



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102357104 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201110306752. 7

(22) 申请日 2006. 03. 06

(30) 优先权数据

60/658, 816 2005. 03. 07 US

(62) 分案原申请数据

200680007533. 6 2006. 03. 06

(73) 专利权人 罗巴斯研究机构

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 格兰特·麦克法登 约翰·巴雷特
玛丽安·斯坦福

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 丁香兰

(51) Int. Cl.

C12N 7/02(2006. 01)

A61K 35/768(2015. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61K 31/436(2006. 01)

(56) 对比文件

US 6596268 B1, 2003. 07. 22, 摘要, 说明书第

4 栏第 2 行至第 5 栏第 8 行, 第 10 栏第 22 行至第 11 栏第 5 行, 第 16 栏第 16 — 25 行, 权利要求 1 — 62, 图 1, 实施例 1, 2.

US 2004/147541 A1, 2004. 07. 29, 摘要, 权利要求 1 — 10.

WO 01/04318 A2, 2001. 01. 18, 摘要, 说明书第 29 页第 26 行至第 32 页第 6 行, 第 36 页第 5 — 28 行, 图 13, 33.

WO 2004/078206 A1, 2004. 09. 16, 摘要, 权利要求 1-64, 说明书第 13-33、52-59、78-81、93、102-105 段, 图 1-28.

CN 2005/002607 A2, 2005. 01. 13, 摘要, 说明书第 21 — 43, 83 — 86, 95 段, 权利要求 1 — 26, 实施例 1, 2.

审查员 康鹏程

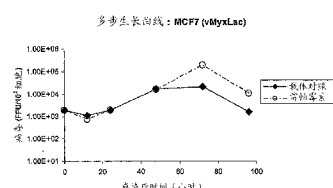
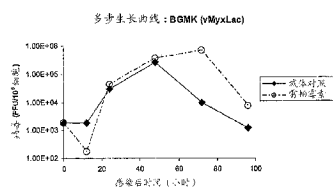
权利要求书1页 说明书26页 附图28页

(54) 发明名称

粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合在治疗性处理中的应用

(57) 摘要

本发明涉及粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合在治疗性处理中的应用。具体地说, 本发明涉及粘液瘤病毒的组合 (包括与雷帕霉素的组合) 在治疗中的应用。采用雷帕霉素进行治疗可增强粘液瘤病毒选择性地感染具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞 (包括对干扰素非应答的细胞) 的能力。雷帕霉素与粘液瘤病毒的所述组合可以用于治疗特征为存在所述细胞的疾病, 包括癌症。本发明还涉及不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒在治疗中的应用。



1. 一种包含不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒的药物组合物。
2. 如权利要求 1 所述的药物组合物,该药物组合物还含有雷帕霉素。
3. 如权利要求 1 所述的药物组合物,该药物组合物还含有其他治疗剂。
4. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中,所述其他治疗剂为化学治疗剂。
5. 有效量的不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒在药物制备中的应用,所述药物用于抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,并且所述细胞选自人类肾脏癌细胞、人类结肠癌细胞、人类肺癌细胞、人类卵巢癌细胞、人类前列腺癌细胞、人类乳腺癌细胞、人类黑素瘤细胞、人类星形细胞瘤细胞、人类神经胶质瘤细胞或人类髓母细胞瘤细胞。
6. 如权利要求 5 所述的应用,其中,所述药物配制用于与有效量的雷帕霉素组合施用。
7. 如权利要求 5 或 6 所述的应用,其中,所述细胞对干扰素是非应答的。
8. 如权利要求 7 所述的应用,其中,所述细胞显示出不正常的干扰素信号转导。
9. 如权利要求 5 所述的应用,其中,所述药物通过注射到癌症的部位来进行施用。
10. 如权利要求 5 所述的应用,其中,所述药物是全身施用。
11. 如权利要求 5 或 6 所述的应用,其中,所述粘液瘤病毒是经过基因修饰的。
12. 如权利要求 11 所述的应用,其中,所述粘液瘤病毒经过基因修饰而表达治疗性基因。
13. 有效量的不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒在药物制备中的应用,所述药物用于治疗患者的疾病状态,其中,所述疾病状态的特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,并且所述疾病状态为癌症,所述患者为人类,所述细胞选自人类肾脏癌细胞、人类结肠癌细胞、人类肺癌细胞、人类卵巢癌细胞、人类前列腺癌细胞、人类乳腺癌细胞、人类黑素瘤细胞、人类星形细胞瘤细胞、人类神经胶质瘤细胞或人类髓母细胞瘤细胞。
14. 如权利要求 13 所述的应用,其中,所述药物配制用于与有效量的雷帕霉素组合施用。
15. 如权利要求 13 或 14 所述的应用,其中,所述药物施用通过注射到癌症的部位来进行。
16. 如权利要求 13 或 14 所述的应用,其中,所述药物施用是全身施用。
17. 如权利要求 13 或 14 所述的应用,其中,所述粘液瘤病毒是经过基因修饰的。
18. 如权利要求 17 所述的应用,其中,所述粘液瘤病毒经过基因修饰而表达治疗性基因。

粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合在治疗性处理中的应用

[0001] 本申请是分案申请,其原申请的国际申请号为 PCT/CA2006/000315,中国国家申请号为 200680007533.6,申请日为 2006 年 3 月 6 日,发明名称为“粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合在治疗性处理中的应用”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2005 年 3 月 7 日提交的 NO. 60/658,816 号美国临时专利申请的权益和优先权,其全部内容此处以参考的方式引入。

技术领域

[0004] 本发明主要涉及粘液瘤病毒与雷帕霉素在治疗上的应用。

背景技术

[0005] 目前用于治疗各种癌症的治疗方法经常通过毒害或杀死癌细胞而起作用。不幸的是,对癌细胞具有毒性的治疗方法一般对健康细胞也具有毒性。此外,有效治疗癌症尚不清楚的主要原因之一是肿瘤的异源性。目前的主流疗法(如化学疗法和放射疗法)倾向于在狭窄的毒力治疗范围内使用。由于肿瘤细胞类型各异以及这些治疗方法可以应用的范围有限,据认为这些类型的治疗方法并不是有力的工具,其适用性有限。

[0006] 目前正在开发的现代抗癌疗法试图选择性地靶向肿瘤细胞,同时对健康细胞具有更低毒性,据此使健康细胞更有可能不受到影响。

[0007] 溶瘤病毒疗法是旨在利用肿瘤细胞与正常细胞间的细胞差异的一种方法。这种方法使用有复制能力、对肿瘤具有选择性的病毒载体作为抗癌剂。溶瘤病毒要么特异地靶向癌细胞而进行感染,要么与在健康细胞中复制相比,更适合在癌细胞中进行有效复制。这些有复制能力的溶瘤病毒是天然存在的,或者是经过基因工程改造而成为靶向异源肿瘤群的高选择性和高效性的工具。由于具有复制选择性的溶瘤病毒在正常细胞中不进行有效复制,所以特别是相对于传统疗法如放射疗法或化学疗法而言,其对患者的毒性较小。

[0008] 大量研究已报道了各种病毒株的溶瘤活性,最具前景的溶瘤病毒是天然存在的或经基因修饰形式的腺病毒、单纯疱疹病毒 1 (“HSV 1”)、呼肠孤病毒、痘苗病毒、水泡性口炎病毒 (“VSV”) 或脊髓灰质炎病毒。目前正在研究的作为抗癌剂的经修饰的溶瘤病毒包括 HSV、腺病毒、新城疫病毒 (“NDV”)、呼肠孤病毒、痘苗病毒、麻疹病毒、VSV 和脊髓灰质炎病毒。各种溶瘤病毒处于临床试验的第一和第二阶段,其中一些病毒显示出了稳定的功效。但是,不知道哪些病毒最符合持续复制、具有特异性和强溶解活性的溶瘤目的。完全有效的溶瘤病毒候选载体应该生命周期短、形成成熟病毒体快、能够在细胞间进行有效传播并且具有便于插入的较大的基因组。同时,有证据表明,抑制早期先天性免疫应答和延缓 Th1 应答的发展对溶瘤疗法的效力至关重要。对于打算用于开发溶瘤病毒的许多病毒来说,从正常群体中所观测到的高水平的抗体和 T 细胞应答来测量,人类病毒显然是具有高度免疫原性的。

[0009] 临床工作表明,目前的溶瘤病毒确实是安全的,但作为单一疗法的疗效还不足以

具有完全的临床效果。由于经常观察到肿瘤细胞没有充分或有效地受到感染,目前的动向是通过对候选病毒进行基因工程改造,以使其表达治疗性转基因,从而提高它们的效力。同时还正在结合其它常见的溶瘤疗法来对大部分以上提到的溶瘤病毒进行测试。

[0010] 腺病毒可以容易地进行基因操作,并且具有众所周知的与病毒蛋白相关的功能。另外,它与相当轻微的疾病有关。ONYX-015 人类腺病毒 (Onyx 制药公司 (Onyx Pharmaceuticals Inc.)) 是受试最广泛的针对临床应用进行了优化的溶瘤病毒之一。据信它优选在 p53 阴性肿瘤中复制,并且在头颈癌症患者的临床试验中展现出潜力。但是,有报道表明,ONYX-015 只在 14% 的治疗患者中产生了客观性临床反应 (Nemunaitis J、Khuri F、Ganly I、Arseneau J、Posner M、Vokes E、Kuhn J、McCarty T、Landers S、Blackburn A、Romel L、Randlev B、Kaye S、Kirn D。临床肿瘤学报 (J. Clin. Oncol.)。2001 年 1 月 15 日;19(2):289 ~ 298)。

[0011] W096/03997 和 W097/26904 描述了可以抑制肿瘤细胞生长并对神经元细胞具有特异性的突变的溶瘤 HSV。所述 HSV 的其它优点是其可以轻而易举地进行基因修饰,而且存在可以关闭任何不需要的病毒复制的药物。但是,这种共同的人类病原体的应用有限,这是因为很可能普通人群已经接触过该病毒,并获得了针对该病毒的免疫应答,这将削弱所述病毒的溶解效果。HSV 还会导致严重的副作用或潜在的致命疾病。

[0012] III 型呼肠孤病毒与相对轻微的疾病有关,并且它的病毒基因功能也已了解得相当清楚。溶瘤生物技术公司 (Oncolytic Biotech) 目前正在开发 III 型呼肠孤病毒作为癌症治疗剂,该病毒在表达突变体 ras 癌基因的细胞中具有增强的复制特性,而且优先在 PKR-/- 细胞中生长 (Strong J.E. 和 P.W. Lee。病毒学报 (J. Virology), 1996, 70:612 ~ 616)。但是,难以对呼肠孤病毒进行基因操作,而且其病毒复制不易关闭。

[0013] VSV 与相对轻微疾病有关,并且病毒基因功能也很清楚。W099/04026 披露了 VSV 在基因疗法中作为载体的应用,以表达治疗各种障碍的很多药物。但是,VSV 存在与呼肠孤病毒同样的问题:难以进行基因操作,并且病毒复制不易关闭。

[0014] 痘苗病毒和脊髓灰质炎病毒是本领域描述的其它候选的溶瘤病毒,但与严重的或潜在致命的疾病有关。

[0015] US 4,806,347 披露了干扰素 γ 和 IFN γ 片段对抗人类肿瘤细胞的应用。W099/18799 披露了在哺乳动物中治疗疾病的方法,在所述的哺乳动物中,病细胞具有干扰素介导的抗病毒应答缺陷,所述方法包括对所述哺乳动物施用治疗有效量的干扰素敏感的有复制能力的克隆病毒。其具体披露了在干扰素存在的情况下,VSV 病毒颗粒对肿瘤细胞具有毒性,但是 VSV 在正常细胞中的细胞毒性会出现下降。W099/18799 还披露,用干扰素处理肿瘤细胞,观察到了 NDV 诱导的敏感性,而将干扰素加到正常细胞,会使这些细胞抗 NDV。这种方法的目的是通过用干扰素敏感病毒来感染细胞,使该细胞对干扰素敏感。

发明内容

[0016] 本发明基于这样的意外发现:包括不表达功能性 M135R 蛋白的新型粘液瘤病毒在内的兔粘液瘤病毒,能够选择性地感染包括人类肿瘤细胞在内的细胞,所述细胞具有先天性抗病毒应答缺陷,并包括对干扰素非应答的细胞,而且利用药物雷帕霉素来治疗该细胞会增强所述感染。在该上下文中使用的术语“先天性”描述了非抗原特异性免疫应答。由

于粘液瘤病毒在人类正常细胞中不进行有效复制,所以所述病毒可用作各种病症和不适的治疗药物,例如,作为癌症的溶瘤治疗药物,所述病症和不适的特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,包括对于干扰素非应答的细胞。所述病毒还可以用于鉴定具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,以及用于体内显示这些细胞。

[0017] 一方面,本发明提供抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的方法,该方法包括对所述细胞施用有效量的粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合。

[0018] 另一方面,本发明提供治疗一种疾病状态的方法,该疾病状态的特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,所述方法包括对需要的患者施用有效量的粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合。

[0019] 本发明进一步提供有效量的粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合在抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞中的应用,以及在制备用于抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的药物中的应用。

[0020] 本发明又进一步提供有效量的粘液病毒与雷帕霉素的组合在治疗患者的疾病状态中的应用,其中,所述疾病状态的特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,以及在制备用于治疗患者的所述疾病状态的药物中的应用。

[0021] 另一方面,本发明提供一种药物组合物,该药物组合物含有粘液瘤病毒和雷帕霉素。该药物组合物可用于抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,或用于治疗特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态。

[0022] 又一方面,本发明提供包含粘液瘤病毒、雷帕霉素和说明书的试剂盒,该试剂盒用于抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,或用于治疗特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态。所述疾病状态包括癌症和慢性病毒感染。

[0023] 本发明进一步提供检测具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的方法,该方法包括将细胞群与粘液瘤病毒和雷帕霉素的组合接触;使所述病毒感染具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞;以及确定所述细胞群中的任何细胞受到的所述粘液瘤病毒的感染。

[0024] 本发明进一步基于这样的意外发现:兔粘液瘤病毒蛋白 M135R 参与引发兔子的免疫应答,并且不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒株可杀死体外细胞,但不会使动物患上粘液瘤病。该病毒株可用于处理具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,包括用于处理对于干扰素非应答的细胞,并包括用于联合药物雷帕霉素而提供的治疗,而不必加强对病毒的防范,由此可改善安全性。

[0025] 一方面,本发明提供抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的方法,该方法包括对所述细胞施用有效量的不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒和选择性组合的有效量的雷帕霉素。

[0026] 另一方面,本发明提供一种治疗疾病状态的方法,所述疾病状态的特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,所述方法包括对需要的患者施用有效量的不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒和选择性组合的有效量的雷帕霉素。

[0027] 本发明进一步提供有效量的不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒和选择性组合的有效量的雷帕霉素在抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞中的应用,以及在制备用于抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的药物中的应用。

[0028] 本发明进一步提供有效量的不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒和选择性组合的

有效量的雷帕霉素在治疗患者的疾病状态中的应用以及在制备用于治疗患者的所述疾病状态的药物中的应用,其中,所述疾病状态的特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞。

[0029] 一方面,本发明提供不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒。

[0030] 另一方面,本发明提供含有不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒的药物组合物。所述药物组合物可用于抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,或用于治疗特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态。所述药物组合物还可包含雷帕霉素。

[0031] 又一方面,本发明提供一种包含不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒和说明书的试剂盒,该试剂盒用于抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞或用于治疗特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态。所述试剂盒还可包含雷帕霉素。所述疾病状态包括癌症和慢性病毒感染。

[0032] 本发明进一步提供一种检测具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的方法,该方法包括将细胞群与不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒和可选的雷帕霉素的组合接触;使所述病毒感染具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞;以及确定所述细胞群中的任何细胞受到的所述粘液瘤病毒的感染。

[0033] 对于本领域普通技术人员而言,通过阅读以下对本发明具体实施方式的描述,并结合附图,应该明了本发明的其它方面和特征。但应理解,说明本发明优选实施方式时的详细描述和具体实施例只为阐明而提供,原因在于从这些详细描述中,本领域技术人员会明了本发明的精神和范围内的各种变化和修改。

附图说明

[0034] 阐明本发明的实施方式的附图只是用于举例目的,

[0035] 图 1 是病毒感染细胞后诱导的干扰素介导的抗病毒信号转导系统的示意图;

[0036] 图 2 是非允许的 WT 鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 在接触粘液瘤病毒后的相差显微照片,该照片显示在用中和抗体抑制干扰素 α/β 后 MEF 变得允许;

[0037] 图 3 是显示在粘液瘤病毒感染后 STAT1 和 STAT2 的磷酸化状态 (激活) 的 Western 印迹,该 Western 印迹显示 MEF 细胞的非允许感染与 STAT1 和 STAT2 的激活相关联;

[0038] 图 4 是显示在粘液瘤病毒感染后 STAT3、STAT4、STAT5 和 STAT6 的磷酸化状态 (非激活) 的 Western 印迹,该 Western 印迹显示 MEF 细胞的非允许感染不会激活这些类型中的任何一种;

[0039] 图 5 是在粘液瘤病毒感染后, $\text{IFN}\alpha/\beta$ R $^{-/-}$ -MEF 和 STAT1 $^{-/-}$ -MEF 以及 $\text{IFN}\alpha/\beta$ R $^{-/-}$ -MEF 和 STAT1 $^{-/-}$ -MEF 的相差显微照片,该照片显示 IFN/STAT/JAK 信号转导的失活使得允许粘液瘤病毒对细胞的感染;

[0040] 图 6 是显示在粘液瘤病毒感染后在非允许野生型 MEF 中 PKR 的磷酸化状态的 Western 印迹,该 Western 印迹显示 PKR 未被粘液瘤病毒感染所激活;

[0041] 图 7 是显示 PKR 在模拟感染的或用粘液瘤病毒预感染的野生型 MEF 中的磷酸化状态的 Western 印迹,该 Western 印迹显示粘液瘤病毒阻断了 MEF 细胞中的 PKR 激活;

[0042] 图 8 是显示在粘液瘤病毒感染后 PERK 在野生型 MEF 中的磷酸化状态的 Western 印迹,该 Western 印迹显示粘液瘤病毒阻断了 MEF 细胞中的 PERK 激活;

[0043] 图 9 是显示在接触粘液瘤病毒后 PKR^{-/-}、RNase L^{-/-} 和 Mx1^{-/-} 三重敲除的相差显微照片,该照片显示在 MEF 细胞中通过不同途径介导抗病毒状态;

[0044] 图 10 是在接触粘液瘤病毒后 PKR^{-/-}、RNase L^{-/-} 和 Mx1^{-/-} 三重敲除的相差显微照片;

[0045] 图 11 是用抗 IFN α / β 的中和抗体处理并接触粘液瘤病毒后 PKR^{-/-}、RNase L^{-/-} 和 Mx1^{-/-} 三重敲除的相差显微照片;

[0046] 图 12 是显示用抗 IFN α / β 的中和抗体处理并接触粘液瘤病毒后, eIF2 α 和 PKR 在非允许 MEF 中的磷酸化水平的 Western 印迹,该 Western 印迹显示 eIF2 α 在非应答细胞中的磷酸化由独立于 PKR 的途径进行催化;

[0047] 图 13 是显示粘液瘤病毒感染后 STAT1 在 PKR^{-/-}、RNase L^{-/-} 和 Mx1^{-/-} 三重敲除中的磷酸化状态的 Western 印迹,该 Western 印迹显示正常的 IFN 诱导的信号转导应答;

[0048] 图 14 是阐明感染后 12 小时,酪氨酸磷酸化的 STAT1 在非允许的 PKR^{-/-}+RNase L^{-/-}+Mx1^{-/-} 细胞中的亚细胞定位的相差显微照片,该照片表明,正如由正常 IFN/STAT 信号转导应答所预测的那样,激活的 STAT 定位于细胞核;

[0049] 图 15 是模拟感染的或用表达 GFP 的死粘液瘤病毒或活粘液瘤病毒感染的患有颅内神经胶质瘤的裸鼠大脑的荧光图片,该图片显示粘液瘤病毒靶向神经胶质瘤细胞;

[0050] 图 16 是用表达 GFP 的粘液瘤病毒感染的鼠神经胶质瘤的薄切片的荧光图像和照片,该图像和照片显示粘液瘤病毒只在肿瘤细胞中复制;

[0051] 图 17 是粘液瘤病毒感染后,用 X-Gal 或结晶紫染色的 HT29 人类肿瘤细胞的相差显微照片,该照片显示在人类细胞中非允许感染的一个例子;

[0052] 图 18 是粘液瘤病毒感染后,用 X-Gal 或结晶紫染色的 HOP92 人类肿瘤细胞的相差显微照片,该照片显示人类细胞的允许感染的一个例子;

[0053] 图 19 是粘液瘤病毒感染后,用 X-Gal 或结晶紫染色的 OVCAR4 人类肿瘤细胞的相差显微照片,该照片显示人类细胞的允许感染的一个例子;

[0054] 图 20 是粘液瘤病毒感染后,用 X-Gal 或结晶紫染色的 SK-MEL3 人类肿瘤细胞的相差显微照片,该照片显示人类细胞的允许感染的一个例子;

[0055] 图 21 是粘液瘤病毒感染后,用 X-Gal 或结晶紫染色的 SK-MEL28 人类肿瘤细胞的相差显微照片,该照片显示人类肿瘤细胞的半允许感染的一个例子;

[0056] 图 22 是粘液瘤病毒感染后,用 X-Gal 或结晶紫染色后的 BGMK 细胞的相差显微照片,该照片显示作为对照的典型的允许感染;

[0057] 图 23 是用浓度逐步升高的表达 LacZ 蛋白的粘液瘤病毒感染后,用 X-Gal 染色的阳性对照 BGMK 细胞和人类肿瘤细胞系 U87、A172 和 U373 的相差显微照片,该照片显示这些人类神经胶质瘤细胞对粘液瘤病毒复制都是允许的;

[0058] 图 24 是显示用病毒浓度逐步升高的粘液瘤病毒感染 72 小时后的 BGMK、U87、A172 和 U373 细胞的存活率的图,该图显示粘液瘤病毒杀死所有这些细胞的能力;

[0059] 图 25 是用 MV GFP 感染的 SF041585 星形细胞瘤细胞的相差显微照片和荧光显微照片,该相差显微照片和荧光显微照片显示了在原发性人类神经胶质瘤细胞中的感染;

[0060] 图 26 是用表达 LacZ 蛋白的粘液瘤病毒感染并经 X-Gal 染色的 U373 神经胶质瘤细胞的相差显微照片,该相差显微照片显示了这些人类肿瘤细胞的感染;

[0061] 图 27 是描述用 MV GFP 感染后 48 小时, SF041585 细胞的存活率的图, 该图显示了这些受感染的人类肿瘤细胞被杀死的情况;

[0062] 图 28 是用表达 GFP 的粘液瘤病毒感染的 Daoy 和 D384 髓母细胞瘤系的荧光显微照片, 该照片显示了这些人类肿瘤细胞的感染;

[0063] 图 29 是使用所示的野生型病毒 vMyxLac 和敲除 M-T5 的病毒 vMyxT5K0, 在下列各细胞系中利用雷帕霉素进行预处理或不利用雷帕霉素进行预处理的病毒生成率的图示: BG MK (灵长类的对照细胞系); RK-13 和 RL15 (兔的对照细胞系); 4T1 和 B16F10 (小鼠的癌细胞系); HOS、PC3、786-0、HCT116、ACHN、MCF-7、M14 和 COLO205 (人类癌细胞系);

[0064] 图 30 是用 vMyxLac 或 vMyxLacT5- 感染的病毒感染细胞系的照片;

[0065] 图 31 是各细胞系 (BG MK; A9; MCF-7; MDA-MB-435; M14 和 COLO205) 经利用雷帕霉素进行预处理或不利用雷帕霉素进行预处理的病毒生成率的图示;

[0066] 图 32 (A) 是粘液瘤病毒蛋白 M135R 和痘苗病毒蛋白 B18R 的示意性对比图, 图 32 (B) 是 M135R 与 B18R 的前 179 个氨基酸之间的氨基酸序列对比;

[0067] 图 33 (A) 是在用粘液瘤病毒 Lausanne (vMyxLau) 感染的 BG MK 细胞中表达的 M135R 的 Western 印迹, 而图 33 (B) 是在用 vMyxLau 感染并用 araC、衣霉素或莫能菌素处理的 BG MK 细胞中表达的 M135R 的 Western 印迹;

[0068] 图 34 (A) 是模拟感染的或用粘液瘤病毒感染的并对 M135R 染色的 BG MK 细胞的荧光显微照片, 而图 34 (B) 是利用抗 M135R 抗体进行的针对用野生型粘液瘤病毒 (vMyxgfp) 或 M135R 敲除株 (vMyx135K0) 感染的细胞的免疫沉淀反应产物或细胞溶解物的 Western 印迹;

[0069] 图 35 (A) 是制备 vMyx135K0 的克隆策略的示意图, 图 35 (B) 是 PCR 插入产物的琼脂糖凝胶, 而图 35 (C) 是用野生型和 M135R 敲除的粘液瘤病毒感染的细胞的 Western 印迹;

[0070] 图 36 是用 vMyxgfp 或 vMyx135K0 感染的 BG MK 细胞中的病毒灶 (viral foci) 的生长曲线;

[0071] 图 37 是用 vMyxgfp 或 vMyx135K0 感染的兔胚胎成纤维细胞的光显微照片和荧光显微照片;

[0072] 图 38 是用 vMyxgfp 或 vMyx135K0 感染的兔 HIG82 成纤维细胞的光显微照片和荧光显微照片;

[0073] 图 39 是用 vMyxgfp 或 vMyx135K0 感染的人类原发性成纤维细胞的光显微照片和荧光显微照片;

[0074] 图 40 是用 vMyxLau 或 vMyx135K0 感染的兔子的体温曲线图;

[0075] 图 41 是模拟感染的或用 vMyxgfp 或 vMyx135K0 感染的并用 ^{125}I 标记的兔干扰素 α/β 处理的细胞的 ^{125}I 发射图;

[0076] 图 42 是通过用 vMyxgfp 或 vMyx135K0 感染 RK13 或 BG MK 而形成的病灶的图, 其中, 细胞未用兔干扰素 α/β 处理或者在感染前 24 小时用兔干扰素 α/β 进行处理; 和

[0077] 图 43 是使用来自用 20nM 雷帕霉素 (R) 或者载体对照 (D) 进行预处理的 786-0 人类癌细胞的细胞溶解物, 并利用直接抗所标明的蛋白的抗体进行检测而得到的 Western 印迹的照片。

具体实施方式

[0078] 正如申请 PCT/CA2004/000341 中所描述的（此处通过参考全部引入），本发明人在过去已经发现通常感染兔子的野生型粘液瘤病毒能够选择性地感染和杀死具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞（包括人类细胞），例如，对干扰素非应答的细胞。粘液瘤病毒在人类正常细胞中不能进行有效复制。因为诸如癌症等很多疾病或不适的特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞，包括对干扰素非应答的细胞，所以粘液瘤病毒可以用于治疗包括癌症在内的所述疾病和不适，并且对正常的健康细胞毒性低。粘液瘤病毒还可用于治疗慢性感染的细胞，因为这些细胞具有先天性抗病毒应答缺陷。例如，很多病毒编码具有抑制细胞的抗病毒性干扰素应答的基因产物；粘液瘤病毒可以选择性地感染这些细胞。

[0079] 粘液瘤病毒（“MV”）是在兔子中引起粘液瘤病的致病媒介物。MV 属于痘病毒科（Poxviridae，最大的 DNA 病毒）的野兔痘病毒（Leporipoxvirus）属。MV 在其天然宿主美洲棉尾兔（*Sylvilagus rabbit*）中引起良性疾病。但是，它是烈性的且宿主特异性痘病毒，在欧洲兔中引起致命疾病，其特征是出现全身性病变，尤其是在粘膜区域的附近（Cameron C, Hota-Mitchell S、Chen L、Barrett J、Cao JX、Macaulay C、Willer D、Evans D、McFadden G, 病毒学（Virology），1999, 264(2) :298 ~ 318 ;Kerr P &McFadden G, 病毒免疫学（Viral Immunology），2002, 15(2) :229 ~ 246）。

[0080] MV 病毒是一种具有 163kb 的双链 DNA 基因组的大病毒，该基因组在受感染的细胞的细胞质中复制（B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley 编，病毒学，Lippincott Raven 出版社，纽约，第二版，1996）。已知 MV 编码各种与细胞有关的分泌蛋白，该蛋白参与宿主免疫和炎症反应的下调以及对病毒感染细胞凋亡的抑制。MV 可以被所有的人类体细胞吸收。但是，除了正常的兔体细胞外，如果所述细胞具有正常先天性抗病毒应答，所述病毒就不能有效感染所述细胞，这意味着所述病毒不能复制和导致细胞死亡。

[0081] 干扰素（“IFN”）是为应答各种刺激而分泌的细胞因子家族。干扰素结合到细胞表面受体，激活信号转导级联，该信号转导级联导致众多的细胞应答，包括抗病毒应答和生长抑制和 / 或凋亡信号的诱导。干扰素分为 I 型或 II 型。I 型干扰素包括 α 干扰素、 β 干扰素、 τ 干扰素和 ω 干扰素，所有的都是单体；II 型 IFN 只有 IFN γ 一种，为二聚体。IFN- α 的 12 种不同亚型由 14 个基因产生，但所有其它的 IFN 都是单基因性的（Arduini 等，1999）。IFN 通过调节癌基因表达来发挥直接的抗肿瘤活性。生长刺激性癌基因的过表达或肿瘤抑制物癌基因的丧失会导致恶性转化。p53、Rb、PC、NF1、WT1 和 DCC 是参与癌症发生的一些致癌基因。

[0082] 粘液瘤病毒和其它溶瘤病毒如呼肠孤病毒和 VSV 一样，都需要穿过正常健康细胞中所存在的抗病毒防护，才能在细胞中复制。MV 和其它溶瘤病毒诱导干扰素的生成，一般对 IFN 途径的抗病毒作用敏感。由 IFN 抗病毒应答诱导的相关蛋白和主要影响病毒增殖的相关蛋白包括 PKR、OAS 合成酶和 RNase L 核酸酶。PKR 激活 eIF2 α ，导致抑制翻译和诱导凋亡。在图 1 中描述的是 IFN 应答途径的示意图。在正常细胞中，MV 受到 PKR 和 eIF2 α 的直接影响。

[0083] 在癌细胞中，抗病毒应答途径经常受到破坏。例如，对 IFN 的减弱或无效应答是在转化过程中和肿瘤发展中经常出现的遗传性缺陷。超过 80% 的肿瘤细胞系对干扰素不产生应答或应答受损（Stojdl 等，癌细胞（Cancer Cell），（2003）4 :263 ~ 275 和其

中所引用的参考文献 ;Wong 等, 生物化学学报 (J. Biol. Chem) (1997) 272(45) :28779 ~ 28785 ;Sun 等, 血液 (blood), (1998) 91(2) :570 ~ 576 ;Matin 等, 癌症研究 (Cancer Res.) (2001) 61(5) :2261 ~ 2266 ;Balachandran 等, 癌细胞 (2004) 5(1) :51 ~ 65)。正如先前在 PCT/CA2004/000341 中披露的, MV 能够感染和杀死癌细胞, 包括人类肿瘤细胞, 并且不受到任何特定理论的限制, 据信 MV 能够感染这些细胞是因为这些细胞存在先天性抗病毒应答缺陷。

[0084] 有证据表明, 抑制早期先天性免疫应答和延缓 Th1 应答的发展对溶瘤治疗的效率是重要的。虽然粘液瘤病毒是一种烈性病毒, 但是它具有宿主特异性, 并且具有非常窄的宿主范围 ;它不感染人或鼠。不受任何具体理论的限制, 据信因为粘液瘤病毒是非人类病毒, 在人类中它应该没有遇到预先存在的免疫识别。因此, 它作为溶瘤病毒的潜力将受到较少的损害 ;对允许性肿瘤细胞, 粘液瘤病毒将提供比天然的人类病毒更有效的感染, 据此可以为癌症提供有效的溶瘤治疗。

[0085] 在粘液瘤病毒感染许多人类肿瘤细胞系时粘液瘤病毒宿主范围基因 M-T5 看起来似乎扮演着重要的角色 (Sypula 等, (2004) Gene Ther. Mol. Biol. 8 :103)。M-T5 基因编码在兔淋巴细胞中进行粘液瘤复制所需的锚蛋白重复蛋白, 切掉 MT-5 基因的粘液瘤病毒不能导致易感兔子感染粘液瘤 (Mossman 等, (1996) J. Virol. 70 :4394)。现有证据表明, 受到感染的人类肿瘤细胞内的细胞内信号转导的差异对于辨别可允许粘液瘤病毒感染和有效复制的人类肿瘤细胞是至关重要的 (Johnston 等, (2003) J. Virol. 77 :5877)。

[0086] 此外, 粘液瘤病毒具有蛋白 M135R, 该蛋白显示了与干扰素 α/β 受体 (“IFN α/β -R”) 的氨基末端部分的同源性。有人提出, M135R 模拟宿主 IFN α/β -R 从而防止 IFN α/β -R 引发宿主的抗病毒应答 (Barrett 等, Seminars in Immunology (2001) 13 :73-84)。所述预测基于与来自痘苗病毒 B18R 的病毒 IFN α/β -R 同源的序列, 并且已经证明, 痘苗病毒 (“VV”) 采用该免疫逃避策略。但是, M135R 仅具有 VV B18R 和所有其他来自测序过的痘病毒的 IFN α/β -R 同系物的一半大小, 并在所有的情况中仅与所述同系物的氨基末端这部分对齐 (align)。

[0087] 本发明人已经发现, 即使免疫荧光结果表明 M135R 定位于细胞表面, 但尝试证明 M135R 具有与 IFN α/β -R 相互作用的能力却是否定的。尽管得到这些结果, 本发明人仍然发现, 切除 M135R 会严重削弱粘液瘤病毒导致宿主动物致病的能力, 虽然实施了该切除的粘液瘤病毒在感染并杀死体外细胞方面与野生型 MV 同样有效。因此, 一方面, 本发明涉及这样的发现, 即, 不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒可用于治疗具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞, 包括用于溶瘤研究, 这是因为, 由于对于正在进行治疗的患者来说, 不需要任何非常规的抑制策略 (containment strategy), 所以该病毒可提供更为安全的用于溶瘤疗法的替代疗法。

[0088] 另一方面, 本发明涉及这样的发现, 即, 抗癌剂雷帕霉素可提高粘液瘤病毒对允许粘液瘤病毒感染的人类肿瘤细胞的感染率水平, 和该雷帕霉素允许某些粘液瘤病毒株在人类肿瘤细胞 (如果没有雷帕霉素, 则其会限制那些粘液瘤病毒株的复制) 中进行复制。允许粘液瘤病毒感染的细胞是所述病毒能够进入并在其中进行有效复制的细胞。允许性细胞在涉及蛋白 PTEN、PDK、AKT、GSK、Raf、mTOR 或 P70S6K 的一个或更多个途径中可能具有缺陷或突变。限制性细胞是仅在某些条件下对粘液瘤病毒具有允许性, 但是在其他条件下则不

允许有效感染的细胞。例如,限制性细胞对野生型的病毒株是允许的,但是不允许某些突变型粘液瘤病毒株,如已敲除 MT-5 基因的病毒株进行有效复制。在另一个实例中,对粘液瘤病毒具有限制性的细胞可能不允许单独的粘液瘤病毒进行有效感染,但是用雷帕霉素处理后,同样的粘液瘤病毒则能够有效地感染该细胞。发育不全的细胞系对粘液瘤病毒感染是非允许的,这意味着该病毒能够进入该细胞,却不能有效地感染该细胞。

[0089] 因此,当雷帕霉素与粘液瘤病毒组合使用时,其可提高粘液瘤病毒对具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的感染率。本发明涉及雷帕霉素与粘液瘤病毒的组合在处理具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞中的应用。

[0090] 雷帕霉素是一种大环内酯,它是由土壤细菌吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 纯化得到的显示出抗真菌活性的化合物。此处使用的雷帕霉素是指能够与 FKBP12 络合并抑制 mTOR 的雷帕霉素(也称为西罗莫司)及其类似物或衍生物,包括类似物 CCI-779(也称为细胞周期抑制剂-779 或雷帕霉素-42,2,2-联(羟基甲基)-丙酸)和 RAD001(也称为依维莫司或 40-O-(2-羟基乙基)-雷帕霉素)。雷帕霉素、CCI-779 和 RAD001 都可商购获得,并且雷帕霉素可由 Wyeth-Ayerst 提供,其名为 Rapamune™。术语雷帕霉素还包括雷帕霉素的药物上可接受的盐类和酯类、其水合物、溶剂化物、多晶型物、类似物或衍生物,以及在使用时,例如施用于患者时可代谢或转化为雷帕霉素或其类似物或衍生物的前药或前体。

[0091] 作为细胞信号转导抑制剂的雷帕霉素具有高度的特异性:它进入细胞并与称为 FKBP12 的细胞蛋白结合。然后,雷帕霉素/FKBP12 复合物与特异的细胞靶 mTOR(哺乳动物的雷帕霉素靶)结合。已经表明许多癌症都是由于诸如 P13K 等信号转导分子的过度活性,或者肿瘤抑制基因 PTEN 的缺失而产生的。这些分子均位于 mTOR 的上游。已经表明 mTOR 是细胞增殖、生长、分化、迁移和存活的重要调节剂,因而在遏制癌细胞的无控生长中的理想靶。对雷帕霉素敏感的癌细胞系一般是通过 mTOR 激活途径而产生的那些细胞系。

[0092] 在移植患者中,雷帕霉素主要用作环孢霉素治疗的替代性治疗或补充治疗。在移植患者中,雷帕霉素治疗通常具有比环孢霉素 A 或 FKS06 更小的副作用。另外,回顾性研究表明,接受雷帕霉素治疗的患者通常较少地患上癌症,并且其 CMV(巨细胞病毒:疱疹病毒)感染的发生率也较低。因此,特别是根据推测雷帕霉素应该可以减少 CMV 的复制的研究(Ponticelli 的综述:“The pleiotropic effects of mTOR inhibitors”,*J Nephrology* 2004;17:762),令人惊讶的是雷帕霉素治疗可增加粘液瘤病毒对癌细胞的感染。不受任何特定理论的限制,通过与这些细胞的肿瘤表型有关的 mTOR 途径,粘液瘤病毒可利用不正常的信号转导。因而,利用 mTOR 抑制剂控制该途径会对所述病毒具有选择性优势。

[0093] 因此,本发明提供对具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞进行抑制的方法,该方法包括对所述细胞施用有效量的粘液瘤病毒。在另一个实施方式中,所述病毒与有效量的雷帕霉素组合施用。

[0094] 粘液瘤病毒可以是属于有复制能力的痘病毒的野兔病毒种的任何病毒。所述粘液瘤病毒可以是粘液瘤病毒的野生型病毒株,或粘液瘤病毒的基因修饰病毒株,包括敲除了 MT-5 的粘液瘤病毒株。粘液瘤病毒可以在兔子中具有减毒作用因而可降低患病风险的病毒株,包括下述的不表达功能性 M135 蛋白的病毒株。

[0095] 在一个具体的实施方式中,所述粘液瘤病毒是不表达功能性 M135R 的粘液瘤病

毒。

[0096] 不表达功能性 M135R 的粘液瘤病毒包括具有部分或全部的编码被删除的、替代的或中断的 M135R 的开放阅读框架的粘液瘤病毒,从而使该病毒不表达基因产物、不表达稳定的基因产物或不表达功能性基因产物。所述病毒还包括具有部分或全部被删除的、替代的或中断的 M135R 基因调节区的粘液瘤病毒,从而使得编码 M135R 的基因无法表达蛋白。功能性 M135R 蛋白是可在细胞内进行转录、翻译、折叠、翻译后修饰和定位的 M135R,并且其可允许粘液瘤病毒导致被感染的宿主患上粘液瘤病。如果 M135R 蛋白在细胞内不能,或不适当地或不充分地进行转录、翻译、折叠、翻译后修饰或定位,以致被感染的宿主未患上粘液瘤病,则细胞内不表达功能性 M135R 蛋白。

[0097] 在另一个实施方式中,所述细胞是对干扰素非应答的。

[0098] 在具体的实施方式中,所述细胞是哺乳动物癌细胞。在一个实施方式中,所述细胞是人类癌细胞,包括人类实体肿瘤细胞。

[0099] 在另一个实施方式中,所述细胞受到病毒的慢性感染。

[0100] 施用的雷帕霉素与粘液瘤病毒的“组合”可以一起配制在同一剂型中,或者可以配制在分开的剂型中,所述分开的剂型可以是相同的形式或不同的形式,通过相同的施用方式或不同的施用方式施用。此外,施用没有配制在同一剂型中的雷帕霉素与粘液瘤病毒的组合是指雷帕霉素与粘液瘤病毒共施用于被治疗的哺乳动物,并且可以同时施用,或者依照任意顺序或在不同的时间点依次施用。因此,雷帕霉素与粘液瘤病毒可分开地但时间上应足够接近地施用,以提供所需的治疗效果。

[0101] 在这里使用的术语“有效量”的意思是以一定的剂量在一定时期内能有效地获得所需结果所必需的量。

[0102] 在这里使用的术语“具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞”是指这样的细胞:当接触病毒或被病毒侵入后,该细胞不诱导抗病毒防御机制(包括抑制病毒复制、生成干扰素、诱导干扰素应答途径和由或不由于干扰素介导的凋亡),并且因此可以受到 MV 病毒(单独的或者组合雷帕霉素处理)的感染。所述术语包括,相对于正常细胞(如没有受到感染的细胞或非癌细胞),当与病毒接触或受病毒感染时具有减弱的或无效的先天性抗病毒应答的细胞。这个术语包括对干扰素非应答的细胞,和具有减弱或无效的凋亡应答或诱导凋亡途径的细胞。所述缺陷可能由多种原因引起,包括感染、遗传缺陷或环境影响。但应理解,当缺陷是由预先存在的感染引起时,可能会排斥 MV 重叠感染,技术人员能够容易地鉴别这种情况。技术人员无需进行不适当的实验就能够容易地确定任何给定的细胞类型是否具有先天性抗病毒应答缺陷因而能够被粘液瘤病毒(或者单独的或者与雷帕霉素处理组合)所感染。例如,VSV 经常被用于检测细胞的抗病毒应答。

[0103] 为了评估给定的细胞类型(如给定的癌细胞类型)是否具有先天性抗病毒应答缺陷,技术人员可以获取外植块,使其一些细胞在体外生长,并确定被 VSV 或作为另外一种选择的粘液瘤病毒(包括与雷帕霉素组合的粘液瘤病毒)感染的感染性。

[0104] 在整个说明书中所使用的术语“对干扰素非应答的细胞”意思是指这样的细胞,该细胞对干扰素活性如干扰素的抗病毒或抗肿瘤活性不产生应答,或者,该细胞不具有正常的干扰素应答,例如,减弱的或无效的干扰素应答,或者,该细胞具有如用信号转导分子如转录因子(例如 STAT1)的磷酸化或激活所检测到的不正常的干扰素信号转导。例如包括

但不限于,没有经受增殖抑制的细胞,或当接触干扰素(其水平在可以对干扰素产生应答的细胞中足以引起所述应答)而没有被杀死的细胞。对干扰素非应答的细胞可能在胞内信号转导途径或在应答细胞中被正常激活的途径中存在缺陷。一般地,对 VSV 感染的易感性表明对干扰素的非应答性,技术人员可以容易确定特定细胞是有能力还是没有能力对干扰素产生应答,以在干扰素存在下抑制 VSV 感染,或者用本领域已知的其它干扰素活性标记,例如,IFN 刺激基因(如 PKR、STAT、OAS、MX)的表达水平。

[0105] 在整个说明书中所使用的术语“有复制能力”是指病毒能够在特定宿主细胞中感染和复制。这包括病毒单独存在于特定的宿主细胞中时其复制受到抑制,但是用雷帕霉素处理宿主细胞后该病毒可有效地感染所述细胞。

[0106] 在这里使用的术语“细胞”包括单细胞,也包括多细胞或细胞群。对细胞施用药剂包括体外施用和体内施用。

[0107] 在这里使用的术语“动物”包括动物界的所有成员,特别是包括哺乳动物,尤其是人类。

[0108] 术语“抑制”具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞除了包括使细胞不能生长或分裂或者减少或延迟细胞的生长或分裂之外,还包括通过溶解或凋亡引起或者其他细胞死亡机制引起的细胞死亡。

[0109] 使用技术人员已知的标准分子生物学技术,例如 Sambrook 等((2001) 分子克隆:实验室手册 (Molecular Cloning:a Laboratory Manual),第三版,冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbour Laboratory Press))中所述的技术,可以容易地对粘液瘤病毒基因组进行修饰以表达一种或更多种的治疗性转基因。技术人员能够容易地确定粘液瘤病毒基因组的哪些部分可以删除,使得该病毒仍然可以进行有效感染。例如,将已公布的病毒基因组序列与其它已被充分表征的病毒基因组进行比较,可以推测出病毒基因组可切除的非必要部分(例如参见 C. Cameron, S. Hota-Mitchell, L. Chen, J. Barrett, J.-X. Cao, C. Macaulay, D. Willer, D. Evans 和 G. McFadden, 病毒学 (1999) 264 :298 ~ 318)。

[0110] 在这里使用的术语“治疗性基因”或“治疗性转基因”意欲广泛地描述其表达可以影响所需的结果,例如,抗癌效果的任何基因。例如,可以对病毒进行修饰,使其携带可以提高用该病毒治疗的抗癌效果的基因。这种基因可以是参与引发凋亡的基因,或参与靶向受感染细胞以进行免疫破坏的基因,如修复干扰素应答缺陷的基因,或结果导致表达刺激抗体应答的细胞表面标记(例如细菌细胞表面抗原)的基因。所述病毒还可以被修饰,以表达参与关闭成瘤细胞或癌细胞的增殖和生长,据此阻止所述细胞的分裂的基因。同时,所述病毒还可以被修饰以包括治疗性基因,如参与化学治疗剂合成的基因,或者,所述病毒可以被修饰以在特定类型细胞如人类细胞中具有增强的复制水平,从所述类型细胞中衍生出欲抑制或杀死的细胞。可被插入粘液瘤病毒中以提高其抗癌效果的基因的具体例子包括编码 TRAIL 蛋白的人类基因或编码 E4 或 f4 多肽的腺病毒基因,两类所述蛋白都参与杀死人类肿瘤细胞。

[0111] 应该理解,粘液瘤病毒(包括与雷帕霉素组合使用时)的治疗效果可以通过病毒对细胞的溶解或通过病毒输送治疗性产物来获得。与粘液瘤病毒组合时所包含的雷帕霉素可以增强单独的粘液瘤病毒的效果。即,与雷帕霉素组合施用的粘液瘤病毒能够有效地感染比单独的粘液瘤病毒更多的靶细胞,或者能够有效地感染具有先天性抗病毒应答缺陷的

靶细胞,而在雷帕霉素不存在时粘液瘤病毒对所述细胞的有效感染是受到抑制的。

[0112] 可以通过本领域已知的标准技术制备病毒。例如,病毒可以用欲使用的粘液瘤病毒株感染所培养的兔细胞,使感染继续发展以使所述病毒在所培养的细胞中复制来制备,并可用本领域已知的破坏细胞表面的标准方法进行释放,从而释放用于采集的病毒颗粒。一旦采集之后,即可通过感染兔细胞的汇合坪并进行噬菌斑检验来测定病毒的滴度(见 Mossman 等(1996),病毒学 215 :17 ~ 30)。

[0113] 本发明还提供了在需要治疗的患者中治疗特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态的方法,该方法包括对所述患者施用有效量的粘液瘤病毒和选择性组合的雷帕霉素。所述患者可以是任何动物,包括哺乳动物,其中包括人类。

[0114] 在这里使用的“特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态”是指任何与具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的存在有关的、涉及该细胞的存在或以存在该细胞为特征的疾病、障碍或不适,并且可以通过杀死这些细胞而治疗所述疾病、障碍、不适或者其症状。例如,所述疾病状态可以是癌症。所述疾病状态也可以包括慢性病毒感染。

[0115] “治疗”疾病状态是指用于获得有益的或所需的结果(包括临床结果)的方法。有益的或所需的临床结果可以包括但不限于,减轻或改善一种或更多种症状或不适、减小病症程度、稳定疾病状态、防止疾病发展、防止疾病传播、推迟或减缓疾病进程、推迟或减缓疾病的发作、改善或减轻疾病状态、以及(部分或完全)恢复。“治疗”还可以指延长患者的生存时间,该生存时间长于所预测的不经治疗的生存时间。“治疗”还可以指抑制疾病进程、暂时减缓疾病进程,不过更为优选的是包括持久地中止疾病进程。

[0116] 在一个实施方式中,所述疾病状态是癌症。所述癌症可以是任何类型的癌症,其中,尽管不必是全部细胞,但至少有一些细胞具有先天性抗病毒应答缺陷。在一个实施方式中,所述癌症可以是其中至少有一些细胞是对干扰素非应答的癌症。在这里使用的术语“肿瘤”、“肿瘤细胞”、“癌症”和“癌细胞”(可以互换使用)是指表现出不正常生长的细胞(其特征为细胞增殖明显失去控制)或已经被无限增殖化的细胞。术语“癌症”或“肿瘤”包括转移性和非转移性癌症或肿瘤。在这里使用的“成瘤的”或“瘤”泛指以不具有正常生长抑制机制增殖的一个细胞或多个细胞,因此除了癌细胞以及发育异常细胞或增生细胞之外,还包括良性肿瘤。

[0117] 癌症,包括恶性肿瘤的存在,可以用本领域普遍接受的标准进行诊断。

[0118] 可以根据本发明进行治疗的癌症类型包括但不限于,包括白血病和淋巴瘤在内的造血细胞癌、结肠癌、肺癌、肾脏癌(kidney cancer)、胰腺癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、口腔癌、卵巢癌、喉癌、肝细胞癌、胆管癌、鳞状细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、黑素瘤和其它任何肿瘤。实体瘤如肉瘤和癌包括但不限于,纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴样恶性肿瘤、胰癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳突样腺癌、髓样癌、支气管肺癌、肾脏细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒膜癌、维尔姆斯氏瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、膀胱癌和 CNS(中枢神经系统)肿瘤(如神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤(craniopharyngioma)、室鼓膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听觉神经瘤、少突胶质细胞瘤、髓膜瘤(menangioma)、黑素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0119] 在另一个实施方式中,所述疾病状态是慢性病毒感染。

[0120] 所述慢性感染病毒可以是在动物细胞中以持续方式长期进行感染和复制从而导致病理状态的任何病毒。所述慢性感染病毒可以是与癌的发展有关或相关的病毒。

[0121] 病毒慢性感染可以通过本领域已知的标准方法进行诊断。例如,慢性病毒感染可以通过患者中抗病毒抗体的存在来检测,或者通过对患者细胞中病毒 RNA 或 DNA 的存在测试呈阳性来检测。

[0122] 当给患者施用,粘液瘤病毒,以及可选的粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合的有效量是以一定的剂量在足够长的期间内,对于病毒减轻、改善、缓和、改进、稳定、防止传播、延缓或推迟进程或治愈疾病来说所需要的量。例如,有效量可以是足以获得以下效果的量:降低癌细胞或成瘤细胞的数目或将其破坏;或者降低病毒慢性感染细胞的数目或将其破坏;或者抑制所述细胞的生长和/或增殖。

[0123] 对患者施用的有效量可以根据许多因素而变化,所述因素例如粘液瘤病毒与可选的雷帕霉素的药效特性;给药方式;患者的年龄、健康状况和体重;疾病状态的性质和程度、治疗的频度、同时进行治疗的类型(如果有的话),以及病毒的毒力和滴度。

[0124] 本领域技术人员可以基于上述因素决定粘液瘤病毒的适当施用量。根据患者的临床反应,病毒最初施用的适当量可以按需进行调整。可以根据安全施用的最大病毒量和产生所需结果的最小病毒量,凭借经验决定病毒的有效量。

[0125] 可使用标准的给药方法对患者施用粘液瘤病毒。在一个实施方式中,病毒的施用是全身给药。在另外一个实施方式中,通过在患处注射来施用病毒。在一个特定实施方式中,所述疾病状态是实体瘤,并且通过在肿瘤部位注射而施用病毒。在许多实施方式中,病毒的施用可以通过口服或胃肠外给药进行,或者采用本领域已知的任何标准方法进行。

[0126] 当对病毒进行全身给药时,为了使其临床效果与在患处注射病毒所获得的临床效果相同,需要施用明显更多的病毒量。但是,适当的剂量水平应该是能够获得所需效果的最小量。

[0127] 待施用的病毒的浓度决定于欲施用的具体的粘液瘤病毒株的毒力和靶向细胞的性质。在一个实施方式中,对人类患者施用低于约 10^9 个空斑形成单位(“pfu”)的剂量。在各种实施方式中,可以以单剂量施用约 10^2 pfu ~ 约 10^9 pfu、约 10^2 pfu ~ 约 10^7 pfu、约 10^3 pfu ~ 约 10^6 pfu 或约 10^4 pfu ~ 约 10^5 pfu。

[0128] 本领域的技术人员还可以利用上述因素决定对患者施用的雷帕霉素的适宜量。可以根据欲施用的病毒量和病毒株、可安全施用的雷帕霉素的最大量和为提高粘液瘤病毒感染率所施用的雷帕霉素的最小量,凭借经验决定雷帕霉素的有效量。

[0129] 可使用标准的给药方法对患者施用雷帕霉素。在一个实施方式中,雷帕霉素的施用是全身施用。在另外一个实施方式中,通过在患处注射来施用雷帕霉素。在一个特定实施方式中,所述疾病状态是实体瘤,并且通过在肿瘤部位注射而施用雷帕霉素。在许多实施方式中,雷帕霉素的施用是通过口服或胃肠外给药进行,或者采用本领域已知的任何标准方法进行。

[0130] 可在一天或数天的时间内以单剂量或多剂量施用全量的雷帕霉素。剂量施用的频度和持续时间可以容易地确定。给药安排取决于施用粘液瘤病毒时间的长短。例如,雷帕霉素可一次性施用于患者,也可以每天施用 2 ~ 4 次。

[0131] 在各种实施方式中,雷帕霉素的剂量可为约 0.01mg/ 每天 / 每千克体重~约 250mg/ 每天 / 每千克体重、约 0.01mg/ 每天 / 每千克体重~ 50mg/ 每天 / 每千克体重、约 0.05mg/ 每天 / 每千克体重~ 10mg/ 每天 / 每千克体重或约 0.1mg/ 每天 / 每千克体重~ 7.5mg/ 每天 / 每千克体重。

[0132] 根据最初治疗方案的效果,可以重复提供有效量的粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合。一般是周期性给药,同时监视所产生的任何反应。应该认识到,技术人员可以根据给药的时间表和所选择的给药途径来施用低于或高于如上所示的剂量。

[0133] 粘液瘤病毒和可选的组合雷帕霉素可以作为单独疗法给药,或者可以结合其它治疗方法(包括化学疗法、放射疗法或其它抗病毒疗法)进行给药。例如,可以在外科手术切除原发性肿瘤之前或之后,或者在实施放射疗法或施用传统化学治疗药物之前或同时或之后施用粘液瘤病毒和可选的组合雷帕霉素。在一个实施方式中,粘液瘤病毒和可选的组合雷帕霉素可以与其它溶瘤病毒联合施用或顺次施用,所述其它溶瘤病毒可以针对不同的肿瘤细胞类型显示出特异性。

[0134] 为了有助于给药,可以将粘液瘤病毒和选择性组合的雷帕霉素制成药物组合物中的组分。因此,在另外的一个实施方式中,提供了含有粘液瘤病毒、可选的雷帕霉素和药学上可接受的稀释剂的药物组合物。因此,本发明一方面还包括所述药物组合物,该药物组合物用于抑制具有先天性抗病应答缺陷的细胞或治疗特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态。所述组合物通常含有药学上可接受浓度的盐、缓冲剂、防腐剂和各种可兼容的载体。对于所有形式的输送,可以将所述重组的粘液瘤病毒制备成生理盐溶液。

[0135] 所述药物组合物还可以含有其它治疗剂,如其他的抗癌剂。在一个实施方式中,所述组合物包含化学治疗剂。例如,所述化学治疗剂实质上可以是任何药剂,只要该药剂针对患者的癌细胞或成瘤细胞表现出溶瘤效果并且不抑制或不降低粘液瘤病毒的肿瘤杀死效果即可。例如,所述化学治疗剂可以是但不限于,蒽环类抗生素、烷化剂、烷基磺酸盐、吡丙啶、氮丙啶、甲基蜜胺(methylmelamine)、氮芥、亚硝基脲、抗生素、抗代谢物、叶酸类似物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、酶、鬼臼毒素、含铂剂或细胞因子。优选的是,所述化学治疗剂是已知可以有效对抗特定类型的癌细胞或成瘤细胞的化学治疗剂。

[0136] 药学上可接受稀释剂的比例和种类可根据所选择的给药途径、与活病毒的相容性、与雷帕霉素的化学稳定性的可适用的相容性和标准的制药实践来确定。一般地,药物组合物可以采用不显著损害所述粘液瘤活病毒的生物特性,或不导致选择性包含的雷帕霉素的降解或稳定性或功效降低的组分进行配制。

[0137] 药物组合物可以通过已知制备方法进行制备,该已知制备方法用于制备适合给患者施用的药学上可接受的组合物,使得可以将有效量的一种或多种活性物质与药学上可接受的载体组合成混合物。适合的载体,例如,在 Remington 的制药科学中进行了描述(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA1985)。基于此,所述组合物包括但不限于,与一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂组合并含在具有适当 pH 且与生理液体等渗的缓冲液中的粘液瘤病毒和可选的雷帕霉素的溶液。

[0138] 本领域技术人员应当能够理解,根据所选择的给药途径,所述药物组合物可以以各种形式对患者施用。本发明的组合物可以通过口服或胃肠外给药。胃肠外给药包括静脉

内、腹膜腔内、皮下、肌肉内、透上皮、鼻内、肺内、鞘内、直肠和局部方式给药。可以通过在选定的一段时间内连续输注进行胃肠外给药。

[0139] 所述药物组合物可以与例如惰性稀释剂或与可同化的载体一起口服施用,或者,其可以被包裹在硬的或软的壳状明胶胶囊中施用,或者压成片剂施用。对于口服治疗给药,粘液瘤病毒与可选的雷帕霉素可以与赋形剂混合,并以可吸收片剂、含服片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆剂和薄片剂(wafer)等形式使用。

[0140] 粘液瘤病毒与可选的雷帕霉素的溶液可以在生理学上适宜的缓冲液中制备。在普通的贮藏和使用条件下,这些制备物含有防腐剂,以防止微生物的生长,但所述防腐剂不能使所述活病毒失活。本领域技术人员应该知道如何制备适当的制剂。选择并制备适当制剂的传统工艺和组分在例如以下文献中有描述:Remington的制药科学和1999年出版的美国药典:国家处方集(The United States Pharmacopeia:The National Formulary, USP 24NF19)。

[0141] 在不同实施方式中,所述组合物通过在诸如肿瘤部位等患处直接注射(皮下、静脉内、肌肉内等)进行施用,或者口服施用,作为选择,可以经皮施用。

[0142] 所述药物组合物的适合注射使用的剂型包括无菌水性溶液或分散液和用于临时制备无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉剂,其中,术语无菌不延及欲施用的活粘液瘤病毒本身。在所有的情况下,所述剂型必须是无菌的,并且流动性必须达到使其容易注射的程度。

[0143] 欲使用的药物组合物的剂量取决于被治疗的具体疾病、疾病的严重性、患者的个体参数(包括年龄、身体条件、身高和体重)、治疗的持续时间、同时进行的疗法的特性(如果有的话)、具体的给药途径,以及在保健人员的知识和专业技能范围内的其它类似因素。这些因素对本领域技术人员是已知的,并且可以通过少量常规实验来解决。

[0144] 粘液瘤病毒和选择性组合的雷帕霉素,或含有粘液瘤病毒与雷帕霉素(不管是在同一制剂中还是在不同的制剂中)的药物组合物也可以包装成试剂盒,该试剂盒包含粘液瘤病毒与雷帕霉素的使用说明书,所述的使用包括,使用粘液瘤病毒,或使用粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合来抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,或者,在需要的患者中,使用粘液瘤病毒,或使用粘液瘤病毒与雷帕霉素的组合来治疗特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态。所述疾病状态可以是癌症,或者可以是慢性病毒感染。

[0145] 本发明还考虑到了粘液瘤病毒和选择性组合的雷帕霉素在抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞中的应用。在一个实施方式中,所述细胞对干扰素是非应答的。本发明还提供粘液瘤病毒和选择性组合的雷帕霉素在治疗需要的患者中的、特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态中的应用。在一个实施方式中,所述疾病状态是癌症。本发明还提供粘液瘤病毒和选择性组合的雷帕霉素在药物制备中的应用,所述药物用于抑制具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞或用于治疗需要的患者中的、特征为存在具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的疾病状态。

[0146] MV可选择性感染除MV的天然宿主以外的动物中的或来自该动物的细胞群中的细胞,所述细胞具有先天性抗病毒应答缺陷。MV的这种能力提供了MV在从培养物或动物的细胞群中检测出具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞中的应用,所述细胞包括对干扰素非应答的细胞。否则,这些细胞可能不容易被检测到,例如,在动物中,还未发展成可触知的肿瘤或

还未引起可察觉病症的某些癌细胞。

[0147] 因而,在一个实施方式中,本发明提供了在患者中检测具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的方法,该方法包括对所述患者施用经修饰而可以表达可检测标记的粘液瘤病毒和选择性组合的雷帕霉素;使所述病毒感染所述患者中具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞;和检测所述患者中表达所述可检测标记的细胞。

[0148] 可以使用使诊断图像可视化的任何传统方法来检测被感染的细胞。所述检测方法取决于所使用的具体的可检测标记。例如,可以使用荧光数字成像显微镜检测被经过基因修饰而表达荧光蛋白的粘液瘤病毒感染的细胞。其它方法包括计算机控制 X 线断层摄影术 (CT)、全身扫描如正电子发射 X 线断层摄影术 (PET)、磁共振成像 (MRI) 和超声波检查法。熟练技术人员能够决定用于检测具体可检测标记的适当方法。

[0149] 可检测标记包括但不限于如下的任何标记,即,用于表达或合成该标记的基因可以插入到粘液瘤病毒基因组中,以在被经修饰的病毒感染的细胞中表达或合成所述标记。例如,在一个实施方式中,可检测标记可以是荧光蛋白。可以对患者施用所述修饰病毒,以使病毒感染任何具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,并使可检测标记在所述细胞中以可检测的水平表达,然后以适当的时间间隔检测被感染的细胞。例如,可以在对患者施用经基因修饰而表达荧光蛋白的病毒后 2 ~ 20 天之间的任何时候进行检测。

[0150] 检测方法可以在患者中间断性地重复进行,以监测所述患者中具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的存在。例如,用粘液瘤病毒检测所述细胞的方法,如有必要,可以按 6 个月、1 年或 2 年的间隔在患者中进行,这取决于具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的特性和由所述细胞在患者中的存在所导致的任何疾病状态的特性。重复所述方法一段时间,以监测疾病状态的发展或缓解,或疾病在患者体内的扩散。

[0151] 粘液瘤病毒能够选择性地感染具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞,并且可以在细胞中用作所述缺陷的指示物。因此,用本发明的方法,可以对从患者中取出的细胞进行先天性抗病毒应答缺陷检测。当与其它指示物结合时,这种检测可以指示患者可能患有特定的疾病状态,例如癌症。

[0152] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了检测样品中具有先天性抗病毒应答缺陷的细胞的方法,该方法包括培养所述细胞;使所培养的细胞与粘液瘤病毒和选择性组合的雷帕霉素接触;以及检测细胞受到粘液瘤病毒感染的感染性。

[0153] 所述细胞可以通过已知活组织检查方法从包括人类受试对象在内的受试对象中取出。所述活组织检查方法决定于待检细胞的位置和类型。

[0154] 按照已知培养技术培养细胞,并通过往培养基中加入活粘液瘤病毒和可选的雷帕霉素而使所述细胞与 MV 和可选的雷帕霉素接触。在组合添加粘液瘤病毒与雷帕霉素时,所述病毒与雷帕霉素可同时加入或依次加入。使用已知接触 MV 后会被感染的细胞培养物作为阳性对照,可改变感染复数 (“MOI”),包括在雷帕霉素存在的情况下的感染复数,以确定对于给定细胞类型、密度和培养技术以及具体的雷帕霉素浓度的最佳 MOI。

[0155] 雷帕霉素的量和在培养细胞中加入雷帕霉素与粘液瘤病毒的时机因细胞的类型、培养方法和病毒株而异。通过使用常规方法的少量测试,可容易地测试并调整所述参数。

[0156] 所培养的细胞被 MV 感染的感染性 (包括在雷帕霉素存在的情况下的感染性) 可以通过技术人员已知的各种方法进行检测,包括对 MV 导致细胞死亡的能力进行检测。也可

以包括将试剂加入所述细胞培养物,以完成其与病毒表达产物的酶促反应或化学反应。所述病毒表达产物可以由插入到 MV 基因组中的报告基因来表达。

[0157] 在一个实施方式中,可以对 MV 进行修饰,以使对感染状态的检测变得容易。例如,可以对 MV 进行基因修饰以表达标记,该标记可通过相差显微术、荧光显微术或放射性成像术而容易地进行检测。所述标记可以是参与比色反应或放射标记反应的所表达的荧光蛋白或所表达的酶。在另一个实施方式中,所述标记是破坏或抑制受检细胞特定功能的基因产物。

[0158] 通过下列非限制性实施例对本发明进行进一步的描述。

[0159] 实施例

[0160] 实施例 1 :粘液瘤病毒对小鼠和人类细胞系的感染

[0161] 病毒株

[0162] 所使用的病毒株包括野生型 MV、经修饰而表达绿色荧光蛋白 (“GFP”) 或 β -半乳糖苷酶 (“LacZ”) 的 MV,以及已被杀死 (“死”) 的 MV。用标准技术对病毒进行制备和滴定。

[0163] 细胞系

[0164] 利用小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 进行小鼠试验,所述小鼠胚胎成纤维细胞来自野生型小鼠和经以下敲除的小鼠:IFN α / β 受体纯合敲除、STAT1 纯合敲除、PKR 杂合敲除、RNase L 杂合敲除、Mx1 杂合敲除、PKR/RNase L/Mx1 三重纯合敲除。

[0165] 以 BGMK 对照细胞和人类肿瘤细胞系进行人类试验,所述人类肿瘤细胞系为 HT29、HOP92、OVCAR4、OVCAR5、SK-MEL3、SK-MEL28、M14、SKOV3、PC3、DU145、CAKI-1、786-0、T47D、MDAMB 435、SF04、U87、A172、U373、Daoy 和 D384,如 Stojdl 等所述 (癌细胞 (Cancer Cell), (2003) 4 :263 ~ 275)。

[0166] 方法

[0167] 一般地,分析和试验如 Lalani 等在 Virology((1999)256:233 ~ 245)、Johnston 等在 J Virology((2003)77(13):7682 ~ 7688) 以及 Sypula 等在 Gen Ther Mol Biol((2004)8:103) 中所述进行。

[0168] 对于体内小鼠研究,将人类颅内神经胶质瘤 U87 植入裸鼠。植入后 15 天,用活的或死的 MV GFP 对小鼠进行肿瘤内注射,滴度为 5×10^6 ,或进行模拟感染。感染后 72 小时,杀死动物,取出大脑,埋入 OCT (最佳切温复合物),切制冷冻切片。通过荧光显微术可以看到整个大脑切片中的粘液瘤病毒 -GFP。然后固定切片,并用 H&E (苏木精和曙红) 染色,使肿瘤可视化。

[0169] 对于人类肿瘤细胞分析,手术一结束即进行肿瘤胰蛋白酶化 (trypsonized) 并铺板,第二天,用病毒进行感染,MOI 为 0.1、1.0 或 10。在感染后 24 小时和 48 小时,分别用相位显微术和荧光显微术收集有关细胞毒性和病毒表达的数据。利用黄色四唑盐 MTT 进行检测,以定量感染后 48 小时、72 小时或 96 小时的细胞存活率% (为模拟感染存活的细胞的百分比)。

[0170] 用 10M.O.I 的粘液瘤病毒 -GFP 感染人类小儿髓母细胞瘤细胞系 Daoy 和 D384。感染后 72 小时,用 MTT 检测细胞的生存能力。

[0171] 结果 :小鼠细胞系的感染

[0172] 以前研究表明,用趋化因子受体转染的某些小鼠 3T3 细胞克隆可以被粘液瘤病毒感染,而其它克隆则不能。为了研究粘液瘤病毒在其它小鼠细胞中的趋向性是否取决于任何特定受体,发明人研究来自野生型 (WT) 小鼠和各种基因敲除小鼠的原初小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF)。

[0173] 因为 IFN 在建构抗病毒应答中起关键作用,所以发明人假定,限制性表型与 IFN 介导的“抗病毒状态”有关。用抗体中和循环的 IFN,或者产生 IFN 受体阴性小鼠或胞内信号转导途径基因缺失了的小鼠,而破坏 IFN 系统的事件链,将严重损害宿主对粘液瘤病毒的抗性,所述粘液瘤病毒一般不感染正常小鼠细胞。

[0174] 为了检验这种假设,发明人需要证明粘液瘤病毒在非允许细胞中的非感染性是否是因为 IFN 的抗病毒作用。对敲除了一种或多种参与胞内 IFN 信号转导应答的蛋白的各种 MEF 细胞类型进行检验,以了解 MV 感染对 IFN 途径的影响。

[0175] 对原初 MEF 进行的实验证明,野生型 (“WT”)MEF 没有被粘液瘤病毒感染。当通过用抗 IFN α/β 的中和抗体阻断 IFN 途径时,完全可以用粘液瘤病毒感染 MEF (图 2)。但是,与抗 IFN γ 中和抗体接触的 MEF 仍然保持非允许。这在总体上说明了 IFN α/β ,而不是 IFN γ ,在为粘液瘤病毒体外感染 MEF 创造允许环境中的重要性。在文献中已经确定了不同的 IFN α/β 和 IFN γ 胞内信号转导途径。但是,与所培养的成纤维细胞不同,IFN α/β 和 IFN γ 均可能在被感染的宿主中起重要作用。发明人推测,在 IFN α/β 和 / 或 IFN γ 途径中存在缺陷的人类肿瘤对粘液瘤病毒的体内感染是易感性的。

[0176] 发明人测定了 STAT1 和 STAT2 在 MV 感染的非允许 WT MEF 中的活性。在图 3 中显示的结果表明,STAT1 和 STAT2 被激活。进一步研究表明,STAT3、STAT4 和 STAT5 没有被激活 (图 4)。

[0177] 为了确定 IFN α/β 胞内途径在保持 MEF 非允许状态中的重要性,进行基因缺失研究,以使 IFN α/β 受体和胞内级联受到破坏。进行 IFN 受体或 JAK1 或 STAT1 的基因缺失。用 MV 感染 WT MEF、IFN α/β R^{-/-}-MEF 和 STAT1^{-/-}-MEF。IFN α/β R^{-/-}-MEF 和 STAT1^{-/-}-MEF 对 MV 是允许的,证明 IFN α/β 和 STAT1 的信号转导级联对 MV 感染是关键的 (图 5)。

[0178] 蛋白激酶 R (PKR) 是在众多细胞中受到 IFN α/β 诱导的酶。这种激酶在 dsRNA (双链 RNA) 存在时,经受自体磷酸化作用,然后磷酸化多个细胞蛋白,包括真核蛋白合成起始因子 (eIF-2 α),该真核蛋白合成起始因子的磷酸化可以诱导对蛋白翻译的抑制和凋亡。RNase L 的激活中也指示 PKR。发明人检测了 MV 感染后 PKR 在非允许 MEF 中的激活。在建立了良好的抗病毒状态的非允许 MEF 中,PKR 未被磷酸化 (图 6)。而且,MV 感染抑制了 PKR 的磷酸化 (图 7)。另外,粘液瘤病毒感染后,PERK (与 PKR 类似,ER 激酶) 在原初 WT MEF 中未被磷酸化 (图 8)。

[0179] 用 MV 感染 PKR、RNase L 或 Mx1 单基因敲除了的 MEF (图 9)。发现 PKR、RNase L 或 Mx1 对保持粘液瘤病毒感染非允许性是非必需的。为了进一步确认 PKR、RNase L 或 Mx1 的非必需性,进行 PKR^{-/-}、RNase L^{-/-} 和 Mx1^{-/-} 的三重敲除。PKR^{-/-}、RNase L^{-/-} 和 Mx1^{-/-} 的三重敲除并未有助于粘液瘤病毒的感染 (图 10),但是,用抗干扰素 α/β 的中和抗体处理 PKR、RNase L 和 Mx1 三重 KO (三重敲除) 的 MEF,其对粘液瘤病毒感染变得允许 (对比图 10 和图 11)。这些实验证明,PKR、RNase L 和 Mx1 对于介导 MEF 对 MV 的非允许性不是必需的。

[0180] 为了检测 MV 感染后, eIF-2 α 和 PKR 在非允许的野生型 MEF 和允许的 IFN α/β

β R-/-MEF 和 STAT1-/-MEF 中的激活,进行了进一步的实验。MV 感染后,尽管 PKR 在允许的和非允许的 MEF 中均未被磷酸化,但 eIF-2 α 在两种情况下均被磷酸化(图 12)。这证明没有 PKR 和 PERK 的参与,抗病毒状态由导致 eIF2 α 磷酸化的其它途径介导。

[0181] 粘液瘤病毒感染非允许的 PKR、RNase L 和 Mx1 三重敲除后的 MEF 后,STAT1 同时发生丝氨酸磷酸化和酪氨酸磷酸化(图 13)。还显示了粘液瘤病毒感染后,酪氨酸磷酸化的 STAT1 在非允许 PKR-/-+RNase L-/-+Mx1-/-MEF 中的亚细胞定位(图 14)。

[0182] 总之,这些结果表明,平行的 PKR/PERK 独立的涉及 IFN/STAT1 的抗病毒途径对痘病毒趋向性是关键。而且,eIF2 α 磷酸化是 IFN 抗病毒作用最好的标记。

[0183] 结果:人类肿瘤研究

[0184] 发明人在体内系统中研究了 MV 感染人类肿瘤细胞的能力。用人类神经胶质瘤细胞注射裸鼠,随后形成颅内神经胶质瘤。活病毒能够感染这些人类肿瘤细胞,但不感染周围细胞(图 15)。在图 16 中显示来自 GFP 的荧光信号定位于肿瘤。

[0185] 假设许多人类肿瘤对干扰素是非应答的,并且,与在正常人类细胞所发现的 IFN 信号级联相比,肿瘤细胞没有正常的 IFN 信号级联,发明人进行了研究以探索粘液瘤病毒对人类肿瘤的影响。结果概括如下。

[0186] 最初,使用粘液瘤病毒来研究对各种对照和人类肿瘤细胞系 BGМК、HT29、HOP92、OVCAR4、SK-MEL3 和 SK-MEL28 的感染性和胞溶作用。MV 显示出各种感染性和胞溶效果:HT29(图 17)、HOP92(图 18)、OVCAR4(图 19)、SK-MEL3(图 20)、SK-MEL28(图 21) 和 BGМК(图 22)。

[0187] 对其它肿瘤细胞进行了检验,以下表 1 将所检验的各种肿瘤类型分为允许或非允许。

[0188] 表 1 粘液瘤病毒对人类肿瘤细胞的趋向性

[0189]

细胞系	细胞来源	类型	允许	非允许
BGMK	肾脏	猴子	X	
RK-13	肾脏	兔子	X	
RL-5	T 淋巴细胞	兔子	X	
HOS	骨肉瘤	人类	X	
PC3	前列腺癌	人类	X	
Caki-1	肾癌(renal cancer)	人类	X	
HCT116	结肠癌	人类	X	
786-0	肾癌	人类	X	
SK-OV-3	卵巢癌	人类	X	
ACHN	肾癌	人类	X	
HOP92	肺癌	人类	X	
SK-MEL3	黑素瘤	人类	X	
SK-MEL28	黑素瘤	人类	X	
OVCAR4	卵巢癌	人类	X	
OVCAR5	卵巢癌	人类	X	
DU145	前列腺癌	人类	X	
A498	肾癌	人类	X	
T47D	乳腺癌	人类	X	
Colo205	结肠癌	人类		X
HT29	结肠癌	人类		X
MDAMB435	乳腺癌	人类		X
M14	黑素瘤	人类		X
MCF7	乳腺癌	人类		X
SK-MEL5	黑素瘤	人类		X

[0190] 随着 MV-LacZ 浓度的上升,各种人类肿瘤系对感染所显示出的应答也不一样。例如,U373 细胞需要更高的病毒滴度才能获得 U87 在低滴度即获得的杀死细胞的水平(图 23 和图 24)。粘液瘤病毒有效地感染星形细胞瘤细胞(图 25)和神经胶质瘤细胞(图 26)。粘液瘤病毒在感染后 48 小时可有效地杀死人类星形细胞瘤细胞和小儿髓母细胞瘤细胞(图 27 和图 28)。

[0191] 实施例 2:雷帕霉素对粘液瘤病毒在限制性细胞系中进行复制的动力学的影响

[0192] 病毒株

[0193] 所使用的病毒株包括野生型 MV(“vMyxLac”)和经修饰而敲除了 MT-5 基因的 MV(“vMyxLacT5-”)。用标准技术对病毒进行制备和滴定。

[0194] 细胞株

[0195] 以 BGMK 灵长类对照细胞系、RK-13 兔对照细胞和正常人类成纤维细胞 A9,以及如下限制性人类肿瘤细胞系进行人类试验,所述人类肿瘤细胞系为 786-0(肾)、ACHN(肾)、HCT116(结肠)、MCF-7(乳腺)、MDA-MB-435(乳腺)、M14(黑素瘤)和 COLO205(结肠)。

[0196] 方法

[0197] 一般地,分析和试验如 Lalani 等在 Virology((1999)256:233 ~ 245)、

Johnston 等在 J Virology((2003)77(13):7682 ~ 7688) 和 Sypula 等在 Gen Ther Mol Biol((2004)8:103) 中所述进行。

[0198] 对于病毒生长曲线,使细胞体外生长在单细胞层中,并在用病毒感染前用 20nM 的雷帕霉素或对照(1 : 5000 倍的 DMSO 稀释液)进行预处理。

[0199] 感染后 72 小时采集用所示病毒株感染的所示细胞系的样品并进行溶解。滴定细胞溶解物中所含有的病毒并用该病毒感染 BGМК 单细胞层。感染后 48 小时,对所述细胞进行固定并用 X-gal 进行染色。

[0200] 结果

[0201] 发明人先前已经证明粘液瘤病毒能感染许多种类的人类肿瘤细胞并在其中进行复制(Sypula 等, Gen Ther Mol Biol(2004)8:103)。该兔子特异性病毒可优先感染来自 NCI 参照收集物的大部分(约 70%)人类癌细胞系。另外,在粘液瘤病毒感染许多所述细胞系时,发现宿主范围基因(host range gene)M-T5 起到关键的作用。

[0202] 在对潜在的胞内分子进行的此次研究中,对雷帕霉素的作用进行了测试,所述潜在的胞内分子可能影响粘液瘤在人类肿瘤细胞中进行选择性复制的能力。

[0203] 如图 29 所示,使用 BGМК(灵长类对照细胞系);RK13 和 RL15(兔子对照细胞系);4T1 和 B16F10(小鼠癌细胞系);HOS 和 PC3(允许的人类癌细胞系);786-0、HCT116 和 ACHN(限制性人类癌细胞系);MCF-7、M14 和 COL0205(发育不全的人类癌细胞系),以多步生长曲线描述在低感染复数(MOI)之后粘液瘤病毒进行复制和传播的能力。对野生型 vMyxLac 和 M-T5 敲除的病毒 vMyxT5K0 进行测试,以研究在以雷帕霉素进行预处理或不以雷帕霉素进行预处理的情况下,这两种病毒在整个细胞单层中进行感染和传播的能力。通过在 BGМК 细胞上形成的病灶评价病毒的滴度。感染前细胞用 20nM 的雷帕霉素或适宜的载体对照(1 : 5000 倍的 DMSO 稀释液)预处理 6 小时。

[0204] 结果证明,雷帕霉素对对照 BGМК 细胞没有影响,且对任何一种受试的包括 RL-5 细胞在内的兔子细胞系(对 MT-5 敲除病毒是非允许的)也没有影响。但是,雷帕霉素确实能够增强粘液瘤病毒在小鼠肿瘤细胞系,以及或多或少的在允许的(I 型)细胞系,如 PC-3 中的复制。雷帕霉素对高度允许的细胞如 HOS 细胞的影响较少,这可能是由于所述细胞系对粘液瘤病毒已经是最大允许。在限制性(II 型)细胞系(786-0、HCT116 和 ACHN)中观察到雷帕霉素的最大效果,所述细胞系对野生型病毒是允许的但是对 vMyxT5K0 病毒株是非允许的。甚至在发育不全的(III 型)细胞系 MCF-7 和 COL0205 中也存在一定影响,不过对发育不全的细胞系 M14 没有影响。

[0205] 然后,采集 BGМК 和 786-0 受感染细胞样品并进行溶解,用分离的病毒感染 BGМК 细胞的单细胞层(图 30)。使用 X-Gal 染色使受到病毒感染的细胞可视化。

[0206] 用雷帕霉素对肿瘤细胞进行预处理,所述肿瘤细胞是对粘液瘤感染具有“限制性”的细胞,即允许野生型粘液瘤病毒复制但是不允许 MT-5 敲除病毒复制的那些细胞,结果可恢复粘液瘤病毒在这些癌细胞系(包括肾、结肠和卵巢癌细胞系)中进行复制的能力(图 29 和 30)。

[0207] 另外,用雷帕霉素处理可增强野生型病毒在相同的这些细胞系中的复制能力,但不能增强其在兔子对照细胞或灵长类对照细胞中的复制能力。这些结果表明,雷帕霉素可起到增强粘液瘤病毒感染的作用。另外,雷帕霉素可能会影响不易被所述病毒感染的癌细

胞允许病毒进行复制的能力。

[0208] 后续实验检验了雷帕霉素处理对不支持野生型粘液瘤病毒感染的人类肿瘤细胞的影响(图 31)。所述预处理对作为对照的灵长类细胞或正常的人类成纤维细胞的影响很小,但能够增强在包括乳腺癌细胞系 MCF-7 在内的数种细胞系中的病毒感染率。由于几种人类肿瘤细胞系以及所述对照细胞系保持对雷帕霉素处理的抗性,因此雷帕霉素处理可能不允许粘液瘤病毒有效地感染未转化组织。

[0209] 实施例 3:粘液瘤病毒 M135K0 变体作为改进的溶瘤病毒的候选病毒

[0210] M135R 作为早期基因由粘液瘤病毒表达

[0211] 粘液瘤病毒编码由 MV 基因组测序鉴定到的蛋白(M135R)(Cameron 等, Virology(1999)264:298-318),该蛋白被预测可模拟宿主 IFN α / β 受体并防止 IFN α / β 引发宿主的抗病毒应答(Barrett 等, Seminars in Immunology(2001)13:73-84)。所述预测基于与来自痘苗病毒(B8R)的病毒 IFN α / β 受体同系物的序列同源性,并且已经证明所述病毒采用该免疫逃避策略(Symons 等, Cell(1995)81:551-560)。但是, M135R 仅具有 VVB18R 和所有其他由痘病毒测序得到的 IFN α / β -R 同系物的一半大小,并在所有的情况中仅与所述痘病毒 IFN α / β -R 同系物的氨基末端这部分对齐。图 32 显示了所预测的结构和 MV 的 M135R 与 VV 的 B18R 之间的序列相似性。在序列比对中仅显示了 B18R 的前 179 个氨基酸残基。表 2 显示了 M135R 与标示的痘病毒 IFN α / β -R 同系物之间的同一性百分比。对角线以上的数表示任何两个种类之间的同一性百分比,对角线以下的数表示任何两个种类之间的相似性百分比。顶部所有括号中的数表示推定蛋白中的氨基酸数目。预测的 M135R 的全长拷贝(178 个氨基酸)仅与各同系物的前 178 个残基进行比较。

[0212] 表 2 M135R 与其他痘病毒同系物的比较

[0213] 同一性%

[0214]

种类	粘液瘤 (178)	痘苗 (351)	天花 (354)	猴痘 (352)	牛痘 (cowpox) (351)	缺肢 (358)	骆驼痘 (Camelpox) (355)	YLDV (351)	猪痘 (344)	LSDV (360)
粘液瘤	----	24	21	24	23	21	22	20	18	17
痘苗	39	----	80	93	90	84	79	20	23	25
天花	36	88	----	79	87	88	79	19	24	24
猴痘	38	95	87	----	86	83	78	20	20	26
牛痘 (cowpox)	38	93	93	91	----	92	88	21	23	25
缺肢	35	89	93	87	94	----	87	17	21	25
骆驼痘	34	86	94	85	92	93	----	17	23	24
YLDV	38	37	37	37	38	34	34	----	23	28
猪痘	32	39	39	36	39	35	37	38	----	25
LSDV	32	39	39	41	38	39	36	43	38	----

[0215] 合成抗所预测的 M135R 免疫原性区的肽,并用其在兔中生成多克隆抗体而用于 western 印迹分析、免疫沉淀反应和免疫荧光。免疫印迹证实, M135R 作为早期基因被合成,其表达早在感染后 3 小时就可以被检测到(图 33A;泳道 1:模拟感染的 BG MK 细胞;泳道 2~6 分别为:用 vMyxLau 感染的感染后 0、3、6、18 和 36 小时的 BG MK 细胞)。用 AraC 对感染细胞进行的处理显示,通过抑制晚期蛋白表达并未改变 M135R 的合成,因而 M135R 是早期

基因(图 33B)。但是,用衣霉素进行的处理显示,M135R 发生 N 连接糖基化,由所述序列预测,所述 N 连接糖基化可能在单位点发生(图 33B)。莫能菌素处理表明,没有发生 O 连接糖基化。由图 33 中所示的结果可知,BGMK 受到粘液瘤病毒感染,moi 为 10。在所示的时间,用浓度为 40 μ g/ml 的 AraC、浓度为 1 μ g/ml 的衣霉素和浓度为 1 μ g/ml 的莫能菌素对细胞进行处理,或者不处理所述细胞。利用肽抗体可以检测到 M135R。

[0216] M135R 编码信号序列但是没有分泌

[0217] M135R 序列分析表明存在所预测的信号序列(图 32B)。但是,在羧基末端还存在所预测的跨膜域(图 32B)。对来自感染的 BGMK 细胞的上清液所进行的免疫印迹表明,M135R 没有分泌。然而,在全细胞的溶解物中容易地检测到 M135R(图 33)。为了测试信号序列是否起到将 M135R 驱动到细胞表面的作用,我们切掉跨膜域并将突变体克隆到杆状病毒表达系统中。对 AcM135R 和 Ac135 Δ TM 感染上清液所进行的比较表明,在细胞溶解物中可以见到全长的 M135R,其中并没有分泌的迹象。相反,Ac135 Δ TM 发生分泌并且证实信号序列起到将 M135R 驱动到胞外环境中的作用(数据未示出)。

[0218] M135R 蛋白定位于感染细胞的表面

[0219] M135R 具有功能性信号序列和跨膜域的发现促使我们去检测 M135R 的定位。有两样证据表明,M135R 定位于细胞表面。第一,当将 BGMK 接种在盖玻片上并用 vMyxLau(10moi)感染 24 小时,随后先利用亲和纯化抗-M135R 然后利用 FITC 偶联二次抗体进行免疫染色时,可以检测到 M135R(图 34A)。M135R 染色图表明在感染细胞的细胞表面上的定位。vMyxLau 是未经插入 β -gal 或 EGFP 基因进行改变的粘液瘤病毒的实际野生型菌株。

[0220] M135R 定位于细胞表面的第二种证据是,感染有 vMyxgfp 或 vMyx135K0 的 GHOST 细胞的细胞表面蛋白的生物素化。在感染后 24 小时制备细胞溶解物。将链霉亲和素琼脂糖珠与 500 μ g 来自细胞溶解物的总细胞蛋白混合 45 分钟。洗涤所述珠并在 15% PAGE-SDS 凝胶上分离,然后用抗-M135R 进行检测。将 50 μ g 来自感染细胞溶解物的总细胞蛋白在所述凝胶上分离作为对照。生物素化的表面蛋白的免疫沉淀反应表明,M135R 在感染细胞的表面上(图 34B)。

[0221] M135R 对于粘液瘤病毒的体外复制是非必要的

[0222] 为了检测 M135R 作为毒力因子的能力,我们构建了这样的重组病毒,其中切掉了 M135R,并用编码处于 VV 早期/晚期启动子控制下的 EGFP 和 gpt 盒(460 个核苷酸,或 86% 的 orf 被切掉)替代。克隆策略和所述盒如图 35A 所示。通过选择表达 EGFP 的病毒克隆来对重组体进行噬菌斑纯化。通过 PCR 证实了重组体的纯度(图 35B;泳道 1 是 1Kbplus DNA 梯度,泳道 2 和 3 是来自两个经纯化的 vMyx135K0 克隆的 PCR 产物。PCR 产物代表其中 M135 编码区域已经被切掉并且已经插入有 EGFP/gpt 标记的区域。泳道 2 为噬菌斑 1 而泳道 3 为噬菌斑 2。泳道 4 代表相同的区域并且包括天然的、没有被中断的 M135R 基因座。)。感染有 vMyxLau 或 vMyx135K0 的 BGMK 细胞的免疫印迹证实,vMyx135K0 已经不再表达 M135R(图 35C;M135R 表达的时间过程:泳道 1 是没有感染的 BGMK 细胞。泳道 2~6 代表在以 vMyxLau 感染后 0 小时(泳道 2)、3 小时(泳道 3)、6 小时(泳道 4)、18 小时(泳道 5)和 36 小时(泳道 6)时的 BGMK 细胞。泳道 7 和 8 代表以 vMyx135K0 感染后 6 小时(泳道 7)和 18 小时(泳道 8)时的 BGMK 细胞。泳道 9 是 M135R 在 AcNPV 中表达的阳性对照)。

[0223] 采用单步生长曲线来测试 vMyx135K0 在 BGMK 细胞中复制的能力。用 vMyxgfp 或

vMyx135K0 以 5moi 感染 BGMK 细胞,并按所示时间收集细胞。对 BGMK 细胞进行病毒滴度测定。vMyxgfp 和 vMyx135K0 之间的复制模式没有差异(图 36)。这些结果表明,M135R 对于体外复制并不是必需的。

[0224] 在我们于兔子原初胚胎成纤维细胞(REF)中研究粘液瘤的另一个基因影响粘液瘤复制的能力的过程中,我们采用 vMyx135K0 作为敲除对照并观察到一个奇怪的现象。用 vMyxgfp 感染 REF 会形成正常的感染灶,但是, vMyx135K0 形成了一个噬菌斑样的感染区域(图 37)。当我们测试其它细胞以证实这些表型时,我们能够在其它兔子成纤维细胞(HIG-82,图 38)和人原初成纤维细胞(ccd922-sk,图 39)中复制所述噬菌斑形成。

[0225] M135R 是兔子致病的关键毒力因子

[0226] 我们接着测试了 vMyx135K0 在实验室用兔子中形成粘液瘤病的能力。用 vMyxLau 或 vMyxgfp 注射动物会形成正常粘液瘤病,并且必须在注射后 9 天和 10 天之间对该动物实施安乐死,相反,注射了 vMyx135K0 的兔子能够完全恢复(表 3)。为了证实 M135R 的缺失会导致 vMyx135K0 的毒力减弱,我们构建了一个其中 M135R 得以回复的回复子病毒,我们测试了该回复子(vMyx135REV)使形成粘液瘤病的能力恢复的能力。所有 4 个处理组的兔子在注射相应病毒后的前 6 天均以类似的模式应答(表 3)。我们观察到,到注射后的第 4 天为止,所有处理组中的注射部位均有大的、红色的凸起的病变。然而,从第 6 天开始一直到随后的 3~4 天,不同病毒之间的差异变得明显。注射有野生型病毒或回复子病毒的这些动物在耳朵、眼睛和鼻子中有很多继发性病变,这在注射有 vMyx135K0 的动物中是观察不到的(表 3)。我们断定, M135R 的缺失显著减弱了 MV 在动物模型中的毒力,因此说明 M135R 是关键毒力因子。

[0227] 表 3 vMyx135K0 与野生型对照相比的致病机理

[0228]

	观察和开始时间 (数字+天表示注射后第一症状出现的天数)		
临床征兆	Lausanne (4 只动物)	vMyx135KO (6 只动物)	vMyx135REV (3 只动物)
接种部位	2 天: 红色, 可见的轻微凸起 4 天: 红色, 发暗中心	4 天: 11~16 mm 的红色凸起, 发暗中心	3 天: 红色小肿块, 轻微凸起
卫星病灶	4 天	6 天: 刚开始, 在感染过程中很少看到	6 天: 可见 5~10 个, 到第 8 天为止增加到 30~40 个卫星病灶
结膜发炎	没有观察到	9 天: 单只兔子的眼睛有流出物	没有观察到
肛殖水肿	7 天: 发肿	7 天: 发红, 发肿	
继发性病变	6~7 天: 首先出现在眼睛周围, 然后是耳朵	7 天: 在耳朵和眼睛有少量小红点但未发现病变,	6 天: 首先在眼睑观察到红色区域, 到第 7 天看到明显的病变
呼吸困难	轻微或没有	轻微或没有	轻微或没有
病变消退		11 天: 25mm, 黑色, 结痂 - 卫星病灶失去颜色并结痂 13 天: 痂开始从健康组织上脱离	
	- 第 9 天对两只动物实施安乐死 - 第 10 天对两只动物实施安乐死	所有动物均恢复	第 10 天对 3 只动物实施安乐死

[0229] 在研究前 3 天每天测定兔子的体温。以此作为动物的基础体温。在研究的过程中, 我们继续每天测定每只动物的体温。但是, 处理组之间的体温并没有差异 (图 40)。这表明: M135R 在感染动物的发热反应中并没有起到关键的作用。

[0230] M135R 没有结合或抑制兔子 IFN α / β

[0231] M135R 的序列类似于痘苗 B18R (IFN α / β 受体类似物) 的序列。我们测试了 M135R 结合兔子 I 型 IFN 的能力。我们首先用碘处理兔子 IFN (5 μ g, 使用 Iodobead), 并测试 vMyx135KO 感染细胞结合 125 I- 兔子 IFN 的能力, 并将其与 vMyxgfp 感染 (10moi) 的细胞进行比较。对细胞进行收集、洗涤并在伽玛计数器 (gamma counter) 中计数。切掉 M135R 并没有影响到 IFN α / β 与感染细胞的结合, 并且我们没有观察到结合到 RK13 或 BGMK 细胞的细胞表面的 IFN 量的任何差异 (图 41)。而且, 用外源兔子 I 型 IFN 处理 RK13 或 BGMK 细胞并没有影响到 vMyx135KO 对细胞的感染 (图 42; 将细胞接种在 12 孔板中, 并用所示病毒以 0.01moi 进行感染; 在感染后 72 ~ 96 小时对荧光病灶进行计数; 在感染前 24 小时加入 200 单位的兔子 IFN α / β 或者未对细胞进行处理)。在感染以诱导细胞的抗病毒状态之前 24 小时对细胞进行预处理时, 观察到相同的结果。我们在 RK13 或 BGMK 细胞中没有发现感

染后形成的病灶有任何显著差异（数据未示出）。如果用人类 IFN α /D 处理细胞，同样发现这一现象（数据未示出）。同时，当将 Ac135 Δ TM 上清液施用于粘附到 BIAcore 芯片的兔子 IFN α / β 时，我们没能观察到任何的结合（数据未示出）。

[0232] 实施例 3 :在粘液瘤病毒感染的情况下抑制 mTOR 的分子后果

[0233] 使用来自其中雷帕霉素促进粘液瘤病毒感染的 786-0 细胞 (II 型癌细胞系) 的细胞溶解物进行 Western 印迹分析 (图 43)。收集用 vMyxLac 或 vMyxT5K0 以 3MOI 进行感染后 16 小时的溶解物或者未用病毒感染的细胞的溶解物。所示泳道含有来自感染前用 20nM 雷帕霉素 (表示为 R) 或适当的载体对照 (1 : 5000 倍的 DMSO 稀释液, 表示为 D) 预处理 6 小时的细胞的蛋白。使用直接抗所示蛋白的一次抗体对印迹进行检测。

[0234] 如所看到的, 粘液瘤病毒感染影响许多汇聚于 mTOR (雷帕霉素的生理靶) 的信号转导途径。在感染野生型病毒 (vMyxLac) 或 MT-5 缺陷 (vMyxT5K0) 病毒的情况下 (其中雷帕霉素对病毒复制具有有利作用), 在根据单独用雷帕霉素进行的处理无法预测的许多这些信号转导分子中观察到全体作用 (请参见模拟感染泳道)。这些作用包括 AKT-1、Raf-1、GSK-3 β 和 mTOR 本身的激酶活性的上升以及 PTEN 和 p70S6K 的激酶活性的下降。这些数据表明, 这些途径很可能在人类癌细胞系的粘液瘤病毒允许性中发挥作用。

[0235] 如本领域技术人员所能够理解的, 对本文描述的示例性实施方式进行诸多改进是可能的。更确切地说, 如权利要求所限定的, 本发明旨在将有所改进包括在其范围之内。

[0236] 尽管本文公开了本发明的各种实施方式, 但是本领域的技术人员根据公知常识也可以在本发明范围内进行多种修改和改进。这样的改进包括为获得相同的结果而用已知等同物以实质上相同的方式对本发明的任意方面所进行的替换。除非另有说明, 否则本文所用的所有技术术语和科学术语都具有本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的含义。

[0237] 本文引用的所用参考文献均以参考的方式完整地引入。

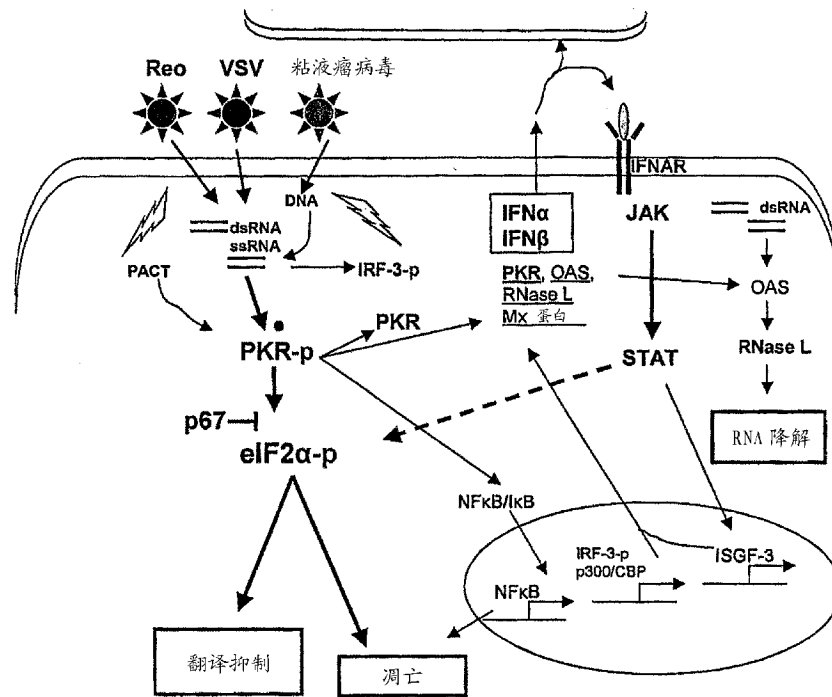


图 1

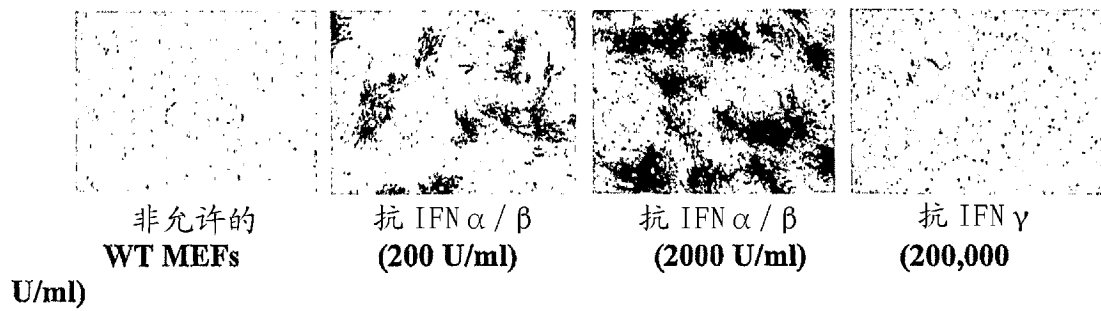


图 2

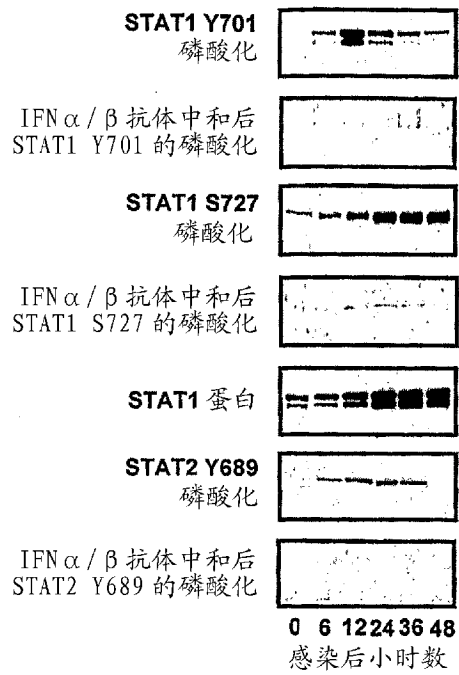


图 3

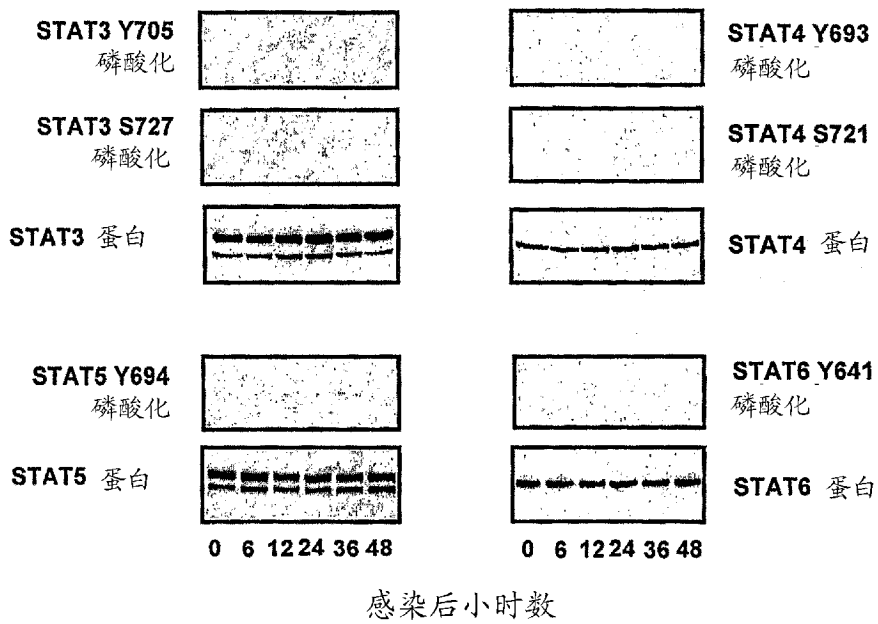


图 4

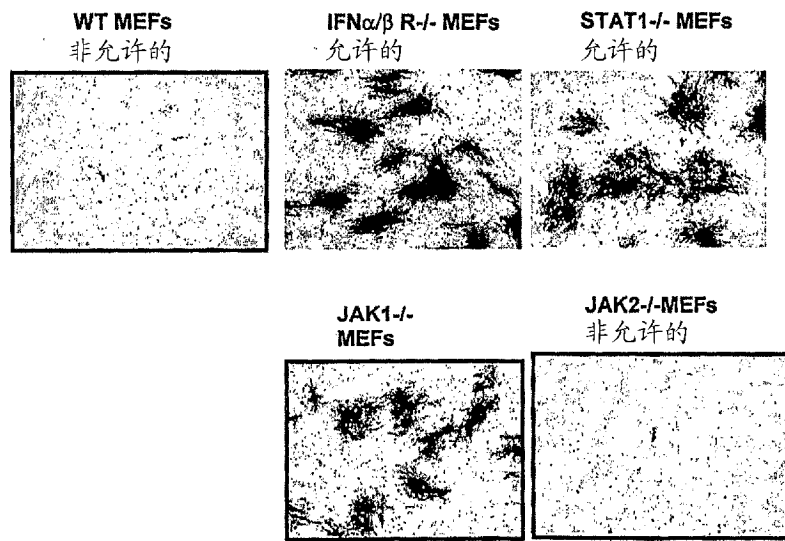


图 5

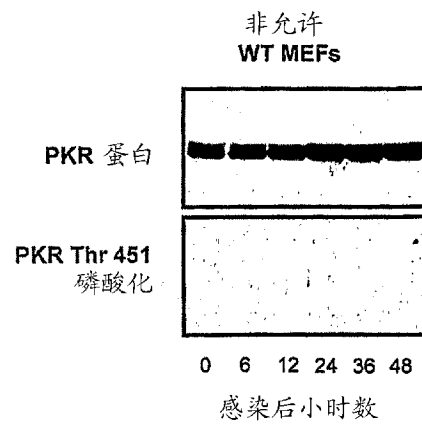


图 6

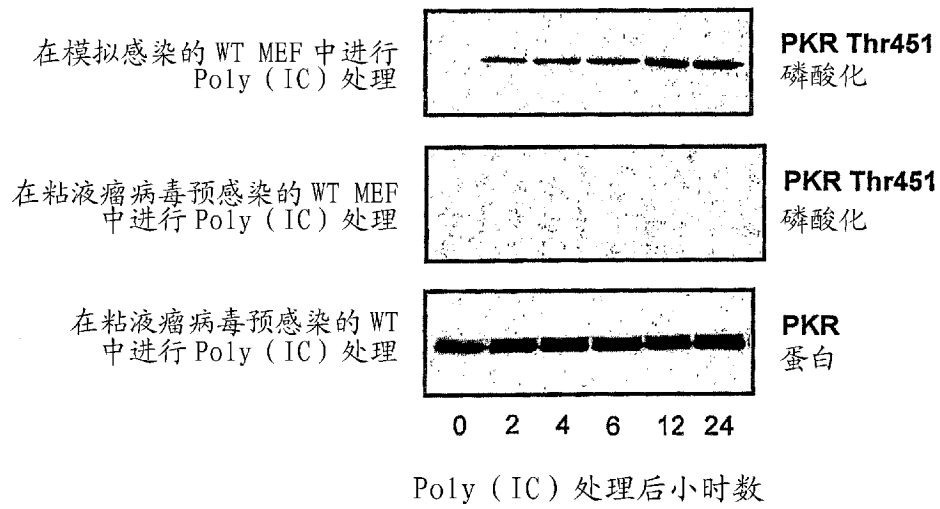


图 7

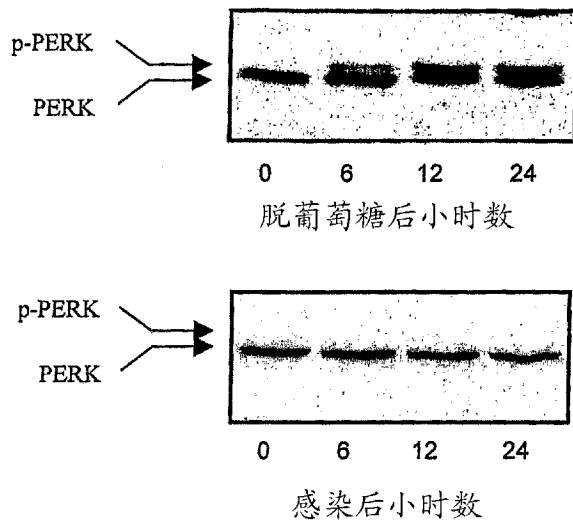


图 8

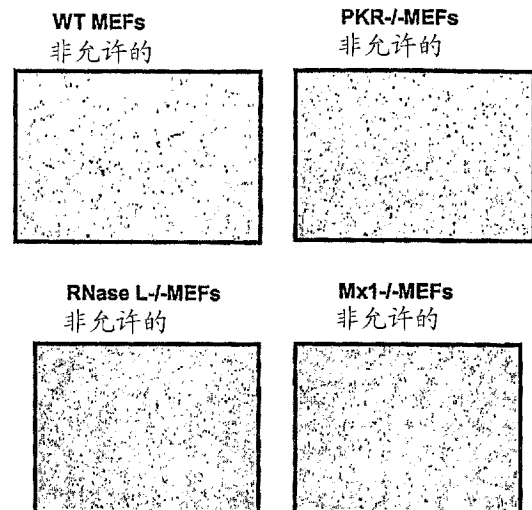


图 9

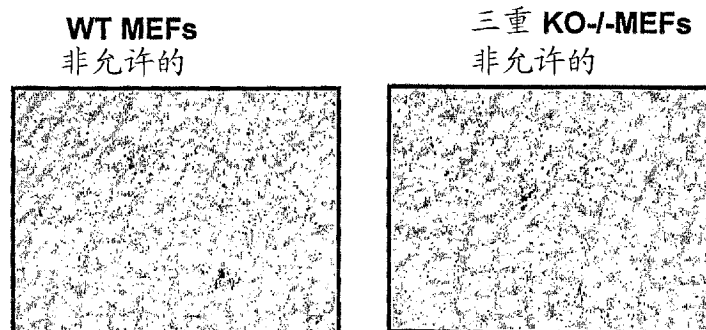
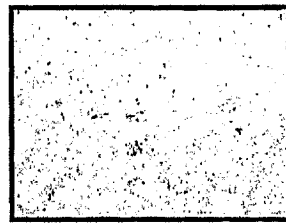


图 10



模拟中和

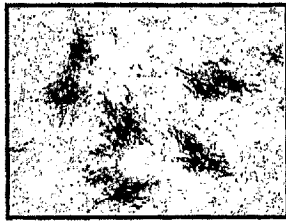
抗 IFN α / β
(2000 u/ml)

图 11

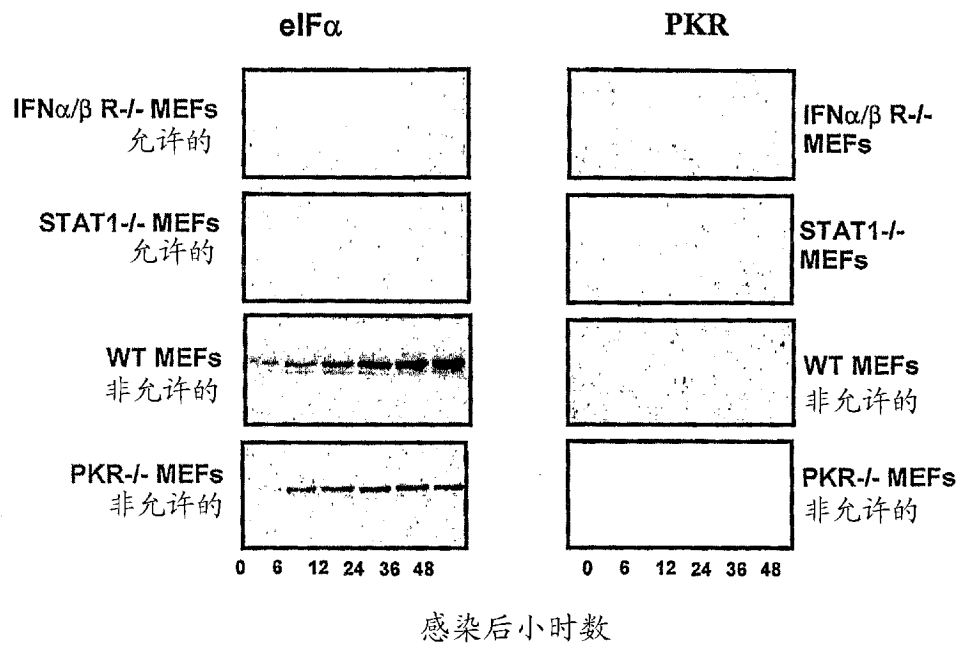


图 12

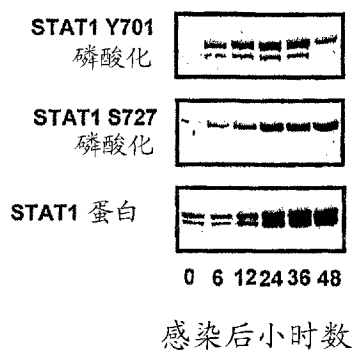


图 13

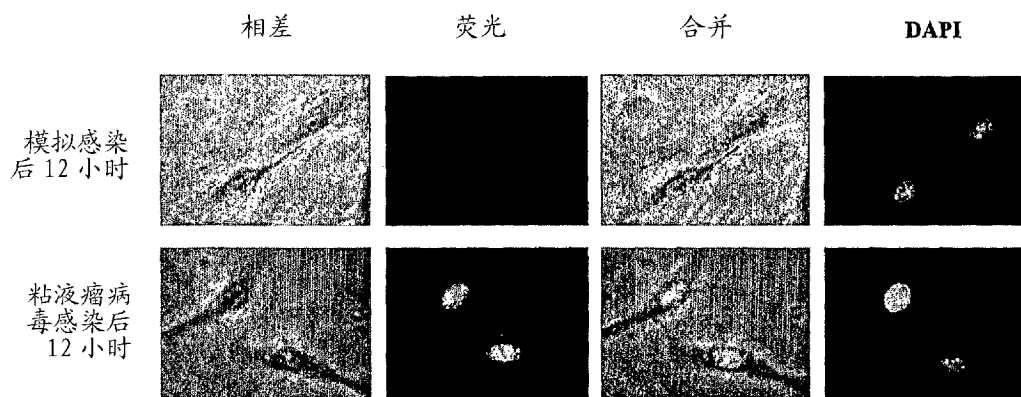


图 14

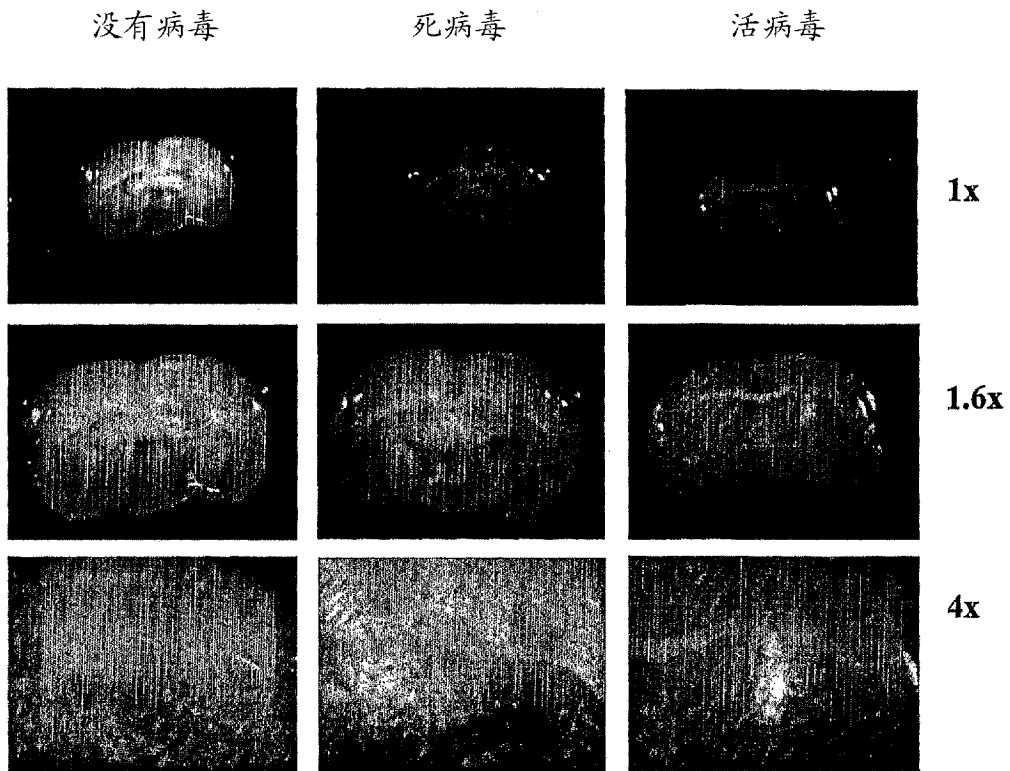


图 15

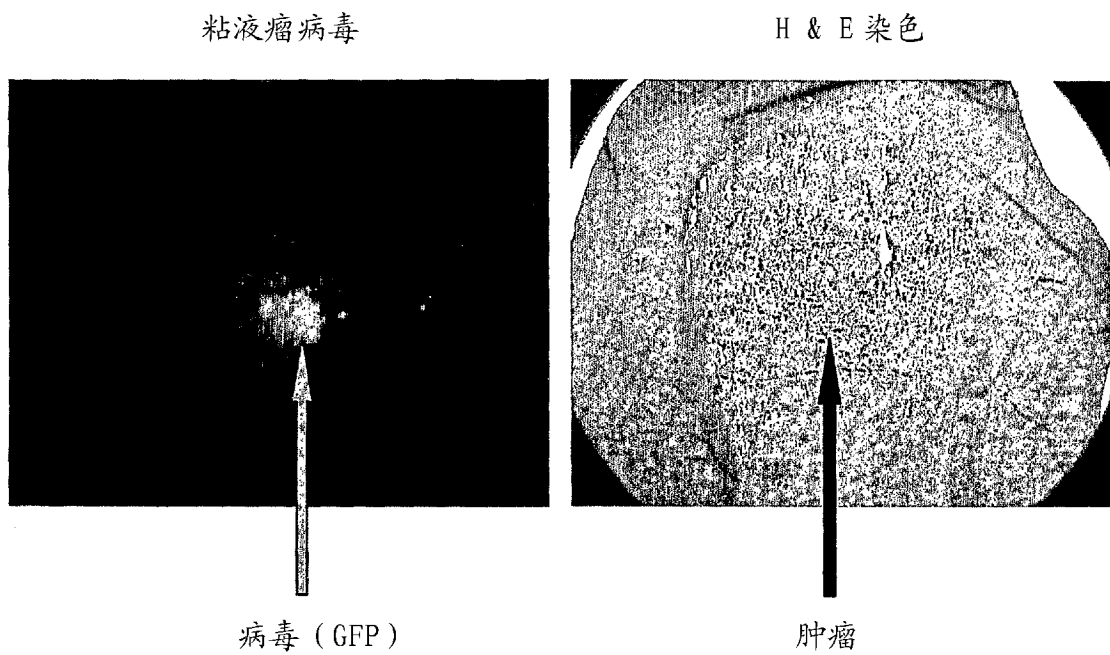


图 16

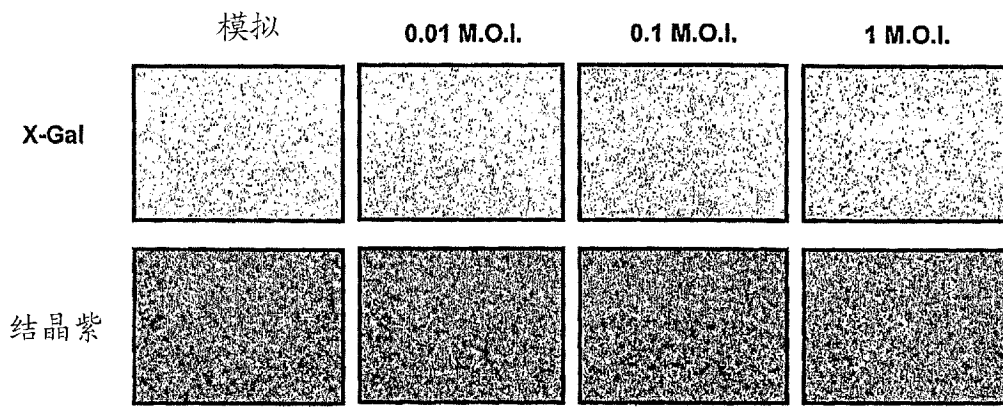


图 17

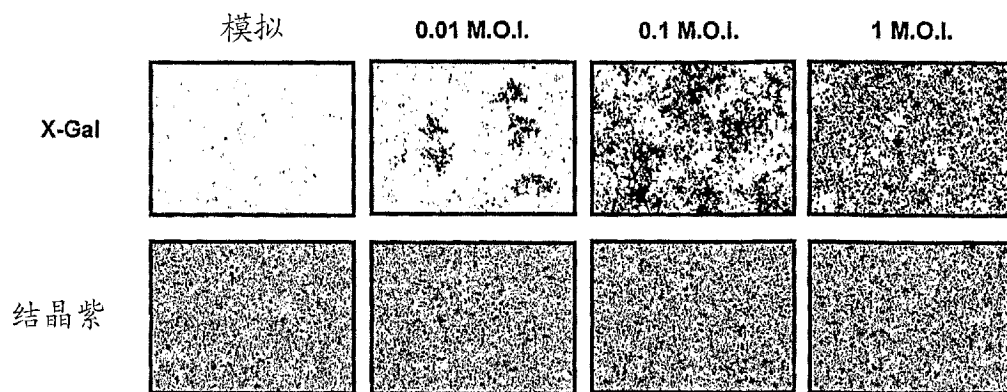


图 18

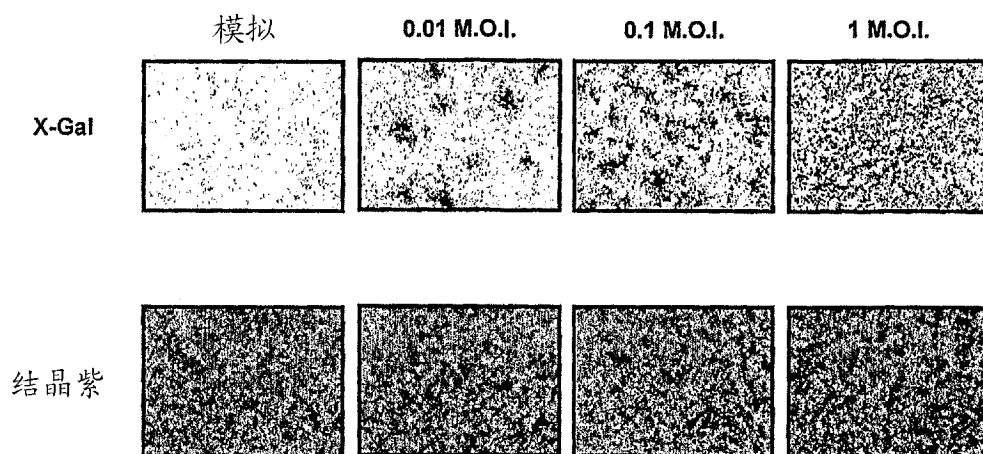


图 19

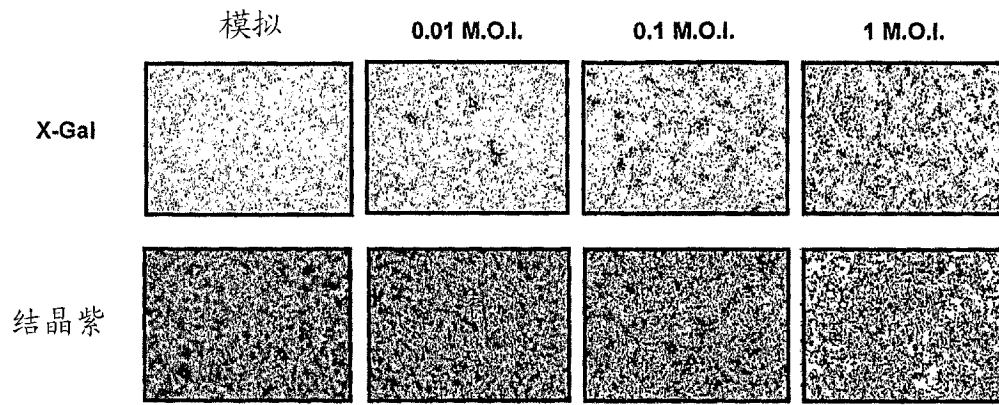


图 20

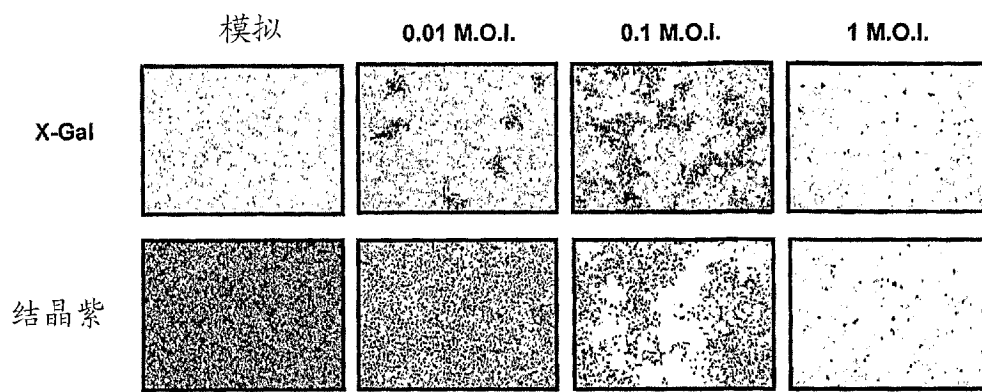


图 21

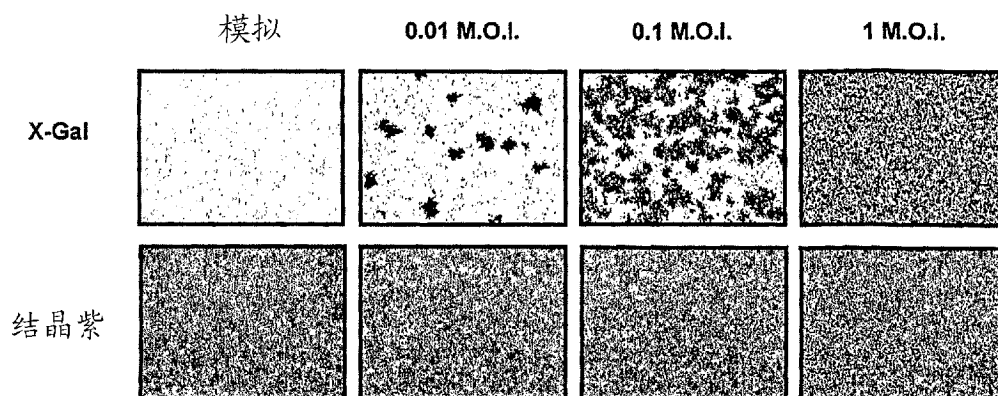


图 22

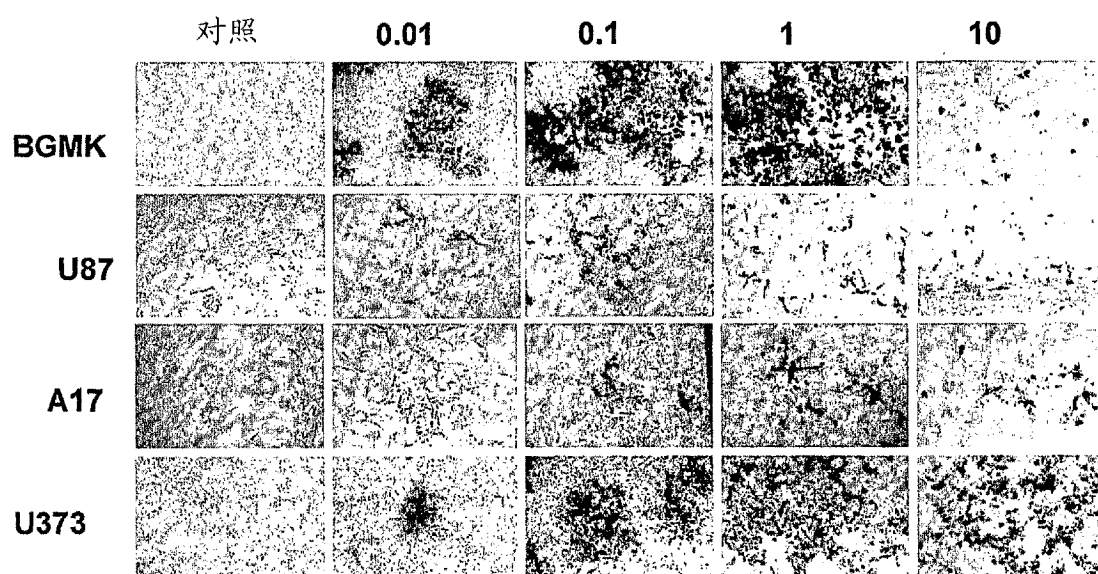


图 23

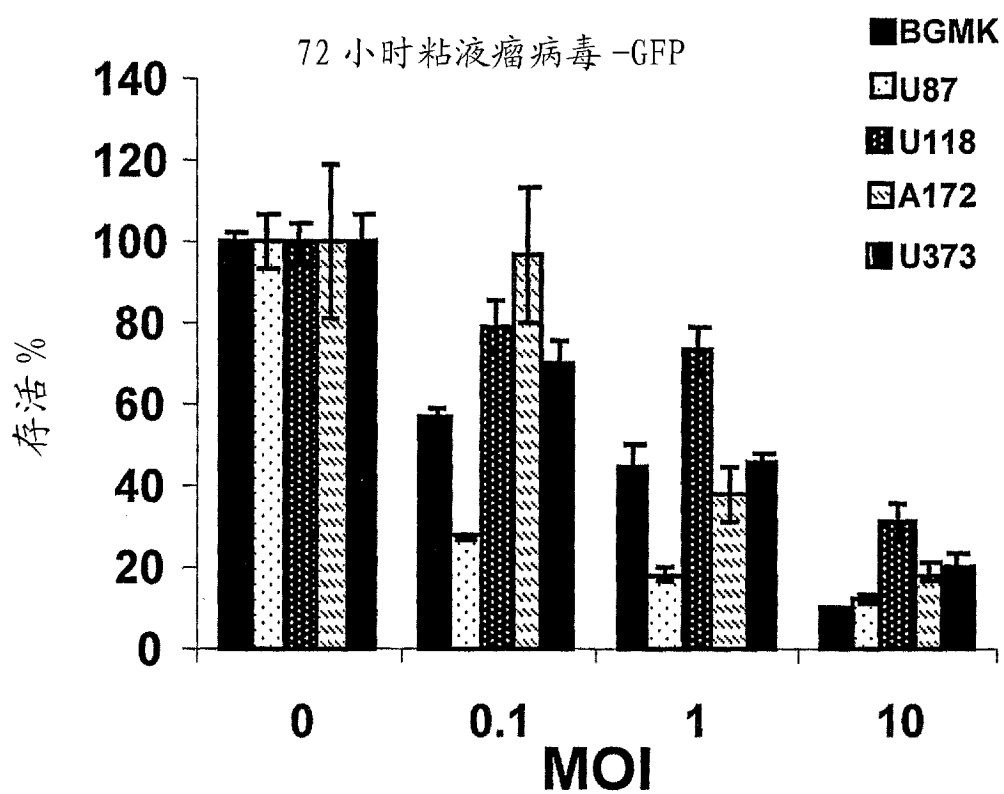


图 24

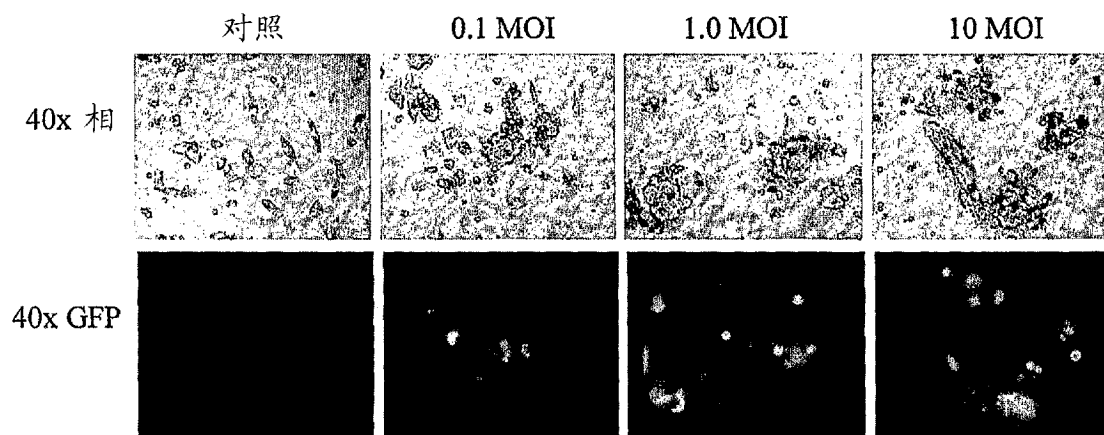


图 25

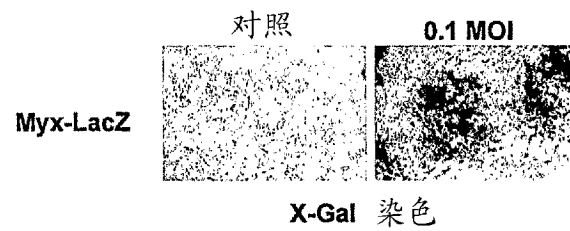


图 26

SF04-1585 48 小时粘液瘤病毒 GFP

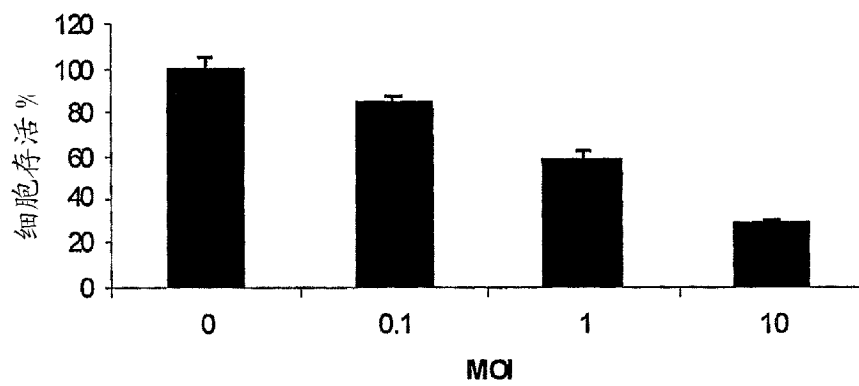


图 27

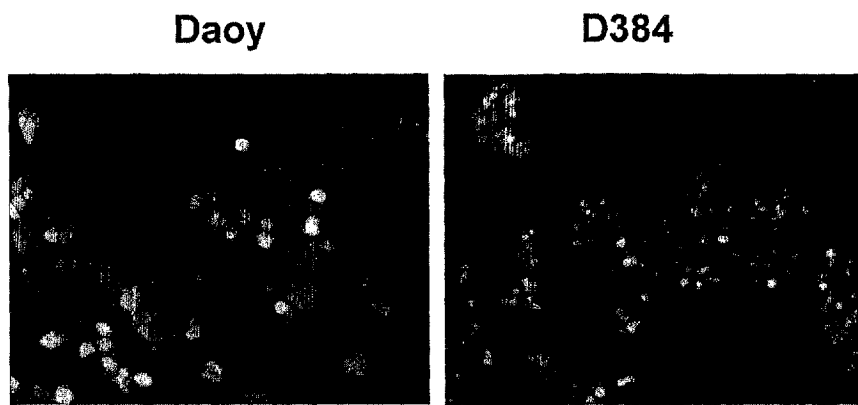


图 28

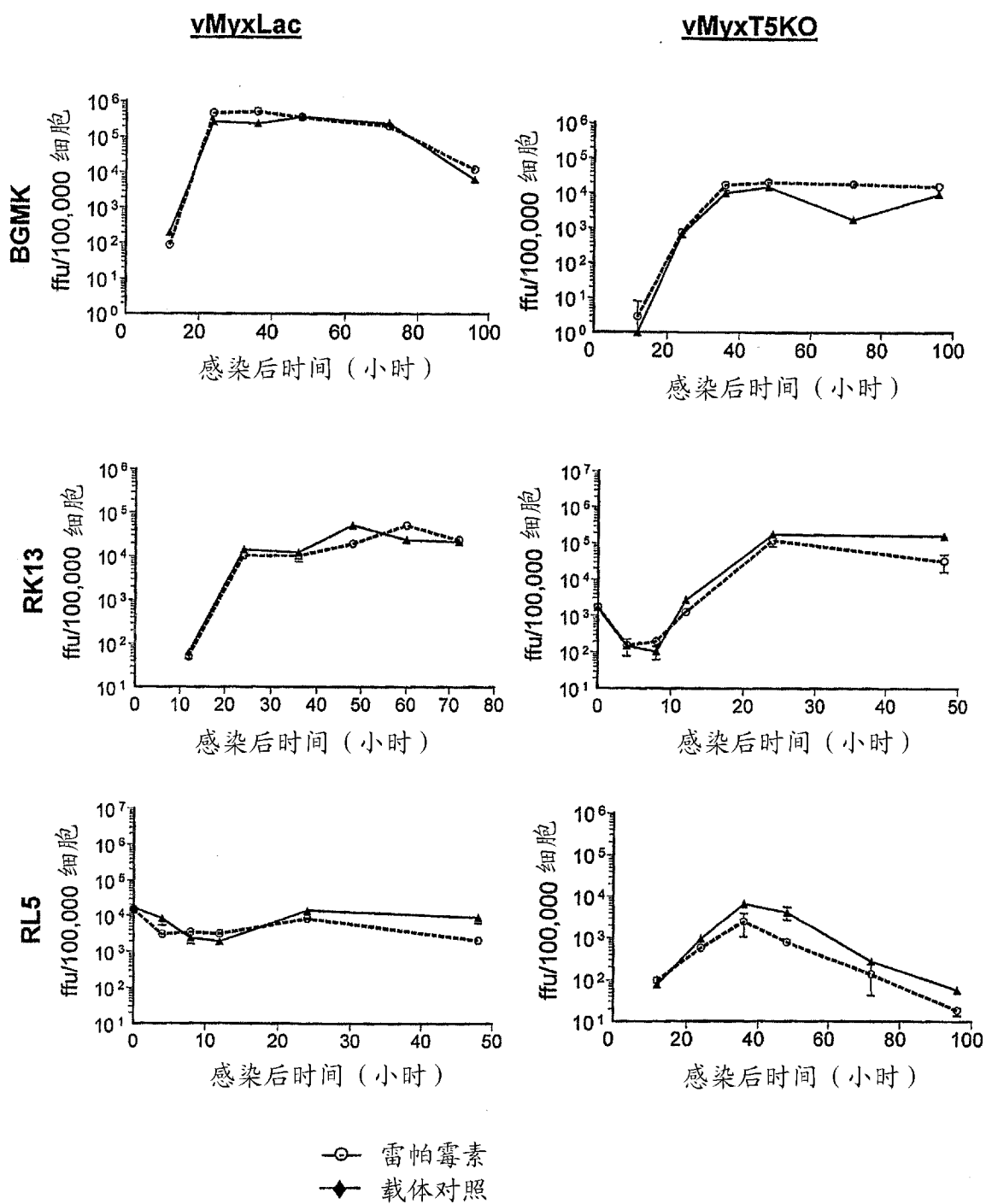


图 29

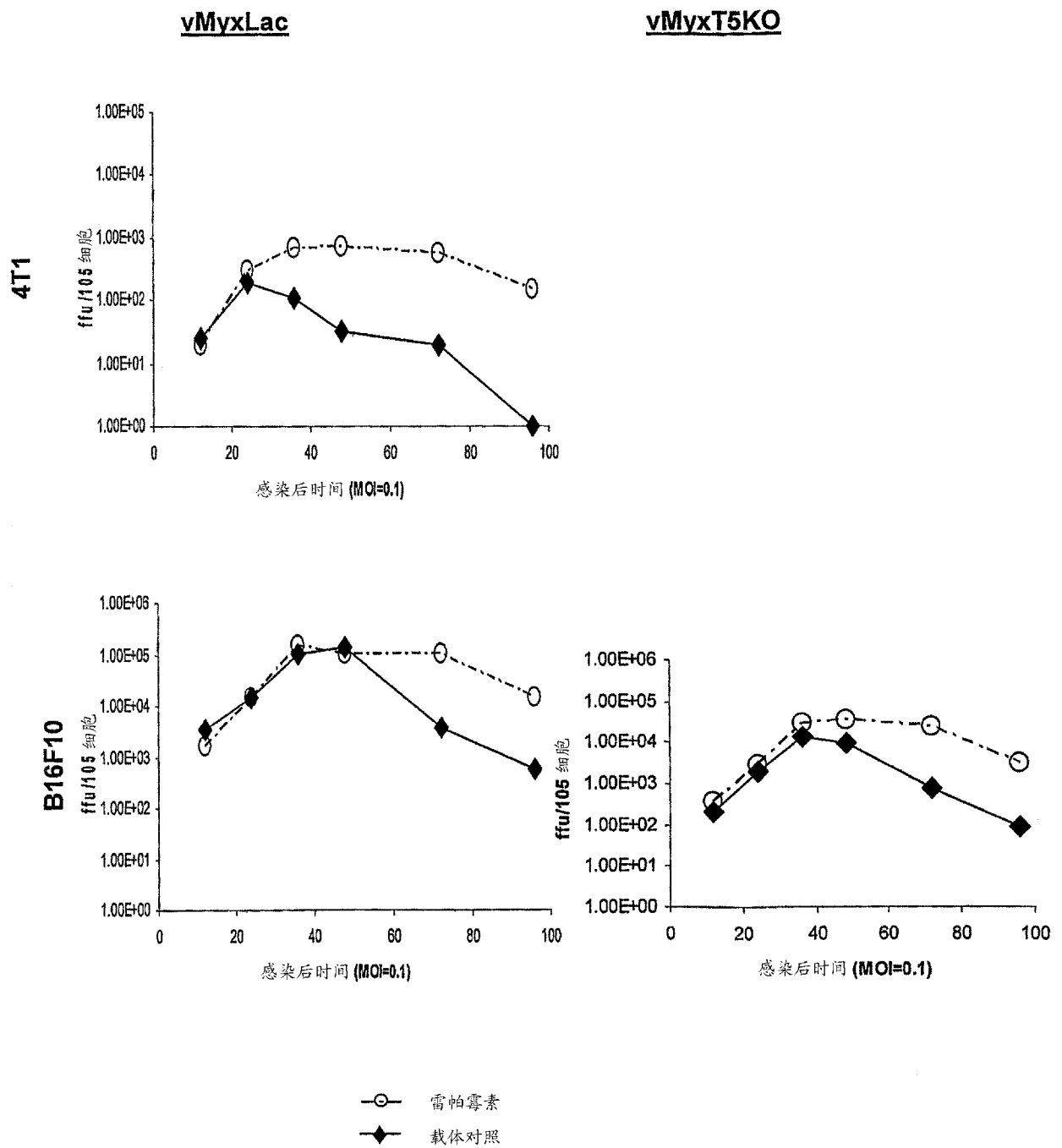


图 29(续)

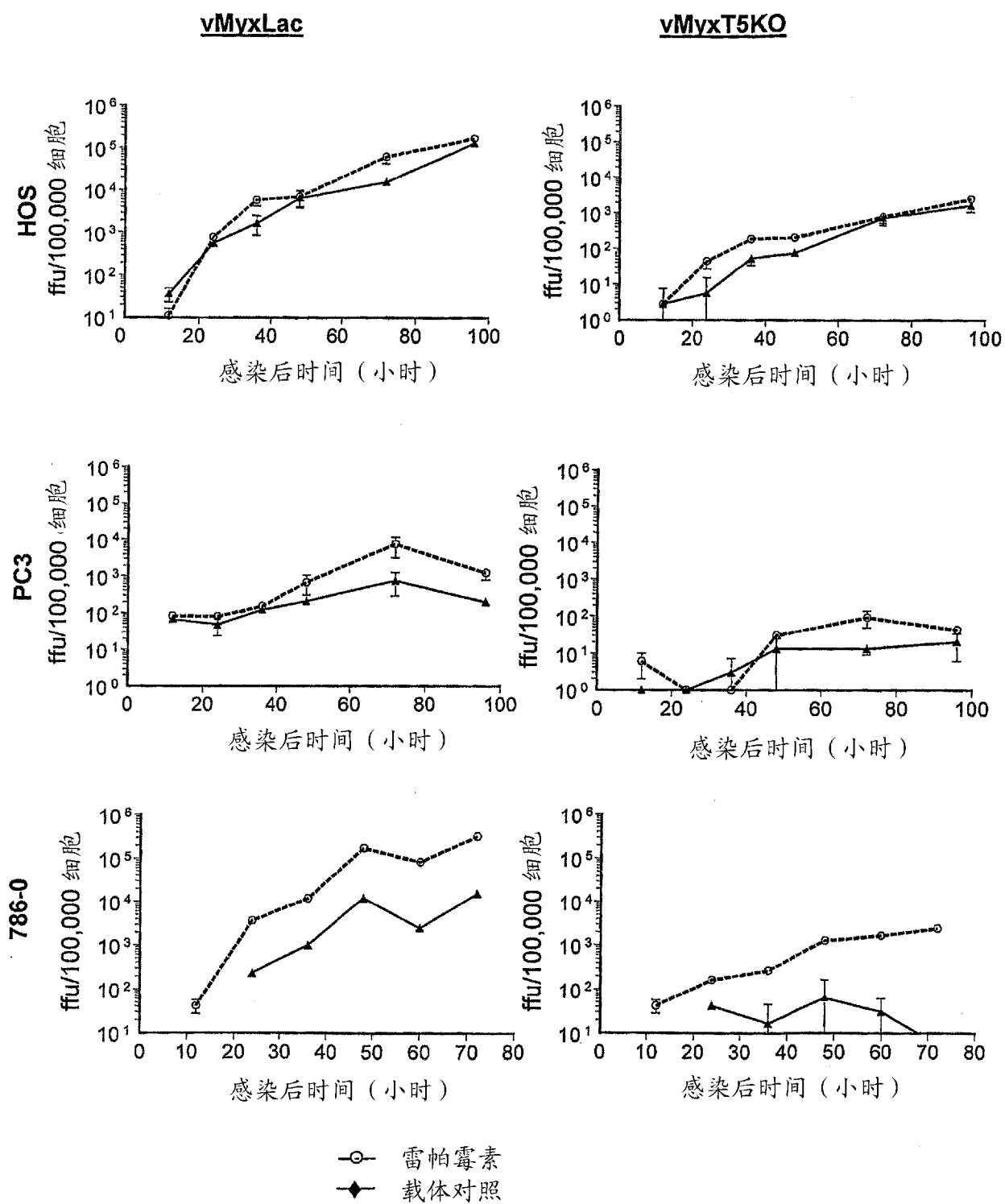


图 29(续)

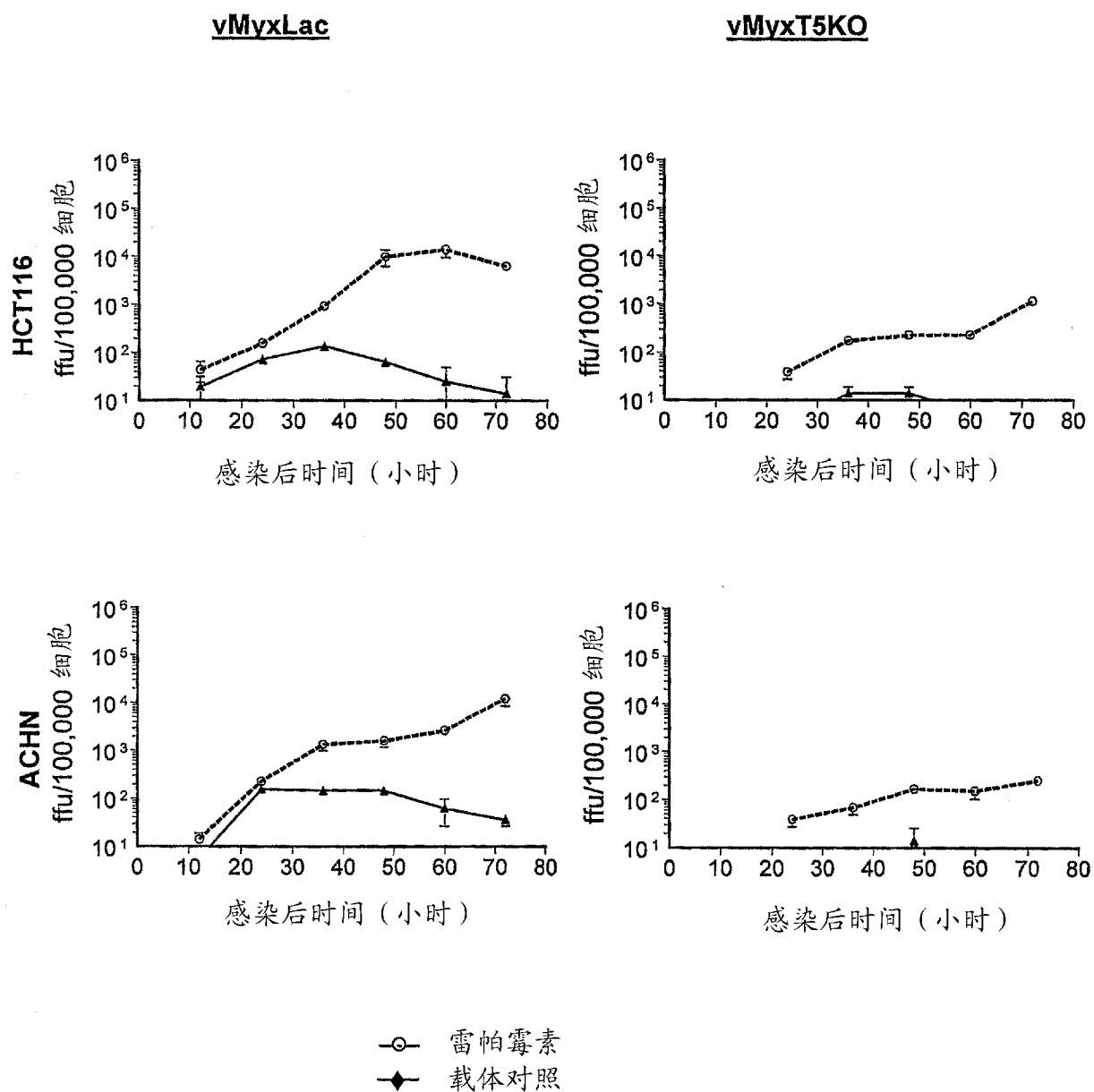


图 29(续)

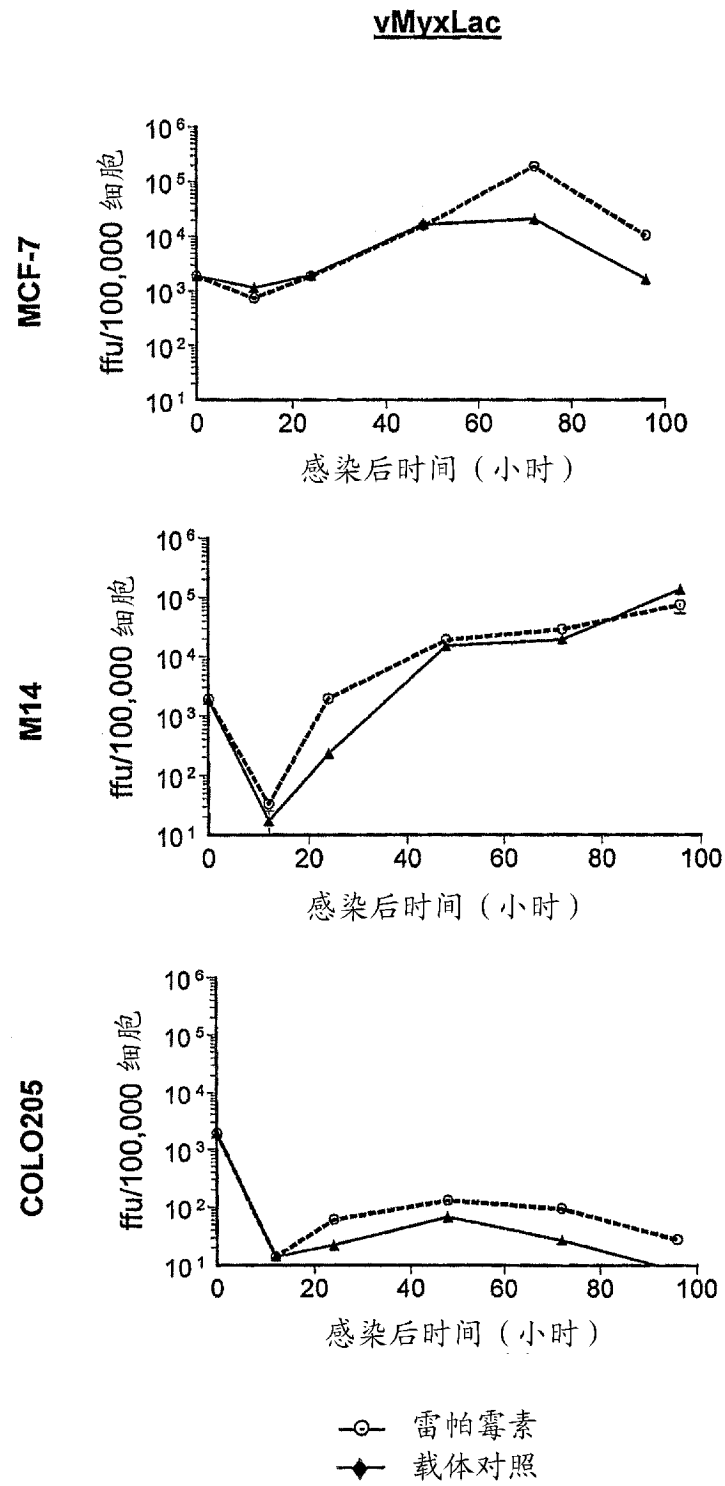


图 29(续)

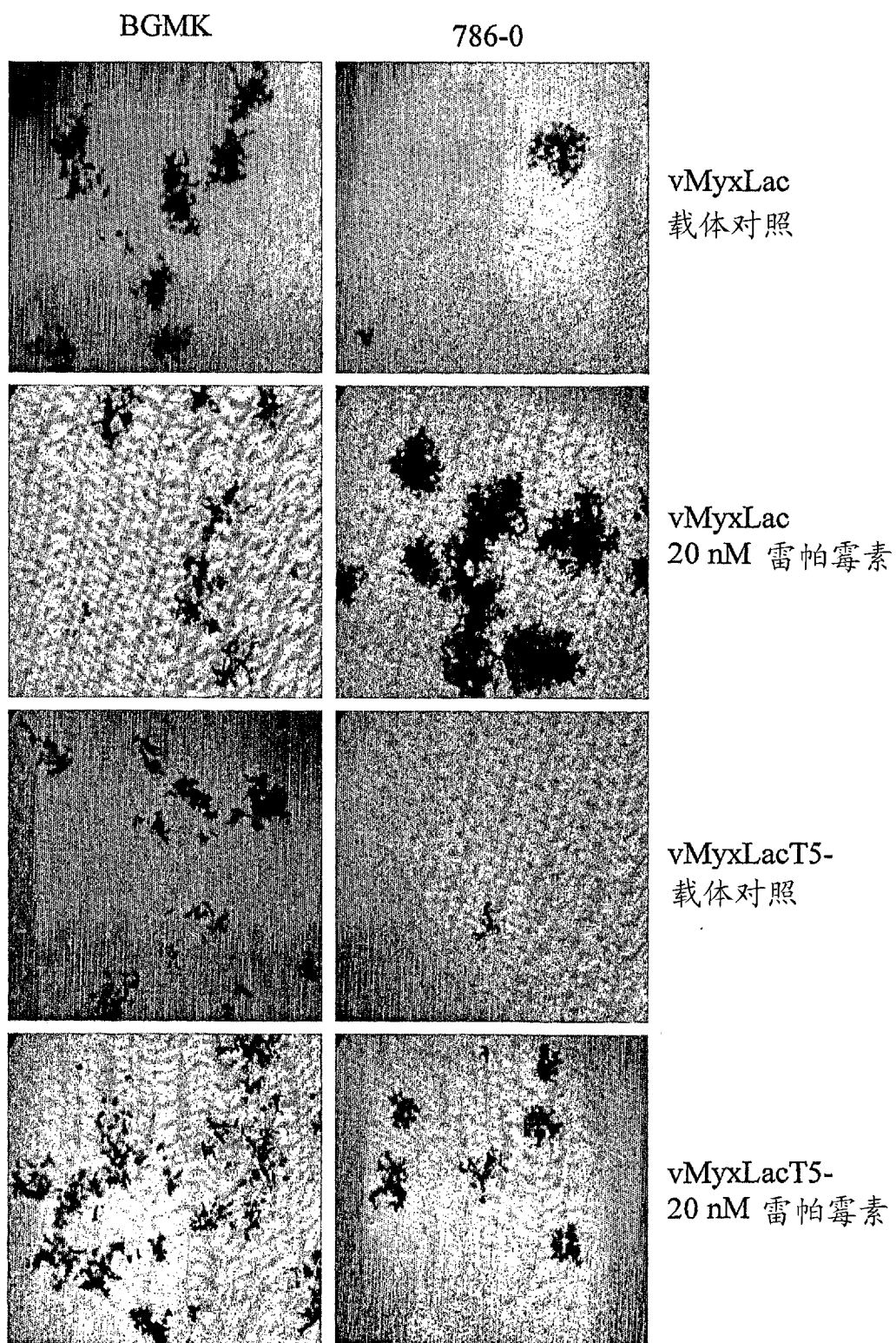


图 30

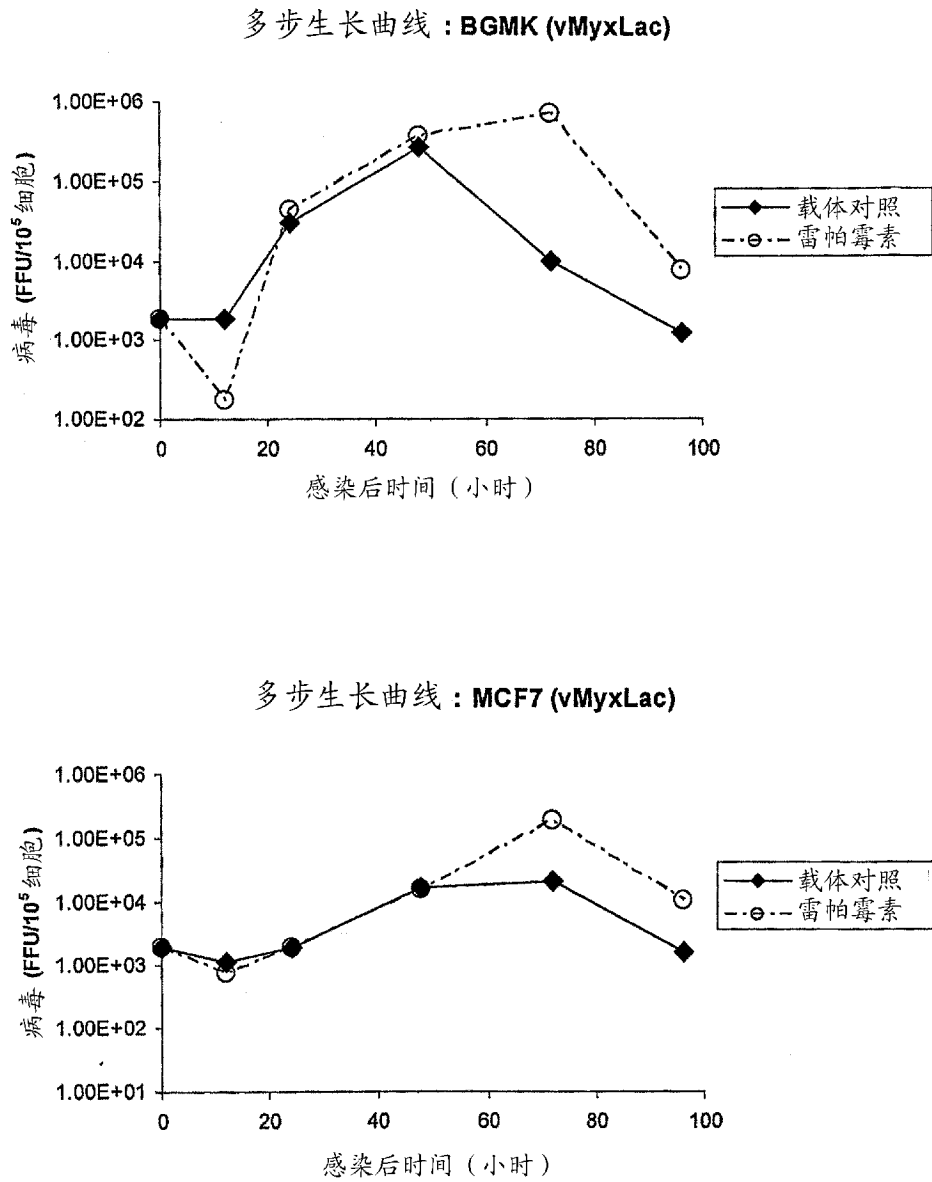
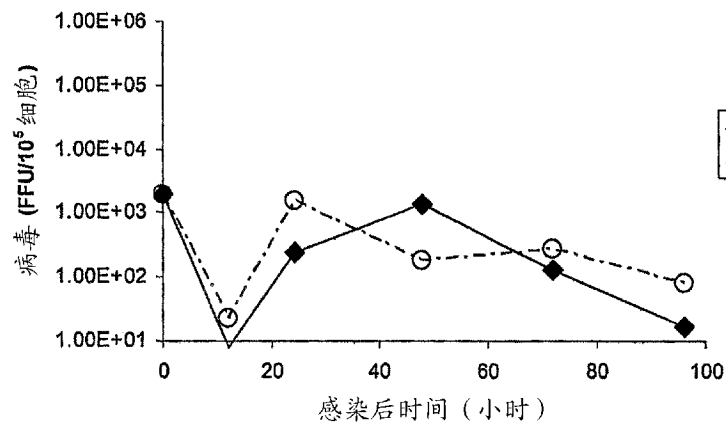


图 31

多步生长曲线 : A9 (vMyxLac)



多步生长曲线 : M14 (vMyxLac)

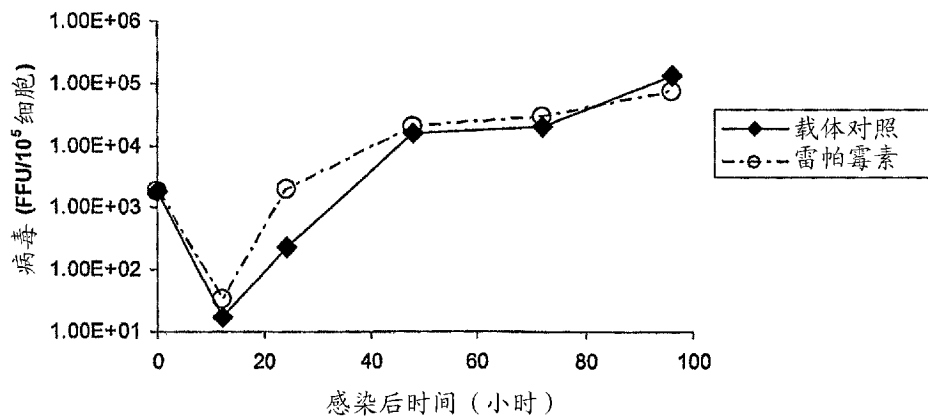
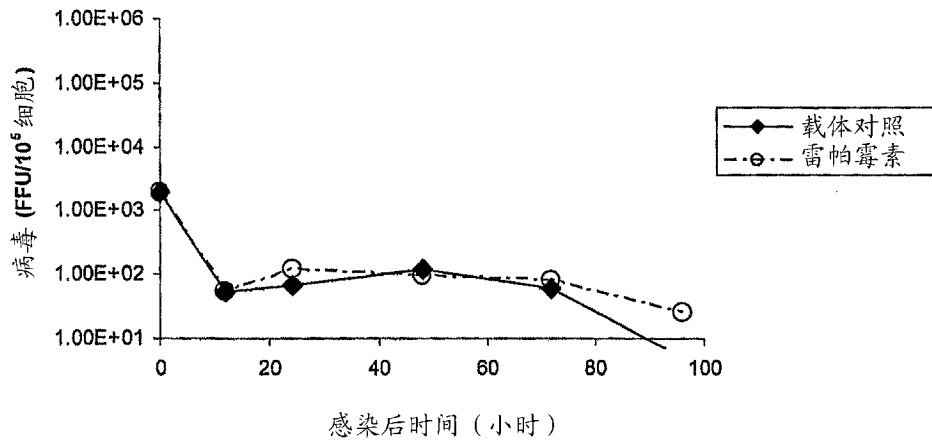


图 31 (续)

多步生长曲线: MDAMB435 (vMyxLac)



多步生长曲线: COLO205 (vMyxLac)

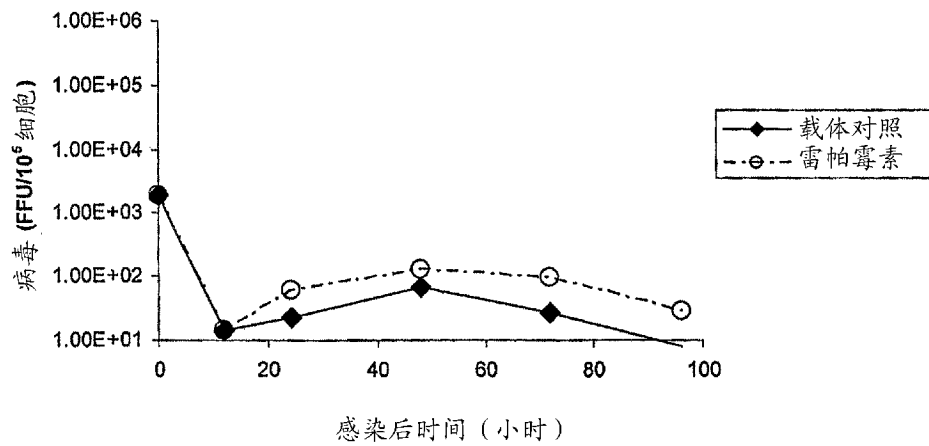


图 31(续)

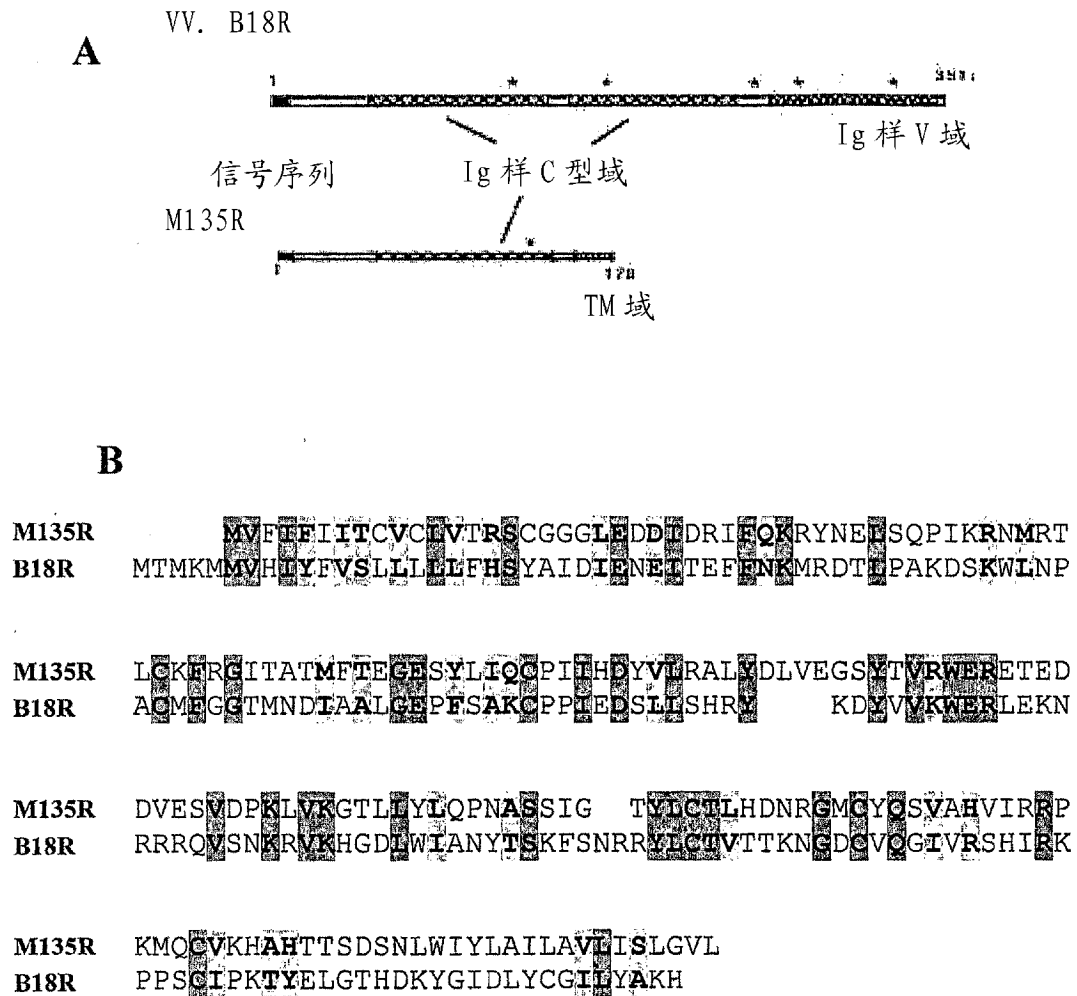


图 32

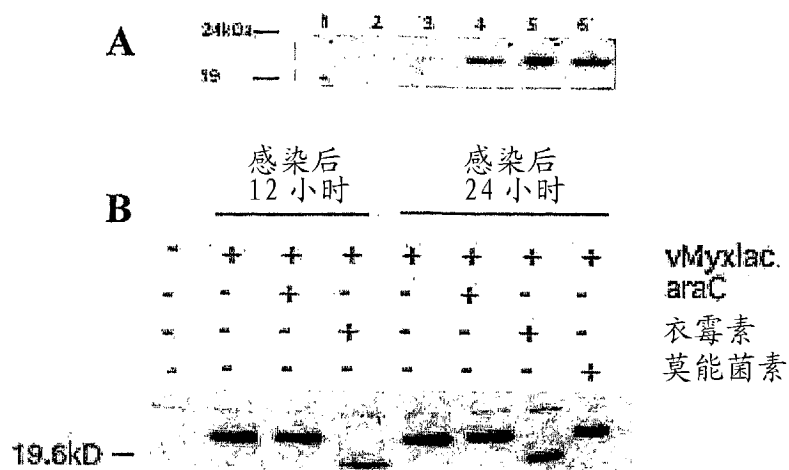


图 33

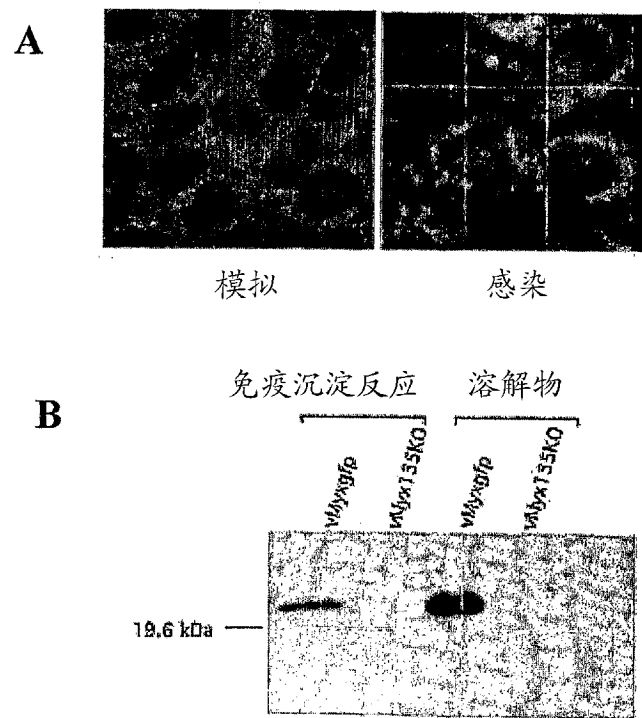


图 34

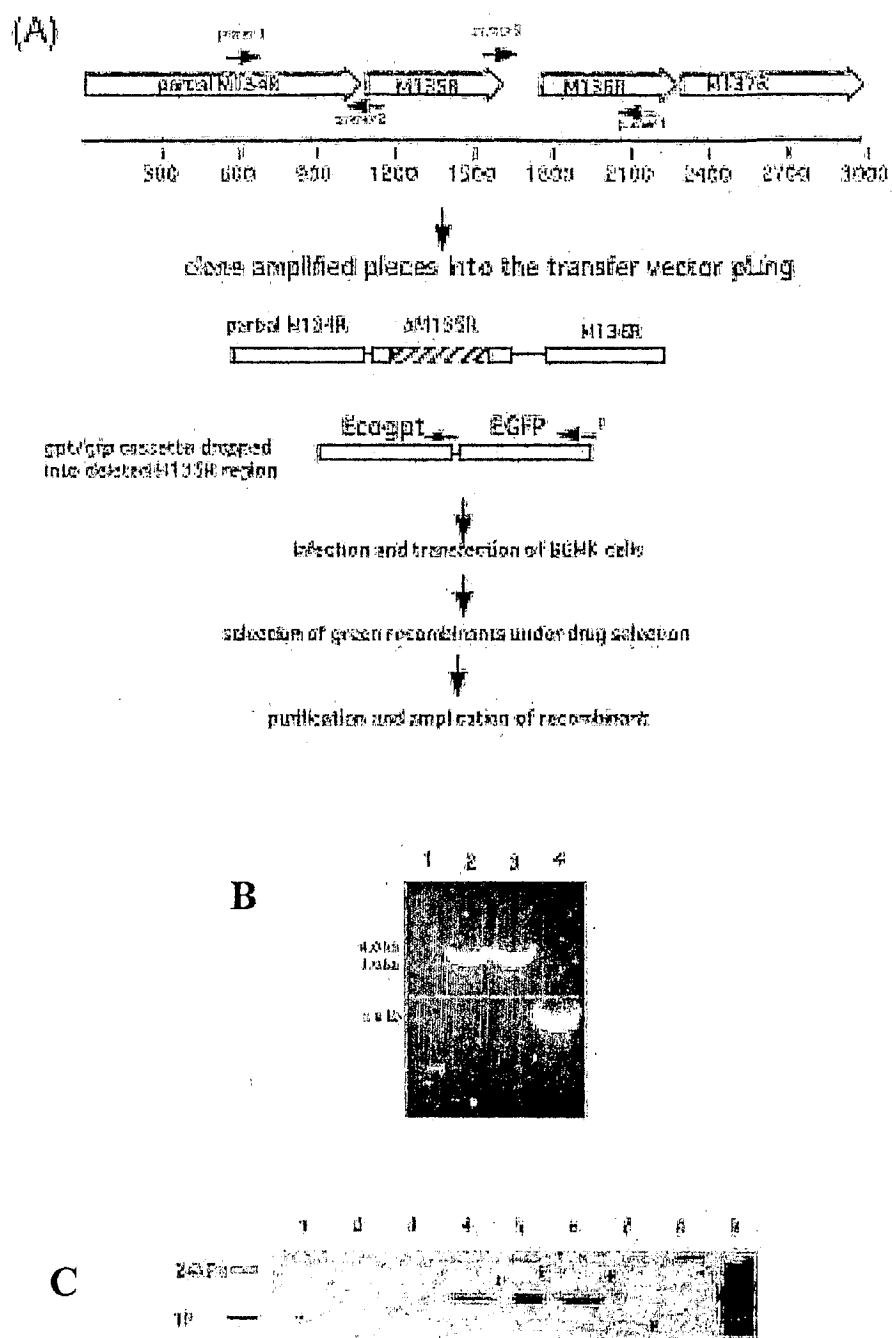


图 35

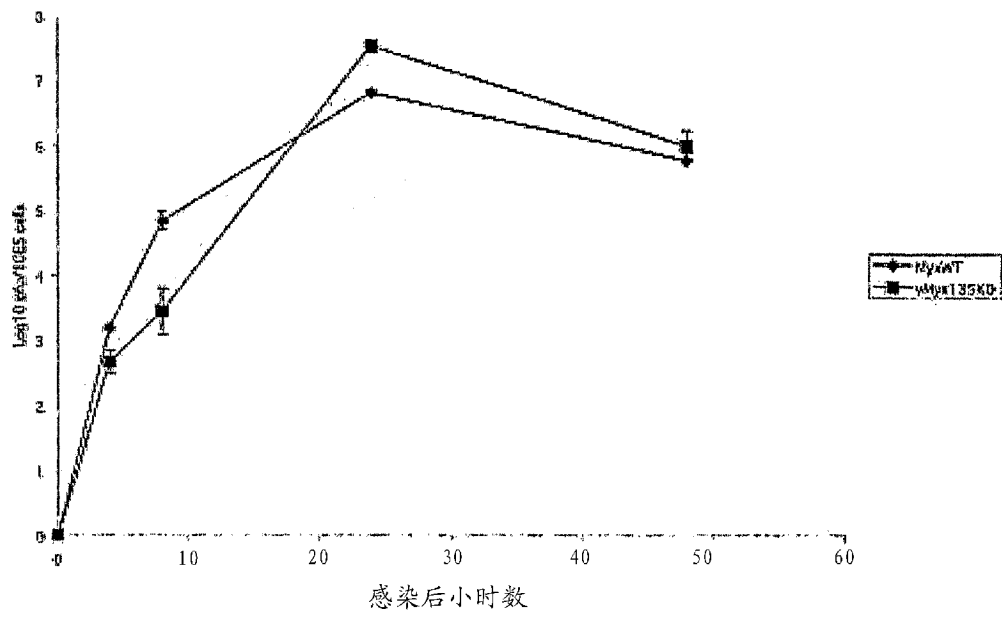


图 36

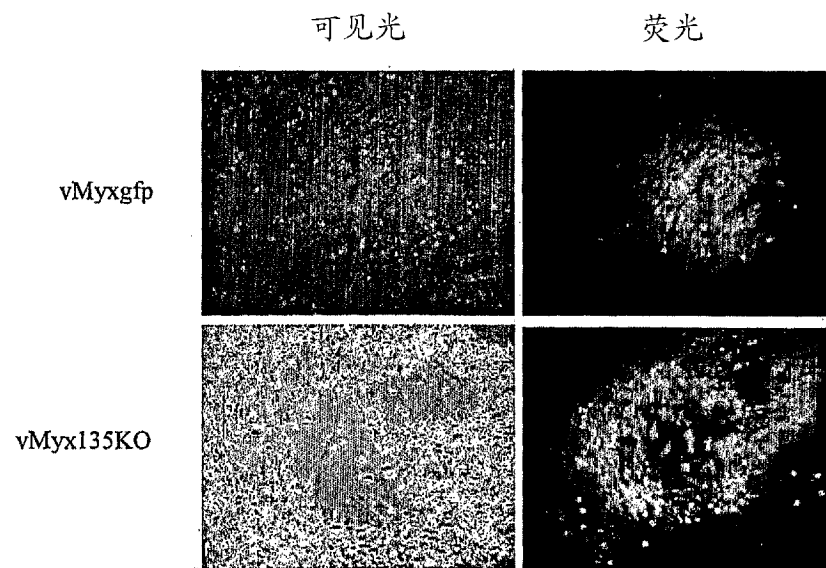


图 37

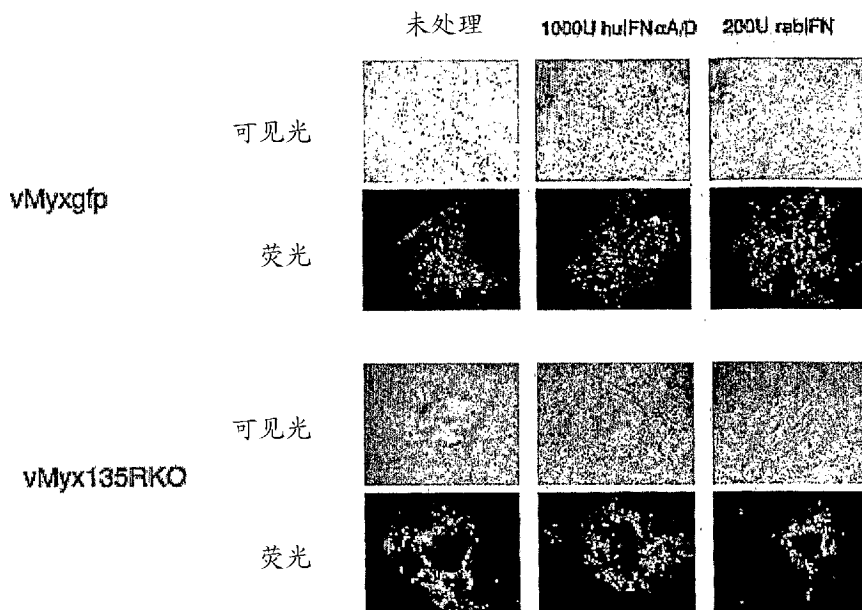


图 38

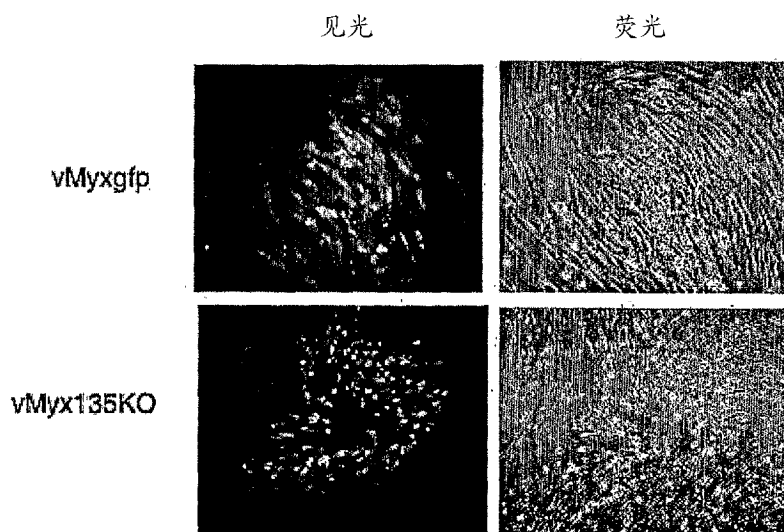


图 39

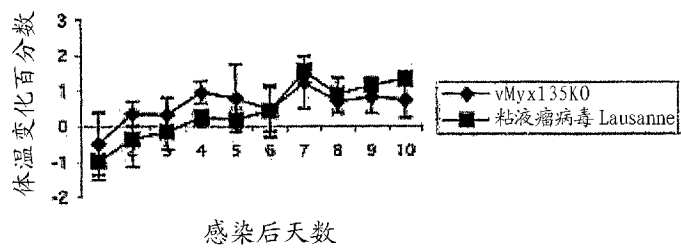


图 40

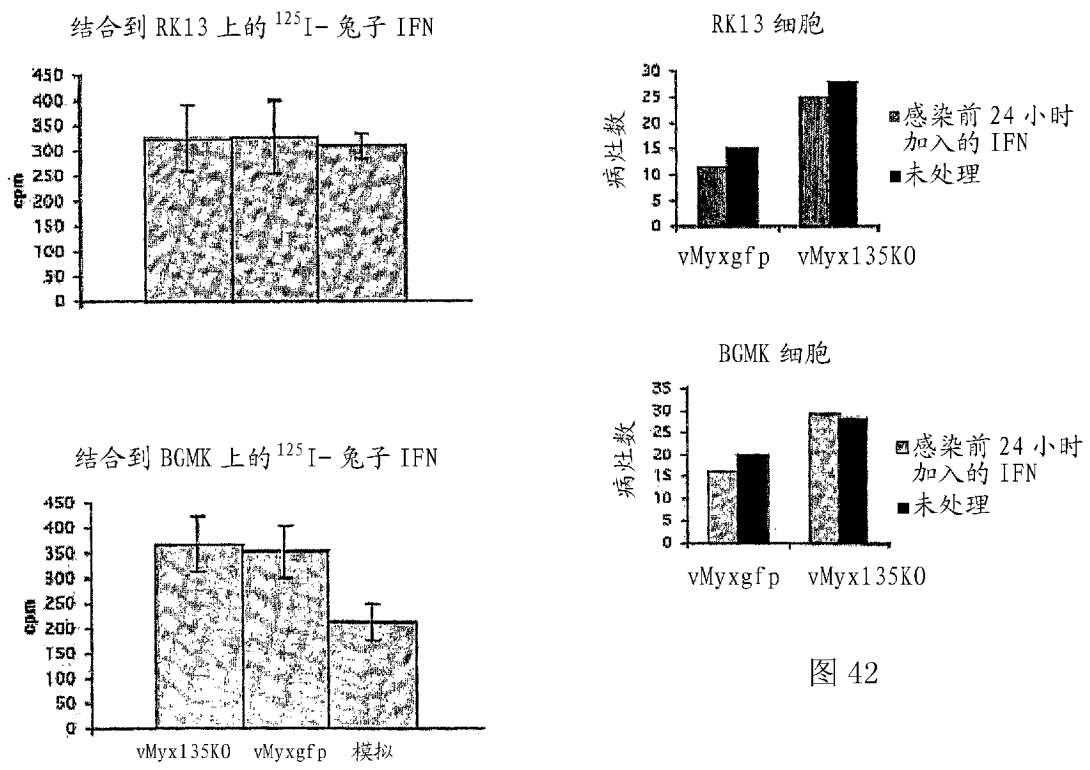


图 42

图 41

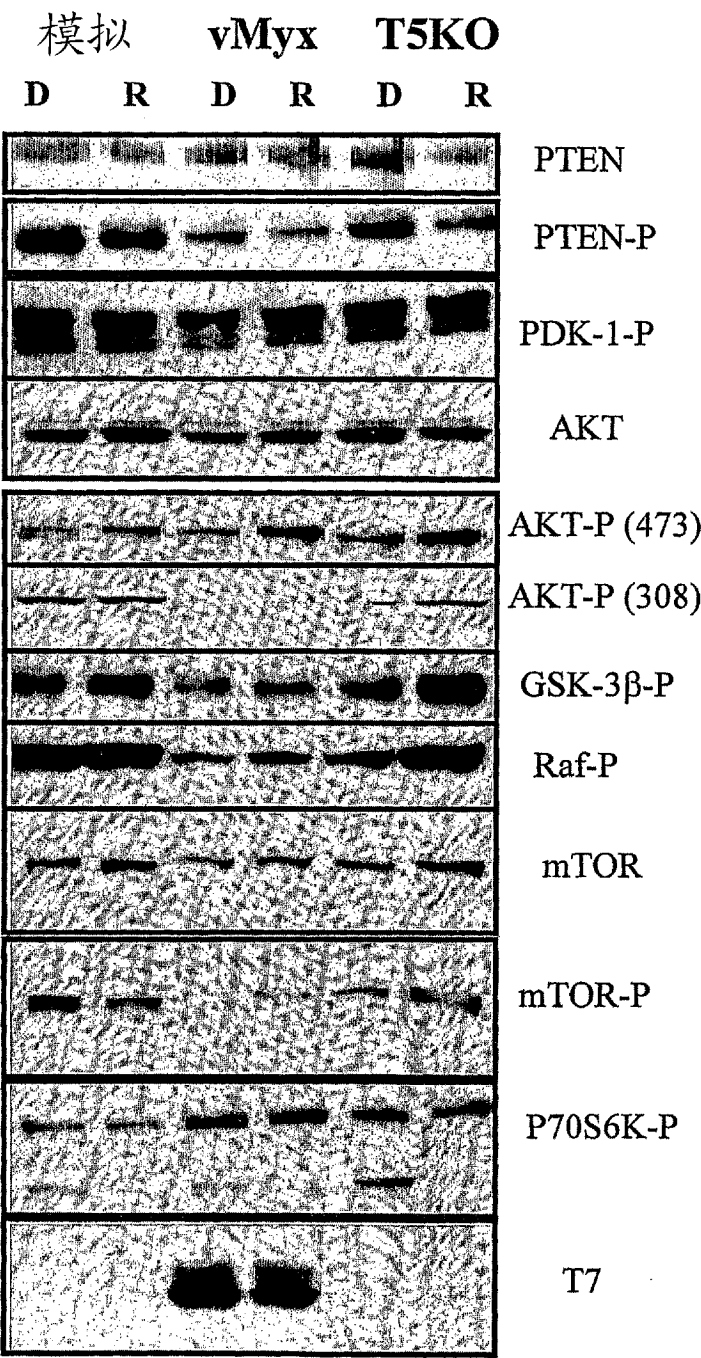


图 43