[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/00 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02809700.9

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 1332712C

[22] 申请日 2002.5.9 [21] 申请号 02809700.9

[30] 优先权

[32] 2001. 5.11 [33] US [31] 60/290,051

[86] 国际申请 PCT/US2002/014642 2002.5.9

[87] 国际公布 WO2002/091997 英 2002.11.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.11

[73] 专利权人 沃尔斯泰特生物制剂公司

地址 美国马里兰州盖德斯伯格市

[72] 发明人 威廉 S·格洛依那 杰弗里 A·米勒 斯蒂芬 N·缪勒

[56] 参考文献

US 6 428 968 B1 2002.8.6

US 6,270,147 B1 2001.5.27

审查员 吴顺华

[74] 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司

代理人 张金海

权利要求书 5 页 说明书 19 页

[54] 发明名称

肿瘤消解病毒疗法

[57] 摘要

本发明公开了一种肿瘤患者的治疗方法。给患者注射一种药物组合物，该药物组合物包含悬浮在生理溶液中的人体白细胞和具有复制能力的肿瘤消解病毒(oncolytic virus)，或者该药物组合物包含以肿瘤消解病毒感染的人体白细胞或血小板。

1、一种药物组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的应用，该药物组合物包含:

(a) 悬浮在生理溶液中的人体细胞和具有复制能力的肿瘤消解病毒，其中所说的细胞为白细胞，所说的病毒与白细胞特异性地结合，且在该组合物中病毒的空斑形成单位与白细胞数的比例至少是 1:100;或者

(b) 悬浮在生理溶液中的以肿瘤消解病毒感染的人体细胞，其中所说的细胞为白细胞或血小板。

2、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的药物组合物包含悬浮在全血中的肿瘤消解病毒。

3、如权利要求 1-2 中任一项所述的应用，其中组合物中病毒的空斑形成单位与白细胞数的比例至少为 1:1。

4、如权利要求 3 所述的应用，其中组合物中病毒的空斑形成单位与白细胞数的比例范围为 1:1 到 200:1。

5、如权利要求 4 所述的应用，其中所说的比例为 200:1。

6、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的细胞是患者的细胞。

7、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的细胞是除患者外的供者的细胞。

8、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的细胞是培养细胞。

9、如权利要求 8 所述的应用，其中所说的培养细胞包括永生细胞系。

10、如权利要求 9 所述的应用，其中所说的永生细胞系为 U-937 或 KG-1。

11、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的细胞为白细胞。

12、如权利要求 11 所述的应用，其中所说的白细胞是通过白细胞电泳分离的白细胞。

13、如权利要求 11 或 12 所述的应用，其中所说的白细胞是具有活性的。

14、如权利要求 11 或 12 所述的应用，其中所说的白细胞是非活性的。

15、如权利要求 11-14 所述的应用，其中所说的白细胞是单核细胞、嗜中性粒细胞或淋巴细胞。

16、如权利要求 15 所述的应用，其中所说的白细胞是肿瘤渗透性白细胞。

17、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的细胞是血小板。

18、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的药物组合物包含全血，在全血中含有以病毒感染的白细胞或血小板。

19、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的病毒具有低到中等的毒性。

20、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的病毒是克隆病毒。

21、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的被感染细胞至少是组合物中白细胞和血小板总数的千分之一。

22、如权利要求 21 所述的应用，其中所说的被感染细胞至少是组合物中白细胞和血小板总数的百分之三十。

23、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的病毒选自由新城鸡瘟病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、水泡性口膜炎病毒、副流感病毒、流感病毒、腺病毒、疱疹 I 型病毒、牛痘病毒和呼肠孤病毒组成的组。

24、如权利要求 23 所述的应用，其中所说的病毒是具有中等毒性的新城鸡瘟病毒。

25、如权利要求 11 所述的应用，其中所说的药物组合物的有效量是 6×10^6 至 6×10^{10} 白细胞/平方米体表面积的日注射剂量。

26、如权利要求 25 所述的应用，其中所说的日剂量为约 6×10^7 白细胞/平方米体表面积。

27、如权利要求 17 所述的应用，其中所说的有效量是 10^9-10^{11} 血小板/平方米体表面积的日剂量。

28、如权利要求 27 所述的应用，其中所说的日剂量为约 10^{11} 血小板/平方米体表面积。

29、如权利要求 25-28 中任一项所述的应用，其中所说的日剂量是单次给药的。

30、如权利要求 25-28 所述的应用，其中在一周的时间内，所说的日剂量按一到七次的频率给药。

31、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的组合物是通过静脉给药。

32、如权利要求 31 所述的应用，其中所说的组合物的给药量从 25 毫升到 1 升。

33、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的组合物是肿瘤内注射给药的。

34、如权利要求 33 所述的应用，其中所说的组合物的给药量是每个肿瘤块 100 微升到 10 毫升。

35、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的肿瘤是实体瘤，且所说的组合物是静脉注射或肿瘤内注射给药。

36、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的肿瘤是非实体瘤，且所说的组合物是静脉注射给药。

37、如权利要求 36 所述的应用，其中所说的肿瘤是白血病。

38、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的组合物是腹膜内注射的。

39、如权利要求 38 所述的应用，其中所说的组合物的注射量最大达到 2 升。

40、如权利要求 1 中任一项所述的应用，其中所说的组合物是膀胱内注射的。

41、如权利要求 40 所述的应用，其中所说的组合物的注射量最大达到 75 毫升。

42、如权利要求 41 所述的应用，其中所说的组合物的注射量为 50-60 毫升。

43、如权利要求 1 所述的应用，其中所说的病毒是能够复制的。

肿瘤消解病毒疗法

背景技术

“用病毒治疗肿瘤”(WO 00/62735)涉及一种将能够复制和杀死具有IFN介导的抗病毒反应缺陷的肿瘤细胞的病毒作为药物使用的方法，该专利的一个特定的方面包括“全身性”使用这种病毒。

已知副粘病毒与红细胞反应并使其凝集，Howe, C.和 Lee, L.T.报道说从红细胞提取了副粘病毒，但比流感病毒具有更低效率(Adv. Virus Res. 17:1-50, 1972)。此外，通过病毒外壳蛋白的特异性抗体的中和而特异性地抑制由副粘病毒引起的红细胞凝集是一个已了解得很清楚的现象。

Schirrmacher 等人(Int. J of Oncology, 16:363-373, 2000)已经证明，NDV 会激活小鼠巨噬细胞的抗肿瘤活性，下面的试验结果表明 NDV 被加到小鼠全血中时并不优先与小鼠白细胞结合。

Bonina 等人(Giorn. Batt. Virol. Immun., LXXVIII, 254-261, 1985)证明，人的巨噬细胞能支持 NDV 的生长。

Woodruff 等人(Cellular Immunology 5:296-306, 1972)及 Woodruff 和 Woodruff(J of Immunology, 112(6):2176-2183, 1974)发现，NDV 在体外凝集大鼠、小鼠和人的淋巴细胞。

Faden 等人(Blood, 58:221-7, 1981)证明，NDV 在体外会与人的嗜中性粒细胞结合。

上述资料并没有显示任何 NDV 优先于红细胞而与白细胞结合的倾向性。

文献描述了 NDV 与红血细胞(通常为鸡)的结合，由于 NDV 并不是人的病原体，发现 NDV 优先与人血液中的白细胞成分结合的结果是很让人惊异的。

文献表明，NDV 与细胞的结合是通过病毒 HN 蛋白的神经氨酸苷酶与连接到细胞表面蛋白上的唾液酸残基的相互反应产生的。人红细胞具有非常高浓度的与细胞表面蛋白连接的唾液酸残基，在人血液中红细胞和白细胞的比例大约为 1000:1，因此，特别使人惊奇的是 NDV 与占小部分的白细胞结合而不是与数量上多得多的红细胞结合。

发明内容

本发明提供了一种治疗肿瘤患者的方法，包括给患者注射适量的可有效地对患者进行治疗的药物组合物，该药物组合物包含悬浮在生理溶液中的人白细胞和具有复制能力的肿瘤消解病毒(oncolytic virus)，其中该病毒与白细胞特异性地结合，及组合物中病毒的空斑形成单位(plaque forming units)与白细胞数的比例至少为 1:100，从而对患者进行治疗。

本发明提供了一种治疗肿瘤患者的方法，包括给患者注射适量的可有效地对患者进行治疗的药物组合物，该药物组合物包含悬浮在生理溶液中的以肿瘤消解病毒感染的人体细胞，其中该细胞是白细胞或血小板，从而对患者进行治疗。

本发明提供药物组合物用于治疗肿瘤患者或在肿瘤治疗药物的制造中的应用，该药物组合物包含：(a) 悬浮在生理溶液中的人体白细胞

和具有复制能力的肿瘤消解病毒，其中该病毒与白细胞特异性地结合且组合物中病毒的空斑形成单位与白细胞数的比例至少为 1:100; 或(b)悬浮在生理溶液中的以肿瘤消解病毒感染的人体细胞，其中该细胞是白细胞或血小板。应用(a)和应用(b)是有关联的，即实施应用(a)通常包含实施应用(b)，因为具有复制能力的肿瘤消解病毒通常会感染白细胞。

本发明部分地是基于肿瘤消解病毒如 NDV 与白细胞和血小板结合的发现，与红细胞相比，NDV 优先与白细胞结合。肿瘤涉及到炎性过程，因此与肿瘤消解病毒结合的白细胞或以肿瘤消解病毒感染的白细胞是投送肿瘤消解病毒的特别有效的手段。

具体实施方式

在这里使用的术语“人体细胞”意指从人体分离得到的细胞，或从人体分离得到的细胞衍生的和/或其核酸成分通过如永生化、照射或重组的方法改变了的培养细胞。“人体白细胞”和“人体血小板”是本身分别为白细胞和血小板的人体细胞。除另外特别说明或由上下文所要求的外，术语“细胞”或“人体细胞”指的是白细胞和/或血小板。

在这里使用的术语“空斑形成单位”(pfu)意指一个传染性病毒颗粒。

在这里使用的术语“感染多重度”(MOI)意指每个细胞添加的感染性病毒颗粒的数目。

在这里使用的术语“克隆病毒”意指源自单个感染性病毒颗粒的病毒，且其分子克隆个体具有显著的核酸序列同源性，例如，序列同源性达到至少八个来自该病毒群体的分子克隆个体在超过 300 个相邻核苷酸的序列上具有大于 95%的序列同源性。

在这里使用的术语“白细胞病毒复合体”(LVC)意指肿瘤消解病毒与白细胞群体混合且该病毒已与细胞结合形成的复合体，该术语既包括病毒结合在细胞外面的细胞，也包括被病毒感染的细胞。

在这里如果病毒与特定的细胞结合的特异性高于这种病毒与红细胞结合的特异性，我们就说该病毒与该细胞“特异性地结合”。“特异性地结合”或“特异性结合”的英文术语“bind(s) specifically”和“specifically bind(s)”可互换使用。

在这里“NDV”是新城鸡瘟病毒(Newcastle Disease Virus)的缩写。

在这里使用的术语“具有复制能力的”病毒指的是在肿瘤细胞中产生传染性子代的病毒。

在这里使用的过渡性词“包括”是开放的，使用该词语的权利要求可包含除在该权利要求中引用的元素外的额外的元素。

按照本发明，人体细胞可由任何来源获得。它们可由患者以外的人提供，但从安全方面考虑，如果可能一般优选患者提供的细胞。任选的从供体分离得到的细胞首先可在培养物中生长，而该培养的细胞也被认为是细胞所取自的供体的细胞。按照本发明可使用的培养细胞的例子包括永生化的人体白细胞系，如美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC)等来源可公开提供适宜的细胞系，如U-937(ATCC 号 CRL-1593.2)和 KG-1(ATCC 号 CCL-246)。

按照本发明，所使用的白细胞(例如单核细胞、嗜中性粒细胞和包括肿瘤渗透性淋巴细胞在内的淋巴细胞)可以是具有活性的或非活性的。灭活白细胞的技术包括照射。

按照本发明，所使用的细胞可被分离(例如在白细胞的情况下通过白细胞去除进行分离)，但细胞分离不是必需的，也可以改用全血，在这种情况下药物组合物包含悬浮在全血中的肿瘤消解病毒或含有病毒感染的白细胞和/或血小板的全血。任选的白细胞或血小板首先从全血中被分离出来，与病毒混合或以病毒感染，然后再加回到其它的血液成分中。

在本发明的不同实施例中，白细胞选自单核细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞。在本发明的一个更特殊的实施例中，白细胞是肿瘤渗透性淋巴细胞(TILs)，TILs 可通过例如 Rabinowich, H.等人(Cancer Res., 47:173-7, 1987)描述的方法进行制备。

按照本发明，所使用的肿瘤消解病毒可具有低(弱毒)、中等(中毒)或高(强毒)毒性，毒性水平是根据鸡胚平均死亡时间(MDT)试验(Alexander, "Chapter 27: Newcastle Disease" in Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rd ed., Purchase, et al. eds. (Kendall/Hunt, Iowa), page 117.)确定的，通过 MDT 试验将病毒划分为弱毒(MDT>90 小时)、中毒(MDT 从 60 小时到 90 小时)和强毒(MDT<60 小时)。

在本发明的一实施例中，病毒是克隆病毒。

参照使用的药物组合物包含悬浮的白细胞和肿瘤消解病毒的方法或应用，在该方法的一实施例中病毒的空斑形成单位与组合物中的白细胞数的比例至少为 1:1，一般优选白细胞被活性病毒颗粒饱和。在 NDV 的情况下病毒的空斑形成单位与白细胞数的比例为 200:1 时达到

饱和，因此在本发明的实施例中，病毒是NDV且组合物中病毒的空斑形成单位与白细胞数的比例从约1:1到约200:1，优选为约200:1。

在上述的使用的药物组合物包含以肿瘤消解病毒感染的细胞的方法或应用中，该方法的一实施例中被感染的细胞至少是组合物中白细胞和血小板总数的千分之一(0.1%)，更优选为至少30%及最优选为约百分之百。所使用的病毒可以是无复制能力的，虽然优选为病毒是具有复制能力的。

在本发明的实施例中，肿瘤消解病毒是选自由新城鸡瘟病毒(NDV)、腮腺炎病毒、麻疹病毒、水泡性口膜炎病毒、副流感病毒、流感病毒、腺病毒、疱疹I型病毒、牛痘病毒和呼肠孤病毒组成的组。在一更特别的实施例可使用中等毒性的新城鸡瘟病毒株。

有经验的医师能够确定在各病例中的注射的组合物的最适量。典型情况当细胞是白细胞时，有效量是组合物注射日剂量包含 6×10^{6}-6×10^{10}白细胞/平方米体表面积，例如约6×10^{7}白细胞/平方米体表面积。当细胞是血小板时，有效量一般是组合物的日剂量包含10^{9}-10^{11}血小板/平方米体表面积，例如约10^{11}血小板/平方米体表面积。

组合物的日剂量可在单个的24小时的时间段的疗程中分多次给患者注射，其中一次注射日剂量的一部分。更优选日剂量进行单次注射给药。在本发明的一实施例中，在一周的时间内组合物的日剂量按1到7次的频率(即在1到7天的各天中)给患者注射。

按照本发明，任何常规的注射方式都适用于该药物组合物的注射，例如该组合物可进行静脉注射、肿瘤内注射、腹膜内注射或膀胱内注射(肾)。在静脉注射的情况下，适宜的组合物注射量从25毫升到1升，

在肿瘤内注射的情况下，适宜的组合物注射量从 100 微升到 10 毫升/肿瘤块，在腹膜内注射的情况下，适宜的组合物注射量可达到 2 升，在膀胱内注射的情况下，适宜的组合物注射量可达到 75 毫升，优选为 50-60 毫升。根据病毒的 pfus 和注射的细胞的量的不同，可对组合物的浓度进行改变以获得适宜的体积。当肿瘤是实体瘤时，可采用上述给出的给药方式中的任一种进行组合物的注射，例如静脉注射或肿瘤内注射，而当肿瘤是非实体瘤(如白血病)时，不能采用肿瘤内注射，而可通过上述给出的其它的给药方式进行组合物的注射，例如静脉注射。

参照下面的实施例可更好地理解本发明，这些实施例只是阐述而不是限制在这里所描述的本发明。在下面的实施例中，所使用的 NDV 是三次空斑纯化的(triple-plaque purified)新城鸡瘟病毒 MK107 株的减毒变体，在 2000 年 10 月 26 日出版的国际专利公开文件 WO 00/62735 (Pro-Virus 公司)中对其有更全面的描述。

实施例

实施例 1：NDV 与人体血细胞的结合

目的：研究 NDV 与人体血细胞的结合以确定与病毒结合的细胞类型。

材料：索引号 RL-004 的 NDV，抗 NDV HN 蛋白的 Mab2F12 抗体 (3.5mg/ml)，含有 2%的新生小牛血清和 0.02%的叠氮钠的、编目号 554656、批号 M059394 的 BD PharMingen Stain Buffer (PSB)缓冲液，编目号 710-1832、批号 7367 的藻红蛋白偶联-Rockland 羊抗鼠多克隆抗体，编目号 349202、批号 82026 的 Becton Dickinson 免疫细胞计数仪 10X FACS 溶血素溶液。

方法：人全血被收集在柠檬酸管(3.2%，0.105M，Becton Dickinson #366415)中，从两管中各取出约 4ml 全血经冷却并保持在室温下直至使用。用台盼蓝排除法和血细胞计数器进行细胞计数，批号 RL-004 的 NDV(1.3E+10PFU/ml)按 MOIs(感染多重度，表示为 PFU/细胞)为 0.2、0.05 和 0.02 (还有不添加病毒的阴性对照) 感染细胞。在添加病毒后，样品管在 37℃孵育 30 分钟，在孵育期间轻轻搅拌三次以使细胞保持在悬浮状态。

样品清洗两次，清洗步骤如下：加入 2ml 的冷 PSB，在 4℃的温度下 2000rpm 离心 5 分钟并吸除溶液留下细胞团。各次 PSB 是通过抽吸去除的。通过加入冷 PSB 将各样品的体积调整到 1ml，通过加入 20μl 的含 9.1μg 抗体的溶液向各样品添加 Mab2F12 单克隆抗体。样品在冰上孵育 30 分钟并按前述步骤再清洗两次，羊抗鼠 PE 指示抗体通过加入 1ml 的含 12μg/ml 该抗体的溶液被加入各样品中，样品再在冰上孵育 30 分钟并按上述方法清洗。为分析白细胞部分，100μl 的各样品与 3ml 的 1X FACS 溶血素溶液在室温下孵育 6 分钟，再如前进行离心和抽吸，细胞团重悬在 0.5ml 的 PSB 中。为进行红细胞分析，1.5μl 的各样品被加入到 2.0ml 的 PSB 中。用 Becton Dickinson FACSCalibur 流式细胞仪进行样品分析，前向和侧向散射参数采用线性设置，而藻红蛋白的 FL2 检测采用对数设置。

结果：在表 1 中显示的试验结果表明 NDV 优先与人全血中的白细胞部分结合。在 MOI 为 0.05(对于全血)的情况下，46%的白细胞为 NDV 阳性，而红细胞的 NDV 阳性率为 0%；在 MOI 为 0.2 的情况下，NDV 在 89%的白细胞中出现，而只与 15%的白细胞结合。请注意如果扣除红细胞不算，则 MOI 为 0.05 和 0.2 对于白细胞来说约为 50 和 200。在

较高的 MOI 时少量的与红细胞结合的 NDV 可能反映了与存在于细胞表面上的唾液酸残基结合的低亲和力。

表 1: NDV 结合阳性细胞百分率(%)

MOI	红细胞	白细胞
0.05	0	46
0.2	15	89

一般认为，副粘病毒与红细胞相互反应并产生红细胞的凝集反应(参见 How, C. and Lee, L.T., "Virus-Erythrocyte Interactions")。因此，人们普遍相信，涉及到与这些病毒结合的主要的细胞类型，包括 NDV，是红细胞。NDV 与细胞的结合被认为是通过病毒 HN 蛋白的神经氨酸酶与连接到细胞表面蛋白上的唾液酸残基的相互反应产生的。在血液中，为达到将细胞保持在溶液中的目的，人红细胞具有非常高浓度的与表面蛋白连接的唾液酸残基。因为在人血液中红细胞和白细胞的比例大约为 1000:1，因此特别让人惊奇的是 NDV 与占小部分的白细胞结合而不是与数量更为巨大的红细胞结合。

实施例 2: 在 NDV 中和抗体存在的情况下 NDV 与白细胞结合

介绍/背景: 本试验的目的是检测 NDV 在有或无 NDV 中和抗体存在的情况下与白细胞结合能力。在抽取本试验的全血样本之前，521 号临床患者接受了大约 27 个疗程的 NDV 治疗，通过空斑中和(plaque neutralization)和微中和(micro-neutralization)分析显示 521 号患者具有显著水平的 NDV 中和抗体。

方法: 从正常供体和 521 号患者获得的人全血样本被收集在柠檬酸管(3.2%，0.105M，Becton Dickenson #366415)中，各供体的采样管

保持在室温下。将全血样本按测试用量均分并掺入 NDV(批号 RL-005)。NDV 是按 MOIs(感染多重度,表示为 PFU/细胞)为 0.2、0.02 和 0.002 (同时还有不加病毒的阴性对照) 掺入。在病毒被加入后,采样管在室温下孵育 30 分钟,通过使用 polymorphprep (Nycomed, Inc.)分离液的梯度离心从添加了病毒的样本中分离血浆和白细胞。从梯度层的顶部小心地去除血浆,收集两个白细胞带(多形核白细胞带和单核细胞带)并将其置于 0.5X DMEM,使细胞成团并重悬在全浓度 DMEM 中。细胞清洗几次以除去分离介质,使用库耳特颗粒计数器对各测试量中的白细胞进行计数。已知数目的白细胞或已知用量的血浆被共培养或接种在 25cm^2 组织培养瓶(Corning)中的单层 HT1080 人纤维肉瘤细胞(ATCC,CCL-121)上。HT1080 细胞对 NDV 的细胞溶解作用是高度敏感的,在数天内对细胞单层进行定性观察以确定 CPE(细胞病变效应)的出现。出现 CPE 的培养瓶被认为是阳性的。

结果:如表 2 中所示,在每瓶 300000 白细胞的情况下,对于所有三种 MOI 的掺入,正常供体和 521 号患者的两个被检测的培养瓶都为 NDV 感染的阳性;对于正常供体,在 3000 细胞的水平所有的培养瓶都为阳性,而在 30 细胞的水平除最低的 MOI 掺入外所有的培养瓶也为阳性;对于 521 号患者,在 3000 细胞水平,MOI 为 0.02 时 2 个培养瓶中只有 1 个为阳性,MOI 为 0.002 时 2 个培养瓶中没有 1 个为阳性,在 30 细胞水平,MOI 为 0.2 时 2 个培养瓶中只有 1 个为阳性,其它所有在这一细胞水平的培养瓶都为阴性。

血浆数据表明,在正常供体,病毒可在所有的 MOIs 测试中从血浆中恢复(参见表 3),但是,没有感染性病毒从含中和抗体的 521 号患者的血浆中恢复。

讨论：结果表明，与正常供体相比，521号患者与感染性病毒结合的白细胞的数目减少了，但是，病毒仍然能够在中和抗体存在的情况下与白细胞结合，即使在与患者剂量相似的低 MOI(0.002)时也出现了这种结合。

NDV 引起导致中和抗体产生的人体免疫反应，病毒与白细胞的结合可以使该病毒免于中和抗体的攻击，这是其优于游离病毒的地方，游离病毒暴露于中和抗体并导致非感染性。

从这些数据可以得出结论，使用白细胞作为向肿瘤投送病毒的载体优于游离的传播病毒，在已产生反射反应的患者(如已接受多剂量 NDV 的患者)体内的中和抗体会导致游离病毒丧失感染性。

表 2：感染性 NDV 与白细胞结合的检测

正常供体

	白细胞被置于 T25 培养瓶中的 HT1080 细胞 单层共培养后的阳性培养数		
NDV 掺入 (MOI)	300000 细胞	3000 细胞	30 细胞
0.2	2*	2	2
0.02	2	2	2
0.002	2	2	0
无掺入(对照)	0	0	0

521 号患者

	白细胞被置于 T25 培养瓶中的 HT1080 细胞 单层共培养后的阳性培养数		
NDV 掺入 (MOI)	300000 细胞	3000 细胞	30 细胞
0.2	2*	2	1
0.02	2	1	0
0.002	2	0	0
无掺入(对照)	0	0	0

* 每 2 个测试培养瓶中阳性培养瓶的数目。

表 3：感染性 NDV 的血浆检测

样本	正常供体	521 号患者
0.2MOI 掺入	1	0
0.02 MOI 掺入	1	0
0.002 MOI 掺入	1	0
无掺入(参照)	0	0

N=1 培养瓶

由于 NDV 不是人体的病原体，发现 NDV 优先与人血液中的白血细胞成分结合是一个让人惊异的结果。

实施例 3：人白细胞/NDV 复合体的制备

通过白细胞去除或采用 POLYMORPHPREP (Nycomed 公司)按照生产商的说明进行的梯度离心制备人白细胞($5 \times 10^{+8}$ 细胞)，在室温下用消毒 1XPBS 清洗细胞两次并用同样的缓冲液将容积调整到 10ml，细胞与 $1 \times 10^{+10}$ pfu 的 NDV(无菌条件下添加)混合并使其静置 30 分钟(在 10 和 20 分钟进行短暂的混合)，在 1500rpm 对细胞离心 5 分钟并去除 PBS，用 20ml 的 1XPBS 清洗细胞并再次离心，细胞团被稀释到 10ml 以用于注射。

实施例 4：用人白细胞/NDV 复合体治疗无胸腺小鼠中的人肿瘤异种移植(<10mm 及>5mm)

无胸腺小鼠用 1 千万人肿瘤细胞进行皮内注射，在肿瘤大小达到 5-10mm 之间的范围后，给予 $8 \times 10^{+6}$ 细胞的如实施例 3 中所描述的白细胞/NDV 复合体的单次注射，按完全退化和部分退化观察 LVC 对肿瘤生长的作用。

实施例 5：用人白细胞/NDV 复合体对患者进行全身性的肿瘤治疗

通过白细胞去除从患者获得人白细胞，按实施例 3 中所述制备白细胞/NDV 复合体(LVC)，该复合体($5 \times 10^{+8}$ 细胞)通过静脉注射返回到患者体内。LVC 的注射隔三天一次，持续 21 天。

实施例 6: 用人供体的白细胞/NDV 复合体对患者进行全身性的肿瘤治疗

通过白细胞去除从正常供体获得人白细胞，按实施例 3 中所述制备白细胞/NDV 复合体(LVC)，该复合体($5 \times 10^{+8}$ 细胞)通过静脉注射返回到患者体内。LVC 的注射隔三天一次，持续 21 天。

实施例 7: NDV 与小鼠血细胞的结合

目的: 研究 NDV 与小鼠血细胞的结合以确定与病毒结合的细胞类型。

材料: 参考批号 RL-005 NDV，抗 NDV HN 蛋白的 Mab2F12 抗体(3.5mg/ml)，含有 2%的新生小牛血清和 0.02%的叠氮钠的、编目号 554656、批号 M059394 的 BD PharMingen Stain Buffer (PSB)缓冲液，编目号 710-1832、批号 7367 的藻红蛋白偶联-Rockland 羊抗鼠多克隆抗体，编目号 349202、批号 82026 的 Becton Dickinson 免疫细胞计数仪 10X FACS 溶血素溶液。

方法: 小鼠全血被收集在柠檬酸管(3.2%, 0.105M, Becton Dickinson #366415)中，用台盼蓝排除法和血细胞计数器进行细胞计数，批号 RL-005 的 NDV(4.2E+10 PFU/ml)按 MOIs(感染多重度，表示为 PFU/细胞) 为 0.2、1 和 3 (还有不添加病毒的阴性对照) 感染细胞。在添加病毒后，样品管在 37℃孵育 30 分钟，在孵育期间轻轻搅拌三次以使细胞保持在悬浮状态。

样品清洗两次，清洗步骤如下：加入 2ml 的冷 PSB，在 4℃的温度下 2000rpm 离心 5 分钟并吸除溶液留下细胞团。每次 PSB 是通过抽吸去除的。通过加入冷 PSB 将各样品的体积调整到 1ml，通过加入 20μl 的含 9.1μg 抗体的溶液向各样品添加 Mab2F12 单克隆抗体。样品在冰上孵育 30 分钟并按前述步骤再清洗两次，羊抗鼠-PE 指示抗体通过加入 1ml 的含 12μg/ml 该抗体的溶液被加入各样品中，样品再在冰上孵育 30 分钟并按上述方法清洗。为分析白细胞部分，100μl 的各样品与 3ml 的 1X FACS 溶血素溶液在室温下孵育 6 分钟，再如前进行离心，细胞团重悬在 0.5ml 的 PSB 中。为进行红细胞分析，1.5μl 的各样品被加入到 2.0ml 的 PSB 中。用 Becton Dickinson FACSCalibur 流式细胞仪进行样品分析，前向和侧向散射参数采用线性设置，而藻红蛋白的 FL2 检测采用对数设置。

结果：在表 4 中显示的试验结果表明，与 NDV 与人血液细胞结合时病毒优先与人全血中的白细胞部分结合(实施例 1)的情况不同，NDV 优先与小鼠全血的红细胞部分结合而不与白细胞结合。

表 4：NDV 结合阳性细胞百分率(%)

MOI	红细胞	白细胞
0.2	30	1
1	80	1
3	92	1

在人白细胞大部分为 NDV 结合阳性的 MOI 为 0.2 的情况下，小鼠白细胞为阴性。

实施例 8：NDV 与大鼠血细胞的结合

目的：研究 NDV 与大鼠血细胞的结合以确定与病毒结合的细胞类型。

材料：参考批号 RL-005 NDV，抗 NDV HN 蛋白的 Mab2F12 抗体(3.5mg/ml)，含有 2%的新生小牛血清和 0.02%的叠氮钠的、编目号 554656、批号 M059394 的 BD PharMingen Stain Buffer (PSB)缓冲液，编目号 710-1832、批号 7367 的藻红蛋白偶联-Rockland 羊抗鼠多克隆抗体，编目号 349202、批号 82026 的 Becton Dickinson 免疫细胞计数仪 10X FACS 溶血素溶液。

方法：从 Sprague Dawley 大鼠获得的全血(1.8ml)被收集在柠檬酸管(3.2%，0.105M，Becton Dickinson #366415)中并保持在室温下直至使用，用台盼蓝排除法和血细胞计数器进行细胞计数，批号 RL-005 的 NDV(4.2E+10 PFU/ml)按 MOIs(感染多重度，表示为 PFU/细胞)为 0.05、0.2、0.5、1 和 3 (还有不添加病毒的阴性对照) 感染细胞。在添加病毒后，样品管在 37℃孵育 30 分钟，在孵育期间轻轻搅拌三次以使细胞保持在悬浮状态。

样品清洗两次，清洗步骤如下：加入 2ml 的冷 PSB，在 4℃的温度下 2000rpm 离心 5 分钟并吸除溶液留下细胞团。每次 PSB 是通过抽吸去除的。通过加入冷 PSB 将各样品的体积调整到 1ml，通过加入 20μl 的含 9.1μg 抗体的溶液向各样品添加 Mab2F12 单克隆抗体。样品在冰上孵育 30 分钟并按前述步骤再清洗两次，羊抗鼠-PE 指示抗体通过加入 1ml 的含 12μg/ml 该抗体的溶液被加入各样品中，样品再在冰上孵育 30 分钟并按上述方法清洗。为分析白细胞部分，100μl 的各样品与 3ml 的 1X FACS 溶血素溶液在室温下孵育 6 分钟，再如前进行离心，细胞团重悬在 0.5ml 的 PSB 中。为进行红细胞分析，1.5μl 的各样品被

加入到 2.0ml 的 PSB 中。用 Becton Dickinson FACSCalibur 流式细胞仪进行样品分析，前向和侧向散射参数采用线性设置，而藻红蛋白的 FL2 检测采用对数设置。

结果：在表 5 中显示的试验结果表明，在低 MOI(0.02 和 0.05)的情况下 NDV 与大鼠白细胞结合，而在这些 MOI's 的情况下 NDV 与红细胞的结合并不好。这一形式介于病毒与人白细胞优先结合和与小鼠白细胞不结合之间。

表 5：NDV 结合阳性细胞百分率(%)

MOI	红细胞	白细胞
0.02	3	7
0.05	12	21
0.2	30	29
1	63	58
3	90	66

实施例 9：NDV 与人血小板的结合

目的：研究 NDV 与人血小板的结合。

材料：参考批号 RL-005 NDV，抗 NDV HN 蛋白的 Mab2F12 抗体(3.5mg/ml)，含有 2%的新生小牛血清和 0.02%的叠氮钠的、编目号 554656、批号 M059394 的 BD PharMingen Stain Buffer (PSB)缓冲液，编目号 710-1832、批号 7367 的藻红蛋白偶联-Rockland 羊抗鼠多克隆抗体，编目号 349202、批号 82026 的 Becton Dickinson 免疫细胞计数仪 10X FACS 溶血素溶液。

方法：

血小板的分离

人全血被收集在柠檬酸管(3.2%，0.105M 柠檬酸盐，Becton Dickinson #366415)中，将 7ml 的全血放入 15ml 的聚丙烯离心管中，该管在室温下按 800g 离心 5 分钟，从离心管的顶部收集大约 1.5ml 的富血小板血浆(PRP)。根据公布的产率，确定样品中含有 8.0E+8 细胞/ml。100μl 的 PRP 在室温下用 NDV(RL-005)按 MOIs 为 0.1、10 和 100 感染 30 分钟。

样品清洗两次，清洗步骤如下：加入 2ml 的冷 PSB，在 4℃的温度下 2000rpm 离心 5 分钟并吸除溶液留下细胞团。每次 PSB 是通过抽吸去除的。通过加入冷 PSB 将各样品的体积调整到 1ml，通过加入 20μl 的含 9.1μg 抗体的溶液向各样品添加 Mab2F12 单克隆抗体。样品在冰上孵育 30 分钟并按前述步骤再清洗两次，羊抗鼠-PE 指示抗体通过加入 0.1ml 的含 12μg/ml 该抗体的溶液被加入各样品中，样品再在冰上孵育 30 分钟并按上述方法清洗。用 Becton Dickinson FACSCalibur 流式细胞仪进行样品分析，前向和侧向散射参数采用线性设置，而藻红蛋白的 FL2 检测采用对数设置。

结果：在表 6 中显示的试验结果表明，NDV 与人血小板结合。在 MOI 的测试范围内 NDV 结合阳性的血小板的数目没有很大的增加，尽管平均荧光值的显著增长，这表明随着 MOI 的增大，有更多的 NDV 结合到血小板的阳性部分。

表 6：NDV 与人血小板的结合

MOI	血小板阳性率(%)	平均荧光值
0	0	10
1	67	258
10	81	616
100	73	1005

实施例 10: NDV 与人白细胞结合的等级

材料: 参考批号 RL-004 NDV，抗 NDV HN 蛋白的 Mab2F12 抗体 (3.5mg/ml)，含有 2%的新生小牛血清和 0.02%的叠氮钠的、编目号 554656、批号 M059394 的 BD PharMingen™ Stain Buffer (PSB)缓冲液，编目号 710-1832、批号 7367 的藻红蛋白偶联-Rockland 羊抗鼠多克隆抗体，编目号 349202、批号 82026 的 Becton Dickinson 免疫细胞计数仪 10X FACS 溶血素溶液。

方法: 人全血被收集在柠檬酸管(3.2%, 0.105M, Becton Dickinson™ #366415)中，从两管中各取出约 4ml 全血经冷却并保持在室温下直至使用。用台盼蓝排除法和血细胞计数器进行细胞计数，批号 RL-004 的 NDV(1.3E+10 PFU/ml)按相对于全血的 MOIs(感染多重度，表示为 PFU/细胞) 为 0、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 和 0.2 感染 100μl 的样品。在添加病毒后，样品在 37℃孵育 30 分钟。

样品清洗两次，清洗步骤如下: 加入 2ml 的冷 PSB，在 4℃的温度下 2000rpm 离心 5 分钟并吸除溶液留下细胞团。用 PSB 将各样品的体积调整到 100μl，通过加入 2μl 在 PSB 中制备的含 1μg 抗体的溶液向各样品添加 Mab2F12 单克隆抗体。样品在冰上孵育 30 分钟并按前述步骤再清洗两次，向各样品中加入 100μl 的由含 12μg/ml 该抗体的溶液按 2.4:1 的比率在 PSB 中稀释的溶液以添加羊抗鼠-PE 指示抗体，样品再在冰上孵育 30 分钟并按上述方法清洗。为制备用于白细胞分析的样品，各样品与 3ml 的 1X FACS 溶血素溶液在室温下孵育 6 分钟，再如前进行离心和抽吸，细胞团重悬在 0.5ml 的 PSB 中。用 Becton Dickinson FACSCalibur™ 流式细胞仪进行样品分析，通过比较各样品的前向散射和侧向散射参数选择性通过粒细胞、淋巴细胞和单核细胞群体，这

被用于确定各样品中各细胞群体的病毒结合阳性细胞数和平均荧光值。

结果(表 7)表明，NDV 优先与三个细胞群体结合，优先顺序为：单核细胞>粒细胞>>淋巴细胞。而且，如平均荧光值数据所显示的，单核细胞群体与 NDV 的结合比粒细胞群体显著要多，比淋巴细胞群体更多得多。

表 7

	阳性细胞率(%)			平均荧光值		
MOI	单核细胞	粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	粒细胞	淋巴细胞
0	2	2	2	13	19	7
0.005	80	68	19	65	20	9
0.01	92	97	39	134	35	11
0.02	99	100	54	219	66	16
0.05	98	100	72	314	113	22
0.10	99	100	84	448	154	31
0.20	100	100	96	692	251	69