。

[0016] 图7A-E. 采用ELISA试验来测定用TK-、TK-TRIF或TK-DAI以MOI为1感染的细胞中的NF- κ B (A)、HMGB1 (B) 和Hsp-70 (C) 的浓度。感染后24小时进行分析。数据经获得并以倍数变化针对TK-+SD作图。虚线指示TK-活化水平。分析响应TK-或TK-TRIF病毒的感染的辅助T细胞 (D) 和调节性T细胞 (E) 的水平。

[0017] 图8A-D. TK-TRIF和TK-DAI的复制和抗肿瘤活性。(A) 小鼠肿瘤细胞中的和TK-DAI的病毒生成。不同的肿瘤细胞系以MOI为1感染,并且在不同时间点通过空斑试验来检测病毒生成。对于各细胞系,通过进行两个独立实验,以一式四份的方式评估病毒产量。对平均值+SD作图。(B) TK-TRIF和TK-DAI的细胞毒性。细胞用指示的病毒以 $75-0.00025$ PFU/细胞的剂量感染。显示感染后第4天的 EC_{50} 值(造成细胞培养物活力减少50%所需的MOI)。对于各细胞系定量四种不同的复制物,并描述各MOI的平均值。(C-D) 病毒基因表达和体内抗肿瘤功效。分别将Renca或MC38异种移植物植入BALB/c或C57BL/6小鼠,随后,通过尾静脉,用PBS或 1×10^8 PFU的TK-、TK-TRIF或TK-DAI注射小鼠。在指示的时间点检测肿瘤中的病毒荧光素酶表达 (C) 和肿瘤体积 (D)。n=12-15只小鼠/组+SE。*,与PBS组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。#,与TK-组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。φ,与TK-DAI组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。

[0018] 图9A-F. (A) 小鼠肿瘤细胞中TK-TRIF和TK-DAI的病毒基因表达。不同的肿瘤细胞系以MOI为1感染,并且在不同时间点通过生物发光成像来对病毒荧光素酶表达定量。对于各细胞系,通过进行两个独立实验,以一式四份的方式评估荧光素酶表达。对平均值+SD作图。(B) 用TK-TRIF和TK-DAI感染后,凋亡细胞的百分比。一组小鼠肿瘤细胞系用指示的病毒

以MOI为1感染。感染后48小时,通过PI和Annexin V染色,通过流式细胞术来测定坏死和凋亡细胞的百分比。进行两个独立实验,并用平均值+SD作图。(C-D)在乳房半常位模型中,TK-TRIF促进TK-GMCSF的抗肿瘤功效。将4T1细胞植入BALB/c小鼠的乳房脂肪垫,并且,一旦肿瘤建立,即用PBS或 1×10^8 PFU的TK-、TK-TRIF或TK-GMCSF通过尾静脉注射小鼠。在指示的时间点检测肿瘤中的病毒荧光素酶表达(C)和肿瘤体积(D)。n=12-14只小鼠/组+SE。(E-F)TK-TRIF提高荷瘤小鼠的存活率。分别荷载Renca(E)或MC38(F)异种移植物的BALB/c或C57BL/6小鼠,如图3d处理,并且在肿瘤体积 $\geq 750\text{mm}^3$ 时建立终点。绘制Kaplan-Meyer存活率曲线。n=12-15只小鼠/组。*,与PBS或对照相比为显著性的, $P < 0.05$ 。#,与TK-组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。φ,与TK-GMCSF组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。ω,与TK-DAI组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。

[0019] 图10A-E。(A)静脉内给予去糖基化的TK-TRIF之后的体重变化。BALB/C小鼠用 1×10^8 PFU/小鼠的TK-、TK-TRIF或去糖基化的TK-TRIF静脉注射。在对照组中采用磷酸盐缓冲盐水(PBS)给予。病毒注射后第6天,TK-注射的小鼠显示多于10%的体重减少,而TK-TRIF和去糖基化的TK-TRIF注射的小鼠显示与用PBS注射的那些相似的体重概况。(B)给予去糖基化的TK-TRIF之后的体内病毒基因表达。将Renca肿瘤植入BALB/c小鼠,然后,小鼠用PBS或 1×10^8 PFU的TK-、TK-TRIF或去糖基化的TK-TRIF通过尾静脉注射。在指示的时间点检测肿瘤中的病毒荧光素酶表达。n=12-14只小鼠/组+SE。(C-D)用去糖基化的TK-TRIF处理的荷瘤小鼠的存活率。(C-D)分别在BALB/C或C57BL/6小鼠中建立Renca(C)或MC38(D)异种移植物,并用单一静脉内剂量的 1×10^8 PFU的指示的病毒或PBS处理。在肿瘤体积 $\geq 750\text{mm}^3$ 时建立终点,并且绘制Kaplan-Meyer存活率曲线。n=12-15只小鼠/组。(E)相较于TK-GMCSF处理,去糖基化的TK-TRIF提高存活率。小鼠(荷载皮下Renca肿瘤的BALB/c)通过尾静脉注射PBS或单一剂量的 1×10^8 PFU的TK-GMCSF或去糖基化的TK-TRIF来处理(n=10-12只/组)。在建立肿瘤体积 $\geq 750\text{mm}^3$ 的终点后获得Kaplan-Meyer存活率曲线。*,与PBS组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。#,与TK-组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。φ,与去糖基化的TK-组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。ω,与TK-TRIF组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。ψ,与TK-GMCSF组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。

[0020] 图11A-F。包膜去糖基化和小鼠TRIF表达的联合加强抗肿瘤细胞应答并显示有力的抗肿瘤功效。(A-B)对于痘苗病毒和肿瘤细胞的细胞免疫应答通过IFN- γ ELISpot试验评估。在病毒给予后第7天,从用 1×10^8 PFU的指示的病毒或PBS静脉注射的小鼠(荷载Renca异种移植物的BALB/c小鼠)收获脾,并评估识别痘苗病毒(A)或Renca细胞(B)的CTL的量。描述个体小鼠的值和平均值 \pm SEM的值。(C)血清中和抗体效价。进行中和试验以测定用 1×10^8 PFU的TK-、TK-TRIF或去糖基化的TK-TRIF注射的小鼠的循环抗痘苗抗体水平。Nabs效价通过导致感染的至少50%抑制的最高血清稀释度来确定。对个体小鼠的值和平均值 \pm SEM的值绘图。(D-E)不同的模型中的体内抗肿瘤活性。荷载Renca(D)肿瘤异种移植物的BALB/c,或荷载MC38(E)肿瘤异种移植物的C57BL/6,用单一静脉内剂量的指示的病毒(1×10^8 PFU/小鼠)处理。通过卡尺测量来跟踪肿瘤生长。描绘12-15小鼠/组的平均值+SE。(F)去糖基化的TK-TRIF显示的抗肿瘤活性高于TK-GMCSF。荷载Renca异种移植物的BALB/c小鼠用 1×10^8 PFU/小鼠剂量的TK-GMCSF或去糖基化的TK-TRIF静脉注射。对病毒给予后的相对肿瘤体积作图(n=12-15只小鼠/组+SE)。*,与PBS组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。#,与TK-组

相比为显著性的, $P < 0.05$ 。φ, 与去糖基化的TK-组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。ω, 与TK-TRIF组相比为显著性的, $P < 0.05$ 。

[0021] 图12A-C. (A) 相对于现有的临床毒株WR.TK-GM-CSF+ (作为毒株JX-594的模型), 痘苗毒株WR与DS处理, C12L缺失和mTRIF表达 (称为UPCI-1812) 在荷载4T1肿瘤的BALB/c小鼠中显示增强的抗肿瘤作用。UPCI-1812病毒还显示肿瘤微环境中免疫治疗细胞因子 (包括 (B) 干扰素γ和 (C) 白介素-12) 的生成的增加。

[0022] 图13A-C. (A) 用TK-病毒感染后分析不同的肿瘤细胞系的存活率。(B) 源自植入了某些肿瘤细胞系的BALB/c和C57BL/6小鼠的肿瘤中的病毒基因表达, 以及从用TK-感染的植入了某些肿瘤细胞系的BALB/c和C57BL/6获得的肿瘤体积。(C) 源自植入了某些肿瘤细胞系并用TK-处理的BALB/c和C57BL/6小鼠的肿瘤中的髓细胞中的磷酸化的Sp6的检测。

[0023] 图14A-B. (A) 没有荷载源自LLC或B16细胞 ($50-100\text{mm}^3$) 的肿瘤或皮下肿瘤的小鼠用 1×10^7 PFU的WR.TK-单次静脉内注射。小鼠 ($n=3$ 只/组与次) 在指示的时间处死, 并回收脾和血清。脾细胞经快速固定和渗透 (根据我们先前公开的方案), 然后经染色以供于进行磷物质流分析 (phosflow), 以检测信号转导通路的活化。对于调节性T细胞 (CD3+CD4+CD8-FoxP3+CD25+) 分析pSTAT5、pS6和Ki67; 对于CD4T细胞 (CD3+CD4+CD8-FoxP3-) 分析pS6、Ki67、CD44和CD62L; 并且对于CD8T细胞 (CD3+CD4-CD8+FoxP3-) 分析pS6、Ki67、CD44和CD62L。(B) 也检测血清中的抗病毒中和抗体水平。

[0024] 图15A-B. (A) 用TK-感染的不同的小鼠肿瘤模型中的调节性T细胞和MDSC细胞的浓度。(B) 用TK-感染的4T1和MC38小鼠肿瘤模型中的调节性T细胞、MDSC细胞和CD8+T细胞的浓度。

[0025] 图16A-B. (A) 显示用于检测脾细胞或从崩解的肿瘤回收的细胞的MDSC (左) 和T细胞和T-reg (右) 的门选策略。(B) 显示荷载不同的肿瘤的小鼠的脾中的MDSC和T-reg的水平。

[0026] 图17A-C. (A) 在基线处显示高水平的MDSC的小鼠肿瘤模型中, TK-痘苗毒株显示极差的增加中值存活率 (相对于PBS对照) 的能力。并且, TK-病毒治疗能够降低 (B) 经处理的肿瘤中的T-reg的水平, 但对 (C) MDSC水平没有影响。

[0027] 图18. 植入了MC38肿瘤细胞的小鼠在用免疫原性痘苗毒株GM-CSF、WR.TK-GM-CSF、WR.B18R-IFNα+、WR.B18R-IFNβ+和WR.B18R-IFNγ+处理之后的小鼠中的免疫应答的分析, 与由TK-感染引发的免疫应答做比较。

[0028] 图19. 植入了4T1肿瘤细胞的小鼠在用免疫原性痘苗毒株GM-CSF、WR.TK-GMCSF和WR.B18R-IFNβ+处理之后的小鼠中的免疫应答的分析, 与由TK-感染引发的免疫应答做比较。

[0029] 图20. 在WR-TK-HPGD表达后或Cox 2抑制剂塞来昔布处理后的COX2和HPGD表达。检测B肌动蛋白作为上样对照。测定在用WR-TK-HPGD或WR TK-感染后或塞来昔布处理后的Renca细胞中的PGE2的表达。

[0030] 图21A-D. 溶瘤痘苗的HPGD表达降低了肿瘤中的MDSC, 并且使耐性肿瘤对于病毒治疗敏化。(A) HPGD表达对肿瘤中T-reg和MDSC水平的作用。荷载Renca肿瘤的小鼠通过瘤内低剂量 (1×10^7 PFU) 注射指示的病毒来处理, 小鼠在指示的时间处死, 回收肿瘤, 使之崩解并如前所述通过流式细胞术分析。HPGD表达减少MDSC和T-reg水平 (* $p < 0.05$, 相比对照)。(B) WR.TK-.HPGD+增强的治疗活性。荷载皮下Renca或MC38肿瘤的小鼠通过单次瘤内注射PBS或

1×10^7 PFU或WR.TK-或WR.TK-HPGD+来处理,并且通过卡尺测量来监测后续肿瘤生长($n=15$ 只/组;WR.TK-HPGD+从第3天(RENCA)或第7天(MC38)显著($p<0.05$)延迟肿瘤生长,与WR.TK-做比较,并导致3例对于RENCA的完全应答和2例对于MC38的完全应答。任何其它组中没有小鼠显示CR)。(C) WR.TK-.HPGD+治疗的肿瘤生长和病毒基因表达的比较。对具有Renca肿瘤和用WR.TK-HPGD+处理的个体小鼠的肿瘤生长绘图,与PBS对照(灰色短线)做比较,并分成佳(实线)和最佳(虚线)应答物。第1天和第5天的肿瘤的生物发光信号(病毒基因表达)针对肿瘤体积标准化,并显示佳与最佳应答物的数据。(D) HPGD表达不减少病毒基因表达。显示用WR.TK-或WR.TK-HPGD+处理后24小时的肿瘤中的病毒荧光素酶基因表达。

[0031] 图22. 肿瘤体积与用PBS对照(CTL;圆形)、胸苷激酶阴性西部保留地(Western Reserve) VV(WR TK-;方形)或携带HPGD的胸苷激酶(TK)阴性西部保留地VV(WR TK-HPGD,三角形)处理后天数的关系,(HPGD是人15-PGDH蛋白质的鼠等同物)。

[0032] 图23A-D. (A)用WR TK-感染的小鼠的脾;(B)用WR TK-HPGD感染的小鼠的脾;(C)用WR TK-感染的小鼠的肿瘤;和(D)用WR TK-HPGD感染的小鼠的肿瘤中的%MDSC。

[0033] 图24A-D. HPGD表达增强免疫应答并改变免疫细胞向肿瘤运输。(A)不同的治疗后的肿瘤中的细胞因子和趋化因子概况。荷载RENCA肿瘤的小鼠按照指示采用 1×10^7 PFU的不同的病毒毒株IT处理,并在3天后处死。用肿瘤匀质物进行Luminex试验以定量不同的细胞因子和趋化因子($*p<0.05$)。(B)抗肿瘤CTL应答随HPGD表达增加。在指示的处理后七天,对从荷载RENCA肿瘤的小鼠收集的脾细胞定量抗肿瘤CTL应答,由ELISPOT($*p<0.06$)确定。(C)不同的治疗之后,趋化因子水平的全身性变化。在指示的处理3天之后,对从荷载RENCA肿瘤的小鼠收集的血清定量趋化因子水平,定量通过ELISA($p<0.05$)进行。(D)活化的免疫细胞优先靶向用表达HPGD的病毒感染的肿瘤。小鼠用双侧RENCA肿瘤植入,并且当这些肿瘤达到 $50-100\text{mm}^3$ 时,其用 1×10^7 PFU的WR.TK-在一侧注射,并用WR.TK-HPGD+在相反的一侧注射,在24小时之后,通过尾静脉注射递送 1×10^7 个活化的和Cy5.5标记的NK T(CIK)细胞。24小时后,小鼠经生物发光(病毒基因表达)和荧光(运输至肿瘤的NK T细胞)($*p<0.05$)成像。显示代表性的荧光成像示例。

[0034] 图25.用WR.TK-感染的肿瘤中的COX2表达,与未处理的肿瘤做比较。

[0035] 图26A-B. (A)用TK-感染后,不同的细胞系的存活率。(B)不同的肿瘤细胞系中的病毒生成和基因表达。

[0036] 图27说明TK-感染的MC-38、LLC和AB12小鼠肿瘤模型在感染后第4天或第5天的病毒基因表达。

[0037] 图28.肿瘤生长与采用PBS或用去糖基化的WR.TK-TRIF+- (UPCI-1812)、携带HPGD的西部保留地TK- (VV-HPGD)或与HPGD表达联合的UPCI-1812的感染处理后天数的关系。

[0038] 图29.增强的EEV生成(A34R突变K151E)导致减少的抗病毒中和抗体(IP递送WR或EEV之后14天)。

[0039] 图30. TRIF结构域。人TRIF氨基酸序列中存在三个TRAF结合结构域和结合RIP1的RHIM结构域。

[0040] 5. 发明详述

[0041] 为了清楚说明而非限制本公开,将本发明分为以下小章节详细描述。

[0042] (i) 病毒主链突变;

- [0043] (ii) 病毒糖基化的修饰;
- [0044] (iii) 促进T细胞应答的修饰;
- [0045] (iv) 抑制免疫抑制的修饰;
- [0046] (v) 增强病毒传播和活性的修饰;
- [0047] (vi) 修饰的病毒;
- [0048] (vii) 治疗的方法;和
- [0049] (viii) 试剂盒。

[0050] 本文中所述的术语“同源性”,指的是采用本领域已知的方法确定的核酸或氨基酸序列之间的同源性,所述方法例如但不限于,软件例如BLAST或FASTA。

[0051] 5.1病毒主链突变

[0052] 在本发明的某些非限制性实施方式中,VV包含其基因组的一种或多种突变,所述突变有利于病毒在癌细胞中的复制,和/或增加对细胞毒性T-淋巴细胞(CTL)免疫应答的诱导。突变可以是本土病毒的一个或多个核酸的插入、缺失或取代。

[0053] 在具体的非限制性实施方式中,突变导致功能性白介素-18结合蛋白(“IL-18BP”)表达减少。作为非限制性示例,(i)所述突变可导致蛋白质与IL-18的结合比本土VV蛋白质弱;(ii)所述突变可导致截短的蛋白质以减少或丧失功能性活性的方式表达;或(iii)所述突变可删去IL-18BP基因。在特定的非限制性实施方式中,所述突变可以是C12L缺失(例如,参见Symons等,2002,J.Gen.Virol.83:2833-2844)。在某些实施方式中,C12L缺失可以是C12L的完全或部分缺失。例如但不限于,C12L的部分缺失可包括导致C12L蛋白质的氨基酸序列的至少约10%、至少约20%、至少约30%或至少约40%或更多的缺失的突变。

[0054] 在其它非限制性实施方式中,病毒主链可以,单独地或连同上述编码IL-18BP的核酸中的一种或多种突变(包括该核酸的缺失),在编码如下分子的核酸中包含突变:B8R(IFN γ 结合蛋白;例如参见Symons等,1995,Cell.81(4):551-60)、B18R(I型IFN结合蛋白;例如参见Colamonici等,1995,J.Biol.Chem.270(27):15974-8)、A35R(MHC II呈递的抑制剂;例如参见Rehm等,2010,Virology.397(1):176-86和Roper等,2006,J.Virol.80(1):306-13)、B15R(IL-1 β 结合蛋白;例如参见Alcami等,1992,Cell.71(1):153-67)、趋化因子结合蛋白(B29R、G3R、H5R)、STAT1抑制剂(H1L);dsRNA或PKR抑制剂,例如E3L(例如参见Chang等,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.89(11):4825-9)或K3L(例如参见Davies等,1993,J.Virol.67(3):1688-92和Langland等,2002,Virology.299(1):133-41);Bcl-2样蛋白(例如N1、N2、B14、F1、C6、A46和K7),或其组合。

[0055] 5.2病毒糖基化的修饰

[0056] 在本发明的某些非限制性实施方式中,VV用修饰糖基化的试剂处理。例如,可对产生VV的细胞给予糖基化抑制剂和/或在糖基化抑制剂的存在下培养或VV可用减少或移除或修饰糖基化的试剂处理。在某些实施方式中,VV可经历酸处理以减少病毒的糖基化。在某些实施方式中,本发明的VV可在(例如,因一种或多种糖基化酶中的突变)不具有糖基化功能的细胞系中生成。

[0057] 在某些实施方式中,用减少或移除或修饰糖基化的试剂处理的VV,例如,去糖基化的病毒的糖基化可以是未用修饰糖基化的试剂处理的VV的糖基化的少于约90%、少于约80%、少于约70%、少于约60%、少于约50%、少于约40%、少于约30%、少于约20%或少于

约10%。

[0058] 在具体的非限制性实施方式中,本发明的VV可用从病毒表面(例如,包膜)减少或移除唾液酸残基的唾液酸酶处理。在非限制性实施方式中,所述VV在给予对象之前用唾液酸酶处理。在具体的非限制性实施方式中,所述唾液酸酶是唾液酸酶A酶(Glyko唾液酸酶A,编号WS0042),例如,作为Glycopro酶促去糖基化试剂盒(产品编号:GK80110,Prozyme)的部分。在某些实施方式中,所述VV可用唾液酸酶A和N-与O-聚糖酶联合处理。从所述病毒移除唾液酸或切割糖基残基的其它酶也可用于本发明,包括但不限于神经氨酸苷酶、PNG酶(例如,PNG酶A或PNG酶F)、 β 1-4半乳糖苷酶、 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶,或应用化学处理,例如b-消除或碱或胍基。不限于任何具体理论,据信痘苗病毒的糖基化的减少,例如通过唾液酸酶处理,能够减少TLR2活化,由此延迟病毒递送过程中的全身性免疫活化和/或减少抗病毒中和抗体的生成。

[0059] 5.3促进T细胞应答的修饰

[0060] 在本发明的某些非限制性实施方式中,VV经修饰以包含编码促进T细胞应答的肽或蛋白质的一种或多种核酸。在某些实施方式中,所述促进T细胞应答的肽或蛋白质能够促进一种或多种促炎性细胞因子的表达。例如但不限于,促炎性细胞因子可包括IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、CCL5和IP-10。

[0061] 促进T细胞应答的肽或蛋白质的非限制性示例包括诱导IFN- β (“TRIF”)或其功能结构域的含Toll/IL-1R结构域的适体。在某些非限制性实施方式中,所述核酸可编码人TRIF,所述人TRIF具有UniProtKB第Q8IUC6号所示的氨基酸序列,或与其具有至少约90%、至少约95%或至少约98%同源性的氨基酸序列,或可编码鼠TRIF,所述鼠TRIF具有UniProtKB第Q80UF7号所示的氨基酸序列,或与其具有至少约90%、至少约95%或至少约98%的同源性的氨基酸序列。

[0062] 在某些非限制性实施方式中,所述核酸可编码如图30所示的一种或多种TRIF结构域。在某些实施方式中,可将编码促进T细胞应答的肽或蛋白质(例如,TRIF)的核酸克隆进入图4A所示的病毒的胸苷激酶(TK)基因的基因座。编码促进T细胞应答的肽或蛋白质的核酸可操作性地连接至可导致该核酸表达的任何启动子。本文中所述的,“操作性地连接”表示,启动子处于正确的功能性位置和/或与核酸序列相关的方向,以控制该序列的转录起始和/或表达。在某些实施方式中,所述启动子是痘苗启动子和/或合成的痘苗启动子。在某些实施方式中,所述启动子是合成的痘苗启动子pSE/L。在某些实施方式中,编码促进T细胞应答的肽或蛋白质的核酸操作性地连接至病毒p7.5启动子。

[0063] 在其它非限制性的实施方式中,所述核酸可编码粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、IL-12、IFN- γ 或IL-18。在某些实施方式中,可将多于一种所述核酸纳入VV。

[0064] 5.4抑制免疫抑制的修饰

[0065] 在本发明的某些非限制性实施方式中,VV经修饰以包含编码抑制或减少免疫抑制的肽或蛋白质或核糖核酸或微小RNA的一种或多种核酸。免疫抑制的检测的非限制性示例包括:髓源性抑制细胞(“MDSC”)的水平;M2巨噬细胞的水平;和辅助T细胞相对抑制物调节性T细胞的水平。在具体的非限制性实施方式中,所述核酸编码减少前列腺素E2活性的肽或蛋白质或核糖核酸或微小RNA(“PGE2拮抗剂”)。在特定的非限制性实施方式中,所述核酸编码作为降解PGE2的PGE2拮抗剂(如本文所用的术语)的肽和/或蛋白质。在特定的非限制性

实施方式中,降解PGE2的蛋白质是15-PGDH(人)或HPGD(小鼠)。例如但不限于,15-PGDH可具有UniProtKB第P15428号所示的氨基酸序列,或与其具有至少约90%、至少约95%或至少约98%同源性的氨基酸序列,和,编码15-PGDH的核酸可具有GenBank登录号U63296.1所示的核酸序列,或与其具有至少约90%、至少约95%或至少约98%同源性的核酸序列。在其它非限制性实施方式中,编码PGE2的胞外受体的分泌或溶解形式的核酸可包含在VV中,例如,编码EP1、EP2、EP3和/或EP4的核酸,其中EP3和4具有较高亲和力。在某些实施方式中,抑制或减少免疫抑制的一种或多种肽或蛋白质可导致一种或多种抑制性趋化因子(例如但不限于,CXCL12)的表达的减少。在某些实施方式中,抑制或减少免疫抑制的一种或多种肽或蛋白质可导致一种或多种免疫活化趋化因子(例如但不限于,CXCL9、CXCL10和CCL5)的表达的增加。

[0066] 在某些实施方式中,编码PGE2拮抗剂的核酸可被克隆进入所述病毒的胸苷激酶(TK)基因的基因座。编码PGE2拮抗剂的核酸肽或蛋白质可操作性地连接至可导致所述核酸的表达的任何启动子。在某些实施方式中,编码PGE2拮抗剂的核酸肽或蛋白质操作性地连接至病毒p7.5启动子。在某些实施方式中,所述启动子是痘苗启动子和/或合成的痘苗启动子。在某些实施方式中,所述启动子是合成的痘苗启动子pSE/L。在某些实施方式中,所述病毒可包含编码PGE2拮抗剂的核酸和编码促进T细胞应答的肽或蛋白质的核酸,所述核酸均操作性地连接至启动子,例如,病毒p7.5启动子,并被克隆进入所述病毒的胸苷激酶(TK)基因的基因座。

[0067] 在其它非限制性实施方式中,本发明的免疫溶瘤病毒可与抑制或减少MDSC的试剂一同给予,例如,包括但不限于,靶向MDSC的表面标志物的抗体,例如,抗CD33抗体或其可变区;抗CD11b抗体或其可变区;COX2抑制剂,例如,塞来昔布;舒尼替尼和/或所有反式维甲酸(例如,参见Najjar和Finke,2013,Frontiers in Oncology,3(49)1-9)。

[0068] 5.5增强病毒传播和活性的修饰

[0069] 在本发明的某些非限制性实施方式中,VV经修饰以增强病毒的传播和/或活性。在具体的非限制性实施方式中,VV经修饰以增加产生的胞外包膜形式的病毒的量,例如,通过引入如下突变中的一种或多种:A34R Lys151至Glu;B5R的完全或部分缺失;A36R的突变/缺失,和/或A56R的突变/缺失。在某些实施方式中,VV经修饰以包含B5R的完全或部分缺失。

[0070] 5.6修饰的病毒

[0071] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种免疫溶瘤VV,其包含如下修饰中的一种或多种,或两种或更多种,或三种或更多种,或四种或更多种,如上文部分所述:

[0072] (i) 病毒主链突变;

[0073] (ii) 病毒糖基化的修饰;

[0074] (iii) 促进T细胞应答的修饰;

[0075] (iv) 抑制免疫抑制的修饰;和/或

[0076] (v) 增强病毒传播和活性的修饰。

[0077] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其包含病毒糖基化的修饰和如下修饰中的一种或多种,如上文部分所述:

[0078] (i) 病毒主链突变;

[0079] (ii) 促进T细胞应答的修饰;

[0080] (iii) 抑制免疫抑制的修饰;和/或

[0081] (iv) 增强病毒传播和活性的修饰。

[0082] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前采用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,并且包含或携带或含有如下修饰中的一种或多种,如上文部分所述:

[0083] (i) 病毒主链突变;

[0084] (ii) 促进T细胞应答的修饰;

[0085] (iii) 抑制免疫抑制的修饰;和/或

[0086] (iv) 增强病毒传播和活性的修饰。

[0087] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,唾液酸化),并且包含或携带或含有如下修饰中的一种或多种,如上文部分所述:

[0088] (i) 病毒主链突变;

[0089] (ii) 促进T细胞应答的修饰;

[0090] (iii) 抑制免疫抑制的修饰;和/或

[0091] (iv) 增强病毒传播和活性的修饰。

[0092] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量的试剂处理,或相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化。

[0093] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用唾液酸酶处理,或相对于未修饰的病毒具有减少的唾液酸残基。

[0094] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其包含或携带或含有编码TRIF的核酸。

[0095] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其包含或携带或含有编码PGE2拮抗剂(例如,15-PGDH或HPGD)的核酸。

[0096] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其包含增强病毒传播和活性的选自下组的一种或多种修饰:A34R Lys151至Glu突变;B5R的完全或部分缺失;A36R的突变/缺失,和/或A56R的突变/缺失。

[0097] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其包含选自下组的一种或多种病毒主链修饰:减少功能性IL-18BP的表达的突变(例如,C12L缺失)、B8R缺失、B18R缺失、A35R缺失,或其组合。

[0098] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量的试剂处理,或相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化,并且还包含或携带或含有编码TRIF或其功能结构域的核酸。

[0099] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含或携带或含有编码PGE2拮抗剂(例如,15-PGDH或HPGD)的核酸。

[0100] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或与未修饰的病毒相比具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含或携带或含有编码TRIF或其功能结构域的核酸,和/或编码PGE2拮

抗剂(例如,15-PGDH或HPGD)的核酸。

[0101] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含增强病毒传播和活性的选自下组的一种或多种修饰:A34R Lys151至Glu突变;B5R的完全或部分缺失;A36R的突变/缺失,和/或A56R的突变/缺失。在某些实施方式中,本发明提供一种去糖基化的VV,其包含B5R的完全或部分缺失。

[0102] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含选自下组的一种或多种病毒主链修饰:减少功能性IL-18BP的表达的突变(例如,C12L缺失)、B8R缺失、B18R缺失、A35R缺失,或其组合。在某些实施方式中,本发明提供一种去糖基化的VV,其包含C12L缺失。

[0103] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含选自下组的一种或多种病毒主链修饰:减少功能性IL-18BP的表达的突变(例如,C12L缺失)、B8R缺失、B18R缺失、A35R缺失,或其组合,并且还包含增强病毒传播和活性的选自下组的一种或多种修饰:A34R Lys151至Glu突变;B5R的完全或部分缺失;A36R的突变/缺失,和/或A56R的突变/缺失。在某些实施方式中,本发明提供去糖基化的VV,其包含C12L缺失和B5R缺失。

[0104] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含或携带或含有编码TRIF或其功能结构域的核酸,并且还包含选自下组的一种或多种病毒主链修饰:减少功能性IL-18BP的表达的突变(例如,C12L缺失)、B8R缺失、B18R缺失、A35R缺失,或其组合。在某些实施方式中,所述病毒包含C12L缺失。

[0105] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含或携带或含有编码PGE2拮抗剂(例如,15-PGDH或HPGD)的核酸,并且还包含选自下组的一种或多种病毒主链修饰:减少功能性IL-18BP的表达的突变(例如,C12L缺失)、B8R缺失、B18R缺失、A35R缺失,或其组合。

[0106] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种TK-VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含或携带或含有编码TRIF或其功能结构域的核酸,和编码PGE2拮抗剂(例如,15-PGDH或HPGD)的核酸,并且还包含选自下组的一种或多种病毒主链修饰:减少功能性IL-18BP的表达的突变(例如,C12L缺失)、B8R缺失、B18R缺失、A35R缺失,或其组合。

[0107] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含或携带或含有编码TRIF或其功能结构域的核酸,并且还包含增强病毒传播和活性的选自下组的一种或多种修饰:A34R Lys151至Glu突变;B5R的

完全或部分缺失;A36R的突变/缺失,和/或A56R的突变/缺失。

[0108] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含或携带或含有编码PGE2拮抗剂(例如,15-PGDH或HPGD)的核酸,并且还包含增强病毒传播和活性的选自下组的一种或多种修饰:A34R Lys151至Glu突变;B5R的完全或部分缺失;A36R的突变/缺失,和/或A56R的突变/缺失。

[0109] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含或携带或含有编码TRIF或其功能结构域的核酸和编码PGE2拮抗剂(例如,15-PGDH或HPGD)的核酸,并且还包含增强病毒传播和活性的选自下组的一种或多种修饰:A34R Lys151至Glu突变;B5R的完全或部分缺失;A36R的突变/缺失,和/或A56R的突变/缺失。

[0110] 在非限制性实施方式中,本发明提供一种VV,其在给予宿主之前用减少糖基化的量(例如,唾液酸化)的试剂处理,或在其它情况中相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化),并且还包含或携带或含有编码TRIF或其功能结构域的核酸和编码PGE2拮抗剂(例如,15-PGDH或HPGD)的核酸,并且还包含增强病毒传播和活性的选自下组的一种或多种修饰:A34R Lys151至Glu突变;B5R的完全或部分缺失;A36R的突变/缺失,和/或A56R的突变/缺失,并且包含选自下组的一种或多种病毒主链修饰:减少功能性IL-18BP的表达的突变(例如,C12L缺失)、B8R缺失、B18R缺失、A35R缺失,或其组合。在某些实施方式中,所述病毒包含C12L缺失。在某些实施方式中,所述VV可包含C12L缺失和B5R缺失。

[0111] 上述修饰可在本领域已知的VV(痘苗病毒)中产生。非限制性示例包括:西部保留地毒株、哥本哈根毒株;怀斯(NYCBOH)毒株;天坛毒株;或USSR毒株(并且参见下文参考文献1和2)。如本文所示修饰的基础VV毒株本身可包含相对于其亲本毒株的一种或多种突变,例如但不限于,如下所示的一种或多种:TK中的缺失(即,本文中称为“TK-”);VGF中的缺失;SPI-1缺失;和/或SPI-2缺失。

[0112] 在某些非限制性实施方式中,本发明提供具有如下修饰的VV:

[0113] (i) 相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;

[0114] (ii) 编码TRIF或其功能结构域的核酸;和/或

[0115] (iii) 编码15-PGDH或其功能结构域的核酸。

[0116] 在非限制性实施方式中,本发明提供具有如下修饰的VV:

[0117] (i) 相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;

[0118] (ii) 编码TRIF或其功能结构域的核酸;

[0119] (iii) 编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;和/或

[0120] (iv) C12L缺失。

[0121] 在非限制性实施方式中,本发明提供具有如下修饰的VV:

[0122] (i) 相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;

[0123] (ii) 编码TRIF或其功能结构域的核酸;

[0124] (iii) 编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;

[0125] (iv) C12L缺失;和/或

[0126] (v) B5R缺失。

[0127] 在某些非限制性实施方式中,本发明提供具有如下修饰的VV:

[0128] (i) TK缺失;

[0129] (ii) 相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;

[0130] (iii) 编码TRIF或其功能结构域的核酸;和/或

[0131] (iv) 编码15-PGDH或其功能结构域的核酸。

[0132] 在非限制性实施方式中,本发明提供具有如下修饰的VV:

[0133] (i) TK缺失;

[0134] (ii) 相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;

[0135] (iii) 编码TRIF或其功能结构域的核酸;

[0136] (iv) 编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;和/或

[0137] (v) C12L缺失。

[0138] 在非限制性实施方式中,本发明提供具有如下修饰的VV:

[0139] (i) TK缺失;

[0140] (ii) 相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;

[0141] (iii) 编码TRIF或其功能结构域的核酸;

[0142] (iv) 编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;

[0143] (v) C12L缺失;和/或

[0144] (vi) B5R缺失。

[0145] 5.7治疗的方法

[0146] 本发明提供减少癌细胞生长的所述方法包括:给予对象的癌细胞有效量的免疫溶瘤VV,如上所述。癌细胞生长的减少可通过如下方式显示,例如,通过细胞死亡或较慢的复制速率或含所述细胞的肿瘤减慢的生长速率,或含癌细胞对象的存活的延长。

[0147] “对象”或“患者”在本文中可互换使用,指人或非人对象。非人对象的非限制性示例包括非人灵长类、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猪、家禽、马、牛、山羊、绵羊等。

[0148] 本发明提供减少肿瘤生长的方法,所述方法包括:给予所述肿瘤有效量的免疫溶瘤VV,如上所述。肿瘤生长的减少可通过如下方式显示,例如,通过生长速率的降低,或含所述肿瘤的对象存活的延长。

[0149] 本发明提供治疗患癌对象的方法,所述方法包括:给予所述对象有效量的免疫溶瘤VV,如上所述。

[0150] 所述方法中,“有效量”包括使癌症的生长速率或传播减小,或使对象的存活延长的量。在某些实施方式中,有效量可包括足以在对象中产生抗癌作用的量。

[0151] 本文中所用的“抗癌作用”,指的是如下情况中的一种或多种:聚集癌细胞质量的减少、癌细胞生长速率的降低、癌细胞增殖的减少、肿瘤质量减小、肿瘤体积减小、肿瘤细胞增殖减少、肿瘤生长速率减小和/或肿瘤转移减少。

[0152] 在某些实施方式中,本发明提供在患癌对象中产生抗癌作用的方法,所述方法包括给予所述对象,有效量的免疫溶瘤VV,如上所述。

[0153] 在特定的非限制性实施方式中,给予的VV的量(例如,剂量)可以是约 10^3 - 10^{11} 空斑形成单位(PFU),或约 10^5 - 10^{10} PFU,或约 10^5 - 10^8 PFU,或约 10^5 - 10^{11} PFU或约 10^8 - 10^{11} PFU。还参

见Thorne和Kirn,2009,Nat Rev Cancer 9:64-71。注意,本文中 10^x 也可替代性地表示为 $1e^x$ 。在某些实施方式中,溶瘤病毒可以单一剂量给予,或可以多重剂量给予。在其中病毒以多重剂量给予的某些实施方式中,所述剂量可依次给予,例如,采用每天一次、每周一次或每月一次的间隔,或根据对象的具体需求而定。

[0154] 在某些实施方式中,所述免疫溶瘤病毒可在药物组合物中给予,其中所述病毒以有效量存在,并和药学上可接受的载体联用。本文中所用的“药学上可接受的”包括不与活性成分的生物学活性的有效性造成干扰和/或对所给予的患者不具毒性的任何载体。合适的药物载体的非限制性示例包括,磷酸盐缓冲的盐水溶液、水、乳液、例如油/水乳液、不同类型的润湿剂和无菌溶液。药学上相容的载体的其它非限制性示例可包括,凝胶、生物可吸附基质材料、包含所述溶瘤VV的植入元件,或任何其它合适的载剂、递送或分配器具或材料。所述载体可通过常规方法配制,并可以有效量给予所述对象。

[0155] 本发明的VV可通过本领域技术人员已知的方法产生。在某些实施方式中,所述VV可在合适的宿主细胞中传送,从宿主细胞分离,并贮存在有利于所述病毒的稳定性和完整性的条件下,从而使随时间发生的感染性的损失最小化。例如,所述VV可通过冷冻或干燥贮存,例如,通过冻干贮存。在某些实施方式中,在给予之前,该贮存的VV可经重建(如果经干燥用于贮存),并在药学上可接受的载体中稀释,供于给予。

[0156] 所述溶瘤病毒可采用标注给予方法给予对象。在某些非限制性实施方式中,所述溶瘤病毒可全身性地给予。或者或此外,所述溶瘤病毒可通过在癌症位点,例如,肿瘤位点注射来给予。例如但不限于,给予的途径可以是吸入、鼻内、静脉内、动脉内、鞘内、瘤内、腹膜内、肌肉内、皮下、局部、皮内、局部区域性、经口给予,或其组合。在某些实施方式中,所述溶瘤病毒可从植入患者的源给予所述患者。在某些实施方式中,所述溶瘤病毒的给予可通过在选定时间段内连续输注来实现。在某些实施方式中,药物组合物可直接给予肿瘤位点,例如,通过直接瘤内注射给予。

[0157] 可通过免疫溶瘤VV治疗的癌症包括但不限于,腺癌、骨肉瘤、宫颈癌、黑素瘤、肝细胞癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、白血病、淋巴瘤、肾癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、十二指肠癌、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤和肉瘤。

[0158] 在某些实施方式中,采用免疫溶瘤VV的治疗,如上所述,可单独使用或与一种或多种抗癌剂联用。本文中所用的“抗癌剂”可以是具有抗癌作用的任何分子、化合物、化学品或组合物。抗癌剂包括但不限于,化疗剂、放疗剂、细胞因子、免疫检验点抑制剂、抗血管生成剂、凋亡诱导剂、抗癌抗体和/或抗细胞周期蛋白依赖性激酶试剂。

[0159] 在某些实施方式中,采用免疫溶瘤VV的治疗可单独使用或与一种或多种免疫调节剂联用。免疫调节剂可包括能够抑制与肿瘤或癌症相关的抗病毒免疫力的任何化合物,分子或物质。在某些实施方式中,所述免疫调节剂能够抑制对于所述溶瘤病毒的先天免疫力和/或适应性免疫力。免疫调节剂的非限制性示例抗CD33抗体或其可变区、抗CD11b抗体或其可变区、COX2抑制剂,例如,塞来昔布,细胞因子,例如IL-12、GM-CSF、IL-2、IFN β 和IFN γ ,和趋化因子,例如MIP-1、MCP-1和IL-8。在某些实施方式中,所述免疫调节剂包括免疫检验点抑制剂,例如但不限于,抗CTLA4、抗PD-1、抗PDL1和TLR激动剂(例如,多聚I:C)。

[0160] 本文中所用的“与……联用”指的是,将免疫溶瘤VV和一种或多种试剂给予对象,作为治疗方案或计划的一部分。在某些实施方式中,以联用方式使用并不意味着免疫溶瘤

VV和一种或多种试剂在给予之前必须物理合并,或其相同的时间阶段给予。例如但不限于,所述免疫溶瘤VV和一种或多种试剂可一起给予待治疗的对象,或可在相同时间或在不同时间点以任何顺序依次给予。

[0161] 在某些实施方式中,治疗患癌对象的方法包括给予所述对象有效量的免疫溶瘤VV,其包含:(i)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(ii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;和(iii)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸。

[0162] 在某些实施方式中,治疗患癌对象的方法包括给予所述对象有效量的免疫溶瘤VV,其包含:(i)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(ii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;(iii)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸,和(iv)C12L缺失。

[0163] 在某些实施方式中,治疗患癌对象的方法包括给予所述对象有效量的免疫溶瘤VV,其包含:(i)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(ii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;(iii)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;(iv)C12L缺失;和(v)B5R缺失。

[0164] 在某些实施方式中,治疗患癌对象的方法包括给予所述对象有效量的免疫溶瘤VV,其包含:(i)TK缺失;(ii)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(iii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;和(iv)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸。

[0165] 在某些实施方式中,治疗患癌对象的方法包括给予所述对象有效量的免疫溶瘤VV,其包含:(i)TK缺失;(ii)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(iii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;(iv)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;和(v)C12L缺失。

[0166] 在某些实施方式中,治疗患癌对象的方法包括给予所述对象有效量的免疫溶瘤VV,其包含:(i)TK缺失;(ii)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(iii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;(iv)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;(v)C12L缺失;和(vi)B5R缺失。

[0167] 在某些实施方式中,本发明的方法还可包括:给予所述对象有效量的一种或多种试剂。例如,但不限于,所述试剂可以是抗癌剂和/或免疫调节剂,如上所述。

[0168] 5.8试剂盒

[0169] 本发明还提供试剂盒,所述试剂盒提供如上所述的免疫溶瘤VV。在某些实施方式中,本发明的试剂盒可包含免疫溶瘤VV或含有上述免疫溶瘤VV的药物组合物。在某些实施方式中,本发明的试剂盒还可包含一种或多种组分,例如使用说明书、装置和其它试剂及组分,例如用于进行本文所述方法的管、容器或注射器。在某些实施方式中,本发明的试剂盒还可包含能与免疫溶瘤VV联合给予的一种或多种试剂,例如,抗癌剂和/或免疫调节剂。

[0170] 在某些实施方式中,本发明的试剂盒可包含使用说明书,用于将免疫溶瘤VV给予对象的装置,或用于将其它试剂或化合物给予对象的装置。例如,但不限于,所述说明书可包含对于所述免疫溶瘤VV的说明,并且,任选地,对于该试剂盒中所含的其它组分和给予方法的说明,所述给予方法包括用于确定对象的合适状态、合适剂量的方法和用于给予所述免疫溶瘤VV的合适给予方法。说明书还可包括用于在治疗期间监测对象的指南。

[0171] 在某些实施方式中,本发明的试剂盒可包含将免疫溶瘤VV给予对象的装置。用于给予药物和药物组合物的本领域已知的多种装置中的任一种都可包含在本发明提供的试剂盒中。例如但不限于,所述装置包括,皮下注射用针头、静脉内针头、导管、无针注射装置、吸入器和液体分配器,例如,点眼药器。在某些实施方式中,待全身(例如通过静脉内注射)递送的免疫溶瘤VV可与皮下注射用针头和注射器一同包含在试剂盒中。

[0172] 在某些实施方式中,本发明的试剂盒包含有效量的免疫溶瘤VV,所述免疫溶瘤VV包含:(i)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(ii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;和(iii)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸。

[0173] 在某些实施方式中,本发明的试剂盒包含有效量的免疫溶瘤VV,所述免疫溶瘤VV包含:(i)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(ii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;(iii)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸,和(iv)C12L缺失。

[0174] 在某些实施方式中,本发明的试剂盒包含有效量的免疫溶瘤VV,所述免疫溶瘤VV包含:(i)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(ii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;(iii)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;(iv)C12L缺失;和(v)B5R缺失。

[0175] 在某些实施方式中,本发明的试剂盒包含有效量的免疫溶瘤VV,所述免疫溶瘤VV包含:(i)TK缺失;(ii)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(iii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;和(iv)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸。

[0176] 在某些实施方式中,本发明的试剂盒包含有效量的免疫溶瘤VV,所述免疫溶瘤VV包含:(i)TK缺失;(ii)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(iii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;(iv)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;和(v)C12L缺失。

[0177] 在某些实施方式中,本发明的试剂盒包含有效量的免疫溶瘤VV,所述免疫溶瘤VV包含:(i)TK缺失;(ii)相对于未修饰的病毒具有减少的糖基化(例如,减少的唾液酸化)的包膜;(iii)编码TRIF或其功能结构域的核酸;(iv)编码15-PGDH或其功能结构域的核酸;(v)C12L缺失;和(vi)B5R缺失。

[0178] 提供以下实施例来更完整地说明本发明,但其不意在限制本发明的保护范围。

[0179] 6. 实施例1:主链突变C12L的作用

[0180] 西部保留地胸苷激酶阴性(“TK-”)痘苗病毒(VV)经修饰以删去C12L。西部保留地痘苗毒株获自BEI资源(弗吉尼亚州马纳萨斯),并且所使用或构建的所有重组痘苗病毒均基于该毒株。

[0181] 缺乏40%的C12L ORF的病毒缺失突变体采用瞬时优势选择构建(Falkner和Moss, 1990, *J Virol.* 64 (6):3108-3111)。细胞用野生型痘苗WR感染,并且同时用包含C12L基因的3'和5'区域的质粒转染。允许发生重组,并采用可选择标志物以确定重组事件。通过对BSC-1细胞进行空斑试验来测定病毒的效价,其按先前所述的方式制造和纯化用于体内应用(Sampath,P等(2013) *Mol. Ther.*, 21:620-628)。

[0182] 对荷载CMT-93肿瘤的C57BL/6小鼠给予 5×10^8 空斑形成单位(“PFU”)的未修饰的WR病毒或携带C12L缺失的病毒(WR Δ C12L)。为了测试所述病毒的肿瘤特异性,在感染后1、3

和10天,评估脑、肝、肺和肿瘤中的病毒的量。关于结果,图1A中显示,尽管在感染后1天在肝、肺和肿瘤中发现了大致等同量的WR和WR Δ C12L病毒,截止10天时,相对于肿瘤中发现的量,在非肿瘤组织中发现极少的WR Δ C12L病毒,而未修饰的WR病毒在肿瘤/非肿瘤表达中的差异要小得多。

[0183] 为了评估C12L突变对存活的作用,荷载皮下CMT-93肿瘤的C57BL/6小鼠(购自杰克森实验室(The Jackson Laboratory)(缅因州巴港))用单一、 1×10^8 PFU剂量的WR或WR Δ C12L病毒静脉内处理,然后对其监控。尽管接受WR病毒的全部小鼠均在感染后60天之前死亡,70天后,50%的WR Δ C12L动物依然存活(图1B)。

[0184] 动物首先用WR或WR Δ C12L免疫,并且将来自这些小鼠(或对照小鼠)的T细胞与WR混合,并且通过ELISA测定所得的IFN- γ 生成水平。结果示于图1C,并且指示C12L缺失导致产CTL或IFN- γ 的脾细胞的更大幅生成。

[0185] 7. 实施例2. 去糖基化处理的作用

[0186] 未测试病毒表面蛋白质的糖基化修饰的作用,WR TK-VV, N-连接的和简单O-连接的多糖,例如,唾液酸,从病毒包膜去除,采用唾液酸酶A(Glyko唾液酸酶A,编号WS0042)或N-和O-聚糖酶和唾液酸酶A的混合物(Glycopro酶促去糖基化试剂盒,产品编号:GK80110, Prozyme)。用于病毒的去糖基化的非变性方案是:(i)取20 μ l的病毒储液;(ii)添加17 μ l的去离子水;(iii)添加10 μ l的5X反应缓冲液;(iv)各添加1 μ l N-聚糖酶、唾液酸酶A和O-聚糖酶(或任何酶独自与19 μ l的去离子水同用);和(v)使用前在37 $^{\circ}$ C孵育16小时。所述病毒的去糖基化通过western印迹分析来确认(图2A)。

[0187] 去糖基化对病毒感染的作用在用TK-("WR"或"WR.TK-")或其去糖基化的形式("TK-去糖基"和"DS WR.TK-")以MOI为1感染的不同的小鼠肿瘤细胞系中评估。HeLa(人宫颈腺癌)、Bsc-1(绿猴正常肾细胞)、143B(人骨肉瘤)、CV-1(绿猴肾成纤维细胞)、Renca(鼠肾腺癌)和4T1(鼠乳腺癌)细胞系获自美国典型培养物保藏中心(维吉尼亚州马纳萨斯)。HEK293-mTLR2细胞购自英韦沃基公司(InvivoGen)(加利福尼亚州圣迭戈)。MC38(鼠结肠腺癌)和MEF(鼠胚胎成纤维细胞)细胞系分别为David Bartlett博士和Robert Sobol博士赠与(匹兹堡大学癌症中心)。所有细胞系均保持在推荐的含5-10%胎牛血清和抗生素的培养基中,保持在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下。病毒感染通过分析病毒基因表达确定。病毒基因表达在感染后3小时通过荧光素酶体外表达的生物发光成像检测。对于培养的细胞,将10 μ l的30mg/ml D-荧光素(金色生物公司(GoldBio),蒙拿大州圣路易斯)添加至1ml的培养基。如图2B所示,病毒包膜的去糖基化对病毒感染的感染无影响。

[0188] 去糖基化对于TLR2活化的作用在模型系统中评估,该模型系统检测构建以表达TLR2(HEK293/mTLR2)并用pNiFty(移走还能够TLR-信号转导报告质粒)转染的HEK293细胞中的NF- κ B活化。pNiFty(TLR-信号转导报告质粒-荧光素酶)获自英韦沃基公司并采用FuGENE HD转染试剂(普洛麦格公司(Promega),威斯康星州麦迪逊)转染进入HEK293/mTLR2细胞。HEK293/mTLR2细胞以MOI为1转染WR或去糖基化的WR病毒,并在感染后24小时通过生物发光成像定量TLR2活化。如图2C中所示,相较于没有去糖基化的病毒而言,病毒的去糖基化导致TLR2的较少体外活化。此外并如图3A中所示,相较于WR病毒,去糖基化的病毒与显著较少的TLR2活化相关。

[0189] 去糖基化的病毒也显示肿瘤的较大摄取。对于这些实验,将合成的痘苗启动子pE/

L (Chakrabarti等 (1997). *Biotechniques* 23:1094-1097) 控制下的荧光素酶基因纳入 WR.TK-或DS WR.TK-痘苗病毒 (分别是“WR.TK-Luc+”和“DS WR.TK-Luc+”), 并且经静脉内途径引入荷载4T1皮下肿瘤的BALB/c小鼠 (购自杰克森实验室公司 (缅因州巴港)). 然后, 可通过对荧光素酶体内表达进行生物发光成像来检测肿瘤中的病毒基因表达. 对于动物模型, 在成像之前, 进行4.5mg剂量的D-荧光素腹膜内注射/小鼠. 采用IVIS 2000模型 (珀金埃尔默公司 (PerkinElmer), 马萨诸塞州沃尔瑟姆) 供于成像, 并且图像用LivingImage软件 (珀金埃尔默) 分析.

[0190] 图3B显示, 感染后24小时, 相对于其糖基化的对应物, 肿瘤中的DS WR.TK-Luc+病毒有显著较高的表达. 非肿瘤组织中没有观察到该摄取差异. 图3C显示去唾液酸化的病毒感染导致较小的肿瘤体积. 此外, 荷载Renca细胞 (小鼠肾腺癌) 的皮下异种移植物的BALB/c小鼠随机分组, 并用 1×10^8 PFU/小鼠的单一静脉内剂量的TK-或去糖基化的TK-病毒注射. 肿瘤中的病毒基因表达动力学由病毒荧光素酶表达的生物发光成像监测. 如图2E中所示, 病毒包膜的去糖基化使增加了体内肿瘤的基因表达.

[0191] 在用 1×10^7 PFU的WR或去糖基化的WR病毒静脉注射的C57BL/6小鼠中分析病毒的去糖基化对pSTAT1-pSTAT3+淋巴细胞存在的作用. 注射指示病毒之后1小时, 从C57BL/6小鼠收获脾, 并分离脾细胞, 固定于1.6% PFA, 并用甲醇透化. 双色胞内免疫染色分析采用LSRFortessa流式细胞仪 (BD生物科学公司, 加利福尼亚州圣何塞) 进行. 脾细胞采用PacificBlue抗小鼠pSTAT1和AlexaFluor647抗小鼠pSTAT3抗体 (BD生物科学公司) 染色. pSTAT1-pSTAT3+淋巴细胞的百分数通过流式细胞术测定, 并且PBS和PAM (3) CSK (4) 用作对照. 图2D显示STAT3磷酸化在用去糖基化的痘苗病毒注射的小鼠的脾的淋巴细胞中耗尽.

[0192] 为了测定针对体内病毒的免疫应答, 进行中和抗体试验. 简言之, 在病毒注射后第14天, 从按照指示处理的小鼠获取含抗体的血清, 并且采用血清的系列稀释物 (始自1/20) 来中和1000PFU的TK-痘苗病毒. 2×10^4 个HeLa细胞/孔铺板于96孔板中, 并用血清-病毒混合物感染. 在感染后第4天, 板用PBS清洗, 并在采用非放射性细胞增殖分析试剂盒 (普洛麦格公司, 威斯康星州麦迪逊) 对培养物染色之后定量吸光度. 采用适应性Hi11等式, 通过标准非线性回归, 由剂量响应曲线评估 IC_{50} 值 (中和能够诱导50%的细胞抑制的痘苗病毒所需的血清稀释). 如图3D所示, 野生型C57BL/6小鼠中的针对病毒的中和抗体的量大于荷载TLR2敲出突变的小鼠. 因此, 与去糖基化的病毒相关联的较低TLR2活化可与较少的抗病毒抗体生成和改善的抗肿瘤反应相关联.

[0193] 8. 实施例3. TRIF表达的作用

[0194] 将编码鼠TRIF的核酸引入WR.TK-病毒, 并评估其对T细胞的作用. TRIF从胸苷激酶基因座内表达, 由病毒早期/晚期痘苗p7.5启动子 (“TK-TRIF”或“WR.TK-.TRIF”; 图4A) 表达. 产生由p7.5表达且克隆进入该病毒胸苷激酶基因的基因座的具有编码鼠DAI (DLM-1/ZBP1) 的核酸的WR.TK-病毒 (“TK-DAI”; 图4A).

[0195] 进行ELISA以确认来自TK-TRIF病毒的TRIF表达 (图4B). 对于ELISA, 采用小鼠TRIF ELISA试剂盒来测定以MOI为1 (PFU/细胞) 用TK-TRIF感染的细胞的上清液或细胞提取物的TRIF浓度. 如图4B所示, 相较于TK-, TK-TRIF病毒特异性表达TRIF. 采用Western印迹来证实来自TK-DAI病毒的DAI表达 (图4C). 对于western印迹分析, 细胞培养物接种于6孔板, 并以MOI为5 (PFU/细胞) 感染, 并且, 在感染后24小时, 通过4°C下在细胞裂解缓冲液 (细胞信号转

导技术公司,马萨诸塞州丹弗斯)中孵育1小时来获得全细胞蛋白质提取物。澄清化的样品(15 μ g/泳道)经10%SDS-PAGE凝胶分离,并转移至硝化纤维素膜。小鼠DAI蛋白质采用多克隆抗DAI一抗(兔,艾碧康公司(Abcam),马萨诸塞州剑桥)和偶联有HRP的多克隆抗兔(山羊,热科学公司(Thermo Scientific),马萨诸塞州沃尔瑟姆),通过免疫印迹膜检测。小鼠单克隆抗 β 肌动蛋白抗体(圣克鲁兹生物技术公司(SantaCruz Biotechnologies),加利福尼亚州圣克鲁兹)和过氧化物酶偶联的抗小鼠抗体(山羊,热科学公司)用于 β 肌动蛋白(作为上样对照)的免疫印迹。如图4C所示,相较于TK-,TK-DAI病毒特异性地表达DAI。

[0196] 如图5A所示,TRIF的表达导致体外淋巴细胞的I型干扰素生成增加。TRIF的表达也增加体内CTL生成,如ELISpot试验所示(图5B)。对于ELISpot试验,从小鼠制备脾细胞。脾细胞与先前用紫外失活的痘苗病毒感染的肿瘤细胞或脾细胞以5:1的比例混合。来自各小鼠的原初脾细胞用作对照。用15 μ g/ml的单克隆抗小鼠IFN- γ 抗体AN18(迈步泰克公司(Mabtech, Inc.), 俄亥俄州辛辛那提)被覆的96孔膜滤板(EMD密理博,马萨诸塞州比勒利卡)用于该试验。细胞在37 $^{\circ}$ C维持48小时,然后采用1 μ g/ml的生物素化的抗小鼠IFN- γ 抗体R4-6A2-生物素(迈步泰克公司)来检测斑点。板用针对过氧化物酶的AEC底物试剂盒和ABC试剂盒显色(维克多实验室公司(Vector Laboratories, Inc.), 加利福尼亚州伯林盖姆)。特定斑点经计数并采用免疫斑点分析仪(ImmunoSpot Analyzer)和软件(CTL, 俄亥俄州榭柯高地)分析。

[0197] TK-、TK-TRIF或TK-DAI(MOI为1)感染后24小时的对于细胞因子和趋化因子的体外和体内释放的分析采用Luminex试验进行。对于细胞培养上清液,采用Miliplex小鼠细胞因子板(5-重)试剂盒(来自密理博公司(马萨诸塞州比勒利卡)和小鼠2-二重分析试剂盒(来自潘诺米克公司(Panomics)(加利福尼亚州雷德伍德城))。对于肿瘤裂解物,采用来自英杰公司(加利福尼亚州卡尔斯巴德)的细胞因子小鼠20-重板试剂盒来测定在痘苗病毒给予后第4天收获的肿瘤中浓度。肿瘤采用Lysing Matrix D管和FastPrep-24仪均质化。如图6A和C中所示,相较于不同的肿瘤细胞系中的TK-(相较于TK-),在用TK-TRIF感染后,pIKK β 、IL-6、IP-10、TNF- α 和IFN- β 的浓度显著提高。此外,分析具有采用 1×10^8 PFU/小鼠的单一静脉内剂量的TK-或TK-TRIF注射建立的Renca皮下异种移植物的BALB/c小鼠以测定细胞因子和趋化因子的体内瘤内浓度。注射后4天,收获肿瘤并通过luminex或ELISA试验来测定肿瘤裂解物中不同细胞因子和趋化因子的浓度。图6D显示,相较于TK-,响应TK-TRIF的INF- γ 、IL-12、IP-10、TNF- α 、IL-1 β 、GM-CSF和KC的瘤内浓度显著提高。

[0198] 在用TK-TRIF和TK-DAI感染后,分析IRF3通路和NF- κ B的活化。采用ELISA试验来分别测定用TK-、TK-TRIF或TK-DAI以MOI为1感染的4T1或MEF细胞的胞质和核提取物中的pIKK β 和IRF3的浓度。如图6A和B所示,TK-TRIF使NF- κ B和IRF3信号转导通路的活化增加,这通过感染后24小时,pIKK β 和IRF3表达的增加而观察到。图7A显示,TK-TRIF和TK-DAI感染之后,NF- κ B的磷酸化增加。HMGB1和Hsp-70,其功能是NF- κ B的调节剂,也在TK-TRIF感染后显示改变的表达(图7B和7C)。在用TK-、TK-TRIF感染后分析CD4+辅助T细胞和CD8+细胞毒性T细胞的存在。如图7D和E所示,细胞毒性T细胞和辅助T细胞的数量在用TK-TRIF感染的小鼠中更高。

[0199] TK-TRIF的复制和抗肿瘤活性的分析在不同的小鼠肿瘤细胞中进行。不同的肿瘤细胞系以MOI为1感染,并且通过如上所述在不同的时间点进行ELISpot空斑试验来检测病

毒生成。如图8A所示,相较于TK-,TK-TRIF和TK-DAI的病毒生成在抵抗性Renca细胞中显著较少,但TK-TRIF和TK-DAI在MC38和4T1细胞中的病毒生成与TK-的水平类似(也参见图9A)。

[0200] 肿瘤中病毒表达和肿瘤体积的进一步分析在分别植入了Renca或MC38异种移植物的BALB/c或C57BL/6小鼠,和植入了4T1异种移植物的BALB/c小鼠中进行。BALB/c或C57BL/6小鼠用PBS或 1×10^8 PFU的TK-、TK-TRIF或TK-DAI通过尾静脉注射。对于4T1半常位模型,将 2×10^5 个4T1细胞植入BALB/C雌性小鼠的乳腺的脂肪垫。图8C显示相较于TK-的病毒基因表达,分别在BALB/c或C57BL/6小鼠中植入的Renca或MC38异种移植物的肿瘤中的TK-TRIF和TK-DAI的病毒基因表达的水平较低。图9C显示,相较于TK-或表达GM-CSF的TK-病毒(“TK-GMCSF”)的病毒表达,肿瘤中的TK-DAI和TK-TRIF的病毒生成和病毒表达减少。对于具有皮下植入Renca肿瘤的BALB/c小鼠,一旦肿瘤达到 $50-100\text{mm}^3$,用IV剂量的 1×10^8 PFU处理小鼠。所用的病毒是WR.TK-和WR.TK-TRIF+(或PBS对照)。后续肿瘤反应通过卡尺测量来跟踪,并且在用TK-TRIF感染的小鼠中观察到肿瘤生长的减少(图5C和图8D)。相较于用TK-GMCSF(图9D)感染的肿瘤,在用MC38肿瘤(图8D)和4T1肿瘤植入的小鼠中观察到类似反应。

[0201] 相较于TK-,修饰的病毒的细胞毒性通过进行细胞毒性试验来确定。细胞毒性试验通过以 2×10^4 个细胞/孔接种于96孔板的含5% FBS的DMEM中进行。细胞用始于MOI为75的系列稀释物感染,并且,在感染后第4天,板用PBS清洗,并且在采用非放射性细胞增殖分析试剂盒(普洛麦格公司,威斯康星州麦迪逊)对培养物染色之后,对板定量吸光度。采用适应性Hi 11等式,通过标准非线性回归,从剂量响应曲线估计 IC_{50} 值(产生50%抑制所需的PFU/细胞)。图8B显示,用指示的病毒以 $75-0.00025$ PFU/细胞感染的细胞中的TK-TRIF和TK-DAI的细胞毒性。相较于TK-,TK-病毒的用以表达TRIF或DAI的修饰并没有导致细胞毒性变化。通过AnnexinV染色确定凋亡细胞的数量,如图9B所示,指示Renca和4T1细胞的感染导致凋亡细胞增加。细胞系的凋亡/坏死评价,细胞用MOI为1的指示的病毒感染,并在感染后48小时用Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(艾碧康公司,马萨诸塞州剑桥)染色。采用Accuri C6流式细胞仪(BD生物科学公司)进行分析。

[0202] 进行实验以测定TK-TRIF是否影响具有Renca或MC38异种移植物的小鼠的存活率(相较于用TK-或PBS处理的小鼠)。分别在BALB/C或C57BL/6小鼠中建立Renca或MC38异种移植物,并用 1×10^8 PFU的单一静脉内剂量的指示的病毒或PBS处理。如图9E和F所示,相较于采用TK-的处理,TK-TRIF显著改善存活率。

[0203] 9. 实施例4. TRIF表达和去糖基化的组合的作用

[0204] 如上文在6.3中讨论的,对经修饰以表达TRIF的TK-病毒去糖基化(“TK-TRIF去糖基”),以分析所述组合对抗肿瘤细胞反应和病毒的抗肿瘤功效的作用。

[0205] 为了确定表达TK-TRIF的病毒的毒性,分析用PBS作为对照或 1×10^8 PFU/小鼠的TK-、TK-TRIF或去糖基化的TK-TRIF静脉注射的BALB/C小鼠的体重。图10A显示,在病毒注射后第6天,相较于注射了PBS的那些小鼠,TK-注射的小鼠呈现多于10%的体重下降,而TK-TRIF和TK-TRIF去糖基-注射的小鼠显示类似的体重概况,这指示TK-TRIF和TK-TRIF去糖基的毒性低于TK-。

[0206] 分析相较于TK-和TK-TRIF,TK-TRIF-去糖基的体内病毒基因表达。将Renca肿瘤植入BALB/c小鼠,随后小鼠用PBS或 1×10^8 PFU的TK-、TK-TRIF或TK-TRIF去糖基通过尾静脉注射。病毒基因表达通过在指示的时间点检测肿瘤中病毒荧光素酶表达来确定。图10B显示,

感染后24小时,相较于TK-,肿瘤中的TK-TRIF和TK-TRIF去糖基的表达较少。

[0207] 进行实验以确定TK-TRIF或TK-TRIF去糖基是否影响具有Renca或MC38异种移植物的鼠的存活率(相较于采用TK-或PBS处理的鼠)。分别在BALB/C或C57BL/6鼠中建立Renca或MC38异种移植物,并用 1×10^8 PFU的单一静脉内剂量的指示的病毒或PBS处理鼠。如图10C和D中所示,相较于采用TK-的治疗,TK-TRIF和TK-TRIF去糖基显著改善鼠的存活率。并且,相较于TK-GMCSF治疗,TK-TRIF去糖基提高了具有Renca肿瘤的小鼠的存活率(图10E)。

[0208] 对于痘苗病毒和肿瘤细胞的细胞免疫应答通过IFN- γ ELISpot试验来评价,如上文部分6.3中所述。在病毒给予后第7天,从用 1×10^8 PFU的指示的病毒或PBS静脉注射的鼠(荷载Renca异种移植物的BALB/c鼠)收获脾,并评估识别痘苗病毒或Renca细胞的CTL的量。图11A显示,相较于单独的修饰(例如,TK-TRIF或TK-去糖基),TRIF的去糖基化和表达导致体内识别痘苗病毒的CTL的生成显著增加。具体而言,表达TRIF的去糖基化的病毒导致CTL生成的显著增加,其远高于经单独修饰所观察到的CTL生成的增加。此外,图11B显示,相较于单独的修饰(例如,TK-TRIF或TK-去糖基),去糖基化和TRIF的表达导致体内识别RENCA细胞的CTL生成的量的增加。

[0209] 进行中和试验以测定用 1×10^8 PFU的TK-、TK-TRIF或去糖基化的TK-TRIF注射的鼠的循环抗痘苗抗体水平。Nabs效价通过导致感染的至少50%抑制的最高血清稀释度来确定。图11C显示,用TK-感染的野生型C57BL/6鼠中的中和抗体的量高于用TK-TRIF、TK-去糖基或TK-TRIF-去糖基感染的鼠。用TK-TRIF-去糖基感染的鼠显示出血清中中和抗体的量的最大幅减少。

[0210] 表达TRIF的去糖基化的病毒对于肿瘤生长的作用在荷载Renca的BALB/c鼠或荷载MC38肿瘤异种移植物的C57BL/6鼠中分析。对于Renca或MC38肿瘤异种移植物,肿瘤细胞系以 5×10^5 个细胞/鼠分别皮下植入BALB/c或C57BL/6鼠。当肿瘤达到约 $50-100 \text{mm}^3$,鼠用单一静脉内剂量的指示的病毒(1×10^8 PFU/鼠)尾静脉注射。肿瘤生长通过卡尺测量来监测,并且通过等式 $V(\text{mm}^3) = \pi/6 \times W^2 \times L$ 来确定,其中W和L分别是肿瘤的宽度和长度。数据表示为与治疗起始时(设为100%)相对的肿瘤尺寸。令人吃惊地,相较于合并的单独修饰的累加作用或TK-病毒,去糖基化的TK-TRIF病毒导致RENCA和MC38异种移植物荷载的鼠中的肿瘤尺寸的更大幅减小(图11D和E)。此外,相较于TK-GMCSF,去糖基化的TK-TRIF显示出提高的抗肿瘤活性,这通过荷载Renca异种移植物的BALB/c鼠(图11F)或BALB/c鼠中的4T1皮下肿瘤(图9D)的肿瘤尺寸的显著减小而观察到。因此,表达TRIF的去糖基化的TK-痘苗病毒显示出显著改善的抗肿瘤反应,并导致抗病毒抗体生成的减少。

[0211] 10. 实施例5. UPCI-1812中的C12L缺失、TRIF表达和去-唾液酸化的组合的作用

[0212] 将上述修饰,即C12L缺失、去唾液酸化和TRIF的引入,一起纳入,以生成新型VV毒株UPCI-1812,并评价该三重修饰的病毒的治疗和免疫学作用。如图12A所示,UPCI-1812感染导致显著优于编码GM-CSF的WR.TK-的存活率。相对于具有C12L缺失("vvDD")的去唾液酸化的病毒,UPCI-1812产生显著较高水平的干扰素 γ (IFN- γ) (图12B) 和白介素-12 (IL-12) (图12C)。

[0213] 11. 实施例6. PGE2靶向的作用

[0214] 最后,开始溶瘤病毒治疗以证明随机化研究的临床功效,以突出该平台的真实潜

能。然而,在现有的临床载体的选择中,被视为最成功的那些已表达免疫活化细胞因子(GM-CSF),这增加了指示免疫应答是病毒效能的关键指标的过剩的临床前数据。然而,且不论该观察结果,仍不清楚如何或为何一些患者响应良好,而另一些似乎对溶瘤病毒治疗具有抗性。

[0215] 进行初始实验来将肿瘤细胞系对病毒感染和复制的体外敏感性与用于在免疫活性小鼠中形成同系肿瘤的相同细胞系的体内响应相关联。通过用TK-感染细胞系来体外分析不同肿瘤类型的14种不同的肿瘤小鼠细胞系和小鼠毒株(图26A)。在14种不同的肿瘤小鼠细胞系中观察到病毒生成和病毒基因表达。通过在24孔板中接种 2×10^5 个细胞,然后以MOI为1(PFU/细胞)用指示的痘苗病毒感染,来分析病毒生成。感染后四小时,培养物用PBS清洗两次,并在无新鲜病毒的培养基中孵育。在感染后的指示的时间点,培养物经收获并冻融三次以获得细胞提取物(CE)。病毒效价通过对BSC-1细胞进行空斑试验来确定。

[0216] 采用直接瘤内注射TK-,对14种细胞系中的7种进行进一步体内测试(图13A和B和图26A和B)。利用直接瘤内注射来减小可能会因病毒递送差异所致的变异性。如图13A和B所示,没有观察到病毒复制或病毒介导的细胞杀伤和体内抗肿瘤作用之间的直接关联,这指示了介导抗肿瘤作用的是除直接溶瘤活性以外的其它因素。

[0217] 在这些实验中采用表达荧光素酶的溶瘤痘苗以允许分析个体小鼠中随时间推移的病毒基因表达(作为病毒复制和持续的替代),并允许进行后续响应的比较。数据似乎显示两个不同的图。对于更具抵抗性的肿瘤模型(确定为病毒治疗使总体存活延长少于2周,如Renca、B16、PAN02和4T1所见),在每个个体肿瘤模型中可观察到直接相关,从而24小时的病毒基因表达水平与后续响应相对应(图13B)。因此,尽管比较肿瘤模型时,体外复制与体内活性不相关(猜测这是因为肿瘤中诸如ECM和非肿瘤细胞等因素的影响),在任一个体肿瘤模型中,在早期病毒基因表达和后续响应之间存在关联。不受具体理论限制,病毒复制和直接溶瘤活性似乎是较高抗性的肿瘤模型中的首先响应的关键介导因素。然而,在对病毒治疗响应良好的肿瘤中观察到不同的图,所述肿瘤包括肿瘤模型AB12、LLC、MC38。在这些模型中,各模型中的最佳响应物显示初始感染和早期复制中的快速且稳健的病毒清除(图13B和图27)。该稳健清除表明,诱导了强免疫应答,以增强较好响应性肿瘤模型中的病毒直接溶瘤作用。

[0218] 为了更具体地测试该观察结果,初始选择相同遗传背景的两肿瘤模型,其在体内病毒处理之后显示相当的应答,但其中之一(LLC)显示稳健免疫诱导的迹象(早期病毒清除)和有限的病毒介导的体外细胞杀伤(图13B和图26A和B)。另一个(B16)对体外病毒杀伤更为敏感,并且任何体外响应似乎与病毒基因表达相关(图13B和图26A和B)。病毒感染后,在无肿瘤小鼠、带有B16肿瘤的小鼠和带有LLC肿瘤的小鼠之间比较全身性免疫标志物的活化的综合测试。这些包括不同的细胞群中的早期先天信号转导活化标志物,例如pS6、pSTAT1、pSTAT3、pSTAT5(图13C和图14A)、T-细胞增殖标志物,例如pS6和Ki67(图14A)和活化标志物,例如CD44和CD62L(图14A),以及中和抗体应答(图14D)。在荷载肿瘤和不荷载肿瘤的动物之间观察到对于病毒治疗的全身性免疫应答的较小差异,其中的一个例外是感染后早期一些髓细胞中的S6的磷酸化(图13C)。在荷载肿瘤的动物中观察到pS6水平的降低,但免疫活化的减少在B16荷瘤小鼠中最为显著(图13C和图14A)。这在其它肿瘤模型也经验证,进一步证实在更高抗性的肿瘤模型(包括4T1和RENCA)中,pS6水平降低,这指示了树突

细胞(DC)响应缺陷,其可介导这些小鼠中的抗性(图13C)。

[0219] 由于几乎没有观察到全身性免疫应答中的差异,检测肿瘤中更加局部化的免疫抑制的作用。不同的免疫细胞与抑制性表型相关联,包括髓源性抑制细胞(MDSC)和调节性T细胞(T-reg)(和M2macs)。相较于未处理的动物,分析所有肿瘤模型中的脾和肿瘤中的这些不同的细胞类型的水平。对于肿瘤中免疫群体的评价,肿瘤从按指示处理的小鼠获得,然后机械崩解并用三重酶混合物(胶原酶IV型、DN酶IV型和透明质酸酶V型(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),蒙拿大州圣路易斯))消化。四色细胞表面免疫染色分析采用Gallios流式细胞仪(加利福尼亚州布瑞亚的贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter, Inc.))分析。肿瘤-崩解的细胞用PE-Cy7抗小鼠CD3(BD生物科学公司,加利福尼亚州圣何塞)、FITC抗小鼠CD4、PerCP-Cy5.5抗小鼠CD8,和PE抗小鼠CD25(电子生物科学公司(eBioscience),加利福尼亚州圣迭戈)染色。

[0220] 发现不同的肿瘤模型的肿瘤中MDSC水平与该模型对于病毒治疗的抗性或敏感性紧密相关(图15A和B和图16)。例如,Renca,其显示对于病毒治疗的抗性,导致肿瘤具有高MDSC水平。图17A显示未处理的肿瘤中MDSC的数量与采用1e8PFU的WR.TK-对不同的肿瘤模型系统进行静脉内处理后增加的存活之间的关系。痘苗毒株显示使显示基线处高MDSC水平的小鼠肿瘤模型的存活增加的能力极差。将所列各肿瘤模型细胞系的细胞(图17A)植入同系免疫活性小鼠。小鼠随后经处死以测定各模型所得肿瘤中的MDSC的平均基线水平,或小鼠用WR.TK-(或PBS对照)(1e8PFU,瘤内给予)处理,并在治疗后(以天计)确定预期寿命的增加(对于50%存活率)。图表绘出“基线处肿瘤中相对MDSC数量”对于“WR.TK-治疗后存活的中值增加(相对于未处理的对照)”的关系。基线处更多的MDSC与治疗有效性的降低相关。

[0221] 检测病毒治疗后肿瘤中发生的其它变化,并且观察到,对于多种肿瘤模型,例如4T1、RENCA和MC38,痘苗治疗的加入导致T-reg的损失,但MDSC水平不受影响,且随时间推移持续增加,如同其在对照组中的表现(图15A和B和图16A和B)。病毒治疗降低了经治疗肿瘤中的T-reg水平,但对MDSC水平无影响。在Renca肿瘤模型(皮下植入BALB/c小鼠)中,在WR.TK-处理(1e8PFU,瘤内给予)之前或之后的不同时间测定肿瘤中T-reg或MDSC的相对数量/mg肿瘤(图17B和C)。因此,似乎溶瘤痘苗在靶向MDSC方面的失能降低了其在具有高MDSC水平的一些肿瘤中的治疗活性。在具有低MDSC背景水平的肿瘤(MC38)中,也发现病毒治疗提高了进入肿瘤的CD8+T细胞的水平,而更具抗性的肿瘤模型(4T1)没有表现任何增加(图15B)。

[0222] 进行对于免疫原性痘苗毒株GM-CSF(其表达细胞因子集落刺激因子(CSF))的分析。GM-CSF已于先前显示导致更剧烈的临床反应并且已与MDSC增殖相关联。图18和19显示,尽管更具免疫原性的痘苗毒株(WR.TK-GMCSF和WR.B18R-IFN β)确实进一步增强了敏感型肿瘤模型中的免疫应答的一些方面,例如进一步减少T-reg和增加CD8+T细胞水平,在其它情况中的抗性肿瘤模型中并没有观察到这些益处。不受具体理论限制,敏感性和抗性肿瘤之间的主要差异似乎涉及病毒无法在肿瘤微环境中具有高水平的MDSC介导的免疫抑制的肿瘤中诱导稳健免疫疗效。

[0223] 近期报道已将COX2介导的前列腺素PGE2生成鉴定为MDSC浸润和MDSC表型的保持的关键决定因素。采用两种方法来靶向该通路。一种方法是通过应用COX2抑制剂。第二种方法是直接从该病毒载体表达前列腺素降解酶HPGD。将编码羟基前列腺素脱氢酶15(HPGD)

(一种降解PGE2的小鼠酶)的核酸引入WR.TK-(通过同源重组插入胸苷激酶基因座),并处于病毒p7.5启动子的控制下(“TK-HPGD”或“WR.TK-.HPGD”)。如图20所示,HPGD由TK-HPGD特异性表达,并显著减少用TK-HPGD感染的Renca细胞中的PGE2水平。如图25所示,采用WR.TK-的感染似乎能改变感染位点处的局部肿瘤中的COX2表达,而不产生肿瘤中的总体COX2表达的显著水平,或所述病毒可选择性地在具有低COX2水平的区域中复制。初始体外和体内实验确定,即便在毒性水平,COX2抑制剂依然无法使PGE2水平降低至接近HPGD表达所获得的水准的任何程度(图20)。

[0224] 然后在若干小鼠肿瘤模型中测试溶瘤痘苗表达。观察到,在仅用WR-TK-HPGD处理的脾和肿瘤中,肿瘤中MDSC细胞的数量快速且显著减少(图21和图23A-D)。相对于未修饰的WR.TK-病毒,还发现HPGD的纳入会减少肿瘤和脾中的MDSC。这对于肿瘤具有特异性,没有观察到全身性毒性(图21A)。有趣的是,TK-HPGD还诱导肿瘤中更快速且稳健的T-reg数量减少。如图21B和C和图22所示,在若干小鼠体内肿瘤模型中,用WR-TK-HPGD的感染与增强的疗效相关联,并且导致较小的肿瘤体积。应注意,先前对病毒治疗最具抗性的肿瘤模型,RENCA(其显示“仅溶瘤”表型和高基线水平的MDSC),在HPGD表达后惊人地显示出治疗益处的最大提高(图21B)。

[0225] 还比较了RENCA肿瘤中的WR.TK-和WR.TK-HPGD之间的病毒基因表达的模式。然而观察到,对于WR.TK-,观察到“仅溶瘤”表型(在第1天,较高基因表达与最大治疗益处相关),WR.TK-HPGD+显示“溶瘤和免疫治疗”表型,最佳响应物截至第5天显示稳健且快速的病毒清除(图21D)。不受具体理论限制,HPGD表达似乎能够恢复这些抗性较高的模型中载体的免疫治疗活性,由此能够使其他情况下具有抗性的肿瘤对溶瘤病毒治疗敏感。不论HPGD表达,溶瘤潜能没有总体损失。

[0226] 进行介导采用WR.TK-HPGD+观察到的该治疗益处的机制的分析。在治疗后3天,截至此时,肿瘤环境中的MDSC和T-reg的水平已经显著下降,注意到,肿瘤中的细胞因子和趋化因子水平仅发生中度变化(图24A)。然而,血清中趋化因子的水平显著变化(图24B)。具体而言,与活化的T细胞的吸引相关的趋化因子,包括CCL5,有所上调,而CXCL12(sdf-1,与免疫抑制性表型和较差预后相关)已被显著减少(图24A和B)。全身性趋化因子作用的这一变化可造成对肿瘤中免疫细胞库的变化的介导。这进一步采用双侧肿瘤试验检测,其中一个肿瘤用WR.TK-注射,并且另一侧的肿瘤用WR.TK-HPGD注射。观察到,活化的T细胞向表达HPGD的肿瘤运输显著更多(图24D)。此外,在稍晚的时间点,观察到WR.TK-HPGD表达导致脾中的肿瘤靶向CTL的水平显著增加。这些数据指示HPGD的表达不仅作用于限制肿瘤内的抑制性环境,还作用于增强T细胞的吸引,导致更加稳健的抗肿瘤适应性免疫应答。此外,将HPGD纳入UPCI-1812导致抑制肿瘤生长的病毒,其对于肿瘤生长的抑制显著多于UPCI-1812(“组合的”;图28)。如图28所示,组合的病毒导致的对于肿瘤生长的减少大于UPCI-1812病毒和VV-HPGD病毒的累加作用。病毒介导的PGE2的靶向能够克服局部的免疫抑制,导致肿瘤微环境的显著变化,并且导致原先具有抗性的肿瘤对病毒治疗敏化。

[0227] 13. 实施例7. 增加活性和传播的修饰

[0228] 图29显示用(1e4PFU)的WR或具有A34R病毒基因中EEV增强的点突变(Lys151至Glu)的WR免疫接种的小鼠的血清中存在的抗痘苗中和抗体的水平。相较于WR-,A34R突变病毒株产生较少的抗痘苗中和抗体。

[0229] 14. 参考文献

- [0230] 1. Guo, Z.S., Thorne, S.H. 和 Bartlett, D.L. Oncolytic virotherapy: Molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses (溶瘤病毒治疗: 在肿瘤选择性复制和溶瘤病毒载体介导的传递分子靶点). *Biochim Biophys Acta* (2008).
- [0231] 2. Kirn, D.H. 和 Thorne, S.H. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer (靶向溶瘤细胞痘病毒: 一种新型多机制癌治疗类型). *Nat Rev Cancer* 9, 64-71 (2009).
- [0232] 3. Kirn, D., Martuza, R.L. 和 Zwiebel, J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions (肿瘤选择性复制的病毒: 生物原理、风险控制和未来的发展方向). *Nat Med* 7, 781-7 (2001).
- [0233] 4. Kim, J.H., Oh, J.Y., Park, B.H., Lee, D.E., Kim, J.S., Park, H.E., Roh, M.S., Je, J.E., Yoon, J.H., Thorne, S.H., Kirn, D. 和 Hwang, T.H. Systemic Armed Oncolytic and Immunologic Therapy for Cancer with JX-594, a Targeted Poxvirus Expressing GM-CSF (采用 JX-594, 一种表达 GM-CSF 的靶向痘病毒的全身作用的溶瘤与免疫学癌症疗法). *Mol Ther* 14, 361-70 (2006).
- [0234] 5. Kirn, D.H., Wang, Y., Le Boeuf, F., Bell, J. 和 Thorne, S.H. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus (靶向 β -干扰素以产生特定、多机制溶瘤痘苗病毒). *PLoS Med* 4, e353 (2007).
- [0235] 6. Thorne, S.H., Hwang, T.H., O'Gorman, W.E., Bartlett, D.L., Sei, S., Kanji, F., Brown, C., Werier, J., Cho, J.H., Lee, D.E., Wang, Y., Bell, J. 和 Kirn, D.H. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963 (合理的菌种选择和工程改造创建一种广谱、系统有效的溶瘤痘病毒, JX-963). *J Clin Invest* 117, 3350-3358 (2007).
- [0236] 7. McCart, J.A., Ward, J.M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H.R., Libutti, S.K., Moss, B. 和 Bartlett, D.L. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes (采用缺乏胸苷激酶和痘苗生长因子基因的肿瘤选择性痘苗病毒突变体的全身性癌症治疗). *Cancer Res* 61, 8751-7 (2001).
- [0237] 8. Guo, Z.S., Naik, A., O'Malley, M.E., Popovic, P., Demarco, R., Hu, Y., Yin, X., Yang, S., Zeh, H.J., Moss, B., Lotze, M.T. 和 Bartlett, D.L. The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and antiapoptosis genes SPI-1 and SPI-2 (缺乏寄主范围及抗凋亡基因 SPI-1 和 SPI-2 的溶瘤痘苗的增强的肿瘤选择性). *Cancer Res* 65, 9991-8 (2005).
- [0238] 9. Gnant, M.F., Noll, L.A., Irvine, K.R., Puhlmann, M., Terrill, R.E., Alexander, H.R., Jr. 和 Bartlett, D.L. Tumor-specific gene delivery using recombinant vaccinia virus in a rabbit model of liver metastases (肝转移兔模型中采用重组痘苗病毒的肿瘤特异性基因递送). *J Natl Cancer Inst* 91, 1744-50 (1999).
- [0239] 10. Zhang, Q., Yu, Y.A., Wang, E., Chen, N., Danner, R.L., Munson, P.J.,

Marincola, F.M. 和 Szalay, A.A. Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus (静脉注射发光溶瘤痘苗病毒裸鼠的固体人乳腺肿瘤的根除). *Cancer Res* 67, 10038-46 (2007).

[0240] 11. Yu, Y.A., Shabahang, S., Timiryasova, T.M., Zhang, Q., Beltz, R., Gentshev, I., Goebel, W. 和 Szalay, A.A. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins (采用编码的发光蛋白的细菌和牛痘病毒的活动物的肿瘤和转移的可视化). *Nat Biotechnol* 22, 313-20 (2004).

[0241] 12. Park, B.H., Hwang, T., Liu, T.C., Sze, D.Y., Kim, J.S., Kwon, H.C., Oh, S.Y., Han, S.Y., Yoon, J.H., Hong, S.H., Moon, A., Speth, K., Park, C., Ahn, Y.J., Daneshmand, M., Rhee, B.G., Pinedo, H.M., Bell, J.C. 和 Kirn, D.H. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial (靶向溶瘤痘病毒 JX-594 在具有难治原发性或转移肝癌患者中的应用: I 期试验). *Lancet Oncol* 9, 533-42 (2008).

[0242] 13. Breitbach, C.J., Burke, J., Jonker, D., Stephenson, J., Haas, A.R., Chow, L.Q., Nieva, J., Hwang, T.H., Moon, A., Patt, R., Pelusio, A., Le Boeuf, F., Burns, J., Evgin, L., De Silva, N., Cvancic, S., Robertson, T., Je, J.E., Lee, Y.S., Parato, K., Diallo, J.S., Fenster, A., Daneshmand, M., Bell, J.C. 和 Kirn, D.H. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans (一种多机制的肿瘤靶向溶瘤痘苗病毒在人体静脉递送). *Nature* 477, 99-102 (2011).

[0243] 14. Schmidt, C. Amgen spikes interest in live virus vaccines for hard-to-treat cancers (安进引发对活病毒疫苗用于难治疗癌症的兴趣). *Nature biotechnology* 29, 295-6 (2011).

[0244] 15. Coffin, R. Clinical Updates with oncolytic HSV (溶瘤 HSV 的临床信息更新). 第 7 届国际溶瘤病毒会议 (魁北克市, 2013).

[0245] 16. Senzer, N.N., Kaufman, H.L., Amatruda, T., Nemunaitis, M., Reid, T., Daniels, G., Gonzalez, R., Glaspy, J., Whitman, E., Harrington, K., Goldsweig, H., Marshall, T., Love, C., Coffin, R. 和 Nemunaitis, J.J. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma (粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子编码型第二代溶瘤疱疹病毒在患有无法切除的转移黑素瘤的患者中的 II 期临床试验). *J Clin Oncol* 27, 5763-71 (2009).

[0246] 17. Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. 和 McCormick, F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells (在 p53 缺陷的肿瘤细胞中选择性复制的腺病毒突变体). *Science* 274, 373-6 (1996).

[0247] 18. Khuri, F., Nemunaitis, J., Ganly, I., Gore, M., MacDougall, M., Tannock, I., Kaye, S., Hong, W. 和 Kirn, D. A controlled trial of Onyx-015, an E1B gene-deleted

adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with recurrent head and neck cancer (Onyx-015, 一种删除E1B基因的腺病毒与化疗联用于复发性头颈癌患者的控制试验). *Nature Medicine* 6, 879-885 (2000).

[0248] 19. Garber, K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment (中国批准了世界上第一个用于治疗癌症的溶瘤病毒疗法). *J Natl Cancer Inst* 98, 298-300 (2006).

[0249] 20. Liu, T.C., Hwang, T., Park, B.H., Bell, J. 和 Kirn, D.H. The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma (靶向溶瘤痘苗病毒 JX-594 显示肝癌患者中的抗肿瘤, 抗血管和抗 HBV 活性). *Mol Ther* 16, 1637-42 (2008).

[0250] 21. Kim, M.K., Breitbach, C.J., Moon, A., Heo, J., Lee, Y.K., Cho, M., Lee, J.W., Kim, S.G., Kang, D.H., Bell, J.C., Park, B.H., Kirn, D.H. 和 Hwang, T.H. Oncolytic and immunotherapeutic vaccinia induces antibody-mediated complement-dependent cancer cell lysis in humans (溶瘤和免疫治疗性痘苗诱导抗体介导的补体依赖的人类癌细胞裂解). *Science translational medicine* 5, 185ra63 (2013).

[0251] 22. Contag, C.H., Sikorski, R., Negrin, R.S., Schmidt, T., Fan, A.C., Bachireddy, P., Felsher, D.W. 和 Thorne, S.H. Definition of an enhanced immune cell therapy in mice that can target stem-like lymphoma cells (能够靶向干细胞样淋巴细胞的小鼠中的增强的免疫细胞治疗的确定). *Cancer Research* 70, 9837-45 (2010).

[0252] 23. Yang, Y., Huang, C.T., Huang, X. 和 Pardoll, D.M. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance (持久 Toll 样受体信号为调节性 T 细胞介导的 CD8 耐受的逆转所需). *Nature immunology* 5, 508-15 (2004).

[0253] 24. Worschech, A., Chen, N., Yu, Y.A., Zhang, Q., Pos, Z., Weibel, S., Raab, V., Sabatino, M., Monaco, A., Liu, H., Monsurro, V., Buller, R.M., Stroncek, D.F., Wang, E., Szalay, A.A. 和 Marincola, F.M. Systemic treatment of xenografts with vaccinia virus GLV-1h68 reveals the immunologic facet of oncolytic therapy (采用痘苗病毒 GLV-1h68 的异种移植物全身治疗显示溶瘤治疗的免疫学方面). *BMC genomics* 10, 301 (2009).

[0254] 25. Thorne, S.H., Liang, W., Sampath, P., Schmidt, T., Sikorski, R., Beilhack, A. 和 Contag, C.H. Targeting localized immune suppression within the tumor through repeat cycles of immune cell-oncolytic virus combination therapy (通过免疫细胞-溶瘤病毒组合治疗的重复循环靶向肿瘤中局部免疫抑制). *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 1698-705 (2010).

[0255] 26. Thorne, S.H. Enhancing biological therapy through conditional regulation of protein stability (通过蛋白质稳定性的条件性调节来增强生物治疗). *Expert reviews in molecular medicine* 12, e2 (2010).

[0256] 27. Wang, L.C., Lynn, R.C., Cheng, G., Alexander, E., Kapoor, V., Moon, E.K., Sun, J., Fridlender, Z.G., Isaacs, S.N., Thorne, S.H. 和 Albelda, S.M. Treating Tumors With

a Vaccinia Virus Expressing IFN β Illustrates the Complex Relationships Between Oncolytic Ability and Immunogenicity (用表达IFN β 的痘苗病毒治疗肿瘤说明溶瘤活性和免疫原性之间的复杂关系). *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* (2011).

[0257] 28. Prestwich, R.J., Ilett, E.J., Errington, F., Diaz, R.M., Steele, L.P., Kottke, T., Thompson, J., Galivo, F., Harrington, K.J., Pandha, H.S., Selby, P.J., Vile, R.G. 和 Melcher, A.A. Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication (呼肠孤病毒的免疫介导的抗肿瘤活性是治疗所需要的并且独立于直接病毒溶瘤性和复制). *Clin Cancer Res* 15, 4374-81 (2009).

[0258] 29. Banchereau, J. 和 Palucka, A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer (树突细胞作为针对癌症的治疗性疫苗). *Nat Rev Immunol* 5, 296-306 (2005).

[0259] 30. Nestle, F.O., Tonel, G. 和 Farkas, A. Cancer vaccines: the next generation of tools to monitor the anticancer immune response (癌症疫苗: 监测抗癌免疫应答的下一代工具). *PLoS Med* 2, e339 (2005).

[0260] 31. Rosenberg, S.A., Yang, J.C. 和 Restifo, N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines (癌症免疫治疗: 越过现有疫苗). *Nat Med* 10, 909-15 (2004).

[0261] 32. Banaszynski, L.A., Sellmyer, M.A., Contag, C.H., Wandless, T.J. 和 Thorne, S.H. Chemical control of protein stability and function in living mice (蛋白质稳定性和功能的活小鼠中的化学控制). *Nat Med* (2008).

[0262] 33. Rommelfanger, D.M., Wongthida, P., Diaz, R.M., Kaluza, K.M., Thompson, J.M., Kottke, T.J. 和 Vile, R.G. Systemic Combination Virotherapy for Melanoma with Tumor Antigen-Expressing Vesicular Stomatitis Virus and Adoptive T-Cell Transfer (采用表达肿瘤抗原的水泡性口炎病毒和过继性T细胞转移的全身性组合病毒疗法). *Cancer Research* (2012).

[0263] 34. Thorne, S.H. Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus (溶瘤痘苗病毒的免疫治疗潜力). *Immunologic research* 50, 286-93 (2011).

[0264] 35. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. 和 Sakaguchi, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3 (+) CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization (通过白介素 (IL)-2 的天然 Foxp3 (+) CD25 (+) CD4 (+) 调节性 T 细胞的稳态维持和 IL-2 中和对自体免疫疾病的诱导). *The Journal of experimental medicine* 201, 723-35 (2005).

[0265] 36. Enzler, T., Gillessen, S., Manis, J.P., Ferguson, D., Fleming, J., Alt, F.W., Mihm, M. 和 Dranoff, G. Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer (GM-CSF 和干扰素 γ 相关炎症和癌症的缺陷). *The Journal of experimental medicine* 197, 1213-9 (2003).

[0266] 37. Jinushi, M., Nakazaki, Y., Dougan, M., Carrasco, D.R., Mihm, M. 和 Dranoff, G. MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro-and

antiinflammatory activities of GM-CSF (MFG-E8介导的APC凋亡细胞摄取相关于GM-CSF促炎性和抗炎性活性). *The Journal of clinical investigation* 117,1902-13 (2007).

[0267] 38. Lemoine, F.M., Cherai, M., Giverne, C., Dimitri, D., Rosenzwaig, M., Trebeden-Negre, H., Chaput, N., Barrou, B., Thioun, N., Gattegnio, B., Selles, F., Six, A., Azar, N., Lotz, J.P., Buzyn, A., Sibony, M., Delcourt, A., Boyer, O., Herson, S., Klatzmann, D. 和 Lacave, R. Massive expansion of regulatory T-cells following interleukin 2 treatment during a phase I-II dendritic cell-based immunotherapy of metastatic renal cancer (转移肾癌的I-II期树突细胞法免疫疗法过程中白介素2处理后的调节性T细胞的大量扩增). *International journal of oncology* 35,569-81 (2009).

[0268] 39. Wei, S., Kryczek, I., Edwards, R.P., Zou, L., Szeliga, W., Banerjee, M., Cost, M., Cheng, P., Chang, A., Redman, B., Herberman, R.B. 和 Zou, W. Interleukin-2 administration alters the CD4+FOXP3+T-cell pool and tumor trafficking in patients with ovarian carcinoma (白介素2的给予改变CD4+FOXP3+T细胞池和卵巢癌患者中的肿瘤运输). *Cancer Research* 67,7487-94 (2007).

[0269] 40. Filipazzi, P., Valenti, R., Huber, V., Pilla, L., Canese, P., Iero, M., Castelli, C., Mariani, L., Parmiani, G. 和 Rivoltini, L. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine (髓抑制剂细胞新子集在采用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子型抗肿瘤疫苗调节的黑素瘤患者外周血中的鉴定). *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25,2546-53 (2007).

[0270] 41. Smith, G.L., Symons, J.A., Khanna, A., Vanderplasschen, A. 和 Alcami, A. Vaccinia virus immune evasion (痘苗病毒免疫逃避). *Immunol Rev* 159,137-54 (1997).

[0271] 42. Smith, G.L., Symons, J.A. 和 Alcami, A. Immune modulation by proteins secreted from cells infected by vaccinia virus (牛痘病毒感染细胞分泌蛋白的免疫调节). *Arch Virol Suppl* 15,111-29 (1999).

[0272] 43. Symons, J.A., Alcami, A. 和 Smith, G.L. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity (牛痘病毒编码结构新颖且有广泛的物种特异性的可溶性I型干扰素受体). *Cell* 81,551-60 (1995).

[0273] 44. Iwasaki, A., Stiernholm, B.J., Chan, A.K., Berinstein, N.L. 和 Barber, B.H. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines (质粒DNA编码的免疫共刺激分子和细胞因子介导的增强CTL反应). *Journal of Immunology* 158,4591-601 (1997).

[0274] 45. Gulley, J.L., Arlen, P.M., Tsang, K.Y., Yokokawa, J., Palena, C., Poole, D.J., Remondo, C., Cereda, V., Jones, J.L., Pazdur, M.P., Higgins, J.P., Hodge, J.W., Steinberg, S.M., Kotz, H., Dahut, W.L. 和 Schlom, J. Pilot study of vaccination with

recombinant CEA-MUC-1-TRICOM poxviral-based vaccines in patients with metastatic carcinoma (疫苗接种重组CEA-MUC-1-TRICOM痘病毒疫苗治疗转移性癌的初步研究). *Clin Cancer Res* 14,3060-9 (2008).

[0275] 46. Takeshita, F., Tanaka, T., Matsuda, T., Tozuka, M., Kobiyama, K., Saha, S., Matsui, K., Ishii, K.J., Coban, C., Akira, S., Ishii, N., Suzuki, K., Klinman, D.M., Okuda, K. 和 Sasaki, S. Toll-like receptor adaptor molecules enhance DNA-raised adaptive immune responses against influenza and tumors through activation of innate immunity (Toll样受体适配器分子通过激活先天免疫,提高了对流感 and 肿瘤的免疫反应). *Journal of virology* 80,6218-24 (2006).

[0276] 47. Sasaki, S., Amara, R.R., Yeow, W.S., Pitha, P.M. 和 Robinson, H.L. Regulation of DNA-raised immune responses by cotransfected interferon regulatory factors (通过共转染干扰素调节因子的DNA提高的免疫应答的调节). *Journal of virology* 76, 6652-9 (2002).

[0277] 48. O'Gorman, W.E., Sampath, P., Simonds, E.F., Sikorski, R., O'Malley, M., Krutzik, P.O., Chen, H., Panchanathan, V., Chaudhri, G., Karupiah, G., Lewis, D.B., Thorne, S.H. 和 Nolan, G.P. Alternate mechanisms of initial pattern recognition drive differential immune responses to related poxviruses (初始模式识别的替代机制驱动对相关痘病毒的差异免疫应答). *Cell hostµbe* 8,174-85 (2010).

[0278] 49. Zhu, J., Martinez, J., Huang, X. 和 Yang, Y. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta (针对痘苗病毒的先天免疫由TLR2介导并需要TLR独立的IFN β 产生). *Blood* 109, 619-25 (2007).

[0279] 50. Samuelsson, C., Hausmann, J., Lauterbach, H., Schmidt, M., Akira, S., Wagner, H., Chaplin, P., Suter, M., O'Keefe, M. 和 Hochrein, H. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection (致死痘病毒感染的小鼠存活取决于TLR9,并且治疗性疫苗接种提供保护). *J Clin Invest* 118,1776-84 (2008).

[0280] 51. Hennessy, E.J., Parker, A.E. 和 O'Neill, L.A. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? (靶向Toll样受体:产生治疗性?) *Nature reviews. Drug discovery* 9,293-307 (2010).

[0281] 52. O'Neill, L.A., Bryant, C.E. 和 Doyle, S.L. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer (治疗性靶向Toll样受体用于感染性和炎性疾病和癌症). *Pharmacological reviews* 61,177-97 (2009).

[0282] 53. Fukata, M. 和 Abreu, M.T. Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies (Toll样受体在胃肠恶性肿瘤中的作用). *Oncogene* 27, 234-43 (2008).

[0283] 54. Chen, R., Alvero, A.B., Silasi, D.A., Steffensen, K.D. 和 Mor, G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer

cells (癌症夺取其Toll, Toll样受体在癌细胞中的功能和调节). *Oncogene* 27, 225-33 (2008).

[0284] 55. Sautes-Fridman, C., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Fisson, S., Fridman, W.H., Cremer, I. 和 Dieu-Nosjean, M.C. Tumor microenvironment is multifaceted (肿瘤微环境是多方面的). *Cancer metastasis reviews* 30, 13-25 (2011).

[0285] 56. Rakoff-Nahoum, S. 和 Medzhitov, R. Toll-like receptors and cancer (Toll样受体和癌症). *Nature reviews. Cancer* 9, 57-63 (2009).

[0286] 57. Umemura, N., Zhu, J., Mburu, Y.K., Forero, A., Hsieh, P.N., Muthuswamy, R., Kalinski, P., Ferris, R.L. 和 Sarkar, S.N. Defective NF- κ B signaling in metastatic head and neck cancer cells leads to enhanced apoptosis by double-stranded RNA (缺陷型NF- κ B信号转导在转移性头颈癌细胞中导致双链RNA所致的增强的凋亡). *Cancer Research* 72, 45-55 (2012).

[0287] 58. Cheng, Y.S. 和 Xu, F. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid (聚肌胞苷酸的抗癌作用). *Cancer biology & therapy* 10, 1219-23 (2011).

[0288] 59. Longhi, M.P., Trumfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C., Salazar, A.M., Colonna, M. 和 Steinman, R.M. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+Th1 immunity with poly IC as adjuvant (采用多聚IC作为佐剂, 树突细胞需要系统性I型干扰素应答以使CD4+Th1免疫成熟并诱导CD4+Th1免疫). *The Journal of experimental medicine* 206, 1589-602 (2009).

[0289] 60. Trumfheller, C., Caskey, M., Nchinda, G., Longhi, M.P., Mizenina, O., Huang, Y., Schlesinger, S.J., Colonna, M. 和 Steinman, R.M. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine (微生物模拟多聚IC诱导可耐受的和保护性CD4+T免疫力以及树突细胞靶向的疫苗). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2574-9 (2008).

[0290] 61. Kalinski, P., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A. 和 Kapsenberg, M.L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal (1型和2型极化的树突细胞的T细胞引发: 第三信号概念). *Immunol Today* 20, 561-7 (1999).

[0291] 62. Mailliard, R.B., Wankowicz-Kalinska, A., Cai, Q., Wesa, A., Hilkens, C.M., Kapsenberg, M.L., Kirkwood, J.M., Storkus, W.J. 和 Kalinski, P. α -type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity (α 型-1极化的树突细胞: 具有优化的CTL诱导活性的新型免疫工具). *Cancer Res* 64, 5934-7 (2004).

[0292] 63. Wesa, A., Kalinski, P., Kirkwood, J.M., Tatsumi, T. 和 Storkus, W.J. Polarized type-1 dendritic cells (DC1) producing high levels of IL-12 family members rescue patient TH1-type antimelanoma CD4+T cell responses in vitro (产生高水平的IL-12家族成员的极化的1型树突细胞DC1援救患者TH1型抗黑素瘤CD4+T细胞体

外应答). *J Immunother* 30,75-82 (2007).

[0293] 64. Kalinski, P. 和 Okada, H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors (极化的树突细胞作为癌症疫苗: 将效应物型T细胞导向肿瘤). *Seminars in immunology* 22,173-82 (2010).

[0294] 65. Okada, H., Kalinski, P., Ueda, R., Hoji, A., Kohanbash, G., Donegan, T.E., Mintz, A.H., Engh, J.A., Bartlett, D.L., Brown, C.K., Zeh, H., Holtzman, M.P., Reinhart, T.A., Whiteside, T.L., Butterfield, L.H., Hamilton, R.L., Potter, D.M., Pollack, I.F., Salazar, A.M. 和 Lieberman, F.S. Induction of CD8+T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with α -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma (针对新型神经胶质瘤相关抗原肽的CD8+T细胞应答的诱导和用 α -1型极化的树突细胞和通过赖氨酸和羧甲基纤维素稳定化的聚肌胞-聚胞苷酸在患者中的免疫接种的临床活性). *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29,330-6 (2011).

[0295] 66. Hokey, D.A., Larregina, A.T., Erdos, G., Watkins, S.C. 和 Falco, L.D., Jr. Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity (载有1型极化的树突细胞的肿瘤细胞诱导Th1介导的肿瘤免疫). *Cancer Research* 65,10059-67 (2005).

[0296] 67. Buller, R.M. 和 Palumbo, G.J. Poxvirus pathogenesis (痘病毒病理学). *Microbiol Rev* 55,80-122 (1991).

[0297] 68. Moss, B. Poxviridae: The viruses and their replication (痘病毒: 病毒及其复制). 刊于《费尔兹病毒学》(Field's Virology) (编者 D.M., K., Fields, B.N. 和 Howley, P.M.) 第84章 (Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001).

[0298] 69. Putz, M.M., Midgley, C.M., Law, M. 和 Smith, G.L. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination (针对两种感染形式的痘苗病毒的多抗原的抗体应答定量提供天花疫苗接种的基准). *Nat Med* 12,1310-5 (2006).

[0299] 70. Symons, J.A., Adams, E., Tschärke, D.C., Reading, P.C., Waldmann, H. 和 Smith, G.L. The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model (痘苗病毒C12L蛋白抑制小鼠IL-18并促进鼠鼻内模型的病毒毒性). *J Gen Virol* 83,2833-44 (2002).

[0300] 71. Reading, P.C. 和 Smith, G.L. Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity (痘苗病毒白介素-18结合蛋白通过减少 γ 干扰素生成和天然杀伤者与T细胞活性来促进毒性). *J Virol* 77,9960-8 (2003).

[0301] 72. Zhu, J., Smith, K., Hsieh, P.N., Mburu, Y.K., Chattopadhyay, S., Sen, G.C. 和 Sarkar, S.N. High-throughput screening for TLR3-IFN regulatory factor

3signaling pathway modulators identifies several antipsychotic drugs as TLR inhibitors (TLR3-IFN调节因子3信号转导通路调节剂的高通量筛选鉴定若干安定药物为TLR抑制剂). *Journal of Immunology* 184,5768-76 (2010).

[0302] 73.Okamura,H.,Tsutsi,H.,Komatsu,T.,Yutsudo,M.,Hakura,A.,Tanimoto,T.,Torigoe,K.,Okura,T.,Nukada,Y.,Hattori,K.等.Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells (诱导T细胞的IFN- γ 生成的新细胞因子的克隆). *Nature* 378,88-91 (1995).

[0303] 74.Wong,J.L.,Mailliard,R.B.,Moschos,S.J.,Edington,H.,Lotze,M.T.,Kirkwood,J.M.和Kalinski,P.Helper Activity of Natural Killer Cells During the Dendritic Cell-mediated Induction of Melanoma-specific Cytotoxic T Cells (树突细胞介导的黑素瘤特异性细胞毒性T细胞的诱导过程中的天然杀伤细胞的辅助活性). *Journal of immunotherapy* 34,270-8 (2011).

[0304] 75.Falivene,J.,Del Medico Zajac,M.P.,Pascutti,M.F.,Rodriguez,A.M.,Maeto,C.,Perdiguero,B.,Gomez,C.E.,Esteban,M.,Calamante,G.和Gherardi,M.M.Improving the MVA vaccine potential by deleting the viral gene coding for the IL-18binding protein (通过删除编码IL-18结合蛋白的病毒基因来改善MVA疫苗潜能). *PLoS One* 7,e32220 (2012).

[0305] 76.Kirn,D.H.,Wang,Y.,Liang,W.,Contag,C.H.和Thorne,S.H.Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion (通过增加的传播和免疫逃避来增强痘病毒溶瘤作用). *Cancer Res* 68,2071-5 (2008).

[0306] 77.Puhlmann,M.,Brown,C.K.,Gnant,M.,Huang,J.,Libutti,S.K.,Alexander,H.R.和Bartlett,D.L.Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant (痘苗作为肿瘤导向基因治疗的载体:胸苷激酶缺失的突变体的生物分布). *Cancer Gene Ther* 7,66-73 (2000).

[0307] 78.Alvarez-Breckenridge,C.A.,Yu,J.,Price,R.,Wojton,J.,Pradarelli,J.,Mao,H.,Wei,M.,Wang,Y.,He,S.,Hardcastle,J.,Fernandez,S.A.,Kaur,B.,Lawler,S.E.,Vivier,E.,Mandelboim,O.,Moretta,A.,Caligiuri,M.A.和Chiocca,E.A.NK cells impede glioblastoma virotherapy through NKp30and NKp46natural cytotoxicity receptors (NK细胞通过NKp30和NKp46天然细胞毒性受体来阻止成胶质细胞瘤病毒治疗). *Nature Medicine* 18,1827-34 (2012).

[0308] 79.Errington,F.,Jones,J.,Merrick,A.,Bateman,A.,Harrington,K.,Gough,M.,O'Donnell,D.,Selby,P.,Vile,R.和Melcher,A.Fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumour cell fusion activates human dendritic cells for enhanced IL-12production and T-cell priming (促融膜糖蛋白介导的肿瘤细胞融合活化人树突细胞,以增强IL-12生成和T细胞引发). *Gene Ther* 13,138-49 (2006).

[0309] 80.Prestwich,R.J.,Errington,F.,Ilett,E.J.,Morgan,R.S.,Scott,K.J.,Kottke,T.,Thompson,J.,Morrison,E.E.,Harrington,K.J.,Pandha,H.S.,Selby,P.J.,Vile,R.G.和Melcher,A.A.Tumor infection by oncolytic reovirus primes adaptive antitumor immunity (溶瘤呼肠孤病毒的肿瘤感染引发适应性抗肿瘤免疫). *Clinical*

cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 14,7358-66 (2008) .

[0310] 81.Feoktistova,M.,Geserick,P.,Kellert,B.,Dimitrova,D.P.,Langlais,C.,Hupe,M.,Cain,K.,MacFarlane,M.,Hacker,G.和Leverkus,M.ciAPs block Ripoptosome formation,a RIP1/caspase-8containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms (ciAP阻碍Rip蛋白凋亡体形成,一种由cFLIP同种型差异调节的包含胞内细胞死亡复合物的RIP1/半胱天冬酶-8) .Molecular cell 43,449-63 (2011) .

[0311] 82.Sato,S.,Sugiyama,M.,Yamamoto,M.,Watanabe,Y.,Kawai,T.,Takeda,K.和Akira,S.Toll/IL-1receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6and TANK-binding kinase 1,and activates two distinct transcription factors,NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3,in the Toll-like receptor signaling (诱导IFN-β (TRIF) 的含Toll/IL-1受体结构域的适体关联TNF受体相关因子6和TANK结合激酶1,并且活化Toll样受体信号转导中的两种不同的转录因子,NF-κB和IFN-调节因子-3) .Journal of Immunology 171,4304-10 (2003) .

[0312] 83.Jiang,Z.,Mak,T.W.,Sen,G.和Li,X.Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3diverges at Toll-IL-1receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta (NF-κB和IRF3的Toll样受体3介导的活化在诱导IFN-β的含Toll-IL-1受体结构域的适体处脱离) .Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101,3533-8 (2004) .

[0313] 84.Bahar,M.W.,Kenyon,J.C.,Putz,M.M.,Abrescia,N.G.,Pease,J.E.,Wise,E.L.,Stuart,D.I.,Smith,G.L.和Grimes,J.M.Structure and function of A41,a vaccinia virus chemokine binding protein (A41,一种痘苗病毒趋化因子结合蛋白的结构和功能) .PLoS Pathog 4,e5 (2008) .

[0314] 85.Smith,G.L.和Moss,B.Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA (感染性痘病毒载体具有异源DNA的至少25000个碱基对的容量) .Gene 25,21-8 (1983) .

[0315] 86.Jones,S.A.,Scheller,J.和Rose-John,S.Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130signaling (用于IL-6/gp130信号转导的临床阻滞的治疗策略) .The Journal of clinical investigation 121,3375-83 (2011) .

[0316] 87.Chang,C.L.,Ma,B.,Pang,X.,Wu,T.C.和Hung,C.F.Treatment with cyclooxygenase-2inhibitors enables repeated administration of vaccinia virus for control of ovarian cancer (采用环氧酶-2抑制剂的治疗能够重复给予痘苗病毒用于控制卵巢癌) .Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 17,1365-72 (2009) .

[0317] 88.Bernard,M.P.,Bancos,S.,Chapman,T.J.,Ryan,E.P.,Treanor,J.J.,Rose,R.C.,Topham,D.J.和Phipps,R.P.Chronic inhibition of cyclooxygenase-2attenuates antibody responses against vaccinia infection (慢性抑制环氧酶-2削弱针对痘苗感

染的抗体应答). *Vaccine* 28,1363-72 (2010).

[0318] 89.Kalinski,P.Regulation of immune responses by prostaglandin E2 (前列腺素E2的免疫应答的调节). *Journal of Immunology* 188,21-8 (2012).

[0319] 90.Vella,L.A.,Yu,M.,Fuhrmann,S.R.,El-Amine,M.,Epperson,D.E.和Finn,O.J.Healthy individuals have T-cell and antibody responses to the tumor antigen cyclin B1 that when elicited in mice protect from cancer (健康个体具有针对肿瘤抗原细胞周期蛋白B1的T细胞和抗体应答,其在小鼠中引发时保护抵抗癌症). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106,14010-5 (2009).

[0320] 91.Weiss,V.L.,Lee,T.H.,Song,H.,Kouo,T.S.,Black,C.M.,Sgouros,G.,Jaffee,E.M.和Armstrong,T.D.Trafficking of high avidity HER-2/neu-specific T cells into HER-2/neu-expressing tumors after depletion of effector/memory-like regulatory T cells (在效应物/存储样调节性T细胞的缺失后将高亲和力HER-2/neu-特异性T细胞运输进入表达HER-2/neu的肿瘤). *PLoS One* 7,e31962 (2012).

[0321] 92.Ercolini,A.M.,Ladle,B.H.,Manning,E.A.,Pfannenstiel,L.W.,Armstrong,T.D.,Machiels,J.P.,Bieler,J.G.,Emens,L.A.,Reilly,R.T.和Jaffee,E.M.Recruitment of latent pools of high-avidity CD8 (+) T cells to the antitumor immune response (高亲和力CD8 (+) T细胞对抗肿瘤免疫应答的潜伏池的招募). *The Journal of experimental medicine* 201,1591-602 (2005).

[0322] 93.Pulido,J.,Kottke,T.,Thompson,J.,Galivo,F.,Wongthida,P.,Diaz,R.M.,Rommelfanger,D.,Ilett,E.,Pease,L.,Pandha,H.,Harrington,K.,Selby,P.,Melcher,A.和Vile,R.Using virally expressed melanoma cDNA libraries to identify tumor-associated antigens that cure melanoma (采用病毒表达的黑素瘤cDNA文库来鉴定治愈黑素瘤的肿瘤相关的抗原). *Nature biotechnology* 30,337-43 (2012).

[0323] 94.Pol,J.G.,Acuna,S.,Stephenson,K.,Tang,N.,Kazdhan,N.,Bramson,J.L.,McCart,J.A.,Stojdl,D.,Bell,J.,Wan,Y.和Lichty,B.Preclinical Evaluation of an Oncolytic Maraba Virus Vaccine in a Simian Model (溶瘤马拉巴病毒疫苗在猿模型中的临床前评价). 刊于第7届国际溶瘤病毒会议 (魁北克市,2013).

[0324] 95.Belyakov,I.M.和Ahlers,J.D.What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? (免疫途径在抵抗粘膜病原体的保护性免疫中有何作用?) *Journal of Immunology* 183,6883-92 (2009).

[0325] 96.Guy,C.T.,Webster,M.A.,Schaller,M.,Parsons,T.J.,Cardiff,R.D.和Muller,W.J.Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease (neu原癌基因在转基因小鼠的哺乳动物上皮中的表达诱导代谢疾病). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89,10578-82 (1992).

[0326] 97.Tsukamoto,A.S.,Grosschedl,R.,Guzman,R.C.,Parslow,T.和Varmus,H.E.Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary

gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice(int-1基因在转基因小鼠中的表达与雄性与雌性小鼠的乳腺增生和腺癌相关).Cell 55,619-25(1988).

[0327] 98.Kelly,K.J.,Brader,P.,Woo,Y.,Li,S.,Chen,N.,Yu,Y.A.,Szalay,A.A.和Fong,Y.Real-time intraoperative detection of melanoma lymph node metastases using recombinant vaccinia virus GLV-1h68in an immunocompetent animal model.International journal of cancer(采用重组痘苗病毒GLV-1h68在免疫活性动物模型中的黑素瘤淋巴结转移的实时术中检测).Journal international du cancer 124,911-8(2009).

[0328] 99.Eisenberg,D.P.,Adusumilli,P.S.,Hendershott,K.J.,Chung,S.,Yu,Z.,Chan,M.K.,Hezel,M.,Wong,R.J.和Fong,Y.Real-time intraoperative detection of breast cancer axillary lymph node metastases using a green fluorescent protein-expressing herpes virus(采用表达绿色荧光蛋白的疱疹病毒的乳腺癌腋窝淋巴结转移的实时术中检测).Annals of surgery 243,824-30;discussion 830-2(2006).

[0329] 100.Brader,P.,Kelly,K.,Gang,S.,Shah,J.P.,Wong,R.J.,Hricak,H.,Blasberg,R.G.,Fong,Y.和Gil,Z.Imaging of lymph node micrometastases using an oncolytic herpes virus and[F]FEAU(采用溶瘤疱疹病毒和[F]FEAU的淋巴结微转移成像)PET.PLoS One 4,e4789(2009).

[0330] 101.Kim,P.S.,Armstrong,T.D.,Song,H.,Wolpoe,M.E.,Weiss,V.,Manning,E.A.,Huang,L.Q.,Murata,S.,Sgouros,G.,Emens,L.A.,Reilly,R.T.和Jaffee,E.M.Antibody association with HER-2/neu-targeted vaccine enhances CD8T cell responses in mice through Fc-mediated activation of DCs(与HER-2/neu靶向的疫苗相关的抗体通过Fc介导的DC活化来增强小鼠中的CD8T细胞应答).The Journal of clinical investigation118,1700-11(2008).

[0331] 102.Le,D.T.,Ladle,B.H.,Lee,T.,Weiss,V.,Yao,X.,Leubner,A.,Armstrong,T.D.和Jaffee,E.M.CD8(+)Foxp3(+) tumor infiltrating lymphocytes accumulate in the context of an effective anti-tumor response(CD8(+)Foxp3(+)肿瘤浸润淋巴细胞在有效抗肿瘤应答中累积).International journal of cancer.Journal international du cancer 129,636-47(2011).

[0332] 103.Chen,H.,Sampath,P.,Hou,W.和Thorne,S.H.Regulating cytokine function enhances safety and activity of genetic cancer therapies(调节细胞因子功能增强遗传学癌治疗的安全性和活性).Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 21,167-74(2013).

[0333] 104.Green,D.R.,Ferguson,T.,Zitvogel,L.和Kroemer,G.Immunogenic and tolerogenic cell death(免疫原性和耐受性细胞死亡).Nature reviews.Immunology 9,353-63(2009).

[0334] 105.Workenhe,S.T.,Pol,J.G.,Lichty,B.D.,Cummings,D.T.和Mossman,K.L.Mitoxantrone synergizes with oncolytic herpes simplex virus to regress established breast tumors in part by increasing recruitment of CD8+T cells(米托蒽醌与溶瘤疱疹单纯病毒部分通过增加CD8+T细胞招募来协同复原建立的乳腺肿瘤).刊

于第7届国际溶瘤病毒会议(魁北克市,2013)。

[0335] 106.Fujita,M.,Kohanbash,G.,Fellows-Mayle,W.,Hamilton,R.L.,Komohara,Y.,Decker,S.A.,Ohlfest,J.R.和Okada,H.COX-2blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells (COX-2阻滞通过抑制髓源性移植细胞来抑制胶质瘤形成).Cancer Research 71,2664-74 (2011)。

[0336] 107.Godin-Ethier,J.,Hanafi,L.A.,Piccirillo,C.A.和Lapointe,R.Indoleamine2,3-dioxygenase expression in human cancers:clinical and immunologic perspectives (人类癌症中的吲哚胺2,3-加双氧酶表达:临床和免疫学方面).Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 17,6985-91 (2011)。

[0337] 108.Terajima,M.和Leporati,A.M.Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Antiviral Activity of Interferon-gamma Against Vaccinia Virus (吲哚胺2,3-加双氧酶在针对痘苗病毒的干扰素 γ 抗病毒活性中的作用).Viral immunology 18,722-9 (2005)。

[0338] 109.Galon,J.,Costes,A.,Sanchez-Cabo,F.,Kirilovsky,A.,Mlecnik,B.,Lagorce-Pages,C.,Tosolini,M.,Camus,M.,Berger,A.,Wind,P.,Zinzindohoue,F.,Bruneval,P.,Cugnenc,P.H.,Trajanoski,Z.,Fridman,W.H.和Pages,F.Type,density,and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome (免疫细胞在人类结直肠肿瘤中的类型、密度和位置预测临床结果).Science 313,1960-4 (2006)。

[0339] 110.Parato,K.A.,Breitbach,C.J.,Le Boeuf,F.,Wang,J.,Storbeck,C.,Ilkow,C.,Diallo,J.S.,Falls,T.,Burns,J.,Garcia,V.,Kanji,F.,Evgin,L.,Hu,K.,Paradis,F.,Knowles,S.,Hwang,T.H.,Vanderhyden,B.C.,Auer,R.,Kirn,D.H.和Bell,J.C.The oncolytic poxvirus JX-594selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers (溶瘤痘病毒JX-594在癌细胞中选择性复制并通过癌症中常规活化的遗传通路驱动摧毁癌细胞).Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 20,749-58 (2012)。

[0340] 111.Visus,C.,Wang,Y.,Lozano-Leon,A.,Ferris,R.L.,Silver,S.,Szczepanski,M.J.,Brand,R.E.,Ferrone,C.R.,Whiteside,T.L.,Ferrone,S.,DeLeo,A.B.和Wang,X.Targeting ALDH (bright) human carcinoma-initiating cells with ALDH1A1-specific CD8 (+) T cells (用ALDH1A1-特异性CD8 (+) T细胞靶向ALDH(亮)人类癌症起始细胞).Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 17,6174-84 (2011)。

[0341] 112.Silva,I.A.,Bai,S.,McLean,K.,Yang,K.,Griffith,K.,Thomas,D.,Ginestier,C.,Johnston,C.,Kueck,A.,Reynolds,R.K.,Wicha,M.S.和Buckanovich,R.J.Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival (醛脱氢酶与CD133联用确定预示较差患者存活的血管生成型卵巢癌干细胞).Cancer Research 71,3991-4001 (2011)。

[0342] 113. Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D. 和 Wicha, M.S. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature (乳腺癌细胞系包含具有转移能力和独特分子签名的功能性癌干细胞). *Cancer Research* 69, 1302-13 (2009).

[0343] 114. Ning, N., Pan, Q., Zheng, F., Teitz-Tennenbaum, S., Egenti, M., Yet, J., Li, M., Ginestier, C., Wicha, M.S., Moyer, J.S., Prince, M.E., Xu, Y., Zhang, X.L., Huang, S., Chang, A.E. 和 Li, Q. Cancer stem cell vaccination confers significant antitumor immunity (癌症干细胞疫苗接种提供显著抗肿瘤免疫力). *Cancer Research* 72, 1853-64 (2012).

[0344] 115. Cho, R.W., Wang, X., Diehn, M., Shedden, K., Chen, G.Y., Sherlock, G., Gurney, A., Lewicki, J. 和 Clarke, M.F. Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors (MMTV-Wnt-1 鼠乳腺肿瘤中癌症干细胞的分离和分子表征). *Stem Cells* 26, 364-71 (2008).

[0345] 116. Ginestier, C., Liu, S., Diebel, M.E., Korkaya, H., Luo, M., Brown, M., Wicinski, J., Cabaud, O., Charafe-Jauffret, E., Birnbaum, D., Guan, J.L., Dontu, G. 和 Wicha, M.S. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts (CXCR1 阻滞在体外和异种移植物中选择性靶标人乳腺癌干细胞). *The Journal of clinical investigation* 120, 485-97 (2010).

[0346] 通过引用, 将本文引用的各种发表物的全部内容纳入本文。

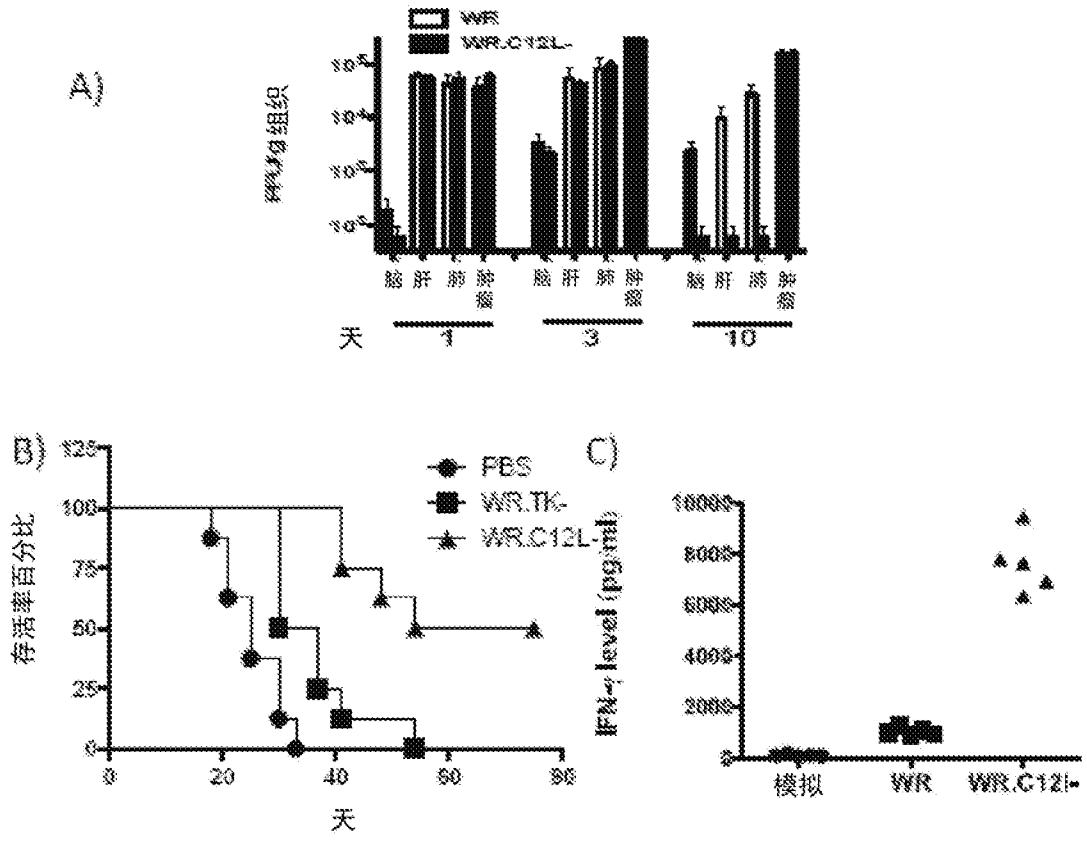


图1A-C

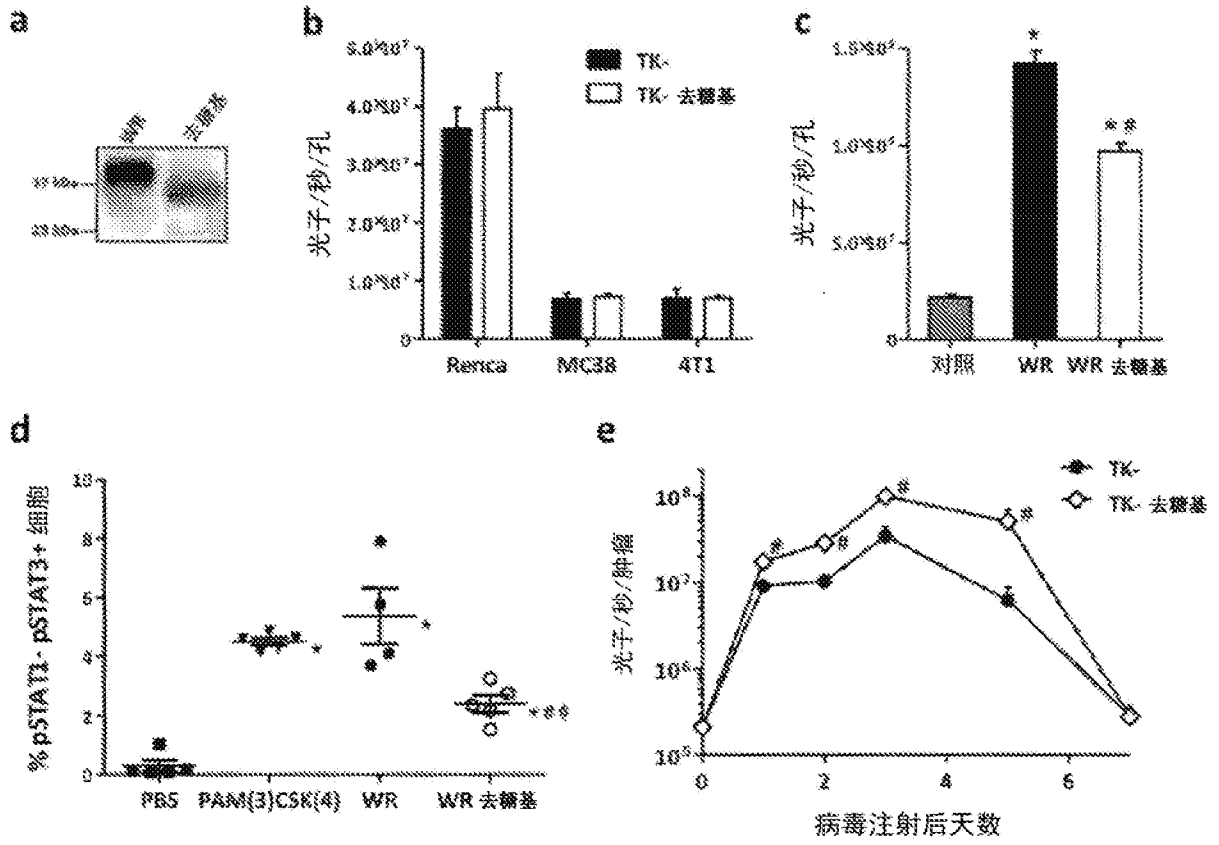


图2A-E

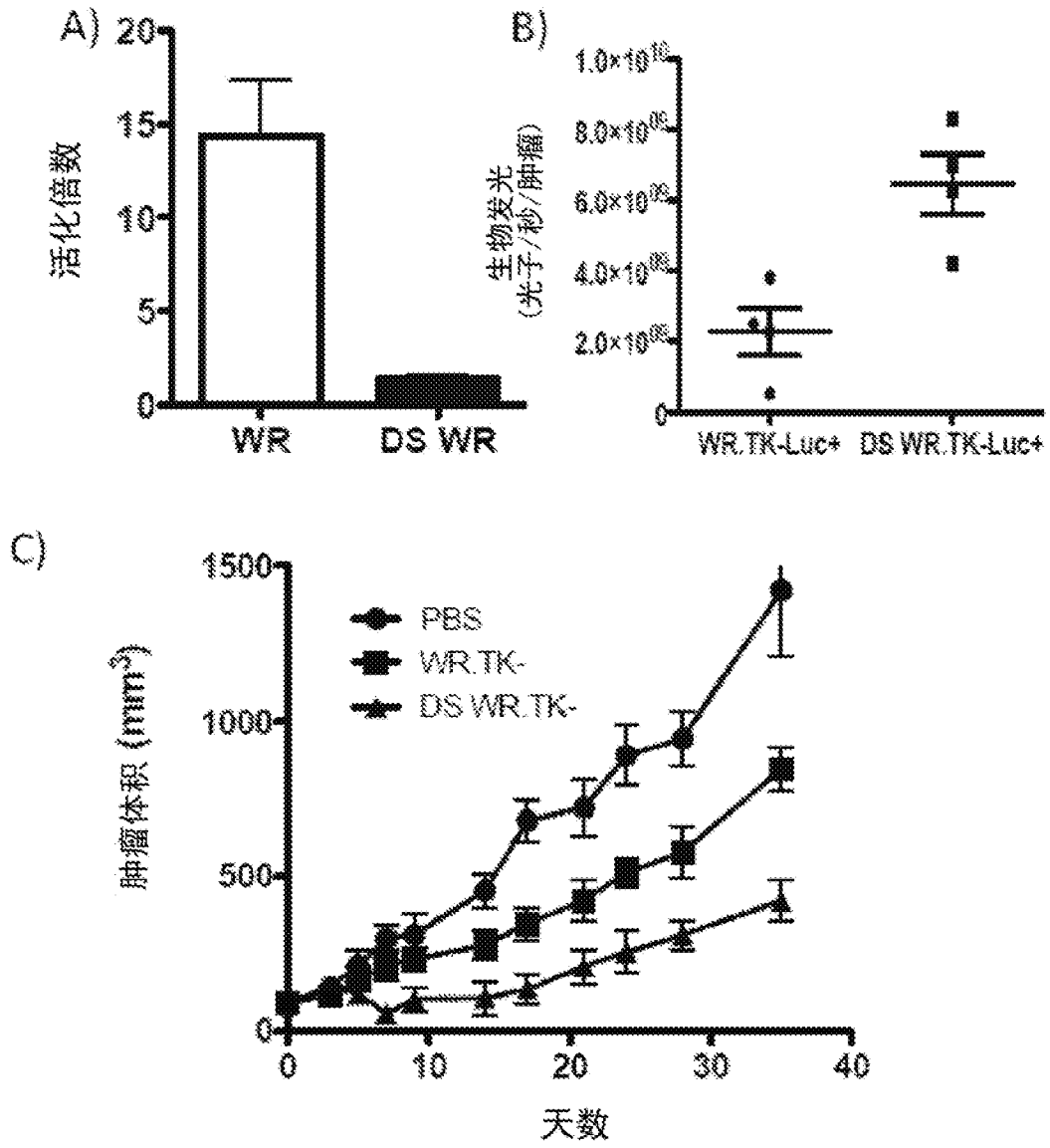


图3A-C

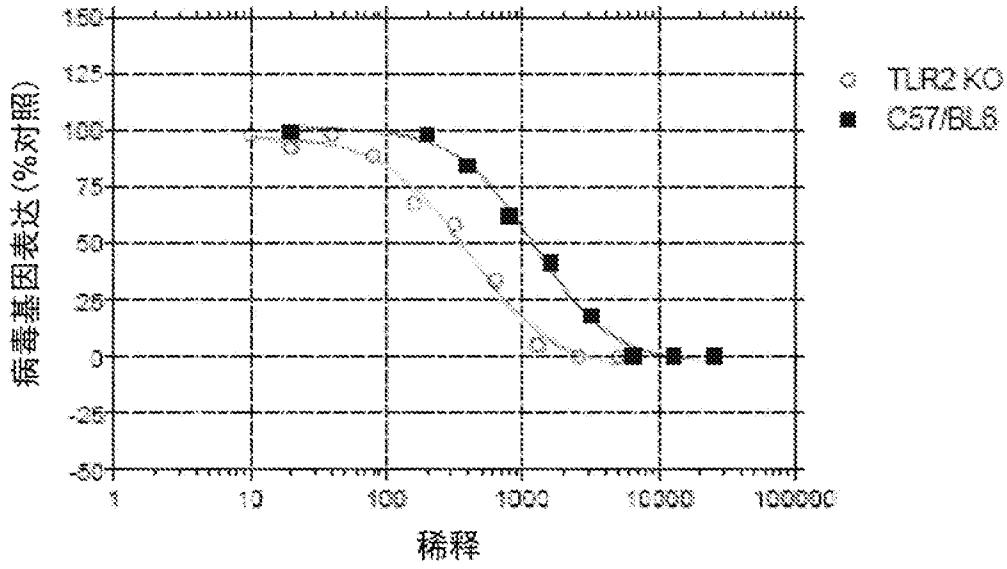


图3D

TK-TRIF

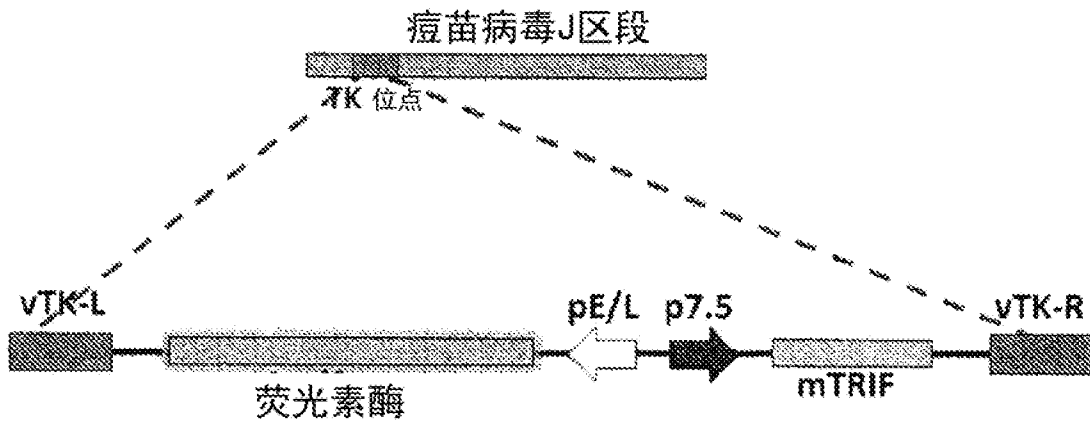


图4A

TK-DAI

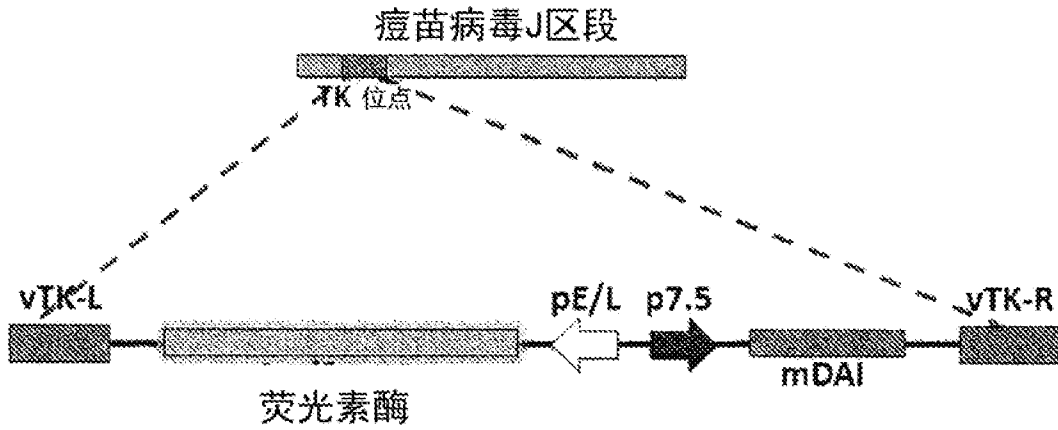


图4A (续)

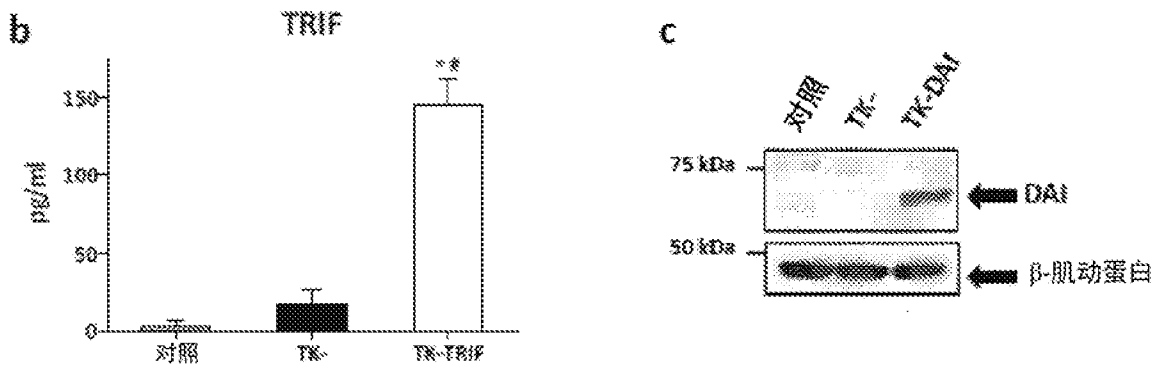


图4B-C

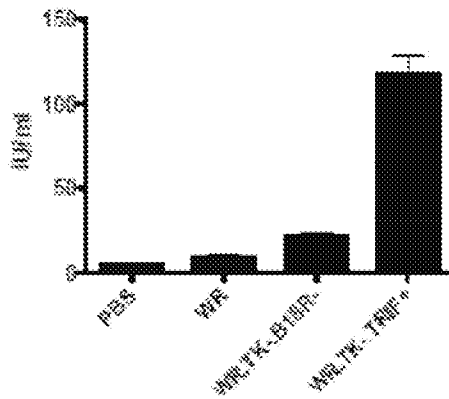


图5A

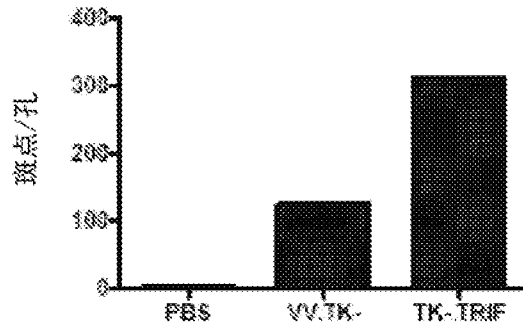


图5B

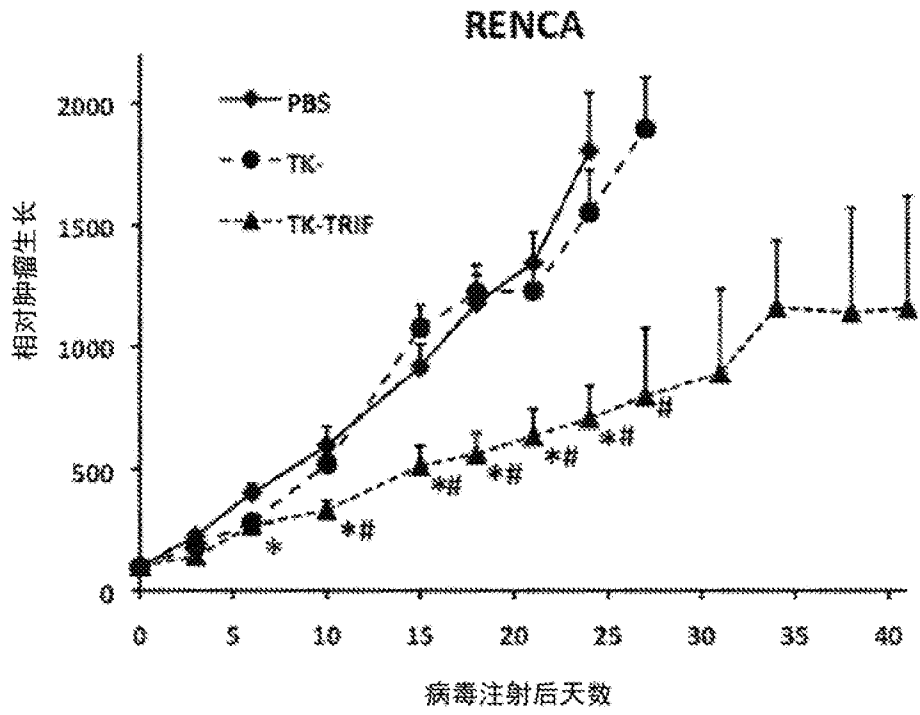


图5C

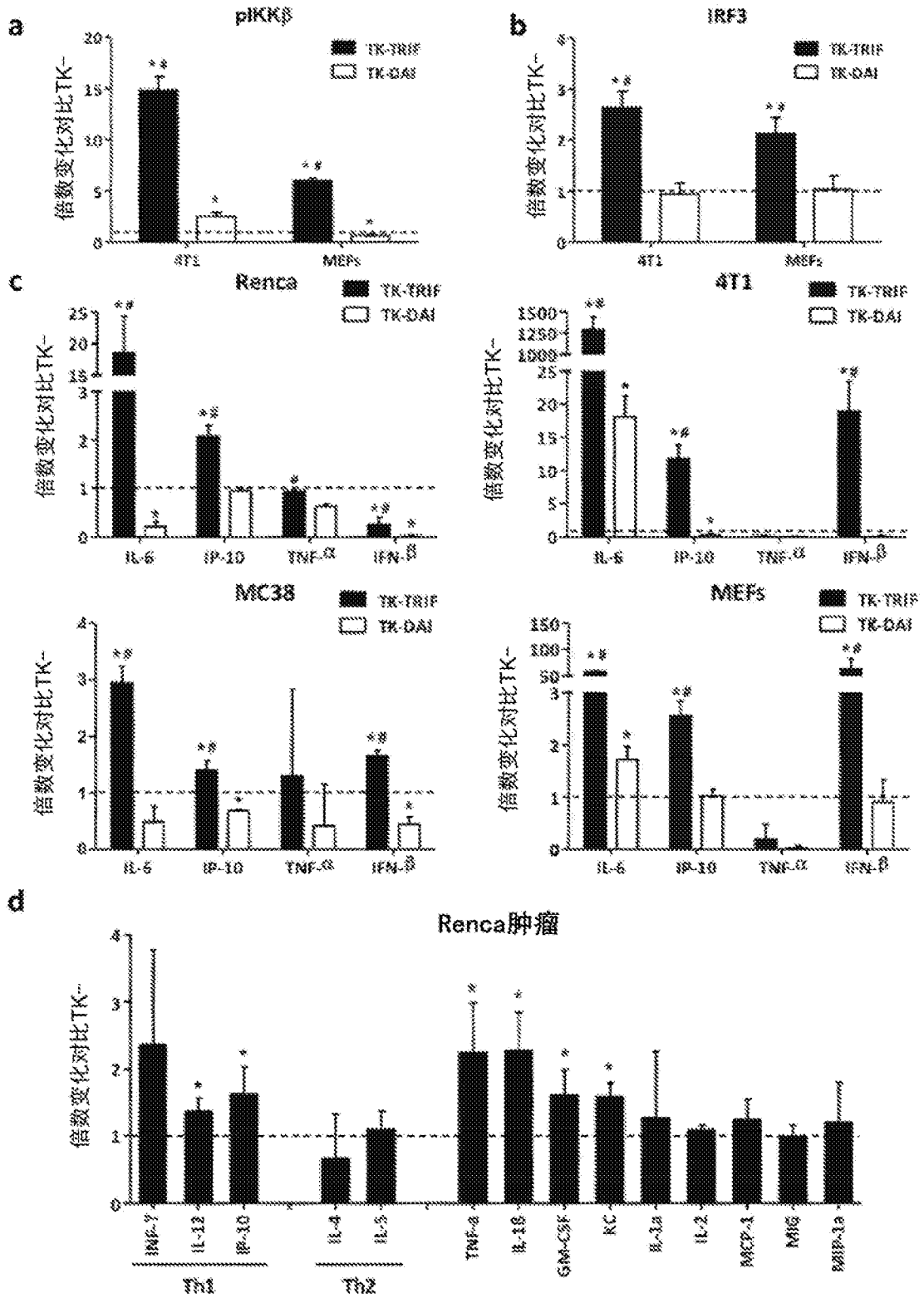


图6A-D

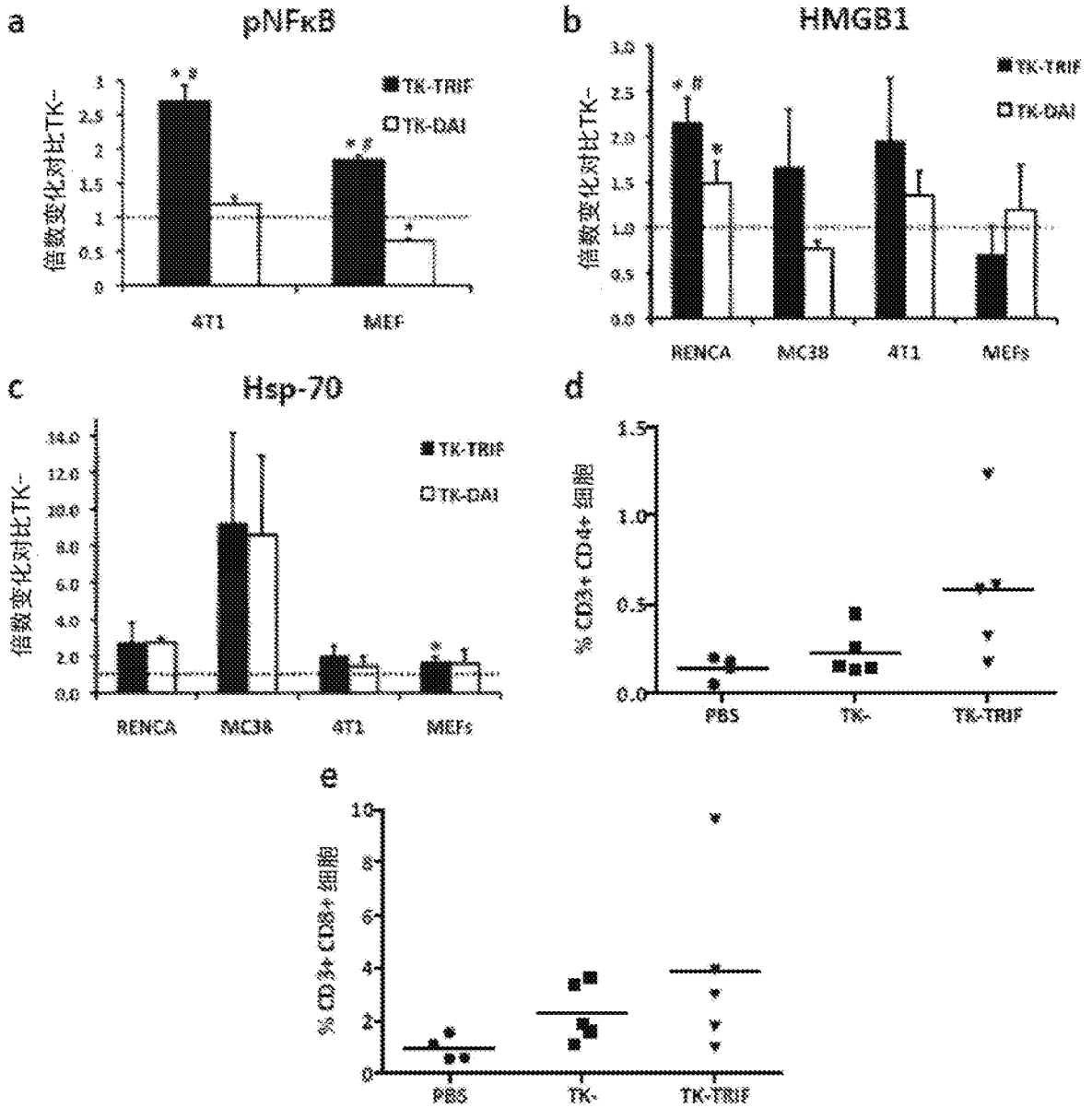


图7A-E

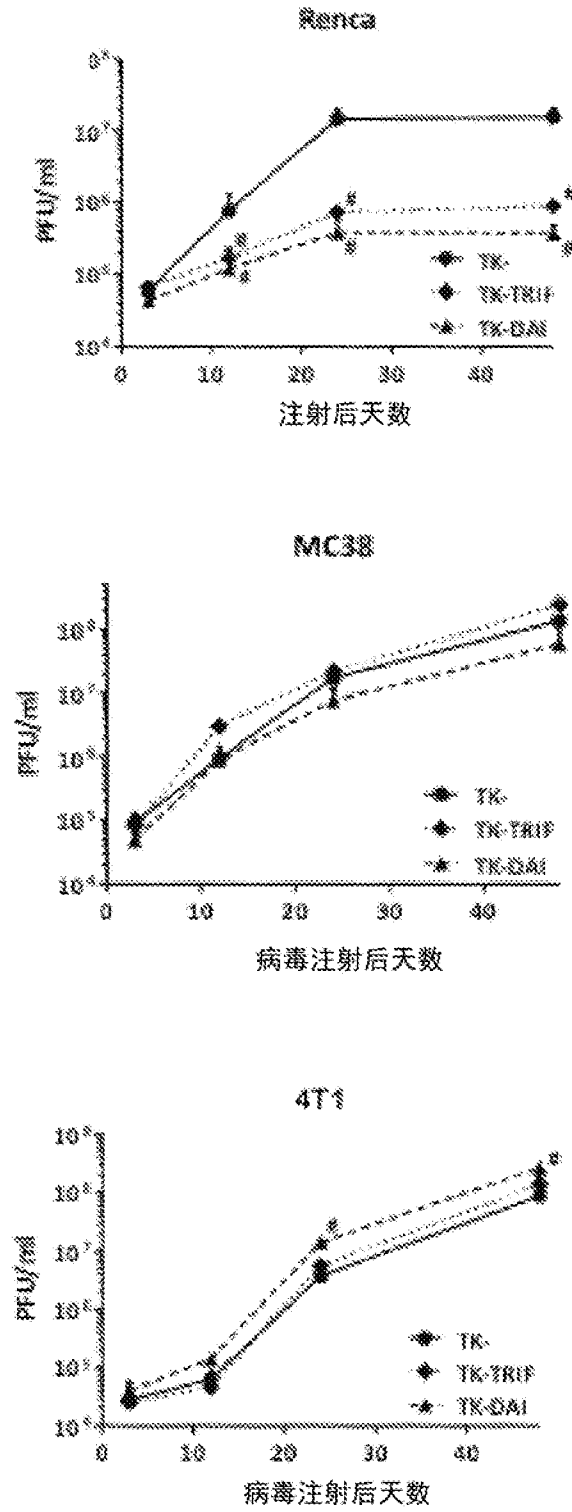


图8A

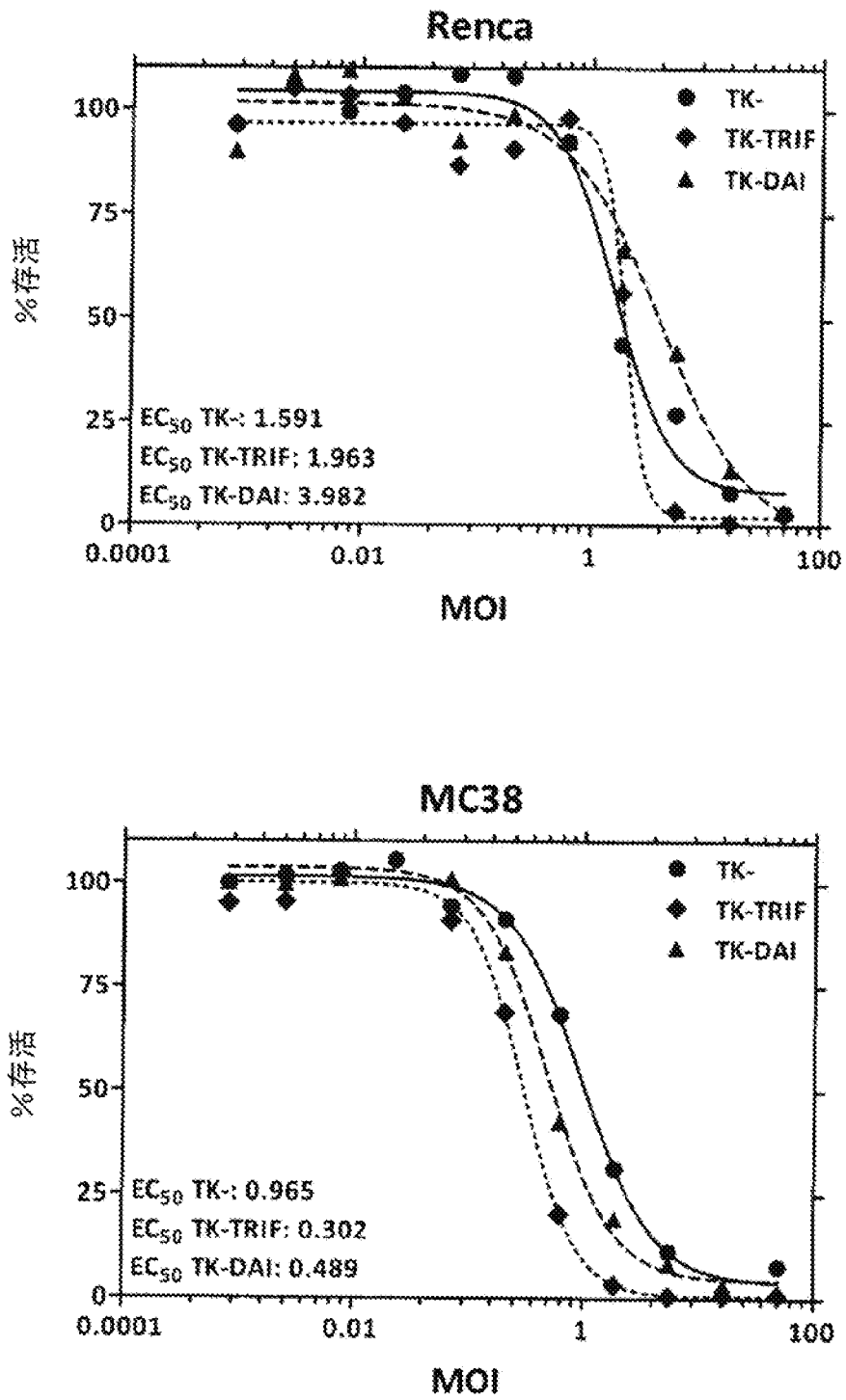


图8B

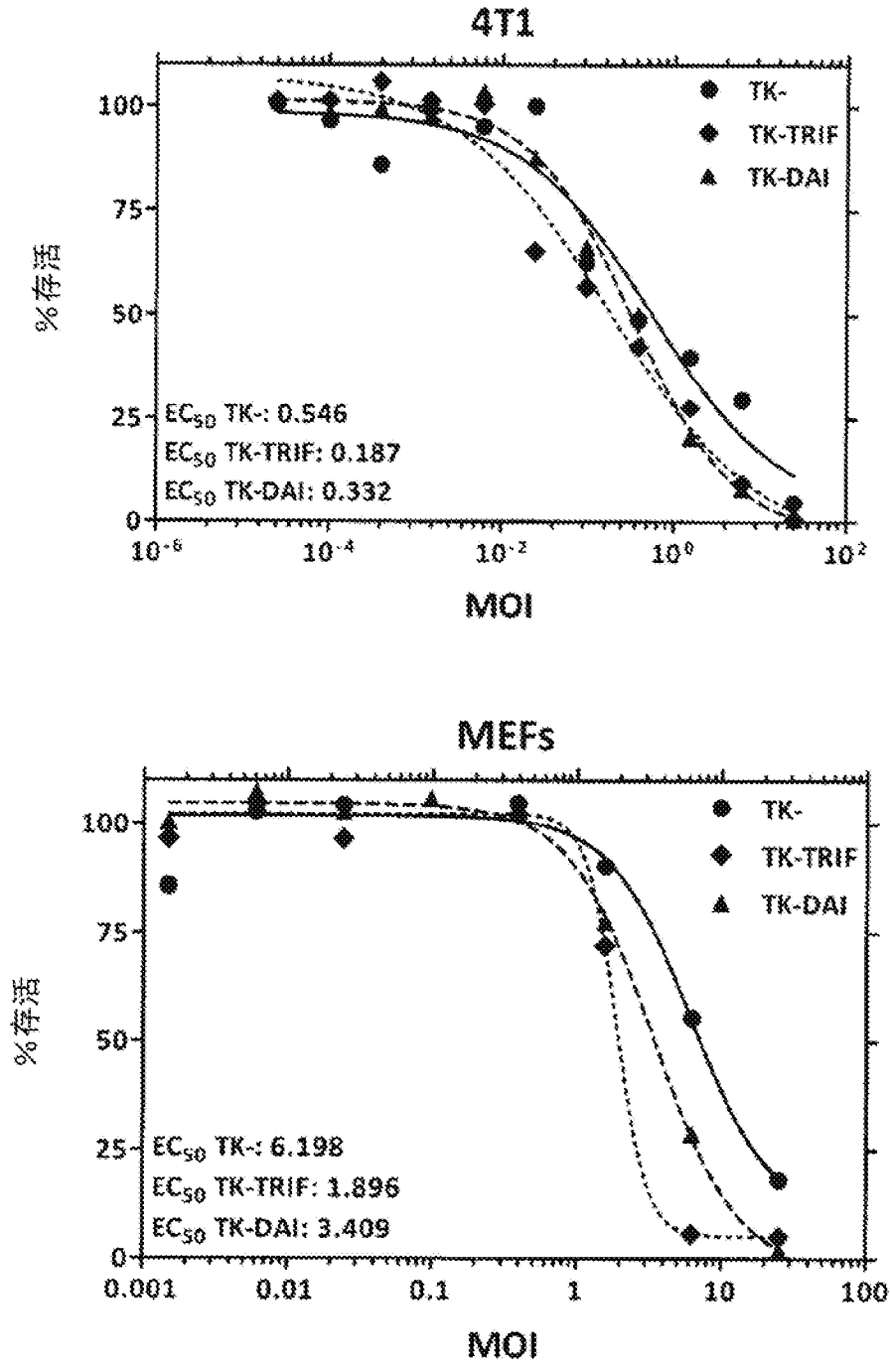


图8B(续)

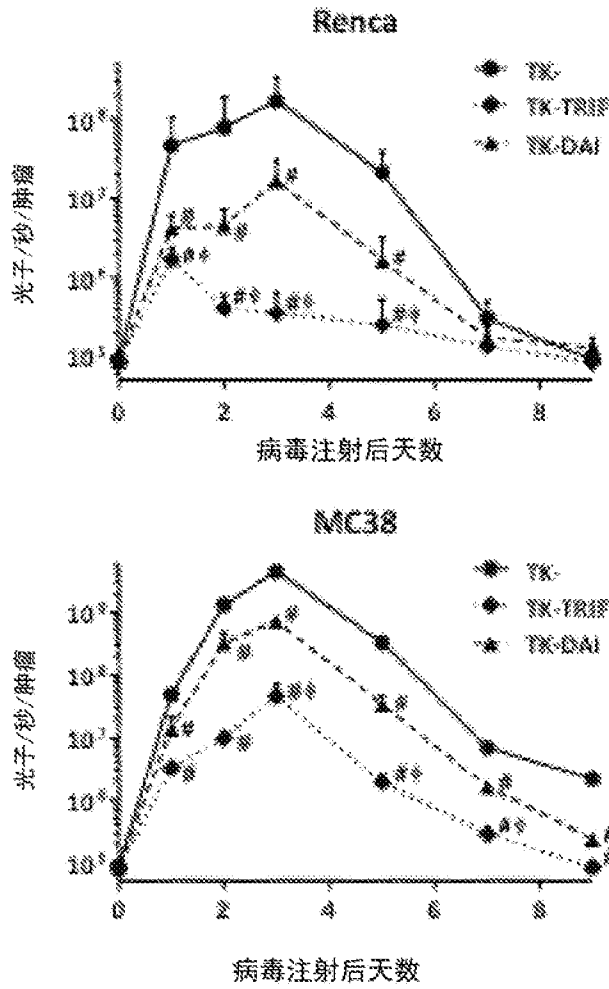


图8C

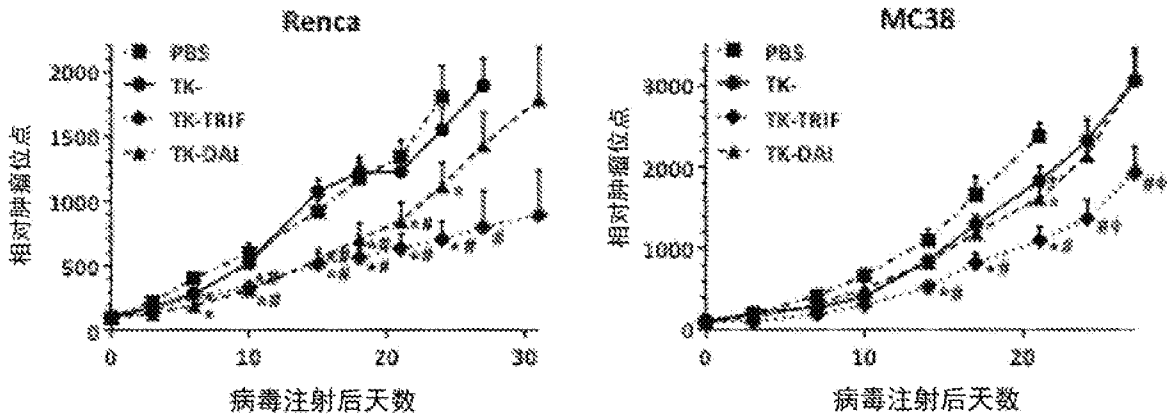


图8D

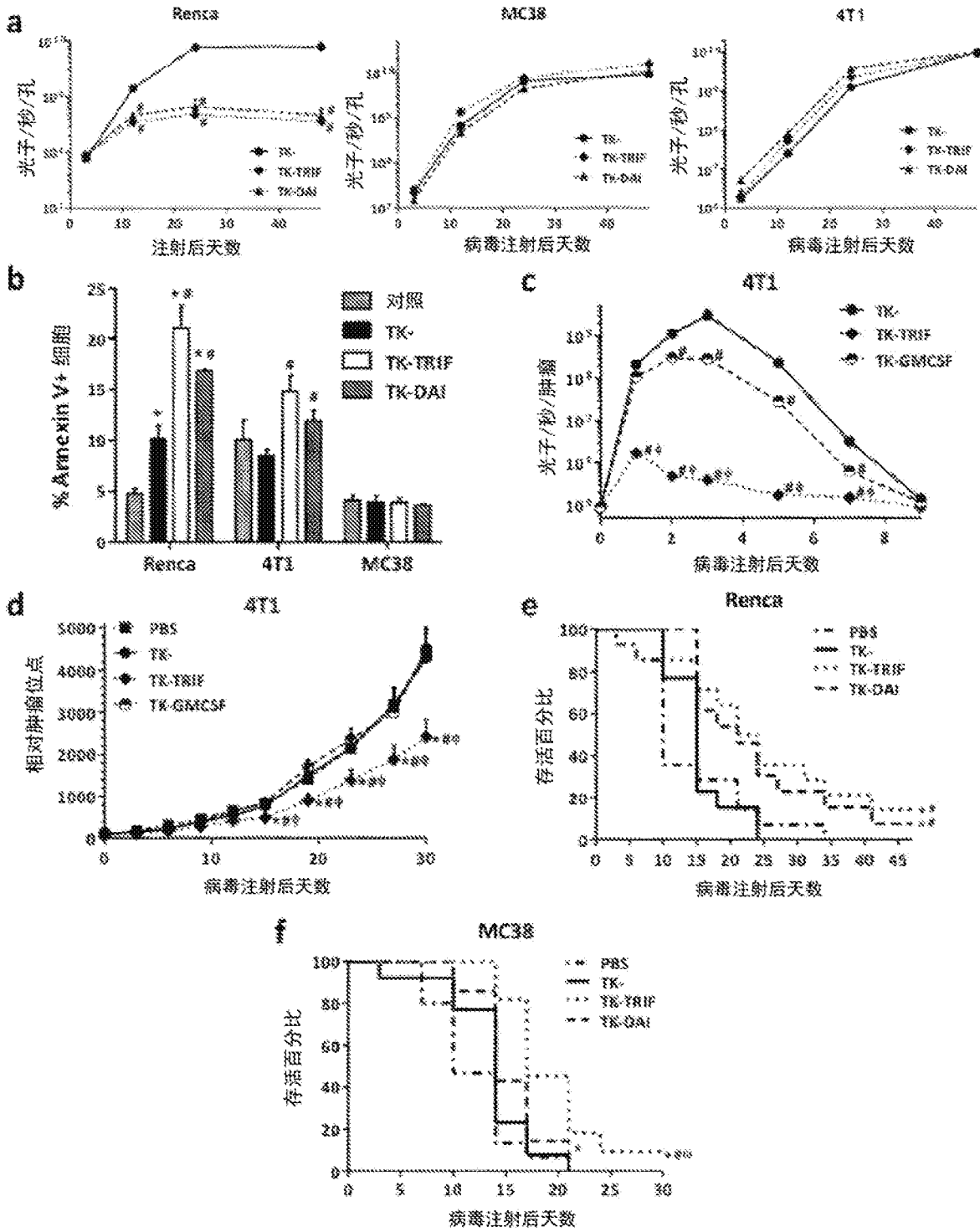


图9A-F

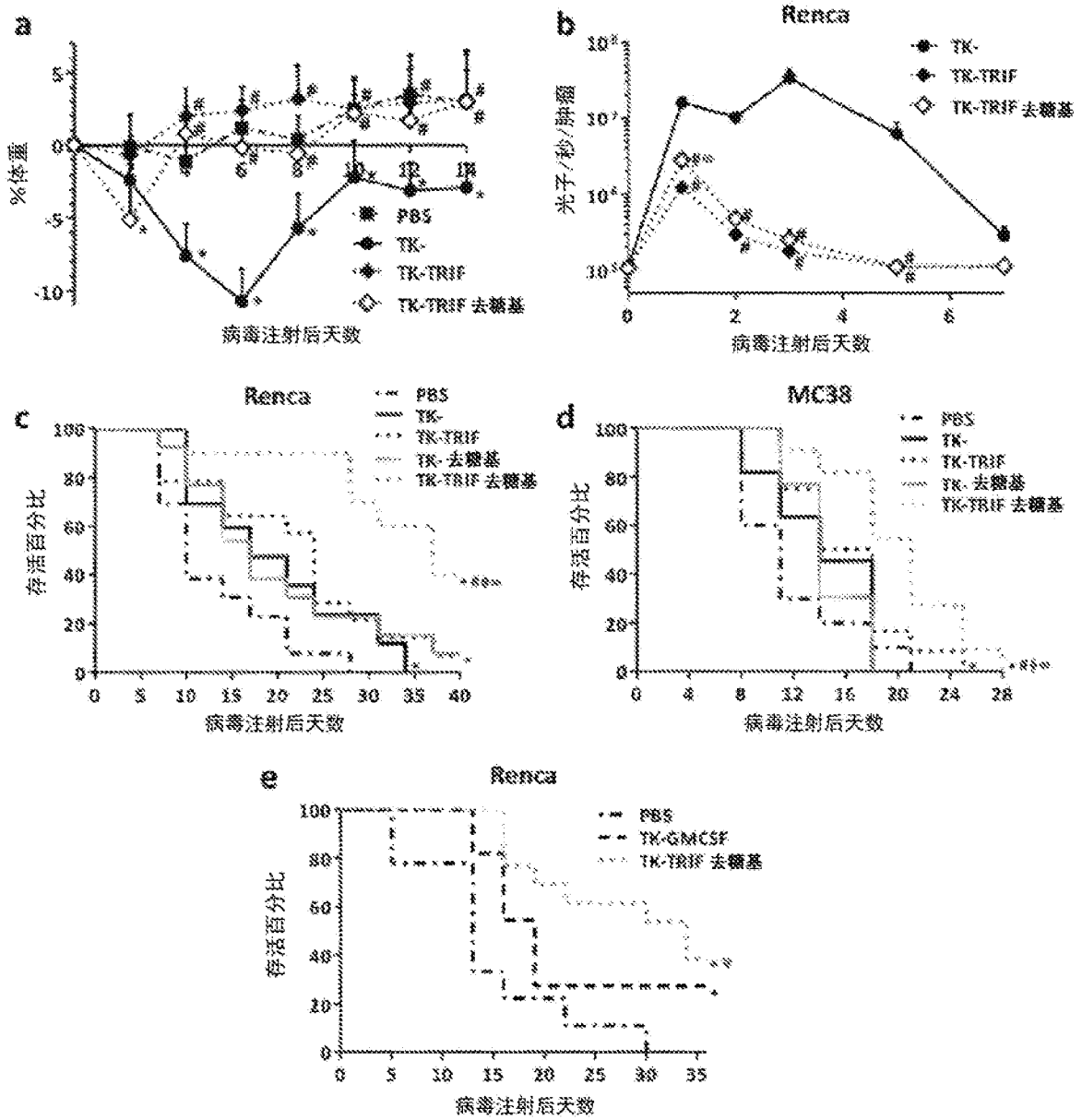


图10A-E

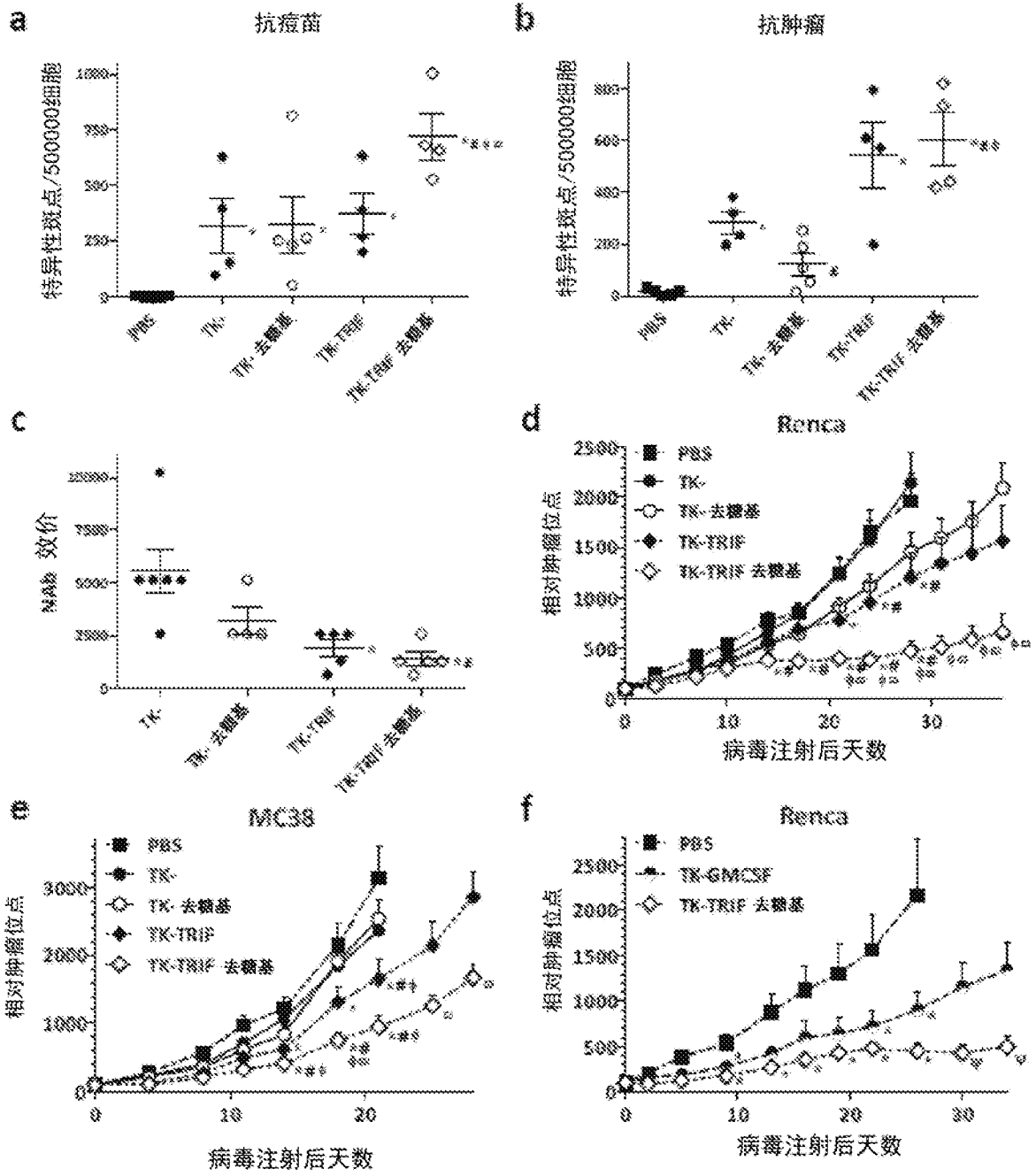


图11A-F

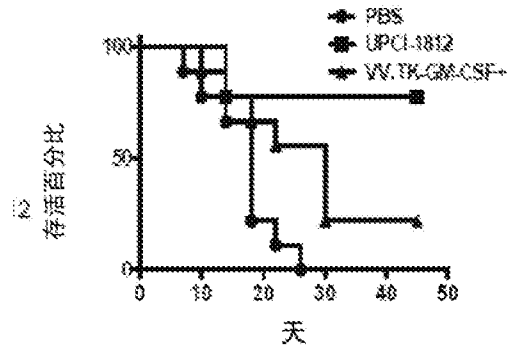


图12A

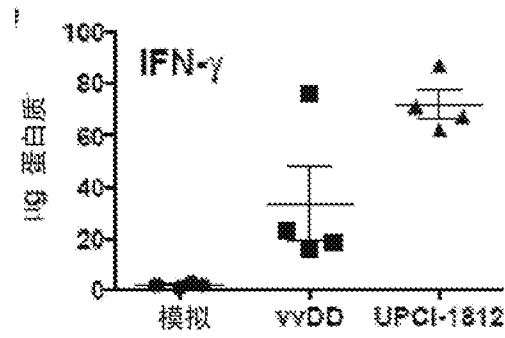


图12B

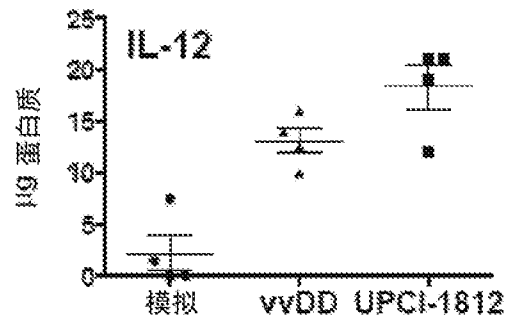


图12C

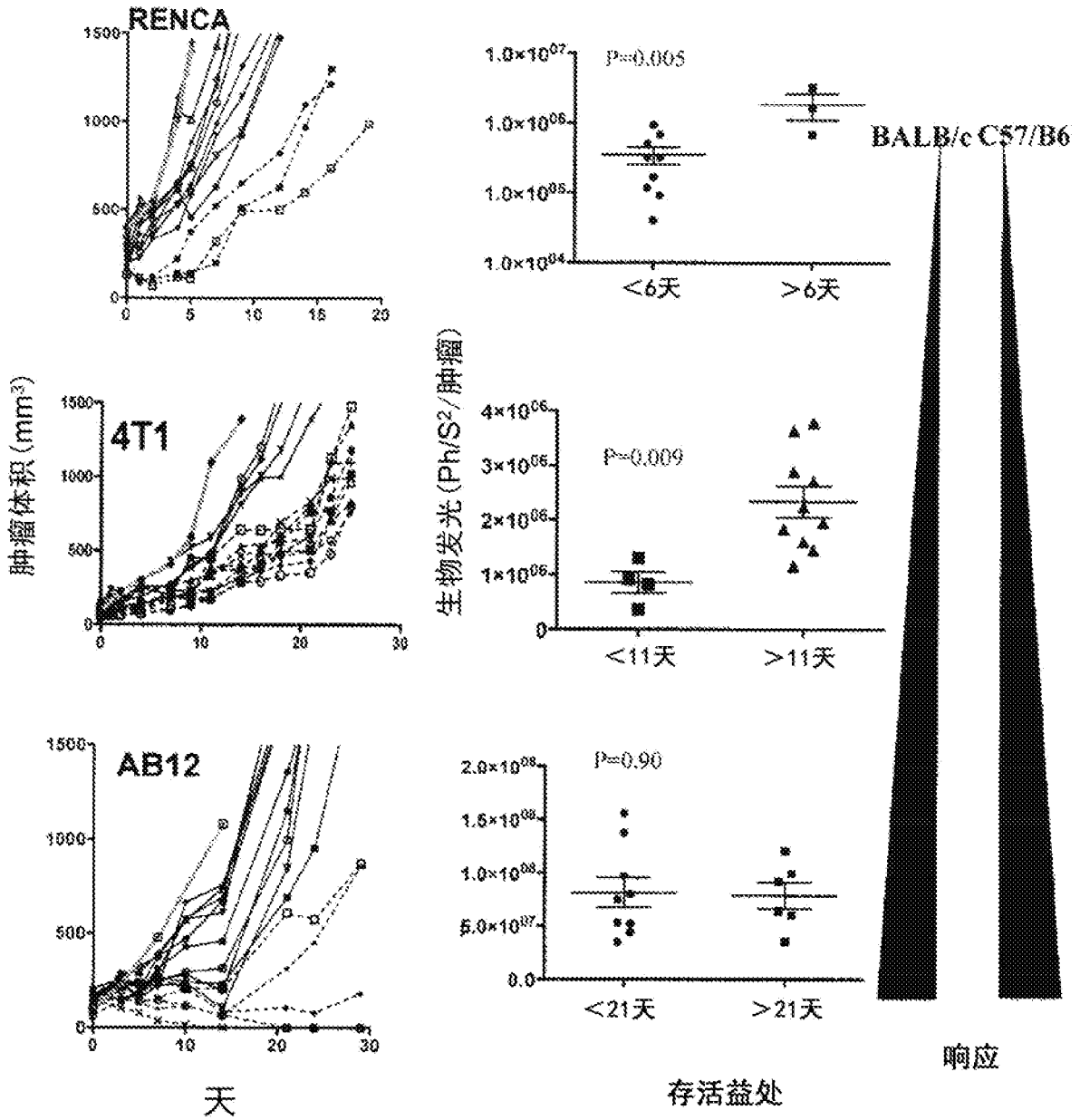


图13B

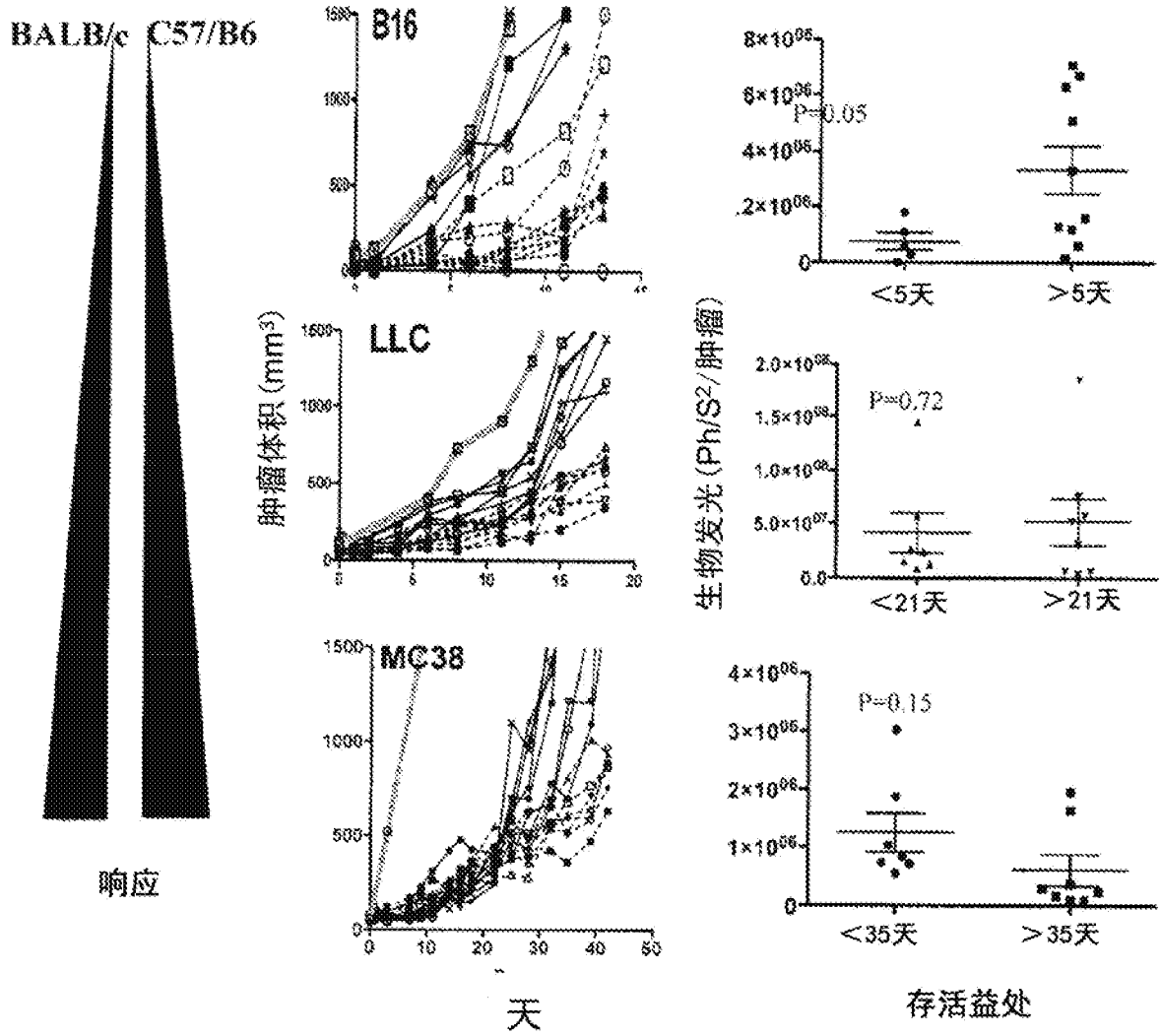


图13B(续)

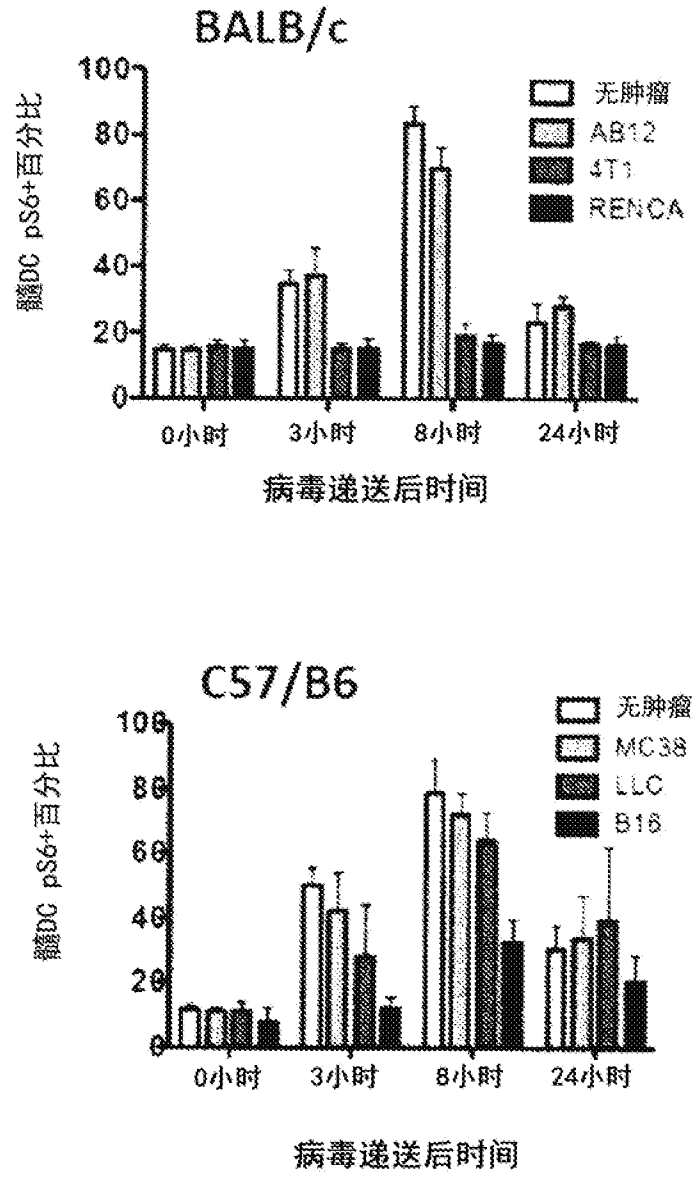


图13C

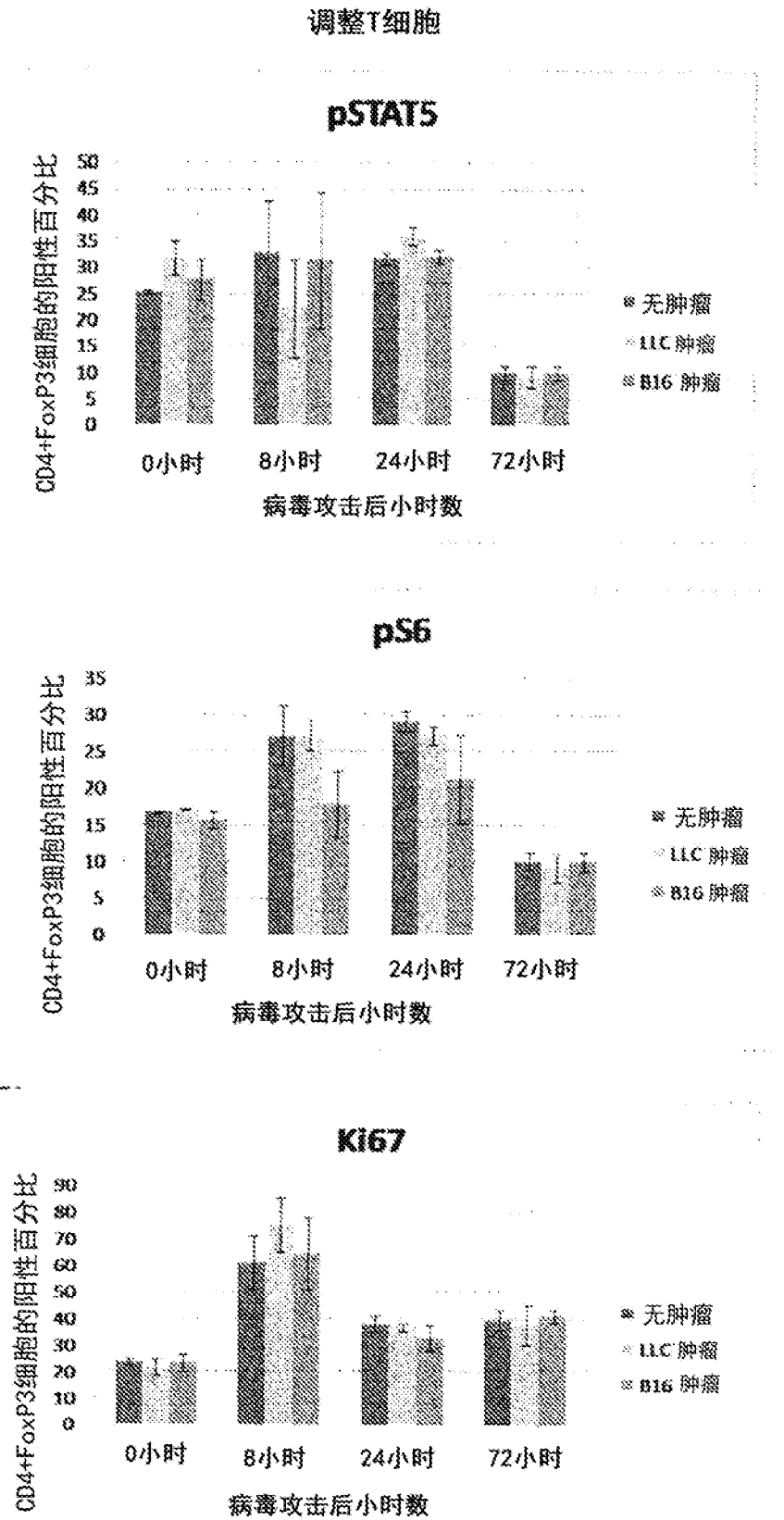


图14A

CD4+ T-CELLS

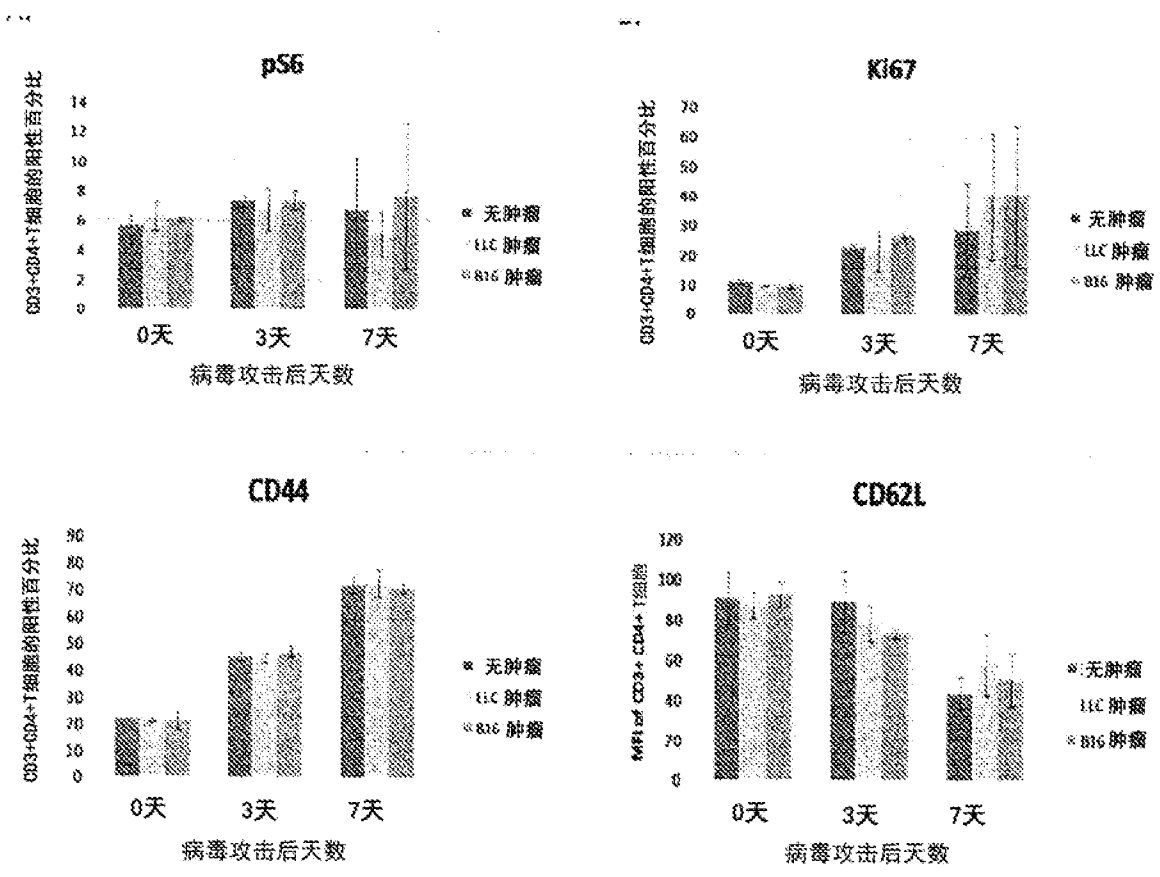


图14A (续)

CD8+ T-CELLS

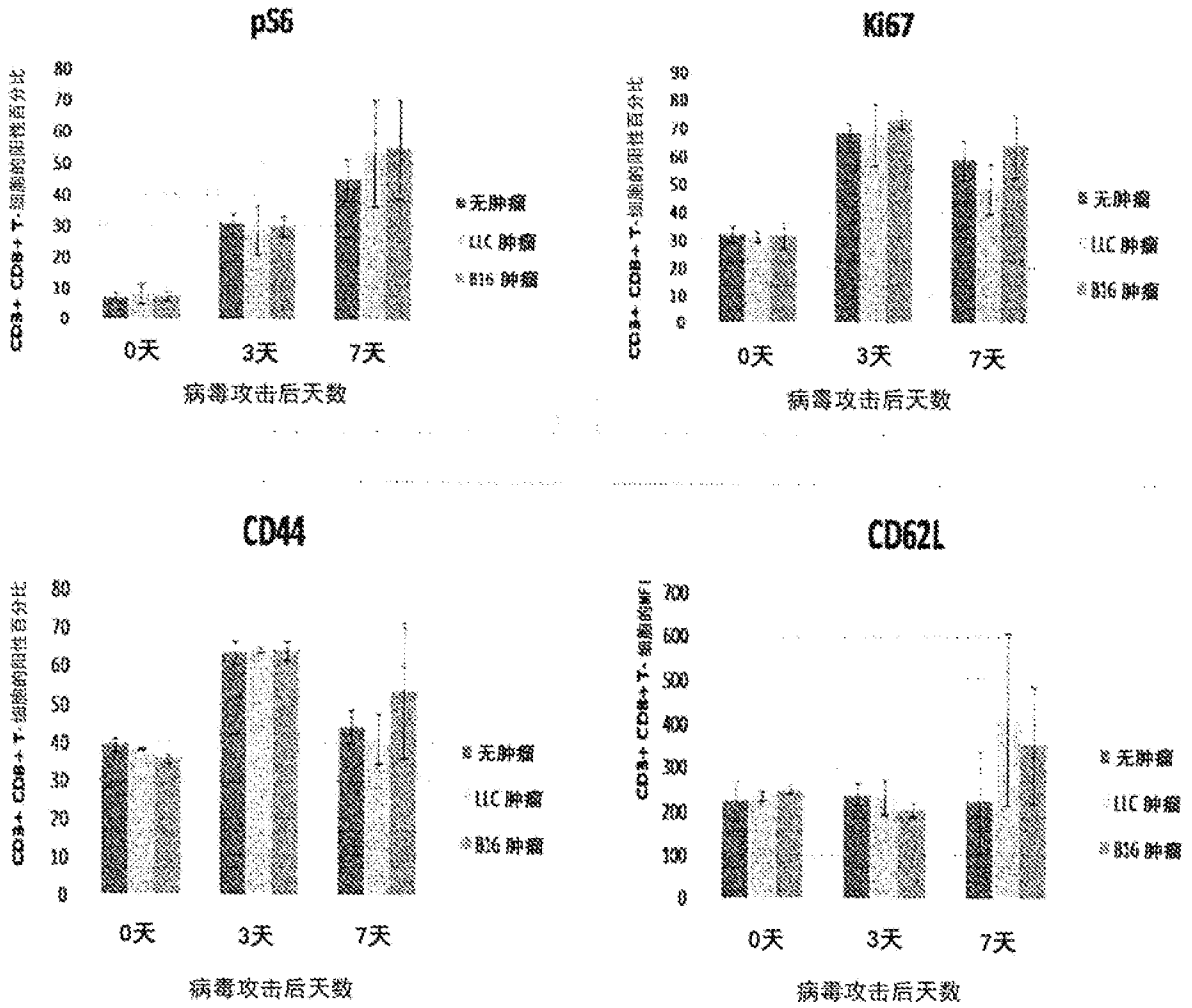


图14A (续)

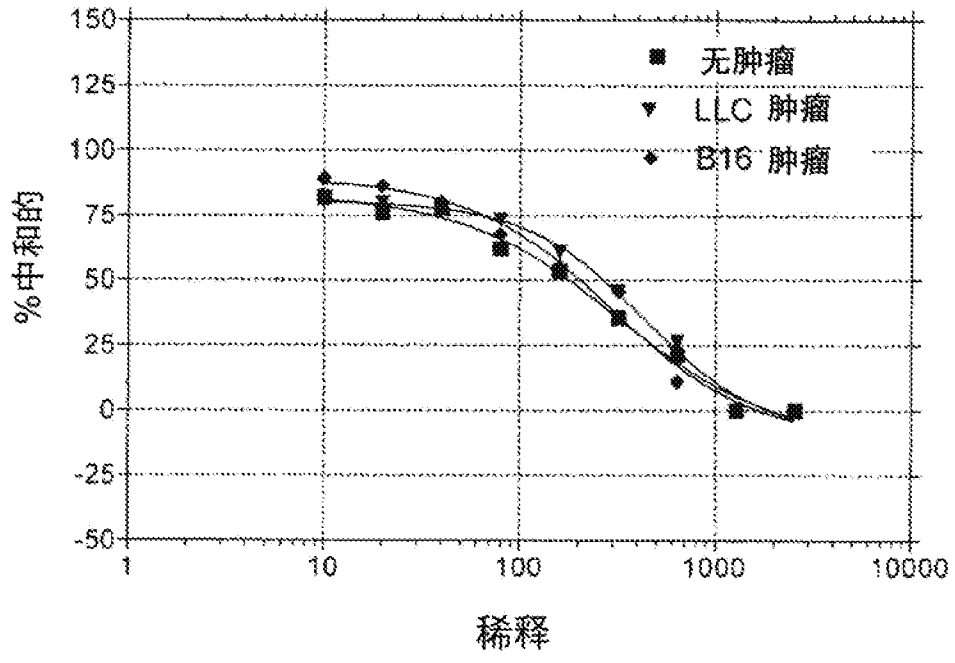


图14B

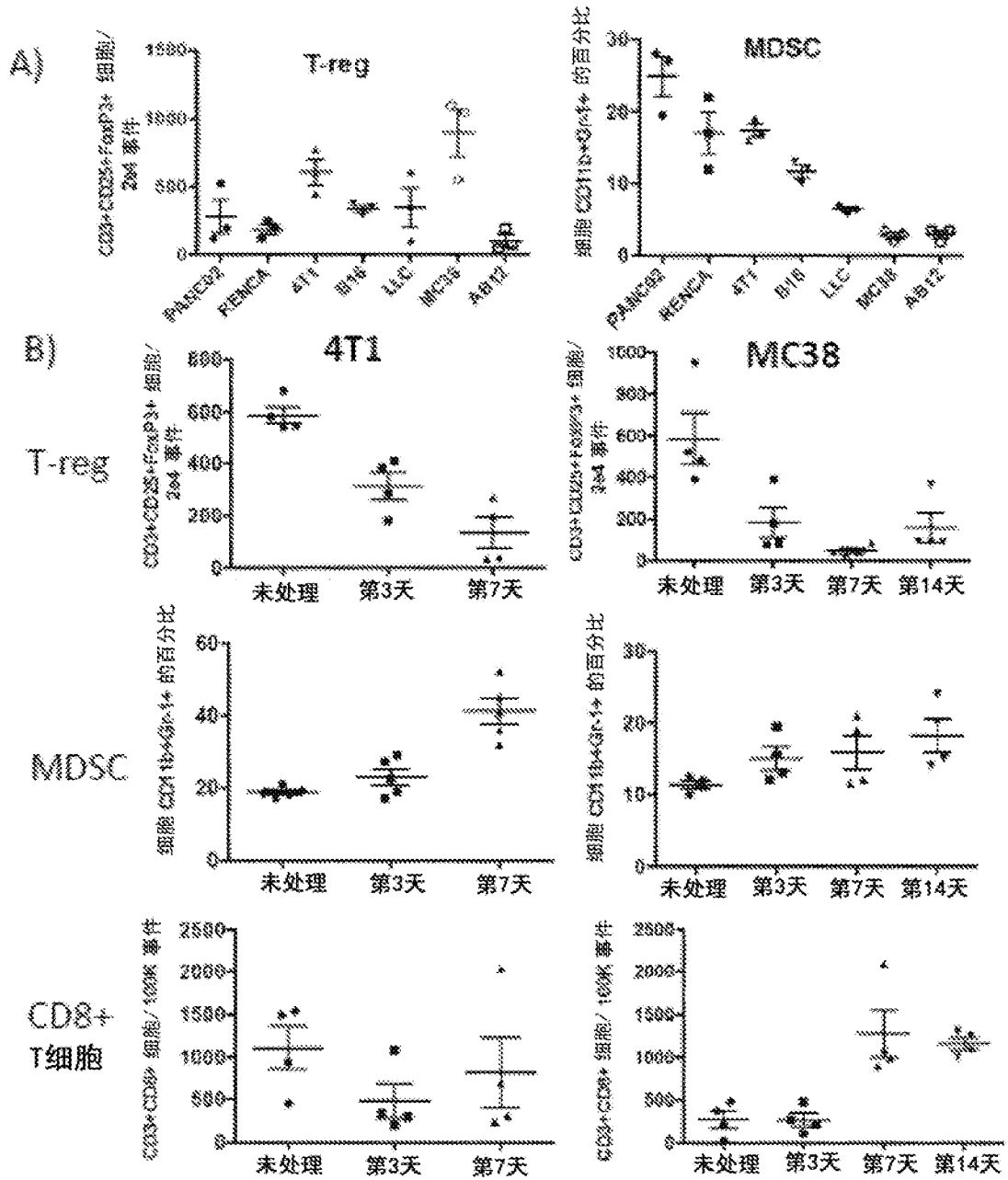


图15A-B

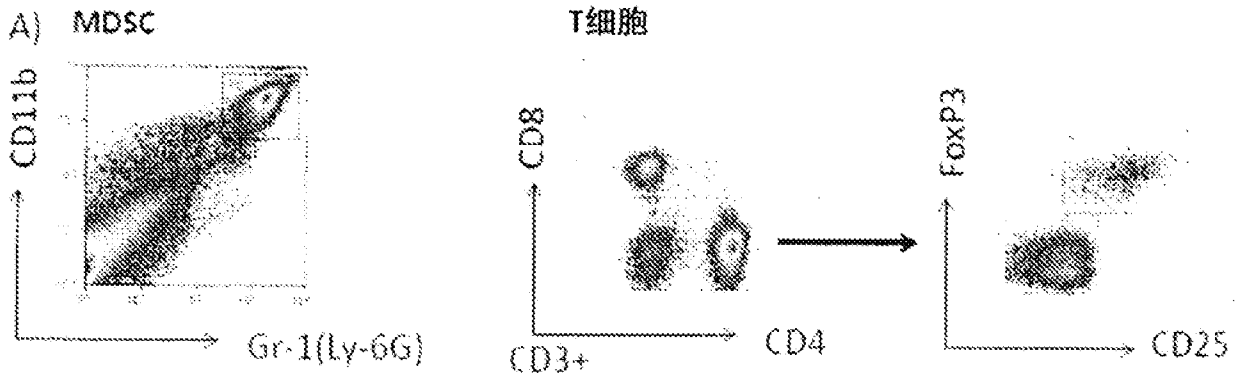


图16A

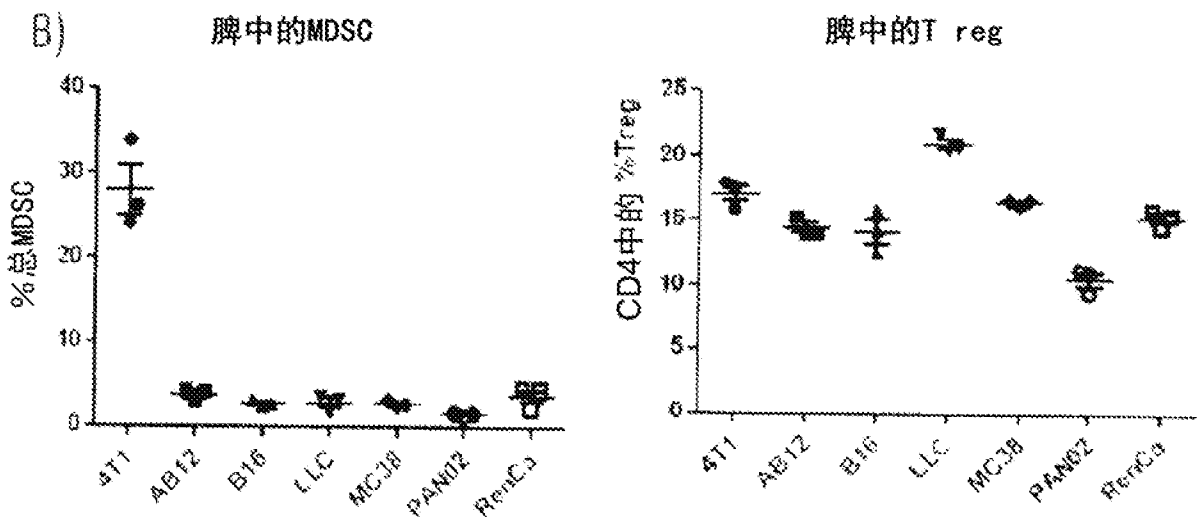


图16B

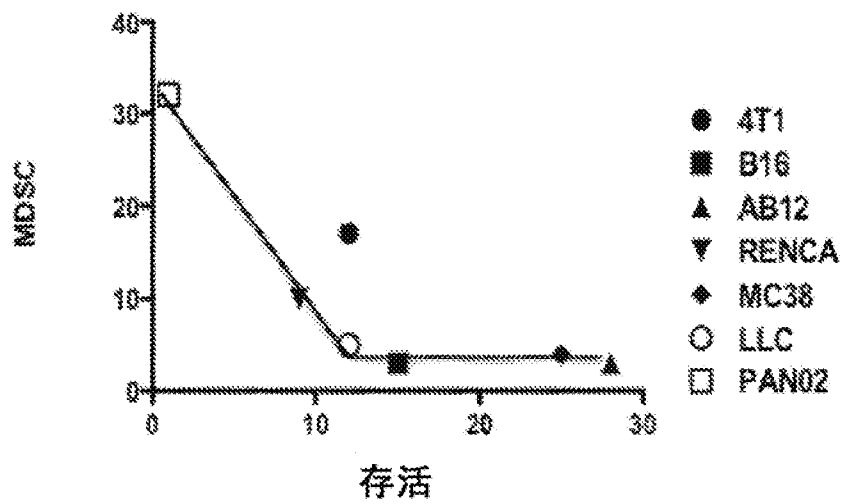


图17A

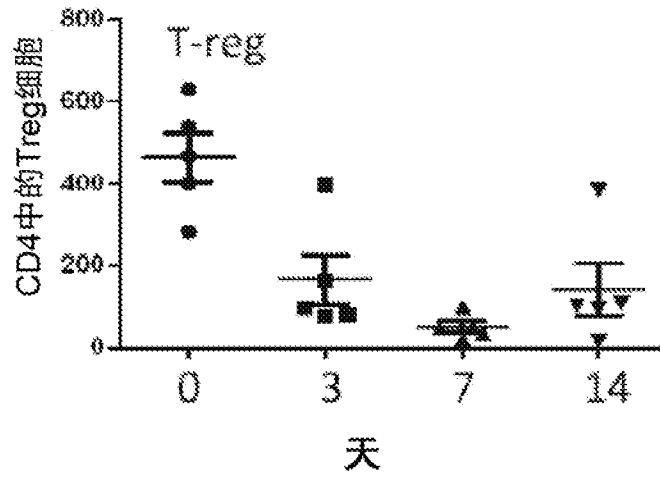


图17B

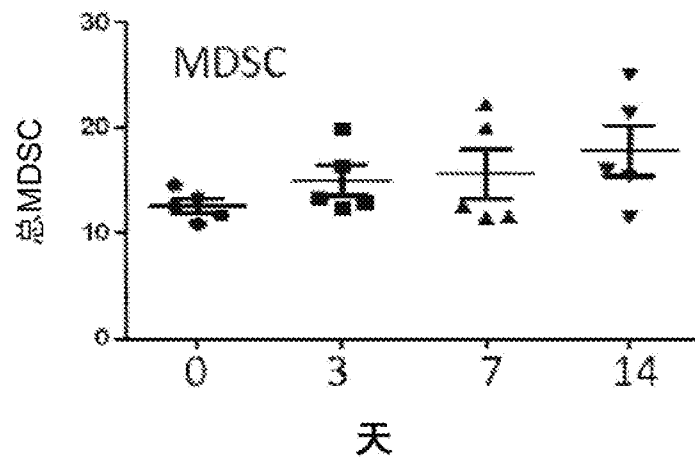


图17C

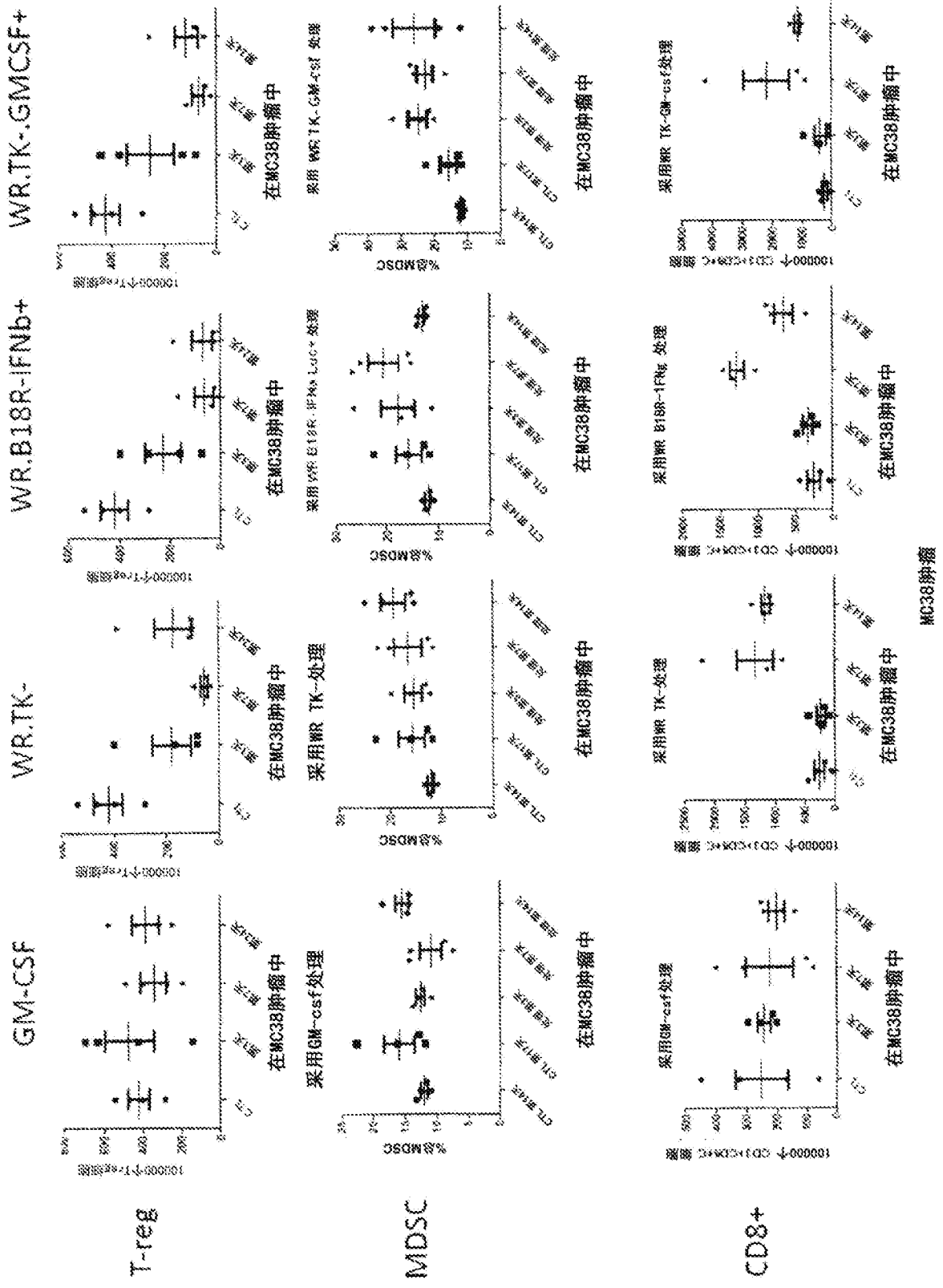


图18

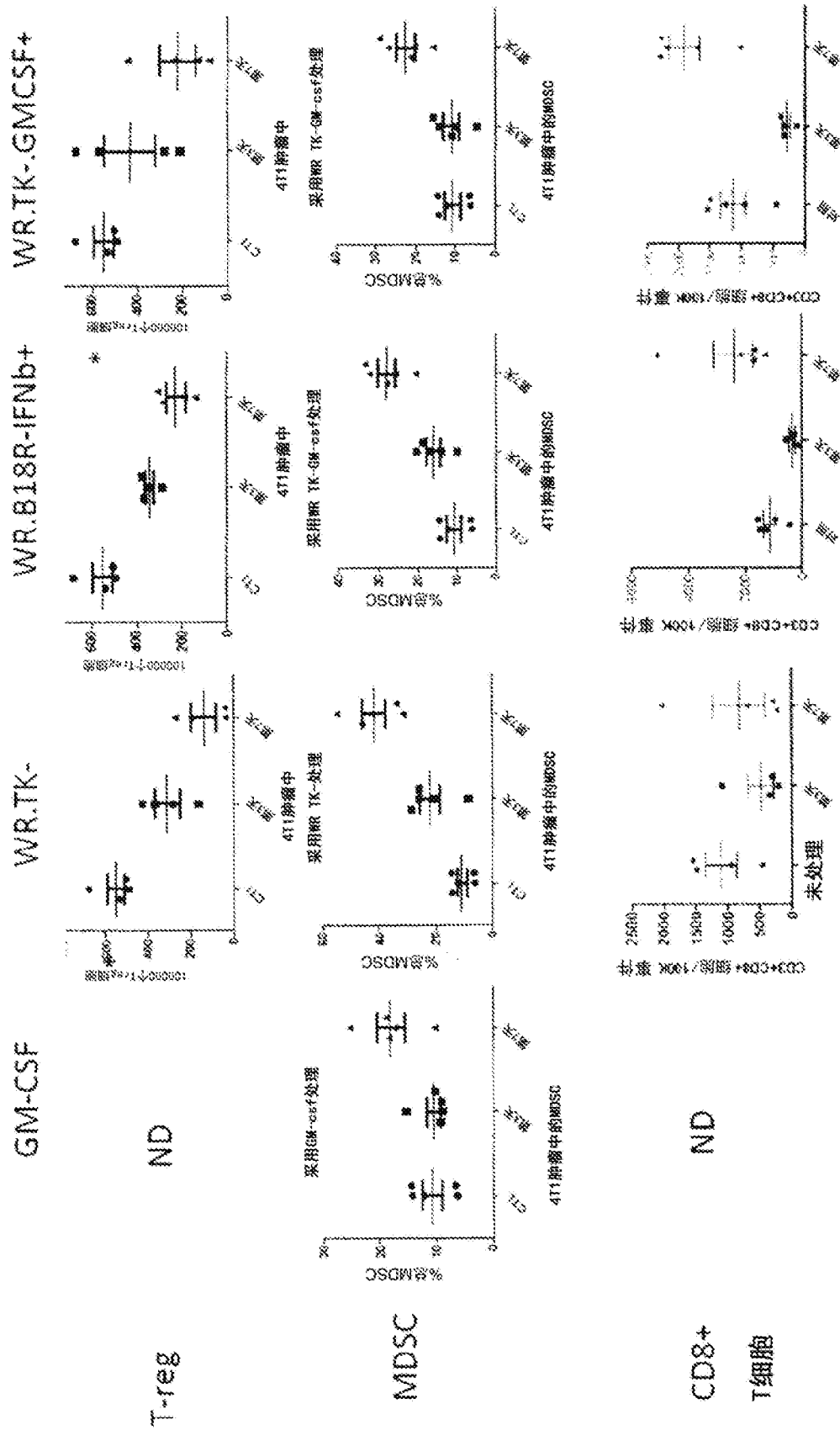


图19

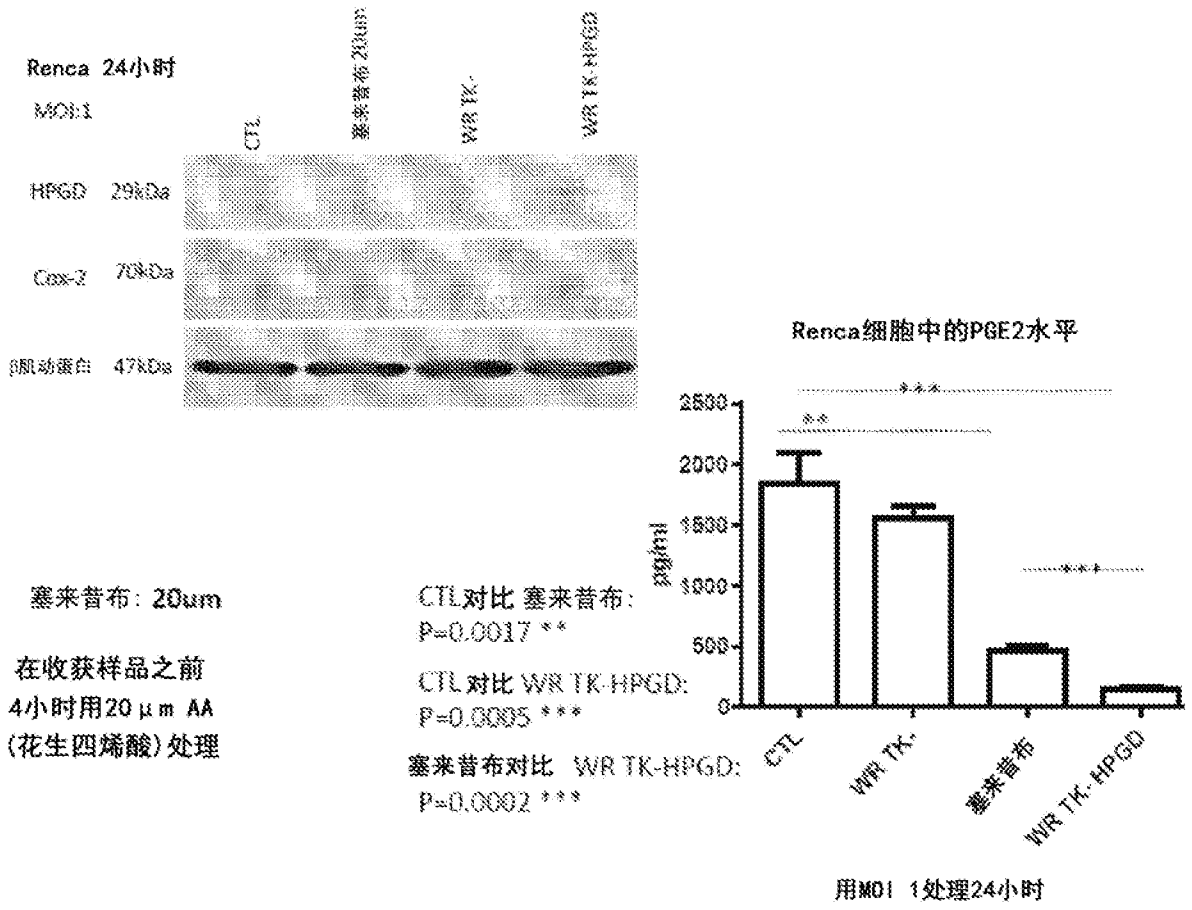


图20

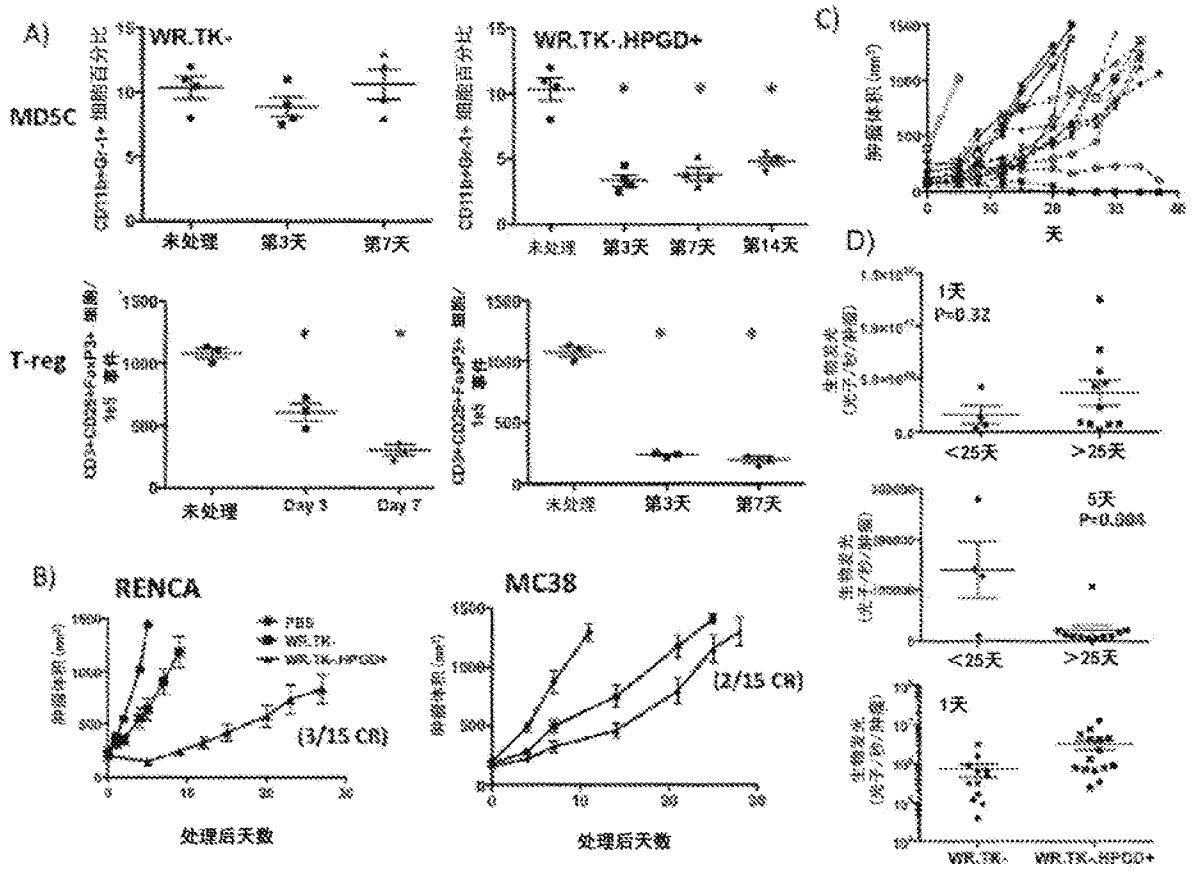


图21A-D

HPGD表达增加痘苗病毒的治疗活性

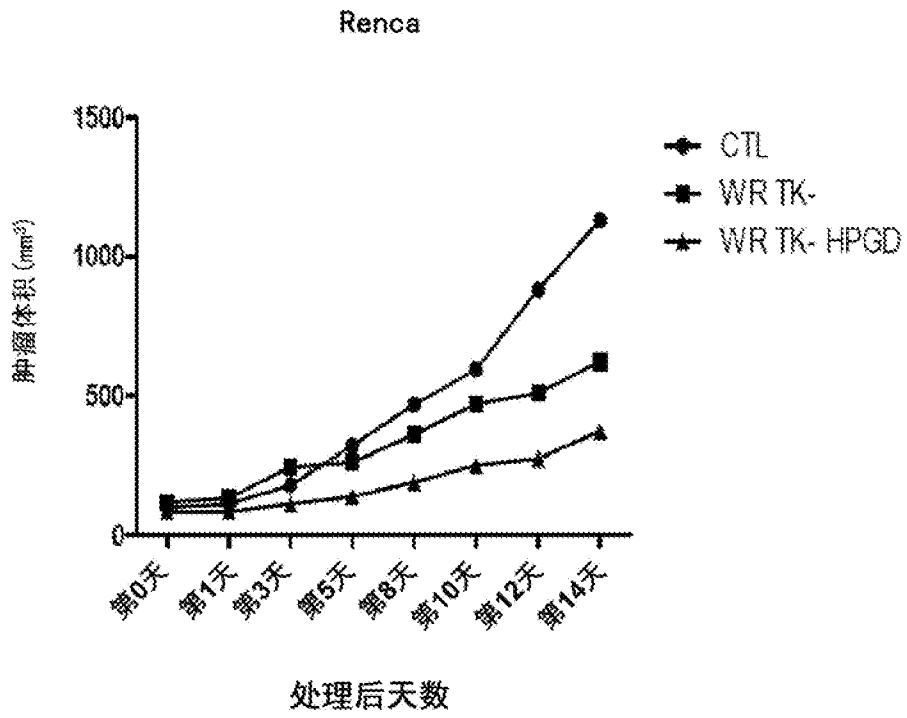


图22

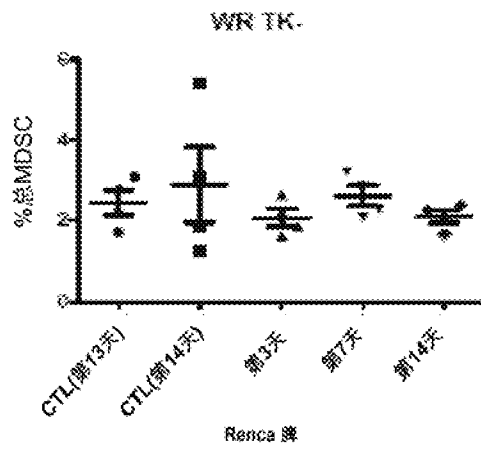


图23A

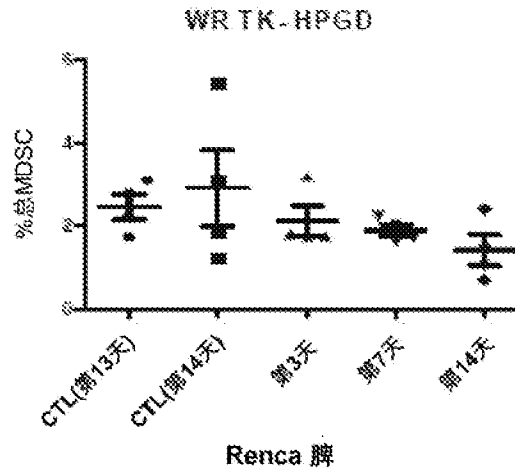


图23B

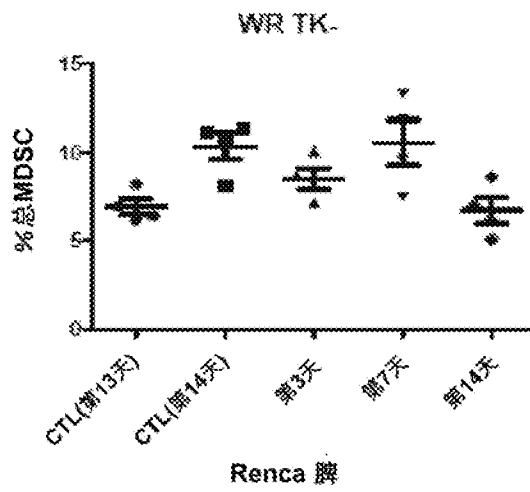


图23C

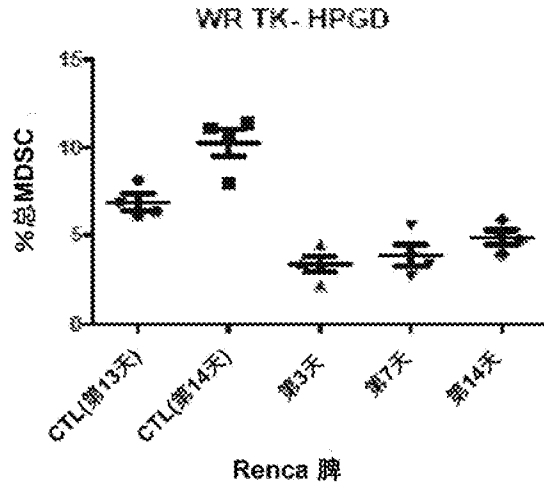


图23D

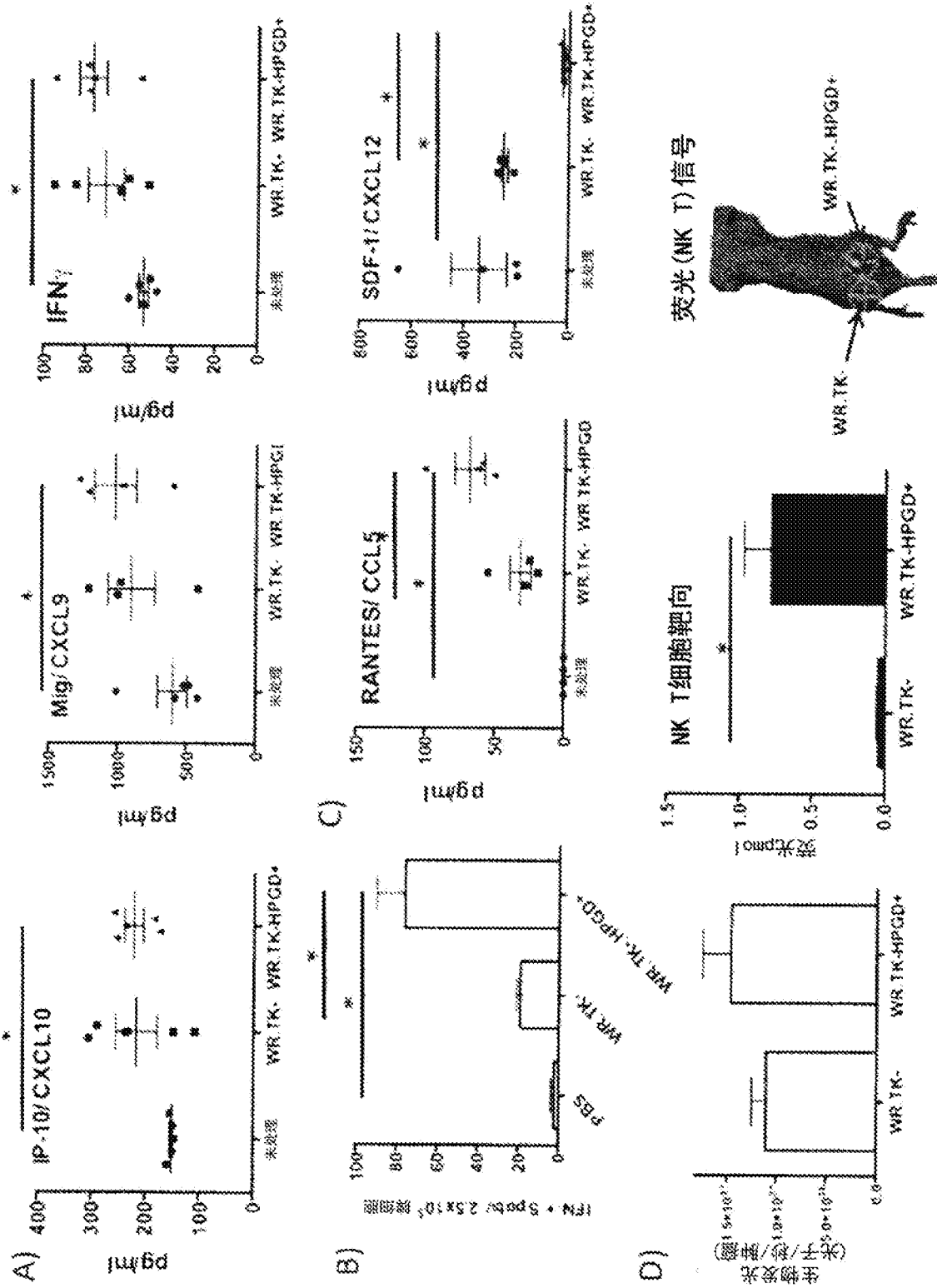


图24A-D

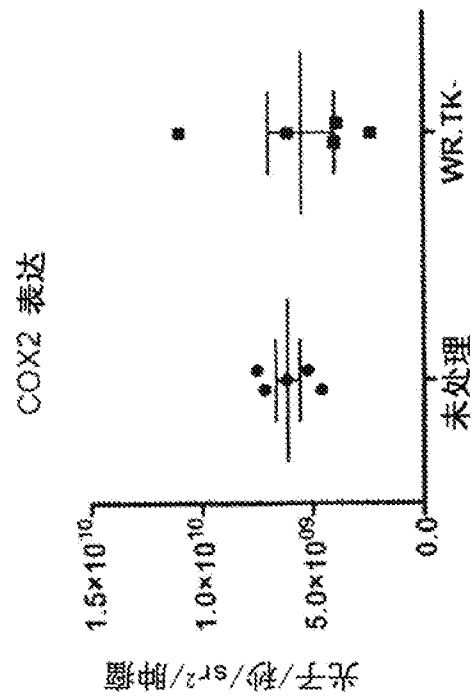
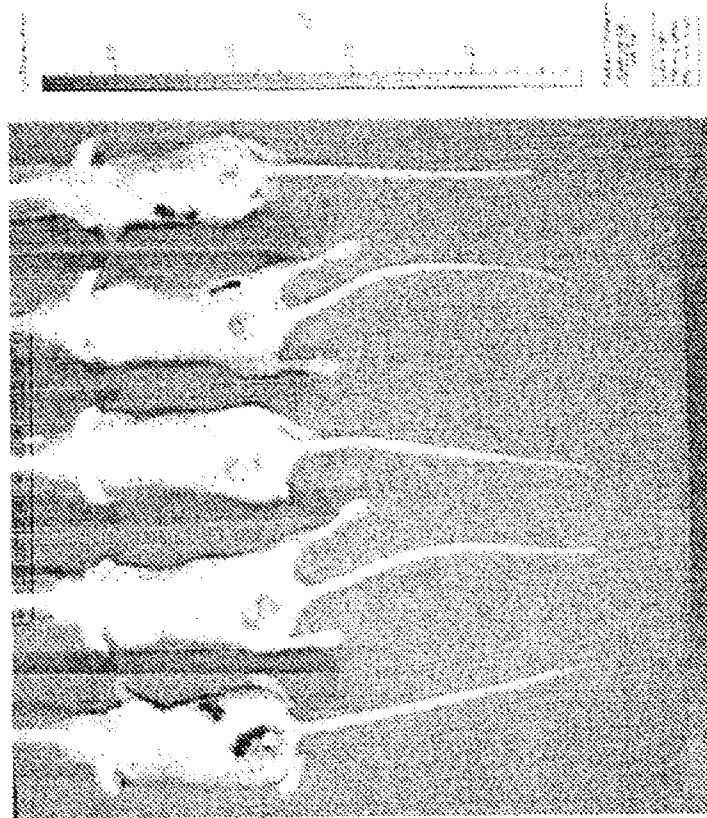


图25

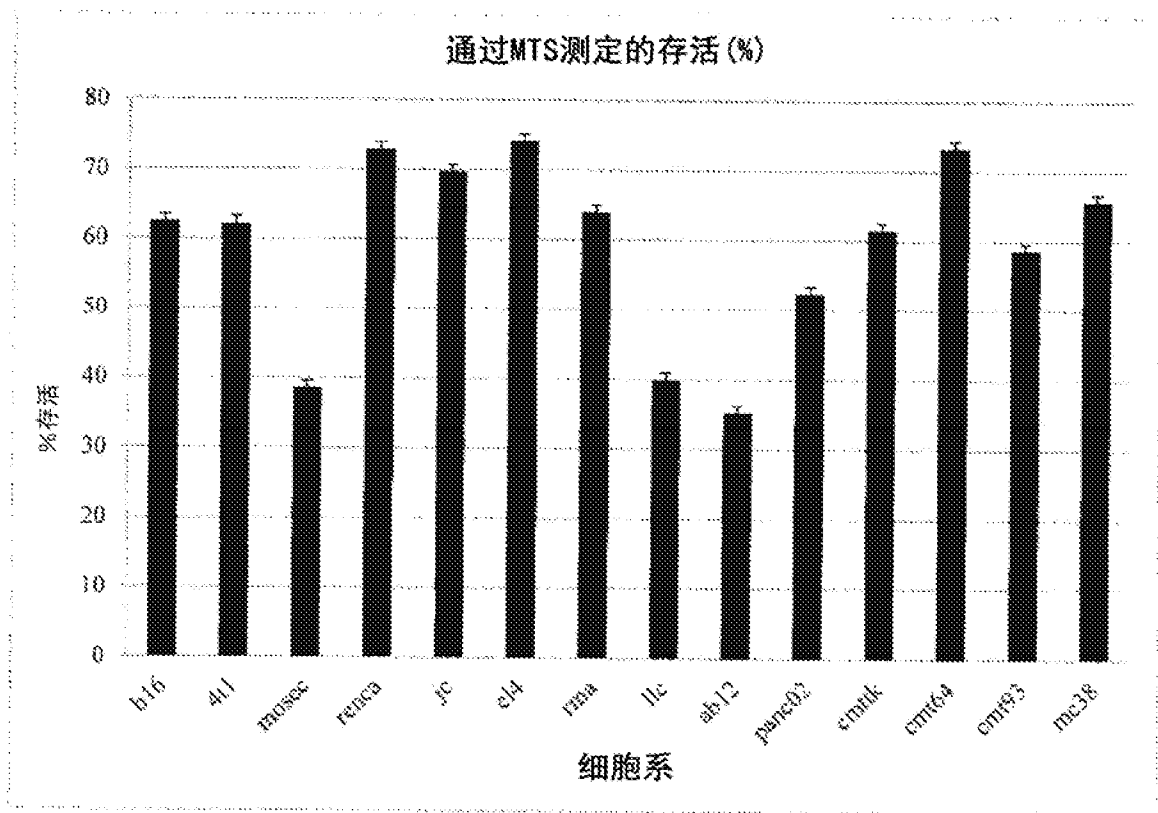


图26A

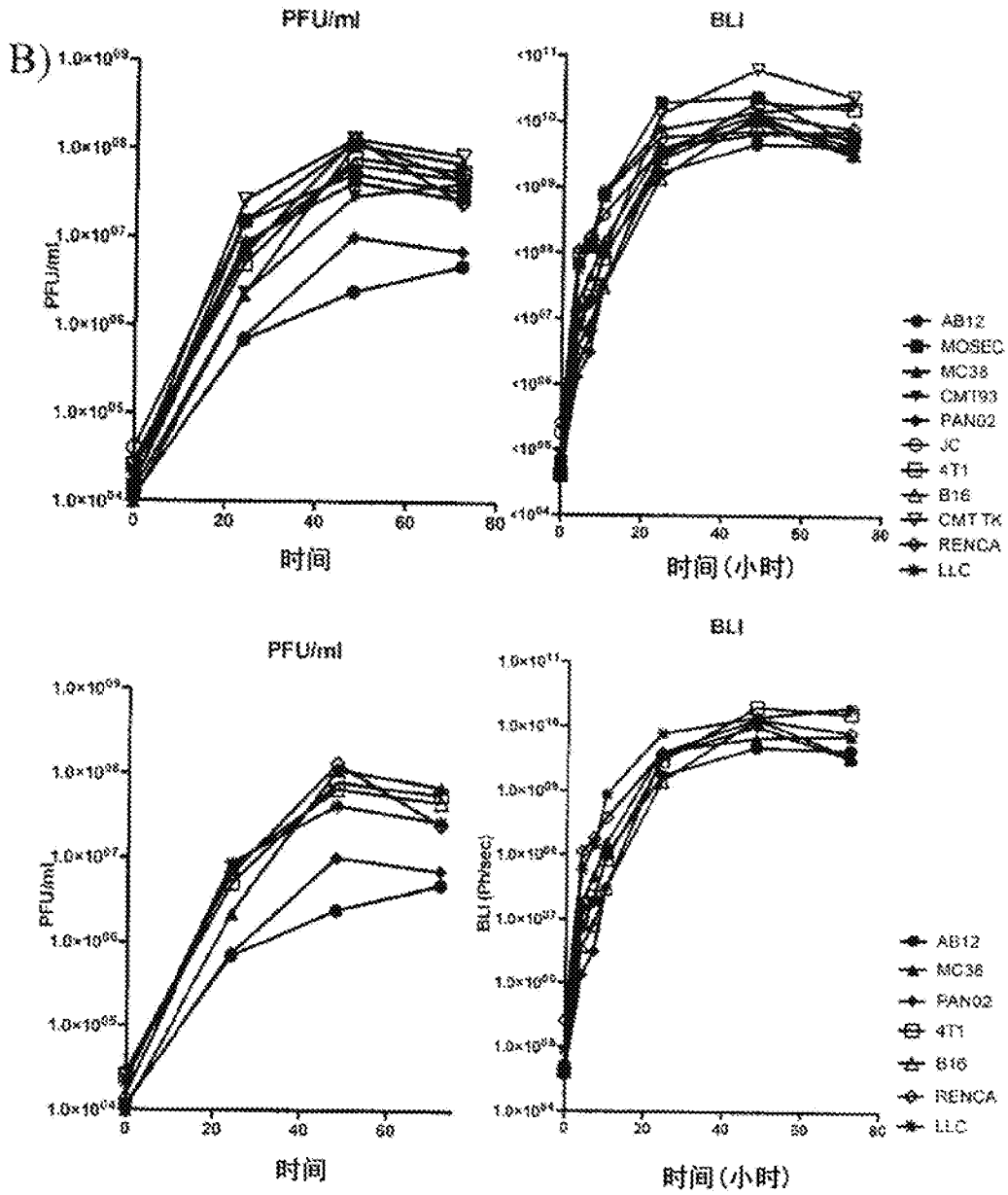


图26B

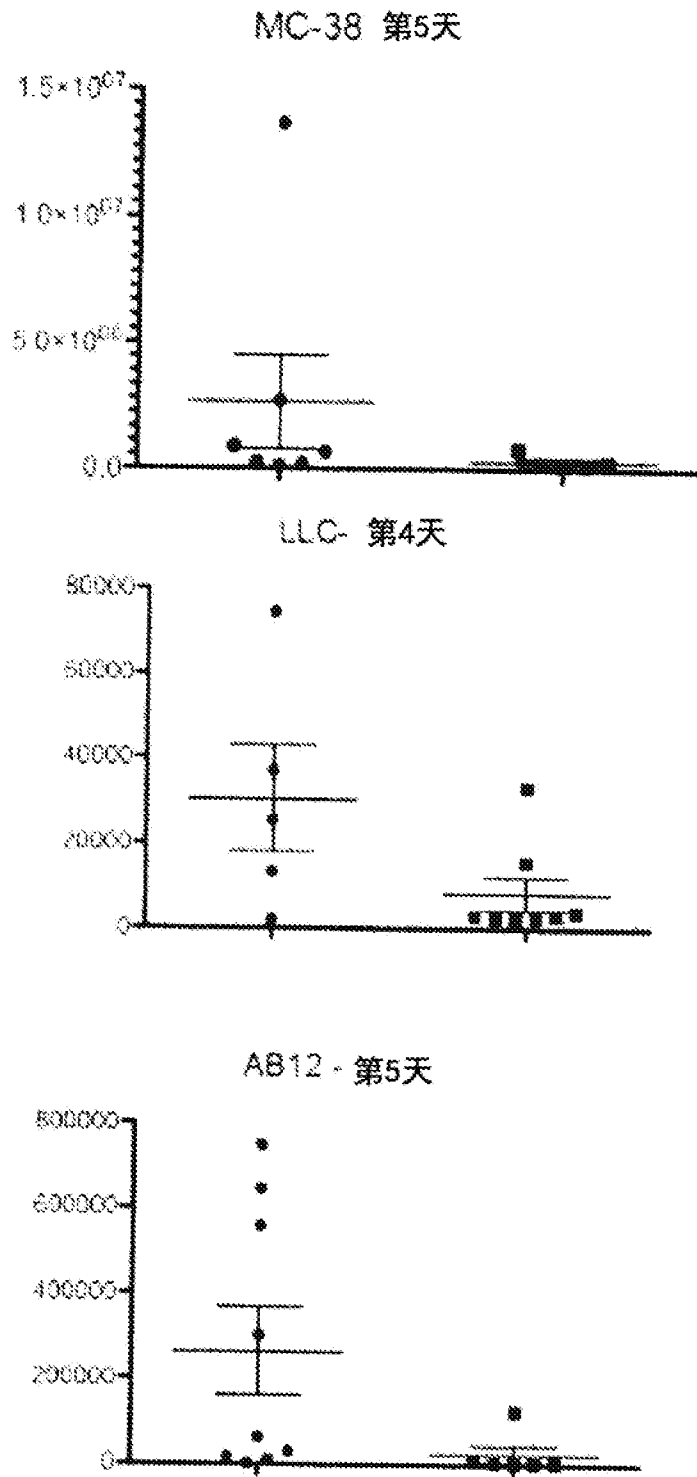


图27

