



(10) 授权公告号 CN 111658670 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 01

(21) 申请号 202010731917.4

A61K 35/17 (2015.01)

(22) 申请日 2014.04.16

A61K 38/19 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00 (2006.01)

申请公布号 CN 111658670 A

A61P 35/02 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.09.15

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

20135387 2013.04.18 FI

CN 102264760 A, 2011.11.30

WO 2007068772 A1, 2007.06.21

(62) 分案原申请数据

CN 118055776 A, 2024.05.17

201480034158.9 2014.04.16

Xueling Fan et al.. "Human Dendritic

(73) 专利权人 蒂尔坦生物制药有限公司

Cells Engineered to Secrete Interleukin-18 Activate MAGE-A3-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in vitro". 《IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS》. 2012, 第41卷 (第5期), 摘要.

地址 芬兰赫尔辛基

Hollie J. Pegram et al.. "Tumor-

(72) 发明人 阿克塞·赫敏基

马库斯·瓦哈-科斯凯拉

瑟瑞·塔提宁 文森佐·赛鲁罗

targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning". 《Blood》. 2012, 第1-30页.

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理有限公司 51258

专利代理师 王晖 黄湘晨

审查员 唐雪珂

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书26页

序列表 (电子公布) 附图33页

(54) 发明名称

(Ad3) 的溶瘤腺病毒载体的药物组合物。

溶瘤腺病毒载体与过继T细胞治疗组合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及溶瘤腺病毒载体与过继T细胞治疗组合物及其用途。更具体地, 本发明涉及过继T细胞治疗组合物和编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体在制备用于治疗受试者中癌症的药物中的用途。本发明还涉及溶瘤腺病毒载体在制备用于提高受试者的肿瘤中分开的过继T细胞疗法或T细胞疗法的疗效的药物中的用途。本发明进一步涉及包含过继T细胞治疗组合物和编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体的药物试剂盒。本发明进一步涉及一种血清3型 (Ad3) 的溶瘤腺病毒载体及其在制备用于治疗受试者中癌症的药物中的用途, 以及包含所述血清3型

1. 过继T细胞治疗组合物和溶瘤腺病毒载体在制备用于治疗受试者中肺癌、前列腺癌或卵巢癌的药物中的用途,其中,所述过继T细胞治疗组合物和所述溶瘤腺病毒载体向受试者被分开施用,其中所述溶瘤腺病毒载体为腺病毒血清3型(Ad3)载体,所述腺病毒血清3型(Ad3)载体包含:

用于E1A的肿瘤特异性表达的hTERT启动子;

由E3单元的E3 9kDa、E3 10.2kDa、E3 15.2kDa和E3 15.3kDa区组成的缺失;以及

所述E3的缺失区处的用于CD40L细胞因子转基因表达的CMV或E2F启动子和CD40L细胞因子转基因。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述受试者是人或动物。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中,过继T细胞治疗组合物和所述溶瘤腺病毒载体对受试者的给药是同时或以任何顺序依次进行的。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中,在过继T细胞治疗组合物和所述溶瘤腺病毒载体的依次给药之间,有一分钟到四周的时间段,和/或对所述过继T细胞治疗组合物和所述溶瘤腺病毒载体分几次给药。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述过继T细胞治疗组合物和/或所述溶瘤腺病毒载体的给药通过瘤内、动脉内、静脉内、囊内或腔内注射或者口服给药来进行。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述过继T细胞治疗组合物和/或所述溶瘤腺病毒载体的给药通过胸膜内或腹腔注射进行。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述溶瘤腺病毒载体编码两种或更多种细胞因子。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中,所述溶瘤腺病毒载体编码选自由以下组成的细胞因子组中的任何进一步的细胞因子转基因:干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、补体C5a、GM-CSF、IL-2、TNF α 、IL12、IL-23、IL15、IL17、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7和XCL2。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中,所述溶瘤腺病毒载体包含内部核糖体进入位点(IRES)。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中,所述腺病毒载体包含在两种转基因之间的核糖体分流位点2A。

11. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述溶瘤腺病毒载体以 1×10^{10} - 1×10^{14} 个病毒颗粒的量给药。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中,所述过继T细胞治疗组合物和所述溶瘤腺病毒载体同时或以任何顺序依次对受试者给药。

13. 根据权利要求1的用途,其中同时或依次的放疗、单克隆抗体、化疗或其他抗癌药物或干预被施用给受试者。

14. 一种药物试剂盒,包含过继T细胞治疗组合物和溶瘤腺病毒载体,其中,所述过继T

细胞治疗组合物被配制在第一剂型中,并且所述溶瘤腺病毒载体被配制在第二剂型中,其中所述溶瘤腺病毒载体为腺病毒血清3型(Ad3)载体,所述腺病毒血清3型(Ad3)载体包含:用于E1A的肿瘤特异性表达的hTERT启动子,由E3单元的E3 9-kDa、E3 10.2kDa、E3 15.2kDa和E315.3kDa区组成的缺失,以及E3的缺失区处的用于CD40L细胞因子转基因表达的CMV或E2F启动子和CD40L细胞因子的转基因。

15.根据权利要求14所述的药物试剂盒,其中,所述第一剂型和所述第二剂型用于对受试者同时或以任意顺序依次给药。

16.一种溶瘤腺病毒载体,其中所述溶瘤腺病毒载体为腺病毒血清3型(Ad3)载体,所述腺病毒血清3型(Ad3)载体包含:用于E1A的肿瘤特异性表达的hTERT启动子,由E3单元的E39-kDa、E3 10.2kDa、E3 15.2kDa和E3 15.3kDa区组成的缺失和E3的缺失区处的用于CD40L细胞因子转基因的表达的CMV或E2F启动子和CD40L细胞因子的转基因。

17.根据权利要求16所述的溶瘤腺病毒载体,其中,所述溶瘤腺病毒载体编码两种或更多种细胞因子。

18.根据权利要求17所述的溶瘤腺病毒载体,其中,所述溶瘤腺病毒载体包含内部核糖体进入位点(IRES)。

19.根据权利要求18所述的溶瘤腺病毒载体,其中,所述溶瘤腺病毒载体包含在两种转基因之间的核糖体分流位点2A。

20.一种药物组合物,包含根据权利要求16-19中任一项所述的溶瘤腺病毒载体。

21.根据权利要求16-19中任一项所述的溶瘤腺病毒载体在制备用于治疗受试者中肺癌、前列腺癌或卵巢癌的药物中的用途,其中,所述溶瘤腺病毒载体被施用给有需要的受试者。

22.根据权利要求21所述的用途,其中,同时或依次的放疗、单克隆抗体、化疗或其他抗癌药物或干预被施用给受试者。

溶瘤腺病毒载体与过继T细胞治疗组合物及其用途

[0001] 本申请是申请日为2014年4月16日,申请号为201480034158.9,发明名称为“增强过继细胞疗法”的中国发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及生命科学和医药领域。具体地,本发明涉及人类的癌症治疗。更具体地,本发明涉及单独使用的或与用于癌症的治疗用途和治疗方法的组合物一起使用的溶瘤腺病毒载体。在一个方面,本发明涉及过继细胞治疗组合物和溶瘤腺病毒载体的分开给药。此外,本发明涉及都利用溶瘤腺病毒载体的药物试剂盒和药物组合物。

背景技术

[0003] 对于癌症治疗,新的治疗方法是不断发展的。过继细胞疗法 (ACT) 是用于治疗癌症的有效方法,但也可用于治疗其他疾病,诸如感染和移植物抗宿主疾病。过继细胞转移是以转移移植物的免疫功能和特征为目标,将体外 (*ex vivo*) 生长的细胞 (最常见的是免疫源细胞) 被动转移到宿主中。过继细胞转移可以是自体的,如过继T细胞疗法中常见的,或者是同种异体的,如通常用于治疗感染或移植物抗宿主病的。临床上,这种方法的常见实施方案包括将免疫促进或致耐受性细胞如淋巴细胞转移至患者,以增强对病毒和癌症的免疫力,或者促进在自身免疫性疾病如I型糖尿病或类风湿性关节炎的设定中的容忍力。

[0004] 对于癌症治疗,ACT方法是在20世纪80年代由在美国工作的少数小组所构想的,领导小组之一是在NCI (美国国立癌症研究所) 工作的Steven Rosenberg和同事。自体肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 或遗传学上重新定向的外周血单核细胞的过继转移已经用于成功地治疗患有晚期实体瘤如黑色素瘤的患者以及患有表达CD19的恶性血液病的患者。在ACT中,最常用的细胞类型是T细胞,有时分类为CD8+,但其他变型包括CD4+细胞、NK-细胞、 δ - γ T细胞、调节性T细胞和外周血单核细胞。细胞可以是未修饰的,如在TIL疗法中的,或是基因修饰的 (modified)。有两种常用的方法来实现将T细胞对肿瘤特异性靶标的基因靶向。一种是具有已知特异性 (TCR疗法) 和具有匹配的人类白细胞抗原 (HLA,被认为是啮齿类动物中的主要组织相容性复合体) 类型的T细胞受体的转移。另一种是用人造分子 (诸如嵌合抗原受体 (CAR)) 的细胞修饰。这种方法不依赖于HLA且相对于靶向分子更灵活。例如,可以使用单链抗体,且CAR还可以结合共刺激域。然而,CAR细胞的靶标需要在靶细胞的膜上,而TCR修饰可以利用细胞内靶标。

[0005] 对于ACT发展的第一个十年,重点关注的是TIL。TIL被发现于肿瘤中,表明肿瘤触发了宿主中的免疫应答。这种所谓的肿瘤免疫原性由肿瘤抗原介导。这些抗原将肿瘤与健康细胞区分开,从而提供免疫学刺激。

[0006] 例如,US2003194804A1描述了一种通过利用TIL来增强T细胞对肿瘤细胞的反应性的方法。在US2003194804A1中,将T细胞暴露于试剂,并重新引入到患者体内。该试剂能够降低或防止在T细胞中内源性Notch或Notch配体的表达或相互作用。

[0007] US5126132A描述了一种治疗癌症的方法,其中,使用有效量的自体TIL和细胞因

子。

[0008] Diaz RM等人(Cancer Res.2007Mar 15;67(6):2840-8(癌症研究2007年3月15日;67(6):2840-8))描述了通过使用过继T细胞转移疗法结合疱疹性口腔炎病毒的瘤内病毒疗法来提高肿瘤抗原特异性T细胞的循环水平。Diaz等人在过继T细胞转移疗法中使用OT1细胞,即人工单克隆细胞系。

[0009] 虽然即使在ACT的早期试验中,也有治疗效果突出,甚至治愈的例子,但多数患者没有受益,并且许多患者出现了严重的副作用。在过继细胞疗法的第一个二十年期间,细胞转移本身的安全性一般是好的,但显著的毒性甚至死亡率与用于增强治疗的联合治疗(包括预处理化疗和放疗)和转移后使用的IL-2相关。预处理用于杀死宿主中的抑制细胞如调节性T细胞和骨髓衍生的抑制剂,以调节肿瘤微环境和为移植物“让出空间”。转移后使用IL2以减少移植物的无能(anergy)并使之繁殖。

[0010] 关于功效,留下了改进空间。一般而言,保证了细胞疗法的提高的特异性和足够的肿瘤杀伤能力。具体而言,在现有技术的ACT中,转移细胞无法运输至肿瘤,且即使它们行进至肿瘤,它们也往往很快变成无能的,或者不能杀死肿瘤细胞或无法繁殖,导致细胞数量快速下降。此外,癌症经常下调肿瘤细胞中的人类白细胞抗原(HLA)-被认为是动物中的主要组织相容性复合体,因而导致T细胞不能杀死,因为需要HLA来向T细胞受体呈现肿瘤表位。

[0011] 本发明提供了利用过继细胞转移进行癌症治疗的有效工具和方法。

发明内容

[0012] 本发明的一个目的是提供克服低效率、不安全且不可预测的癌症疗法的上述问题的简单方法和工具。更具体地,本发明提供用于细胞疗法的新颖方法和手段。本发明的目的通过其特征在本发明中所声明的病毒载体、方法和布置(arrangement)实现。

[0013] 本申请描述了重组病毒载体的构建、与病毒载体有关的方法以及它们在肿瘤细胞系、动物模型和癌症患者中的用途。

[0014] 本发明是基于以新颖和创造性的方式将编码细胞因子的溶瘤腺病毒载体或腺病毒载体与过继细胞疗法结合用于癌症治疗的想法。本发明是基于令人惊喜的效果,即,过继T细胞疗法中的以下改进:i)到肿瘤的转移细胞的聚集(recruitment);ii)肿瘤处转移细胞的繁殖;iii)肿瘤处转移细胞的增强的反应性(图20)。实际上,病毒载体和细胞因子与过继细胞疗法的所述结合提供了对比可能被假定的更宽的靶标的更有效的结果。与单独的包含细胞因子转基因的病毒载体或单独的过继细胞转移的效果相比,包含细胞因子转基因的病毒载体与过继细胞转移的所述结合的效果是协同性的。

[0015] 本发明的另一个目的是提供用于人体中恶性肿瘤的治疗的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和转基因(由病毒递送的转基因产生的)白细胞介素-2(IL-2)的结合。本发明的上述和各种其他目的和优点通过一种治疗人体中恶性肿瘤的方法来实现,该方法包括:在有或没有预处理化疗和/或放疗的情况下,对患有癌症的患者施用有效量的TIL和IL-2,以引起癌症的消退或稳定。

[0016] 本发明涉及治疗受试者中癌症的方法,其中该方法包括对受试者分开施用过继细胞治疗组合物和编码至少一种细胞因子的溶瘤(=肿瘤而不是正常细胞中的复制能力)腺病毒载体。

[0017] 本发明还涉及用于癌症治疗的编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体以及分开的过继细胞治疗组合物。

[0018] 本发明还涉及编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体以及分开的过继细胞治疗组合物在制备用于治疗受试者中癌症的药物中的用途。

[0019] 本发明还涉及用于提高受试者中过继细胞疗法或T细胞疗法的功效的溶瘤腺病毒载体。

[0020] 而且,本发明涉及溶瘤腺病毒载体在制备用于提高受试者中T细胞疗法的疗效的药物中的用途。

[0021] 而且,本发明涉及通过对有需要的受试者施用溶瘤腺病毒载体来提高受试者中过继细胞疗法或T细胞疗法的功效的方法。

[0022] 本发明还涉及药物试剂盒,其包含过继细胞治疗组合物和编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体,其中过继细胞治疗组合物被配制在第一剂型(formulation)中,和编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体被配制在第二剂型中。

[0023] 此外,本发明涉及一种溶瘤腺病毒载体,其包含:

[0024] 1) 包含5/3嵌合纤突结(chimeric fiber knob)的血清5型腺病毒(Ad5)核酸骨架;

[0025] 2) 用于E1A的肿瘤特异性表达的E2F1启动子;

[0026] 3) 腺病毒E1的Rb结合恒定区2中的24bp缺失(D24);

[0027] 4) 病毒gp19k和6.7k阅读框的核酸序列缺失;以及

[0028] 5) E3区中的缺失的gp19k/6.7K处的导致病毒E3启动子下转基因表达的复制相关控制的编码至少一种细胞因子转基因的核酸序列,其中该细胞因子选自:干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、补体C5a、IL-2、TNF(肿瘤坏死因子) α 、CD40L、IL12、IL-23、IL15、IL17、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5(=RANTES)、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7和XCL2。

[0029] 此外,本发明涉及一种血清3型(Ad3)溶瘤腺病毒载体,其包含:E3区中的缺失和E3的缺失区处的用于转基因的表达的肿瘤特异性启动子。

[0030] 进而,本发明涉及一种药物组合物,其包含本发明的溶瘤载体。

[0031] 而且,本发明涉及一种治疗受试者中癌症的方法,其中该方法包括对有需要的受试者施用本发明的溶瘤腺病毒载体。而且,本发明涉及用于癌症治疗的本发明的溶瘤腺病毒载体。

[0032] 而且,本发明涉及本发明的溶瘤腺病毒载体在制备用于治疗受试者中癌症的药物中的用途。

[0033] 本发明布置的优点是治疗效果增强和副作用降低。预防了严重不良事件,甚至死亡,因为疗效的增强和我们的方法的抗抑制效果可降低对现有技术方法中用于为转移细胞“让出空间”和减少肿瘤免疫抑制的预处理化疗和/或辐射的需要。而且,预防了严重不良事件,甚至死亡,因为如果在肿瘤中复制时病毒产生IL2,则不需要分开加入现有技术方法中

用于在将细胞转移进患者之后繁殖和维持转移细胞的IL2。肿瘤处的局部产生也可以增强IL-2的受追捧效果(sought-after effects)(移植的刺激和繁殖),同时减少导致不良事件的全身性暴露。本发明提供了选择性治疗,对健康组织的毒性或损伤更小。

[0034] 而且,本发明通过以下提供了令人惊喜的治疗效果:i)例如通过将包含重组细胞因子的病毒载体注射进肿瘤中来向肿瘤提供运输(trafficking)信号。病毒注射导致产生与这种效果(对与病原体相关分子模式识别受体结合的病毒的反应)相关的细胞因子,但是通过额外产生最相关的细胞因子作为来自病毒的转基因可以实现好得多的效果。ii)通过增加危险信号减少了耐受性。病毒注射本身可以通过与病原体相关分子模式识别受体结合实现这一点,但效果可以通过额外产生细胞因子作为来自病毒的转基因来增强。iii)诱导HLA表达。病毒感染增加了HLA表达,因为细胞试图呈现用于安装抗病毒T细胞应答的病毒表位。出乎意料的是,这可以用来增强需要HLA起作用的针对肿瘤抗原表位的T细胞疗法。病毒对HLA的效果部分地由细胞因子介导;在本发明的一个令人惊喜的实施方案中,所述由病毒产生细胞因子可以因此也在附近的肿瘤细胞中诱导HLA表达。iv)通过解除由病毒本身的存在(再次通过病原体相关分子模式识别受体)介导的但通过产生细胞因子增强的免疫抑制来诱导细胞的繁殖(图48)。因此,这种方法可以解决目前阻碍自适应细胞疗法的关键障碍。

附图说明

[0035] 下面将借助于具体实施方案并参照附图更详细地描述本发明,附图中:

[0036] 图1示出用Ad5/3嵌合溶瘤腺病毒处理增加了B16-OVA肿瘤中的细胞因子和趋化因子分泌。干扰素 γ 可以上调HLA(=MHC)I类的表达,从而生成可以由TIL有效地识别的肿瘤细胞表型。可促进TIL活化和增殖的免疫细胞聚集中涉及各种IFN- γ 诱导趋化因子(如RANTES、MIP-1 α 和MCP-1)。而且,TIL的运输可以通过这些趋化因子的上调而得到增强。

[0037] 图2示出了在有或没有过继细胞转移情况下多次注射5/3嵌合溶瘤腺病毒后的肿瘤生长控制。相较于PBS治疗,单独使用腺病毒处理(A)对B16-OVA肿瘤生长的影响很小。500000(B)或2000000(C)个肿瘤特异性OT-I淋巴细胞的过继转移与病毒注射联用导致显著的肿瘤生长控制。单独使用腺病毒或OT-I细胞与PBS联用对肿瘤生长的较差治疗效果突出了用作单一试剂的溶瘤腺病毒和过继细胞转移疗法的主要缺点,支持本发明的目的,以使用腺病毒增强过继细胞疗法的功效。

[0038] 图3示出腺病毒注射诱导T细胞运输进肿瘤和增加肿瘤中过继转移T细胞的增殖。A)在治疗后第1天引流Ad治疗小鼠的淋巴结和脾,据称由于淋巴细胞运输,过继转移CD8+CFSE+细胞的量在肿瘤中增加和在血液中减少。在整个实验中,整体CD8+T细胞计数在腺病毒处理的肿瘤中保持很高,表明这些细胞对有害肿瘤微环境的抗性和/或增加的CD8+T细胞增殖。B)相较于PBS组,在第6和14天,在Ad治疗的肿瘤中OT-I细胞增殖增强,被视为已经经过细胞分裂的细胞(移向M7)比PBS组中的细胞占据更大的比例。因此,用溶瘤腺病毒处理诱导了过继转移TIL的运输和增殖。C)关于如何进行CFSE阳性细胞的设门(gating)的实例已完成。M0表示还没有分裂的细胞,M7表示已分裂的足以将CFSE稀释到可检测极限以下(7倍以上)的细胞。

[0039] 图4揭示了在箭头指示的天数来自用溶瘤腺病毒治疗的人的数据。病毒注射到肿瘤中导致血液中的淋巴细胞减少,反映了它们到肿瘤的运输。

[0040] 图5揭示了溶瘤腺病毒注射到人癌症患者的肿瘤中引起CD8+T细胞的流通(influx)的数据。溶瘤腺病毒的瘤内注射引起肿瘤处CD8+T细胞的积聚,其在学习前和治后由针活检评估。

[0041] 图6示出了与T细胞的过继转移联用的腺病毒注射的结果。用 5×10^5 OT1淋巴细胞对患有皮下B16-0va肿瘤的小鼠进行腹腔内(intraperitoneally)过继转移并且不处理肿瘤,或者用PBS或Ad5/3注射(参见实施例材料和方法)。在类似于人黑色素瘤的免疫抑制B16-0va模型中,抗0va OT1细胞的过继转移很少。添加病毒注射显著提高了疗效(a)。CD8+T细胞增加(b)。这些细胞不是抗0va T细胞(c)。

[0042] 图7揭示了由于过继转移和病毒注射而使“天然”抗肿瘤T细胞的数量急剧增加。对患有皮下B16-0va肿瘤的小鼠腹腔内过继转移 5×10^5 OT1淋巴细胞并且不处理肿瘤,或者用PBS或Ad5/3注射(参见实施例材料和方法)。过继转移+病毒注射行为起到用于肿瘤和局部淋巴结处“其他”T细胞的繁殖的催化剂作用。(a)肿瘤部位处的Trp2 CD8+细胞。(b)肿瘤部位处的抗gp100 CD8+细胞。

[0043] 图8示出了第14天时肿瘤中的活化CD8+细胞和肿瘤中的TIM-3表达。对患有皮下B16-0va肿瘤的小鼠腹腔内过继转移 5×10^5 OT1淋巴细胞并且不处理肿瘤,或者用PBS或Ad5/3注射(参见实施例材料和方法)。免疫治疗中的免疫抑制:如果未解除免疫抑制,则T细胞数量的增加不足。在病毒处理的肿瘤中有更多的活化T细胞和较少的免疫抑制。

[0044] 图9示出了抗肿瘤T细胞的增加和免疫抑制的减少导致针对肿瘤抗原的全身免疫性。对患有皮下B16-0va肿瘤的小鼠腹腔内过继转移 5×10^5 OT1(a)或 2×10^6 (b) OT1淋巴细胞并且不处理肿瘤,或者用PBS或Ad5/3注射(参见实施例材料和方法)。通过病毒增强抗原递呈:T细胞工作更好。抵抗几种肿瘤抗原表位的全身免疫导致:(a)第14天时肿瘤中树突状细胞(CD11c+CD80+CD86+)上共刺激分子的表达;(b)第14天时具有脾细胞的IFN γ ELISPOT。

[0045] 图10示出了病毒注射后的OTI T细胞的分布:具有运输趋势,但不足以解释疗效。(a)图表,(b)动物模型,(c)肿瘤。

[0046] 图11揭示了解除免疫抑制可诱导细胞的繁殖。腺病毒处理的肿瘤含有更多的肿瘤特异性淋巴细胞(OT-I细胞)。在PBS处理的肿瘤中,OTI细胞已滞留在M5阶段(左箭头),而在Ad组中,它们继续增殖(右箭头)。

[0047] 图12示出了与OT1细胞联用的重组细胞因子(无病毒)的功效。

[0048] 图13示出了与过继T细胞转移联用的武装有细胞因子的腺病毒的抗肿瘤功效。在第1天,用富集有 1.5×10^6 CD8+的OT-1T细胞对承受皮下B16-OVA黑素瘤肿瘤的C57BL/6小鼠进行腹腔内治疗。在第1天及此后每周将细胞因子编码的腺病毒或对照病毒Ad5-Luc1进行瘤内注射(每个肿瘤 1×10^9 病毒颗粒)。按之前所描述的计算肿瘤体积(Bramante等, Serotype chimeric oncolytic adenovirus coding for GM-CSF for treatment of sarcoma in rodents and humans(编码用于治疗啮齿动物和人类中肉瘤的GM-CSF的血清型嵌合溶瘤腺病毒), Int J Cancer(国际癌症杂志), 2013年12月24日),且肿瘤大小被表示为相对于设定为100%的第1天的百分比。风险图中的数量:在给定时间点各实验组中剩余的动物的数量。当肿瘤已经超过最大可接受大小时,或者当疼痛或痛苦的任何迹象很明显时,将动物人道处死。

[0049] 图14示出了不同病毒对肿瘤大小的影响。

[0050] 图15示出了与OT1 T细胞联用的包含mTNF α 转基因的腺病毒载体对减小肿瘤大小的优异结果。

[0051] 图16示出了与OT1 T细胞联用的包含mIL3转基因的腺病毒载体对减小肿瘤大小的优异结果。

[0052] 图17示出了表达C5a或TNF- α 的溶瘤腺病毒的示意图。示出了病毒的一些重要特征,包括插入转基因的位点。

[0053] 图18示出了由A549细胞中溶瘤腺病毒进行的TNF- α 表达。用10VP/细胞感染细胞,在指定时间点收集培养基,并使用ELISA来评估培养基中TNF- α 的量。病毒诱导来自感染细胞的TNF- α 的表达和分泌。

[0054] 图19示出了由溶瘤TNF- α 武装的溶瘤腺病毒产生的TNF- α 的生物活性。在该试验中,使用来自感染细胞的上清液来挑战TNF敏感型WEHI-13VAR细胞,证实了溶瘤腺病毒促进功能细胞因子的表达。

[0055] 图20示出了通过溶瘤腺病毒对人类癌细胞的剂量依赖性杀伤。如所预期的,在TNF- α 不敏感型溶瘤允许的人类A549或PC3肿瘤细胞中,在非武装对照病毒与TNF- α 表达溶瘤腺病毒之间没有观察到差异,因为仅溶瘤就足以杀死细胞。然而,因为人类TNF- α 在小鼠细胞中是部分活性的,而这对人类腺病毒的溶瘤作用是不容许的,所以与非武装病毒相比,TNF- α 有助于B16-OVA小鼠细胞中所见的病毒的较强毒性。复制缺陷型病毒显示出可以忽略不计的细胞杀伤能力。

[0056] 图21示出放射治疗与TNF- α 表达病毒有协同作用。A) 该实验中的治疗方案(treatment schedule)的示意图。辐射(XRT)是剂量为 $2 \times 2\text{Gy}$ 的全身照射,且病毒为 $1 \times 10^8\text{VP/肿瘤}$,其中,每个裸小鼠携带两个A549异种移植物。B) TNF- α 病毒具有比非武装亲本病毒大的抗肿瘤能力。因为复制缺陷型(RD)病毒未杀死培养基中的A549细胞(图20),所以通过体内RD病毒提供的抗肿瘤效果可能是由于通过病毒注射引起的先天性免疫应答,包括细胞因子、NK细胞和巨噬细胞。C) 当与临床相关剂量的外照射(external beam irradiation)联用时,TNF- α 表达病毒引起更好的抗肿瘤效果,支持细胞因子武装病毒的临床可译性。重要的是,这些和以前的实验表明,TNF- α 表达溶瘤腺病毒能够复制并杀死细胞,认为TNF- α 未发挥针对腺病毒的抗病毒效果。

[0057] 图22示出了hTNF- α 编码腺病毒对B16-OVA肿瘤的抗肿瘤疗效。该实验类似于在图26中描述的用C5a病毒的实验,表明与非武装病毒相比,TNF- α 表达赋予更大的治疗优势。

[0058] 图23示出了用细胞因子武装病毒(II)处理的肿瘤中的肿瘤特异性CD8⁺T细胞的增强的诱导/扩增。图20中所描绘的实验中的肿瘤被切除并处理以用于流式细胞检测分析,类似于实验11。与非武装对照病毒相比,在用TNF编码病毒处理的肿瘤中检测到OVA特异性CD8⁺T细胞的更大的诱导/数量,与C5a数据一起表明,也通过对过继转移T细胞的图2B、C的推断和比较表明,合理选择的由溶瘤腺病毒表达的细胞因子与病毒诱导的炎症一起形成有力支持肿瘤特异性T细胞的扩增和活化的独特的肿瘤环境。

[0059] 图24示出了A549细胞中C5a的表达。用10VP/细胞感染细胞,在指定时间点收集培养基,并使用ELISA来评估培养基中的C5a的量。示出了两个独立实验的结果。

[0060] 图25示出了体外趋化性试验的结果。按照制造商的说明书(Millipore公司QCM试剂盒)将测试上清液中的趋化因子所吸引的穿过半透膜进入下腔室的THP1人类单核细胞的

量定量。C5a表达病毒引起比对照病毒强的来自感染细胞的趋化因子。结果认为倾向于使用细胞因子武装病毒,而不是非武装病毒。

[0061] 图26示出了体内AdD24-C5a的抗肿瘤疗效。在第0天、第2天和第4天用 1×10^9 VP的各病毒或用50u1 PBS注射所建皮下肿瘤,并通过卡尺(caliper)测量肿瘤体积。与对照病毒相比,C5a表达病毒提供卓越的肿瘤控制。由于腺病毒不在小鼠细胞中复制或未杀死小鼠细胞,即,其在该模型中是非细胞溶解性的(Young AM等.Mol Ther.2012Sep;20(9):1676-88, PMID:22735379(杨等,分子疗法,2012年9月;20(9):1676-88, PMID:22735379)),这些结果强调了细胞因子武装病毒的鲁棒能力以增强免疫抗肿瘤效果,强烈地支持利用它来提高过继细胞疗法的疗效的概念。

[0062] 图27示出了用细胞因子武装病毒(I)处理的肿瘤中的肿瘤特异性CD8+T细胞的增强的诱导/扩增。图26中所描绘的实验中的肿瘤被切除并处理以用于流式细胞检测分析。用针对CD8的抗体且用针对抗Ova TCR的五聚体对单细胞悬浮液着色。与对照病毒、非武装腺病毒或病毒表达C5a拮抗剂相比,通过非细胞溶解性腺病毒的C5a表达诱导肿瘤中更多的OVA特异性CD8 T细胞数量,支持使用细胞因子武装病毒来增加肿瘤中的过继转移T细胞的数量。同样参见实验13。

[0063] 图28示出了自适应T细胞应答的示意图。

[0064] 图29示出了自适应转移T细胞作为用于预先存在的T细胞的催化剂(“火花(spark)”)。

[0065] 图30示出自适应“火花”导致“天然”抗肿瘤T细胞增加。

[0066] 图31示出了过继细胞转移的方法。

[0067] 图32示出了,利用本发明的TILT技术,可以避免有毒预处理(化疗+辐射)和后处理(全身IL2)。(对于TILT技术的机制,参见图48)

[0068] 图33示出了表达单一细胞因子的新病毒构建体的示意图。病毒骨架是人血清5型腺病毒,除了来自血清3型的纤突结之外。单和双转基因都在病毒E3启动子的转录控制下。两种转基因被放置到对于gp19k和6.7k缺失的E3区中。对于24种氨基酸(“D24”),恒定区2中的E1A蛋白缺失,使得Rb结合有缺陷。E1A表达在E2F启动子的调控下。示出一些病毒基因区以供参考。

[0069] 图34示出了表达两种细胞因子的新病毒构建体的示意图。在一个版本中,设置“核糖体分流位点”/“核糖体跳跃位点”/“顺式作用水解酶元件”(CHYSEL)作为每个细胞因子之间的框内融合。细胞因子插件(insert)将被合成为被共转译分裂以得到两种细胞因子(sytokine)的单一多蛋白,导致在第一种细胞因子的3'端增加了几个额外的氨基酸,和在后一种细胞因子的5'端增加了单一的脯氨酸,IL2)。在另一个版本中,IRES元件分离两种细胞因子,导致合成没有额外的氨基酸的细胞因子。

[0070] 图35示出了2A的核苷酸和氨基酸序列。

[0071] 图36示出了TILT生物治疗静脉内腺病毒递送技术。上述TILT腺病毒将被瘤内提供给患者以增强T细胞疗法(标记4a,5a)。然而,并非所有肿瘤都可以通过瘤内途径到达。因此,我们已开发了一种可以通过静脉内途径到达肿瘤的基于Ad3的递送溶媒(vehicle)(标记为4b,5b)。

[0072] 图37示出了Ad3-hTERT-E3del-CMV-CD40L载体的结构。该病毒载体Ad3-hTERT-

E3del-CMV-CD40L的核苷酸序列示于SEQ ID NO 30中。

[0073] 图38示出了Ad3-hTERT-E3del-E2F-CD40L载体的结构。该病毒载体Ad3-hTERT-E3del-E2F-CD40L的核苷酸序列示于SEQ ID NO 31中。

[0074] 图39示出了用限制酶切割的pWEA-Ad3-hTERT-CMV-CD40L载体的琼脂糖凝胶。克隆病毒载体的校正限制分析显示出病毒的校正DNA序列。

[0075] 图40示出了用限制酶切割的pWEA-Ad3-hTERT-E2F-CD40L载体的琼脂糖凝胶。克隆病毒载体的校正限制分析显示出病毒的校正DNA序列。

[0076] 图41示出了体外E2F-CD40L和CMV-CD40L载体的功能性。纵轴上是相对视觉效价(titer)TCID₅₀产率的对数比例(logarytmic scale) (PFU/ml)。横轴上是感染后的天数(d)。这表明,病毒是功能性的并且能够感染至少一些肿瘤细胞系。根据VP效价未制备病毒的稀释液。渐进的TCID₅₀:首先用渐进的TCID₅₀测试新产生的病毒,以确定它们是否具有溶瘤性质。在培养九(9)天之后,A549细胞的所有培养板中感染变得可见,这表明所有的新病毒是功能性的。在接下来的几天,感染相应地继续传播,达到每个细胞被移液的病毒的量。在细胞裂解的量和速度方面检测到细微差异。

[0077] 图42-44揭示了,在A549肺癌细胞、PC3-MM2前列腺癌细胞和SKOV3卵巢癌细胞中,所有血清3型溶瘤病毒显示出比非复制Ad3eGFP对照病毒显著($P<0.05$)更好的细胞杀伤。溶瘤Ad3病毒之间未看到显著差异,表明所有病毒构建体是全功能性的,并且E3区缺失、插入的启动子(CMV或E2F)或插入的转基因(CD40L)不会影响体外溶瘤能力。

[0078] 图45示出了体内基于Ad3的病毒的抗肿瘤功效:原位腹腔卵巢癌模型。Ad3-hTERT-E3del-E2F-CD40L具有最佳抗肿瘤功效。ELISA证实CD40L释放到血流中。

[0079] 图46示出了编码免疫活性小鼠中鼠CD40L的溶瘤腺病毒的治疗窗。剂量 $5:1 \times 10^{11}$ VP/小鼠;剂量 $4:3 \times 10^{10}$ VP/小鼠;剂量 $3:1 \times 10^{10}$ VP/小鼠;剂量 $2:1 \times 10^9$ VP/小鼠;剂量 $1:1 \times 10^8$ VP/小鼠;阳性对照(肿瘤内剂量2)。使用剂量5,67%的小鼠有肝毒迹象。剂量4能够在静脉内递送后实现良好的肿瘤转导,而无肝中毒迹象。

[0080] 图47示出了在用编码免疫活性小鼠中鼠CD40L的溶瘤腺病毒通过静脉内途径治疗的小鼠中的肝酶释放。在任何静脉内治疗组(剂量1-5)中,没有太多肝毒,如通过肝酶释放所测量的。最后一条柱表示瘤内给予的剂量2。然而,在剂量5中,在目视检查中有肝毒→剂量4是用于静脉内递送的最大耐受剂量。(从模拟(mock)到剂量2的剂量被表示为从左至右的柱)。

[0081] 图48示出了由双细胞因子表达病毒增强过继细胞疗法的机制。病毒感染和病毒颗粒的固有感测诱导危险信号,该信号包括癌细胞上HLA/MHC I类分子的上调、抗原呈递细胞的活化和成熟以及免疫细胞聚集细胞因子的分泌。危险信号被带有溶瘤病毒的肿瘤细胞死亡进一步放大,这还释放了肿瘤抗原并通过免疫系统提高了肿瘤组织的识别。病毒表达两种细胞因子:T细胞聚集细胞因子将过继转移T细胞吸引到肿瘤中,并且在白细胞介素2的具体实施方案中,T细胞扩大细胞因子增加并保持它们的增殖。

[0082] 图49示出了重组小鼠细胞因子的运输实验的示意图。在第0天对B16-OVA承受C57BL/6雌性小鼠腹腔内(i.p.)过继转移富含 2.0×10^6 CD8a+的OT-I淋巴细胞(方框),和在工作日瘤内注射重组鼠细胞因子(三角)进行治疗。监控肿瘤生长,并通过使用电子卡尺每周记录三次(圆圈)。在两个不同的时间点(SAC1和SAC2)将小鼠处死(X),收集肿瘤并利用

OT-I qPCR和T细胞FACS分析来分析样品。

[0083] 图50示出了编码小鼠细胞因子的腺病毒的运输实验的示意图。在第0天对B16-OVA承受C57BL/6雌性小鼠腹腔内过继转移富含 2.0×10^6 CD8a+的OT-I淋巴细胞(方框),并在工作日利用武装有不同小鼠细胞因子(红色三角)的腺病毒瘤内治疗。监控肿瘤生长,并通过使用电子卡尺每周记录三次(圆圈)。在两个不同的时间点(SAC1和SAC2)将小鼠处死(X),收集肿瘤并利用OT-I qPCR和T细胞FACS分析来分析样品。

[0084] 图51示出了利用111铟放射性标记的OT-I细胞和SPECT/CT成像进行的运输实验的示意图。连续六天对B16-OVA承受C57BL/6雌性小鼠瘤内注射1e9VP的5/3嵌合病毒(三角)。第一组小鼠将在第0天接受富含 2.0×10^6 CD8a+的铟羟基喹啉标记的OT-I淋巴细胞(方框)的静脉内过继转移,而其他组小鼠在第7天。通过SPECT/CT成像将OT-I细胞在肿瘤内的积聚定量(圆圈)。在两个不同时间点(SAC1和SAC2)将小鼠处死(X),收集肿瘤并测定其最终放射性。

具体实施方式

[0085] 过继细胞疗法

[0086] 本发明的一般方法是利用能够与癌反应并破坏癌的免疫淋巴细胞的转移对患有癌症的患者的治疗的发展。分离的肿瘤浸润淋巴细胞在培养液中生长到很大数量并输注到患者体内。在本发明中,编码至少一种细胞因子的腺病毒载体用于增加淋巴细胞的效果。在过继细胞治疗组合物和腺病毒载体的分开给药之前常有骨髓破坏性(myeloablating)或非骨髓破坏性预处理化疗和/或辐射。过继细胞疗法治疗旨在减少或消除患者体内的癌症。(图21)

[0087] 本发明涉及利用细胞过继治疗组合物例如肿瘤浸润淋巴细胞,TCR修饰淋巴细胞或CAR修饰淋巴细胞的疗法。本发明特别涉及T细胞疗法,还涉及其他过继疗法,诸如NK细胞疗法或其他细胞疗法。事实上,根据本发明,过继细胞治疗组合物可包含未修饰的细胞(例如在TIL疗法中)或基因修饰的细胞。有两种常用方法来实现T细胞对肿瘤特异性靶标的基因靶向。一种是将具有已知特异性(TCR疗法)和具有匹配的人类白细胞抗原(HLA,被认为是啮齿类动物中的主要组织相容性复合体)型的T细胞受体的转移。另一种是用人造分子如嵌合抗原受体(CAR)将细胞修饰。这种方法不依赖于HLA且相对于靶向分子更灵活。例如,可以使用单链抗体,并且CAR还可以结合共刺激域。然而,CAR细胞的靶标需要在靶细胞的膜上,而TCR修饰可以利用细胞内靶标。

[0088] 本文中使用的“过继细胞治疗组合物”是指包含适于过继细胞转移的细胞的任何组合物。在本发明的一个实施方案中,过继细胞治疗组合物包含选自肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、TCR(即异源T细胞受体)修饰的淋巴细胞和CAR(即嵌合抗原受体)修饰的淋巴细胞的细胞类型。在本发明的另一个实施方案中,过继细胞治疗组合物包含选自T细胞、CD8+细胞、CD4+细胞、NK-细胞、 δ - γ T细胞、调节性T细胞和外周血单核细胞的细胞类型。在另一个实施方案中,TIL、T细胞、CD8+细胞、CD4+细胞、NK-细胞、 δ - γ T细胞、调节性T细胞或外周血单核细胞形成过继细胞治疗组合物。在本发明一个具体实施方案中,过继细胞治疗组合物包含T细胞。本文中使用的“肿瘤浸润淋巴细胞”或TIL是指已经离开血流并迁移至肿瘤中的白细胞。淋巴细胞可分为三组,包括B细胞、T细胞和自然杀伤细胞。在本发明的另一个具体实施

方案中,过继细胞治疗组合物包含已用目标特异性嵌合抗原受体或特别选择的T细胞受体修饰的T细胞。本文中使用的“T细胞”是指CD3⁺细胞,包括CD4⁺辅助细胞,CD8⁺细胞毒性T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

[0089] 除了适合的细胞之外,本发明中使用的过继细胞治疗组合物还可以包含任何其他制剂,如药学上可接受的载体、缓冲剂、赋形剂、佐剂、添加剂、抗菌剂(防腐剂, antiseptics)、填充剂、稳定剂和/或增稠剂,和/或在相应产品中通常会发现的任何组分。选择用于配制组合物的适合成分和适当制造方法属于本领域技术人员的常识。

[0090] 过继细胞治疗组合物可以是适于给药的任何形式的,如固体、半固体或液体形式的。剂型可以选自但不限于:溶液剂、乳剂、悬浮剂、片剂、小丸剂(pellet)和胶囊剂。该组合物不限于某种剂型,相反该组合物可以配制成任何已知的药学上可接受的剂型。该药物组合物可以通过本领域中已知的任何常规工艺来生产。

[0091] 病毒载体

[0092] 本发明中使用的溶瘤腺病毒载体可以是适于治疗人或动物的任何腺病毒载体。在本发明的一个实施方案中,腺病毒载体是人病毒的载体,并可以选自Ad5、Ad3和Ad5/3载体。在另一个实施方案中,载体是Ad5或Ad5/3载体。

[0093] 本文中使用的“溶瘤腺病毒载体”是指能够通过肿瘤(与正常细胞相对)中选择性复制来感染和杀死癌细胞的腺病毒载体。

[0094] 该载体可以以本领域中公知的任何方式例如,通过缺失、插入、突变或修饰任何病毒区而被修饰(modified)。使载体对于复制是肿瘤特异性的。例如,腺病毒载体可以包含在E1、E3和/或E4中的修饰,如肿瘤特异性启动子的插入(例如,以驱动E1),区域的缺失(如用于“D24”中的E1的恒定区2、E3/gp19k、E3/6.7k)和转基因的插入。此外,载体的纤突结区可以被修饰。在本发明一个实施方案中,腺病毒载体是包含Ad5核酸骨架和Ad3纤突结或Ad5/3嵌合纤突结的Ad5/3。

[0095] 本文中使用的表达“血清5型(Ad5)腺病毒核酸骨架”是指Ad5的基因组。类似地,“血清3型(Ad3)腺病毒核酸骨架”是指Ad3的基因组。“Ad5/3载体”是指具有Ad5和Ad3载体两者的部分的嵌合载体。在本发明的一个具体实施方案中,载体的衣壳修饰是Ad5/3嵌合。本文中使用的“Ad5/3嵌合纤突结”是指一种嵌合体,其中纤维的突结部分来自血清3型Ad,而纤维的其余部分来自血清5型Ad。具体地,在一个实施方案中,该构建体具有来自Ad3的纤突结,而基因组的其余部分来自Ad5。(参见图17、33和34)。

[0096] 用于产生肿瘤特异性溶瘤腺病毒的一种方法是设计影响E1的恒定区2(CR2)的24个碱基对缺失(D24)。在野生型中,腺病毒CR2负责结合用于诱导合成(S)阶段即DNA合成或复制阶段的蜂窝状Rb肿瘤抑制/细胞周期调节蛋白。pRb与E1A之间的相互作用需要本发明中缺失的E1A蛋白保守区的八种氨基酸121到127。根据Heise C.等(2000,Nature Med 6, 1134-1139),本发明的载体包括与载体的氨基酸122-129对应的核苷酸的缺失。已知有D24的病毒克服G1-S检查点的能力下降并只在该相互作用不是必须的细胞中例如在Rb-p16途径中有缺陷的肿瘤细胞中有效地复制,其包括即使不是所有也是大多数的人类肿瘤。(参见图17、33和34)

[0097] 也可以例如用肿瘤特异性启动子取代E1A内源性病毒启动子。在本发明的具体实施方案中,利用hTERT启动子来取代E1A内源性病毒启动子。

[0098] E3区对于体外病毒复制不是必需的,但E3蛋白在宿主免疫应答的调节中即在先天和特异性免疫应答两者的抑制中具有重要作用。E3中的gp19k/6.7K缺失是指965个碱基对从腺病毒E3A区的缺失。在所生的腺病毒构建体中,gp19k和6.7K基因都被删除(Kanerva A等.2005, Gene Therapy 12,87-94)。已知的gp19k基因产物结合和隔离内质网中的主要组织相容性复合体I (MHC1,被认为是人类中的HLA1) 分子,并防止感染细胞被细胞毒性T淋巴细胞识别。因为许多肿瘤缺乏HLA1/MHC1,gp19k的缺失增加了病毒的肿瘤选择性(病毒比野生型病毒被从正常细胞清除得更快,但在肿瘤细胞中没有差异)。6.7K蛋白表达于细胞表面上,并且它们参与下调TNF相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 受体2。(参见图17、33和34)

[0099] 对于我们的发明,这两种缺失提供了令人惊喜的优点。由于我们正尝试重新获得HLA/MHC的表达,用于将肿瘤表位递呈到过继转移T细胞,因而gp19k蛋白的表达使得达不到预期目标,并且实际上HLA/MHC的上调需要gp19k的缺失。对于6.7k,由于我们发明的实施方案是从病毒产生TNF α ,且其抗肿瘤活性之一是直接的抗肿瘤凋亡效应(在转导和非转导的旁观者细胞(bystander cell)两者上),因而6.7k的存在使得达不到预期目标。

[0100] 在本发明的一个实施方案中,一个或多个细胞因子转基因在E3启动子下被放入gp19k/6.7k缺失的E3区中。这将转基因表达限制于允许病毒复制和随后的E3启动子激活的肿瘤细胞。E3启动子可以是本领域中已知的任何外源性(例如,CMV或E2F启动子)或内源性启动子,特别是内源性E3启动子。虽然E3启动子主要通过复制而激活,但当E1被表达时发生一些表达。当E1表达后D24型病毒的选择性出现时(当E1无法结合Rb时),这些病毒确实也在转导的正常细胞中表达E1。因此,极其重要的是还调节E1表达,以将E3启动子介导的转基因表达限制于肿瘤细胞。

[0101] 在本发明的另一实施方案中,E3 gp19k/6.7k被保持在载体中,但一种或多种其他E3区已被删除(例如E3 9-kDa、E3 10.2kDa、E3 15.2kDa和/或E3 15.3kDa)。

[0102] 在本发明的具体实施方案中,溶瘤腺病毒载体是基于血清5型腺病毒(Ad5)核酸骨架,该骨架包含5/3嵌合纤突结,并且包含以下:用于E1A的肿瘤特异性表达的E2F1启动子;在腺病毒E1的Rb结合恒定区2中的24bp缺失(D24);病毒gp19k和6.7k阅读框的核酸序列缺失,具有插入缺失区中的转基因插入,导致在病毒E3启动子下转基因表达的复制相关控制;以及E3区中的缺失的腺病毒基因gp19k/6.7K处的编码至少一种细胞因子转基因的核酸序列(图17)。在本发明的一个实施方案中,腺病毒载体基于人类腺病毒。(参见图17、33和34)

[0103] 在本发明的另一具体实施方案中,溶瘤腺病毒载体基于血清3型腺病毒(Ad3)核酸骨架,并且包含以下:E3区中的缺失;以及缺失的E3区处的用于转基因(例如,CD40L)的表达的肿瘤特异性启动子(例如CMV或E2F)。在本发明的一个实施方案中,腺病毒载体基于人类腺病毒。(参见图37和38,病毒载体Ad3-hTERT-E3del-CMV-CD40L和Ad3-hTERT-E3del-E2F-CD40L的相应核苷酸序列示于SEQ ID NO 30和31中)

[0104] 腺病毒3中的早期区(E3)蛋白的确切功能尚不清楚。通常,在腺病毒中,它们在缺失时似乎并没有损害复制,而它们似乎影响了对腺病毒的抗病毒宿主应答(Wold等,1999)。在人类中发现的六个种类(A-F)的腺病毒中,人类腺病毒基因组的E3含有最高水平的遗传多样性。这种遗传内容的多样性主要位于高度保守的E3-gp19K和编码基因的种类特异性阵列的E3-RID α 开放阅读框(ORF)之间(Burgert和Blusch,2000)。

[0105] 细胞毒性T细胞介导的病毒感染细胞杀伤由E3-gp19K调控。这是通过阻断MHC I类

传输到质膜,并抑制TAP-MHC I类复合体形成而实现的(Andersson等,1985;Andersson等,1987;Burgert和Kvist,2002,Bennet等,1999)。

[0106] 因此,在本发明的一个方面中,重要分子E3-gp19K被包含在腺病毒载体中,以使病毒复制更隐秘和使更多的时间能够用于溶瘤及其有益效果。此外,保留E3-gp19K可以减少抗腺病毒-细胞毒性T细胞的诱导,生成更多的抗肿瘤T细胞。

[0107] 在本发明的一个实施方案中,溶瘤腺病毒载体基于血清3型腺病毒(Ad3)核酸骨架,并且包含以下:用于E1A的肿瘤特异性表达的启动子(例如hTERT),E3区中的缺失(例如,影响E3 9-kDa、E3 10.2kDa、E3 15.2kDa和E3 15.3kDa的缺失),以及E3的缺失区处的用于转基因(例如,CD40L)的表达的肿瘤特异性启动子(例如CMV或E2F)。在本发明的一个实施方案中,载体的核酸骨架完全是血清3型腺病毒。在本发明的一个实施方案中,在Ad3 delE3病毒中,已删除以下特征:E3 9-kDa、E3 10.2kDa、E3 15.2-kDa、E3 15.3kDa,此外,具有启动子的CD40L(CMV或E2F)已经被插入在他们的位置中。这些病毒诱导肿瘤细胞的凋亡,并触发几种免疫机制,包括引起细胞毒性T细胞活化和免疫抑制减少的T辅助1型(TH1)应答。

[0108] 细胞因子通过各种机制(包括T细胞向肿瘤的聚集)的作用参与免疫应答。编码细胞因子转基因的核苷酸序列可来自任何动物,例如人、猿、大鼠、小鼠、仓鼠、狗或猫,但特别地由人序列编码。编码该转基因的核苷酸序列可被修饰,以改善其效果,或未被修饰,即野生型的。

[0109] 本发明的具体实施方案包括编码至少一种细胞因子的病毒载体。本发明中使用的细胞因子可以选自本领域中任何已知的细胞因子。在本发明的一个实施方案中,细胞因子选自:干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、补体C5a、IL-2、TNF α 、CD40L、IL12、IL-23、IL15、IL17、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7和XCL2。在本发明的具体实施方案中,细胞因子是IL-2或TNF α 。在本发明的另一实施方案中,一种或多种细胞因子选自由以下组成的趋化因子组:CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7和XCL2。

[0110] 本发明的病毒载体可以编码一种、两种、三种、四种、五种或更多种细胞因子。在本发明的一个实施方案中,溶瘤腺病毒载体编码两种或更多种细胞因子,最特别的是两种。这两种细胞因子可以是任何已知的细胞因子,例如包括但不限于上面列出的那些,外加GMCSF。这两种细胞因子可以是不同的细胞因子。在本发明的一个实施方案中,溶瘤腺病毒载体编码选自由以下组成的细胞因子组中的一种或多种细胞因子:干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、补体C5a、GMCSF、IL-2、TNF α 、CD40L、IL12、IL-23、IL15、IL17、CCL1、CCL11、CCL12、

CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7和XCL2,或者溶瘤腺病毒载体编码IL-2和选自由以下组成的细胞因子组中的一种或多种细胞因子:干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、补体C5a、GMCSF、TNF α 、CD40L、IL12、IL-23、IL15、IL17、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7和XCL2。在本发明的具体实施方案中,细胞因子是IL-2和TNF α 。其他细胞因子通过吸引和激活T细胞并降低肿瘤免疫抑制作用,而IL-2诱导T细胞移植物的繁殖。因此,IL-2在需要其的肿瘤处局部地产生,代替如在T细胞疗法中通常所进行的会引起副作用的全身性注射,因此,可以通过该实施方案防止现有技术疗法的一个主要问题(即全身性IL-2的毒性)。

[0111] 通过溶瘤病毒的复制提供的危险信号和通过病毒DNA对病原体相关分子模式识别受体的激活以及转基因的作用可将肿瘤免疫抑制降低至可以省略预处理治疗的程度。因此,能够避免由于预处理化疗和放疗导致的毒性引起的现有技术中的重大问题。

[0112] 在本发明的一个实施方案中,病毒载体包含内部核糖体进入位点(IRES)或可选的两种转基因之间的核糖体分流位点2A。因此,IRES或核糖体分流位点2A可以位于任何细胞因子之间,如IL-2和选自上面列出的细胞因子组中的任何其他细胞因子。本文中使用的“IRES”是指能够在蛋白质合成中在信使RNA序列的中间开始翻译的核苷酸序列。IRES可以来自任何病毒,但在本发明的一个实施方案中,IRES来自脑心肌炎病毒(EMCV)。本文中使用的“核糖体分流位点2A”是指翻译起始位点,其中核糖体物理上绕开5'非翻译区的部分而到达起始密码子。IRES和A2都能使病毒从一种启动子(E3启动子)产生两种转基因。

[0113] 可以在本发明中使用的病毒基因组的一般排列的示意图示于图17、33、34、37和38中。包含转基因C5a、hCD40L、hIFN α 2、hIFN β 1、hIFN γ 1、hIL2或TNF α 的病毒载体的核苷酸序列分别示于SEQ ID NO 1-7中(Ad5/3-E2F-D24-转基因)。包含CD40L的病毒载体的核苷酸序列也示于SEQ ID NO 30和31中(Ad3-hTERT-E3del-CMV-CD40L和Ad3-hTERT-E3del-E2F-CD40L)。此外,SEQ ID NO 8-21中示出包含两种转基因的病毒载体的核苷酸序列,一种是IL-2,另一种是C5a、CD40L、IFN α 2、IFN β 、IFN γ 、GMCSF或TNF α (SEQ ID NO:8C5a-2A-IL2、SEQ ID NO:9IFN α -2A-IL2、SEQ ID NO:10TNF α -2A-IL2、SEQ ID NO:11CD40L-2A-IL2、SEQ ID NO:12IFN β -2A-IL2、SEQ ID NO:13GMCSF-2A-IL2、SEQ ID NO:14IFN γ -2A-IL2、SEQ ID NO:15C5a-IRES-IL2、SEQ ID NO:16IFN α -IRES-IL2、SEQ ID NO:17TNF α -IRES-IL2、SEQ ID NO:18CD40L-IRES-IL2、SEQ ID NO:19IFN β -IRES-IL2、SEQ ID NO:20GMCSF-IRES-IL2、SEQ ID NO:21IFN γ -IRES-IL2)(Ad5/3-E2F-D24-转基因-IRES/2A-转基因)。

[0114] 总之,利用包含至少一种细胞因子转基因的病毒载体的本发明的主要优点是:i)

细胞因子和病毒本身引起将T细胞和其他免疫细胞聚集到肿瘤的危险信号,ii)细胞因子诱导肿瘤处和局部淋巴器官中的T细胞增殖,iii)细胞因子和病毒本身能够诱导T细胞(过继T细胞移植物和天然的先天抗肿瘤T细胞)在肿瘤处增殖,iv)细胞因子和/或病毒诱导癌细胞上抗原呈递分子(HLA)的上调,使它们对识别敏感并被T细胞杀伤,以及v)细胞因子和病毒复制通过降低免疫抑制和细胞无能而有利地改变了肿瘤微环境。

[0115] 本发明中使用的病毒载体还可以包含如上所述之外的其他修饰。可选地,可以使用任何另外的组分或修饰,但不是必须用于本发明。

[0116] 外源性元件(element)的插入可以增强载体在靶细胞中的作用。外源性组织或肿瘤特异性启动子的使用在重组载体中很常见,且它们也可以用于本发明中。

[0117] 总之,本发明揭示了溶瘤病毒的复制可以在肿瘤处聚集T细胞并诱导危险信号,降低了免疫抑制和细胞无能。这些作用由病原体相关分子模式识别受体介导(一种用于诱导免疫的进化上保守的机制)且不受容忍性影响。本发明还揭示了能够在肿瘤中但不能在正常细胞中复制的溶瘤平台的额外好处是在肿瘤处自扩增。另外,溶瘤作用本身可以增加人类中的整体抗肿瘤作用。

[0118] 癌症

[0119] 本发明的重组载体能够在肿瘤细胞中复制。在本发明的一个实施方案中,载体能够在Rb-通路特别是Rb-p16通路中有缺陷的细胞中复制。这些有缺陷的细胞包括动物和人类中的所有肿瘤细胞。本文中使用的“Rb-通路中有缺陷”是指该通路的任何基因或蛋白质中的突变和/或表观遗传变化。由于这些缺陷,肿瘤细胞过表达E2F,并且因此,对于有效复制通常所需的E1ACR2与Rb的结合是不必要的。进一步地,选择性由仅在游离E2F存在时激活的E2F启动子介导,如Rb/p16通路缺陷性细胞中所见。在没有游离E2F的情况下,没有发生E1A的转录,并且病毒不复制。含有E2F启动子对预防可以直接或间接通过允许来自E3启动子的转基因表达而导致毒性的正常组织中的E1A的表达很重要。

[0120] 本发明涉及用于治疗受试者中癌症的方法。在本发明的一个实施方案中,受试者是人或动物,特别是动物或人患者,更具体地是患有癌症的人或动物。

[0121] 该方法可以用于治疗任何癌症或肿瘤,包括恶性和良性肿瘤,原发性肿瘤和转移瘤都可以是该方法的目标。在本发明一个实施方案中,癌症以肿瘤浸润淋巴细胞为特征。本发明的工具对以肿瘤浸润淋巴细胞为特征的转移性实体瘤的治疗特别有吸引力。在另一个实施方案中,T细胞移植物已经通过嵌合抗原受体的肿瘤或组织特异性T细胞受体修饰。

[0122] 本文中使用的术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是为了包括不仅完全治愈,而且包括预防、改善或减轻与癌症或肿瘤相关的紊乱或症状的目的,指对受试者优选哺乳动物或人受试者施用至少溶瘤腺病毒载体或者施用至少溶瘤腺病毒载体和过继细胞治疗组合物。治疗效果可以通过监测患者的症状、血液中的肿瘤标记物或例如肿瘤大小或病人的存活长度来评估。

[0123] 在本发明的另一个实施方案中,癌症选自:鼻咽癌、滑膜癌、肝细胞癌、肾癌、结缔组织癌、黑色素瘤、肺癌、肠癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、脑癌、咽喉癌、口腔癌、肝癌、胃癌、胰腺癌、绒毛膜癌、胃泌素瘤、嗜铬细胞瘤、泌乳素瘤、T-细胞白血病/淋巴瘤、神经瘤、希佩尔-林道病(von Hippel-Lindau disease)、佐林格-埃利森综合征(Zollinger-Ellison syndrome)、肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、输尿管癌、脑癌、少突神经胶质瘤、神经母细

胞瘤、脑膜瘤、脊髓肿瘤、骨癌、骨软骨瘤、软骨肉瘤、尤文肉瘤 (Ewing's sarcoma)、不明原发部位的癌症、类癌瘤 (carcinoid)、胃肠道类癌、纤维肉瘤、乳腺癌、佩吉特病 (Paget's disease)、子宫颈癌、结肠直肠癌、直肠癌、食道癌、胆囊癌、头部癌症、眼癌、颈部癌症、肾癌、维尔姆斯瘤 (Wilms' tumor)、肝癌、卡波济氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、前列腺癌、肺癌、睾丸癌、霍奇金病、非何杰金氏淋巴瘤、口腔癌、皮肤癌、间皮瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、内分泌腺癌、胰高血糖素瘤、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、垂体癌、软组织肉瘤、视网膜母细胞瘤、小肠癌、胃癌、胸腺癌、甲状腺癌、滋养细胞癌 (trophoblastic cancer)、葡萄胎、子宫癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、听神经瘤、蕈样真菌病 (mycosis fungoides)、胰岛瘤、类癌瘤综合征、生长抑素瘤、牙龈癌 (gum cancer)、心脏癌 (heart cancer)、唇癌、脑膜癌、口腔癌、神经癌、腮腺癌、腮腺癌、腹膜癌、咽癌、胸膜癌、唾液腺癌、舌癌和扁桃体癌。

[0124] 在将人或动物患者分为适合于本发明的疗法之前,临床医生可以检查患者。基于偏离正常并揭示肿瘤或癌症的结果,临床医生可以对患者建议本发明的治疗。

[0125] 药物组合物

[0126] 本发明的药物组合物包含本发明的至少一种类型的病毒载体。此外,该组合物可包含至少两种、三种或四种不同的载体。除了载体之外,药物组合物还可以包含其他治疗上有效的制剂,任何其他制剂如药学上可接受的载体、缓冲剂、赋形剂、佐剂、添加剂、抗菌剂、填充剂、稳定剂和/或增稠剂,和/或在相应产品中通常会发现的任何组分。选择用于配制组合物的合适成分和适当制造方法属于本领域技术人员的常识。

[0127] 该药物组合物可以是适于给药的任何形式的,如固体、半固体或液体形式。剂型可以选自但不限于:溶液剂、乳剂、悬浮剂、片剂、小丸剂和胶囊剂。本发明的组合物不限于某种剂型,相反该组合物可以配制成任何已知的药学上可接受的剂型。该药物组合物可以通过本领域中已知的任何常规工艺来生产。

[0128] 在本发明的一个实施方案中,病毒载体或药物组合物作为用于聚集T细胞的原位溶媒,增强了其治疗效果并允许其在肿瘤处的繁殖。

[0129] 本发明的药物试剂盒包含过继细胞治疗组合物和编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体。过继细胞治疗组合物被配制在第一剂型中,和编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体被配制在第二剂型中。在本发明的另一个实施方案中,第一剂型和第二剂型用于对受试者同时或以任意顺序依次施用。

[0130] 给药

[0131] 本发明的载体或药物组合物可以对选自植物、动物和人的任何真核受试者施用。在本发明的具体实施方案中,受试者是人或动物。动物可以选自宠物、家畜和生产动物。

[0132] 可使用任何常规方法对受试者施用载体或组合物。给药途径取决于组合物的剂型或形式、疾病、肿瘤位置、患者、共患疾病 (comorbidity) 和其他因素。

[0133] 在本发明的一个实施方案中,过继细胞治疗组合物和编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体对受试者的分开给药是同时或以任何顺序依次进行的。本文使所用的“分开给药”或“单独使用/分开的 (separate)”是指过继细胞治疗组合物和溶瘤腺病毒载体是两种不同的产品或彼此不同的组合物的情况。

[0134] 本发明的过继细胞治疗组合物和编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体或仅溶瘤性或非溶细胞性病毒载体的仅一次给药可具有治疗作用。根据例如患者和癌症的类

型、程度或位置,在给药之间可有任何时间段。在本发明的一个实施方案中,在过继细胞治疗组合物和编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体的连续给药之间,有一分钟到四周,特别地1至10天,更特别地1到五天的时间段,和/或对过继细胞治疗组合物和溶瘤腺病毒载体有几次给药。在治疗期期间,过继细胞治疗组合物和溶瘤腺病毒载体的给药次数数量也可以不同。溶瘤腺病毒载体或药物或过继细胞组合物在前2周、4周、每月或在治疗期间可以给药例如1至10次。在本发明的一个实施方案中,载体或任何组合物的给药在前2周,然后4周,然后每月进行三到七次。在本发明的具体实施方案中,给药在前2周,然后4周,然后每月进行四次。治疗期长度可以变化,并且例如可以持续2到12个月或更长。

[0135] 在本发明的具体实施方案中,过继细胞治疗组合物和溶瘤腺病毒载体在同一天给药,其后在可能持续例如1至6个月或12个月或更长的治疗期期间,每星期、每两个星期、每三星期或每月施用一次溶瘤腺病毒载体。

[0136] 在本发明的一个实施方案中,溶瘤病毒的给药通过瘤内、动脉内、静脉内、胸膜内、囊内、腔内或腹腔注射或者口服给药来进行。任何给药组合也是可能的。尽管是局部注射,但该方法可以给予全身性功效。过继细胞治疗组合物可以在静脉内或肿瘤内给药。在一个实施方案中,过继细胞治疗组合物和/或编码至少一种细胞因子的溶瘤病毒载体的给药通过肿瘤内、动脉内、静脉内、胸膜内、囊内、腔内或腹腔注射或者口服给药来进行。在本发明的具体实施方案中,TIL或T细胞在静脉内给药,而病毒载体在肿瘤内和/或静脉内给药。值得注意的是,来自T细胞给药的病毒分开地递送至肿瘤;病毒不用于体外修饰T-细胞移植物。在本质上,病毒以使T细胞移植物可以更好地工作的方式修饰肿瘤。

[0137] 载体的有效剂量至少取决于需要治疗的受试者、肿瘤类型、肿瘤位置和肿瘤阶段。剂量可以例如从约 1×10^8 病毒颗粒(VP)至约 1×10^{14} VP,特别地从约 5×10^9 VP至约 1×10^{13} VP,更特别地从约 8×10^9 VP至约 1×10^{12} VP变化。在一个实施方案中,编码至少一种细胞因子的溶瘤腺病毒载体以 1×10^{10} - 1×10^{14} VP的量给药。在本发明的另一实施方案中,剂量在约 5×10^{10} - 5×10^{11} VP的范围内。

[0138] 细胞转移的量也将取决于患者,但典型的量的范围为每次注射 1×10^9 - 1×10^{12} 个细胞。注射次数也不同,但典型实施方案包括几周(例如2-4周)分开的1或2轮治疗。

[0139] 除了本发明的疗法之外,可以使用任何其他治疗或治疗组合。在一个具体实施方案中,本发明的方法或用途还包括对受试者同时或依次施用放疗、单克隆抗体、化疗或其他抗癌药物或干预(包括手术)。

[0140] 本文中使用的术语“治疗”或“增加”以及由此所产生的词语并不一定意味着100%或完全的治疗或增加。精确地说,本领域普通技术人员认识到不同的程度具有潜在的好处或治疗效果。在这方面,本发明的方法可以提供T细胞疗法疗效任何量的增加或者疾病的任何程度的治疗或预防。

[0141] 图28-32、36和48说明了本发明的方法和机制。

[0142] 对本领域技术人员来说,随着技术的进步,本发明构思可以以各种方式来实现将是显而易见的。本发明及其实施方案不限于上述实例,而是可以在权利要求书的范围内变化。

[0143] 实施例

[0144] 材料与方法

[0145] B16-OVA动物模型:将卵清蛋白表达B16细胞(B16-OVA)保存在RPMI、10%FBS、5mg/ml G418、20mM L-谷氨酰胺、1×青霉素/链霉素溶液(GIBCO)中。对4-7周龄的C57BL/6免疫活性的雌性小鼠在右肋皮下植入50μl RPMI, 0%FBS中的 2.5×10^5 B16-OVA细胞,每只小鼠一种肿瘤。大约在肿瘤植入10天后(当肿瘤变为可注射的,~3mm的最小直径),将小鼠分组,并在一些实验中通过瘤内注射50μl PBS或50μl PBS中 1×10^9 病毒颗粒(VP)的溶瘤腺病毒连续治疗六天。在其他实验中,在第0天、第2天和第4天给予三次注射。因为小鼠细胞对人类腺病毒是不允许的,所以使用多次瘤内病毒注射来模拟病毒复制诱导的炎症,(Blair等, 1989)。

[0146] 过继转移:在瘤内治疗的第一天,小鼠还通过腹腔内过继转移接受100μl RPMI, 0%FBS中的 5×10^5 至 2×10^6 个放置过夜的富含CD8a并扩增的脾细胞,该脾细胞来自通过基因工程仅具有卵白蛋白(OVA)-特异性CD8 T细胞受体的4-8周龄的C57BL/6-Tg (TcraTcrb) 1100Mjb/J (OT-1) 小鼠。根据制造商的说明书,在转移5天前,通过小鼠CD8a (Ly-2) 微珠进行CD8a富集(Miltenyi Biotech公司,USA,类别号130-049-401)。在重组鼠IL-2(160ng/ml)和可溶性抗小鼠CD3ε抗体(0.3μg/ml, Abcam, 克隆145-2C11)的存在下,使富集细胞在淋巴细胞培养基(RPMI, 10%FBS, 20mM L-谷氨酰胺, 1×青霉素/链霉素溶液, 15mM HEPES, 50μM 2-巯基乙醇, 1mM的丙酮酸钠)中,大量扩增5天。

[0147] 用于流式细胞检测的组织处理:对小鼠处以安乐死,并将脾脏、引流淋巴结和肿瘤收集至1-10ml的RPMI, 10%FBS中,并通过出血至胸膜腔的终末期心脏收集血液,并通过一次性注射器转移到含有EDTA的微量离心管中,并处理以便分析:通过手术刀粗略地分离固体组织,并在5至10ml的ACK裂解缓冲液(150mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 0.1mM EDTA, pH 7.2)中在10ml的一次性无菌吸管端中研磨,并且在室温(RT)下培养~20分钟,此时于+4℃, 1200rpm下将细胞压丸(pellet)5分钟,随后根据所估计的细胞量,将细胞重悬浮于1至10ml的RPMI, 10%的FBS中,并通过40μm的无菌过滤器以生成单细胞液。在一些实验中,相反地,手术刀切割之后(在添加ACK之前),于37℃, 5%的 CO_2 下,在总体积1ml的蛋白酶-鸡尾酒(cocktail) (补充有1mg/ml的A、H或P、罗氏型胶原酶和核酸酶的RPMI, 终浓度为125单位/ml, Sigma公司, E1014-25KU) 中直接处理肿瘤组织1-2小时,之后加入10ml的ACK裂解缓冲液,并按如上所述的处理细胞。将200μl全血吸取到5ml的ACK裂解缓冲液中并按如上所述的处理。将细胞或者在37℃, 5% CO_2 下中培养过夜,或者通过免疫染色和流式细胞检测直接分析。

[0148] 用于细胞因子分析的组织处理:对小鼠处以安乐死,并将~2-10mm³的肿瘤片冷冻于干冰上的2ml的微量离心管中,并在-80℃下储存。对肿瘤片称重并加入200μl的冰冷却的PBS。通过Tissue Master 125转子将这些片均质,加入1×蛋白酶抑制剂鸡尾酒(Sigma)和最终浓度0.1%的BSA,并将试管保持于冰上。于+4℃下将肿瘤匀浆物以2000rpm离心10分钟,并按照制造商的说明书,用CBA Flex Set细胞因子珠(BD, USA)在BD FACSArya上对上清液进行分析。

[0149] 支持本发明的实验

[0150] 实验1(由瘤内腺病毒注射诱导的细胞因子和趋化因子):

[0151] 为了研究腺病毒感染是否会引起细胞因子和趋化因子表达,在第0、1、2、3、4和5天,我们给携带皮下B16-OVA肿瘤的小鼠瘤内注射PBS或5/3嵌合溶瘤腺病毒。在第0天(病毒

注射前=基线控制)从每个治疗组中的三只小鼠提取肿瘤并处理,用于细胞因子分析,并在第6、10、14和18天的每个时间点从其他三只小鼠。

[0152] 值得注意的是,结果示出IFN- γ 分泌的病毒诱导型增加和随后在第10天IFN- γ 诱导趋化因子RANTES、MIP-1 α 和MCP-1的上调(图1)。

[0153] 为了加强过继细胞疗法的治疗疗效,这些发现是很重要的。

[0154] 基于该数据,用溶瘤细胞因子武装的腺病毒治疗导致肿瘤微环境的有利改变,过继转移免疫细胞的趋药性增加以及细胞毒性CD8+T细胞对肿瘤细胞的识别增强。

[0155] 实验2(过继T细胞疗法的腺病毒介导型增强):

[0156] 为了研究腺病毒治疗对过继T细胞疗法的影响,用5/3嵌合溶瘤腺病毒单独使用或与肿瘤特异性OT-I细胞的过继转移联用来治疗鼠B16-OVA黑素瘤,并与接受瘤内PBS注射的小鼠相比。图2中总结的三次独立实验的结果揭示了,一方面,病毒注射本身(记住,人腺病毒不能在小鼠细胞中生产性地复制)导致了较小的肿瘤生长控制,持续直到治疗后第14天并在此之后递减(图2A)。另一方面,当治疗的小鼠用 5×10^5 或 2×10^6 个OT-I细胞过继转移时,在两个独立的实验(分别是图2B和2C)中得到PBS和Ad组之间在统计学上具有显著差异。

[0157] 因此,病毒在肿瘤中的存在对过继细胞疗法有很强的增强作用。在我们手中每次以 1×10^9 VP进行的六次瘤内病毒注射与OT-I细胞的过继转移联用,与Song等人(2011, Mol Ther)所报告的相比,提供了相同或优异的抗肿瘤功效, Song等人报道的是单次肌肉注射与等量的共表达A20特异性短发夹RNA的腺病毒和B16.OVA黑色素瘤模型中刺激Toll样受体5(AD-shAF)分泌形式的鞭毛蛋白混合的 1×10^{10} VP的OVA表达复制缺陷型腺病毒(Ad-OVA)(Song XT等. Mol Ther. 2011 Jan; 19(1):211-7, PMID:20959814)。鉴于这些结果,我们的发明的一个新颖方面是使病毒注射靶向到肿瘤内,我们甚至可以用未武装病毒实现对肌肉注射的多免疫功能武装病毒的优异肿瘤控制。

[0158] 实验3(对体内免疫细胞群的质量和数量的腺病毒介导的改变):

[0159] 为了研究实验2的过继转移细胞的运输和增殖,用5 μ M羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)对OT-I细胞进行体外染色。该荧光细胞染色染料随每次细胞分裂稀释,因此使我们能够通过流式细胞检测通过分析每次细胞分裂(最多7次分裂,这里标记为M0-7)时的~1/2部分降低的荧光信号强度追踪淋巴细胞增殖。在转移后第1天,结果显示转移OT-I细胞(CD8+CFSE+双阳性群)在肿瘤中的病毒诱导累积,伴随有血液中这些细胞的减少(图3A)。在之后的时间点时,与PBS注射的肿瘤相比,在病毒治疗的肿瘤中总CD8+T细胞计数也显得更高,并在第14天时,病毒治疗小鼠的淋巴器官中总CD8+T细胞计数增加。

[0160] 在不同时间点OT-I细胞分裂的量示于图3B中。由于OT-I细胞的增殖状态在第1天在两组之间是相同的,在各器官中的CD8+细胞计数的差异是由于腺病毒诱导的免疫细胞运输。然而,在之后的时间点时,情况已改变,且腺病毒治疗的肿瘤中的OT-I细胞增长是由于增加的淋巴细胞增殖。在第6天, PBS治疗肿瘤中的多数OT-I细胞被阻滞在M5阶段,然而腺病毒组中的转移细胞继续增殖(分裂M6-M7)。该数据表明,通过打破肿瘤中的免疫抑制,吸引有助于CD8+细胞活化的免疫细胞和/或通过有助于克服T细胞无能的一些其他重要机制,溶瘤病毒疗法或非溶细胞病毒感染导致过继转移淋巴细胞的运输和增殖增强。

[0161] 作为对我们在动物模型中发现的支持,在对患有晚期癌症的患者施用溶瘤病毒之后第一天中,我们已观察到血液淋巴细胞计数的短暂衰减(图4),表明对肿瘤中的急性腺病

毒感染应答而动员使T细胞循环。

[0162] 此外,为了支持将T细胞聚集进肿瘤中的腺病毒感染,我们检测到在肿瘤活检组织切片中治疗后CD8+T细胞的数量比之前的增加(图5)。

[0163] 图6示出了与T细胞的过继转移联用的腺病毒注射的结果。

[0164] 图7揭示了由于过继转移和病毒注射而使“天然”抗肿瘤T细胞的数量急剧增加。

[0165] 图8示出了第14天时肿瘤中的活化CD8+细胞和肿瘤中的TIM-3表达。

[0166] 图9示出了抗肿瘤T细胞的增加和免疫抑制的减少导致抗肿瘤抗原的全身免疫性。

[0167] 图10示出了病毒注射之后的OTI T细胞的分布。

[0168] 图11揭示了解除免疫抑制可诱导细胞的繁殖。

[0169] 图12示出了重组细胞因子(无病毒)与OT1细胞联用的疗效。

[0170] 实验4(过继转移T细胞+小鼠Ad5腺病毒武装的细胞因子):

[0171] 模型:

[0172] 有B16-OVA的C57BL/6(每只动物 0.25×10^6 个细胞)

[0173] 组:

[0174] 无注射

[0175] Ad5-Luc

[0176] Ad5-CMV-mTNFa

[0177] Ad5-CMV-mIFNg

[0178] Ad5-CMV-mIL2

[0179] Ad5-CMV-mIFNb1

[0180] 无注射+OT1

[0181] Ad5-Luc+OT1

[0182] Ad5-CMV-mTNFa+OT1

[0183] Ad5-CMV-mIFNg+OT1

[0184] Ad5-CMV-mIL2+OT1

[0185] Ad5-CMV-mIFNb1+OT1

[0186] Ad5载体是编码小鼠转基因的非复制型人腺病毒的载体。利用AdEasy技术(Agilent公司)制作构建体;转基因盒(由CMV启动子驱动)在缺失的E1区中(参见例如Diaconu I等.Cancer Res.2012 May 1;72(9):2327-38)。

[0187] 组大小:

[0188] $n=7, 12 \times 7=84$ (+额外20%=100)

[0189] 治疗方案:

[0190] OT1细胞:第1天每只动物腹腔内注射 2×10^6

[0191] 病毒注射:在第1天及此后每周 1×10^9 个病毒颗粒(OD 260)

[0192] 端点:

[0193] 肿瘤体积(第一个星期每2天,然后每3天,测量一次)

[0194] 当小鼠死亡或被杀死时,收集肿瘤和脾脏;用于FACS和/或ELISPOT(根据Siri数据,聚焦于最相关的试验)。

[0195] 与T细胞疗法联用的最佳转基因是TNF α ja IL2(图13)。加强数据,在没有病毒的实

验中涉及同样的细胞因子。

[0196] 图14示出了不同病毒(在没有T细胞疗法的情况下)对肿瘤大小的影响(图14)。

[0197] 图15示出了与Ad5-CMV-mTNF α 载体联用的T细胞疗法的优异结果。

[0198] 图16示出了与Ad5-CMV-mIL2载体联用的T细胞疗法的优异结果。

[0199] 新型病毒构建体

[0200] 以下新病毒构建体作为我们所提出的技术的实例而呈现:

[0201] 表达溶瘤病毒的C5a和TNF- α

[0202] 我们产生了新的溶瘤性Ad5/3腺病毒,其携带补体成分C5a或人TNF- α 的活性部分作为转基因,而不是6.7K/gp19基因区(图17)。

[0203] 实验5(来自C5a编码的腺病毒载体的转基因表达):

[0204] 作为概念证明,为了确认溶瘤腺病毒能够表达所提出的增强过继细胞疗法的所选细胞因子,我们在培养物中以10VP/编码C5a的腺病毒细胞感染人A549细胞(图24),并在感染后的不同时间点通过ELISA评估细胞培养物上清液中的C5a水平。结果确实验证了假设并支持携带所选细胞因子的专用腺病毒构建体的产生。

[0205] 实验6(新型腺病毒载体对单核细胞迁移的影响):

[0206] 我们利用体外趋化性试验测试了C5a聚集单核细胞的能力:用表达C5a的腺病毒或非武装对照病毒(10VP/细胞-病毒之间的感染单位相似)感染A549细胞,或用PBS处理,并且感染48小时后收集培养基并用于按照制造商的说明书(Millipore QCM,类别号ECM512)在转移趋化试验中聚集人单核细胞系THP1。结果揭示了,通过来自C5a表达病毒感染的细胞的上清液比通过来自非感染细胞或用非武装病毒感染的细胞的培养基的显著更大的单核细胞吸引力(图25)。

[0207] 实验7(C5a武装的腺病毒的抗肿瘤疗效):

[0208] 为了评估C5a在非溶细胞瘤感染的情况中的抗肿瘤功效,我们在第0、2和4天用PBS、C5a表达病毒或用非武装对照病毒治疗C57BL/6小鼠中的所建B16-OVA肿瘤。结果揭示了C5a表达病毒的抗肿瘤作用强(图26)。

[0209] 实验8(通过C5a病毒抗肿瘤T细胞扩增增加):

[0210] 为了评估观察到的C5a表达病毒的抗肿瘤疗效的增加(图24)是否与T细胞相关,通过用于卵清蛋白特异性CD8⁺T细胞的流式细胞检测分析肿瘤,通过用对识别装载有免疫卵清蛋白肽SIINFEKL(ProImmune,美国)的MHC I的TCR特异性的APC缀合的五聚体染色来检测。事实上,C5a病毒组中的肿瘤比注射了对照病毒或PBS的肿瘤包含显著更大比例的肿瘤特异性CD8⁺T细胞(图27)。

[0211] 实验9(来自TNF- α 编码腺病毒的转基因表达):

[0212] 与C5a病毒类似(图24和实验5),我们测试hTNF- α 表达溶瘤腺病毒介导选择转基因的分泌的能力。结果证实了表达(图18)。

[0213] 实验10(表达的转基因的生物效应被保留在溶瘤腺病毒中):

[0214] 为了评估腺病毒表达的转基因是否保留其生物效应,将来自用对照非武装病毒或用TNF- α 表达病毒感染的A549细胞的无病毒(100kD过滤)上清液(改变VP/细胞,72小时腹腔内注射)施用在对TNF- α 敏感的WEHI-13VAR(ATCC CRL-2148)细胞上,并评估这些细胞在暴露于上清液之后的72小时的生存能力。(例如Espevik T等.J Immunol Methods.1986;95

(1):99-105描述了该方法。)结果揭示了由溶瘤腺病毒表达的TNF- α 保留有效的生物效应(图19)。

[0215] 实验11(溶瘤细胞因子表达病毒保留体外细胞杀伤能力):

[0216] 因为TNF- α 可能具有抗病毒效果,确认表达TNF- α 的腺病毒的溶瘤作用保留其感染和杀死癌细胞的能力很重要。按照制造商的说明(Promega公司,美国)用TNF- α 表达病毒或对照病毒感染培养物中的几种癌细胞系,并通过CelltiterGlo AQ MTS试验来评估存活力。结果表明病毒是体外溶瘤性的(图19-20)。

[0217] 实验12(放疗和表达TNF α 的溶瘤病毒之间的协同作用):

[0218] 我们在有或没有伴随集中的外部射线照射(XRT)的情况下,利用病毒瘤内治疗携带皮下A549异种移植物的裸小鼠(图21)。RD表示复制缺陷型病毒,且未武装病毒是没有TNF α 的溶瘤病毒。

[0219] 实验13(TNF- α 表达腺病毒在免疫活性宿主中的增加抗肿瘤疗效):

[0220] 为了测试不在鼠细胞中复制的溶瘤腺病毒是否仍然能够在免疫活性小鼠体内引起抗肿瘤作用,以与图26中类似的方式,对有所建B16.OVA肿瘤的小鼠瘤内注射TNF- α 表达或非武装对照病毒或PBS。结果显示,与对照相比,利用TNF- α 表达病毒具有更好的总体肿瘤控制(图22),表明人TNF- α 在小鼠中是部分活性的并支持武装病毒的概念以实现更好的抗肿瘤作用。

[0221] 实验14(由TNF α 病毒增加的抗肿瘤T细胞扩增):

[0222] 与实验11类似,我们想测试所观察到的TNF- α 表达病毒的抗肿瘤作用是否与肿瘤特异性溶瘤T细胞应答的诱导相关。我们提取肿瘤并处理它们用于流式细胞分析,如实验11中的。结果(图23)确实证实,TNF- α 表达也促进肿瘤特异性T细胞在肿瘤部位的扩增,极力主张有助于所提出的技术。

[0223] 图28-32、36和48示出了本发明的方法和机制。

[0224] 实验15(两种不同腺病毒载体和OT1(Ad-mTNFa/Ad-mIL2+OT1)的组合实验):

[0225] 模型:

[0226] 有B16-OVA的C57BL/6(每只动物 0.25×10^6 个细胞)

[0227] 组:

[0228] Ad5-CMV-mTNFa(1×10^9 VP)

[0229] Ad5-CMV-mIL2(1×10^9 VP)

[0230] Ad5-CMV-mTNFa+Ad5-CMV-mIL2($0.5+0.5 \times 10^9$ VP)

[0231] Ad5-CMV-mTNFa+OT1

[0232] Ad5-CMV-mIL2+OT1

[0233] Ad5-CMV-mTNFa+Ad5-CMV-mIL2+OT1

[0234] Ad5Luc1+OT1

[0235] 无注射(模拟-模拟)

[0236] Ad5载体是编码小鼠转基因的非复制人腺病毒的载体。利用AdEasy技术(Agilent公司)制作构建体;转基因盒(由CMV启动子驱动)在缺失的E1区中(参见例如Diaconu I等Cancer Res.2012 May 1;72(9):2327-38)。

[0237] 组大小:

[0238] $n=9$

[0239] 订购100只

[0240] 治疗方案:

[0241] OT1细胞:在第1天每只动物腹腔内注射 1.5×10^6 (与之前的实验中相同的量,不是 2×10^6)

[0242] 病毒注射:对于单种试剂:在第1天及此后每周 1×10^9 个病毒颗粒(OD260);对于组合:在第1天及此后每周 0.5×10^9 VP+ 0.5×10^9 VP

[0243] 端点:肿瘤体积(第一个星期每2天,然后每3天,测量一次)

[0244] 支持本发明的其他实验:

[0245] 几个动物实验支持本发明。首先我们筛选最佳的细胞因子候选物,以利用细胞因子的重组鼠形式与过继T细胞转移结合(图49)。一种或多种细胞因子选自以下组:干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 、补体C5a、GMCSF、IL-2、TNF α 、CD40L、IL12、IL-23、IL15、IL17、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7和XCL2。包含细胞因子转基因或两种转基因的病毒基因组的一般排列的示意图示于图33和34中。图35示出了2A的核苷酸和氨基酸序列。包含转基因C5a、hCD40L、hIFNa2、hIFNb1、hIFNg1、hIL2或TNF α 的病毒载体的核苷酸序列分别示于SEQ ID NO 1-7中(Ad5/3-E2F-D24-转基因)。此外,包含两种转基因(一种是IL-2,另一种是C5a、CD40L、IFNa2、IFNb、IFNg、GMCSF或肿TNFa)的核苷酸序列示于SEQ ID NO 8-21中(SEQ ID NO:8 C5a-2A-IL2、SEQ ID NO:9 IFNa-2A-IL2、SEQ ID NO:10 TNFa-2A-IL2、SEQ ID NO:11 CD40L-2A-IL2、SEQ ID NO:12 IFNb-2A-IL2、SEQ ID NO:13 GMCSF-2A-IL2、SEQ ID NO:14 IFNg-2A-IL2、SEQ ID NO:15 C5a-IRES-IL2、SEQ ID NO:16 IFNa-IRES-IL2、SEQ ID NO:17 TNFa-IRES-IL2、SEQ ID NO:18 CD40L-IRES-IL2、SEQ ID NO:19 IFNb-IRES-IL2、SEQ ID NO:20 GMCSF-IRES-IL2、SEQ ID NO:21 IFNg-IRES-IL2)(Ad5/3-E2F-D24-转基因IRES/2A-转基因)。

[0246] 选择最好候选物中的一些用于细胞因子/病毒组合实验,其中方案大致保持不变,所有的小鼠接受腹腔内注射富含CD8a+的OT-I淋巴细胞和与腺病毒混合的所选细胞因子的瘤内治疗。另外,利用我们现有的编码小鼠细胞因子或在小鼠中具有证明的活性的人细胞因子的复制缺陷型腺病毒,进行单独的运输实验(图50)。RD表示复制缺陷型病毒。基于这些实验,即使在诊所中,也可以选择并进一步分析最终的细胞因子候选物(一种或多种)。

[0247] 实验结果表明:a)进入肿瘤的病毒注射导致T细胞向肿瘤的运输增强,b)病毒注射导致肿瘤中的MHC1表达增强,c)危险信号被激活,导致较少的耐受性和免疫抑制,d)病毒注射之后T细胞在肿瘤处繁殖。重要的是,增加细胞因子作为转基因增强了这些作用中的每一种。值得注意的是,双转基因进一步增强了效果。因此,细胞因子武装的溶瘤腺病毒的瘤内注射以协同方式增强了过继细胞转移的效果,超过单独利用病毒载体或过继细胞转移能够实现的效果。

[0248] 为了研究过继转移之后的T细胞运输和生物分布,进行SPECT/CT成像实验(图51)。富含CD8a+的OT-I淋巴细胞用¹¹¹In放射性标记并过继转移到受体小鼠中。

[0249] 由于氧化铟的半衰期相对较短(2.83天),所以用于成像的最大监视周期局限于7天。由于这种限制,将细胞标记为两个批次并在两个不同的时间点转移到小鼠中。来自第一批次的成像数据涵盖了0-7天的运输事件,而第二批次使我们能够在病毒后的第8-14天观察肿瘤中的情况。

[0250] 溶瘤Ad3病毒(图37-40,SEQ ID NO 30和31(Ad3-hTERT-E3del-CMV-CD40L和Ad3-hTERT-E3del-E2F-CD40L))

[0251] 克隆策略:

[0252] 1.含有相应的表达盒的Ad3的3'端质粒的构建,此质粒含有Ad3基因组的3' ITR, Ad3基因组的从29892到30947的E3区被表达盒取代。(注:我们利用Ad3基因组中的接近3'端的EcoRI限制位点)

[0253] 2.Ad3的5'端质粒的构建,该质粒含有5' ITR和hTERT-E1。(注:我们利用Ad3基因组中的独特限制位点NotI和接近5'端的NheI限制位点)

[0254] 3.pWEA-Ad3-hTERT-CMV-CD40L和pWEA-Ad3-hTERT-E2F-CD40L的构建(注:我们利用噬菌体包装系统)

[0255] 含有相应表达盒的Ad3的3'端质粒的构建:

[0256] 1.PCR扩增E2F启动子,正向引物:5' AAAttaattaatggtaccatccggacaaagc3' (SEQ ID NO:22),反向引物:5' TTTgctagcggcgagggtcgatcc3' (SEQ ID NO:23)。克隆进TA载体pGEM-T(Promega公司)→pGemT-E2F

[0257] 2.PCR扩增CD40L片段,正向引物:5' TAGCTGCTAGCATGATCGAAACATACAAC3' (SEQ ID NO:26),反向引物:5' GTCAATTTGGGCCCTCAGAGTTTGAGTAAGCCAA3' (SEQ ID NO:27)。克隆进pGEM-T→pGemT-CD40L。

[0258] 3.我们含有CMV-GFP的Ad3 3'端质粒(pWEA-Ad3-3'端-CMVGFP)用NheI/ApaI消化以除去GFP,pGemT-CD40L用NheI/ApaI消化→pWEA-Ad3-3'端-CMV-CD40L。

[0259] 4.pWEA-Ad3-3'端-CMV-CD40L中的CMV启动子被E2F启动子替换(pGemT-E2F用PacI/NheI消化)→pWEA-Ad3-3'端-E2F-CD40L。

[0260] 含有hTERT-E1的Ad3 5'端质粒的构建:

[0261] 1.PCR从pKBS2-hTERT(来自Ad3-hTERT-E1A纸的质粒)扩增Ad3基因组的5'端,正向引物5' gtcag-tttaaaccttaggccggccctatctatataatataccttatagatggaatgg3' (SEQ ID NO:28),反向引物5' CTTATCAGCAGCTAGCAGCATAGAATCAG3' (SEQ ID NO:29)。克隆进pGem-T→pGemT-Ad3-5'端-hTERT。

[0262] 2.质粒pWEA-Ad3(其含有整个ad3基因组)用FseI/NotI消化,含有Ad3基因组的5'端的13.2kb片段被克隆进由pBluescript KS(-)修饰的载体(SacI和XbaI之间的限制位点被修饰为SacI-PmeI-MluI-FseI-SalI-NotI-XbaI)→pBS-Ad3-5'端。

[0263] 3.质粒pBS-Ad3-5'端用PmeI/NheI消化,含有5' ITR的~800bp片段被来自pGemT-Ad3-5'端-hTERT的相应PmeI/NheI片段取代→pBS-Ad3-5'端-hTERT。

[0264] pWEA-Ad3-hTERT-CMV-CD40L和pWEA-Ad3-hTERT-E2F-CD40L:

[0265] 1.质粒pWEA-Ad3-hTERT-E2F-用EcoRI消化以除去3'端基因组,并与含有来自

pWEA-Ad3-3'端-CMV-、pWEA-Ad3-3'端-CMV-CD40L和pWEA-Ad3-3'端-E2F-CD40L的表达盒的相应片段连接。

[0266] 2.利用Gigapack III和包装提取物(Stratagen)将连接包装到噬菌体中并传播(X11蓝菌株)

[0267] 体外测试Ad3病毒的功能性,并在图41中示出结果。所有的新病毒都是功能性的并且能感染肿瘤细胞系。

[0268] 还在CHO-K7上测试了病毒,但它们显示出在TCID₅₀期间对这些细胞的活力没有影响。这可能是由于这些仓鼠细胞的表面上缺乏人样桥粒芯蛋白-2。

[0269] AD3载体的体内结果

[0270] 所有的动物实验都经赫尔辛基大学实验动物委员会和芬兰南部省政府批准。经常监测小鼠的健康状况,一旦注意到疼痛或痛苦的信号,就将小鼠安乐死。使用追踪重症联合免疫缺陷小鼠的雌性狐(查尔斯河)。

[0271] 通过在300ml纯达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco modified Eagle's medium)中的 5×10^6 个SKOV3-Luc细胞腹腔内注射到重症联合免疫缺陷小鼠($n=5$ 每组)中来发展腹腔播散性卵巢癌的原位模型。3天后,对小鼠进行非侵入性成像并通过对每只小鼠腹腔内注射PBS或在PBS中的109VP进行治疗。在第3、7、14、21和25天利用IVIS 100(Xenogen, Alameda, CA)对小鼠成像以估计小鼠中的肿瘤细胞的数量。对于生物发光成像,腹腔内注射150mg/kg D-荧光素(Promega公司),并且之后在10秒的曝光时间,1f(光圈值)/stop(步进),中等面元(medium binning)和开式滤光器(open filter)下拍照10分钟。在成像过程中,小鼠处于异氟烷气体麻醉中。用Living Image 2.50(Xenogen公司)将图像叠加。通过绘制小鼠腹腔区域周围的感兴趣区域来测量总通量(光子/秒)。减去背景。

[0272] 图45示出了Ad3基病毒在体内的抗肿瘤疗效。

[0273] MTS细胞增殖试验(图42-44)

[0274] 在第一天,将每孔105个细胞(A549,PC3-MM2或SKOV3-luc)接种到100 μ l生长培养基(GM)中的96孔板中,所述生长培养基含有5%的FBS。在第二天,用含5%FBS的GM将单层洗涤一次。然后用不同的病毒以每细胞100、10、1、0.1和0个病毒颗粒的剂量感染细胞。其后,将细胞在摇摆机上培养1小时,然后用GM洗涤。在增加新的5%的GM之后,将细胞留在培养箱中,并且每四天更换一次GM。在测试病毒之一的细胞病变效应达到100%的最高浓度之后,通过加入mts试剂(Promega公司)终止该测试。在培养2小时后,在490nm滤光器处测定吸光度。然后减去背景并分析结果。

[0275] 免疫活性小鼠中编码鼠CD40L的溶瘤腺病毒的治疗窗

[0276] 在免疫活性动物中,静脉内注射后,病毒基因组存在于肿瘤中(图46)。对白化C57小鼠皮下接种小鼠B16-ova细胞,并用5种不同病毒剂量的编码小鼠CD40L的Ad5基病毒进行静脉内治疗(见实验4和15)。收集每组3只动物的肿瘤并储存于-80°C下。提取总DNA,且利用定量PCR研究病毒DNA载荷。病毒E4拷贝数被标准化为具有小鼠B-肌动蛋白引物的基因组DNA。在图46中,每个图标代表一种肿瘤;水平线表示组的中间值。模拟: $n=5$;剂量5: $n=4$;剂量4: $n=4$;剂量3: $n=4$;剂量2: $n=6$;剂量1: $n=2$;瘤内剂量2: $n=4$ 。剂量5: 1×10^{11} VP/小鼠;剂量4: 3×10^{10} VP/小鼠;剂量3: 1×10^{10} VP/小鼠;剂量2: 1×10^9 VP/小鼠;剂量1: 1×10^8 VP/小鼠;阳性对照(瘤内剂量2。)

[0277] 用剂量5,67%的小鼠有肝毒迹象。在无肝毒迹象的情况下,剂量4在瘤内递送之后能够实现良好的肿瘤转导。

[0278] 肝酶释放实验的结果示于图47中。如下进行肝酶释放实验。所有动物协议都由赫尔辛基大学实验动物委员会和芬兰南部省政府审查和批准。对三到四周龄的雌性白化C57小鼠(Harlan实验室,荷兰)在两侧翼皮下注射 2.5×10^5 个B16-ova细胞,并随机分成7组(3只小鼠/组)。以 10^8 - 10^{11} 个病毒颗粒(VP)/小鼠(剂量1-剂量5)静脉内注射在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释的Ad5/3CMV-mCD40L病毒。一个治疗组瘤内接受剂量2(10^9 VP/细胞)作为阳性对照。在任何程序之前麻醉动物,并每天监测健康状况。病毒注射48h后,小鼠被处死并通过心脏穿刺采集血液。通过以5000rpm离心10分钟对血样离心而分离血清。在赫尔辛基临床化学核心大学利用西门子ADVIA 1650生化分析仪将血清样本中的谷丙转氨酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)的水平(单位/升)定量。由分析排除溶血样本,因为血清溶血可能干扰试验(错误的高ALT和AST水平)。所述条示出了平均值+SEM。

[0279] 参考文献

[0280] Blair GE,Dixon SC,Griffiths SA,Zajdel ME.Restricted replication of human adenovirus type 5 in mouse cell lines.Virus Res.1989 Dec;14(4):339-46.

[0281] Ekkens MJ,Shedlock DJ,Jung E,Troy A,Pearce EL,Shen H,Pearce EJ.Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses.Infect Immun.2007 May;75(5):2291-6.

[0282] Kratky W,Reis e Sousa C,Oxenius A, **Spörri** R.Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8+T-cell priming and tumor vaccination.Proc Natl Acad Sci U S A.2011 Oct 18;108(42):17414-9.

[0283] Lugade AA,Sorensen EW,Gerber SA,Moran JP,Frelinger JG,Lord EM.Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity.J Immunol.2008 Mar 1;180(5):3132-9.

[0284] Propper DJ,Chao D,Braybrooke JP,Bahl P,Thavasu P,Balkwill F,Turley H,Dobbs N,Gatter K,Talbot DC,Harris AL,Ganesan TS.Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma.Clin Cancer Res.2003 Jan;9(1):84-92.

[0285] Schroder K,Hertzog PJ,Ravasi T,Hume DA.Interferon-gamma:an overview of signals,mechanisms and functions.J Leukoc Biol.2004Feb;75(2):163-89.

[0286] Street D,Kaufmann AM,Vaughan A,Fisher SG,Hunter M,Schreckenberger C,Potkul RK,Gissmann L,Qiao L.Interferon-gamma enhances susceptibility of cervical cancer cells to lysis by tumor-specific cytotoxic T cells.Gynecol Oncol.1997 May;65(2):265-72.

[0287] 对于病毒构建体的参考文献

[0288] Blair GE,Dixon SC,Griffiths SA,Zajdel ME.Restricted replication of human adenovirus type 5 in mouse cell lines.Virus Res.1989 Dec;14(4):339-46.

[0289] Ekkens MJ,Shedlock DJ,Jung E,Troy A,Pearce EL,Shen H,Pearce EJ.Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses.Infect Immun.2007 May;75(5):2291-6.

- [0290] Kratky W, Reis e Sousa C, Oxenius A, Spörri R. Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8+T-cell priming and tumor vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 18;108(42):17414-9.
- [0291] Lugade AA, Sorensen EW, Gerber SA, Moran JP, Frelinger JG, Lord EM. Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):3132-9.
- [0292] Propper DJ, Chao D, Braybrooke JP, Bahl P, Thavas P, Balkwill F, Turley H, Dobbs N, Gatter K, Talbot DC, Harris AL, Ganesan TS. Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2003 Jan;9(1):84-92.
- [0293] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004 Feb;75(2):163-89.
- [0294] Street D, Kaufmann AM, Vaughan A, Fisher SG, Hunter M, Schreckenberger C, Potkul RK, Gissmann L, Qiao L. Interferon-gamma enhances susceptibility of cervical cancer cells to lysis by tumor-specific cytotoxic T cells. *Gynecol Oncol*. 1997 May;65(2):265-72.

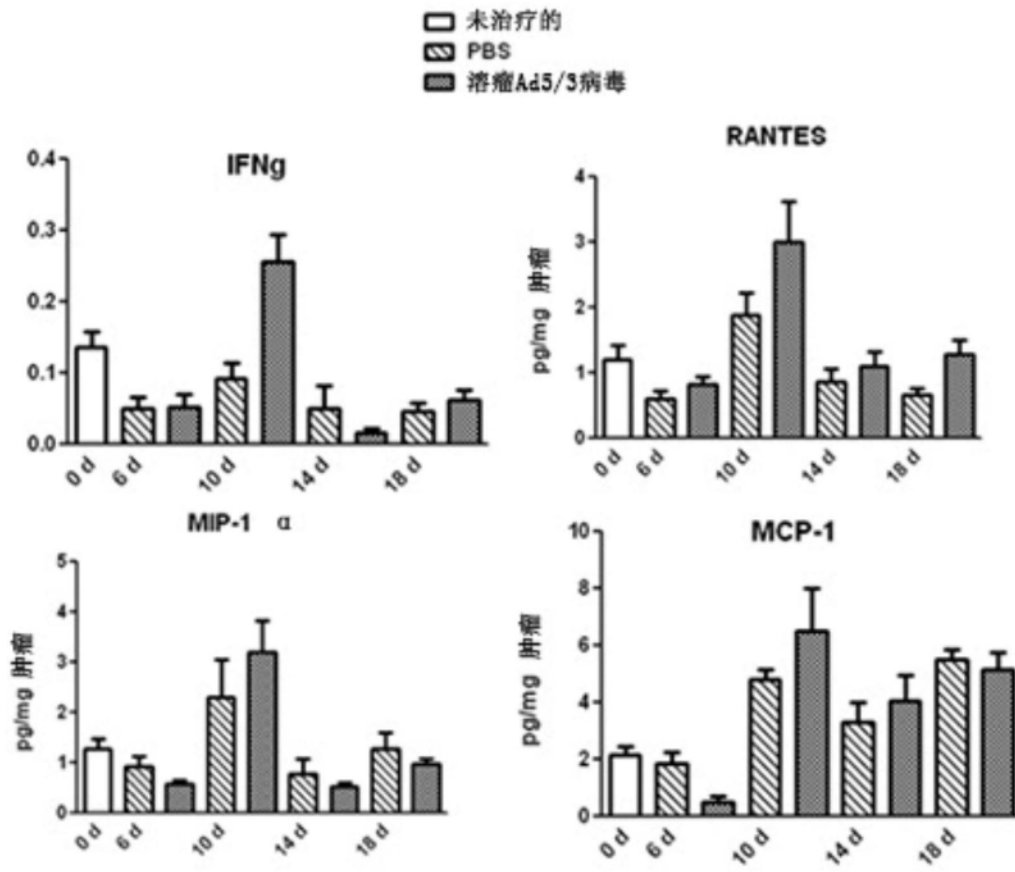


图1

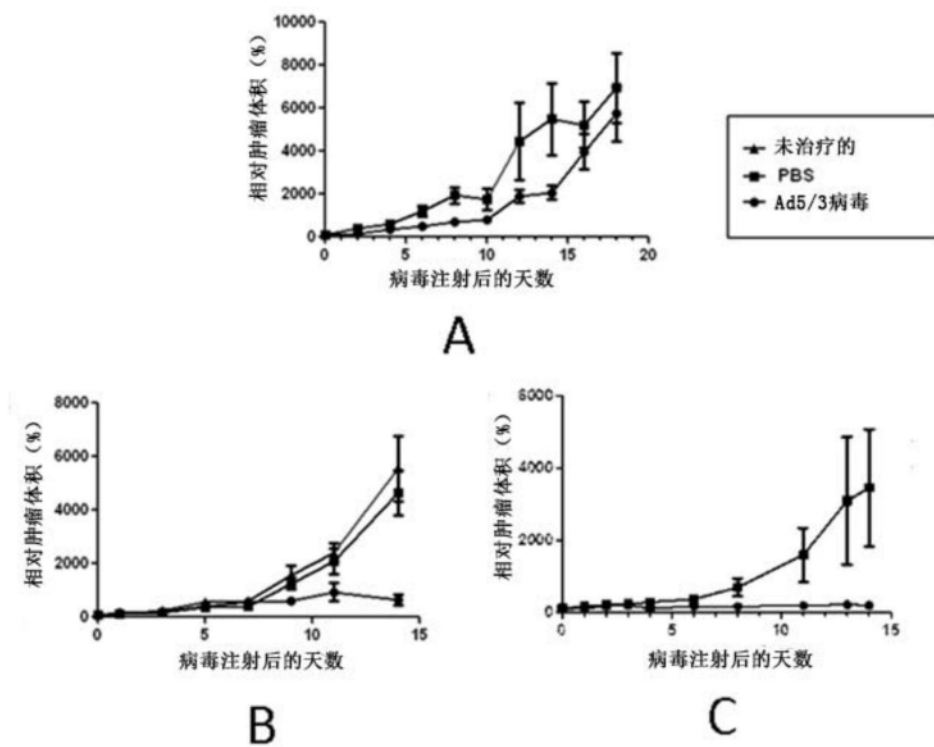


图2

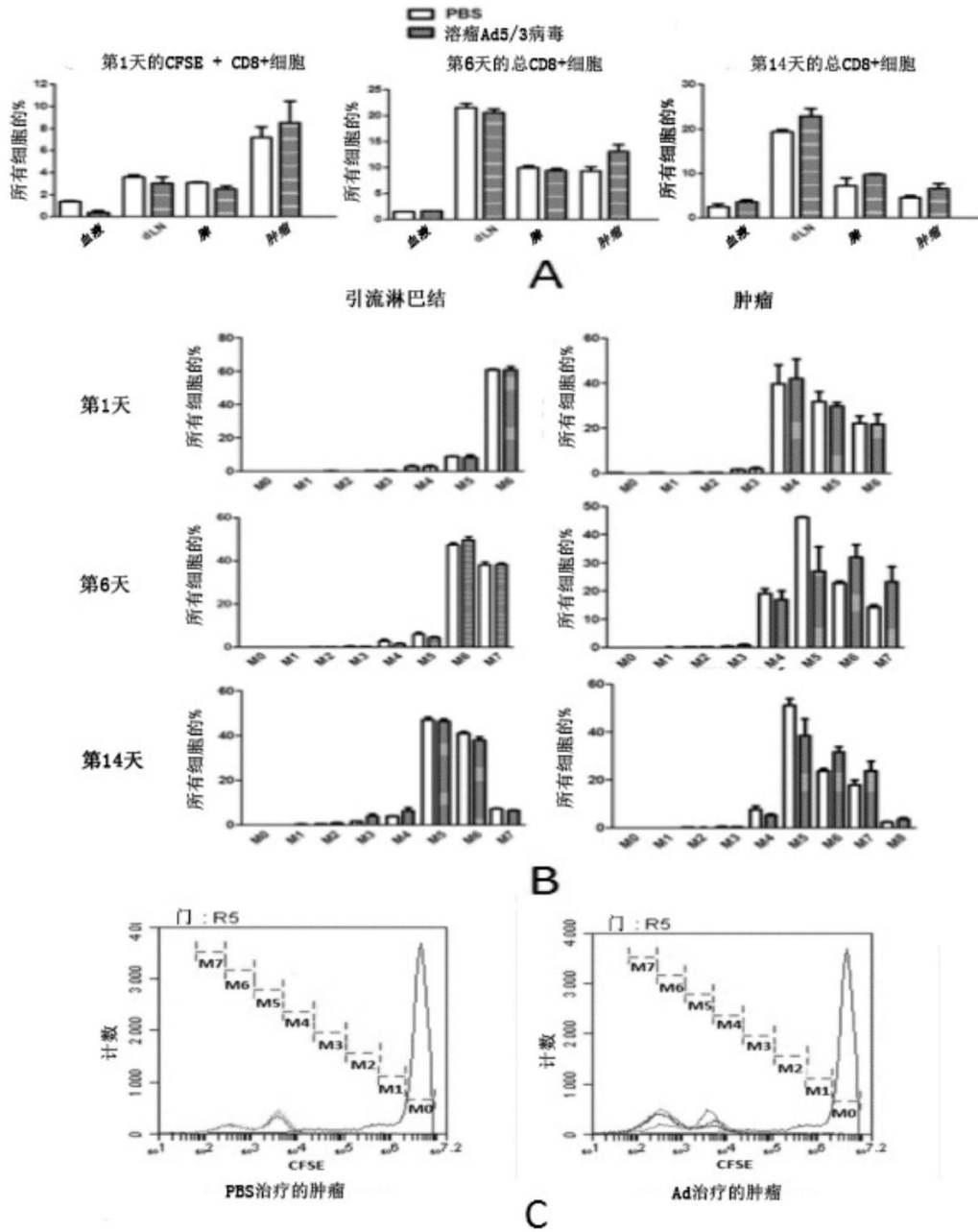


图3

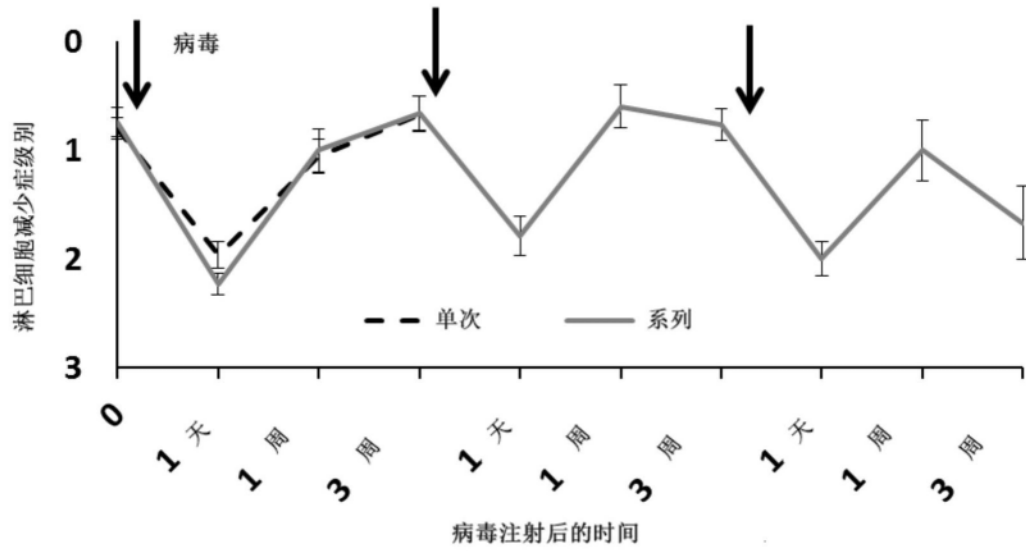


图4

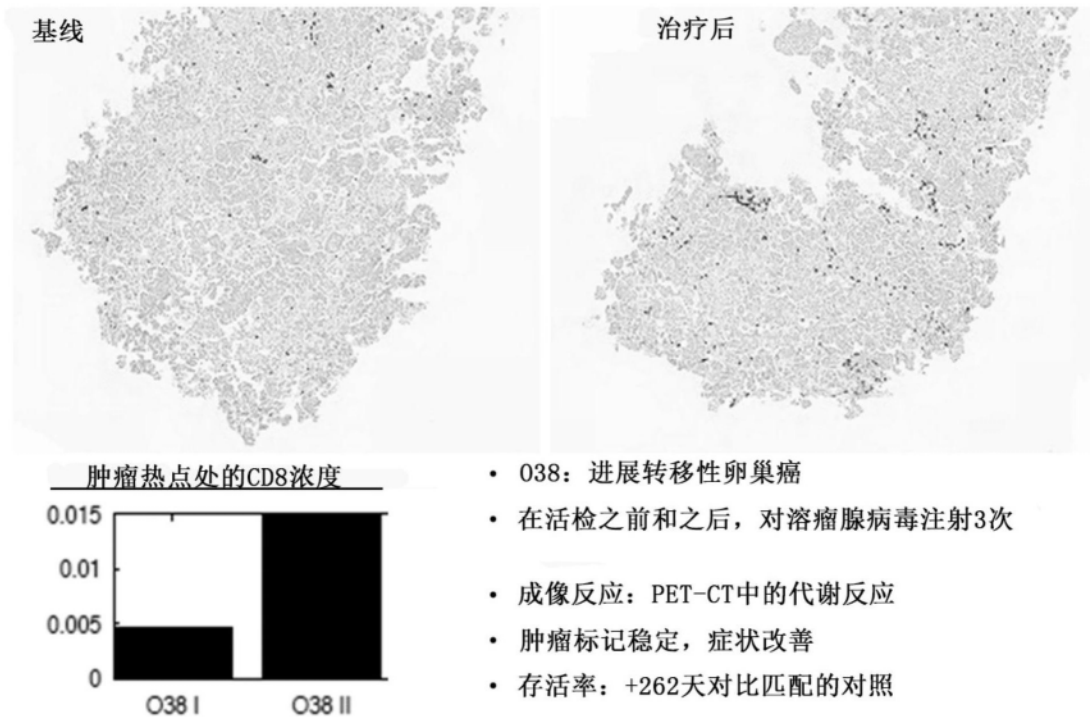


图5

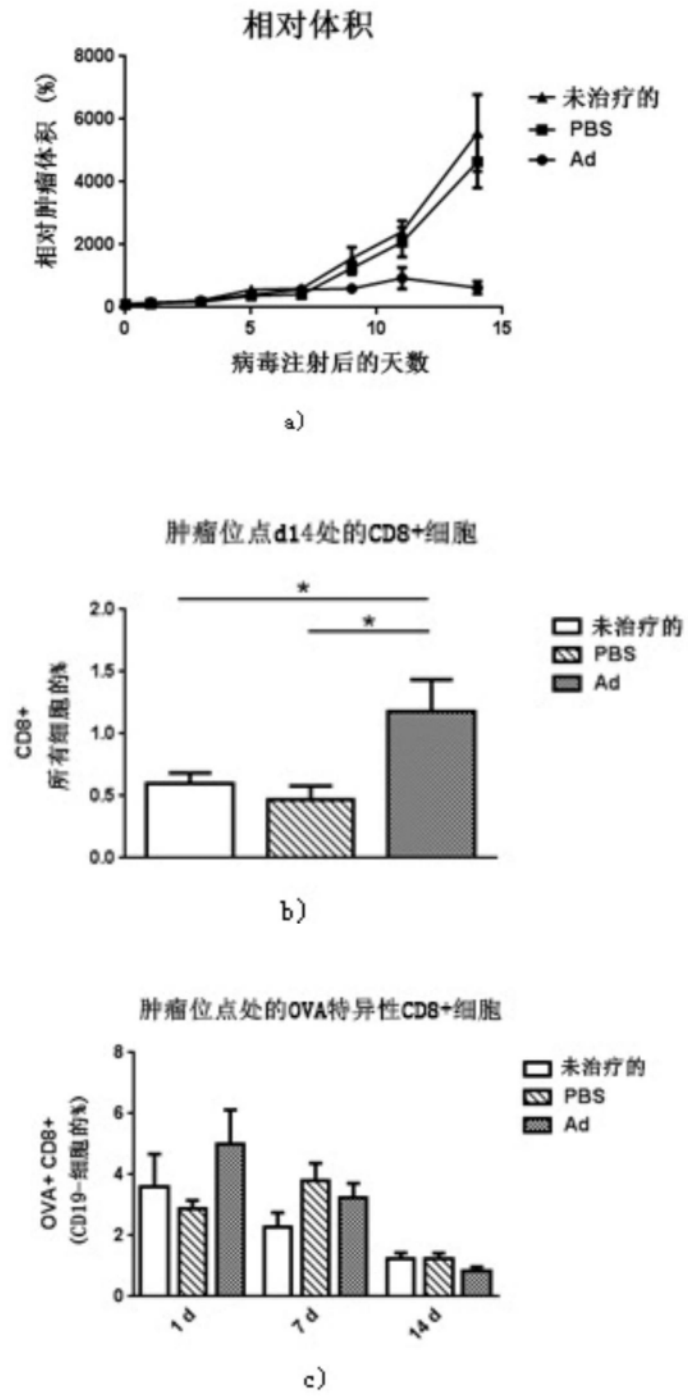


图6

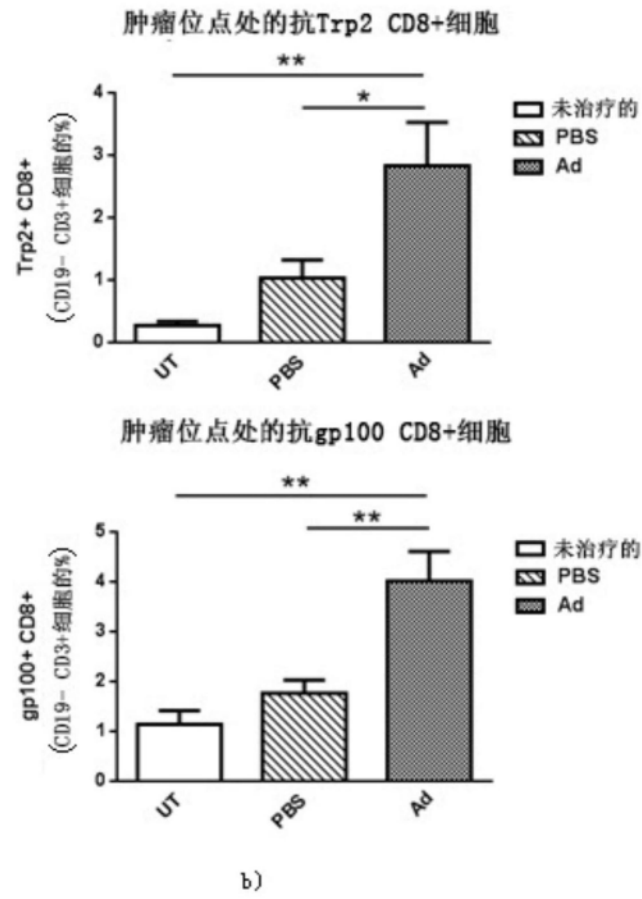


图7

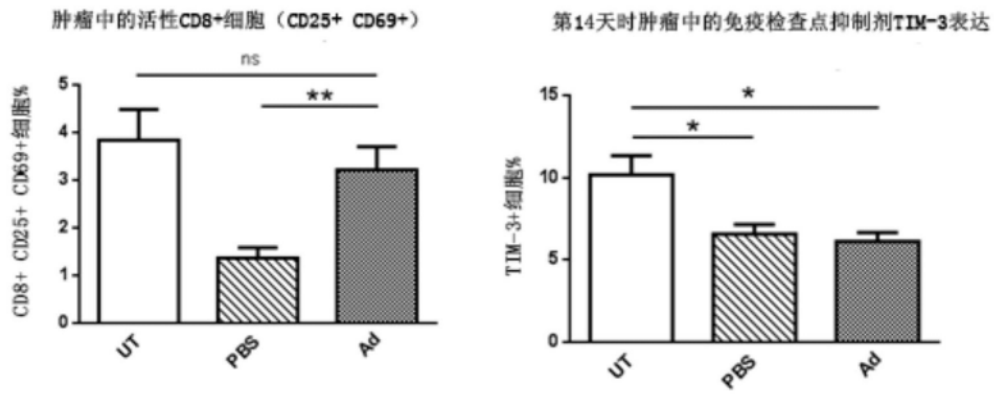
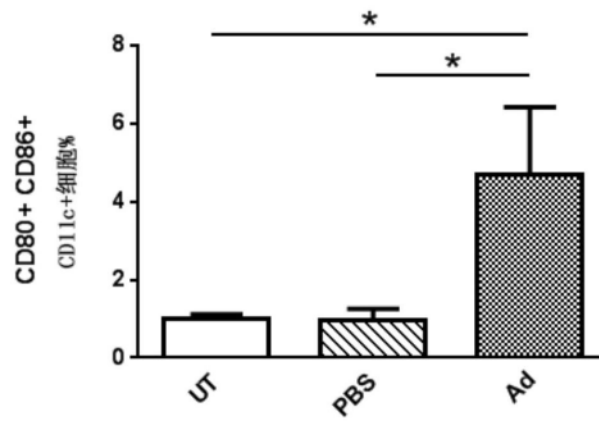


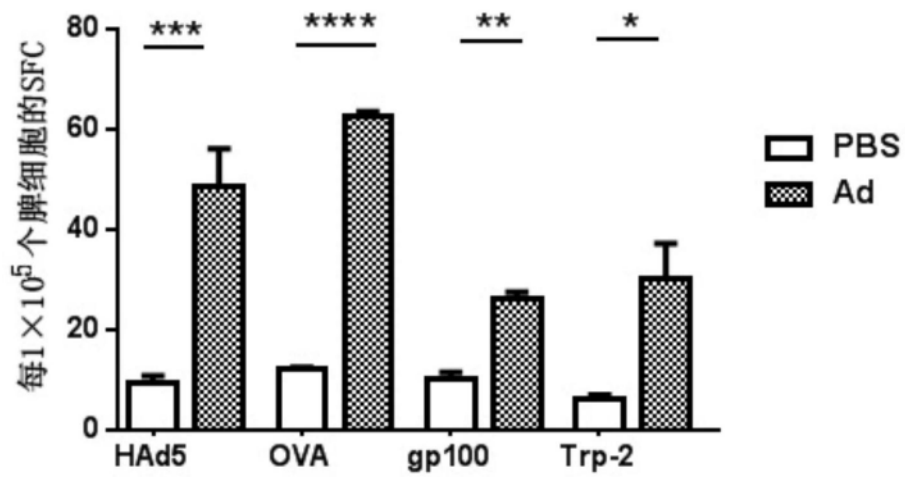
图8

第14天时肿瘤中的树突细胞 (CD11c+ CD80+ CD86+) 上的共刺激分子的表达



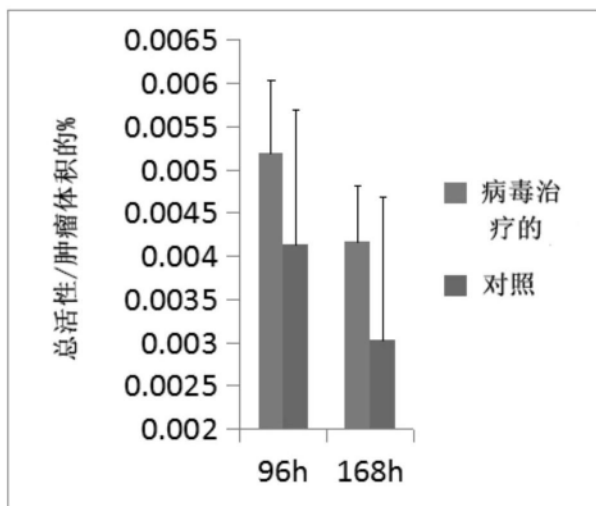
a)

具有脾细胞d14的IFN γ ELISPOT

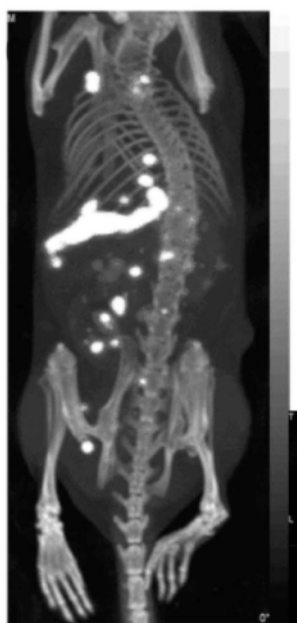


b)

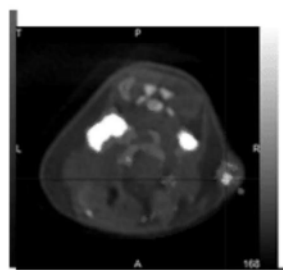
图9



a)



b)



c)

图10a-c

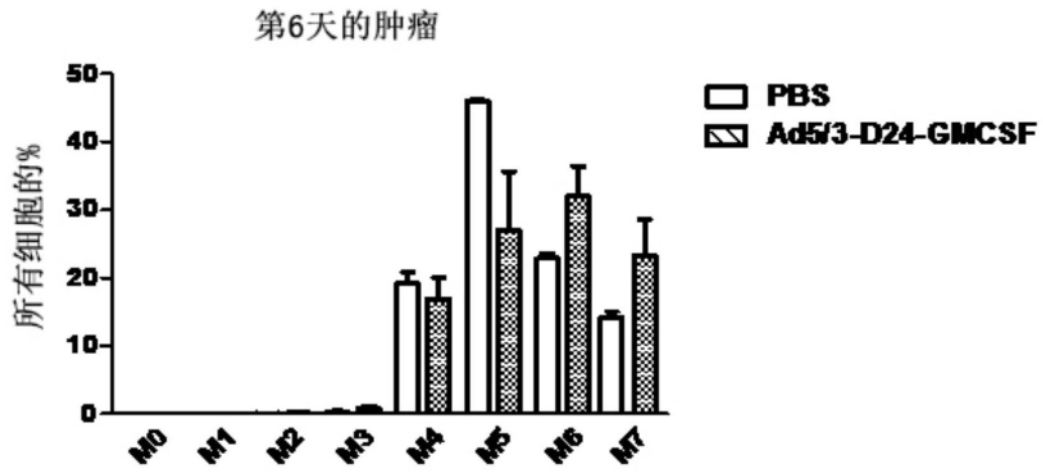


图11

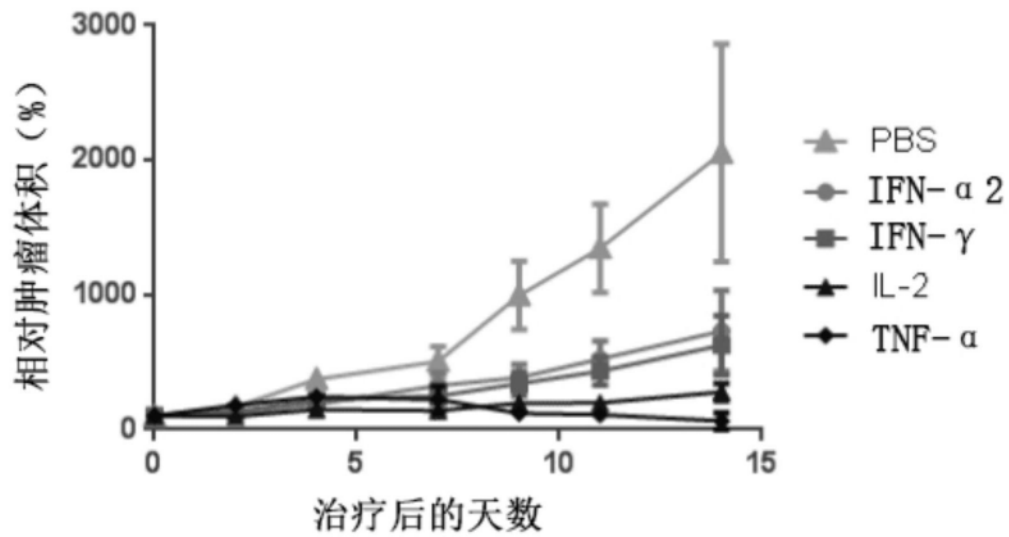
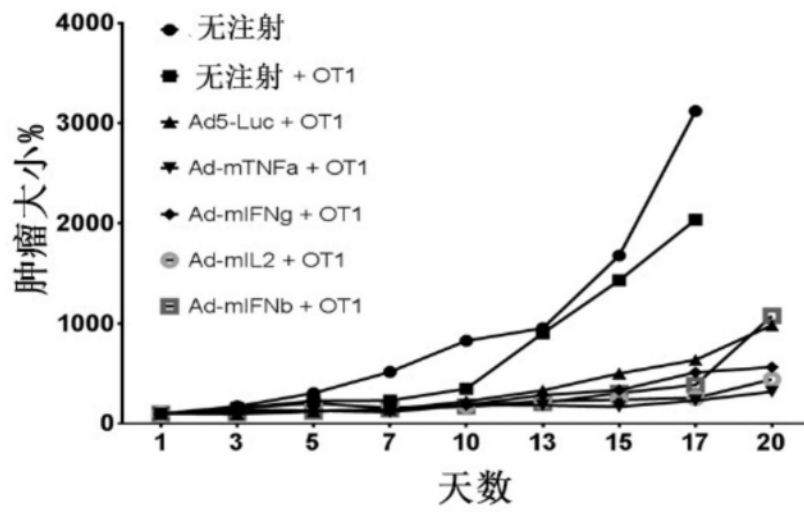


图12

直到第20天的组合对比



	风险数								
	第1天	第3天	第5天	第7天	第10天	第13天	第15天	第17天	第20天
无注射	6	6	6	6	6	5	5	5	2
无注射 + OT1	6	6	6	6	5	5	5	5	3
Ad5-Luc + OT1	5	5	5	5	5	5	5	4	4
Ad-mTNFa + OT1	6	6	6	6	5	5	4	4	4
Ad-mIFNg + OT1	5	5	5	5	5	5	5	5	4
Ad-mIL2 + OT1	5	5	5	5	4	4	4	4	4
Ad-mIFNb + OT1	5	5	5	5	5	5	5	5	5

图13

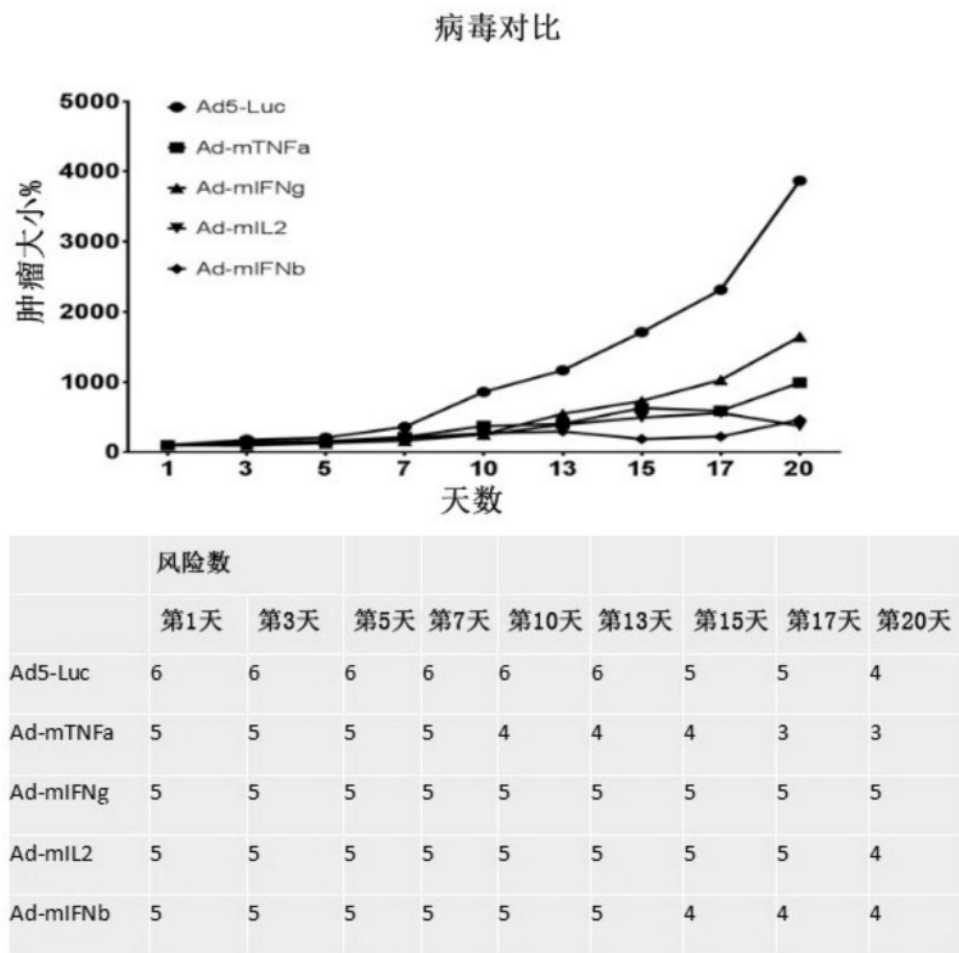
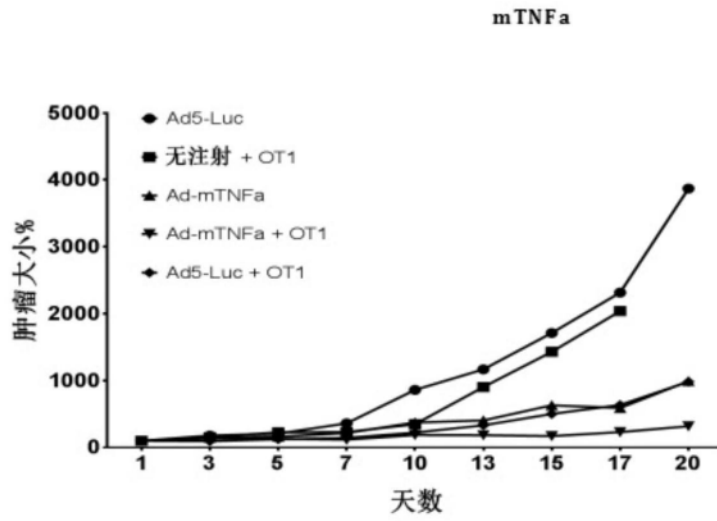
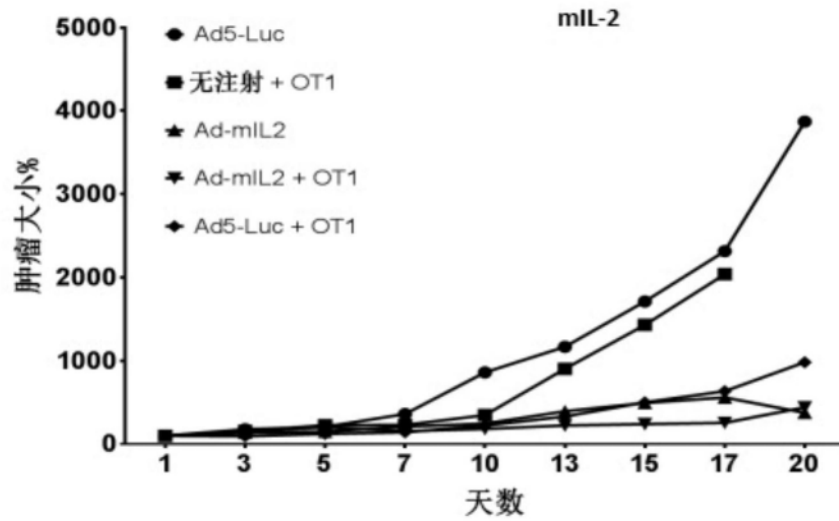


图14



	风险数								
	第1天	第3天	第5天	第7天	第10天	第13天	第15天	第17天	第20天
Ad5-Luc	6	6	6	6	6	6	5	5	4
无注射 + OT1	6	6	6	6	5	5	5	5	3
Ad-mTNFa	5	5	5	5	4	4	4	3	3
Ad-mTNFa + OT1	6	6	6	6	5	5	4	4	4
Ad5-Luc + OT1	5	5	5	5	5	5	5	4	4

图15



	风险数								
	第1天	第3天	第5天	第7天	第10天	第13天	第15天	第17天	第20天
Ad5-Luc	6	6	6	6	6	6	5	5	4
无注射 + OT1	6	6	6	6	5	5	5	5	3
Ad-mIL2	5	5	5	5	5	5	5	5	4
Ad-mIL2 + OT1	5	5	5	5	4	4	4	4	4
Ad5-Luc + OT1	5	5	5	5	5	5	5	4	4

图16

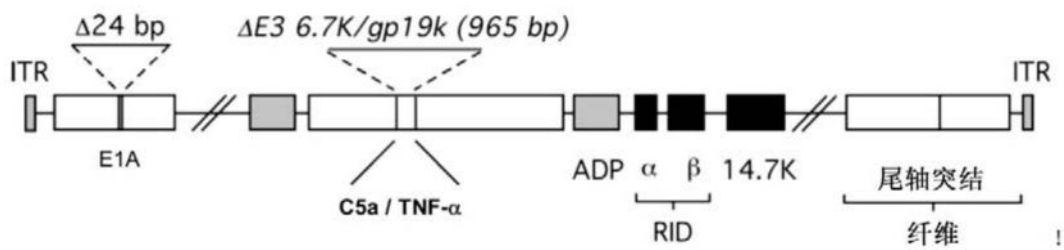


图17

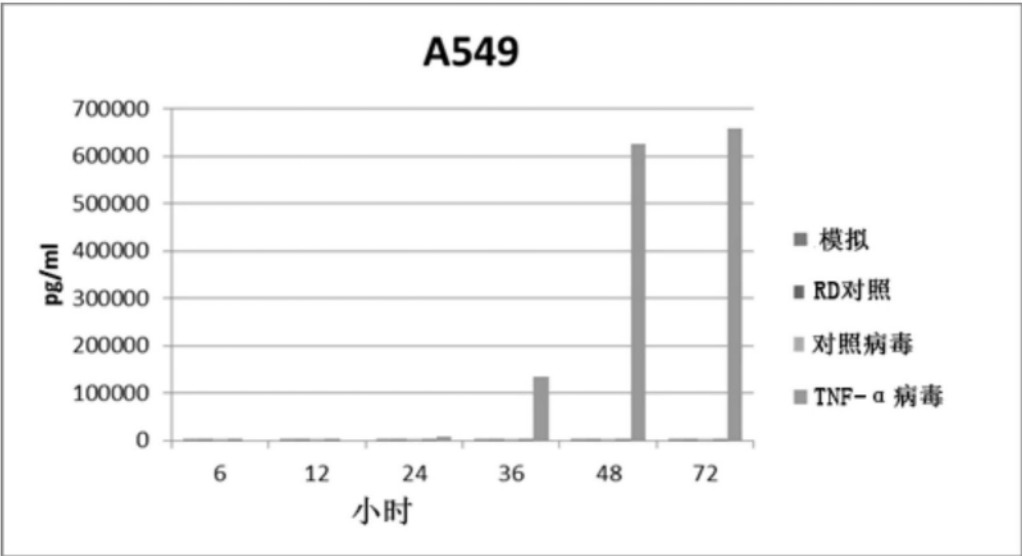


图18

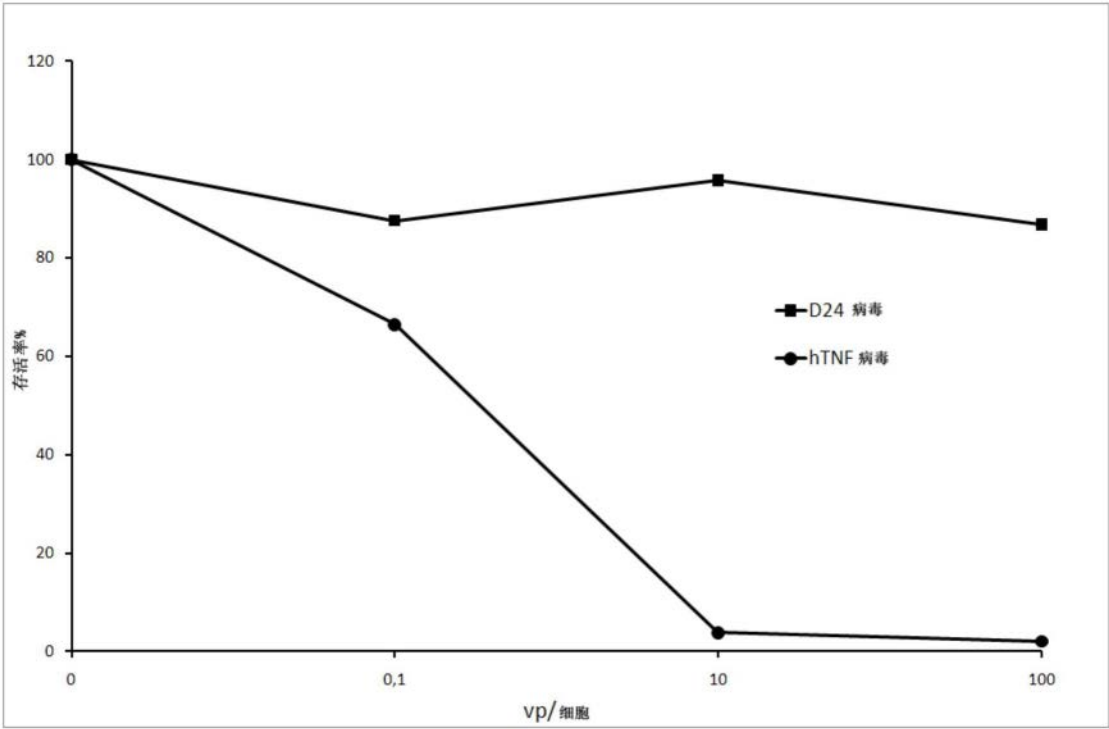


图19

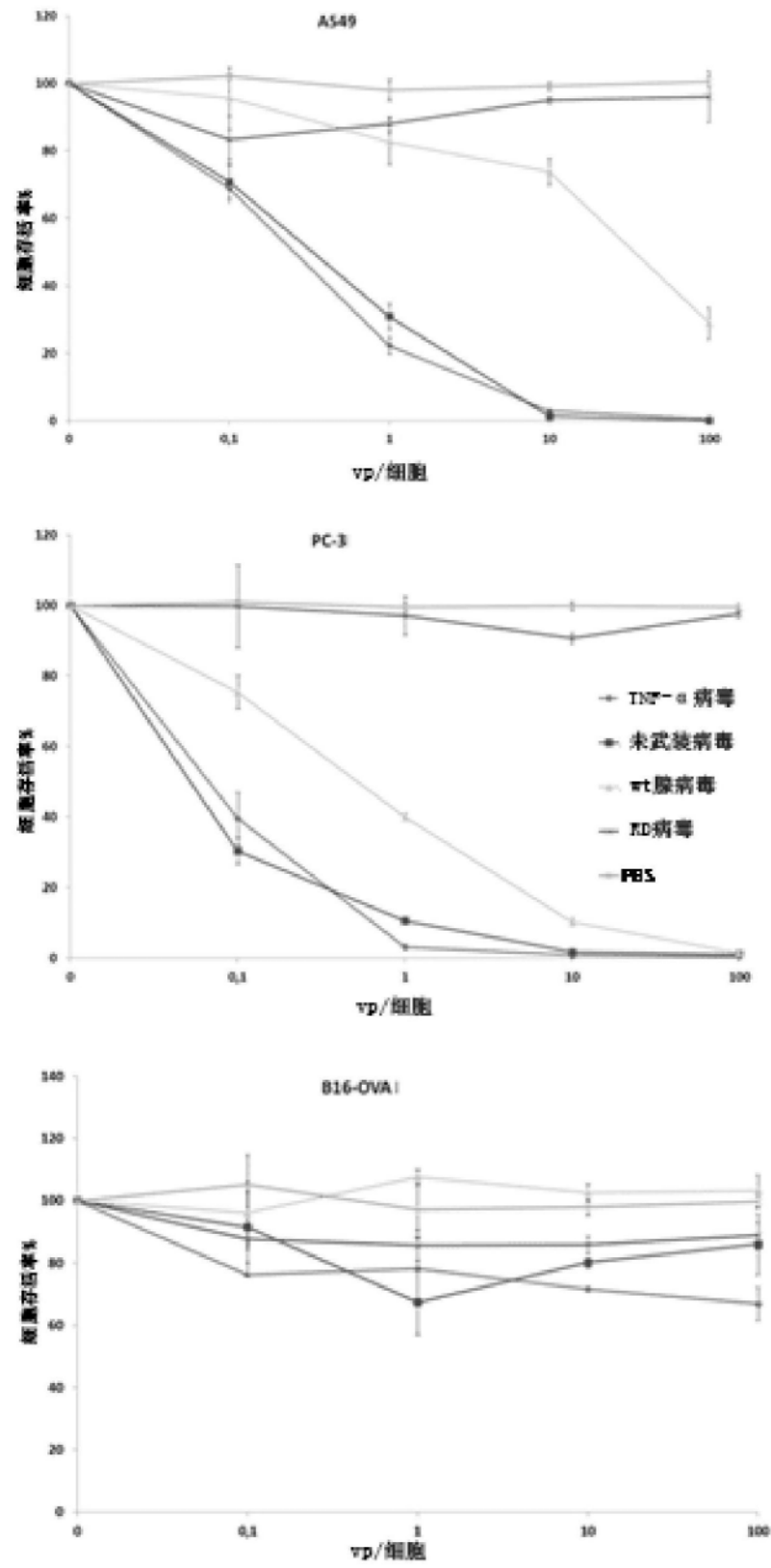


图20

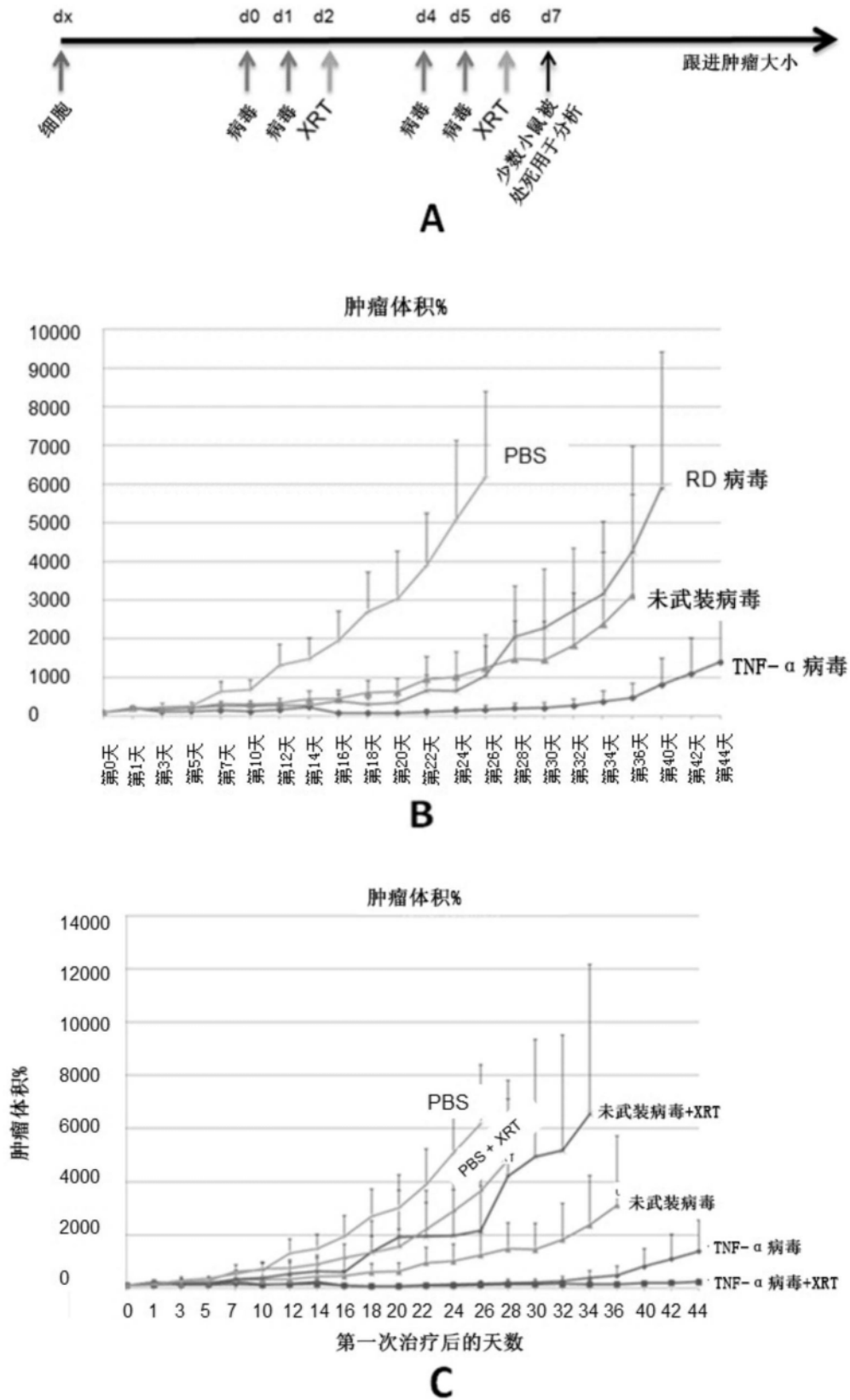


图21

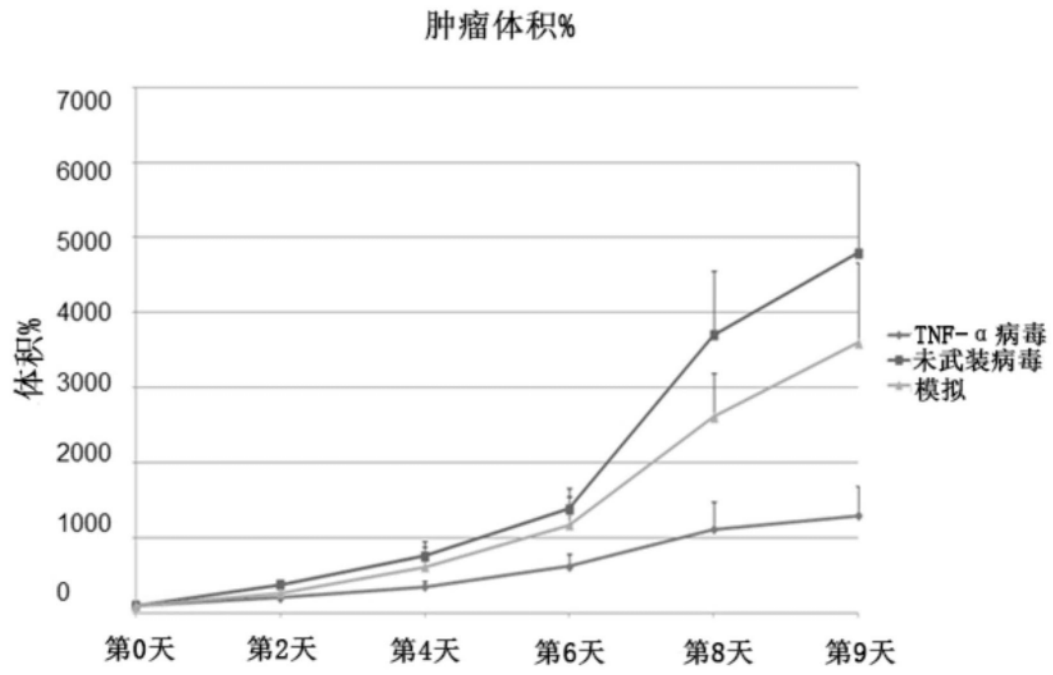


图22

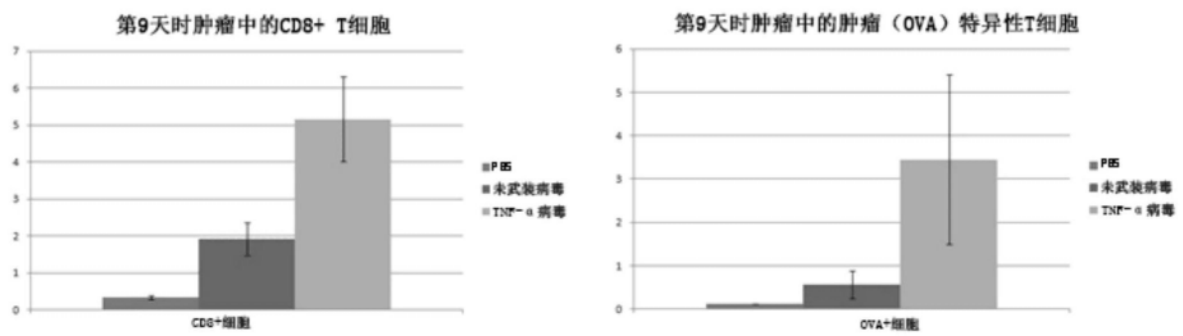


图23

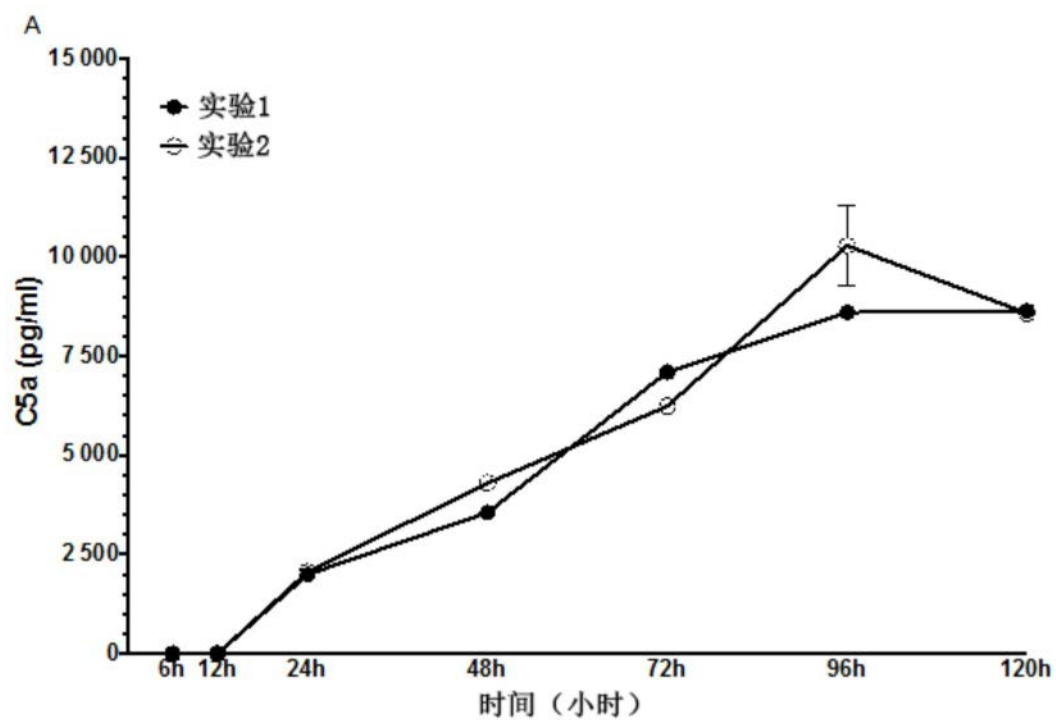


图24

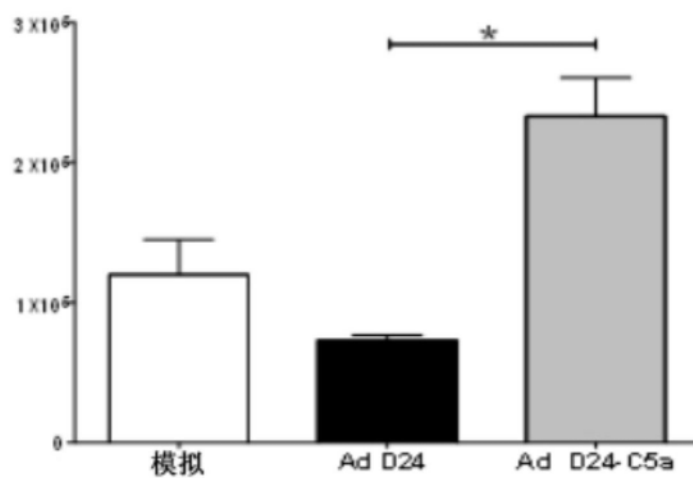


图25

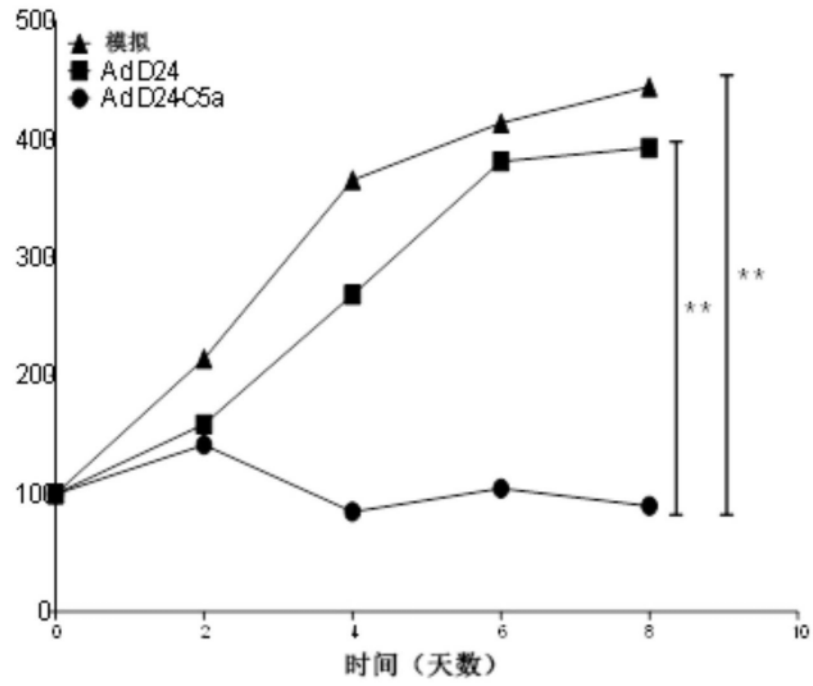


图26

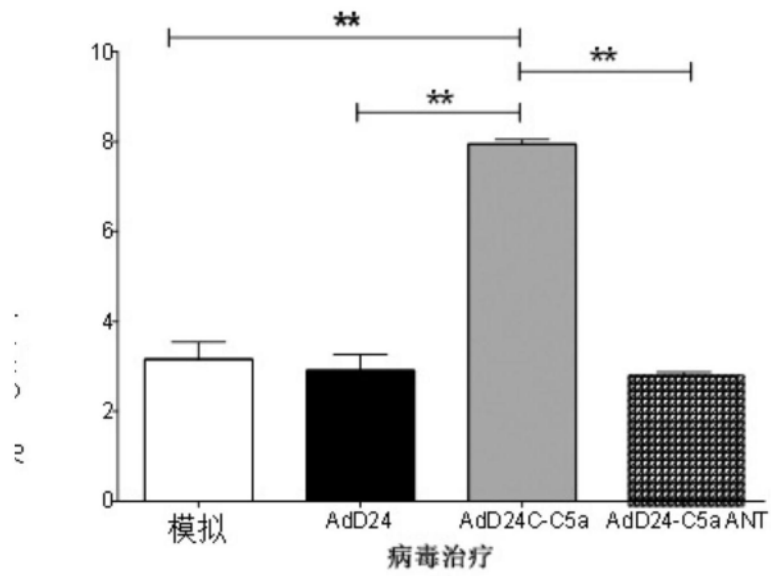


图27

天然的预先存在的抗肿瘤细胞

由肿瘤介导的免疫抑制

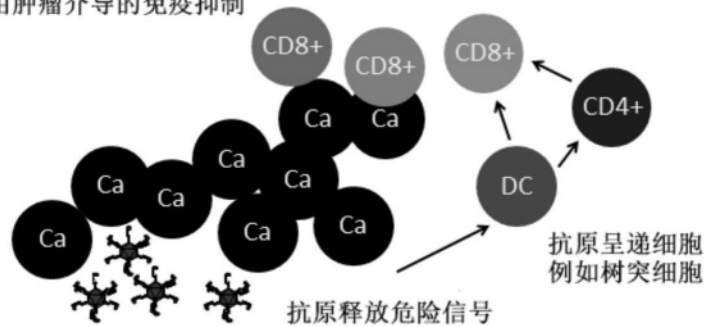


图28

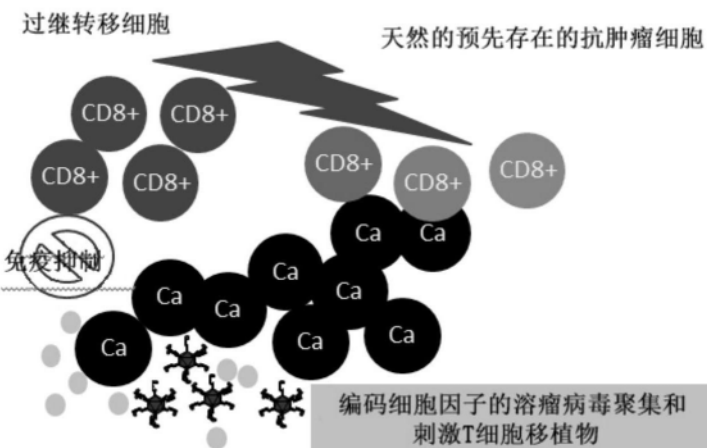


图29

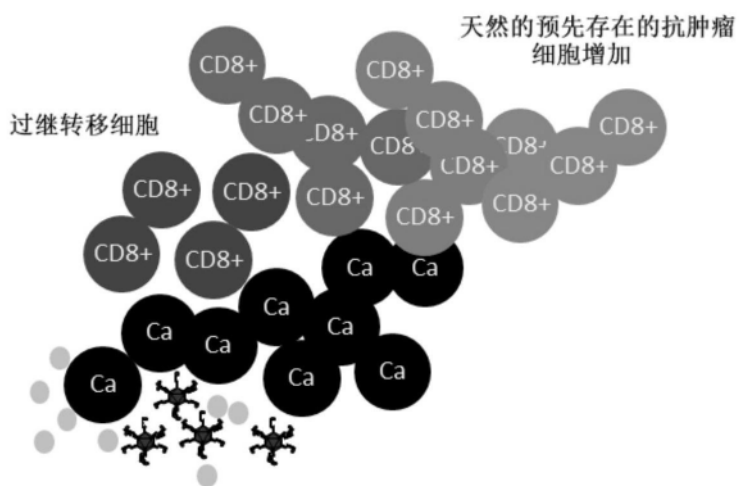


图30

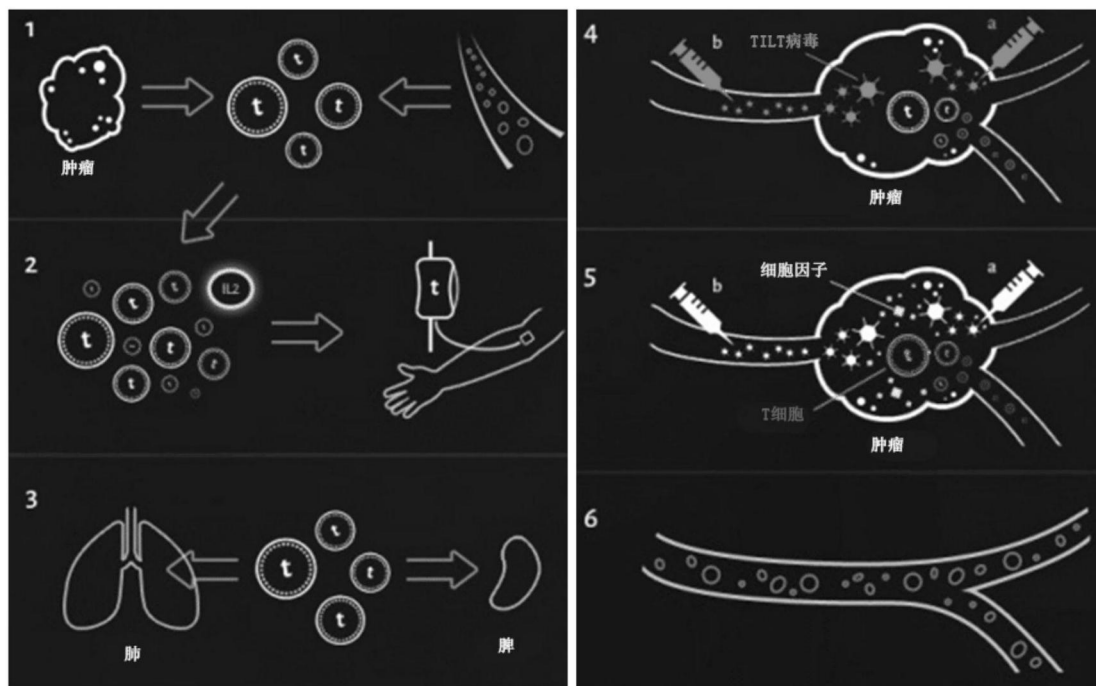
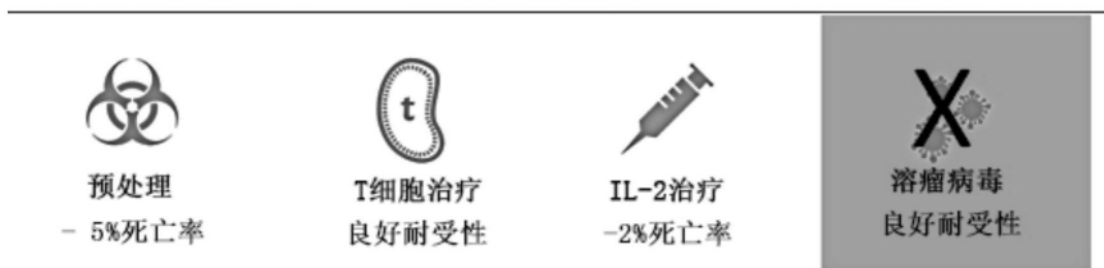


图31

常规T细胞治疗



TILT技术



图32

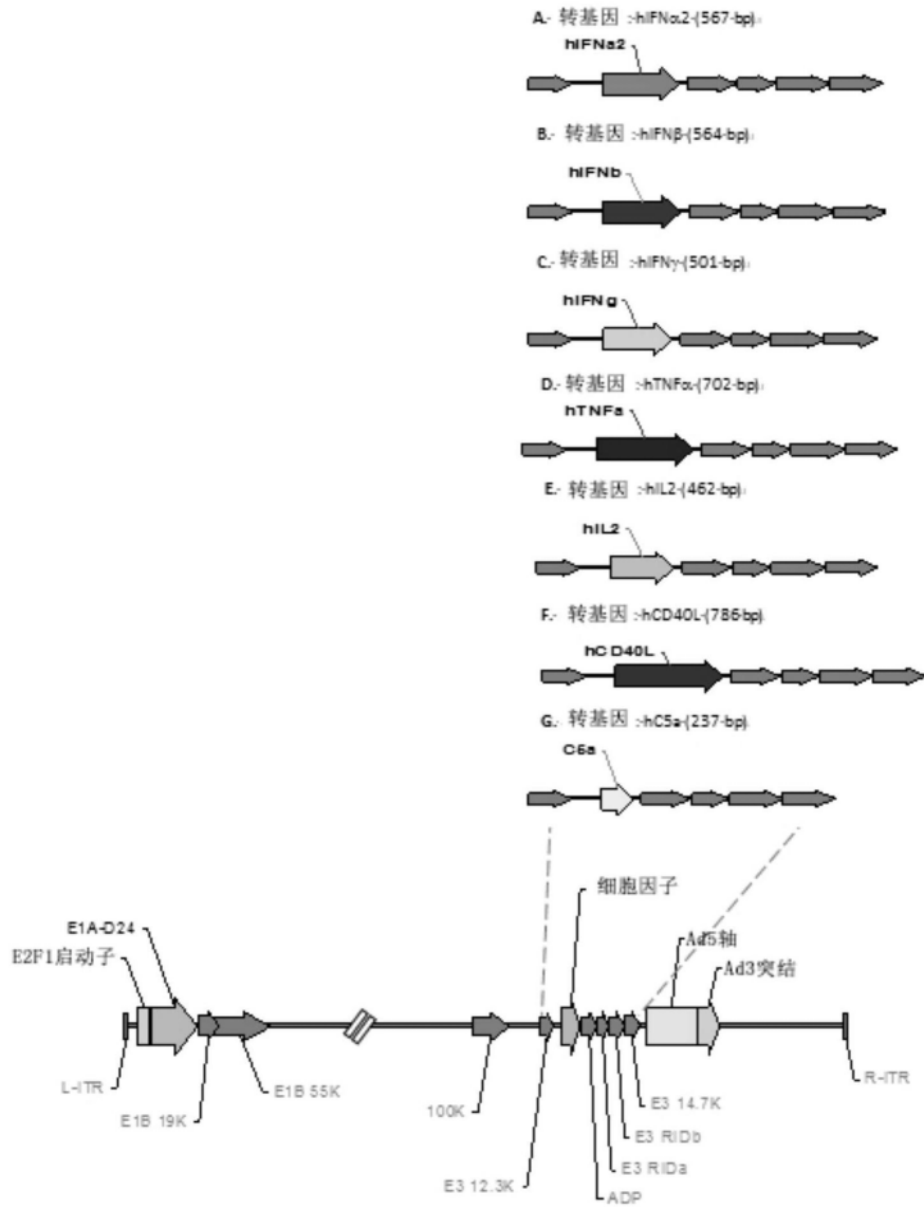


图33

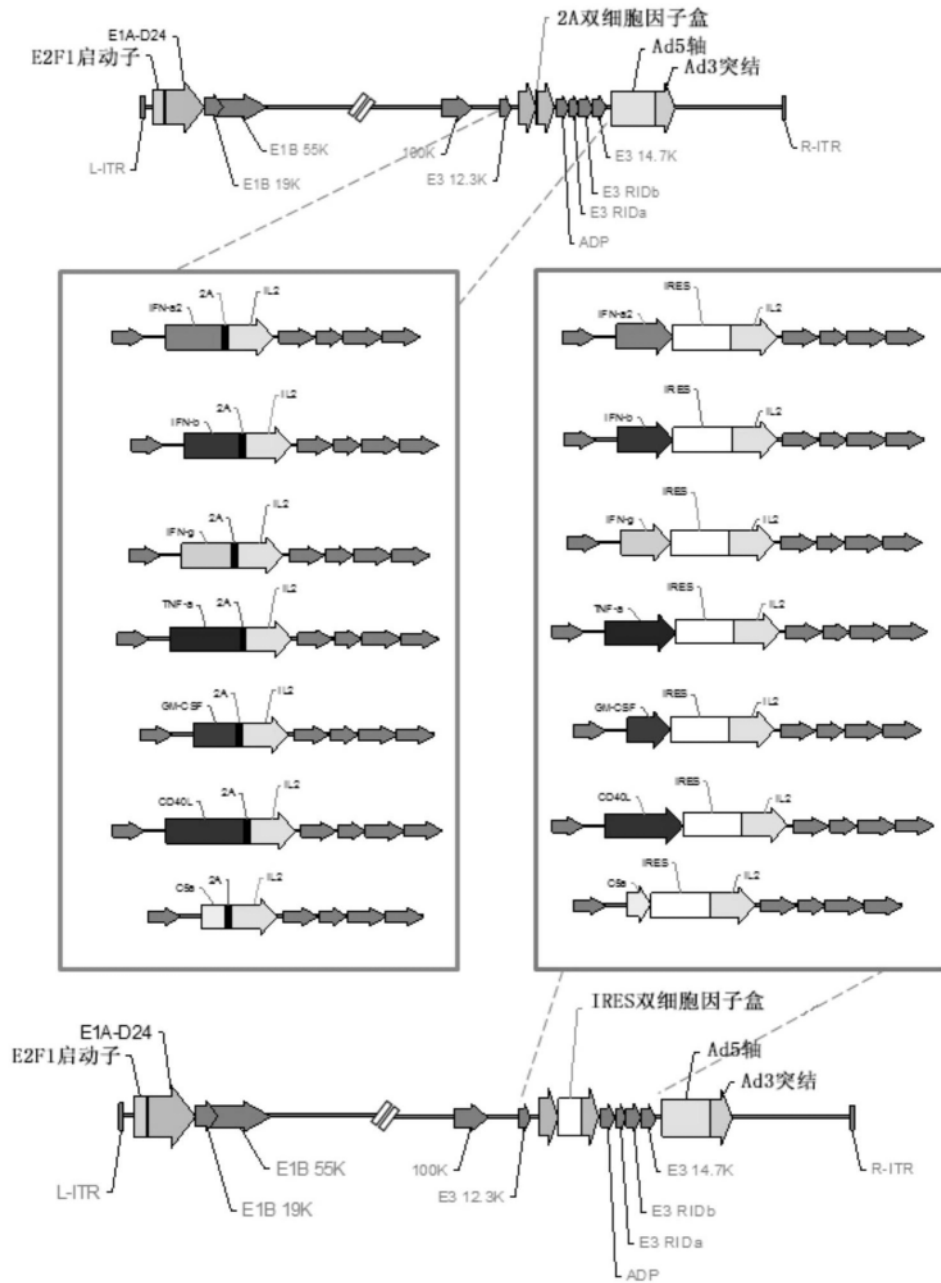


图34

‘核糖体分流位点’，‘核糖体跳跃位点’，‘顺式作用的水解酶元件’(CHYSEL)，‘类2A’：

足和口疾病病毒(FMDV) 2A肽：

核苷酸序列 : `gtgaaaCAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTTAAGCTTGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCCGGGCCC`

翻译 : VKQLNFDLLKLAGDVESNPGP

猪teshcovirus (TV1) 2A肽：

核苷酸序列 : `ggcagcggcGCCACGAACTTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCCGGGCCT`

翻译 : GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (The GSG spacer improves cleavage; Holst et al., 2006, Nat Prot)

扁刺蛾β四体(thosea asigna)病毒(TAV) 2A肽：

核苷酸序列 : `GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT`

EGRGSLLTCDVEENPGP

图35

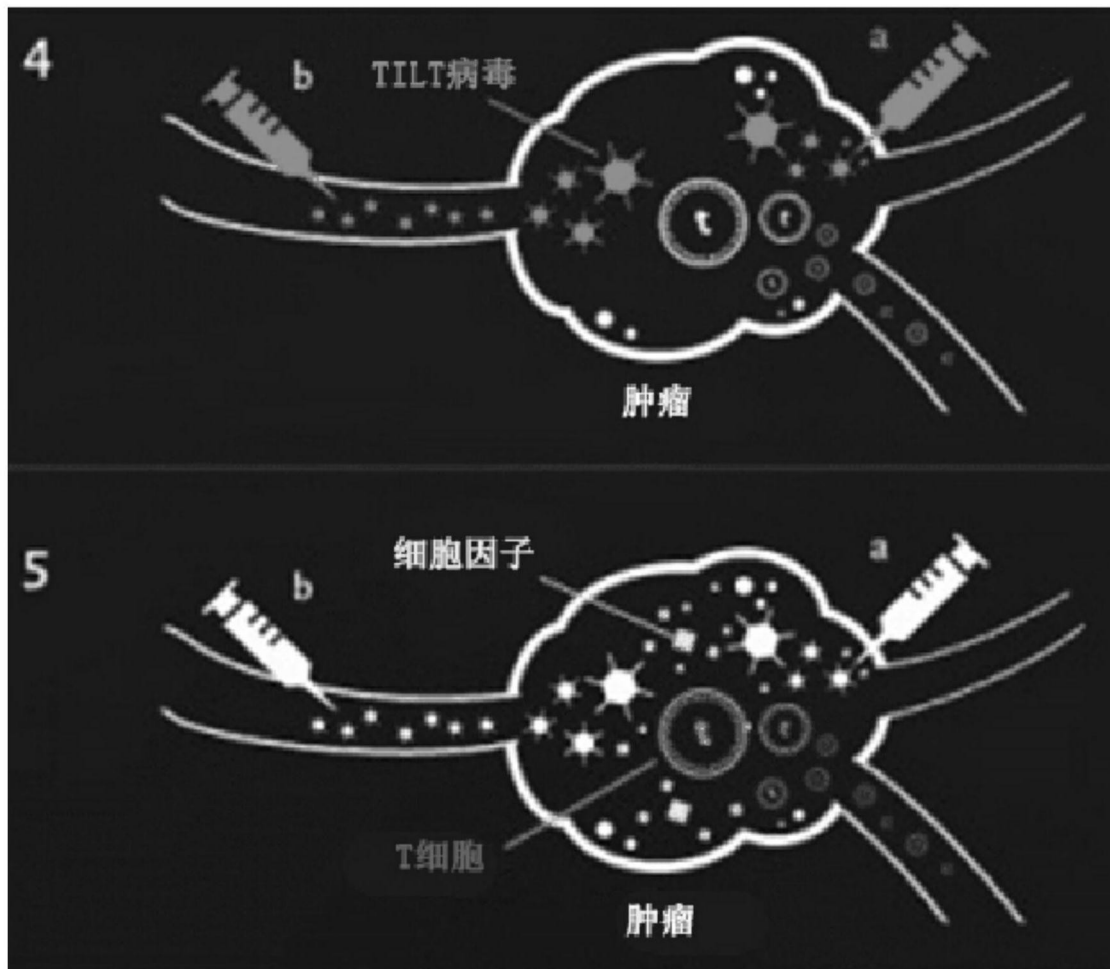


图36

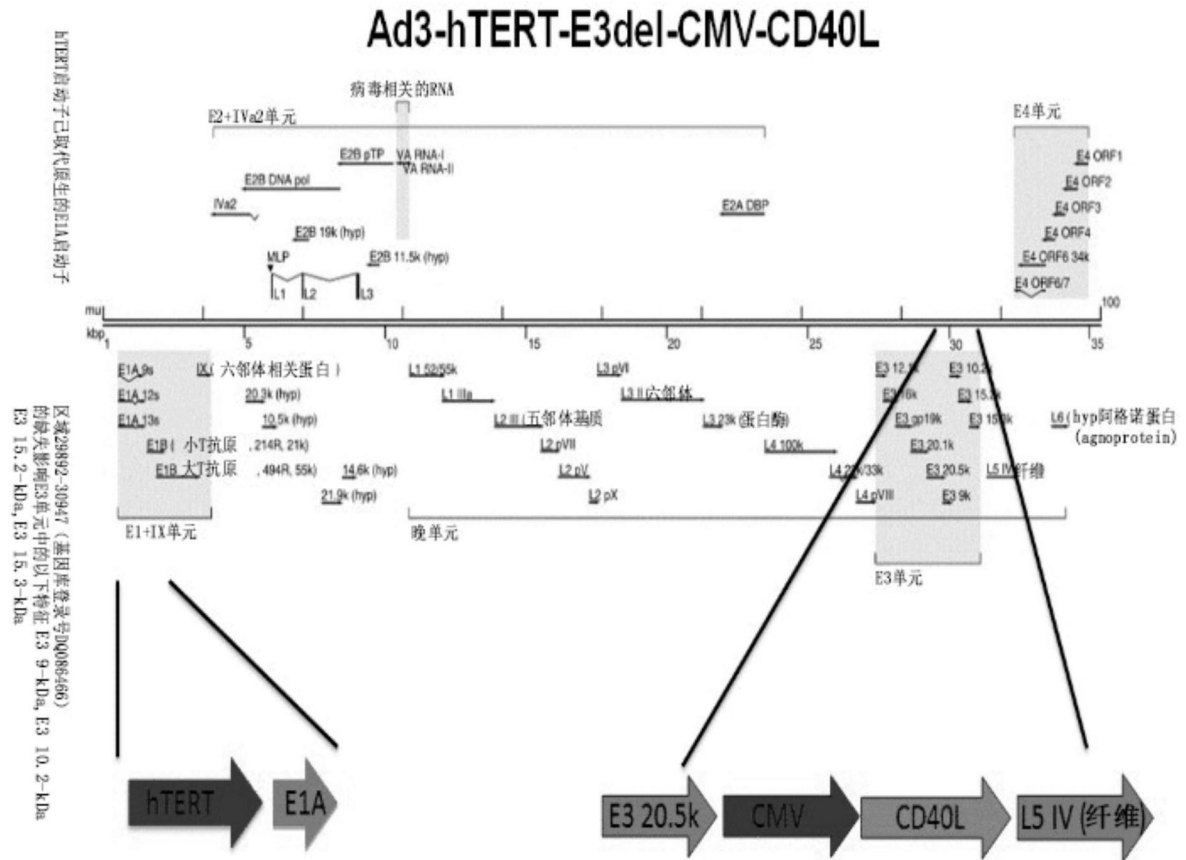


图37

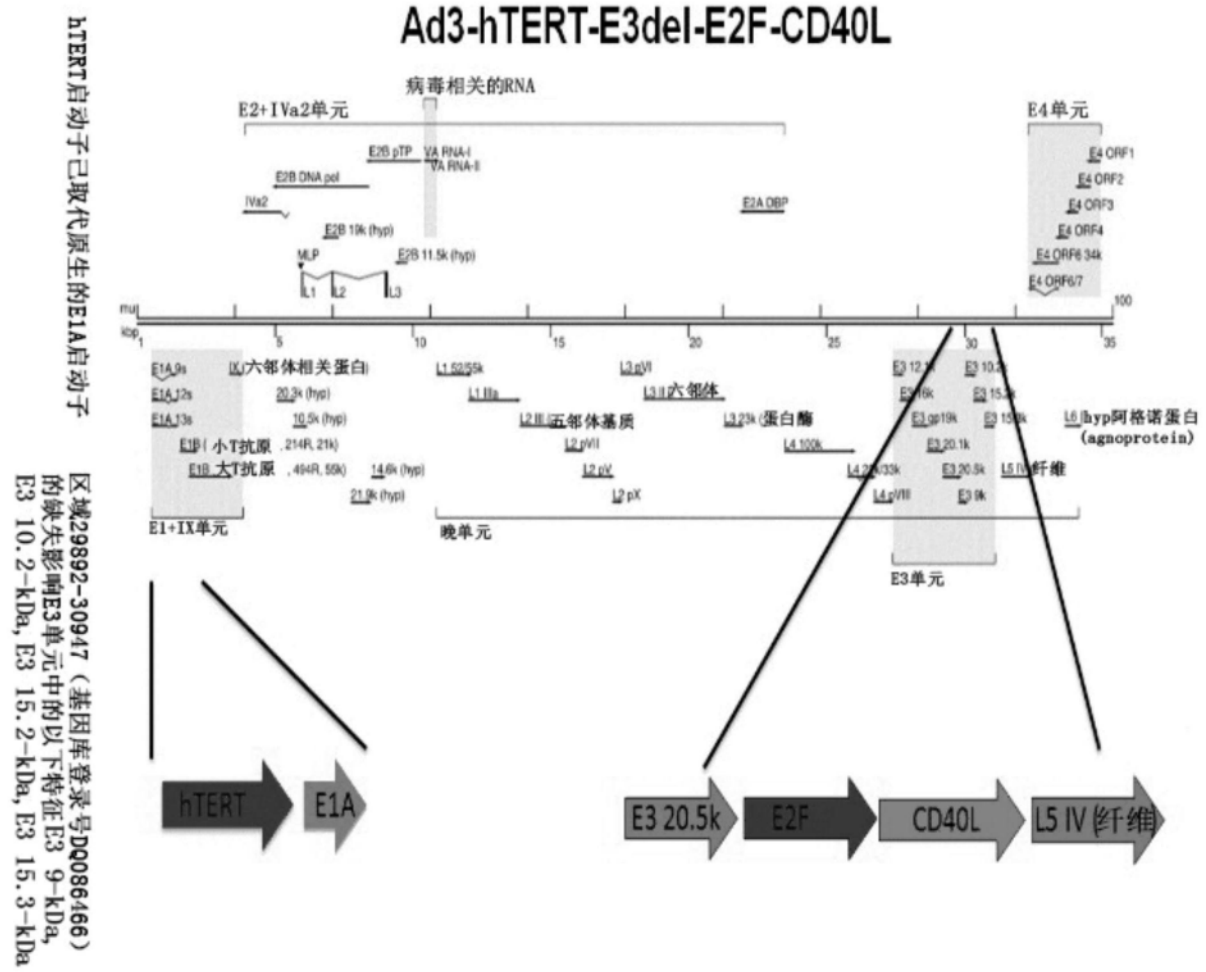


图38

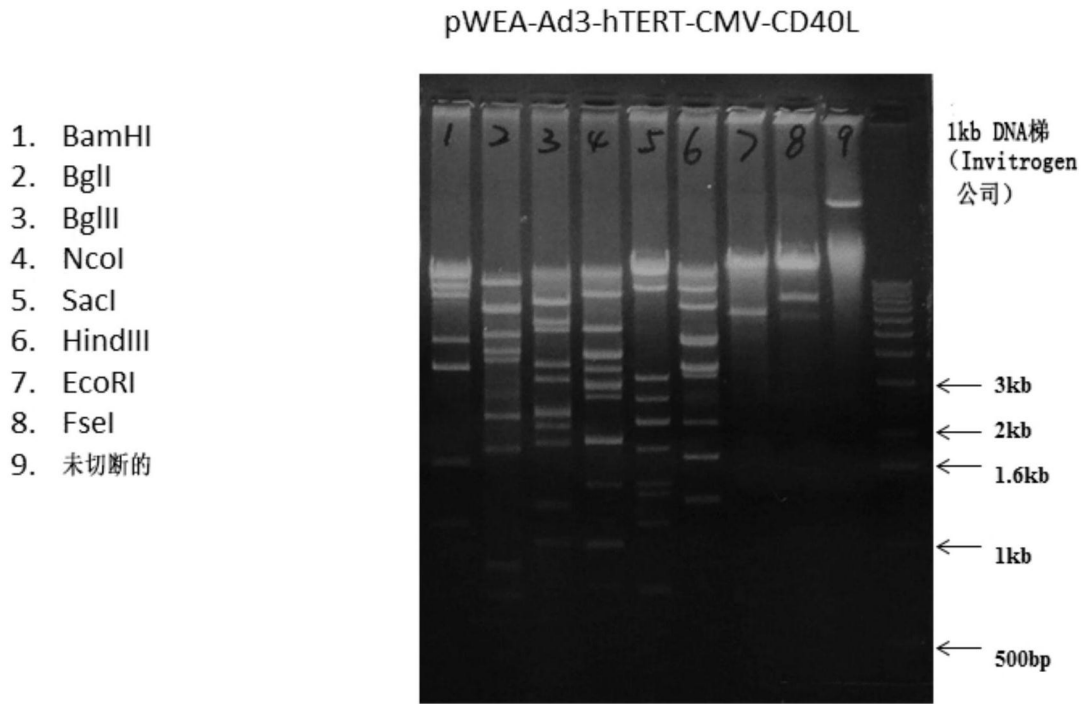


图39

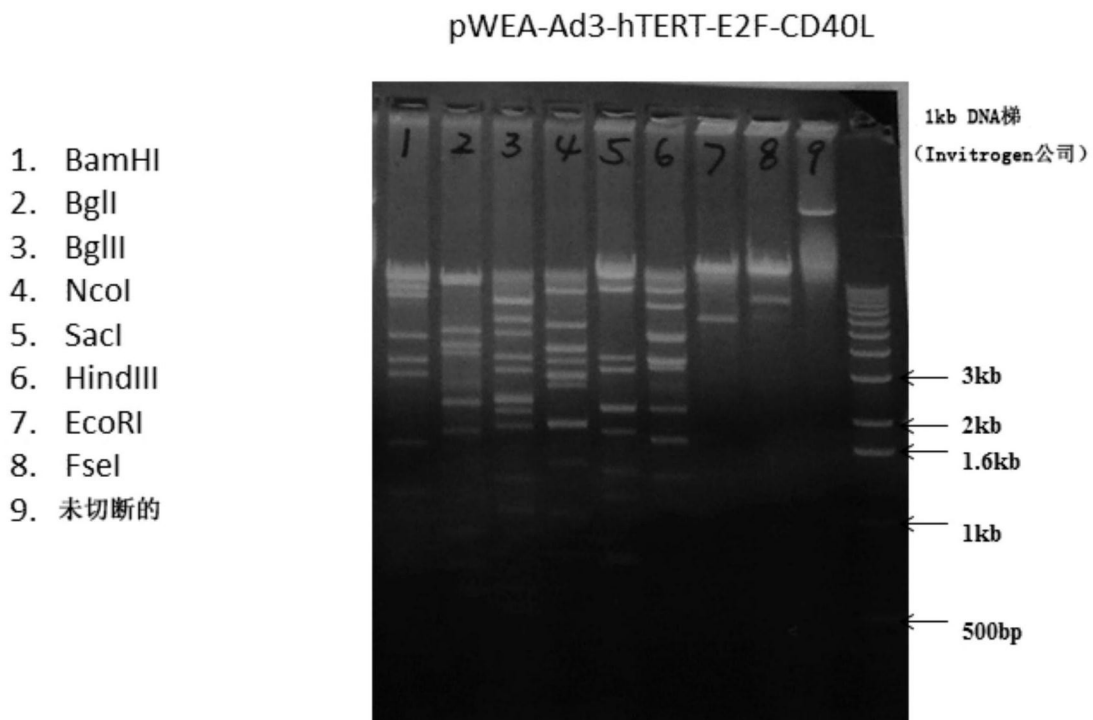


图40

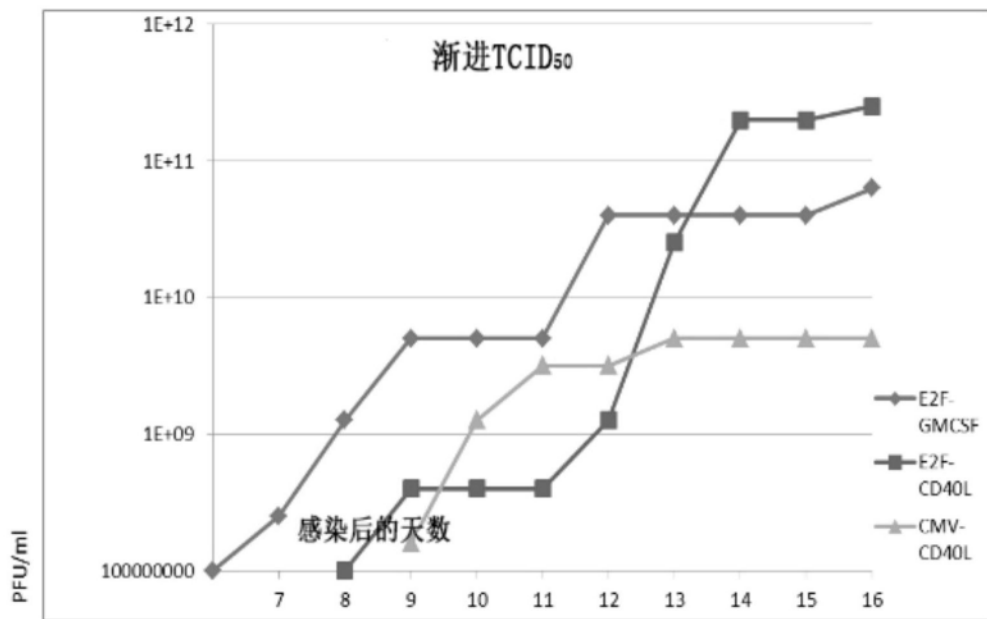


图41

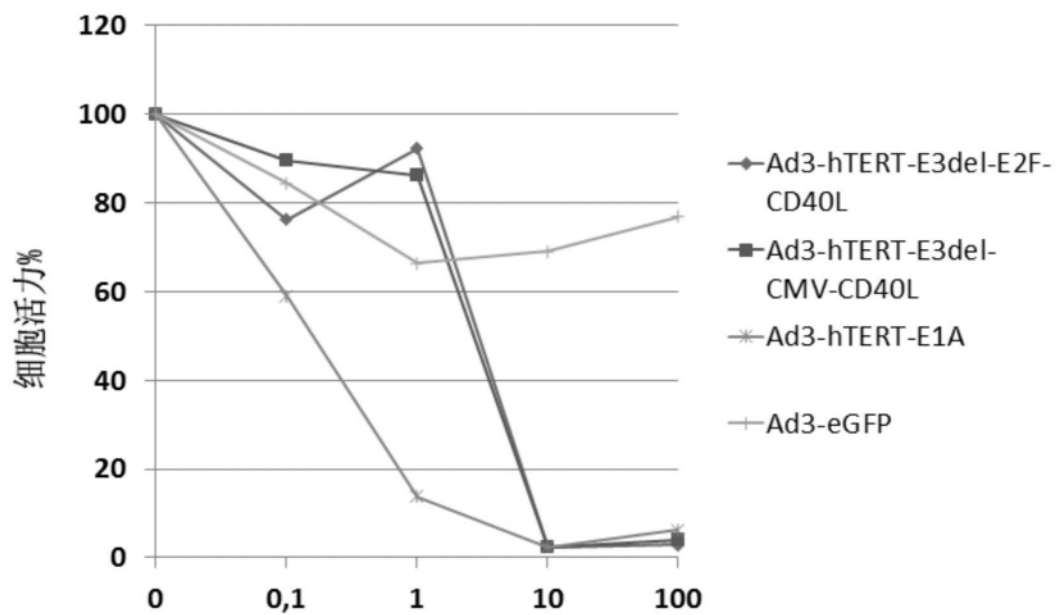


图42

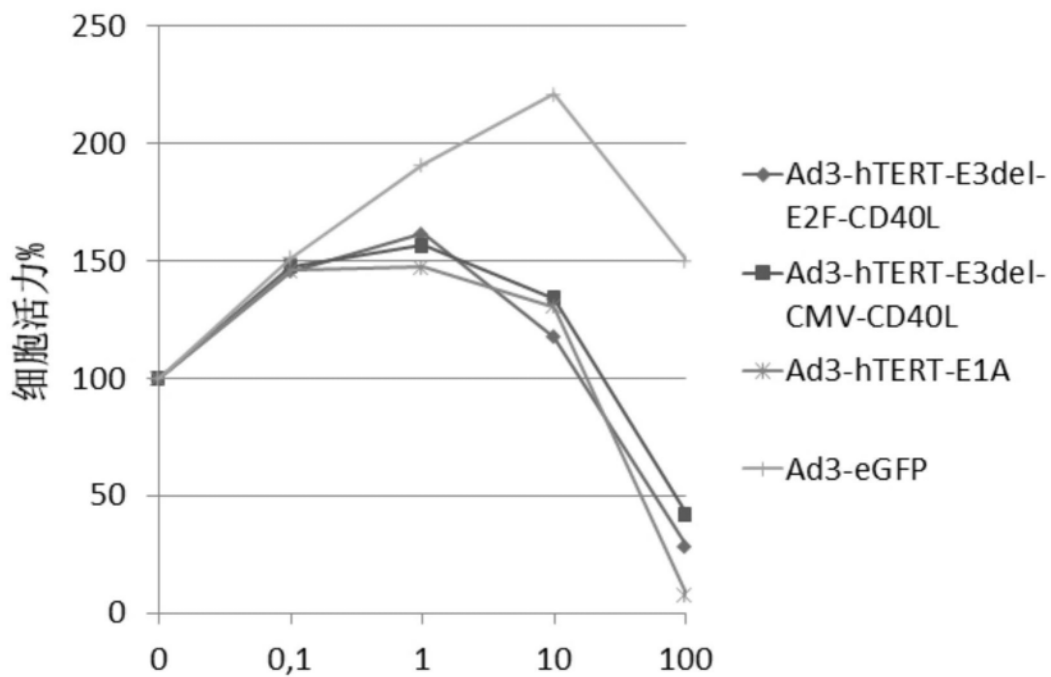


图43

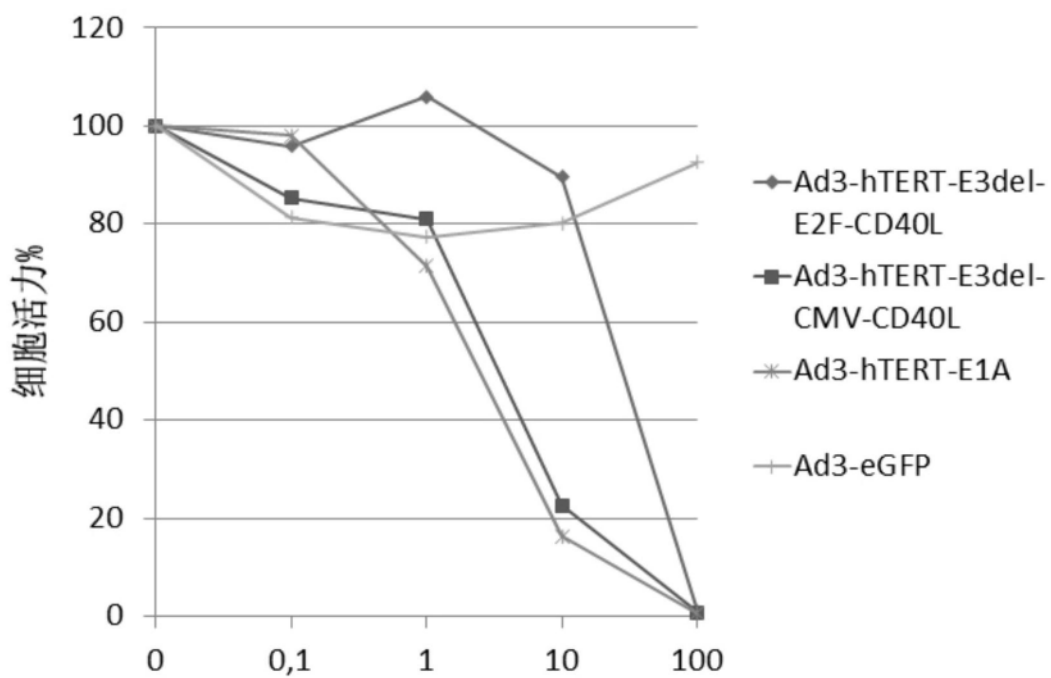


图44

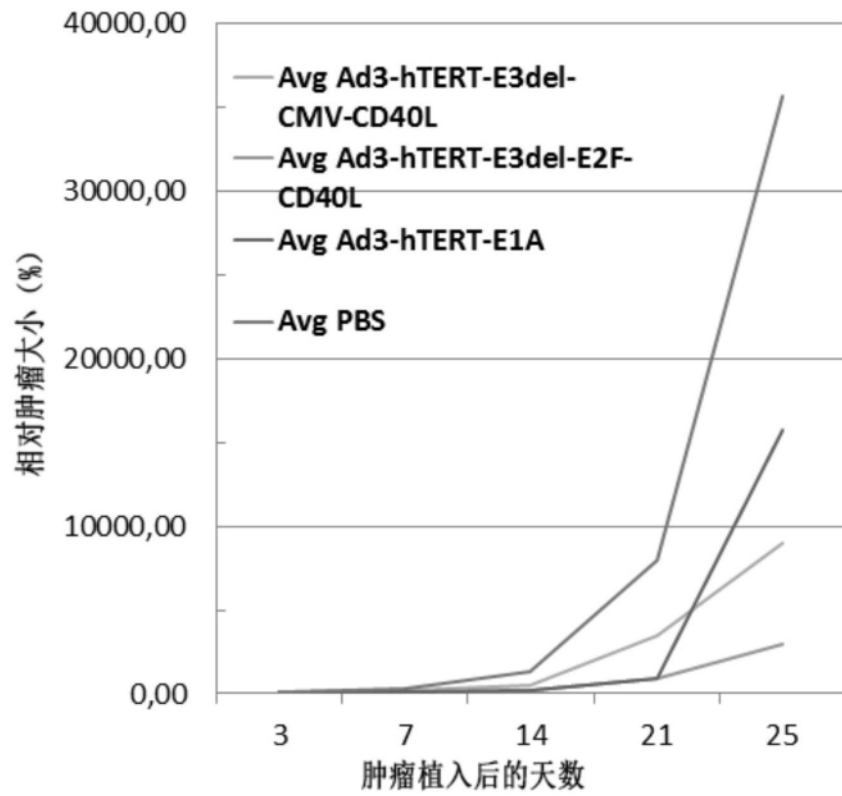


图45

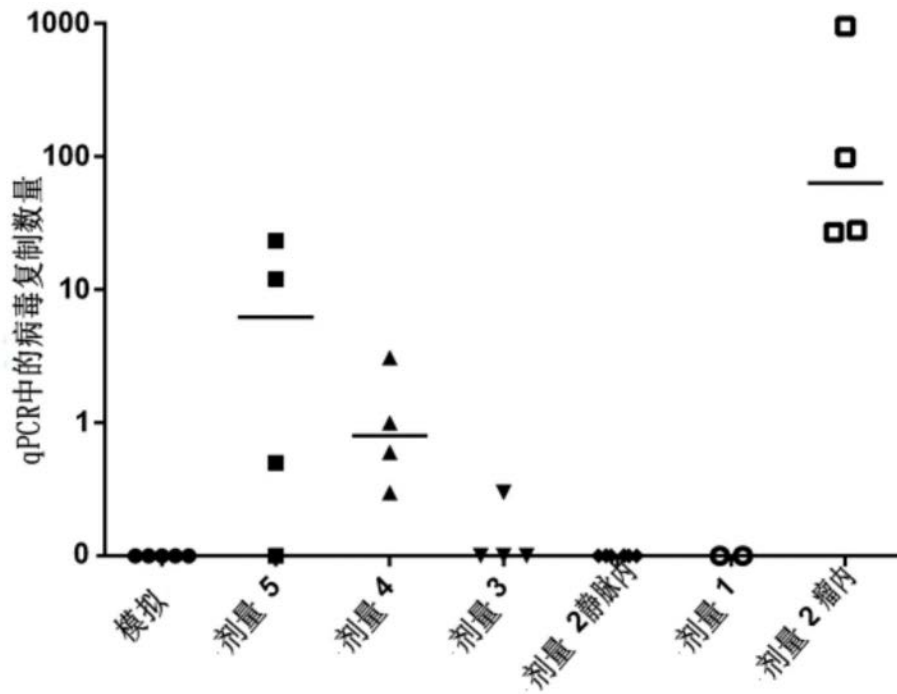


图46

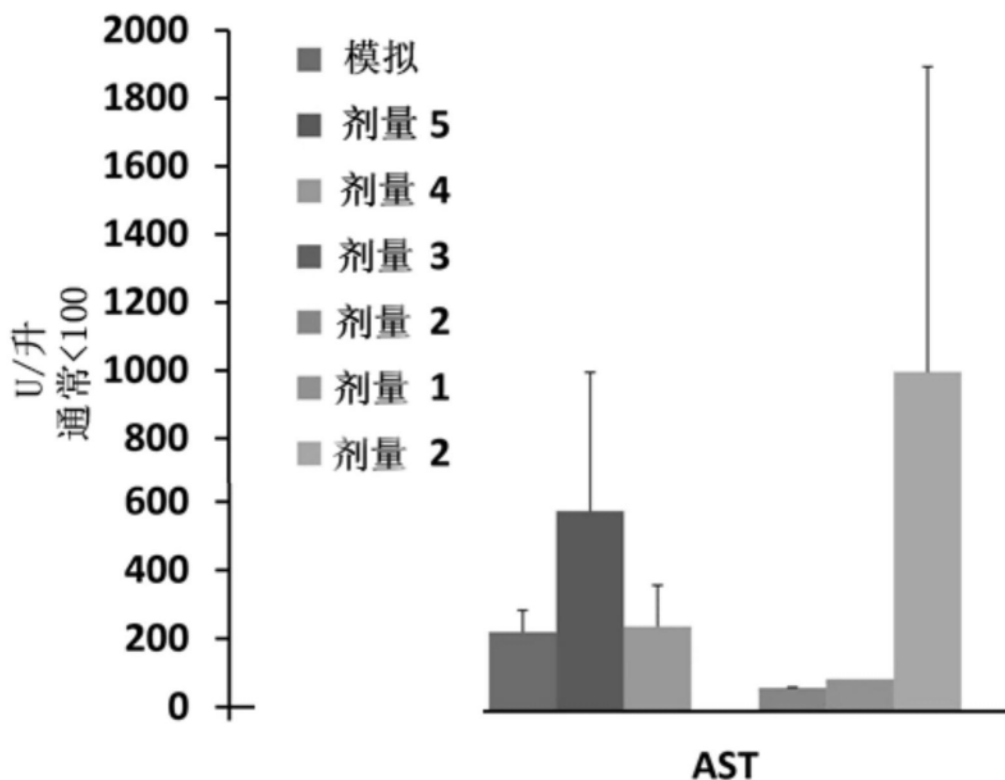


图47

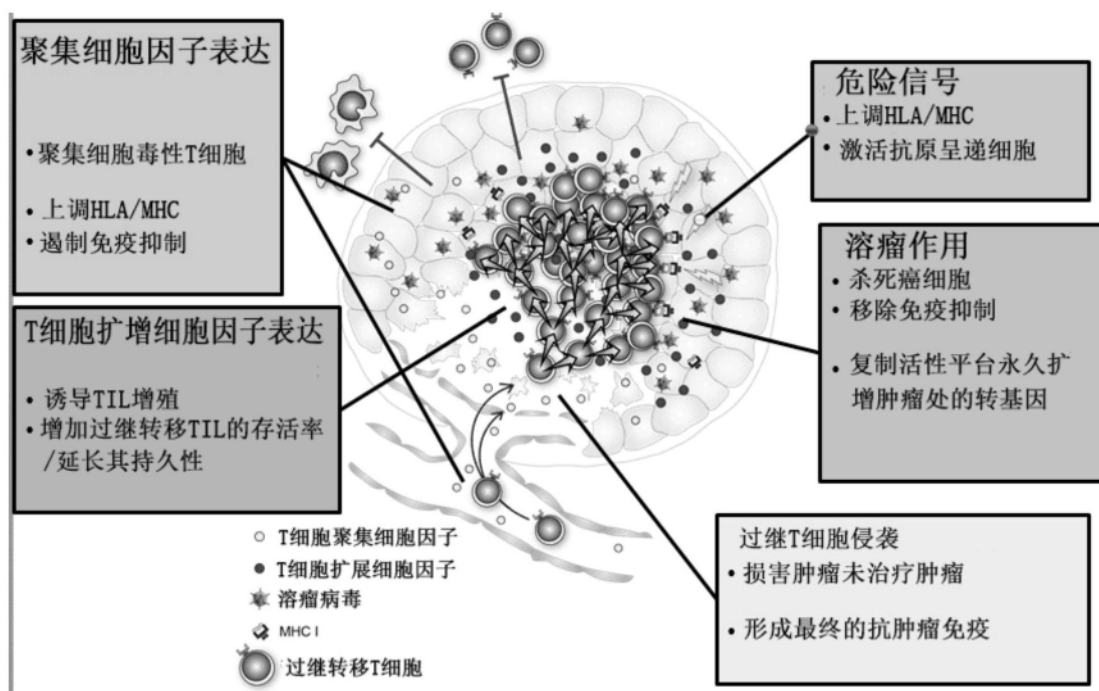


图48

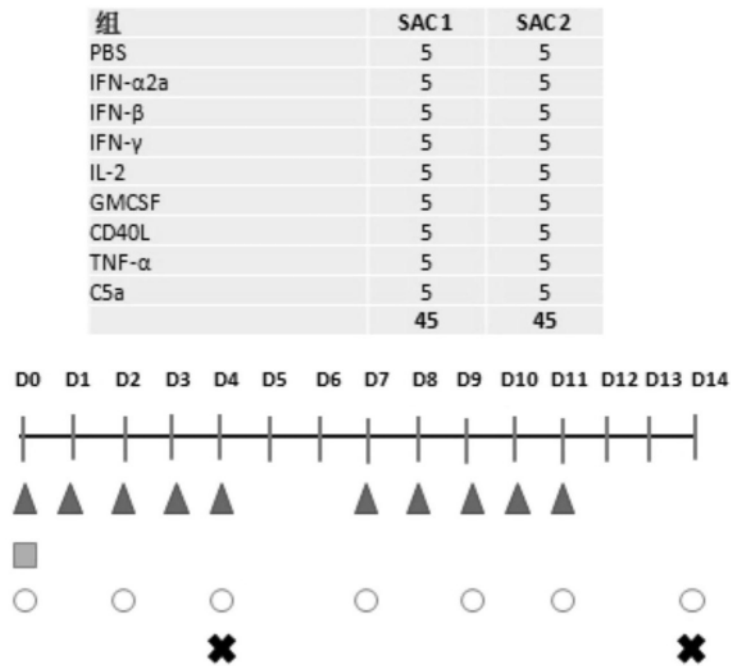


图49

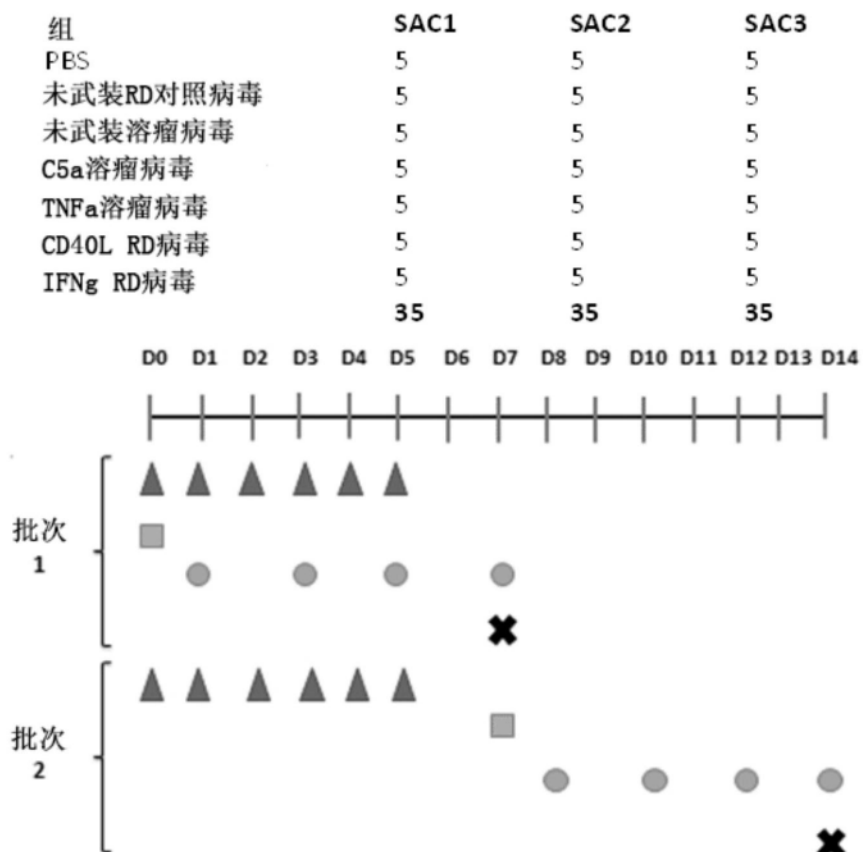


图50

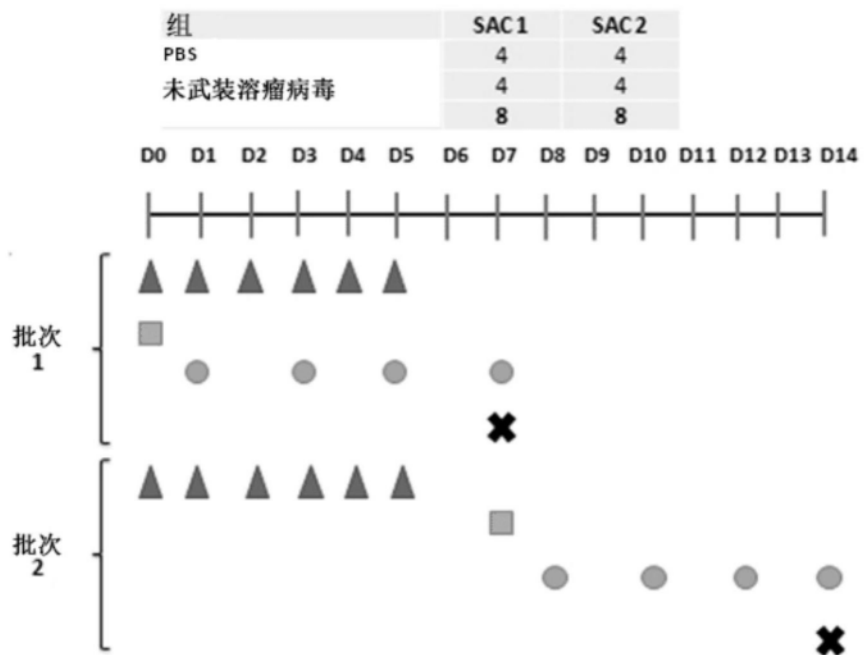


图51