



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 111479582 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 10

(21) 申请号 201880077583.4

(22) 申请日 2018.12.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111479582 A

(43) 申请公布日 2020.07.31

(30) 优先权数据
102017128538.5 2017.12.01 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/083318 2018.12.03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/106205 EN 2019.06.06

(73) 专利权人 盖德·苏特
地址 德国慕尼黑
专利权人 胡安·约瑟·罗哈斯·埃普斯图

(72) 发明人 盖德·苏特

胡安·约瑟·罗哈斯·埃普斯图

(74) 专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限公司 44658
专利代理师 周婧 黄幸兒

(51) Int.Cl.
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/768 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C12N 15/863 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2003198623 A1, 2003.10.23
US 2004096864 A1, 2004.05.20
US 2015191704 A1, 2015.07.09
汪龚泽等. 钙网蛋白抗肿瘤免疫治疗的研究进展.《中国肿瘤生物治疗杂志》.2012,第19卷(第1期),93-97.

审查员 张蕾

权利要求书1页 说明书14页
序列表4页 附图15页

(54) 发明名称
免疫调节的复制高效的痘苗病毒株

(57) 摘要
本发明涉及用于医学中的新的免疫调节的复制高效的痘苗病毒株 (IOVA) 及其衍生物。

1. 一种免疫调节痘苗病毒,其中所述病毒通过SEQ ID NO:1的存在进行鉴定,具有功能性活跃的K1L,在哺乳动物细胞中具有复制能力,并且诱导钙网蛋白易位至感染的HeLa细胞的膜,

其中所述病毒的A56R和A26R功能性失活;

其中所述病毒的包含选自由以下组成的开放阅读框的组的一个或多个免疫逃逸基因功能性失活:B21R、C10L、C9L、C4L、M1L、A51R、A52R、A55R和B13R/B14R。

2. 根据权利要求1所述的免疫调节痘苗病毒,其中所述病毒另外包含选自由J2R、C11R和F4L组成的组的至少一个功能性失活、部分缺失或全部缺失的基因。

3. 根据权利要求1所述的免疫调节痘苗病毒,其中所述病毒具有复制能力并且在细胞周期活化细胞和/或肿瘤细胞中裂解。

4. 根据权利要求1所述的免疫调节痘苗病毒,其中所述病毒在感染后引起合胞体的形成。

5. 一种核酸序列,其编码根据权利要求1至4中任意一项所述的免疫调节痘苗病毒。

6. 一种免疫调节痘苗病毒的病毒载体,其包含根据权利要求5所述的核酸序列。

7. 根据权利要求1至4中任一项所述的免疫调节痘苗病毒、根据权利要求6所述的免疫调节痘苗病毒的载体,其特征在于携带一个或多个插入位点,其中至少一个插入一个或多个转基因。

8. 根据权利要求7所述的免疫调节痘苗病毒或载体,其中所述转基因是编码疾病相关抗原的基因。

9. 根据权利要求7所述的免疫调节痘苗病毒或载体,其中所述转基因选自包含以下的组:编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原、和病原体衍生抗原的基因。

10. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至4中任一项所述的免疫调节痘苗病毒、根据权利要求6所述的载体或根据权利要求8至9中任一项所述的免疫调节痘苗病毒以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

免疫调节的复制高效的痘苗病毒株

发明领域

[0001] 本发明涉及用于医学中的新的免疫调节的复制高效的痘苗病毒株 (IOVA) 及其衍生物。

[0002] 发明背景

[0003] 最近,病毒在人类癌症的治疗中作为溶瘤病毒首次获得市场认可。这样的成功将科学兴趣重新集中于一般的病毒,并且也集中于痘苗病毒用于癌症治疗的用途。痘苗病毒的使用已证明不仅在疫苗接种方法(例如防止人类痘病毒感染)中是有效的,而且还已应用到许多其他医学治疗和临床试验中,例如肿瘤疫苗接种中。

[0004] 科学界从在溶瘤病毒的第一批临床研究中获得的数据得知,这些病毒或设计的病毒载体能够在癌细胞中选择性复制,并且积极促进此类感染的癌细胞的裂解。然而,此类感染的癌细胞的直接裂解很少足以根除大块的肿瘤,并且很少治愈转移性疾病。这些结果表明,不仅对更强效和选择性的病毒,而且对避免疾病复发的替代肿瘤破坏机制的需求日益增长。

[0005] 最近,基于痘苗病毒的病毒和病毒载体被作为溶瘤剂进行了测试,并且由于其通过与直接裂解肿瘤细胞不同的机制破坏肿瘤的能力而被认为是最有前景的(Kirn等人,2009)。一方面,已证明病毒在肿瘤相关内皮细胞中的复制导致肿瘤血流的破坏、缺氧和大量肿瘤坏死(Breitbach等人,2013);另一方面,由于裂解后释放了肿瘤相关抗原(TAA)并且克服了肿瘤内存在的局部免疫抑制作用,因此痘苗病毒在肿瘤内的复制能够诱导抗肿瘤免疫应答(Thorne等人,2010)。

[0006] 这些替代机制被证明是临床评估中的关键,并且突显了免疫系统在确定溶瘤载体的活性方面的关键作用。在随机临床试验中,最有效的病毒被证明是表达免疫活化的细胞因子以优化细胞免疫应答的活化的病毒(Breitbach等人,2011;Heo等人,2013)。但是,即使使用这些更强效的表达细胞因子的病毒,一些患者也不会引发针对肿瘤的有效免疫应答。有效的抗肿瘤免疫应答的产生需要甚至更多且不同的免疫细胞谱系的活化和协同作用,并且单个细胞因子的表达几乎不能改变病毒引发的整体免疫。因此,仍然需要对具有更高的活化稳健的免疫应答能力的新型株的产生进行研究。

[0007] 因此,本发明的目的是提供用于治疗人类疾病的新适应的和/或更强效的病毒和/或病毒载体,其中所述病毒或载体在感染后在需要这种治疗的患者体内引发和/或活化另外的且更强大的但(出于安全性原因)高度特异性的免疫应答。

[0008] 此目标已经通过如本申请的权利要求1中所述的最新鉴定的免疫调节的复制高效的痘苗病毒株得到解决。另外的实施方案涉及这种最新鉴定和/或适应的免疫调节痘苗病毒以及载体的变型,在所附权利要求中描述了包含最新鉴定和/或适应的痘苗病毒株的优选用途和组合物。

[0009] 在研究对已知痘苗病毒株的免疫应答时,并且特别是与特征明确的痘苗病毒株(Western Reserve (WR))进行比较时,发明人能够分离、产生并表征新的痘苗病毒株。这种新型株显示出明显改善的免疫学特征。不受理论的束缚,我们认为所述新型株在感染肿瘤

细胞后还显示出对增加的免疫原性细胞死亡的强烈促进,并因此将免疫反应重定向至感染的和尚未感染的肿瘤细胞。

[0010] 痘苗病毒WR株是明确定义的病毒株,所述病毒株由于其在肿瘤细胞中的高复制能力已被测试为溶瘤的,并且被用于递送GM-CSF以增加针对肿瘤的免疫应答。为了提供具有肿瘤选择性的载体,成功缺失了涉及活化感染细胞的代谢的不同痘苗病毒基因,从而限制了所得病毒载体向具有高复制指数的细胞的复制。在临床试验中测试的候选病毒中已经包括了诸如胸苷激酶或病毒生长因子等基因的缺失(Zeh等人,2015)。

[0011] W02015027163是一个实例,其中描述了溶瘤痘苗病毒,所述溶瘤痘苗病毒在一些典型的病毒免疫逃逸基因中包含基因组缺失。在这种特定情况下,溶瘤病毒在例如B8R、B18R和A35R基因中包含缺失。

[0012] EP2136633是另一个实例,其描述了溶瘤治疗方法中表达GM-CSF的痘苗病毒的治疗用途。

[0013] 在这些肿瘤学方法中,痘苗病毒WR株被认为是目前用于开发和比较最新开发的溶瘤痘苗病毒的黄金标准。

[0014] 但是,除了这种所谓的成功之外,仍然存在一些担忧,考虑将痘苗病毒WR作为重症癌症患者治疗方法的基础。由于痘苗病毒WR是在小鼠脑中多次传代后在体内选择的,这实际上导致了病毒在小鼠细胞中具有高复制能力,由于亲神经性和神经毒性还导致了惊人的毒力,这可能会阻碍其在癌症患者治疗中的安全使用。

[0015] 然而,在本申请的上下文中,选择痘苗病毒WR作为与本发明的最新开发的痘苗病毒株的比较,其中本发明的主要目的是提供一种新型的免疫调节的具有复制能力的痘苗病毒株,其具有显著改善的免疫学特征以及高裂解和/或溶瘤能力。

[0016] 与痘苗病毒的高度减毒的MVA(修饰的痘苗安卡拉(Modified Vaccinia Ankara))株的另外的比较似乎是无用的,因为MVA的特征在于其宿主范围限制,或者换言之,其在哺乳动物宿主细胞中的复制缺陷。MVA已经广泛用于递送抗原以针对病原体进行疫苗接种(综述参见Volz和Sutter,2017),并且已经就其生物学和免疫学特征进行了表征(Meyer等人,1991)。此外,MVA是一种高度修饰的无法在哺乳动物细胞中复制的痘苗病毒,并且先前已经用于通过递送肿瘤相关抗原(TAA)进行的针对肿瘤的疫苗接种(Zhang等人,2012)。尽管事实是这种病毒似乎显示出理想的安全性并且被证明可以有效地针对体内表达的肿瘤抗原产生免疫应答,但是大多数患者并未显示出任何可验证的抗肿瘤应答;似乎所引发的免疫受到肿瘤内部局部发生的免疫抑制作用的阻碍,从而导致无效的抗肿瘤应答(Marigo等人,2008)。

[0017] 因此,尽管可以说已经朝着改善的免疫疗法取得了进展,但是仍然需要将更有效的痘苗病毒株用于癌症的病毒疗法以建立能够根除癌症的有效免疫应答。

[0018] 现在,本发明描述了朝向此目标迈进的又一步,并且公开了一种新型的痘苗病毒株,其在人类和小鼠细胞中具有复制能力,并且根据发明人的最佳知识,即使是一般的第一痘苗病毒也是如此,所述第一痘苗病毒通常会导致免疫相关的钙网蛋白(CRT)向外膜易位并且因此引起钙网蛋白在感染细胞的外细胞膜上暴露,因此引发强效和改善的免疫应答。

[0019] 钙网蛋白(CRT)似乎是一种多功能蛋白并且已被描述为涉及激素应答DNA元件的转录调控以及MHC I类蛋白的成熟;它还被描述为结合并灭活内质网中的Ca²⁺离子或错误折

叠蛋白质,并且主要位于内质网(ER)的储藏室中。CRT代表ER内腔中含量最丰富的蛋白质,但是在细胞死亡的情况下,一部分蛋白质可以从ER内腔转移到细胞表面;更具体地,已经表明CRT在细胞表面上充当“吃我(eat-me)”信号(Gardai等人,2005),从而介导CD91阳性细胞(主要是巨噬细胞和树突状细胞(DC))的吞噬。

[0020] 新型痘苗病毒株被描述为在哺乳动物细胞中具有复制能力。不受此理论限制,据信,这种特性尤其取决于病毒骨架中K1L基因的存在和功能活性。具体地,已经显示所述新型株在哺乳动物(并且特别是在人类和小鼠)细胞系中(例如在诸如HeLa细胞、143B细胞、CT26细胞、LLC1细胞或MCF-7细胞的癌细胞中)复制良好。与这些结果相比,应当指出的是,已知MVA在这些细胞或其他哺乳动物来源的细胞中不复制。

[0021] 此外,新型痘苗病毒株与所有和/或至少一些其他痘苗病毒株共享若干个管家基因。然而,其免疫学特征非常不同,并且在本申请的上下文中被称为IOVA(免疫溶瘤痘苗)。

[0022] 痘苗病毒基因组的许多基因已被描述为免疫逃逸基因(Smith等人,2013),所述免疫逃逸基因形成并决定不同病毒株的免疫学特征。多年来,已经进行了研究以鉴定此类免疫逃逸基因的潜在作用机制。根据获得的结果,这些免疫逃逸基因尤其表达细胞因子的可溶性受体,其与天然受体竞争并且降低细胞因子诱导的免疫应答的功效。其他基因阻断了活化不同的免疫活化基因的细胞内途径,并且因此也干扰并减少病毒特异性免疫应答。

[0023] 简单总结一下,表1列出了目前鉴定的痘苗病毒的免疫逃逸基因以及它们在不同痘苗株中的存在与否。它还指示了对应基因产物的潜在功能或作用机制。

[0024] 表1:与IOVA序列相比的已知痘苗免疫调节剂

	ORF	基因产物	IOVA				
			CVA	MVA	COP	WR	
[0025]	C12L	白介素-18 结合蛋白	+	+	--	+	+
	C10L	结合 DNA--PK	--	--	--	+	+
	C9L	蚂蚁样蛋白	--	--	--	+	+
	C8L*	白介素-18 结合蛋白	+	+	+	--	+
	C6L	IRF3 结合	+	+	+	+	+
	C5L	Kelch 样蛋白	+	+	--	+	+
	C4L	NF-κB 抑制剂	--	--	--	+	+
	C3L	补体控制蛋白	+	+	--	+	+
	C2L	Kelch 样蛋白, 炎症的调节剂	--	--	--	+	+
	N1L	TNF-R 和 TLR 信号传导的抑制剂	--	+	--	+	+

[0026]	N2L	IRF3 抑制剂	--	+	--	+	+
	M1L	凋亡抑制剂	--	--	--	+	+
	K1L	NF-κB 抑制剂	+	+	--	+	+
	K2L	丝氨酸蛋白酶抑制剂; SPI-3	+	+	+	+	+
	K3L	eIF2α 样蛋白	+	+	+	+	+
	K7R	NF-κB/IRF3 抑制剂	+	+	+	+	+
	F1L	抗凋亡, 炎性体抑制剂	+	+	+	+	+
	F3L	Kelch 样蛋白	+	+	--	+	+
	E3L	双链 RNA 结合蛋白	+	+	+	+	+
	H1L	使 STAT1 和 STAT2 (VH1)去磷酸化	+	+	+	+	+
	D9/D10	切割 mRNA 上的 5-甲基化帽	+	+	+	+	+
	A35R	MHC II 类的抑制剂	+	+	+	+	+
	A38L	CD47 样蛋白	+	+	+	+	+
	A40R	C 型凝集素样蛋白	+	+	+	+	+
	A41L	分泌型趋化因子结合蛋白	+	+	+	+	+
	A42R	抑制蛋白-1 样	+	+	--	+	+
	A44L	3 β-羟基类固醇脱氢酶	+	+	+	+	+
	A46R	NF-κB/IRF3 抑制剂	+	+	+	--	+
	A49R	NF-κB 抑制剂	+	+	+	+	+

[0027] 表1 (续)

[0028]	ORF		IOVA	CVA	MVA	COP	WR
[0028]	A52R	靶向 IRAK2/TRAF6 的 Toll/IL1 受体抑制剂	--	+	--	+	+
	A53R	可溶性 TNF 受体(CrmC)	--	+	--	--	--
	A55R	细胞内 kelch 蛋白免疫调节剂	--	--	--	+	+
	A56R	血凝素/NK 细胞裂解的阻断剂	--	+	+	+	+
	B7R	趋化因子结合结构域蛋白 SCP-3	+	+	--	+	+
	B8R	分泌型干扰素-γ 结合蛋白	+	+	--	+	+
	B13R/B14R	胱天蛋白酶的抑制剂(SPI-2, CrmA)	--	--	--	--	+
	B15R	分泌型 IL-1β 结合蛋白	+	+	--	+	+
	B16R	白介素-1β 受体	+	+	+	--	+
	B19R	可溶性和细胞表面干扰素-α/β 受体	+	+	--	+	+
	B21R*	趋化因子结合结构域蛋白 SCP-1	--	--	--	--	+

[0029] ORF:痘苗COP株的命名法。*CPXV-GRI中的命名法。

[0030] +:完全且功能性的;

[0031] --:全部或部分缺失的(非功能性的)。

[0032] 表1中使用的开放阅读框(ORF)的命名法是指针对痘苗病毒哥本哈根(COP)株建立

的命名系统(Goebel等人,1990),并且通过分配给由限制性内切核酸酶HindIII产生的大小递减的病毒基因组DNA片段的字母来标识。例外的是具有涉及牛痘病毒CPXV-GRI基因组中的DNA片段的字母的ORF C8L和B21R,因为它们在痘苗病毒COP株中不存在。此类HindIII片段中的不同ORF由数字来标识。末尾的字母指示转录方向:R代表右,L代表左。

[0033] 另外,表1提供了关于迄今已鉴定的免疫逃逸基因与特征明确的痘苗病毒株COP、WR、MVA以及MVA祖先株CVA的功能性的比较。在表1中表明,不同的基因在不同的病毒基因组中是功能性的(由“+”指示),还是部分/全部缺失且功能性失活的(由“-”指示)。

[0034] 如本文所述以及下文中鉴定为IOVA的新型痘苗病毒株具有其自身的免疫学特征。它与CVA或WR共享一些功能性表达的基因,并且还与MVA共享一些功能性失活的基因。发明人还在序列水平上确认了这一点,从而将新型痘苗病毒IOVA的一个分离株的全长序列与WR、COP、CVA和MVA的公开序列进行比较。

[0035] 发明人还开发了用于容易地鉴定新型IOVA株的PCR测定。为此,可以用一方面特异性结合在C2L ORF(开放阅读框)的区或序列以及N2L ORF的区或序列中的PCR寡核苷酸(引物)扩增任何待测试的痘苗病毒的DNA片段。通过标准参数执行的PCR将针对大多数痘苗病毒产生包含ORF C2L-C1L-N1L-N2L序列的扩增片段。这些PCR产物是双链DNA片段,并且这样然后用限制性核酸内切酶BstXI进行酶促处理。因此,在例如痘苗株WR、COP和CVA中获得的特异性DNA产物在琼脂糖凝胶电泳后不会被切割,并呈现出约3280bp(分子量)的单条带。不同的是,特异性IOVA DNA产物将被BstXI切割,并且将在琼脂糖凝胶中呈现两个条带,其分子量分别为约2360和920bp。对此的解释是,新型IOVA病毒在N1L ORF中携带高度特异性的突变,从而导致功能性失活的N1L和新的BstXI限制性位点。就MVA而言,MVA基因组中的C2L基因序列被缺失,因此,这种特异性PCR将不会扩增DNA产物。

[0036] 如表1和本申请提供的数据中可看出,尽管IOVA(本身及其所有衍生物)与CVA、WR和MVA共享许多基因和/或功能性缺失,但是它不仅在安全特征方面而且在免疫学特征方面都是独特的。

[0037] 作为本发明的基本核心,这种免疫学特征尤其与钙网蛋白在病毒感染的细胞的外膜上的呈递有关。

[0038] 因此,新型株的免疫学特征被描述为尤其引发可测量的在病毒感染的细胞的外膜上的钙网蛋白呈递。不受此理论的束缚,据信这种特性取决于病毒骨架中的选自由以下组成的组的免疫逃逸基因中的至少一个的功能性失活、部分或全部缺失:B21R*、C10L、C9L、C4L、C2L、N1L、N2L、M1L、A26R、A51R、A52R、A55R、A56R和B13R/B14R(痘苗病毒Cop株命名法,除*之外,其对应于CPXV-GRI命名法)。

[0039] 由于这些功能性失活的、部分或全部缺失的基因,最新产生的病毒不仅丧失了其逃避宿主的免疫应答的某些能力,而且还另外引入了免疫逃逸策略的转变。

[0040] 表2:IOVA与WR之间的区别

	ORF	基因产物	IOVA	WR
[0041]	C10L	结合 DNA-PK	-	+
	C9L	蚂蚁样蛋白	-	+
	C4L	NF-κB 抑制剂	-	+
	C2L	Kelch 样蛋白, 炎症的调节剂	-	+
	N1L	TNF-R 和 TLR 信号传导的抑制剂	-	+
	N2L	IRF3 抑制剂	-	+
	M1L	凋亡抑制剂	-	+
	A52R	靶向 IRAK2/TRAF6 的 Toll/IL1 受体抑制剂	-	+
[0042]	A55R	细胞内 kelch 蛋白免疫调节剂	-	+
	A56R	血凝素/NK 细胞裂解的阻断剂	-	+
	B13R/B14R	胱天蛋白酶的抑制剂(SPI-2, CrmA)	-	+
	B21R*	趋化因子结合结构域蛋白 SCP-1	-	+

[0043] ORF: 根据痘苗病毒-COP株的命名法。

[0044] +: 完全且功能性的;

[0045] -: 全部或部分缺失或功能性失活的。

[0046] 在这种情况下, 特别有趣的是, 钙网蛋白的这种效应: 钙网蛋白通常严格地是内部蛋白并且位于内质网中, 但是在被新型痘苗病毒株感染后转移到癌细胞的细胞表面时, 它可以引发并增强对病毒感染的细胞的特异性免疫反应。钙网蛋白是一种危险相关分子模式 (DAMP), 被描述为当出现在外膜上时充当“吃我”信号, 并且可用作免疫原性细胞死亡的标志物。与痘苗病毒WR相比, 新产生的痘苗病毒株IOVA以低得多的剂量裂解或杀伤癌细胞, 因此更高效 (图3A)。

[0047] 发明人表明, 在人类和小鼠细胞系中, WR仅能杀伤70%-80%的培养的肿瘤细胞; 约20%-30%的细胞逃避了病毒介导的破坏, 并且即使在感染复数大大增加的情况下仍保持代谢活跃。

[0048] 相反, 新型IOVA病毒的衍生物破坏了所有测试细胞系中至少并甚至超过95%的细胞; 非常令人惊讶的是, 在人类细胞系HeLa中, 新型IOVA衍生物显示出高度改善的细胞毒性, 其效率比痘苗病毒WR至少高40倍, 但是就IOVA在HeLa中的生长能力而言, 它与痘苗病毒WR的生长能力非常相似。这种更完整的杀伤病毒感染的细胞的效率特别降低了肿瘤缓解的风险, 并且因此是高度有利的。

[0049] 因此, 将新型痘苗病毒株用于感染细胞周期活化的细胞和/或肿瘤细胞不仅非常有利, 而且在这种情况下特别适合作为溶瘤病毒或用于治疗癌症, 并且还用于疫苗接种目的和更一般的免疫刺激目的, 因此一般用于医学中。

[0050] 另外, 根据另一实施方案, 新型痘苗病毒株IOVA包含功能性失活的A56R基因。此基因产物表达的缺乏与病毒将感染细胞与邻近细胞融合 (即在感染哺乳动物细胞和肿瘤细胞时形成合胞体) 的能力有关。

[0051] 已经在许多病毒感染中描述了合胞体的形成, 并且在这些感染的大多数中, 合胞体的形成是由于细胞病变作用引起的膜失稳的结果; 然而, 一些其他病毒会编码促进这种合胞体形成的蛋白质作为传播感染的机制, 而不是中和抗体的靶标。有趣的是, 痘苗病毒WR

表达A56R基因产物,以便抑制这种合胞体的形成(图1)。

[0052] 新型痘苗病毒株IOVA引起癌细胞中合胞体形成的发现被认为是溶瘤病毒潜在的有趣表型,因为合胞体细胞死亡被描述为高度免疫原性:肿瘤细胞的融合触发与肿瘤抗原的有效释放相关联的外泌体样囊泡的释放,其可以被树突状细胞高效吸收并因此改善高度特异性的免疫反应。

[0053] 另外,根据另一实施方案,新型痘苗病毒株IOVA包含功能性失活的A26R和A56R基因。这些基因产物表达的缺乏与哺乳动物细胞和肿瘤细胞感染后甚至改善的合胞体形成有关,并且因此,也与病毒将感染细胞与邻近细胞融合的能力有关。

[0054] 为了研究合胞体形成作为可能的IOVA病毒特异性抗肿瘤功效的中介物以及在这种融合体中单独缺失A56R或与A26R组合缺失A56R的结果,通过替换突变的A56R基因并创建IOVA/A56+,对单个A56+IOVA病毒变体进行了工程改造(图1和6)。在恢复A56R基因表达时,尽管与IOVA/A26-/A56-病毒相比,融合细胞的数量减少,但IOVA/A56+病毒保留融合肿瘤细胞的一定能力(图6);这表明两个基因可能相互作用以完全抑制感染细胞的融合。

[0055] 已知合胞体的形成会对其他候选溶瘤病毒(例如,衍生自麻疹病毒或腺病毒候选溶瘤病毒)的生产性复制产生负面影响。出人意料的是,已证明在IOVA病毒的情况下合胞体形成对复制能力的影响极小,并且从感染IOVA/A56-和IOVA/A56+的细胞获得了非常相似的病毒产量(图2)。

[0056] 出人意料的是,根据本发明,合胞体的形成对癌细胞的细胞毒性具有显著的积极影响:在所有测试的细胞系中,形成的合胞体病毒对癌细胞执行更有效的杀伤,尤其是在143B和MCF-7癌细胞系中,其中IOVA/A56+与痘苗病毒WR表现相似,对培养的癌细胞的杀伤降低(图3)。因此,由IOVA/A56-以及IOVA/A56-/A26-介导的合胞体形成可以有助于增强癌细胞的破坏。

[0057] 癌细胞感染后观察到大斑块表型。IOVA/A56-和IOVA/A56+病毒都表现出增加的杀伤能力和在癌细胞中扩散的能力,如感染单个癌细胞后产生的斑块的增加的直径所示(图7)。

[0058] 在诱导免疫原性细胞死亡方面,合胞体的形成也独立于CRT易位的诱导,并且还独立于随后描述的其他DAMP(诸如HMGB1和ATP)的另外分泌,这对于A56-和A56+病毒都非常相似(图4a至图4c)。

[0059] 有趣的是,在本发明的上下文中表明,其本身已经在癌细胞中具有增强的细胞病变作用的合胞体形成的表型,除了将钙网蛋白独立地暴露在感染细胞的外膜上之外,还增加了如本文所述的免疫调节的痘苗病毒株IOVA的抗肿瘤有效性。

[0060] 因此,新型痘苗病毒株可另外含有功能性失活的A56R和/或A26R基因,并且因此引起合胞体形成并诱导肿瘤细胞的融合。与钙网蛋白在感染细胞的膜上的增强呈递组合,这会导致更大的裂解,并且因此导致更大的抗肿瘤活性,并且结果导致癌细胞、肿瘤块的破坏增强,并最终导致产生针对肿瘤的更强的免疫应答。

[0061] 为了提高新型IOVA病毒、其衍生物和/或其病毒载体的安全性,已经或可能引入了另外的修饰以仅将复制限制在特定的细胞范围内。

[0062] 因此,根据另一个实施方案,将新型痘苗病毒株IOVA修饰成在复制细胞和/或癌细胞中具有宿主范围,或者换句话说,具有细胞范围限制的复制能力。

[0063] 在这种情况下,术语“复制细胞”包括具有活化的细胞周期并以高指数复制的细胞。落在此定义内的细胞包括连续复制的细胞,诸如癌细胞,并且还包括属于例如活化的免疫系统并且任选地具有浸润肿瘤的潜能的细胞。

[0064] 此外,下文使用的术语“癌细胞”包括不可逆转且不受控制地分裂并且具有通过例如形成实体肿瘤块或通过用异常细胞充满血液和/或其他体腔来取代或处置正常组织的能力的细胞。此外,术语“癌细胞”还任选地表示表达已知肿瘤标志物基因产物并且可以通过其表达来鉴定的细胞。

[0065] 为了提高新型痘苗病毒株的细胞范围特异性,研究表明,通过灭活选自由F4L、J2R和C11R组成的组的所谓的管家基因中的一个或多个,可以获得细胞范围受限的复制能力。例如,具有失活或突变的J2R基因的病毒将不表达病毒胸苷激酶,并且因此,其有效复制将限于具有连续活化的细胞周期的细胞或另选地限于肿瘤细胞。根据本发明,已经通过将替代表达盒(表达示踪剂的颜色)插入TK基因的位置上来示例性地执行了这种失活,所述TK基因在痘苗命名法中被称为J2R。

[0066] 相似地,根据本发明,单独的C11R、F4L或者彼此组合或与J2R组合的功能性失活、缺失或突变也将限制痘苗病毒株对细胞周期活化的细胞和/或肿瘤细胞的复制能力。因此,为了使具有宿主范围限制的上述结果的由F4L、J2R和C11R组成的组中的一个或多个基因功能性失活,这种向病毒基因组中添加突变或缺失明显地改善了对新型病毒株的安全特征。

[0067] 因此,细胞范围受限的痘苗病毒株IOVA由于其改善的安全特征而用于医学是特别有利的。

[0068] 发明人还表明,与痘苗病毒WR相比,本发明的新型痘苗病毒株出人意料地能够诱导感染后免疫原性细胞死亡。

[0069] 在这种情况下,术语“免疫原性细胞死亡”应理解为这样一种细胞死亡的形式:其能够引发并活化针对垂死细胞的免疫应答,并且其特征在于损伤相关的分子模式(DAMP)分子的释放或暴露,所述分子可以激发针对微生物和致癌新抗原两者的免疫应答(Galluzzi等人,2017)。在由可能介导对肿瘤细胞的免疫应答的垂死细胞释放或暴露的DAMP的长列表中,已经描述了钙网蛋白在细胞的细胞表面的暴露,以及高迁移率族蛋白1(HMGB1)或ATP向细胞外空间的释放。

[0070] 免疫原性细胞死亡可进一步被描述为这样一种细胞死亡的形式:其暴露或释放不同的DAMP,以便活化树突状细胞(DC),并且因此活化针对垂死细胞中存在的抗原的特异性T细胞。它不是从外部触发的,如例如细胞凋亡一样,其例如被定义为非免疫原性并且甚至是致耐受性的细胞死亡,并且不能由相同的DAMP定义。

[0071] 利用此类标志物的背景知识,发明人可以对由病毒引起的细胞死亡的类型进行实际描述和分类。因此,可以清楚地证明,与痘苗病毒WR相比,新型痘苗病毒株IOVA不仅在感染后引起了增强的裂解和细胞杀伤作用,而且还可以通过测量某些DAMP(即HMGB1和ATP)以及通过测量外层细胞膜上存在的CRT量来表明感染细胞由于免疫原性细胞死亡而死亡。

[0072] 这令人印象深刻地证明,在哺乳动物细胞中并且尤其是在肿瘤细胞或细胞周期活化细胞中复制的新型痘苗病毒株不仅作为用于疫苗接种目的的疫苗或佐剂高度可用,而且在其他免疫治疗或免疫肿瘤治疗的情况下,特别是作为溶瘤病毒用于癌症的治疗也高度可用。

[0073] 总之,新型痘苗病毒株IOVA及其衍生物、载体和重组体具有在哺乳动物癌细胞系中复制的能力,并且可被描述为裂解的,或者在癌细胞的情况下被描述为溶瘤的,因为与黄金标准痘苗病毒WR相比,它们引发增加的破坏细胞周期活化细胞和/或肿瘤细胞的能力。

[0074] 重要的是,IOVA及其衍生物或重组体特别适合在细胞感染后诱导免疫原性细胞死亡,并且因此极有希望用于免疫治疗方法中。它们特别适合作为新型平台病毒用于安全且高效的免疫治疗或免疫肿瘤治疗。

[0075] 根据另一实施方案,本申请还提供了以其特征在于其核酸序列的分离的IOVA病毒。分离的IOVA的序列信息可包含碱基对修饰,然而,其不影响IOVA的免疫学特征。因此,IOVA病毒可以通过序列分析和选自由以下组成的组的至少一种或多种功能性失活或缺失的ORF的存在来鉴定:J2R、C11R、F4L、B21R*、C10L、C9L、C4L、C2L、N1L、N2L、M1L、A26R、A51R、A52R、A55R、A56R和B13R/B14R。

[0076] 根据另一实施方案,IOVA及其衍生物可以通过C2L-C1L-N1L-N2L (SEQ ID NO.:1) 的独特核苷酸序列延伸的存在来鉴定,所述C2L-C1L-N1L-N2L在N1L ORF中引入新产生的BstXI限制酶位点。在此序列中,C2L掺入分布在3个微缺失中的一个51个的核苷酸的缺失;N1L掺入一个2个的核苷酸缺失,所述2个的核苷酸缺失掺入一个早期终止密码子;并且N2L掺入一个15个的核苷酸的缺失,所述15个的核苷酸的缺失编写较短的N2L型式。因此,SEQ ID No.1中所示的序列是IOVA的独特序列,并且代表IOVA的C2L-C1L-N1L-N2L区的独特延伸,从而在一些ORF中掺入微缺失,但不是此类基因的完全缺失并且不具有功能性的C1L ORF的微缺失。

[0077] 另外,根据一个实施方案,分离的IOVA被认为是一种平台技术,其允许产生相关的衍生物或重组体,其通过如上所述的PCR分析或选自由以下组成的ORF的组的病毒管家基因或功能性失活的免疫逃逸基因中的至少一种或多种的直接序列比较来鉴定:K1L、A56R、A26R、J2R、C11R、F4L、B21R*、C10L、C9L、C4L、C2L、N1L、N2L、M1L、A51R、A52R、A55R和B13R/B14R。

[0078] 根据另一实施方案,本申请还提供了衍生自IOVA的病毒载体。这种病毒载体包含与IOVA相同的一组功能性活跃和功能性失活的基因。在本申请的上下文中,术语“病毒载体”还包括两个或更多个载体分子,每个载体分子包含或携带IOVA的一组功能性活跃和功能性失活基因的部分或范围,所述两个或更多个载体分子协同工作以转染细胞,从而使这种细胞能够产生IOVA。

[0079] IOVA本身、分离的病毒、IOVA的核酸序列和包含IOVA特异性核酸序列的病毒载体被认为是一种平台技术。

[0080] 所述IOVA平台还包含IOVA的衍生物,其可以通过PCR和使用BstXI酶的限制性酶消化来鉴定,并且其仍具有与IOVA相同的功能特征和特性,特别是在哺乳动物细胞周期活化细胞中的复制能力、钙网蛋白向外膜的易位和/或感染细胞中含胞体形成的独立诱导。

[0081] 所述IOVA平台还包含IOVA的重组体。IOVA的骨架含有若干个精心描述的痘苗病毒插入位点,用于将转基因插入其基因组。由于其与痘苗病毒的密切关系,本领域技术人员知道并且能够使用一个或若干个位置以用于插入转基因,例如像编码肿瘤抗原、肿瘤相关抗原、疾病相关抗原和/或病原体衍生抗原的基因。

[0082] 因此,根据另一实施方案,本发明提供了重组或转基因的IOVA或者其衍生物或病

毒载体。如在每种平台技术中一样,在精心描述的插入位点引入另外的基因或遗传信息不影响所要求保护的成员的主要特性,这些特性独立地是(i) 诱导感染细胞融合或合胞体形成,(ii) 诱导DAMP尤其是钙网蛋白的显著释放或暴露和/或(iii) 诱导感染细胞的免疫原性细胞死亡,其可能有助于甚至更强的免疫学作用,或者在感染肿瘤细胞的情况下,通过增强对肿瘤细胞的破坏而具有的更有效的抗肿瘤活性。

[0083] 不受理论的束缚,据信更有效的抗肿瘤活性特别是由于针对此类感染细胞的较强免疫应答,这可通过钙网蛋白的存在和/或其他DAMP(诸如HMGB1或ATP)的释放增加来触发。释放的HMGB1可以与TLR4和RAGE结合并且触发促炎应答,而所释放的ATP似乎也可以充当免疫细胞的“发现我(find-me)”信号。

[0084] 总之,新型痘苗病毒株IOVA及其衍生物、载体和重组体具有在哺乳动物癌细胞系中复制的能力,并且可被描述为裂解的,或者在癌细胞的情况下被描述为溶瘤的,因为与黄金标准痘苗病毒WR相比,它们引发增加的破坏细胞周期活化细胞和/或肿瘤细胞的能力。

[0085] IOVA或其衍生物,由于其独特的免疫学特征和安全特征,其可与已经建立的痘苗病毒株相当或甚至更好,因此可用于医学(特别是用在肿瘤学方法中)或用作溶瘤剂或用作针对癌症或其他病原体的疫苗。

[0086] 重要的是,IOVA病毒及其衍生物或重组体特别适合在细胞感染后诱导免疫原性细胞死亡,并且因此被强烈推荐用于免疫治疗方法中。它们特别适合作为新型病毒平台用于安全且高效的免疫治疗或免疫肿瘤治疗。

附图说明

[0087] 图1.感染IOVA病毒后癌细胞中的合胞体形成。示出了感染(a) 人类或(b) 小鼠癌细胞系(感染后24小时)后的荧光显微照片(40x)。HeLa和CT26细胞用0.5的MOI感染。143B、MCF-7和LLC1用5的MOI感染。mCherry在P11启动子下由所有病毒表达。当细胞被IOVA/A56-感染时,可以观察到细胞的大量融合(合胞体)。

[0088] 图2.人类和小鼠肿瘤细胞中IOVA病毒的病毒产生。(a) 以5的MOI用WR/TK-、IOVA/A56-或IOVA/A56+感染人类和(b) 小鼠肿瘤细胞系,并且在不同时间点通过斑块测定来测量后代。通过进行两个独立的实验,针对每个细胞系一式四份评估病毒产量。绘制了平均值+SD。*,与WR/TK-相比,显著 $p < 0.05$ 。#,与IOVA/A56+相比,显著 $p < 0.05$ 。

[0089] 图3.IOVA病毒对肿瘤细胞的细胞毒性增加。以100至0.0005PFU/细胞范围内的剂量用WR/TK-、IOVA/A56-或IOVA/A56+感染癌细胞。感染后第3天,测定细胞活力。测试人类(a) 和小鼠(b) 癌细胞两者。量化每种细胞系的四个不同重复,并描绘每个MOI的平均值±SD。

[0090] 图4.IOVA病毒对免疫原性细胞死亡的诱导。(a) 钙网蛋白在感染细胞表面上的表达的分析。以5的MOI用WR/TK-、IOVA/A56-或IOVA/A56+感染指示的肿瘤细胞系,并且在感染后24小时,通过流式细胞术确定钙网蛋白+细胞群。未感染的细胞(模拟)和星形孢菌素 $1\mu\text{m}$ 分别用作阴性和阳性对照。(a) 钙网蛋白+细胞的百分比。绘制单个重复的值以及不同处理的平均值±SEM。(b-c) 感染IOVA病毒后细胞上清液中HMGB1(b) 和ATP(c) 的浓度。分别利用ELISA测定和ENLITEN ATP测定系统来确定所指示的肿瘤细胞系在感染(5的MOI)后24小时的此类浓度。数据一式四份获得,并以倍数变化相对于WR/TK-+SD的形式绘制。*,与WR/TK-

相比,显著 $p<0.05$ 。#,与模拟相比,显著 $p<0.05$ 。

[0091] 图5.用于病毒鉴定的PCR测定。图5a:在PCR测定中使用的PCR产物的序列。图5b:PCR测定的结果清楚地鉴定了IOVA株的序列,因为所述测定产生了IOVA的两条独特的条带图案(2320和920bp),这与针对WR、COP和CVA呈现3300bp的单个条带的所有其他痘苗病毒株不同。由于C2L缺失,MVA株不产生扩增产物。

[0092] 图6.感染IOVA病毒后合胞体中的核数。以5的MOI用WR/TK-、IOVA/A56-/A26-或IOVA/A56+/A26-感染人类肿瘤细胞系。感染后16小时,将培养物用Hoechst 33342染色,并且在显微镜下计数一个合胞体中的核数。绘制单个重复的值和平均值 $\pm$ SEM。***,与WR/TK-相比,显著 $p<0.0001$ 。

[0093] 图7.癌细胞中斑块的大小。用指示的病毒以0.0001的MOI感染癌细胞单层1小时,并用1:1的培养基和1%羧甲基纤维素的混合物覆盖培养4天。固定并用结晶紫染色后,测定斑块的直径。绘制单个重复的值和平均值 $\pm$ SEM。*,与WR/TK-相比,显著 $p<0.05$ 。#,与IOVA/A56-相比,显著 $p<0.05$ 。

实施例

[0094] 实施例1:IOVA基因组中的缺失

[0095] 产生一种新型免疫溶瘤痘苗病毒(IOVA)株,其在胸苷激酶(TK, J2R)基因中掺入了一个缺失,以便在癌细胞中进行选择性复制。此外,已在痘苗病毒特异性启动子P11的控制下将mCherry基因克隆到TK位点,以便监测病毒复制。

[0096] 此外,新产生的IOVA包含若干个缺失或功能性失活,其在被认为是免疫调节剂的基因中并且选自以下的ORF:B21R*、C10L、C9L、C4L、C2L、N1L、N2L、M1L、A26R、A51R、A52R、A55R、A56R和B13R/B14R。这些基因编码的蛋白质的功能总结在上表1中。

[0097] IOVA基因组的特征还在于包括A26R和/或A56R基因的突变型式。病毒体中A26蛋白的存在阻止了直接的病毒-细胞融合机制,并且其缺失与合胞体的诱导相关联。A56R编码具有血凝活性的病毒调控蛋白,并且据信其在痘苗病毒中的失活会导致具有促融合表型的病毒。已经通过测序确认了所有基因缺失或部分缺失以及所有功能性失活或基因插入。

[0098] 实施例2:由IOVA诱导的合胞体形成

[0099] 为了评估合胞体形成对肿瘤破坏的利弊,发明人通过同源重组恢复了新型IOVA基因组中的野生型痘苗病毒A56R基因序列。与具有截短的A56R型式的IOVA(称为IOVA/A56-)相比,所得的病毒命名为IOVA/A56+。

[0100] 感染后,观察到(图1)感染IOVA/A56-病毒的细胞与邻近细胞融合,并且在通过mCherry表达追踪的人类和小鼠肿瘤细胞系中都可以清楚地观察到巨大的合胞体形成。如所假设的,IOVA/A56+中野生型A56的表达恢复了与痘苗病毒WR株非常相似的表型,并且未导致合胞体形成。

[0101] 另外,观察到IOVA/A56-/A26-中野生型A56的表达也可被描述为仅部分阻断合胞体的形成,因为在感染IOVA/A56+/A26-后仍可观察到多达10个细胞的融合(图6)。

[0102] 实施例3:IOVA的复制能力

[0103] 我们在广泛的人类和小鼠癌细胞系中测试了IOVA与标准株痘苗病毒WR相比的复制能力。

[0104] 为了监测新产生的IOVA的复制,在若干种人类和小鼠癌细胞系中测试了两种IOVA病毒分离株(A56-和A56+)和作为对照的WR/TK-的复制能力。

[0105] 为此,以5的MOI用WR/TK-、IOVA/A56-或IOVA/A56+感染人类和小鼠肿瘤细胞系,并且在不同时间点通过斑块测定来测量后代。通过进行两个独立的实验,针对每个细胞系一式四份评估病毒产量(先前在以下文献中有所描述:Rojas JJ等人,Cell Rep.2016)。

[0106] 如图2所示,两种IOVA病毒(A56-和A56+)在大多数测试的细胞系中均表现出与对照株WR/TK-非常相似的生长曲线,且在形成合胞体的IOVA早期时间点,产量仅略有下降。

[0107] 实施例4:IOVA的细胞毒性

[0108] 我们检查了IOVA感染与广泛的人类和小鼠癌细胞系中的标准株痘苗病毒WR相比的细胞毒性作用。

[0109] 为此,以100至0.0005PFU/细胞范围内的剂量用WR/TK-、IOVA/A56-或IOVA/A56+感染各种癌细胞系。感染后第3天,测定细胞活力。测试人类和小鼠癌细胞两者。量化每种细胞系的四个不同重复,并描绘每个MOI的平均值 $\pm$ SD。

[0110] 有趣的是,与痘苗病毒WR相比,感染IOVA病毒导致癌细胞中的细胞毒性水平明显增强(图3)。痘苗病毒WR能够杀伤培养物中约70%-80%的癌细胞,即使在最高的感染复数(MOI)下也是如此。相反,IOVA/A56-病毒能够杀伤95%-100%之间的培养的肿瘤细胞并降低EC50(杀伤50%的细胞所需的病毒量)。

[0111] 出人意料的是,与痘苗病毒WR(WR/TK-)相比,IOVA/A56-降低了将HeLa细胞50%的细胞培养物活力降低超过40倍所需的病毒量。IOVA/A56+还呈现具有增强的体外癌细胞的细胞毒性的表型;恢复A56的病毒以与IOVA/A56-相似的速率杀伤HeLa、CT-26和LLC1细胞。但是在143B和MCF-7细胞中,细胞毒性与用WR/TK-感染所获得的非常相似,这表明病毒介导的大合胞体形成可能有助于增强肿瘤的破坏。

[0112] 实施例5:癌细胞中IOVA病毒的大斑块表型

[0113] 癌细胞中斑块大小的增加已与病毒在整个肿瘤中的更好扩散以及更高的抗肿瘤活性相关联。为了测试IOVA病毒的斑块大小,以0.0001的MOI感染一组癌细胞系,并且在感染1小时后,用羧甲基纤维素覆盖物培养感染的细胞。感染后4小时,将培养物固定并用结晶紫染色,并测定斑块的直径。

[0114] 如图7所示,与WR/TK-病毒对照相比,IOVA/A56-和IOVA/A56+在所有测试的癌细胞系中均诱导较大的斑块。在HeLa细胞中,感染IOVA病毒后的斑块平均比WR/TK-大40%。令人印象深刻的是,用IOVA病毒感染143B和MCF-7后,可以观察到非常大的斑块,其中就143B细胞而言,斑块的直径是WR/TK-产生的斑块直径的2倍,并且就MCF-7而言,斑块的直径是WR/TK-产生的斑块直径的2.6倍。

[0115] 关于斑块大小,除了在MCF-7乳腺癌细胞系的情况下,IOVA/A56-产生的大合胞体没有显著影响,与IOVA/A56-相比,IOVA/A56+病毒产生的斑块小1.4倍。

[0116] 实施例6:IOVA病毒诱导钙网蛋白在细胞膜上的呈递和癌细胞的免疫原性细胞死亡

[0117] 为了测试IOVA病毒是否能够引发和加强针对癌细胞的免疫应答,发明人最初通过流式细胞术分析了感染IOVA/A56-A、IOVA/A56+或对照病毒WR/TK-后人类癌细胞表面上钙网蛋白(CRT)的暴露。

[0118] 为此,以5的MOI感染细胞,并且在病毒感染后24小时使用非酶细胞解离溶液分离细胞。通过将细胞与人类抗钙网蛋白-AlexaFluor405抗体(Abcam,Ref N°ab210431)在4℃孵育1小时来检测钙网蛋白。未感染的细胞和星形孢菌素1 μ m分别用作阴性和阳性对照。

[0119] 感染HeLa细胞后,WR/TK-在约15%的细胞上诱导CRT的表面暴露(图4a);相反,感染两种IOVA病毒后,令人惊讶的80%以上72%的高水平的细胞在表面上表达了CRT。相似地,在143B细胞中,CRT的暴露率从约35%(使用WR/TK-)增加到几乎90%(使用IOVA病毒),并且在MCF-7细胞中从3%增加到72%以上。

[0120] 为了进一步研究感染IOVA病毒后可能诱导明显的免疫原性细胞死亡,分别使用ELISA测定和荧光素酶介导的ATP测定系统测定HMGB1和ATP的释放。

[0121] 在所有测试的并且用IOVA/A56-和IOVA/A56+两者感染的细胞系中,与用WR/TK-感染的细胞相比,在感染细胞的上清液中可以检测到明显更高浓度的HMGB1(图4b),其中增加范围在1.23倍(143B细胞,IOVA/A56-)至1.68倍(MCF-7细胞,IOVA/A56+)。与用WR/TK-感染后的水平相比,用IOVA病毒感染时,感染细胞上清液中的ATP浓度也增加(图4c),其中增加范围在1.12倍(143B细胞,IOVA/A56+)至2.27倍(HeLa,IOVA/A56-)。

[0122] 这些结果表明,IOVA病毒而不是痘苗病毒WR诱导感染的人类癌细胞的免疫原性细胞死亡。因此,可以建议将IOVA作为一种特别有希望的候选病毒,其在临床试验中就抗肿瘤活性而言可能具有巨大的益处。

[0123] 实施例7:用于鉴定IOVA病毒或其衍生物的PCR测定

[0124] 为了鉴定IOVA株,通过用蛋白酶K消化感染细胞的细胞提取物,并且按照制造说明使用QIAamp基因组DNA试剂盒(QIAGEN)分离病毒的DNA。使用以下寡核苷酸通过PCR扩增覆盖C2L-C1L-N1L-N2L片段的IOVA独特序列(图5a;SEQ ID No.1):正向5'-ATGTTATCCTGGACATCGTAC-3'(SEQ ID No.2)和反向5'-TCATGACGTCCTCTGCAATGG-3'(SEQ ID No.3)。使用这两个引物的PCR产物比独特的SEQ ID No.1大50bp;出于稳定性的原因,PCR反应的设计中还包括了50bp。将PCR产物(SEQ ID No.4)通过使用QIAquick PCR纯化试剂盒纯化,并且用BstXI限制酶消化。

[0125] 通过使用此测定,可以清楚地鉴定IOVA株,因为它产生了在1%琼脂糖中电泳可见的两个DNA条带(2361和923bp)的特定且独特的图案,这与呈现3384bp的单个条带的所有其他痘苗株不同。由于不存在C2L序列,MVA基因组DNA的PCR不产生PCR产物(图5b)。

[0126] 参考文献

[0127] D.Kirn,T.Hermiston,F.McCormick,ONYX-015:clinical data are encouraging.Nature medicine 4,1341(Dec,1998)。

[0128] C.J.Breitbart et al.,Oncolytic vaccinia virus disrupts tumour-associated vasculature in humans.Cancer research 73,1265(Feb 15,2013)。

[0129] S.H.Thorne et al.,Targeting localized immune suppression within the tumour through repeat cycles of immune cell-oncolytic virus combination therapy.Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 18,1698(Sep,2010)。

[0130] C.J.Breitbart et al.,Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans.Nature 477,99(sep 1,2011)。

- [0131] J.Heo et al.,Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer.Nature medicine 19,329(Mar, 2013) .
- [0132] H.J.Zeh et al.,First-in-man study of western reserve strain oncolytic vaccinia virus:safety,systemic spread,and antitumouractivity.Molecular therapy:thejournal of the American Society of Gene Therapy 23,202(Jan,2015) .
- [0133] A.Volz,G.Sutter,Protective efficacy of Modified Vaccinia virus Ankara in preclinical studies.Vaccine 31,4235(Sep 6,2013) .
- [0134] H.Meyer,G.Sutter,A.Mayr,Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence.The Journal of general virology 72(Pt 5),1031(May,1991) .
- [0135] R.T.Zhang,s.D.Bines,C.Ruby,H.L.Kaufman,TroVax((R))vaccine therapy for renal cell carcinoma.Immunotherapy 4,27(Jan,2012) .
- [0136] I.Marigo,L.Dolcetti,P.Serafini,P.Zanovello,V.Bronte,Tumour-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells.Immunol Rev 222,162(Apr,2008) .
- [0137] S.J.Gardai et al.,Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte.Cell 123,321(Oct 21,2005) .
- [0138] G.L.Smith et al.,Vaccinia virus immune evasion:mechanisms,virulence and immunogenicity.The Journal of general virology 94,2367(Nov,2013) .
- [0139] Goebel et al.The complete DNA sequence of vaccinia virus.Virology, 1990 Nov;179(1):247-66,517-63.
- [0140] L.Galluzzi,A.Buque,O.Kepp,L.Zitvogel,G.Kroemer,Immunogenic cell death in cancer and infectious disease.Nat Rev Immunol 17,97(Feb,2017) .
- [0141] Rojas JJ et al.,Manipulating TLR signaling increases the anti-tumour T cell response induced by viral cancer therapies.Cell Rep.,2016 Apr 12;15 (2):264-73.

[0001]	序列表
[0002]	<110> 盖德·苏特
[0003]	胡安·约瑟·罗哈斯·埃普斯图
[0004]	<120> 免疫调节的复制高效的痘苗病毒株
[0005]	<130> F038.002.NPECN
[0006]	<140>
[0007]	<141> 2018-12-03
[0008]	<150> DE102017128538.5
[0009]	<151> 2017-12-01
[0010]	<160> 4
[0011]	<170> BiSSAP 1.3.6
[0012]	<210> 1
[0013]	<211> 3234
[0014]	<212> DNA
[0015]	<213> 痘苗病毒
[0016]	<220>
[0017]	<223> C2L-C1L-N1L-N2L具有新的BstXI位点
[0018]	<400> 1
[0019]	ctattgtaga aattgttttt cacagttgct caaaaacgat ggcagtgact tatgagtttc 60
[0020]	atcttttagta aacatatcat aatattcgat attactagtt gacatatcga acaaattcca 120
[0021]	agtatttgat tttggataat attcgtatit tgcattctgt ataattaaga tataatcacc 180
[0022]	gcaagaacac acgaacatct ttctacatg gttaaagtag atgtacaatt ctatccattt 240
[0023]	gtcttcctta actatatatt tgtatagata attacgagtc tcgtgagtaa ttccagtaat 300
[0024]	tacatagatg tcgccgtcgt actctacagc ataaactata ctatgatgac taggcattgg 360
[0025]	agactttttt atccaacgat ttttagtgaa acattccaca tcgtttaata ctacatattt 420
[0026]	ttcatacgtg gtataaactc caccatttac atatatatca tcgtttacga ataccgacgc 480
[0027]	gcctgaatat ctaggagtaa ttaagtttgg aagtcttata catttcgaag tgccgtgttt 540
[0028]	caaattattct gccacacccg ttgaaataga aaattctaatt cctcctatta catataactt 600
[0029]	tccatcggtt acacaagtag taacttctga ttttaacgac gacatattag taaccgtttt 660
[0030]	ccattttttc gtttcaagat ctacccgcga tacggaataa acatgtctat tgtaaatcat 720
[0031]	gccgccaata atgtatagac aattatgtaa aacatttgca ttatagaatt gtctatctgt 780
[0032]	attaccgact atcgtccaat attctgttct aggagagtaa tgggttattg tggatatata 840
[0033]	atcagagttt ttaatgacta ctatattatg ttttatacca tttcgtgtca ctggctttgt 900
[0034]	agatttggtt atagttaate ccaacaatga tatagcattg cgcattagat tagtcataaa 960
[0035]	cttgggatgt aaaatgttga tgatatctac atcgttttga tttttatgta tccactttta 1020
[0036]	taatatcata gctgtaacat cctcatgatt tacgttaacg tcttcgtggg ataagatagt 1080
[0037]	tgtagtttca tcctttgata attttccaaa ttctggatcg gatgtcaccg cagtaatat 1140
[0038]	gttgattatt tctgacatcg acgattata tagtttttta attccatata ttttagaaaa 1200
[0039]	gttaaacatc cttatacaat ttgtggaatt aatattatga atcatagttt ttacacatag 1260
[0040]	atctactaca ggcggaacat caattattat ggcagcaact agtatcattt ctacattgtt 1320
[0041]	tatggtgatg tttatcttct tccagcgcatt atagtctaatt agcgattcaa acgcgtgata 1380

[0042]	gtttatacca ttcaatataa tcgcttcac	cttttagatgg tgatcctgaa tgcgtttaaa	1440
[0043]	aaaattatac ggagacgccg taataatttc	cttatttact tgtataattt cccattgat	1500
[0044]	agaaaatatac acgctttcca ttcttgaagt	actataagta attatagtat aatgtaaagg	1560
[0045]	tttatatatt caatatTTTT tataaaaaaa	tcatttcgac attaatcct ttttaaattt	1620
[0046]	ccgtctatca tctatagaaa catattctat	gaatttataa aatgctttta cgtgtcctat	1680
[0047]	cgtaggcgat agaaccgcta aaaagcctat	cgaatttcta caaaagaatc tgttatatgg	1740
[0048]	tatagggaga gtataaaaca ttaaatgtcc	gtacttatta aagtattcag tagccaatcc	1800
[0049]	taactctttc gaatacttat taatggctct	tgttctgtac gaatctattt ttttgaacaa	1860
[0050]	tggacctagt ggtatatctt gttctatgta	tctaaaataa tgtctgacta gatccgtag	1920
[0051]	tttaatatcc gcagtcactt tgtctagaat	ggcaaacta actgcgggtt taggcttag	1980
[0052]	tttagtttct atatctacat ctatgtcttt	atctaacacc aaaaatataa tagctaatat	2040
[0053]	tttattacaa tcatccggat attcttctac	gatctcacta actaatgttt ctttggttat	2100
[0054]	actagtatag tcacgatcag acaataaag	aaaatcagat gatcgatgaa taatacat	2160
[0055]	aaatcatca tctgtaagat ttttgagatg	tctcattaaa atattattag ggtcagtact	2220
[0056]	cattatcatt aggcagctat tacttatttt	attatttttc accatataga tcaatcatta	2280
[0057]	gatcatcaaa atatgtttca atcatccaag	agtatggtga atgactcttc ccatctaatt	2340
[0058]	tctgaacgtt caccaatgtc tctagccact	ttggcactaa tagcgatcat tcgcttagcg	2400
[0059]	tcttctatat tattaactgg ttgattcaat	ctatctagca atggaccgtc ggacagcgtc	2460
[0060]	attctcatgt tcttaatcaa tgtacataca	tcgccgtcat ctaccaattc atccaacaac	2520
[0061]	ataagctttt taaaatcatc attataatag	gtttgatcgt tgtcatttct ccaaagaata	2580
[0062]	tatctaataa gtagagtcct catgattagt	taacaactat tttttatggt aaatcaatta	2640
[0063]	gtacaccgct atgtttaata cttattcata	tttttagttt taggattgag aatcaataca	2700
[0064]	aaaattaatg catcattaat tttagaaata	cttagtttcc acgtagtcaa tgaaacattt	2760
[0065]	gaactcatcg tacaggacgt tctcgtacag	gacgtaacta taaaccggtt tatatttggt	2820
[0066]	caagatagat acaaatccga taactttttt	tacgaattct acgggatcca ctttaaaagt	2880
[0067]	gtcataccgg gttcttttta tttttttaa	cagattaatg gtgtgatggt gattaggtct	2940
[0068]	tttacgaatt tgatatagaa tagcgtttac	atattctcca taatgggtcaa tcgccatttg	3000
[0069]	ttcgtatgtc ataaattctt taattatatg	acactgtgta ttatttagtt catccttggt	3060
[0070]	catcattagg aatctatcca atatggcaat	tatactagaa ctataggtgc gttgtataca	3120
[0071]	catattgatg tgtctgttta tacaatccat	gtactacct tcgggtaaaa ttgtagcatc	3180
[0072]	atataccatt tctagtactt taggttcatt	gttatccatt gcagaggacg tcat	3234
[0073]	<210>	2	
[0074]	<211>	21	
[0075]	<212>	DNA	
[0076]	<213>	人工序列	
[0077]	<220>		
[0078]	<223>	引物	
[0079]	<400>	2	
[0080]	atgttatect ggacatcgta c	21	
[0081]	<210>	3	
[0082]	<211>	21	
[0083]	<212>	DNA	

[0084]	<213> 人工序列
[0085]	<220>
[0086]	<223> 引物
[0087]	<400> 3
[0088]	tcatgacgtc ctctgcaatg g 21
[0089]	<210> 4
[0090]	<211> 3284
[0091]	<212> DNA
[0092]	<213> 痘苗病毒
[0093]	<220>
[0094]	<223> PCR产物
[0095]	<400> 4
[0096]	atgttatcct ggacatcgta caaataataa aaagcccata tatgttcgct attgtagaaa 60
[0097]	ttgtttttca cagttgctca aaaacgatgg cagtgactta tgagtttcat ctttagtaaa 120
[0098]	catatcataa tattcgatat tactagtgtga catatcgaac aaattccaag tatttgattt 180
[0099]	tggataatat tcgtattttg catctgctat aattaagata taatcaccgc aagaacacac 240
[0100]	gaacatcttt cctacatggt taaagtacat gtacaattct atccatttgt cttccttaac 300
[0101]	tatatatttg tatagataat tacgagtcct gtgagtaatt ccagtaatta catagatgtc 360
[0102]	gccgtcgtac tctacagcat aaactatact atgatgtcta ggcatgggag acttttttat 420
[0103]	ccaacgattt ttagtgaaac attccacatc gtttaatact acatattttt catacgtggt 480
[0104]	ataaactcca ccattacat atatatcatc gtttacgaat accgacgcgc ctgaatatct 540
[0105]	aggagtaatt aagtttgga gtcttatcca tttcgaagt ccggtgttca aatattctgc 600
[0106]	cacaccggt gaaatagaaa attctaatec tcctattaca tataactttc catcgtaaac 660
[0107]	acaagtacta acttctgatt ttaacgacga catattagta accgttttcc attttttctg 720
[0108]	ttcaagatct acccgcgata cggaataaac atgtctattg ttaatcatgc cgccaataat 780
[0109]	gtatagacaa ttatgtaaaa catttgcatt atagaattgt ctatctgtat taccgactat 840
[0110]	cgtccaatat tctgttctag gagagtaatg ggttattgtg gatataataat cagagttttt 900
[0111]	aatgactact atattatggt ttataccatt tcgtgtcact ggctttgtag atttgatatt 960
[0112]	agttaatccc aacaatgata tagcattgag catagtatta gtcataaact tgggatgtaa 1020
[0113]	aatgttgatg atatctacat cgtttggatt tttatgtatc cactttaata atatcatagc 1080
[0114]	tgtaacatcc tcatgattta cgtaaagtc ttcgtgggat aagatagttg tcagttcatc 1140
[0115]	ctttgataat tttccaaatt ctggatcgga tgtcaccgca gtaatattgt tgattatttc 1200
[0116]	tgacatcgac gcattatata gttttttaat tccatatctt ttagaaaagt taaacatcct 1260
[0117]	tatacaattt gtggaattaa tattatgaat catagttttt acacatagat ctactacagg 1320
[0118]	cggaacatca attattatgg cagcaactag tatcatttct acattgttta tggatgatgt 1380
[0119]	tatcttcttc cagcgcatat agtctaatac cgattcaaac gcgtgatagt ttataccatt 1440
[0120]	caatataatc gtttcatcct ttagatgggt atcctgaatg cgtttaaaaa aattatacgg 1500
[0121]	agacgccgta ataatttctt tattcacttg tataatttcc ccattgatag aaaatatcac 1560
[0122]	gctttccatt cttgaagtac tataagtaat tatagtataa tgtaaagggt tatatatcca 1620
[0123]	atatttttta taaaaaatc atttcgacat taattccttt ttaaatttcc gtctatcatc 1680
[0124]	tatagaaaca tattctatga atttataaaa tgcttttacg tgtcctatcg taggcgatag 1740
[0125]	aaccgctaaa aagcctatcg aatttctaca aaagaatctg ttatatggta tagggagagt 1800

[0126] ataaaacatt aaatgtccgt acttattaaa gtattcagta gccaatccta actctttcga 1860
[0127] atacttatta atggctcttg ttctgtacga atctatTTTT ttgaacaatg gacctagtgg 1920
[0128] tatatcttgt tctatgtatc taaaataatg tctgactaga tccgttagtt taatatccgc 1980
[0129] agtcatcttg tctagaatgg caaatctaac tgcgggttta ggcttttagtt tagtttctat 2040
[0130] atctacatct atgtctttat ctaacaccaa aaatataata gctaataattt tattacaatc 2100
[0131] atccggatat tcttctacga tctcactaac taatgtttct ttggttatac tagtatagtc 2160
[0132] acgatcagac aaataaagaa aatcagatga tcgatgaata atacatttaa attcatcatc 2220
[0133] tgtaagattt ttgagatgtc tcattaaaat attattaggg tcagtactca ttatcattag 2280
[0134] gcagctatta cttatTTTT tatTTTTc acatagatc aatcattaga tcatcaaaat 2340
[0135] atgtttcaat catccaagag tatggtgaat gactcttccc atctaatttc tgaacgttca 2400
[0136] ccaatgtctc tagccacttt ggcactaata gcgatcattc gcttagcgtc ttctatatta 2460
[0137] ttaactggtt gattcaatct atctagcaat ggaccgtcgg acagcgcatc tctcatgttc 2520
[0138] ttaatcaatg tacatacatc gccgtcatct accaattcat ccaacaacat aagcttttta 2580
[0139] aaatcatcat tataataggt ttgatcgttg tcatttctcc aaagaatata tctaataagt 2640
[0140] agagtcctca tgattagtta acaactattt tttatgttaa atcaattagt acaccgctat 2700
[0141] gtttaatact tattcatatt ttagttttta ggattgagaa tcaatacaaa aattaatgca 2760
[0142] tcattaattt tagaaatact tagtttccac gtagtcaatg aaacatttga actcatcgta 2820
[0143] caggacgttc tcgtacagga cgtaactata aaccggttta tatttggtca agatagatac 2880
[0144] aaatccgata acttttttta cgaattctac gggatccact ttaaaagtgt cataccgggt 2940
[0145] tctttttatt tttttaaaca gattaatggt gtgatgttga ttaggtcttt tacgaatttg 3000
[0146] atatagaata gcgtttacat attctccata atggtcaatc gccatttggt cgtatgtcat 3060
[0147] aaattcttta attatatgac actgtgtatt atttagttca tccttggtca tcattaggaa 3120
[0148] tctatccaat atggcaatta tactagaact ataggtgcgt tgtatacaca tattgatgtg 3180
[0149] tctgtttata caatccatgc tactacctc gggtaaaatt gtagcatcat ataccatttc 3240
[0150] tagtacttta ggttcattgt tatccattgc agaggacgtc atga 3284

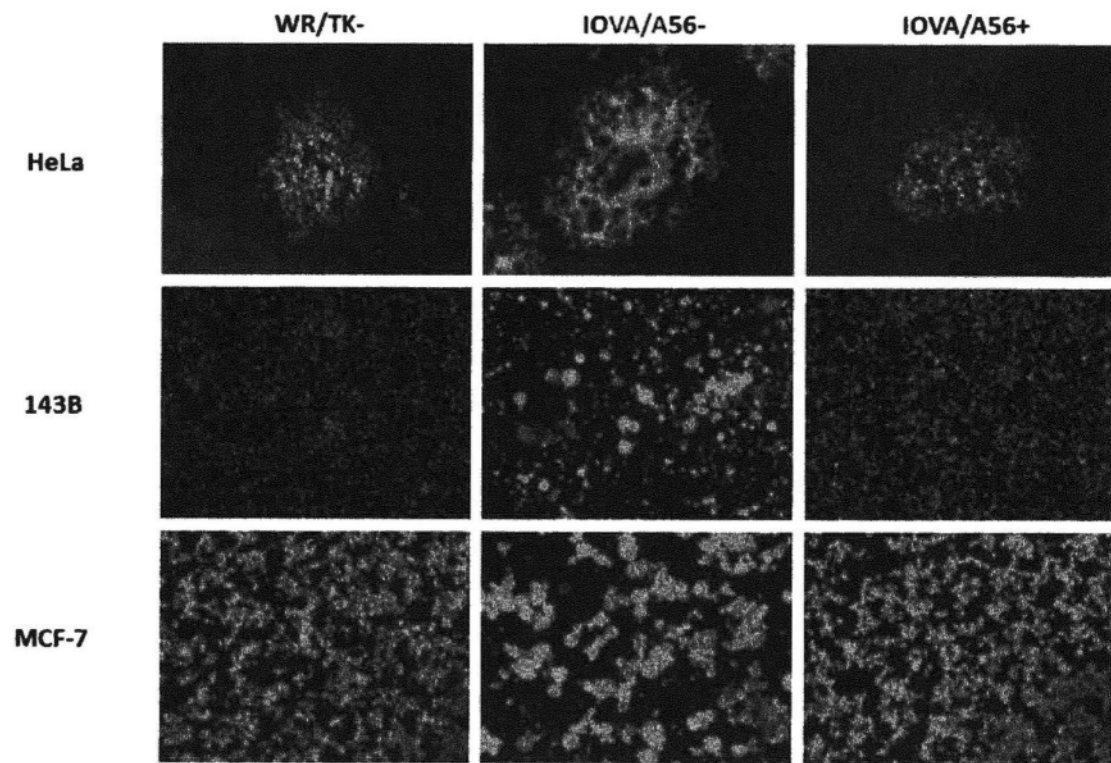


图1a

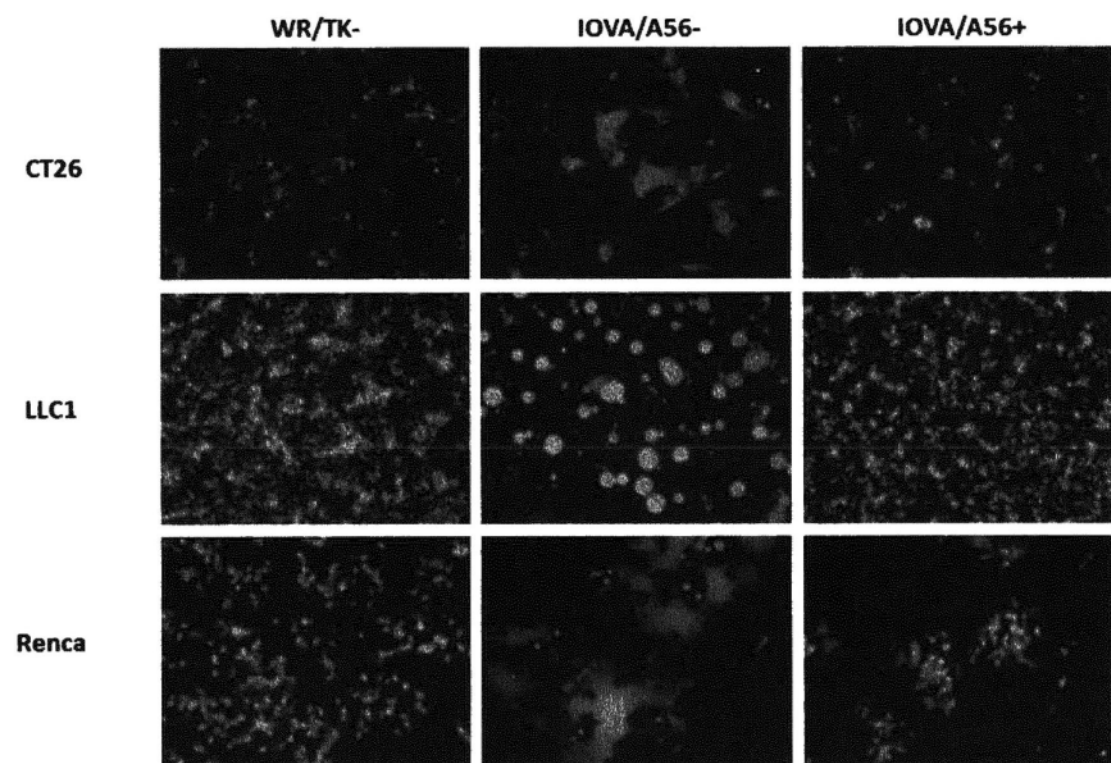


图1b

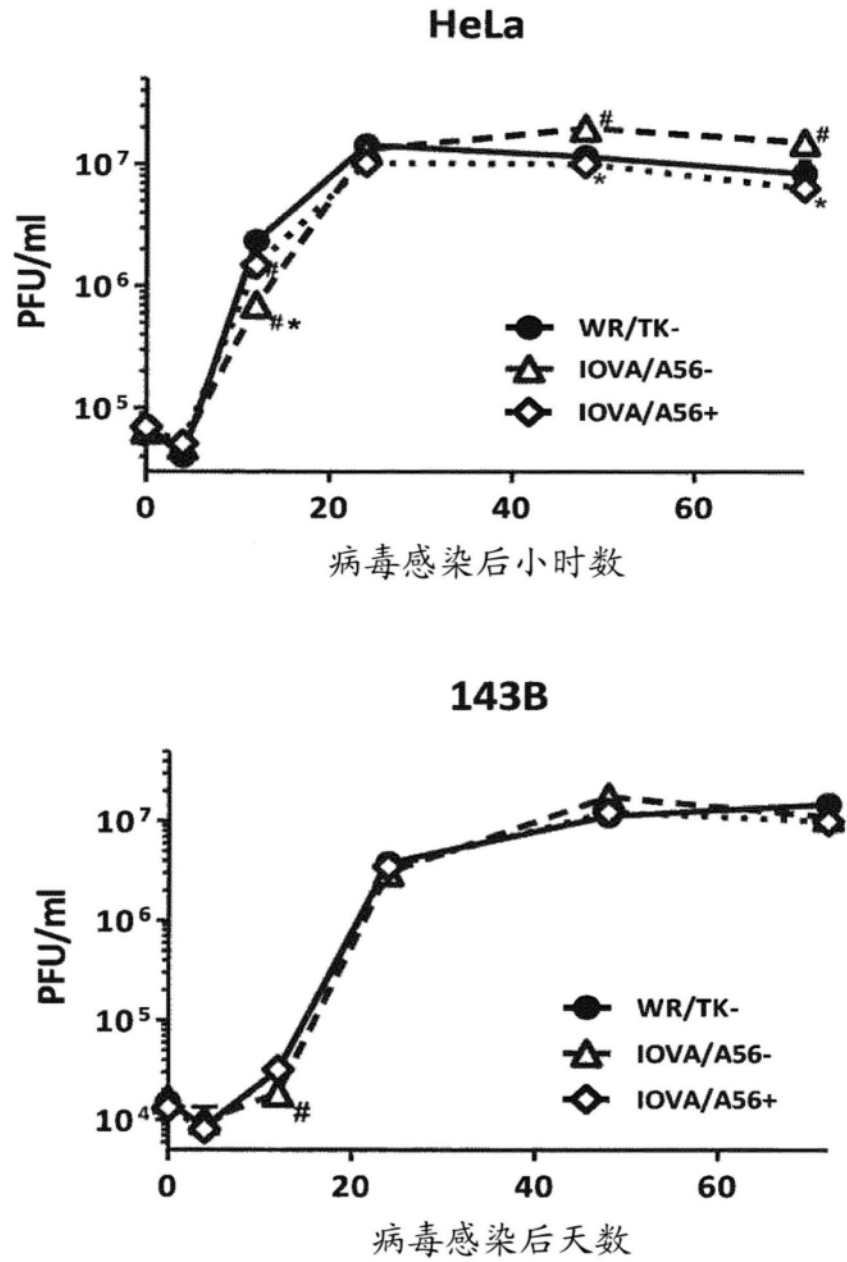


图2a

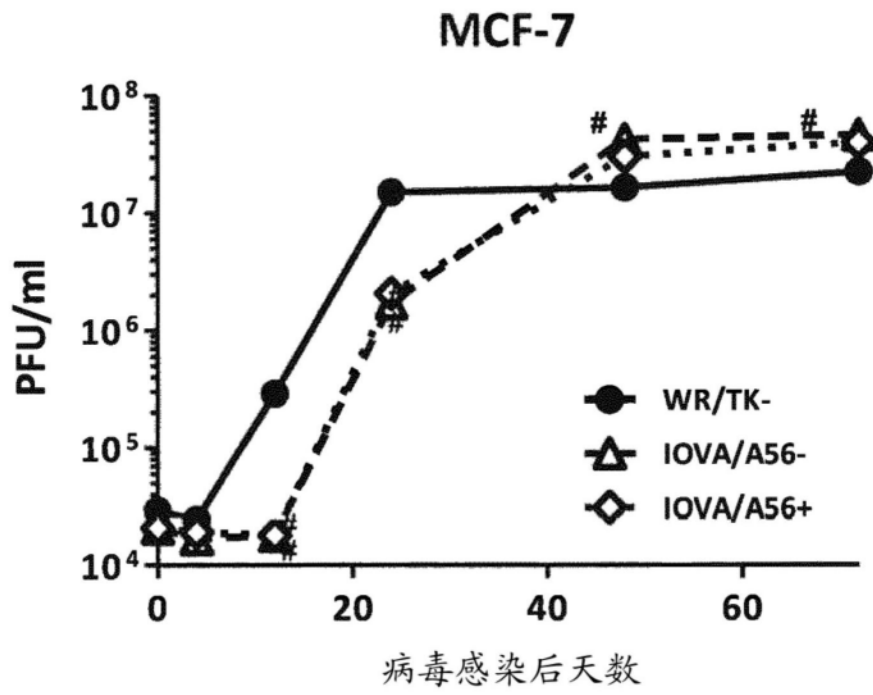


图2a续

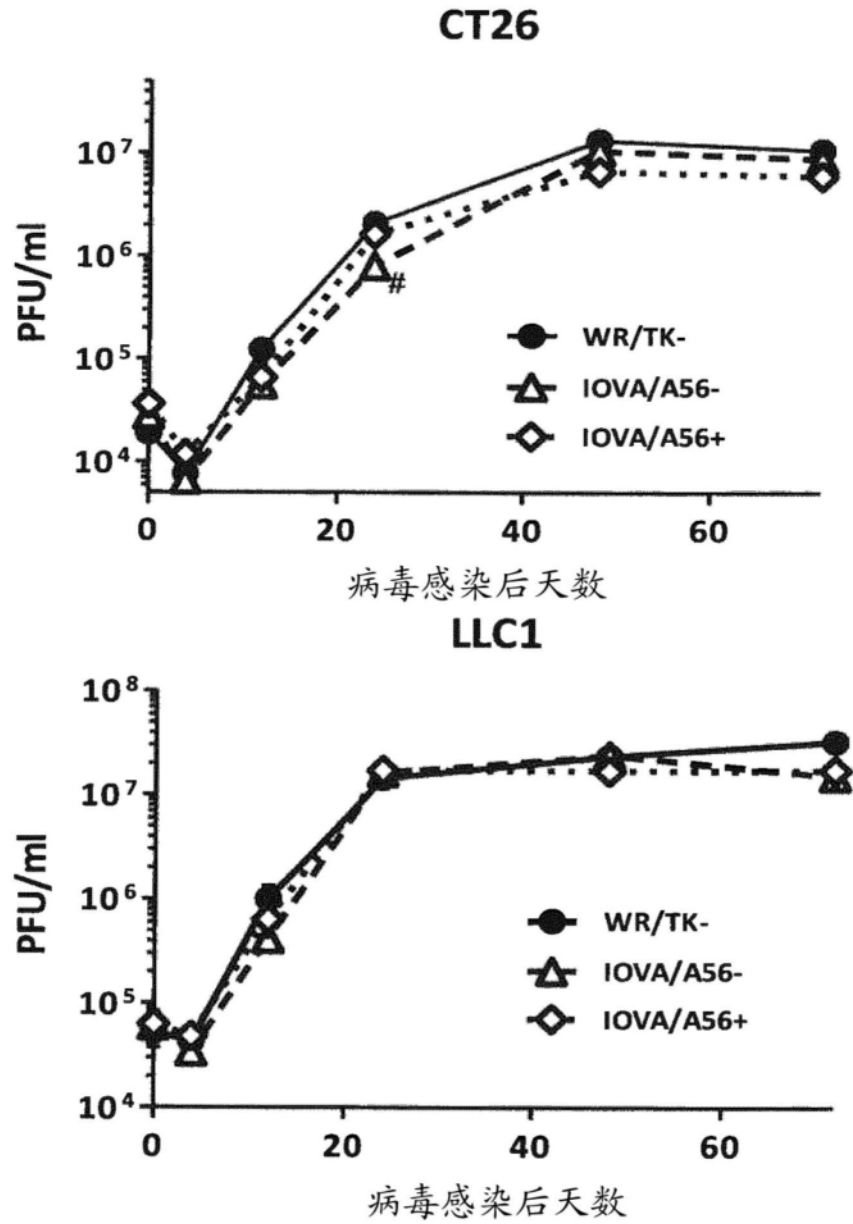


图2b

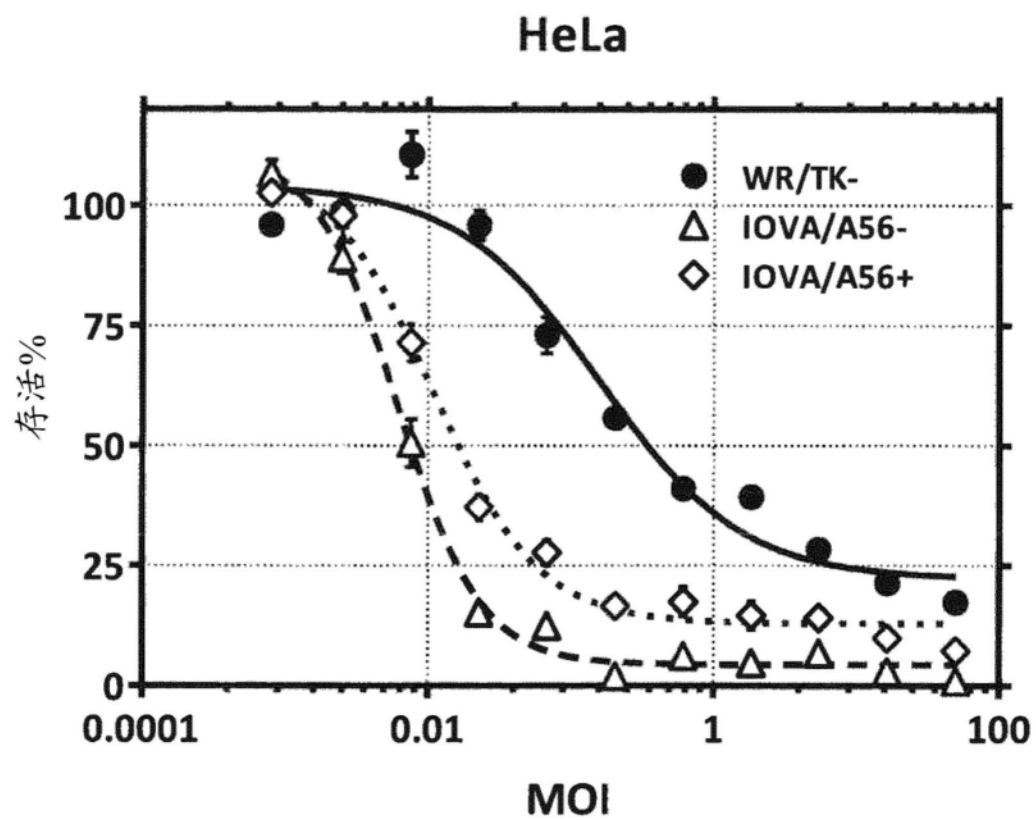


图3a

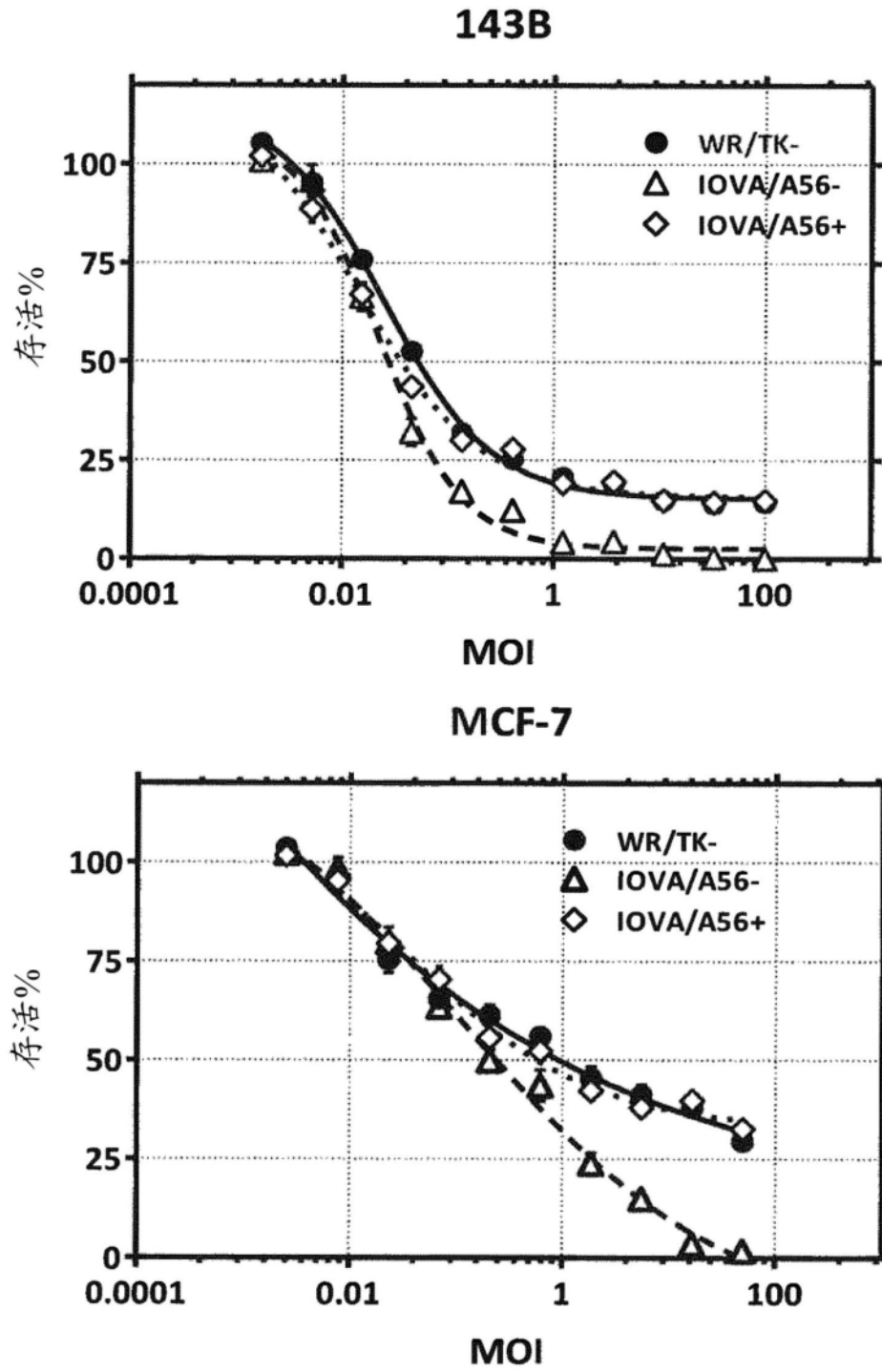


图3a续

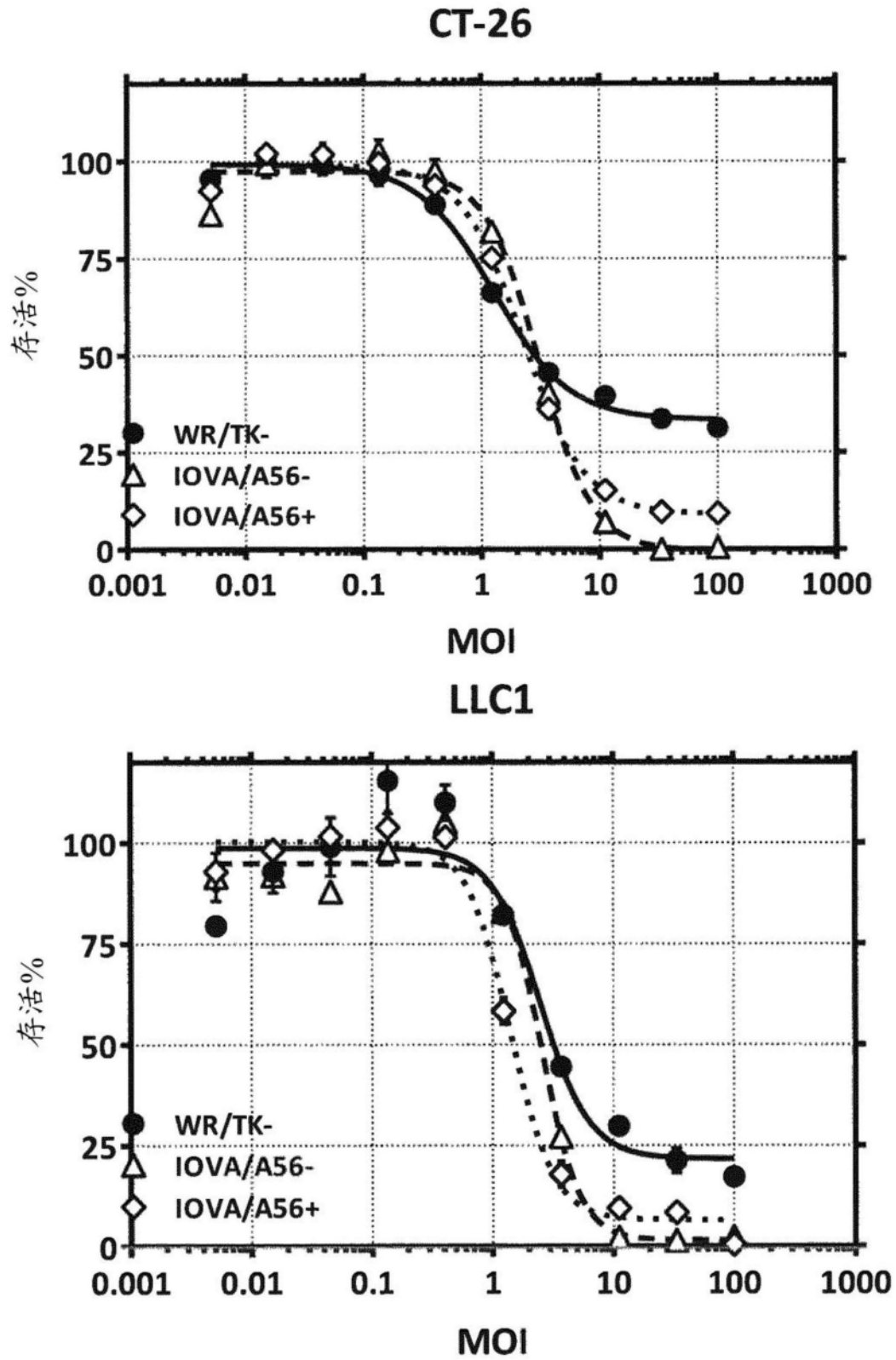


图3b

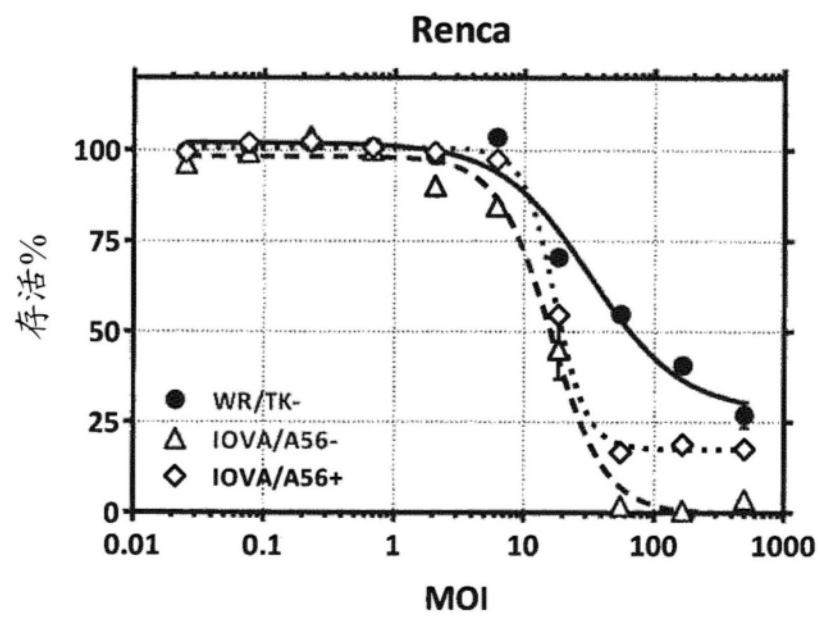


图3b续

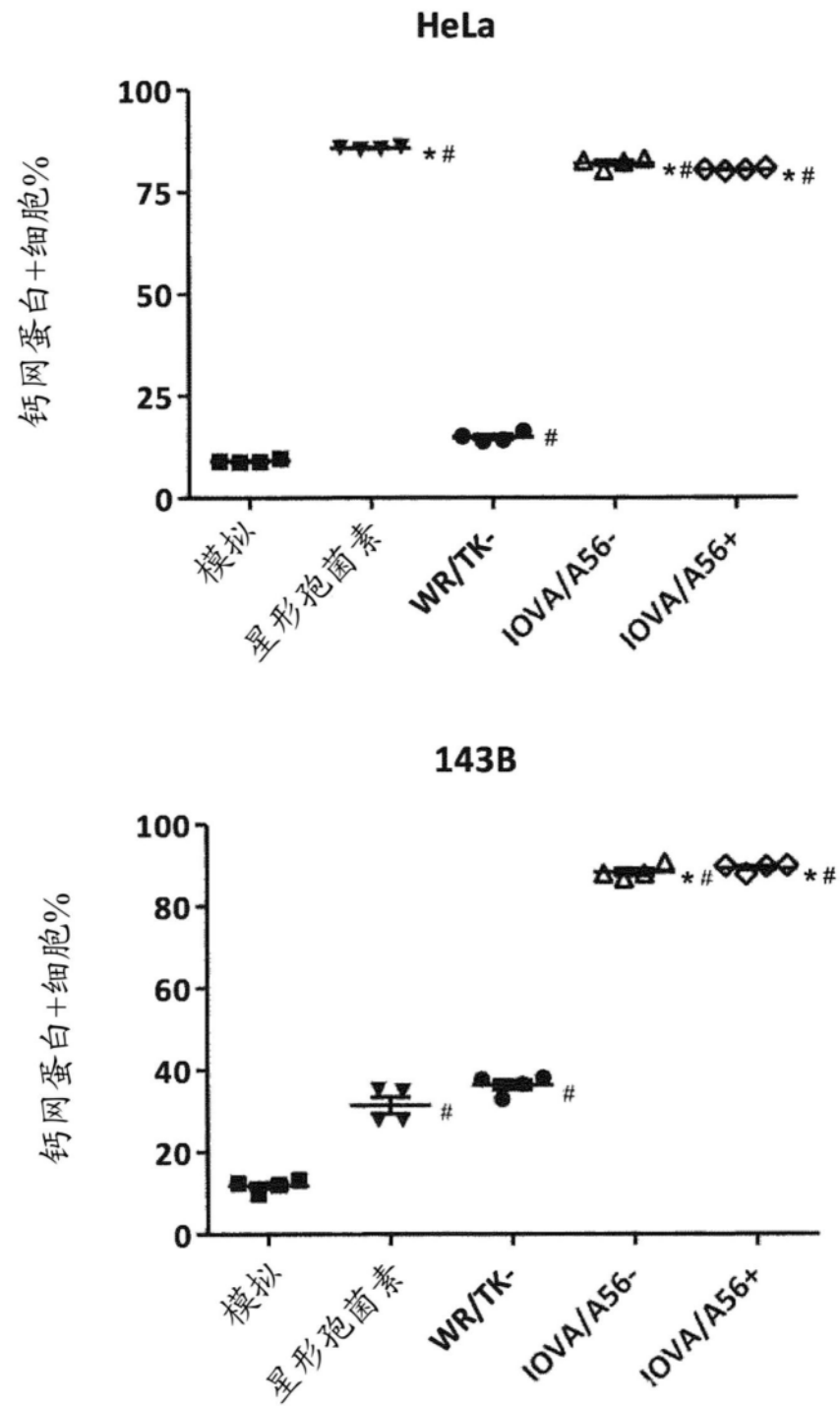


图4a

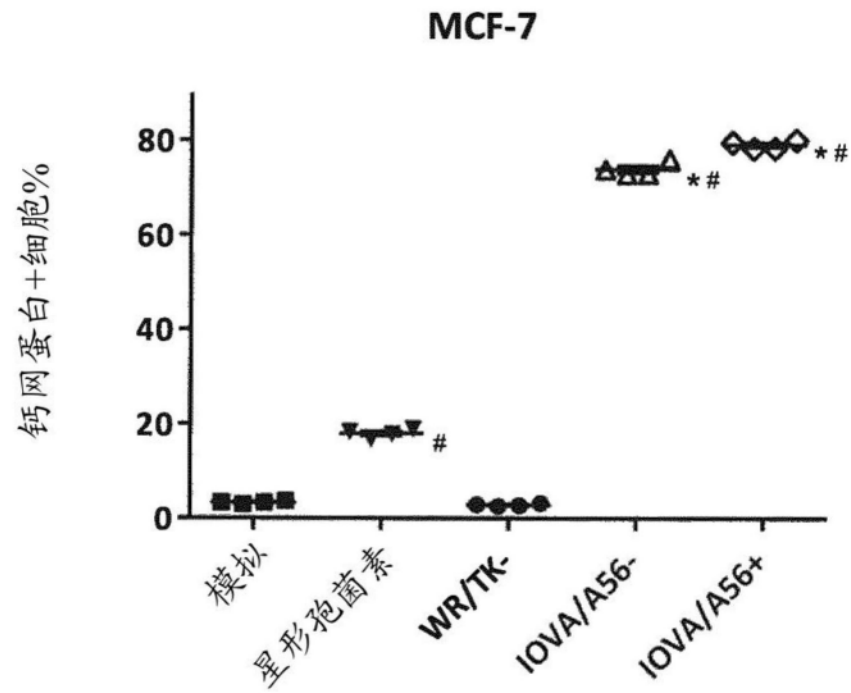


图4a续

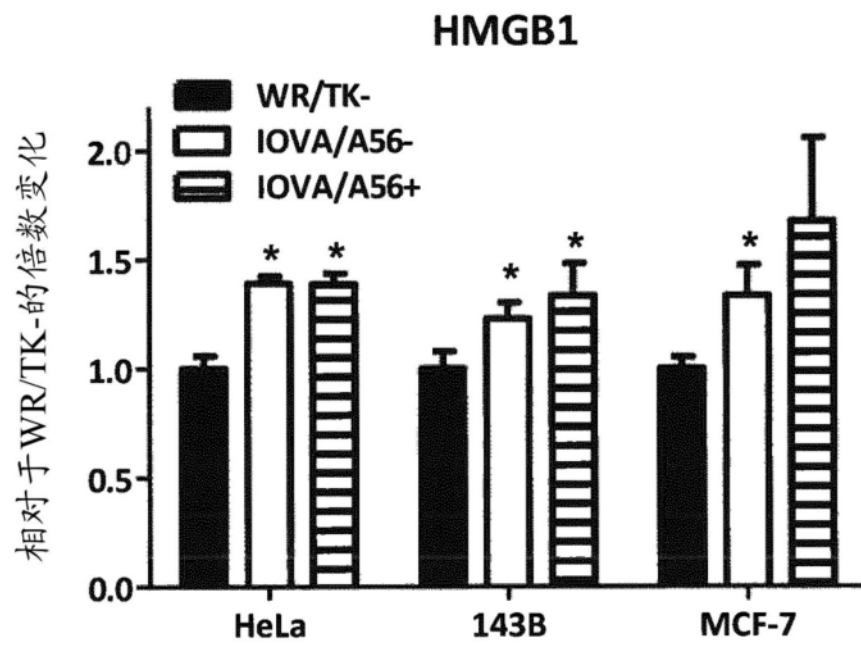


图4b

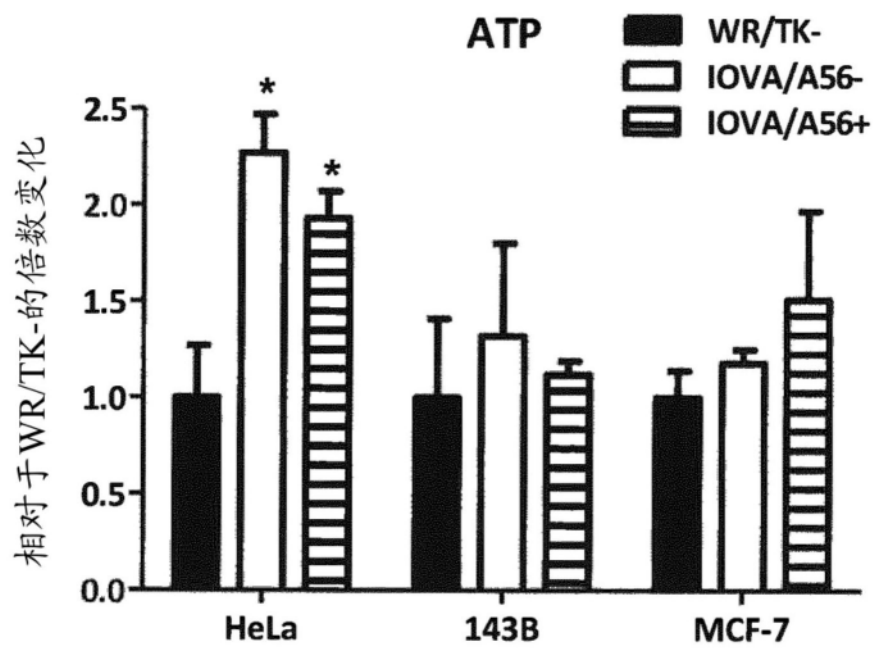


图4c

CTATTGTAGAAATTGTTTTTCACAGTTGCTCAAAAACGATGGCAGTGACTTATGAGTTTCATCTTT
AGTAAACATATCATAATATTCGATATTACTAGTTGACATATCGAACAAATTCCAAGTATTTGATTT
TGGATAATATTCGTATTTTGCATCTGCTATAATTAAGATATAATCACCGCAAGAACACACGAACAT
CTTTCCTACATGGTTAAAGTACATGTACAATTCTATCCATTTGTCTTCCTTAAGTATATATTTGTA
TAGATAATTACGAGTCTCGTGAGTAATTCCAGTAATTACATAGATGTCGCCGTCGTACTCTACAGC
ATAAACTATACTATGATGTCTAGGCATGGGAGACTTTTTTATCCAACGATTTTGTAGTGAAACATTC
CACATCGTTTAATACTACATATTTTTCATACGTGGTATAAACTCCACCCATTACATATATATCATC
GTTTACGAATACCGACGCGCCTGAATATCTAGGAGTAATTAAGTTTGGAAGTCTTATCCATTTCTGA
AGTGCCGTGTTTCAAAATTTCTGCCACACCCGTTGAAATAGAAAATTCTAATCCTCCTATTACATA
TAACTTTCCATCGTTAACACAAGTACTAATTTCTGATTTTAAACGACGACATATTAGTAACCGTTT
CCATTTTTCGTTTCAAGATCTACCCGCGATACGGAATAAACATGTCTATTGTTAATCATGCCGCC
AATAATGTATAGACAAATTATGTAAACATTTGCATTATAGAATTGTCTATCTGTATTACCGACTAT
CGTCCAATATTTCTGTTCTAGGAGAGTAATGGGTTATTGTGGATATATAATCAGAGTTTAAATGAC
TACTATATTATGTTTTATACCATTTCTGTCTACTGGCTTTGTAGATTTGGATATAGTTAATCCCAA
CAATGATATAGCATTGCGCATAGTATTAGTCATAAACTTGGGATGTAAAATGTTGATGATATCTAC
ATCGTTTGGATTTTTATGTATCCACTTTAATAATATCATAGCTGTAACATCCTCATGATTTACGTT
AACGTTCTCGTGGGATAAGATAGTTGTGAGTTTCTCCTTTGATAATTTTCCAAATTTCTGGATCGGA
TGTCACCGCAGTAATATGTTGATTATTTCTGACATCGACGCATTATATAGTTTTTAAATCCATA
TCTTTTAGAAAAGTTAAACATCCTTATACAATTTGTGGAATTAATATTATGAATCATAGTTTTTAC
ACATAGATCTACTACAGGCGGAACATCAATTATTATGGCAGCAACTAGTATCATTTCTACATTTGTT
TATGGTGATGTTTATCTTCTTCCAGCGCATATAGTCTAATAGCGATTCAAACGCGTGATAGTTTAT
ACCATTTCAATATAATCGCTTCATCCTTTAGATGGTGATCCTGAATGCGTTTAAAAAATTTATACGG
AGACGCCGTAATAATTTCTTATTCACTTGTATAATTTCCCATTTGATAGAAAATATCACGCTTTC
CATTTCTGAAGTACTATAAGTAATTATAGTATAATGTAAAGGTTTATATATTCAATATTTTTTATA
AAAAATCATTTTCGACATTAATTCCTTTTTAAATTTCCGTCTATCATCTATAGAAACATATTCAT
GAATTTATAAAATGCTTTTACGTGTCTATCGTAGGCGATAGAACCGCTAAAAAGCCTATCGAATT
TCTACAAAAGAATCTGTTATATGGTATAGGAGAGTATAAAACATTAAATGTCCGTACTTATTTAA
GTATTCAGTAGCCAATCCTAATCTTTTTCGAATACTTATTAATGGCTCTTGTCTGTACGAATCTAT
TTTTTTGAACAATGGACCTAGTGGTATATCTTGTCTATGTATCTAAAAAATGTCTGACTAGATC
CGTTAGTTTAAATATCCGCAGTCATCTTGTCTAGAATGGCAAATCTAACTGCGGGTTTAGGCTTTAG
TTTAGTTTCTATATCTACATCTATGTCTTTATCTAACACCAAAAAATATAATAGCTAATATTTTATT
ACAATCATCCGATATTTCTTCTACGATCTCACTAATAATGTTTCTTTGGTTTACTAGTATAGTC
ACGATCAGACAAATAAAGAAAATCAGATGATCGATGAATAATACATTTAAATTCATCATCTGTAAG
ATTTTTGAGATGTCTCATTAATAATATTATTAGGGTCAGTACTCATTATCATTTAGGCAGCTATTACT
TATTTTATTATTTTTTACCATATAGATCAATCATTAGATCATCAAAATATGTTTCAATCATCCAAG
AGTATGGTGAATGACTCTTCCCATCTAATTTCTGAACGTTTACCAATGTCTCTAGCCACTTTGGCA
CTAATAGCGATCATTCGCTTAGCGTCTTCTATATTATTAAGTGGTTGATTCAATCTATCTAGCAAT
GGACCGTCGGACAGCGTCATTCTCATGTTCTTAATCAATGTACATACATCGCCGTCATCTACCAAT
TCATCCAACAACATAAGCTTTTTTAAATCATCATTATAATAGGTTTGATCGTTGTCTATTTCTCCAA

SEQID No.: 1

图5a

AGAATATATCTAATAAGTAGAGTCCTCATGATTAGTTAACAACATATTTTTATGTTAAATCAATTAGTACA
CCGCTATGTTTAATACTTATTCATATTTTAGTTTTAGGATTGAGAATCAATACAAAAATTAATGCATCAT
TAATTTTAGAAATACTTAGTTTCCACGTAGTCAATGAAACATTTGAACTCATCGTACAGGACGTTCTCGTA
CAGGACGTAACATAAAACCGGTTTATATTTGTTCAAGATAGATACAAATCCGATAACTTTTTTACGAATT
CTACGGGATCCACTTTAAAAGTGTACATACCGGGTCTTTTTATTTTTTAAACAGATTAATGGTGTGATGT
TGATTAGGTCTTTTACGAATTTGATATAGAATAGCGTTTACATATTCTCCATAATGGTCAATCGCCATTTG
TTCGTATGTCATAAATCTTTAATTATATGACACTGTGTATTATTTAGTTCATCCTTGTTTCATCATTAGGA
ATCTATCCAATATGGCAATTATACTAGAACTATAGGTGCGTTGTATACACATATTGATGTGTCTGTTTATA
CAATCCATGCTACTACCTTCGGGTAAAATTGTAGCATCATATACCATTCTAGTACTTTAGGTTCATTGTT
ATCCATTGCAGAGGACGTCAT

SEQID No.: 1 续

图5a续

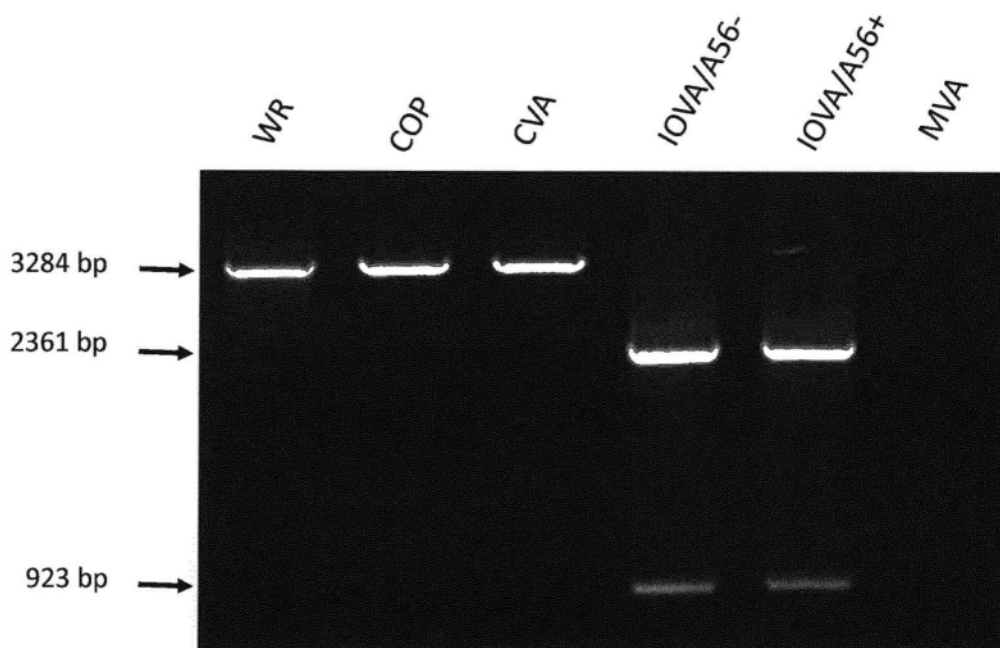


图5b

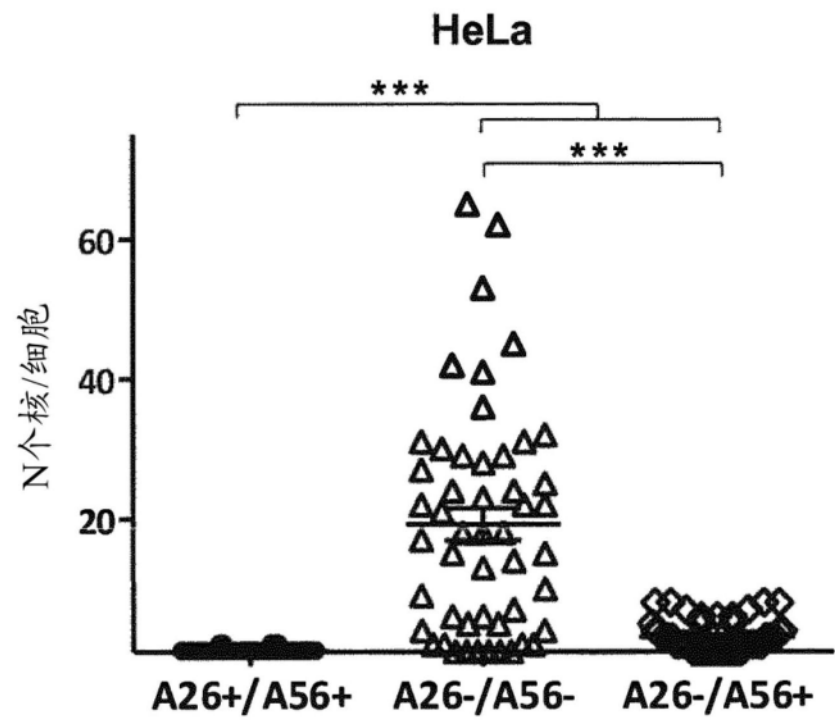


图6

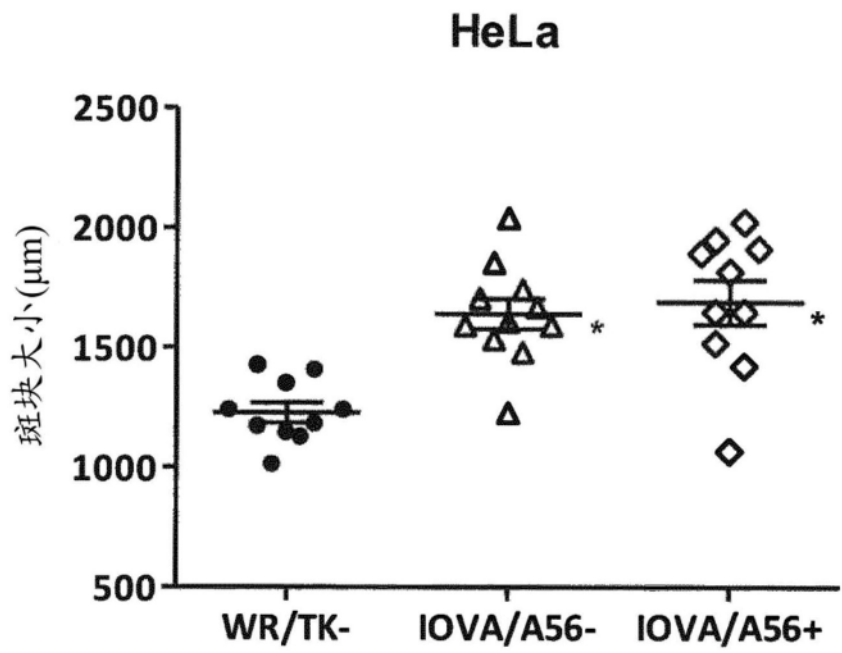


图7a

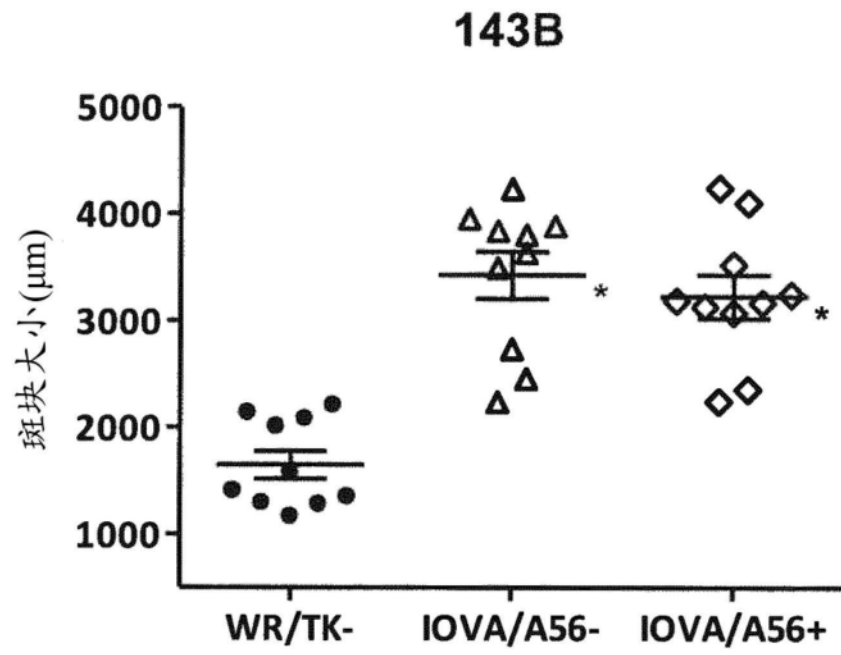


图7b

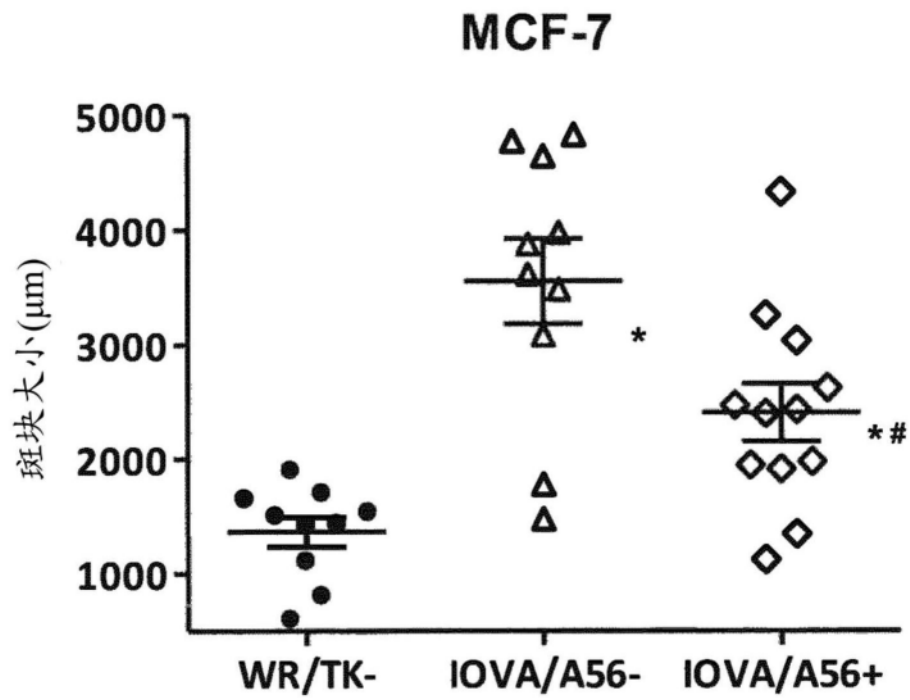


图7c