(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1784242 B
(45)授权公告日 2011.06.08

(21)申请号 200380109808.3

(22)申请日 2003.12.18

(30)优先权数据
2002953436 2002.12.18 AU

(85)PCT申请进入国家阶段日
2005.08.17

(86)PCT申请的申请数据
PCT/AU2003/001688 2003.12.18

(87)PCT申请的公布数据
WO2004/054613 EN 2004.07.01

(73)专利权人 溶瘤病毒有限公司
地址 澳大利亚新南威尔士

(72)发明人 D·雪弗伦

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 张平元

(51)Int.Cl.
A61K 39/12(2006.01)
A61K 39/125(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 01/37866 A1,2001.05.31,说明书正文第1,6-10,12,17-19页.

Martha Triantafilou等.Identification of Echovirus 1 and coxsackievirusA9 receptormolecules via a novel flow cytometricquantificationmethod.Cytometry 43.2001,(43),279,287.

John Nemunaitis.Oncolytic viruses.Investigational New Drugs 17.1999,(17),375-386.

Gerasimos Anastassiou等.Expression of VLA-2,VLA-3,and αv integrin receptors inuvealmelanoma: association with microvasculararchitectureofthetumour and prognostic value.Br F Ophthalmol 84.2000,(84),899,901.

审查员 王璟

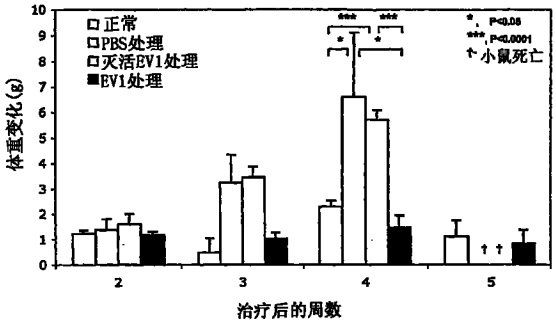
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 18 页

(54)发明名称

通过小核糖核酸病毒直接介导的溶瘤作用治疗受试者恶性肿瘤的方法

(57)摘要

本发明提供了治疗哺乳动物异常细胞如癌细胞的方法。该方法涉及使用病毒治疗哺乳动物,该病毒选自可识别 $\alpha_2\beta_1$以感染细胞的艾柯病毒,其修饰形式及其组合。本发明也提供了筛选用于本发明的方法中的病毒以及用于这些方法中的药物组合物的方法。



CN 1784242 B

1. 识别 $\alpha_2\beta_1$ 以感染卵巢癌细胞的艾柯病毒 EV1 在制备治疗哺乳动物卵巢癌的药物中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于所述治疗包括在多个治疗步骤中给予所述艾柯病毒 EV1。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于所述的治疗包括将所述艾柯病毒 EV1 与另一种感染卵巢癌细胞的病毒联合给予哺乳动物，其中所述另一种病毒为识别 ICAM-1 以感染所述细胞的柯萨奇病毒血清型 CAV21。

4. 根据权利要求 1 至 3 任何一项中所述的应用，其特征在于所述的卵巢癌细胞中 $\alpha_2\beta_1$ 的表达是上调的。

5. 根据权利要求 1 至 4 任何一项中所述的应用，其特征在于所述的药物适合全身或肿瘤内给予哺乳动物。

6. 一种筛选对诱发细胞死亡的艾柯病毒 EV1 具有易感性的哺乳动物卵巢癌细胞样本的方法，其特征在于包括：

(a) 提供卵巢癌细胞的样本；

(b) 用所述艾柯病毒 EV1 处理细胞足够的时间使细胞被所述艾柯病毒 EV1 感染；和

(c) 确定所述艾柯病毒 EV1 是否感染并至少引起一些卵巢癌细胞的死亡。

通过小核糖核酸病毒直接介导的溶瘤 作用治疗受试者恶性肿瘤的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使用病毒杀死异常细胞。也描述了筛选细胞的方法，以明确它们是否对病毒，以及药物组合物的处理敏感。本发明发现了一些在兽医方面以及在人类医学领域中的广泛应用。

背景技术

[0002] 卵巢癌是女性死亡的一个主要原因。几种恶性肿瘤均源自卵巢。卵巢上皮癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一，在因癌症死亡的女性中发生率居第五位，在超过 65 岁的女性患者的所有死亡原因中占半数。

[0003] 大约 5％至 10％的卵巢癌是家族性的，已经鉴定了 3 种明显的遗传模式 :单纯卵巢癌，卵巢和乳腺癌，或卵巢和结肠癌。卵巢癌的最重要危险因素是一级亲属（母亲、女儿或姐妹）有患病的家族史。在女性中最高危的情况是两个或多个的一级亲属患有卵巢癌。对于 1 个一级亲属和一个二级亲属（外祖母、姑母）患有卵巢癌的女性危险稍微小一些。在大多数患有乳腺癌和卵巢癌综合征，或位点特异性卵巢癌的家族中，遗传基因连锁已经发现在染色体 17q21 上的 BRCA1 基因座上。BRCA2 对于一些遗传性卵巢癌和乳腺癌也是起作用的，它通过遗传基因连锁被定位在染色体 13q12 上。

[0004] 在 BRCA1 上携带生殖系突变的患者中，发生卵巢癌对生命的威胁大大超过了普通人群。对 BRCA1 上有生殖系突变的患者进行的两个回顾性研究表明，与 BRCA1 阴性的女性相比这些女性的生存率是提高的。在解释这些数据时，必须考虑到大多数具有 BRCA1 突变的女性的可能拥有卵巢癌和 / 或乳腺癌史的家族成员。因此，这些女性可能要警惕一些，并最好参与可早期发现癌症的癌症筛选计划中。对于高危患者，如果 35 岁以后已完成分娩，可考虑采用预防性卵巢切除术。但，预防性卵巢切除术的优势尚未明确。在预防性卵巢切除术后，一小部分女性可发生原发性腹膜癌，其表现类似于卵巢癌 (Xiao,C 等人，2001)。上皮癌是卵巢癌最常见的类型。基质和胚细胞肿瘤相对少见，有不超过 10％的病例。

[0005] 卵巢癌的播散通常通过局部脱落进腹腔内，然后种植在腹膜上，以及通过局部侵袭肠和膀胱进行。这种肿瘤的高度致死性是由于患病女性早期缺乏征兆。据报道在首次手术中阳性淋巴结的发生率在 I 期患者中高达 24％，II 期患者为 50％，III 期患者为 74％。肿瘤细胞也可能阻塞横隔膜淋巴管。引起的腹膜淋巴引流障碍被认为是卵巢癌腹水发生的原因之一。穿过横隔膜播散至胸膜也是很常见的。

[0006] 卵巢癌的预后受几个因素的影响，但多变量分析表明最重要的有利因素包括较小的年纪、良好的表现状态、细胞类型不是粘质类和透明细胞、较低的分期、分化良好的肿瘤、在任何外科减积术之前较小的病灶体积、没有腹水和在首次细胞减积手术后残余较少的肿瘤。对于 I 期患者，最重要的预后因素是分级，然后是致密斑的附着和大量的腹水。DNA 流式细胞仪分析 I 期和 IIA 期患者可鉴定出一组高危患者。组织学上有透明细胞的患者似乎具有较差的预后。明显具有移行细胞癌成分的患者似乎有较好的预后。

[0007] 尽管当在诊断时测定的卵巢癌相关抗原 CA 125 与预后没有显著性，但当 III 期或 IV 期患者在第三个周期化疗后 1 个月测定时，它与生存率有很高的相关性 (Rossmann, M.G. 等人，2000)。对于化疗使 CA125 升高的正常患者，以后 CA125 升高一次以上就是活动期疾病的高度预测指标，但这还不能马上进行治疗。

[0008] 大多数患者在就诊时疾病已经播散，因为卵巢癌一般在早期是无症状的。部分是由于这种原因，每年卵巢癌的死亡率大约是发生率的 65％。即使使用以铂类为基础的组合治疗，非最佳减积的 III 期和 IV 期患者长期随访显示了不超过 10％的 5 年生存率。然而，该疾病的早期患者仍有很高比例可治愈。

[0009] 目前晚期卵巢癌的治疗包括全腹子宫切除术，仔细探查浆膜表面，并尝试除去所有病灶，通常紧接着进行包含铂类似物的化疗组合。存活率在 6 至 40 个月之间，长期存活率不超过 10％。

[0010] 已经进行的研究，目标是鉴定在良性和恶性肿瘤中表达不同的分子。

[0011] 已经发现卵巢癌可表达整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$(Moser, T.L. 等人，1996 ;Cannistra, S.A. 等人，1995 ;Bartolazzi,A. 等人，1993)。通过与 1 型胶原特异结合相互作用，$\alpha_2\beta_1$ 可促进人卵巢上皮癌的转移性播散 (Schiro,J.A. 等人，1991 ;Cardarelli,P.M. 等人，1992)。以前在人胃癌上也观察到整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 表面表达的上调。

[0012] $\alpha_2\beta_1$ 与 1 型胶原的相互作用可能在腹膜播种和转移中具有重要地位，$\alpha_2\beta_1$ 的过度表达已经显示可诱发非转移性细胞出现转移性 (Chan, B.M,等人，1991)。阻断 α2β1 已经显示出可极大的抑制 1 型胶原与卵巢癌的粘附。

[0013] 已知能够通过其复制过程诱发恶性细胞裂解的病毒是溶瘤病毒。大多数溶瘤病毒需要在相同的种属或细胞系中增殖。病毒对细胞的感染包括与细胞的附着和并可引起摄取进细胞内，这或与病毒衣壳的脱壳同时发生，随后在细胞内复制。

[0014] 估计具有杀死癌细胞能力的溶瘤病毒包括腺病毒亚型 Egypt 101 病毒，其在 Hela 子宫 / 宫颈癌细胞系中显示有溶瘤活性，治疗胃癌、子宫癌和皮肤癌的腮腺炎病毒，新城鸡瘟病毒 (NDV)，治疗卵巢癌的流感病毒，和治疗宫颈癌的腺病毒 (Nemunaitis J ;1999)。

[0015] 其他报道表明腺病毒和减毒脊髓灰质炎病毒重组体可用于治疗恶性神经胶质瘤 (例如，Andreansky S.S.，1996)，呼肠孤病毒具有活化的 Ras 信号通路，在人 U87 成胶质细胞瘤细胞和 NIH-3T3 细胞中显示有裂解能力 (例如，Strong J.E. 等人，1998)。

[0016] 牛痘溶瘤物也已经被用于治疗黑色素瘤 (II 期) 患者的临床实验中 (Nemunaitis J.，1999)。已经报道改良的无神经毒性的单纯疱疹病毒 (HSV) 有希望治疗包括颅内黑素瘤和皮下人黑色素瘤的脑肿瘤 (Randazzo B.R.，1997)，同时也有报道腺病毒感染可增强植物有丝分裂毒素 (mitotoxin) 肥皂草素对黑色素瘤细胞的杀伤力 (Satyamoorthy K.，1997)。

[0017] 腺病毒识别的靶细胞受体对于不同的腺病毒类型是不同的。也就是说，例如腺病毒亚群 A、C、D、E 和 F 可识别 CAR 受体，而腺病毒 5 型 (亚组 C)，腺病毒 2 型 (亚组 C) 和腺病毒 9 型 (亚组 D) 可分别识别主要组织相容性 II 类分子、$\alpha_m\beta_2$ 和 α_v 整合蛋白。已知该 CAR 受体可在黑色素瘤细胞系中表达。

[0018] 类肝素硫酸盐可被单纯疱疹 1 型和 2 型、人疱疹病毒 7、腺相关病毒 2 型识别。人疱疹病毒 7 的受体是 CD4，而 Epstein-Barr 病毒可识别补体受体 Cr2(CD21)。1 型和 2 型脊髓灰质炎病毒可识别脊髓灰质炎病毒受体 (Pvr) 以发生细胞粘附，而呼肠孤病毒可识别

唾液酸。流感 A 和 B 病毒可识别唾液酸 N- 乙酰神经氨酸发生细胞粘附。相反，C 型流感病毒可识别唾液酸 9-O- 乙酰神经氨酸。牛痘病毒可识别表皮细胞生长因子受体和类肝素硫酸盐，柯萨奇病毒 A13，A15，A18 和 A21 可识别 ICAM-1 和补体调控蛋白 DAF(CD55)（例如，见 Shafren D.R. 等人，1997）。世界专利申请 No.PCT/AU00/01461 描述了将识别 ICAM-1 以感染细胞的柯萨奇病毒用于受试者，来裂解表达 ICAM-1 的黑色素瘤细胞。DAF 也可被肠道病毒 70 识别（例如，见 Flint SJ 等人，(2000)Principle of Virology（病毒学原理）：molecular biology（分子生物学），pathogenesis and control（发病机理和控制）。ASM Press，Washington）。

[0019] 已经报道了一个对卵巢细胞传代培养的适应性，以及它们用于检测病毒的可能性进行了评估的研究 (Harris，RE 和 Pindak，FF，1975)。在该研究中，培养的正常卵巢细胞用多种病毒进行激发，包括细小核糖核酸病毒，如柯萨奇病毒 A、柯萨奇病毒 B、脊髓灰质炎病毒、艾柯病毒和心病毒及其血清型；副粘病毒如新城鸡瘟病毒、麻疹病毒、瘟热病毒；腺病毒人亚群血清型 3、4、7 和 21；单纯疱疹病毒，1 型；外衣病毒如 Sindbis 和 Mararo；呼肠孤血清型 1 至 3；牛痘病毒。研究证明来自人卵巢的细胞可长期生长在细胞培养物中，并可传代的次数无法确定，以便在体外繁殖多种病毒，推荐这种培养物用于研究病毒的发病机制和病毒感染的病理学。报道进一步说明一些病毒，如脊髓灰质炎病毒和牛痘，这些已经显示可穿透人类胎盘并感染胎儿，对病毒与培养中的正常卵巢细胞之间的相互作用的研究可能是促进畸形发生研究的一种方法。

[0020] 转移性肿瘤的播散是与一系列粘附 / 去粘附事件相关，并与可调控的组织降解相关联的病理过程。与细胞外基质的粘附和通过细胞外基质的迁移对于肿瘤的侵袭是很重要的。尽管在恶性肿瘤治疗中已经取得了一些进展，但对于包括卵巢恶性肿瘤的癌症的治疗仍是对研究的一个主要挑战，仍需要一些对现有治疗方法的可替代手段。

发明内容

[0021] 本发明涉及到一些观察结果，即可使用能识别 $\alpha_2\beta_1$ 进行细胞感染的艾柯病毒来显著杀伤异常细胞，如表达整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 的癌细胞。

[0022] 因此，在本发明的一个方面，提供了治疗哺乳动物异常细胞的方法，包括使用有效量的病毒治疗哺乳动物，该病毒选自艾柯病毒，其修饰形式及其组合，它们可识别 $\alpha_2\beta_1$ 进行细胞感染，这样至少有一些细胞被病毒杀死。

[0023] 识别 $\alpha_2\beta_1$ 的单个病毒血清型可用于哺乳动物或给予其识别 $\alpha_2\beta_1$ 的多个不同的艾柯病毒。

[0024] 术语“异常细胞”在本发明中的含义是取其广义，包括恶性细胞、任何异常生长的细胞和与表达正常表现型的相同类型的细胞相应正常细胞相比任何具有整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 异常表达上调的细胞，不管细胞是否是癌细胞以及细胞是否以异常速率增殖。因此，该术语包含肿瘤前期细胞和肿瘤细胞，以及最终可以或不进展成为癌细胞的细胞。例如异常生长可以是一种良性或恶性肿瘤。异常的细胞通常是恶性细胞。与发现异常细胞的周围组织相比，一般异常细胞 $\alpha_2\beta_1$ 的表达上调。因此，该病毒一般将优先感染异常细胞，因为接触这些细胞上的 $\alpha_2\beta_1$ 的可能性更高。同样，该病毒可用来有效地靶向异常细胞。

[0025] 本发明的一种方法特别适合治疗卵巢癌患者或原发卵巢肿瘤已经转移的癌症。但

本发明并不限于治疗这些癌症，本文所述的方法发现可应用于治疗其他癌症包括黑色素瘤和前列腺肿瘤以及乳腺癌、结肠癌、结直肠癌以及已经播散至机体其他部位的继发癌症。例如，该病毒可用于哺乳动物皮肤之外的机体部位中的黑色素瘤癌细胞。因此，本发明的方法延伸至治疗一种恶性肿瘤，该恶性肿瘤已经转移至哺乳动物中通常与艾柯病毒的感染无关的的部位或组织。

[0026] 该病毒一般作为活的完整病毒用于哺乳动物。可选择地是，例如使用编码病毒基因组或足以产生病毒的核酸供细胞摄取，在细胞内产生活的完整病毒。该核酸包括单个RNA或DNA分子，或分别编码不同的病毒蛋白的多个分子。

[0027] 该病毒也可用来筛选异常细胞以明确，例如病毒是否适合用于治疗该细胞取自的哺乳动物，或不包含该病毒的治疗方案是否更有效。相反，不同的艾柯病毒和/或其修饰形式或其组合可采用从哺乳动物获取的细胞样本来筛选，以便选择最合适治疗哺乳动物的病毒。

[0028] 因此，在本发明的另一个方面，提供了从哺乳动物筛选对诱发细胞死亡的病毒易感的异常细胞样本的方法，以评价应用病毒于哺乳动物，治疗异常细胞的病毒，该方法包括以下步骤：

[0029] (a) 提供哺乳动物异常细胞的样本；

[0030] (b) 用病毒治疗该细胞足够的时间，使病毒感染细胞；并

[0031] (c) 确定该病毒是否已经感染，并引起至少一些异常细胞死亡；

[0032] 其特征在于所述的病毒选自可识别 α2β1 以感染异常细胞的艾柯病毒，和其修饰形式及其组合。

[0033] 也可通过检测是否能够被指定的病毒感染和杀死样本中至少一些异常细胞，选择出可用于本发明的方法中的病毒。特别是该检测通过将每种病毒与异常细胞的样本分别孵育，并测定病毒感染是否引起这种细胞死亡，涉及筛选大量不同的病毒。

[0034] 因此，本发明的另一个方面，提供了筛选病毒感染和引起哺乳动物异常细胞死亡能力的方法，该方法用来评估应用病毒于哺乳动物对异常细胞的治疗作用，该方法包括以下步骤：

[0035] (a) 选择病毒；

[0036] (b) 用该病毒处理哺乳动物异常细胞样本足够的时间，使病毒感染细胞；并

[0037] (c) 测定该病毒是否已经感染并引起至少一些异常细胞的死亡；

[0038] 其中所述可识别 $\alpha_2\beta_1$ 以感染异常细胞的病毒，选自艾柯病毒，其修饰形式及其组合。

[0039] 该方法也包括以下的步骤，使用另一个细胞样本，进行步骤 (b) 和 (c) 比较所选择病毒和另一种可识别 $\alpha_2\beta_1$ 以感染细胞的艾柯病毒或其修饰形式感染并引起细胞死亡的能力。

[0040] 细胞死亡一般是由病毒感染细胞引起的，其原因可能是因为病毒的细胞内复制造成的细胞裂解，或由感染引发的凋亡，这最有可能是由于细胞级联反应的活化。一旦被裂解，被感染细胞胞质内容物可能从被破坏的浆膜中漏出，释放一些抗原，包括能够诱发对异常细胞的免疫反应的细胞表面抗原。因此根据本发明的方法对哺乳动物异常细胞的治疗可提高哺乳动物对异常细胞的免疫力。

[0041] 因此，在本发明的另一个方面，提供了在哺乳动物中诱发对表达 $\alpha_2\beta_1$ 的异常细胞产生免疫反应的方法，该方法包括用病毒感染哺乳动物的异常细胞，该病毒选自可识别 $\alpha_2\beta_1$ 以感染异常细胞并至少引起一些细胞裂解的艾柯病毒，其修饰形式及其组合。

[0042] 一般该病毒以药物组合物的形式提供，用于本发明的方法中。同样，在一个更深入的方面，提供了治疗哺乳动物异常细胞的药物组合物，其包括产生治疗细胞的病毒的接种物，这样至少有一些细胞被病毒以及药学可接受载体一起杀死，其特征在于所述的病毒选自可识别 $\alpha_2\beta_1$ 以感染细胞的艾柯病毒，其修饰形式及其组合。

[0043] 在本发明的另一个方面，提供了在生产药物的过程中使用接种物来产生病毒，这种药物是用来和病毒一起治疗哺乳动物异常细胞的，这样至少一些异常细胞被杀死，其特征在于所述的病毒选自可识别 $\alpha_2\beta_1$ 以感染异常细胞的艾柯病毒，其修饰形式及其组合。

[0044] 在本发明的另一个方面，提供了在生产药物的过程中，使用接种物产生病毒，这种药物是用来诱发哺乳动物针对异常细胞的免疫反应，其中病毒选自可识别 $\alpha_2\beta_1$ 以感染异常细胞并杀死细胞的艾柯病毒，其修饰形式及其组合。

[0045] 根据本发明的方法应用的艾柯病毒一般是选自艾柯病毒 EV1、艾柯病毒 EV8 和艾柯病毒 EV22 的艾柯病毒。虽然该病毒通常是一种很常见的动物艾柯病毒，但本发明不限于此，可使用改造的能够感染和杀死异常细胞的重组病毒，或例如已经被修饰以增强其感染和杀死细胞能力的病毒。

[0046] 相同的病毒可在不同的治疗周期中用于哺乳动物。但优选不同的病毒用于不同的治疗周期，以避免或减轻针对前面使用的病毒的任何免疫反应的潜在作用。例如病毒可局部、瘤内或全身应用于哺乳动物。

[0047] 该哺乳动物可以是根据本发明，需要治疗的任何哺乳动物。该哺乳动物典型地是人类。

[0048] 本发明的方法可用作其他治疗异常细胞的方法，如传统癌症治疗的辅助方法，或作为缺少其他治疗方法时的治疗手段。特别是本发明的方法可应用在传统治疗不适合或不实用的情况下，或是患者因为可能引起疤痕或畸形，特别是在患者的面部如鼻或唇，不接受异常细胞切除术的情况。该病毒可在异常细胞切除术之前和 / 或之后应用。切除术后的应用可杀死在周围组织中残余的异常细胞。

[0049] 因此，本发明的一个或多个实施方案提供了可替代的治疗方法，在早期和晚期恶性肿瘤的诊断之后均可应用，并进一步发现可用于杀死手术之前和之后残余的异常细胞。使用本文所述的方案，普通技术人员能够很容易地选择一种合适的病毒用于本发明的方法中，并确定何种异常细胞对感染易感，并引起细胞的死亡。

[0050] 在本发明的另一个方面，提供了一种涂药器，其可将接种物应用于哺乳动物，以产生病毒治疗哺乳动物中的异常细胞，其特征在于所述的涂药器包含一个注入了接种物的区域，这样接种物可与哺乳动物接触，该病毒选自可识别 $\alpha_2\beta_1$ 以感染细胞的艾柯病毒，其修饰形式及其组合。

[0051] 在本说明书中，“comprise(包含)”或其变化形式如“comprises(包含)”或“comprising(包含)”，将被理解为包含一个已述的要素、整体或步骤，或一组要素、整体或步骤，但不排除任何其他要素、整体或步骤，或一组要素、整体或步骤。

[0052] 在本说明书中提及的所有出版物在此合并为参考文献。已经包含在本说明书中的

文档、法规、材料、装置、文章等的任何论述的目的仅是为了说明本发明。不能被认为任何或全部这些材料组成了以往本领域基础理论的一部分，或是与本发明相关的领域中的一般公共常识，因为在本申请的每个权利要求的优先权日之前它已经普遍存在。

[0053] 本发明的特征和优势将更清晰的表现在下面对本发明的优选实施方案的描述中。

[0054] 附图简要说明

[0055] 图 1 显示了乳腺癌细胞表面上表面表达的 ICAM-1、CAR、DAF 和 $\alpha_2\beta_1$ 水平的流式细胞仪分析。该乳腺癌细胞与交联 R- 藻红蛋白的羊抗鼠免疫球蛋白 $F(ab')_2$ 片段孵育，这是在存在或缺少这些受体的相应特异单克隆抗体的情况下。从肠道病毒受体样本的几何平均数中减去交联样本的几何平均数，代表受体表达的相对水平。

[0056] 图 2 显示了肠道病毒 CAV21、CVB3、EV1、EV7 和 PV1 对乳腺癌细胞的裂解性感染。计算 50％的终点滴定度，如果 $TCID_{50}$/ml 终点为 10^4 或更高，则认为溶瘤作用很显著。

[0057] 图 3 显示了结直肠癌细胞表面上 ICAM-1、CAR、DAF 和 $\alpha_2\beta_1$ 表面表达水平的流式细胞仪分析。结肠癌细胞与交联 R- 藻红蛋白的羊抗鼠免疫球蛋白的 $F(ab')_2$ 片段孵育，这是在存在或缺少这些受体的相应特异单克隆抗体的情况下。从肠道病毒受体样本的几何平均数中减去交联样本的几何平均数，代表受体表达的相对水平。

[0058] 图 4 显示了肠道病毒 CAV21、CVB3、EV1、EV7 和 PV1 对结直肠癌细胞的裂解性感染。计算 50％的终点滴定度，如果 $TCID_{50}$/ml 终点为 10^4 或更高，则认为溶瘤作用很明显。

[0059] 图 5 显示了前列腺或胰腺癌细胞表面上 ICAM-1、CAR、DAF 和 $\alpha_2\beta_1$ 表面表达水平的流式细胞仪分析。前列腺或胰腺癌细胞与交联 R- 藻红蛋白的羊抗鼠免疫球蛋白的 $F(ab')_2$ 片段孵育，这是在存在或缺少这些受体的相应特异单克隆抗体的情况下。从肠道病毒受体样本的几何平均数中减去交联样本的几何平均数，代表受体表达的相对水平。

[0060] 图 6 显示了肠道病毒 CAV21、CVB3、EV1、EV7 和 PV1 对前列腺或胰腺癌细胞的裂解性感染。计算 50％的终点滴定度，如果 $TCID_{50}$/ml 终点为 10^4 或更高，则认为溶瘤作用很明显。

[0061] 图 7 显示了卵巢癌细胞表面上 ICAM-1、CAR、DAF 和 $\alpha_2\beta_1$ 表面表达水平的流式细胞仪分析。前列腺或胰腺癌细胞与交联 R- 藻红蛋白的羊抗鼠免疫球蛋白的 $F(ab')_2$ 片段孵育，这是在存在或缺少这些受体的相应特异单克隆抗体的情况下。从肠道病毒受体样本的几何平均数中减去交联样本的几何平均数，代表受体表达的相对水平。

[0062] 图 8 显示了肠道病毒 CAV21、CVB3、EV1、EV7 和 PV1 对卵巢癌细胞的裂解性感染。计算 50％的终点滴定度，如果 $TCID_{50}$/ml 终点为 10^4 或更高，则认为溶瘤作用很明显。

[0063] 图 9A 显示了用 10^{-1} 稀释度的 EV1 感染单层卵巢癌细胞 72 小时的显微照相图片。在重复进行该病毒输入的情况下，除了细胞系 A2780 以外的所有细胞系显示 EV1（右侧）有显著的溶瘤作用水平。

[0064] 图 9B 显示了用 10^{-1} 稀释度的 EV1 感染单层卵巢癌细胞 72 小时的显微照相图片。在重复使用多种病毒的情况下，除了细胞系 SKOV-3 以外的所有细胞系显示 EV1（右侧）有显著的溶瘤作用水平。

[0065] 图 10 显示了 EV1 对卵巢癌细胞的裂解性感染。10 个细胞系中的 7 个被认为对 EV1 的溶瘤作用易感。如果病毒滴定度 ($TCID_{50}$/ml) 计算为 10^4 或更高，溶瘤作用被认为是显著的。

[0066] 图 11 显示了存在抗 $\alpha_2\beta_1$ 时 EV1 结合作用被抑制。存在和缺少抗 $\alpha_2\beta_1$ 或抗 DAF MAb 时，[^{35}S]- 蛋氨酸标记的 EV1 与卵巢癌细胞系的结合作用。通过 1450Microbeta TRILUX(Wallac,Finland) 液体闪烁计数测定结合的 [^{35}S]- 蛋氨酸标记病毒的水平。

[0067] 图 12 显示了 EV1 在存在或缺少抗 $\alpha_2\beta_1$MAb 时，EV1 对卵巢癌细胞系 OWA-42 和 IGROV-1 的裂解性感染。感染后 72 小时，用抗 $\alpha_2\beta_1$MAb 预孵育的细胞仍然是完全被保护的。通过用结晶紫甲醇溶液染色来测定细胞存活率。

[0068] 图 13 显示了在存在或缺少抗 $\alpha_2\beta_1$MAb 时，EV1 对单层 OWA-42 卵巢癌细胞的裂解性感染。在感染后 24、48 和 72 小时拍摄的显微照相图片，证明由于单克隆抗体阻断 $\alpha_2\beta_1$ 受体，细胞完全不受 EV1 感染。

[0069] 图 14 显示了 DOV13 卵巢癌细胞培养在环形插入物内，HeLa 细胞（人成纤维细胞）培养在外环。用 EV1 感染后，活细胞用结晶紫甲醇溶液染色。EV1 特异性感染卵巢癌细胞，而 HeLa 细胞仍然是健康的。

[0070] 图 15 显示了黑色素瘤细胞系 SkMel28 上表面表达的 $\alpha_2\beta_1$ 水平的流式细胞仪分析。在存在或缺少抗 $\alpha_2\beta_1$ 的情况下，SkMel28 细胞与 R- 藻红蛋白交联的羊抗鼠免疫球蛋白 F(ab′)2 片段孵育。从样本的几何平均数中减去交联样本的几何平均数，确定差值，由此确定受体的表达。由于几何平均数有差值，证明有显著的 $\alpha_2\beta_1$ 表达。

[0071] 图 16 显示了在存在和缺少抗 $\alpha_2\beta_1$ 或抗 DAF MAb 的情况下 [^{35}S]- 蛋氨酸标记的 EV1 与 SkMel28 黑色素瘤细胞的结合作用。在 1450Microbeta TRILUX(Wallac,Finland) 上通过液体闪烁计数测定已经结合的 [^{35}S]- 蛋氨酸标记病毒的水平。$\alpha_2\beta_1$ 的阻断可引起显著的 EV1 结合抑制。结果表示为三个样本的均数 ± 标准误。

[0072] 图 17 显示了 EV1 对 SkMel28 黑色素瘤细胞的裂解性感染。通过结晶紫甲醇溶液测定细胞存活率。观察到有显著的裂解作用。

[0073] 图 18 是显示用 EV1 处理卵巢癌多细胞球状体的显微照相图片。

[0074] 图 19A 显示通过在腹膜内 (i.p.) 途径用磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、UV- 灭活艾柯病毒 EV1 或感染性 EV1(10^5TCID$_{50}$) 腹膜内注射前 3 周给予 1.0×10^6OVHS-1 细胞的 SCID 小鼠体重变化的直方图。

[0075] 图 19B 显示了与用 OVHS-1 细胞注射和用 PBS，UV- 灭活 EV1 或 EV1 处理的小鼠相比，正常对照 SCID 小鼠注射后 5 周时拍摄的照片。注意在给予 PBS 或 UV- 灭活 EV1 的荷瘤小鼠中腹水的发生。优选实施方案

[0076] 为了确定一种病毒是否能够感染并引起肿瘤细胞的死亡，从肿瘤取活检，使用常规的技术制备细胞制剂，然后：(i) 证实病毒受体细胞的表面表达和 (ii) 用病毒激发细胞，监测在预先确定的孵育时间内的细胞感染和细胞死亡，虽然根据使用的病毒，这个孵育时间可发生变化，但一般大约为 2 天。$\alpha_2\beta_1$ 的表达很容易通过流式细胞分析来证实。大量病毒可以此方式筛选，同时，使用不同的等体积已制备的恶性细胞，选择显示有较高程度感染性和细胞死亡的病毒给予取活检的受试者。同样，从不同来源获取的活检中获得的不同的恶性细胞制剂可用于使用具体病毒的测定中。该活检可从单个个体或大量个体的不同部位获取。

[0077] 期望在本文所述的方法中使用的病毒仅引起接受者很少或轻微的临床症状。这种病毒很容易从普通技术人员所熟知的商业渠道获得，可用上面所述的方式，用该方法筛

选其有效性。通常期望病毒是选自艾柯病毒 EV1、艾柯病毒 EV7、艾柯病毒 EV8 和艾柯病毒 EV22 的艾柯病毒。这些病毒的每一种都识别 $\alpha_2\beta_1$ 以感染细胞。例如 EV1 与轻度上呼吸道疾病和胸膜痛有关 (Fields B.N. 等人,2000 ;McCracken A.W. 等人,1969)。

[0078] 相信 $\alpha_2\beta_1$ 的表达在卵巢癌上是上调的,其原因是在间皮中遇到的基质主要是 I 型胶原。大量的恶性黑色素瘤也已经显示 $\alpha_2\beta_1$ 的表达水平是上调的 (Kramer R.H. 和 Marks N,1989 ;Ramos D.M. 等人,1990)。使用 $\alpha_2\beta_1$ 亚单位结构区 I 中的不同残基,EV1 和胶原附着于 $\alpha_2\beta_1$(Bergelson J.H.,1993)。整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 不能同时接纳 EV1 和胶原。但该病毒与 $\alpha_2\beta_1$ 的结合与 I 型胶原相比亲和性增加 10 倍 (Xing L,2002)。

[0079] 为了筛选指定的病毒以明确它是否能够感染和引起恶性细胞的死亡,可使用恶性细胞系而不是从活检中分离的原代恶性细胞。

[0080] 已选择的病毒将优选直接注射至恶性肿瘤的多个部位上,以便将该病毒可能感染肿瘤的区域最大化。除了完整的病毒,掺入了核酸可产生病毒的病毒,或其他质粒,或表达载体可被注射进肿瘤中,以被肿瘤细胞摄取,在细胞内产生完整的病毒,使治疗发挥作用。合适的表达载体包括能够表达编码产生病毒所需的病毒蛋白的 DNA(例如,基因组 DNA 或 cDNA) 插入物的质粒。表达载体通常包括与被插入的核酸可操作连接的转录调控序列。“可操作连接”的含义是核酸插入物与转录调控序列连接,使被插入序列转录,而不需要进入插入物的可读框内。这种转录调控序列包括促进 RNA 聚合酶的结合以起始转录的启动作用,以及使核糖体与已转录的 mRNA 结合的表达控制元件。

[0081] 更特别的是,在本文使用的术语“调控序列”包含参与驱动转录和控制 (即,调节) 指定 DNA 序列转录水平的任何 DNA。例如,5′ 调控序列是位于编码序列上游的 DNA 序列,其包含启动子和 5’ 未翻译的引导序列。3′ 调控序列是位于编码序列下游的 DNA 序列,包含合适的转录终止 (和 / 或) 调节信号,包括一个或多个聚腺苷酸化信号。如本文所使用,术语“启动子”包括在转录起始过程中被 DNA 依赖性 ENA 聚合酶识别并结合 (直接或间接) 的任何 DNA 序列。启动子包括转录起始位点,和转录起始因子和 RNA 聚合酶的结合位点,并能够包含其他的多种位点或序列 (例如,增强子),基因表达调控蛋白可与其结合。

[0082] 适合转染哺乳细胞的大量表达载体在本领域中是已知的。适合转染哺乳动物细胞的表达载体包括 pSV2neo、pEF-PGkpuro、pTk2 和非复制性腺病毒穿梭载体,其掺入了聚腺苷酸化位点和延伸因子 1-x 启动子和 pAdEasy 为基础的表达载体大多数优选掺入了巨细胞病毒 (CMV) 启动子 (例如,见 He 等人,1998)。也可应用将多肽延伸因子 -α 2 作为启动子的质粒 pEFBOS。

[0083] 通过逆转录病毒 RNA 基因组或其片段制备编码产生病毒所必需的病毒蛋白的 cDNA,使用本领域中熟知的重组技术掺入进合适的载体中,例如在 Sambrook 等人 (1989),分子克隆 :实验室手册,第二版,Cold Spring Harbour Laboratory Press,New York,和 Aueubel 等人,(1994),现代分子生物学方法,USA,第 1 和 2 卷中所述的技术。

[0084] 除了 cDNA,可用从纯化的病毒体中提取的病毒 RNA 转染细胞,或例如在体外使用噬菌体 T7RNA 聚合酶从 xDNA 模板中产生 RNA 转录物,后者如 Ansardi,D.C. 等人,2001 中所述。同样,单个质粒或 RNA 分子可用来表达病毒蛋白和产生病毒,或多个质粒或编码不同病毒蛋白的 RNA 分子被用来转染细胞和产生病毒。

[0085] 在缺少促进细胞转染的载体运载体的情况下,或与这种运载体联合应用,质粒或

RNA 可直接用于肿瘤或其局部，或通过注射被肿瘤细胞摄取。合适的载体运载体包括脂质体，其一般是以本领域中通常已知的水包油乳剂形式提供。脂质体通常包含脂类的组合，特别是磷脂，如高相变温度的磷脂，其通常具有一个或多个类固醇或类固醇前体如胆固醇，可为脂质体提供膜稳定性。可用于提供脂质体的脂类例子包括磷脂酰化合物如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、鞘脂、磷脂酰乙醇胺、脑苷脂和神经节苷脂。二酰基磷脂酰甘油酯特别合适，其脂类部分含有 14 至 18 个碳原子，更优选 16 至 18 个碳原子，并是饱和的。

[0086] 脂质体与靶细胞的相互作用是被动或主动的。主动的靶向作用涉及脂质体的修饰作用，其通过将该配体可结合的特异的配体掺入进脂质体膜，或与靶细胞表达的相应配体相互作用。这种配体包括，例如单克隆抗体或其结合片段（例如，Fab 或 $F(ab')_2$），糖或糖脂部分，或病毒蛋白。病毒蛋白或 $\alpha_2\beta_1$ 的特异单克隆抗体是特别优选的。

[0087] 正常情况下，只要组织中有恶性细胞存在的可能性，肿瘤周围的组织就也可被注射或用该病毒处理。如果该肿瘤直至相对晚期才被发现，在手术切除肿瘤后，周围组织可用该病毒注射。

[0088] 除了被直接注射进恶性肿瘤中，该接种物可被全身给药，在肿瘤部位邻近的位置通过静脉注射至接受者的血流中以输送至肿瘤。同样，该接种物可被皮下或腹膜内给药，或例如，如果认为合适可肌肉内给药。但一般当使用完整的病毒时，只要有存在病毒特异抗体的可能，就优选直接将病毒注射进肿瘤中，该抗体有可能降低各种可交替使用的病毒输送方式的效率。

[0089] 接种物也可单独或与将接种物直接注射入肿瘤联合使用局部应用于肿瘤。局部治疗可通过逐滴应用药物组合物来完成，该组合物含有接种物和合适的药学可接受载体，以保持接种物的完整性以便感染恶性细胞，或使用一种充满了这种组合物的涂药器涂抹肿瘤。该涂药器可含有一团或一块浸过组合物的合适材料的填充物。在治疗皮肤上的黑色素瘤时，使用充满接种物的涂药器来应用接种物，该涂药器置于被治疗的恶性肿瘤部位，这样接种物能与皮肤接触。在这种情况下，涂药器含有一种贴片或一团填充物等，其中充满了接种物，可进一步提供粘合表面或多种表面，如附着于黑色素瘤周围的皮肤上的粘的膏药，这样可使接种物保持与黑色素瘤的接触。一般可给予哺乳动物完整的病毒以发挥治疗效应。

[0090] 通常可在恶性肿瘤上和 / 或周围组织上作一个或多个小的切口，为病毒进入其中提供入口。

[0091] 对于卵巢癌，或卵巢附近的癌症，艾柯病毒可使用导管或其他合适的给药装置，通过将导管或选择的装置沿输卵管插入，直接输送至卵巢或受累部位。

[0092] 在靶细胞内使用病毒和 / 或核酸或含有能产生病毒的病毒核酸的质粒来接种受者所使用的药学可接受载体可以是液体，如生理盐水，或被认为适合的任何其他传统已知的生理可接受的介质，如市售的适合作为药物应用，并可将接种物施于治疗部位的各种凝胶。该载体一般可被缓冲至生理 pH，并可含有合适的防腐剂和 / 或抗生素。

[0093] 该接种物一般含有大约 1×10^2 至大约 1×10^{10} 空斑形成单位 /ml 接种物。优选，该接种物含有大约超过 1×10^5 空斑形成单位 /ml 接种物。主治医生或外科医生可根据公认的医学实践经验，结合患者的一般情况，分期和恶性肿瘤的位置以及用病毒治疗区域的全部大小和分布，很容易地确定给于患者的接种物的量。一般患者用初始剂量的病毒治疗，随后在决定进一步给予病毒之前，监测适当的时间周期，确定一些不明确的因素如患者初

始病毒给药时的反应，以及初始治疗产生的病毒感染的程度和恶性细胞死亡的程度。

[0094] 期望个体用该病毒以预先确定的间隔治疗一定的时间。如为适合每种情况所确定的那样，间隔时间可以是每天，或从 24 小时至 72 小时或更大的范围。每次可使用不同的病毒以避免或尽量减小对前面应用的病毒的任何免疫反应，治疗周期可延伸至一至两周或更多，可由主治医生来确定。更优选，可应用哺乳动物以前未接触过的或可通过标准的技术确定的哺乳动物可产生相对小的免疫反应的病毒。

[0095] 虽然很容易获得的已知艾柯病毒适合用于本发明的方法中，但也可应用修饰的病毒或使用常规技术改造的病毒。例如，该病毒可被修饰为使用其他的细胞粘附分子作为细胞受体。作为例子，病毒可使用位点定向诱变来修饰，这样在该病毒衣壳表面上表达肽基序″ RGD″。RGD 基序可被 α_v 整合蛋白杂二聚体识别，这种衣壳修饰例如可使病毒与整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 结合，后者是一种已经显示在黑色素瘤病灶上表达上调的细胞粘附分子 (Natalia P.G ;1997) 因为具有 $\alpha_2\beta_1$，可能引起靶细胞对病毒的摄取增强。

[0096] 为了更清楚的了解本发明的特征，其优选的形式是以下列非限制性例子作为参考来描述。

[0097] 实施例 1 :材料和方法

[0098] 1.1. 细胞系

[0099] IGROV-1、A2780、DU145、PC3、AsPC-1、PANC-1、T47-D、MDA-MB361、MDA-MB453、MDA-MB231 和 MCF-7 癌细胞系从澳大利亚，新南威尔士，悉尼，Garvan Institute 获得。BT-20、MDA-MB157、SK-BR-3、ZR-75-1、HCT116、LIM2537、SW480、SW620、2008、JAM、OVCA-429、OVCAR-3、OVHS-1、OWA-42、SKOV-3 和 DOV13 癌细胞系从澳大利亚，维多利亚，墨尔本，Peter MacCullum CancerInstitute 获得。SkMel28 细胞从澳大利亚，维多利亚，Monash 大学，生物化学和分子生物学系，Ralph 博士处获得。HeLa 细胞从澳大利亚，维多利亚，墨尔本，Fairfield 医院，Margery Kennett，Entero-respiratoryLaboratory 获得。除了 BT-20 细胞在 α -MEM 培养基中培养以外，所有的细胞可在标准条件下 (37℃，5％ CO_2 大气条件) 在含有 2-5％胎牛血清 (FCS) 和抗生素的 RPMI 中培养。所有使用的细胞通过 ELISA 常规检查衣原体的存在 (Roche Molecular Systems，CA，USA)。

[0100] 1.2. 病毒

[0101] 柯萨奇病毒 A21(CAV21) 原型菌株 Kuykendall ；柯萨奇病毒 B3(CVB3) 原型菌株 Nancy ；艾柯病毒 (EV1) 原型菌株 Farouk ；艾柯病毒 (EV7) 原型菌株 Wallace ；和脊髓灰质炎病毒 1(PV1) 原型菌株 Mahoney 从澳大利亚，维多利亚，墨尔本，Fairfield 医院，EnterorespiratoryLaboratory 的 Margery Kennett. 博士处获得。所有病毒在 HeLa 细胞中繁殖并进行滴定。

[0102] 1.3 单克隆抗体 (MAb)

[0103] 抗 -DAF MAb VIIIA7，可识别 DAF 的第三个 SCR，从日本，大阪，大阪大学，T.Kinoshita 博士处获得，抗 DAF mAb IH4 由澳大利亚，维多利亚，海德尔堡，Austin 研究协会，Bruce Loveland 博士惠赠。抗 -CARMAb RmcB 从马萨诸塞州，波士顿，Dana Farber 癌症协会的 J.M.Bergelson 博士处获得。抗 -β_2- 微球蛋白 MAb 918 从英格兰，赫特福德郡，NIBSC，P.Minor 博士处获得。抗 -$\alpha_2\beta_1$MAb AK7 可识别 α_2 亚单位，对照抗 -GPIV(血小板膜糖蛋白) 抗体 MAb PTA-1 从澳大利亚，NSW，纽卡斯尔大学，医学生物化学和癌症研究系的

Gordon Burns 教授处获得。抗 -ICAM-1MAb IH4 从澳大利亚，昆士兰，昆士兰医学研究协会的 Andrew Boyd 教授处获得。

[0104] 1.4. 流式细胞仪分析

[0105] 癌细胞上肠道病毒受体的表面表达通过流式细胞仪分析。被分散的细胞 (1×10^6) 在冰上用合适的 MAb(5μg/ml，用 PBS 稀释）孵育 20 分钟。用 PBS 洗涤细胞，离心沉淀，然后重新悬浮在 100μl 1 ：50 稀释的 R- 藻红蛋白交联的羊抗鼠免疫球蛋白的 $F(ab')_2$ 片段 (Dako，A/S，Denmark) 中。在进行流式细胞仪分析之前细胞再次在冰上孵育 20 分钟，洗涤，沉淀，重新悬浮在 PBS 中。使用 FACStar 分析仪 (Becton Dickenson，Sydney，Australia) 分析细胞表面受体的表达。

[0106] 1.5. 病毒感染性测定

[0107] 癌细胞系的汇合单层用 10 倍系列稀释 (100μl/ 孔，三份或四份）的 CAV21、CVB3、EV1、EV7 或 PV1 接种在含有 1％胎牛血清 (FCS) 的 DMEM 中，并在 37℃，5％ CO_2 环境中孵育 72 小时。为了测定细胞的生存率，培养板用 100μl/ 孔的结晶紫甲醇溶液 (0.1％结晶紫，20％甲醇，20％甲醛，磷酸盐缓冲盐水 (PBS)) 孵育 24 小时，并在蒸馏水中洗涤。

[0108] 有限稀释测定的终点是影响 50％检测单位的病毒稀释度。使用 Reed 和 Muench 法（参考文献）来应用统计学步骤计算终点。终点表示每毫升 50％组织培养物的感染剂量 ($TCID_{50}$/ml)。

[0109] 当需要用抗受体的单克隆抗体预处理细胞单层时，细胞用 100μl 抗 $-\alpha_2\beta_1$AK7MAb(20μg/ml，在 PBS 稀释）37℃孵育 1 小时。然后细胞单层接种在合适病毒稀释度的两份样品中，并在上述染色前在 37℃ 5％ CO_2 环境中孵育 72 小时。

[0110] 使用倒置显微镜 (Olympus IX-FLA) 以 100X 放大倍数在 24、48 或 72 小时拍摄显微照相图片。

[0111] 1.6 病毒纯化

[0112] 含有 DOV13 细胞汇合单层的 6 孔组织培养板接种 500μl EV1（感染复数 [moi] ＝ 10^5TCID $_{50}$/ml)37℃，1 小时。用无蛋氨酸 / 半胱氨酸 DMEM(ICN Biomedical，Ohio，USA) 洗涤三次去除未结合的病毒，在加入 300μCi[^{35}S]- 蛋氨酸反向标记 (ICN Biomedical，Ohio，USA) 之前，细胞单层继续在 1.3ml 这种培养基中 37℃孵育 2 小时。被感染的单层在 37℃，5％ CO_2 的环境中孵育过夜。三次冷冻 / 复温循环后，病毒裂解产物在 5-30％蔗糖梯度中纯化，在 Beckman XL-90 超速离心机 (SW41tiRotor) 速度离心 36,000rpm，离心 95 分钟。从每个试管的底部收集组分，通过液体闪烁计数监测 (Wallac 1450 Microbeta TRILUX，Finland)，对在病毒结合测定定位使用的 160S 病毒峰。

[0113] 未放射性标记的 EV1 病毒体用集中的峰值感染组分以类似的梯度进行纯化，用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 透析。紫外线 (UV) 灭活 EV1 的产生是通过在 6 孔板中将 1.0ml PBS 液中纯化的 EV1/ 孔 (5×10^5TCID $_{50}$) 在 15 瓦 UV 光下照射 30 秒。通过微滴定板裂解性感染性细胞测定计算病毒的灭活。

[0114] 1.7. 放射性标记病毒结合测定

[0115] 重新悬浮在 800μl 含有 1％牛血清白蛋白 (BSA) 的 RPMI 中的大约 1×106 细胞在 20μg/ml MAb（抗 -α2β1 或抗 -DAF，在 PBS 中稀释）存在下，4℃孵育 1 小时，然后加入 300μl(1×10^6)[^{35}S]- 蛋氨酸标记的 160SEV1。4℃孵育 2 小时后，细胞用无血清培养基洗

涤 4 次，在三个样品通过液体闪烁计数测定结合的 [^{35}S] 蛋氨酸标记病毒的水平之前，细胞团裂解在 200μl 0.2M NaOH-1% SDS 中。(Wallac 1450 Microbeta TRILUXFinland)。结果表示为均数 ±SE。

[0116] 1.10 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[0117] [35S]- 蛋氨酸标记的病毒组分通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析 (PAGE)，并通过放射自显影来显影。[^{35}S]- 蛋氨酸标记的 160S EV1 组分用样品还原缓冲液 (250mM TRIS，0.2g w/v SDS，20% v/v 甘油，10% v/v2- 巯基乙醇和 0.01% w/v 溴酚蓝，pH6.8)95℃孵育 10 分钟，使病毒体变性。然后变性的 160S 病毒峰组分在 15% Tris-HCl 预制胶 (BIORADReady-Gel，CA，USA) 结合 Benchmark 预先染色的中等蛋白梯度 (GIBCO，USA) 上以 180V 分离 45 分钟。接触 96 小时后在 Hyperfilm MP(Amersham International，England) 上通过放射自显影显示主要结构蛋白和分析病毒纯度。

[0118] 1.11 细胞的细胞毒性测定

[0119] 人外周血淋巴细胞 OVHS-1 和 DOV-13 细胞的细胞悬液用 EV1(moi = 1.0TCID$_{50}$/ 细胞）激发，37℃孵育 24 小时。细胞裂解产物的水平可计算为 LDH(一种在细胞裂解过程中释放的稳定的胞浆酶）释放的函数，使用 Cyto-Tox 96 试剂盒 (Promega Corp.Maddison，WI.USA) 按照生产厂商的说明书进行评价。

[0120] 1.12 球状体的培养和球状体感染性的测定

[0121] DOV-13 细胞以每孔 500 或 5000 个细胞植入 24 孔板，1ml 含有 5% FCS 的 RPMI1640 中接种至半固体的 0.5% 琼脂糖层上。在加入 EV1(10^{5}TCID$_{50}$) 之前细胞在 5% CO_2 气体中在 37℃孵育 48 小时，使球状体形成。

[0122] 1.13 SCID 小鼠腹膜内肿瘤异种移植模型

[0123] 6 至 8 周龄的雄性 BALB/c SCID 小鼠根据纽卡斯尔大学实验动物管理和伦理委员会所批准的方案在无菌条件下圈养。OVHS-1 细胞用 0.05% 胰蛋白酶收获，重新悬浮在含有 10% FCS 的 RPMI 中，离心沉淀。在小鼠用 200μL 含有 1×10^{6} 细胞的溶液腹腔内注射 (i.p.) 之前，洗涤细胞，并重新悬浮在 PBS 中。14 天后，小鼠分为三组 (n = 5)，用磷酸盐缓冲盐水 (PBS)，或 10^{5}TCID$_{50}$ 的 UV 灭活 EV1 或感染性 EV1 处理。以每周为基准对动物进行称重，当肿瘤超过其体重 20% 时处死。处理小鼠的体重与未荷瘤的健康 BALB/c SCID 小鼠的体重进行比较。

[0124] 1.14 通过实时 PCR 测定病毒血症

[0125] 来自感染小鼠的血清采用实时定量 RT-PCR 分析病毒血症。简言之，使用 QIAamp 病毒 RNA mini 试剂盒 (Qiagen，Clifton Hill，维多利亚，澳大利亚）从 10μl 血清中提取病毒 RNA，并根据生产厂商的说明书洗脱为 40μl 终体积。使用 Primer Express™ 1.5 软件 (AppliedBiosyatems，Foster City，CA，USA) 并基于以前公布的 EV1 序列 (Genbank 登记号 AF029859) 设计测定 EV1 病毒 RNA 水平的引物和探针，；正向引物 (5′ -CAAGACAGGGACCAAAGAGGAT-3′)，反向引物 (5′ -CCACTCGCCTGGTTGTAATCA-3′)，以及 6-FAM 标记的 MGB- 探针 (5′ -CCAATAGCTTCAACAATT-3′)。使用 Platinum® 定量 RT-PCR ThermoScript™ 一步系统在 ABI7000 序列检测仪上进行一步 RT-PCR。为了产生标准曲线，EV1 病毒储存液 (1×10^{6}TCID$_{50}$/ml) 的 10 倍稀释液用最佳浓度的引物和探针进行扩增。在 25μl 的体积中，反应混合物包括：1×ThermoScript™ 反应混合物，500nM 正向引物，900nM

反向引物，250nM 探针，500nM ROX，0.5μl ThermoScript™ Plus/PlatinumTag Mix 和 5μl 提取的 RNA。热循环条件为 60℃ 30 分钟，然后 95℃ 5 分钟，然后在 95℃ 15 秒和 60℃ 1 分钟进行 40 个循环。

[0126] 实施例 2：病毒介导的对癌细胞系的溶瘤作用

[0127] 2.1 乳腺癌细胞表面上肠道病毒受体的表达

[0128] 为了确定肠道病毒所使用的被选肠道病毒细胞表面受体的相对表达水平，进行流式细胞分析。被选的受体包括 CAV21 使用的 ICAM-1；被 EV7，CAV21，CVB3 使用的 DAF；CVB3 使用的 CAR；以及 EV1 使用的整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$。由于没有针对 PVR 受体的 Mab，因此没有检测到 PVR 的表达水平。

[0129] 分析 9 个乳腺癌细胞系，包括 BT-29、MCF-7、MDA-MB157、MDA-MB231、MDA-MB361、MDA-MB453、SK-BR-3、T47-D 和 ZR-75-1。这些细胞系与抗 -ICAM-1(IH4)、抗 -CAR(RmcB)、抗 -DAF(VIIIA7) 或抗 -$\alpha_2\beta_1$(AK7) 共同孵育。

[0130] 这 9 个细胞系中的 6 个，ICAM-1 的表达是显著的，而在所有细胞系中 DAF 似乎表达的水平相对较低。这 9 个细胞系中的 7 个，很明显存在中等水平的 CAR 表达，而在 8 个乳腺癌细胞的表面上 $\alpha_2\beta_1$ 的表达最低（图 1）。

[0131] 2.2. 被选肠道病毒对乳腺癌细胞的溶瘤作用

[0132] 对所有 9 个乳腺癌细胞系进行裂解性感染测定，以确定它们对被选的肠道病毒 CAV21、CAB3、EV1、EV7 和 PV1 的易感性（图 2）。如果在 50％终点 /ml($TCID_{50}$/ml) 组织培养的感染剂量计算为 10^4 或更高，则认为细胞系高度易感。在 9 个乳腺癌细胞系中的 6 个中 CAV21 和 CVB3 可诱发显著的裂解作用。除了 1 个细胞系 T47-D 以外，通常乳腺癌细胞对艾柯病毒 EV1 和 EV7 的裂解性感染不敏感，证明 T47-D 对 EV1 具有相当大的易感性。PV1 实质上可使 9 个乳腺癌细胞系中的 8 个产生溶瘤作用（图 2）。

[0133] 2.3. 肠道病毒受体在结直肠癌细胞上的表达

[0134] 通过流式细胞仪分析 4 个结直肠癌细胞系 (HCT116、LIM2537、SW480 和 SW620) ICAM-1、CAR、$\alpha_2\beta_1$ 和 DAF 的表达。在这两个细胞系上观察到了显著的 ICAM-1 和 DAF 表达水平。在所有这 4 个细胞系中有 CAR 的中等表达水平，而没有观察到 $\alpha_2\beta_1$ 的显著表达水平（图 3）。

[0135] 2.4. 被选肠道病毒对结直肠癌细胞的溶瘤作用

[0136] 在所有 4 个结直肠癌细胞系中滴定 CAV21、CVB3、EV1、EV7 和 PV1。在所有细胞系中观察到 CVB3 和 PV1 具有显著水平的溶瘤作用（图 4）。但 CAV21 诱发的显著细胞裂解仅发生在 4 个细胞系中的一个中 (LIM2573)。这个细胞系显示具有最高水平的 ICAM-1 表达。尽管 $\alpha_2\beta_1$ 的表达水平非常低，但 EV1 可裂解性地感染其中的 3 个细胞系，而所有细胞对 EV7 的感染是可耐受的。

[0137] 2.5. 肠道病毒受体在前列腺和胰腺癌细胞表面上的表达

[0138] 分析包括 DU145 和 PC3 的前列腺癌细胞系，以及包括 AsPC-1 和 PANC-1 的胰腺癌细胞系中 ICAM-1、DAF、CAR 和 $\alpha_2\beta_1$ 的表达。在两种前列腺细胞系和一个胰腺细胞系上 ICAM-1 有显著水平的表达。在所有 4 个细胞系上发现有中等的 CAR 和 DAF 表达，而 $\alpha_2\beta_1$ 的表达似乎是最小的（图 5）。

[0139] 2.6. 前列腺和胰腺癌细胞的溶瘤作用

[0140] 在微量滴定板裂解性感染中检测两个前列腺癌细胞系和两个胰腺癌细胞系对肠道病毒 CAV21、CVB3、EV1、EV7 和 PV1 的易感性。该前列腺癌细胞系对所有的病毒易感，除了 DU145 对 EV7 不敏感。PANC-1 仅可被 CAV21 和 PV1 感染，而其他的胰腺癌细胞系 AsPC-1 显示可被除 EV7 之外的所有病毒裂解（图 6）。

[0141] 2.7. 肠道病毒受体在卵巢癌细胞表面上的表达

[0142] 检测卵巢癌细胞系肠道病毒受体 ICAM-1、CAR、DAF 和 $\alpha_2\beta_1$ 的表达。在本研究中包括 9 个细胞系：A2780、DOV13、IGROV-1、JAM、OVCA-429、OVHS-1、OWA-42、SKOV-3 和 2008。这 9 个细胞系中的两个有显著水平的 ICAM-1 表达，而这 9 个中的 6 个上有中等水平的 CAR 表达。在除一个以外的所有卵巢癌细胞系上 DAF 为中等至较高水平的表达。这 9 个卵巢癌细胞系中的 8 个显示中等至较高水平的 $\alpha_2\beta_1$ 表达（图 7），还有另外一个卵巢癌细胞系 (OVCAR-3) 有显著水平的 $\alpha_2\beta_1$ 表达（数据未显示）。

[0143] 2.8 卵巢癌细胞系的溶瘤作用

[0144] 在这 9 个卵巢癌细胞系中的每一个细胞系中评价 CAV21，CVB3，EV1，EV7 和 PV1 的溶瘤能力（图 8）。在这 9 个细胞系中的两个上发现了 CAV21 的易感性，而 CVB3 在这 9 个细胞系中的 7 个中可引起明显的裂解作用。卵巢癌似乎特别对艾柯病毒 EV7 易感，其可引起这 9 个癌细胞系中的 4 个死亡，EV1 可引起 10 个细胞系中 7 个在感染过程中发生明显地裂解（图 9A，9B 和 10）。在所有 9 个卵巢癌细胞系中均显示对 PV1 的易感性。对用 EV1 感染的所有 10 个细胞系拍摄显微照相图片（图 9A 和 9B），也观察 EV1 对 10 个卵巢癌细胞系的微滴定板裂解性感染作用（图 10）。

[0145] 2.9.EV1 与卵巢癌细胞系的结合

[0146] 因为卵巢癌细胞系对 EV1 的溶瘤作用高度易感，因此进行进一步研究以评价 EV1 细胞粘附的特征。在加入放射性标记的 EV1 以确定这些受体参与 EV1 宿主细胞的结合之前，细胞与抗 -$\alpha_2\beta_1$(AK7) 或抗 -DAF(VIIIA7) 单克隆抗体预先孵育。在被测的所有 10 个细胞系中 EV1 的结合是很明显的。通过用抗受体抗体对 $\alpha_2\beta_1$ 整合蛋白的阻断，EV1 的细胞粘附被显著抑制。用单克隆抗体 VIIIA7 阻断细胞表面受体 DAF，没有引起 EV1 结合的显著抑制（图 11）。

[0147] 2.10. 抗体对 $\alpha_2\beta_1$ 整合蛋白的阻断可抑制 EV1 对卵巢癌细胞系的感染

[0148] 为了评价在 EV1 感染中 $\alpha_2\beta_1$ 的功能，进行裂解性测定实验，其中细胞单层与抗 $\alpha_2\beta_1$(AK7) 单克隆抗体预先孵育。分析 OWA-42 和 IGROV-1 卵巢癌细胞系。病毒感染后 72 小时，缺少 MAb 阻断的细胞单层对 EV1 的裂解性感染高度易感。即使是在 EV1 的最低稀释度时，在 MAb 阻断 $\alpha_2\beta_1$ 整合蛋白后，在细胞系中没有溶瘤作用的表现，（图 12）。在 OWA-42 细胞系感染后 24，48 和 72 小时拍摄显微照相图片（图 13）。

[0149] 2.11 非癌的人类细胞对 EV1 感染不易感

[0150] 进行一个试验以验证 EV1 对非癌的人类细胞的作用，其测定是通过用 EV1 感染人成纤维细胞。简言之，用组织培养环形插入物制备 6 孔组织培养板，DOV13 细胞位于环内，HeLa 细胞，人成纤维细胞（从 CSL，澳大利亚获得）在外环，37℃孵育直至形成汇合单层。去掉环，细胞用 EV1 感染，37℃过夜。活细胞用结晶紫甲醇溶液染色。在用 EV1 感染的过程中，DOV13 卵巢癌细胞被裂解，而 HeLa 细胞仍然是健康的（图 14），证明卵巢癌细胞对 EV1 的特异易感性。

[0151] 2.12$\alpha_2\beta_1$在黑色素细胞系SkMel28上的表达

[0152] 黑色素瘤，一种皮肤癌，已知其$\alpha_2\beta_1$的表达是上调的。使用流式细胞仪检查黑色素瘤细胞系SkMel28的表达。观察到很高水平的$\alpha_2\beta_1$表达。但，用对照MAb显示很低的本底结合水平（图15）。

[0153] 2.13EV1与SkMel28的结合

[0154] 为了进一步研究EV1与SkMel28细胞表面表达的$\alpha_2\beta_1$相附着的性质，采取放射性标记病毒结合实验。放射性标记的EV1可显著的与恶性黑色素瘤细胞系结合，MAb阻断$\alpha_2\beta_1$可极大地减少EV1结合的量（图16）。

[0155] 2.14EV1对SkMel28的灭活实验

[0156] 裂解性感染试验用来确定SkMel28对EV1感染的易感性。恶性黑色素瘤细胞系在用EV1感染的过程中显示中等程度的溶瘤作用。结晶紫染色被没有经历裂解性感染的细胞吸收，而没有染色的细胞表示细胞单层已完全被裂解（图17）。

[0157] 2.15讨论

[0158] 发现卵巢癌细胞系对EV1的裂解性感染高度易感，被检测的10个细胞系中有7个显示有明显的溶瘤作用。进一步对EV1和卵巢癌细胞系结合的研究证实$\alpha_2\beta_1$是EV1所使用的基本受体。放射性标记结合研究进一步表明$\alpha_2\beta_1$是病毒结合所需要的，MAb的阻断实验显示通过使用$\alpha_2\beta_1$单克隆抗体(Mab)预处理易感的卵巢癌细胞，EV1的感染被完全抑制。DAF MAb VIIIA7作为一种阴性对照处理也用于结合实验中，以确定DAF是否在EV1结合中具有重要作用，因为它在肠道病毒CAV21和CVB3中是有作用的。使用抗DAF MAb预处理没有出现对EV1结合的明显阻断。

[0159] 卵巢癌细胞与人成纤维细胞共培养，然后EV1进行感染，显示即使处在病毒可特异性裂解卵巢癌细胞的环境中，人成纤维细胞对EV1的感染不易感。

[0160] 也研究了EV1介导的溶瘤作用对黑色素瘤细胞系的作用。数据显示在SkMel28黑色素瘤细胞系表面上$\alpha_2\beta_1$是上调的，这些细胞对EV1的裂解性感染是易感的。放射性标记结合实验显示EV1与卵巢癌细胞的结合显示是经与$\alpha_2\beta_1$的相互作用。剩余可被EV1感染的癌细胞系是结肠癌细胞系，这4个细胞系中的三个以及前列腺癌细胞系是高度易感的。这两个类型的癌症可遇到与卵巢癌细胞相同的细胞外基质，因此在腹膜表面发现的富含1型胶原的细胞外基质转移的过程中上调了其$\alpha_2\beta_1$表达。

[0161] 应当理解的是本领域普通技术人员对于以具体实施例所显示的本发明可进行大量的修动和/或变动，这从广义上来说是不背离本发明的精神和范围的。因此这些实施例从所有方面应均可被认为是说明性的，而不是限制性的。

[0162] 实施例3：艾柯病毒(EV2)裂解性感染的特异性

[0163] 3.1EV1的相对致病性

[0164] 研究了与肿瘤细胞相比EV1对体外培养的非恶性卵巢细胞的相对致病性。使用人乳头状瘤病毒16E6-E7开放可读框永生化的正常人卵巢表面上皮(HOSE)细胞(Teao，S.W等人，1995)，以及一种透明细胞卵巢癌细胞系(OVHS-1)和未分化卵巢癌细胞(DOV13)给予多重度的EV1进行激发，moi的范围从5.0至0.05$TCID_{50}$/细胞。在感染后48小时，显微镜检查显示全部细胞被破坏，以及两个卵巢癌细胞系单层的细胞裂解，即使病毒激发的量很低，达到0.05$TCID_{50}$EV1/细胞。相反，即使在最高的病毒激发剂量下仍未观察到HOSE细胞

的细胞形态学发生可检查到的变化。

[0165] 为进一步确定 EV1 感染的特异性，正常的外周血淋巴细胞 (PBL) 以及 OVHS-1 和 DOV13 细胞用 EV1(moi ＝ 1.0) 激发。流式细胞仪分析显示 PBL 细胞制品上表面 $\alpha_2\beta_1$ 的表达很少以至没有，而两个卵巢癌细胞系表达很高水平的 $\alpha_2\beta_1$。EV1- 介导的 PBL 和卵巢癌细胞悬液的细胞裂解作用可使用标准的测量 LDH 释放的细胞毒性测定来评价。EV1 的激发可引起 EV1 感染的培养卵巢细胞的几乎完全裂解，而在 PBL 与相同施加剂量的 EV1 接触后仅观察到本底水平的细胞裂解作用。

[0166] 为了确定在缺少可检测到的细胞裂解的情况下，在 PBL 中 EV1 是否启动了可繁殖性的感染，以证实本底水平的细胞裂解是非特异性的，不是由 EV1 感染介导的，PBL 和两个卵巢癌细胞系的悬液用 EV1 接种 (moi ＝ 1.0)，并监测子代病毒的产生。在两个卵巢癌细胞系 (OVHS-1 和 DOV-13) 中，在开始的细胞结合接种过程中，EV1 的滴定度增加了大约 10^4 倍。相反，PBL 在 48 小时的孵育过程中没有产生子代病毒，观察到的感染性主要是给予的接种残余物的非特异性结合。

[0167] 实施例 4 :艾柯病毒 (EV1) 裂解卵巢癌细胞

[0168] 4.1EV1 体外裂解培养的卵巢癌细胞球状体

[0169] 许多体外卵巢癌细胞培养物可作为多维球状体进行繁殖 (Casey，R.C 等人，2001)。多细胞球状体类似通常在晚期卵巢癌患者腹水中发现的多细胞集合体。已经明确培养的卵巢单层细胞对 EV1 的裂解性感染高度易感，卵巢癌细胞的多细胞球状体可用 EV1 进行激发。流式细胞仪分析确定无论 OVHS-1 细胞以单层生长或形成球状体，EV1 细胞受体 $\alpha_2\beta_1$ 的表面表达水平是可比较的。EV1(10^5TCID_{50}) 加在围绕球状体周围的半固体琼脂糖培养基上，获得在病毒激发后不同的间隔时间球状体形态学的显微照相影像。图 18 显示了对照未感染的球状体具有增殖活性的，经过 9 天的孵育周期其量是稳定增加的。相反，EV1 感染的球状体显示在接种后的头 7 天其量稍微降低，在接下来的 48 小时发生明显的结构崩解和细胞破坏。数据显示 EV1 可在癌性球状体中使增殖的细胞成为被裂解性感染的细胞，不管初始接种球状体的量是多少（即 5×10^2 或 5×10^3 细胞）可有效地阻止球状体的生长。

[0170] 4.2 艾柯病毒 1 对人卵巢癌腹水模型的作用

[0171] 在转移性卵巢癌的晚期，肿瘤细胞迁移遍布腹腔和 / 或定植在远隔的组织部位。为了确定 EV1 介导的溶瘤作用是否是晚期腹膜卵巢癌的一种有效治疗手段，使用携带人卵巢癌异种移植物的 SCID 小鼠腹水模型。在给予活 EV1 之前 14 天，通过腹膜内途径给 SCID 小鼠注射 2×10^6OVHS-1 细胞。试验性治疗方案包括通过腹膜内途径注射单剂量的 PBS，UV- 灭活的 EV1 或活的 EV1(10^5TCID_{50})。接受多种治疗处理的小鼠体重相对未携带卵巢癌异种移植物小鼠的变化被用作腹水负担发生的标志物。

[0172] 在治疗后 3 周，给予 PBS 或 UV 灭活 EV1 的小鼠表现出体重明显增加，但在正常和 EV1 治疗小鼠之间没有观察到差异。PBS 或 UV 灭活 EV1 组的体重持续增加，注射后 4 周时由于腹水液体积聚除了剩余的治疗组以外，所有的小鼠腹胀都很明显（图 19A)。在注射后 5 周，因为腹水过多所有 PBS 和 UV 灭活 EV1 处理的小鼠死亡，而在 EV1 治疗的小鼠和没有接受卵巢癌异种移植物的动物之间没有观察到可检测到的体重增加或腹水形成（图 19B)。经过本研究的过程，即使是血清病毒荷载量超过病毒接种剂量 10-100 倍（注射后 7-14 天；数据未显示）的情况下，在用活 EV1 注射的小鼠中没有观察到疾病显著进展的指征。

[0173] 4.3 讨论

[0174] 使用有复制能力的病毒成功进行病毒溶瘤策略的主要要求之一是病毒对宿主的致病性很低，但对肿瘤细胞有很高的选择性。

[0175] 在本研究中，评价了代表性的人艾柯病毒诱发体外培养的人卵巢癌细胞裂解性感染的能力。尽管对黑色素瘤细胞具有很高的溶瘤作用，CVA21 和 EV7 的原型株在许多人卵巢癌细胞单层中诱发增殖细胞裂解性感染的能力不如 EV1。单克隆抗体阻断研究证实了 EV1 介导的卵巢癌细胞裂解性感染是通过具体病毒衣壳与细胞表面表达的整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 的结合所启动的。因为整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 不能同时结合 EV1 和胶原，EV1 对卵巢癌细胞的裂解性感染不仅能介导肿瘤细胞迅速地裂解，还可以干预 1 型胶原和 $\alpha_2\beta_1$ 整合蛋白之间的相互作用，因此有可能减少癌细胞通过腹膜表面的播散。

[0176] EV1 激发对多细胞三维球状体的破坏反映了 EV1 介导的溶瘤作用在体内缩小实体肿瘤体积的能力。EV1 这种对卵巢球状体有效的裂解令人信服地使人认为卵巢球状体中的单个细胞较形成单层中的细胞更稳固，对放射线和化学物质诱导的凋亡有较强的抵抗力 (Frankel，A 等人，1997)。

[0177] 治疗性溶瘤病毒对于恶性细胞的靶向应该有一种特殊的机制。选择性 EV1 介导的感染作用的突出特点是 EV1 不能诱导正常卵巢上皮细胞系和外周血淋巴细胞 (PBL) 的大量裂解。在卵巢癌细胞中而不是 PBL 悬液中产生高滴度的子代病毒再次说明了 EV1 感染非肿瘤细胞的特异性和低致病性。

[0178] 除了卵巢癌，恶性黑色素瘤细胞表面整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 的表达水平也是上调的，因此使它们对 EV1 的激发也是易感的。有些相反的论点认为，EV1 对卵巢癌细胞的感染可诱导 ICAM-1(Pietiainen，V. 等人，2000)，CVA21 的细胞靶向受体在黑色素瘤细胞表面上的表达增加。因此，通过含有活 EV1 和 CVA21 的治疗制剂激发卵巢癌和 / 或恶性黑色素瘤可引起更有效的溶瘤性感染。

[0179] 腹膜内给予 EV1 可非常有效的控制 SCID 小鼠腹腔内卵巢肿瘤异种移植物的进展。所有注射活 EV1 的小鼠没有显示体重增加 (相对没有注射卵巢癌异种移植物的小鼠) 以及可检查到的腹水发生。通过体内裂解性感染卵巢肿瘤细胞产生的子代 EV1 在注射后 7 天小鼠的血中可被检测到 (数据未显示)。血中 (vireamic) 的 EV1 可被认为是控制播散性疾病的储备库，检测到其显著的水平 (大约 10^6TCID_{50}) 也表明可显著降低病毒的给药剂量 -10^5TCID_{50}，仍可维持其溶瘤作用。在没有携带卵巢癌异种移植物的小鼠中 (数据未显示) 注射后 7 天不能检测到血中的 EV1 表明在缺少易感性肿瘤细胞的情况下，EV1 迅速和有效地从全身循环中被清除。

[0180] 总体来说，这些结果高度提示，EV1 的溶瘤性治疗可在体外和体内非常有效地控制腹膜卵巢癌。应用相对非侵入性的 EV1 治疗被认为是现有治疗方案中的另一种非常吸引人的方法，现有方案涉及手术减积术后进行联合化疗。EV1 治疗也可被用作肿瘤减积手术后的辅助治疗，目标是靶向和破坏在手术操作过程中释放的肿瘤细胞。EV1 溶瘤治疗也可被用作治疗整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 高表达水平的其他人类恶性肿瘤中的一种新的治疗方法。而且，因为 EV1 和 EV8 可竞争整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 上的相同结合表位，因此 EV8 可替代 EV1，诱导卵巢癌细胞迅速的裂解性感染。利用两个不同的病毒血清型可相继地通过整合蛋白 $\alpha_2\beta_1$ 的靶向作用激发卵巢癌，不依赖首次给予病毒产生的保护性免疫反应。对于 EV1 利用一种有效

的抗肠道病毒药物 (pleconaril)(Pevear,D.C. 等人,1999) 可进一步增强这种治疗的目的性,因为它能够直接控制非特异性病毒的复制和播散的子代病毒。在 pleconaril 和 EV1 之间潜在的协同性也可允许在全身注射给药多重度非常高的病毒后,在病毒已经靶向并开始对恶性细胞进行裂解性感染后马上再应用 pleconaril(为了灭活游离的病毒)。

[0181] 应当理解的是本领域普通技术人员对于以具体实施例所显示的本发明可进行大量的修动和 / 或变动,这从广义上来说是不背离本发明的精神和范围的。因此这些实施例从所有方面应均可被认为是说明性的,而不是限制性的。

[0182] 参考文献

[0183] 1.Andreansky SS,He B,Gillespie GY,Soroceanu L,Markert J,Chou J,Roizman B和Whitley RJ(1996)。应用遗传改造的单纯疱疹病毒治疗试验性脑肿瘤。Proc Natl Acad Sci USA 93 :11313-8.

[0184] 2.Ansardi,D.C.,Porter,D.C,Jackson,G,Gillespie,Y. 和 Morrow,CD. 来自脊髓灰质炎病毒的RNA复制子对于不同来源的人肿瘤细胞是具有直接溶瘤作用。Cancer Res,2001,61 :8470-8479。

[0185] 3.Bartolazzi,A.,J.Kaczmarek,G,Nicolo,A.M.Risso,G.Tarone,P,Rossino,P.Defilippi,和 P.Caetellani。在一些常见卵巢上皮肿瘤和正常相应组织中 $\alpha_3\beta_1$ 整合蛋白的定位。Anticaneer Res,1993.13(1) :p.1-11.

[0186] 4.Bergelson,J.M.,B.M.Chan,R.W.Finberg,和M.E.Hemler。整合蛋白VLA-2通过不同的机制与艾柯病毒 1 和细胞外基质配体结合。J Clin Invest,1993.92(1) :p.232-9.

[0187] 5.Cannistra,S.A.,C.Ottensmeier,J.Niloff,B.Orta, 和 J.DiCarlo。B1 和 αvβ3 整合蛋白在卵巢癌中的表达和功能。Gynecol Oncol,1995.58(2) :p.216-25.

[0188] 6.Cardarelli,P.M.,S,Yamagata,I.Taguchi,F.Gorcsan,S.L.Chiang,和 T.Lobl。来自MG-63和HT1080细胞的胶原受体 α2β1 可与环RGD肽相互作用。J Biol Chem,1992,267(32) :p.23159-64.

[0189] 7.Casey,R.C. 等人,(2001)。β1- 整合蛋白可调节卵巢癌多细胞球状体的形成和粘附。Am J Pathol.159 :2071-80.

[0190] 8.Chan,B.M.,N.Matsuura,Y.Takada,B,R.Zetter,和M.E.Hemler。体内和体外VLA-2在横纹肌肉瘤细胞上表达的结果。Science,1991.251(2001) :p.1600-2.

[0191] 9.Fenner,F. 等人。动物病毒生物学。Academic Press.New York,1974 第二版。

[0192] 10.Fields,B.N,和 D.M.Knipe。病毒学领域。第四版,Vol.1.2000,New York : Raven Press.

[0193] 11.Flint,SJ. 等人,2000,病毒学原理 :分子生物学,发病机理和调控。ASM Press,Washington.

[0194] 12.Frankel,A. 等人,(1997),在以多细胞肿瘤球状体生长的人卵巢癌细胞中消除紫杉醇诱导的G2-M停滞和凋亡。Cancer Res.57 :2388-93.

[0195] 13.Harris,R.E. 和 Pindak,F.F.(1975)。在培养的人卵巢细胞中的病毒复制。Gynecol.46(2) :227-230.

[0196] 14.He,T.C.,产生重组腺病毒的一个简化系统。Proc.Natl.Acad,Sci.USA,1998,95 :2509-2514

[0197] 15.Kamata,T,和Y.Takada,胶原与整合蛋白α2β1(VLA-2,CD49b/CD29)的I结构功能区以二价阳离子非依赖性的方式直接结合。J Biol Chem,1994.269(42):p.26006-10.

[0198] 16.Kramer,R.H. 和N.Marks。在人黑色素瘤细胞上鉴定整合蛋白胶原受体。J Biol Chem,1989.264(8):p.4684-8.

[0199] 17.McCrackerv,A.W. 和K.M.Wilkie,在亚丁与1型艾柯病毒感染相关的流行性胸痛。Trans R Soc Trop Med Hyg,1969.63(1):p.85-8.

[0200] 18.Moser,T.L.,S.V,Pizzo,L.M.Bafetti,D.A.Fishman,和M.S.Stack,卵巢上皮癌细胞通过$\alpha_2\beta_1$整合蛋白优先与I型胶原粘附。Int J Cancer,1996.67(5):p.695-701.

[0201] 19.Natalie PG,Hamby CV,Felding-Habermann B,Liang B,NicotraMR,Di Filippo F,Giannarelli D,Temponi M,Ferrone S(1997),α(v)β_3整合蛋白和细胞间粘附分子-1在皮肤恶性黑色素瘤病变中表达的临床意义。Cancer Res.Apri 15;57(8):1554-60.

[0202] 20.Nemunaitis J(1999).溶瘤性病毒。Investigational New Drugs17:375-386

[0203] 21.Pietianen,V.等人,(2000).艾柯病毒1感染对细胞基因表达的作用。Virology.276:253-50

[0204] 22.Pevear,D.C.等人(1999)。pleconaril对肠道病毒的活性。Antimicrob. Agents Chemother.43:2109-15.

[0205] 23.Ramos,D.M.,E.D.Berston,和R.H.Kramer。分析转移性B16黑色素瘤细胞上的层粘连蛋白和IV型胶原的整合蛋白受体。CancerRes,1990,50(3):p.728-34。

[0206] 24.Randazzo BP,Kesari S,Gesser RM,Alsop D,Ford JC,BrownSM,Maclean A和Fraser NW(1995).用神经减毒单纯疱疹病毒1型突变体治疗小鼠试验性颅内黑色素瘤。Virology 211:94-101.

[0207] 25.Reed,L.J.和H.A.Muench。估计50%终点的简单方法。AmJHyg,1938.27:P.493-497.

[0208] 26.Roesmann,M.G.,J.Bella,P.R.Kolatkar,Y.He,E.Wimmer,R.J.Kuhn, 和T.S.Baker,通过鼻病毒和肠道病毒的细胞识别和进入。Virology,2000.269(2):p.239-47.

[0209] 27.Satyamoorthy K,Soballe PW,Scans F和Herlyn M(1997)。腺病毒感染可增强mitotoxin对黑色素瘤细胞的杀伤作用。Cancer Research57:1873-1876.

[0210] 28.Shafren DR,Dorahy DJ,Ingham RA,Burns GF和Barry RD(1997)。与促衰变因子结合的柯萨奇病毒A21进入细胞需要细胞间粘附分子-1。J Virol,Jun;71(6):4736-43.

[0211] 29.Strong JE,Coffey MC,Tang D,Sabinin P和Lee PWK(1998)。病毒溶瘤作用的分子基础:Ras信号通路被呼肠弧病毒侵占。17(12):3351-3362

[0212] 30.Tsao,S,W.等人。(1995).通过人乳头状瘤病毒癌基因(HPV-E6E7 ORFS)永生化的人卵巢表面细胞的特征。Exp Cell Res.218:499-507.

[0213] 31.Xiao,C,C.M.Bator,V.D.Bowman,E.Rieder,Y.He,B.HebertJ.Bella,T.S.Baker,E.Wimmer,RJ.Kuhn和M.G.Rossmann,柯萨奇病毒A21与其细胞受体,ICAM-1的相互作用。J Virol,2001.75(5):p.2444-51.

[0214] 32.Xing,L.,用宿主细胞分子探测无包被病毒的感染:结构性研究。生物科学系。2002,Karolinska Institutet,瑞典:斯德哥尔摩。

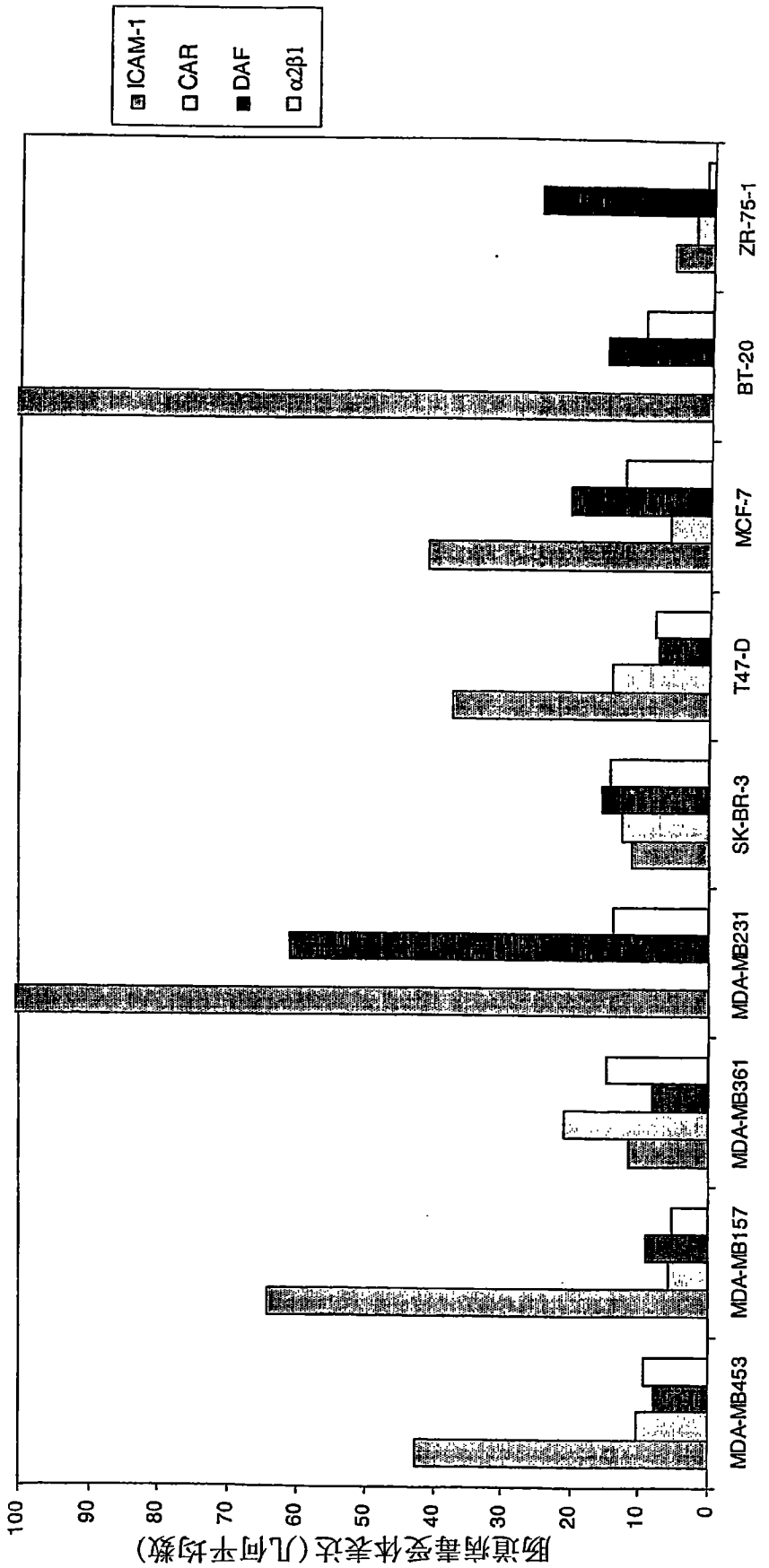

ICAM-1
CAR
DAF
α2β1
肠道病毒受体表达(几何平均数)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
MDA-MB453
MDA-MB157
MDA-MB361
MDA-MB231
SK-BR-3
T47-D
MCF-7
BT-20
ZR-75-1

图1

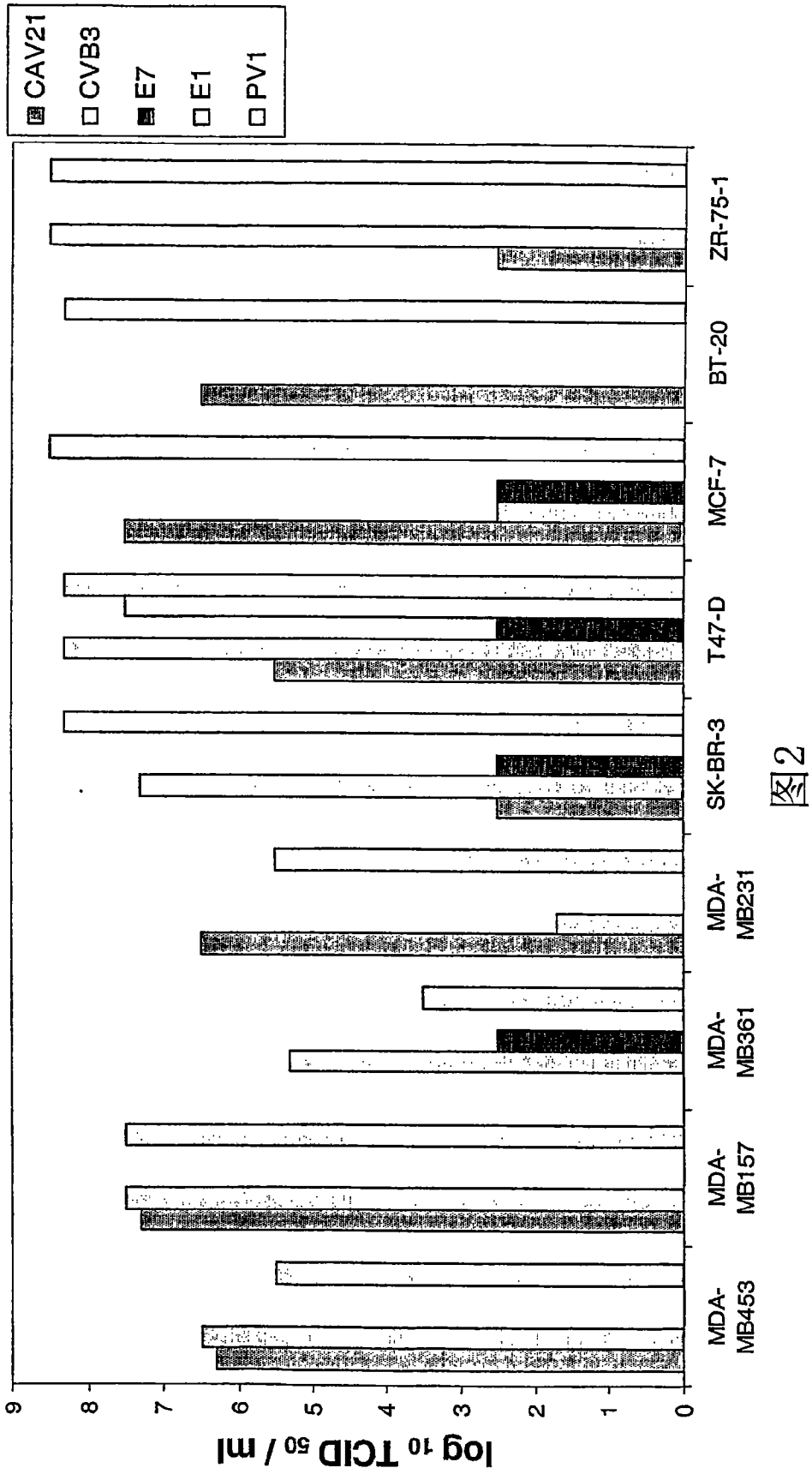

CAV21
CVB3
E7
E1
PV1
log 10 TCID 50 / ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
MDA-MB453
MDA-MB157
MDA-MB361
MDA-MB231
SK-BR-3
T47-D
MCF-7
BT-20
ZR-75-1

图2

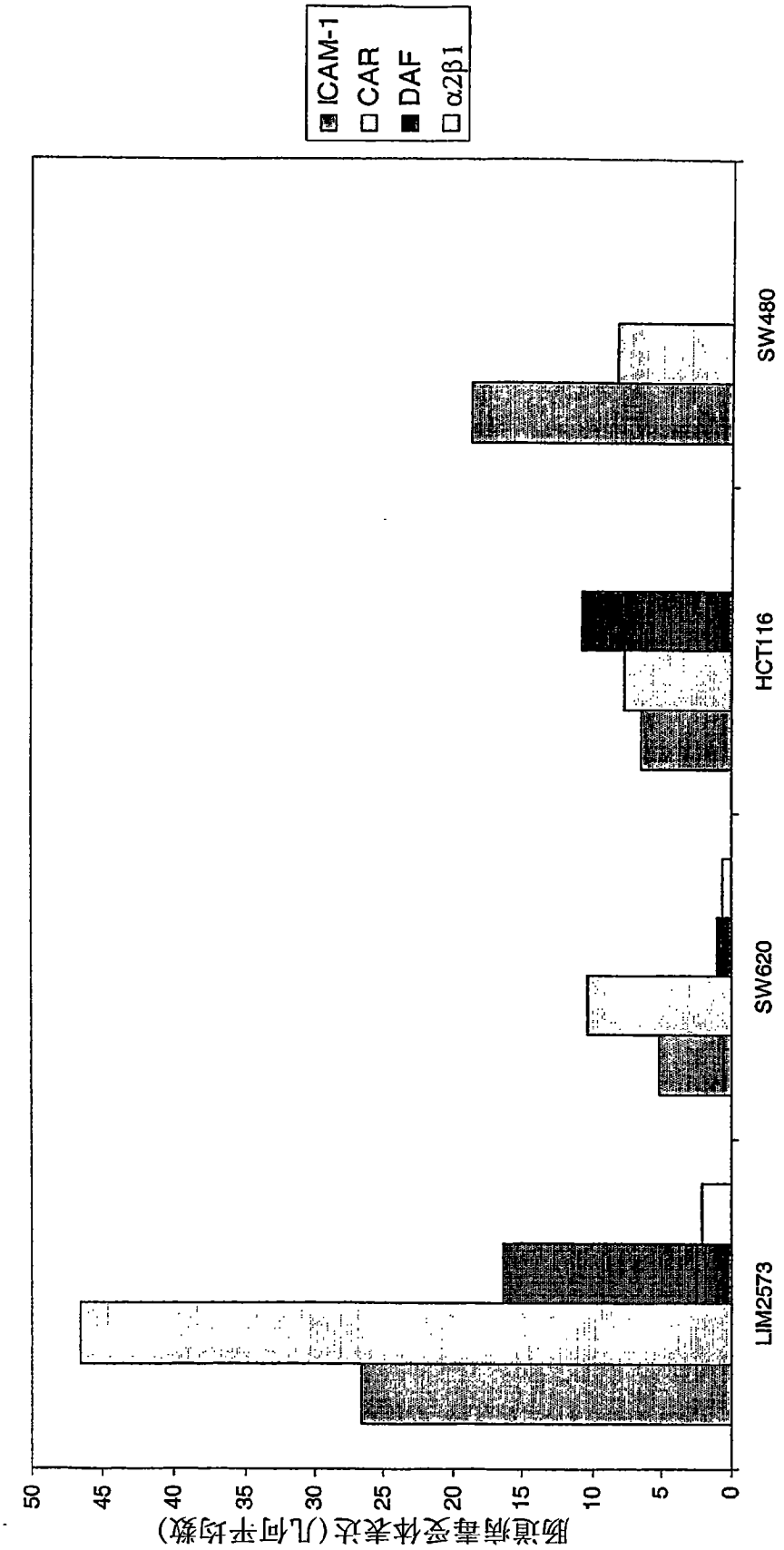

ICAM-1
CAR
DAF
α2β1
肠道病毒受体表达(几何平均数)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
LIM2573
SW620
HCT116
SW480

图3

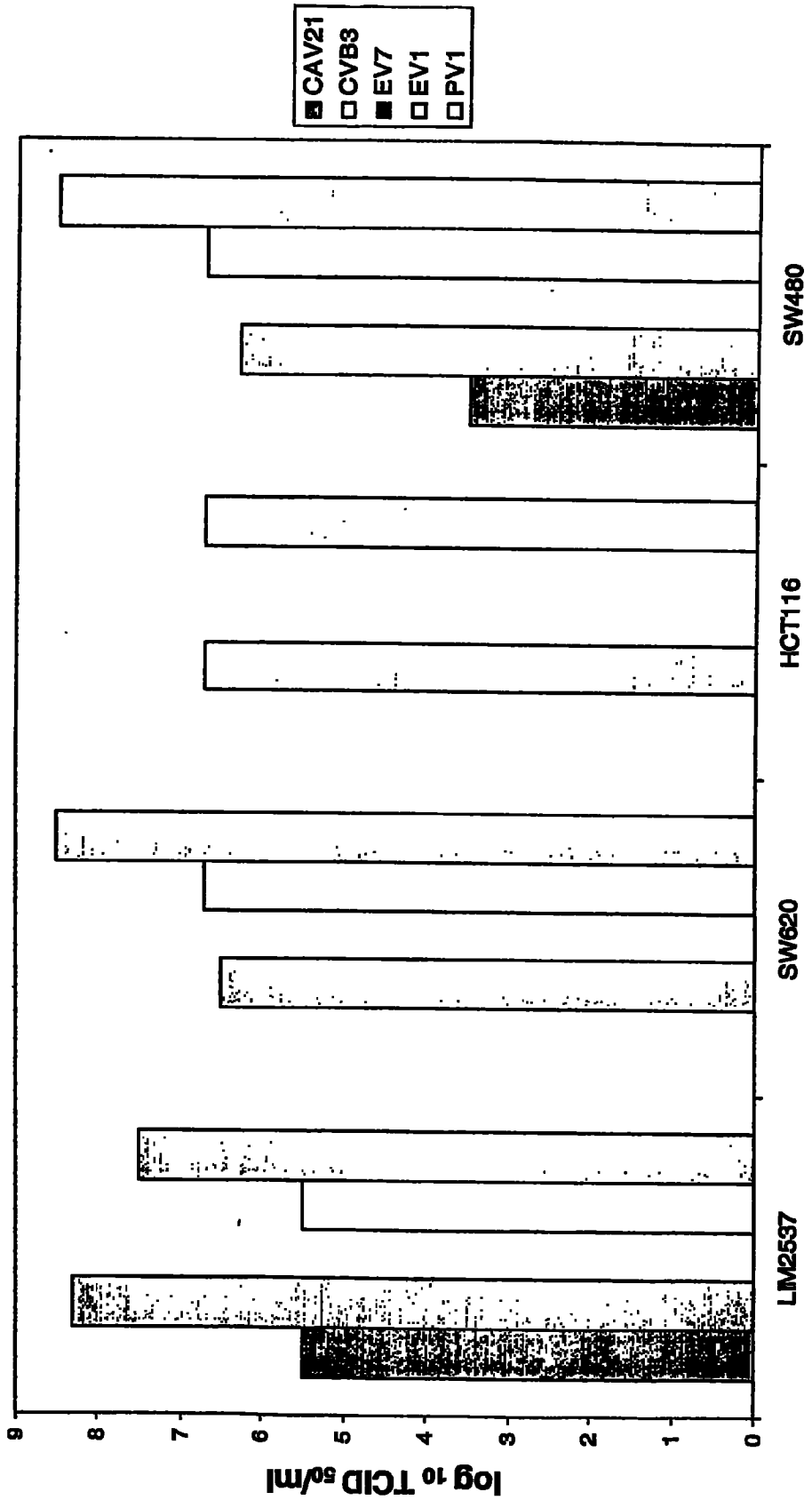

CAV21
CVB3
EV7
EV1
PV1
SW480
HCT116
SW620
LM2537
log 10 TCID 50/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9

图4

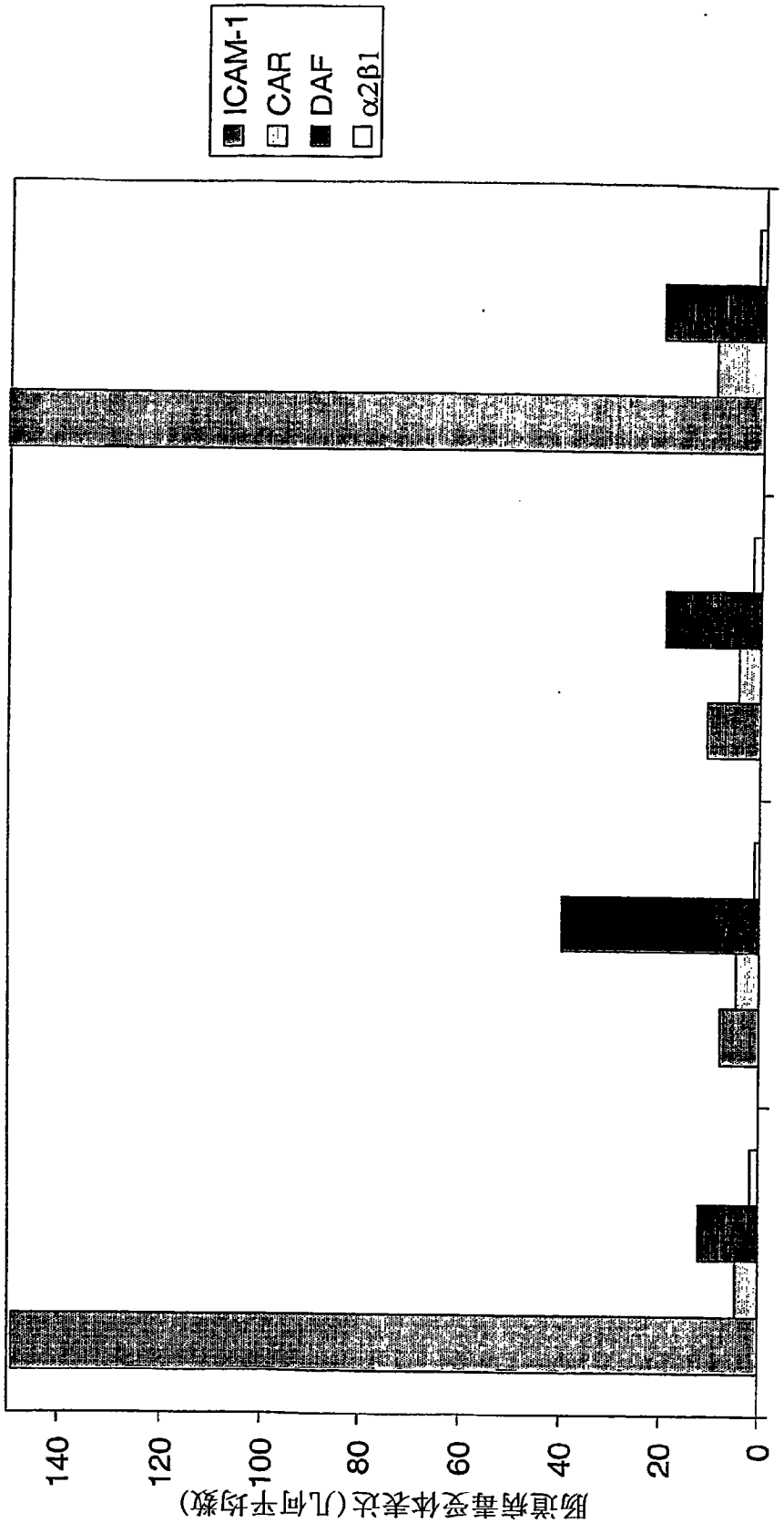

ICAM-1
CAR
DAF
α2β1
肠道病毒受体表达(几何平均数)
0
20
40
60
80
100
120
140
PANC-1
AsPC-1
PC3
DU145

图5

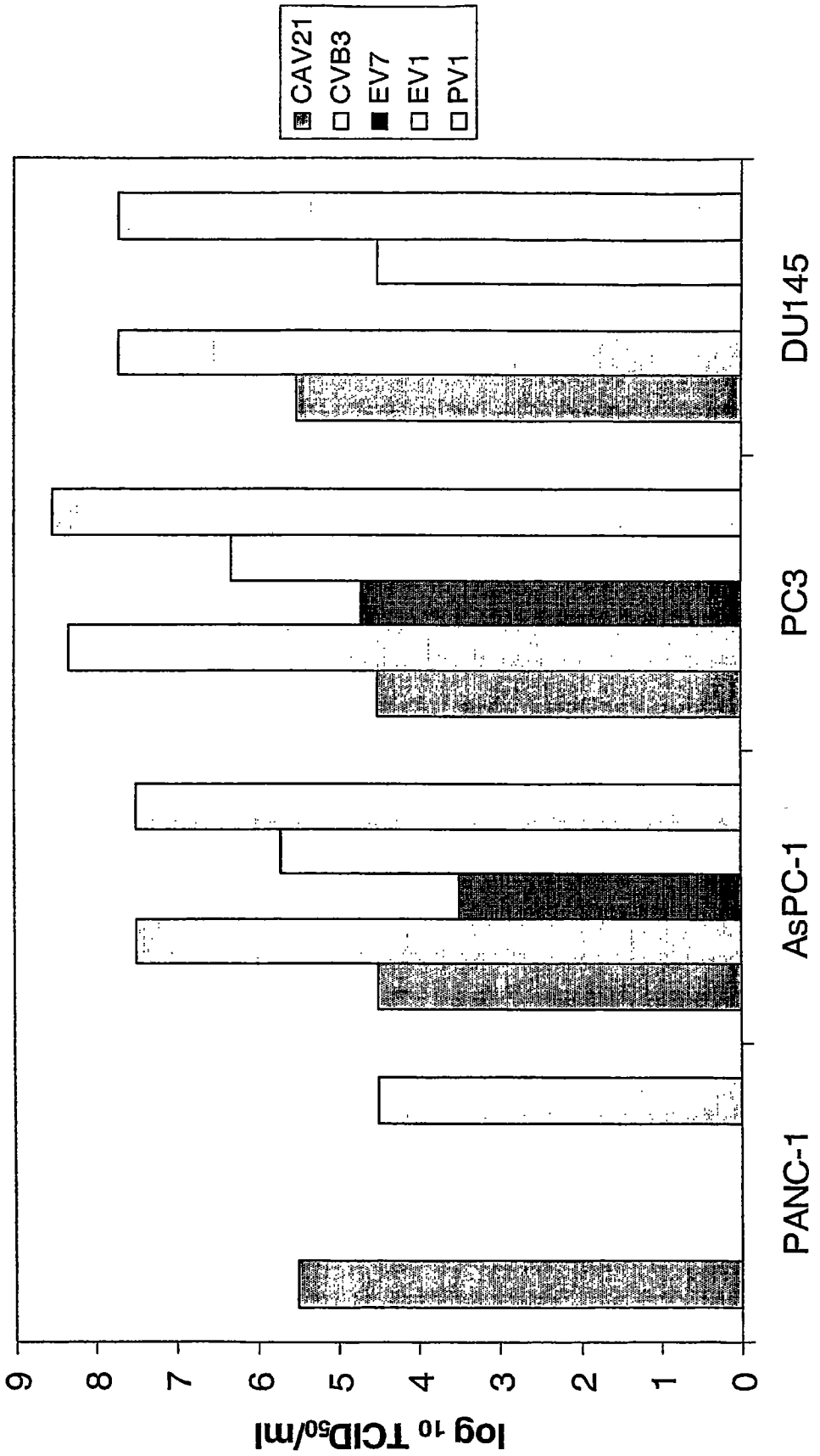

CAV21
CVB3
EV7
EV1
PV1
log 10 TCID50/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
PANC-1
AsPC-1
PC3
DU145

图6

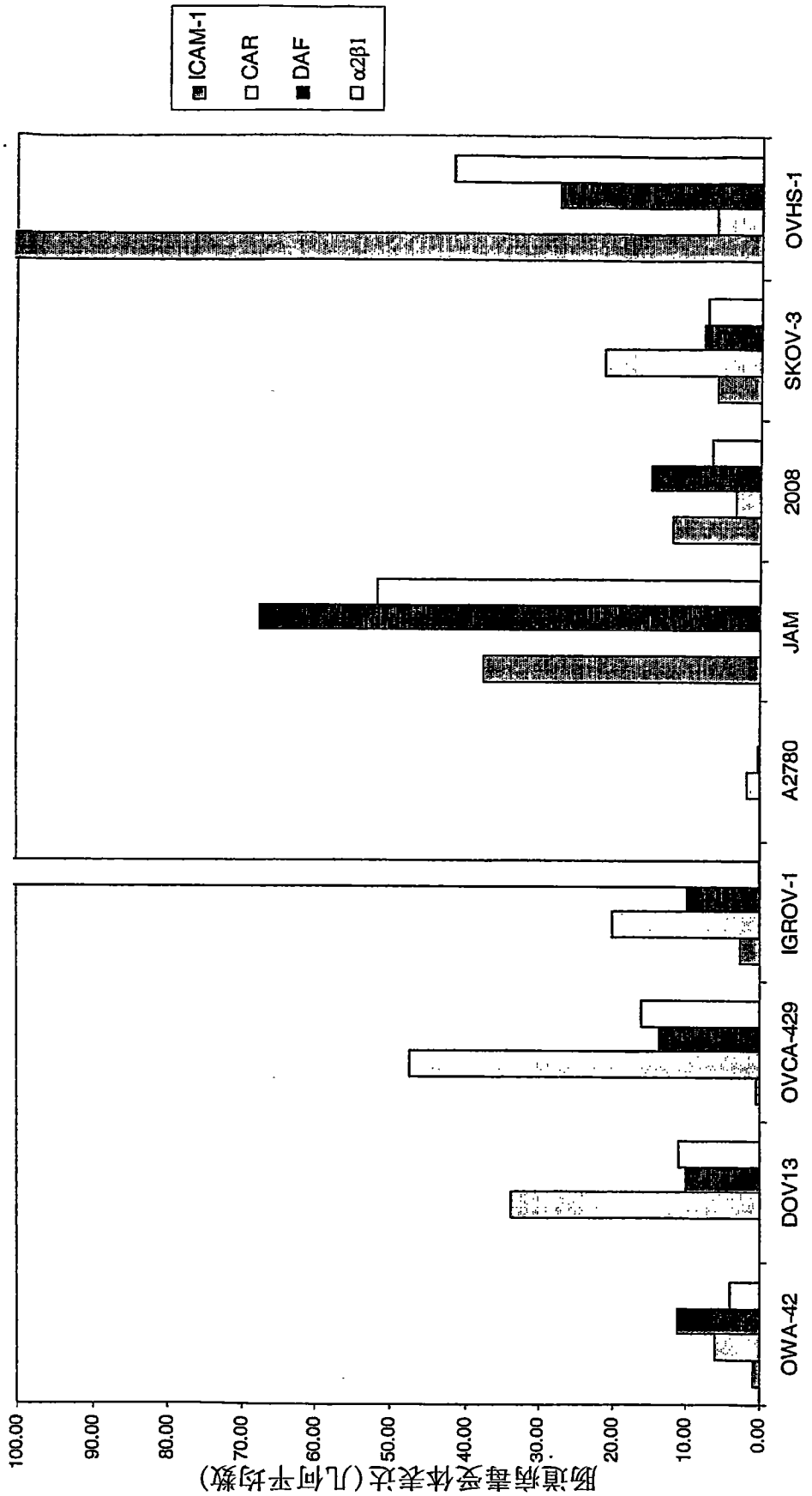

ICAM-1
CAR
DAF
α2β1
肠道病毒受体表达(几何平均数)
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
OWA-42
DOV13
OVCA-429
IGROV-1
A2780
JAM
2008
SKOV-3
OVHS-1

图7

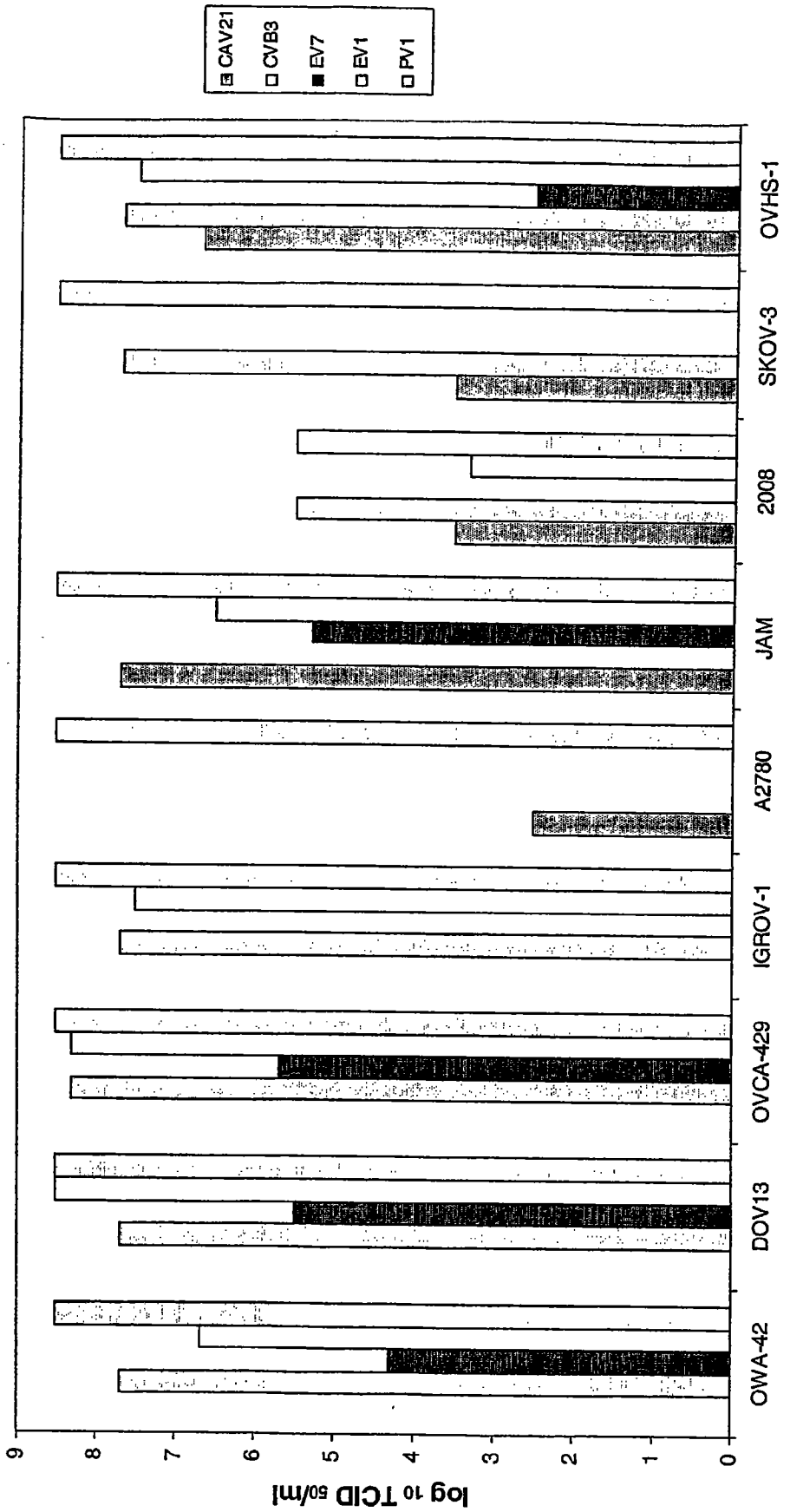

CAV21
CVB3
EV7
EV1
PV1
log 10 TCID 50/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
OWA-42
DOV13
OVCA-429
IGROV-1
A2780
JAM
2008
SKOV-3
OVHS-1

图8

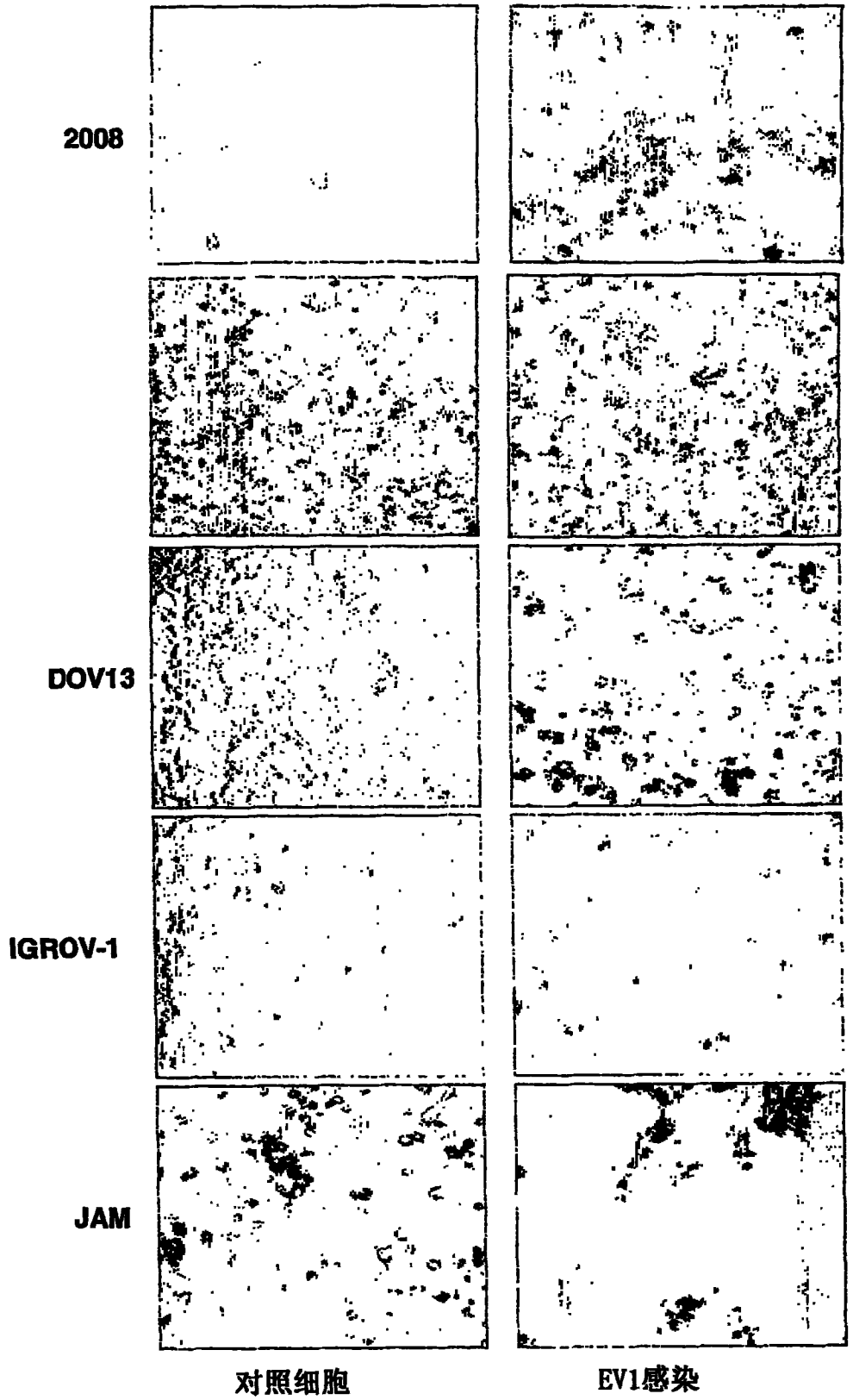


图 9a

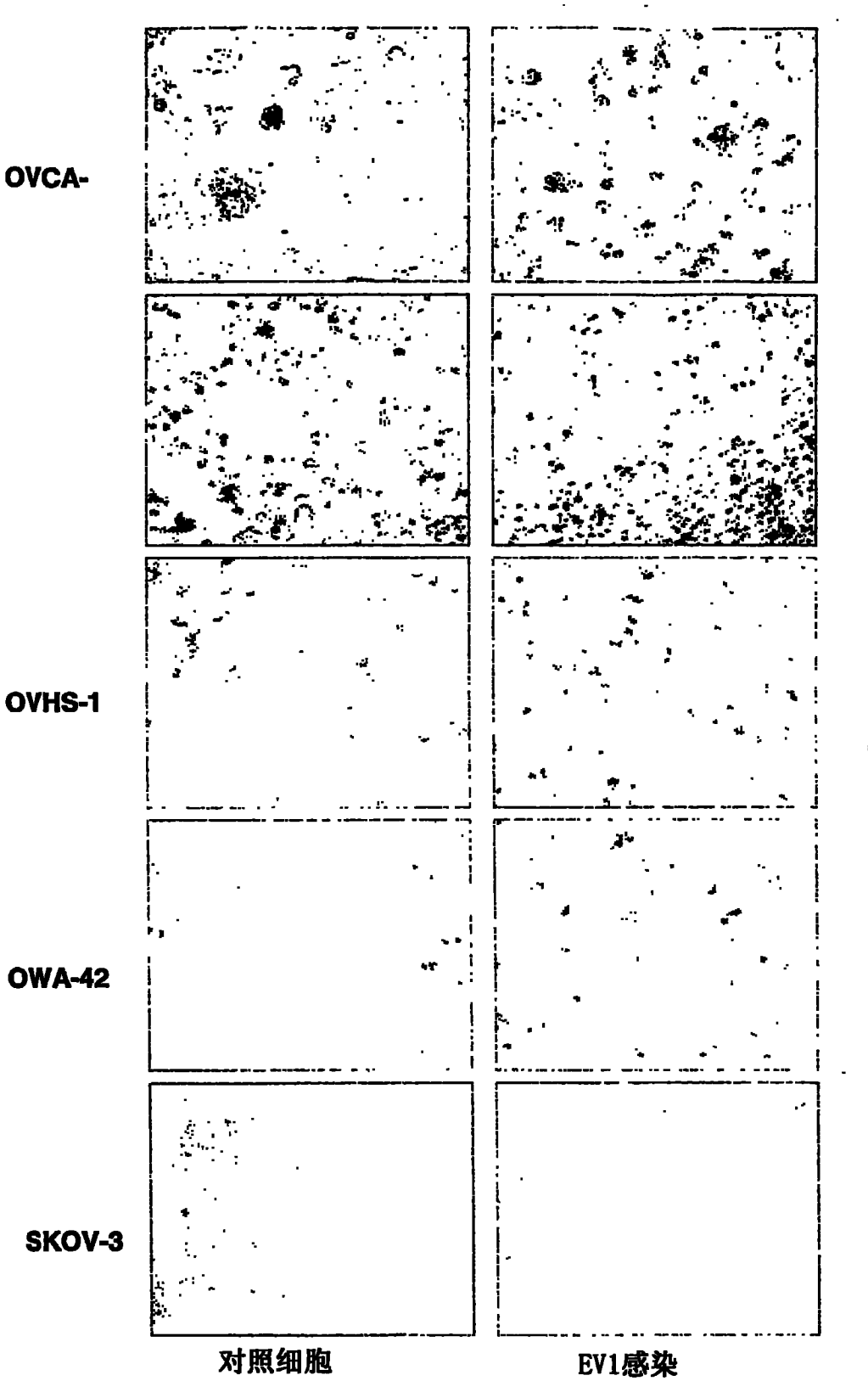


图 9b

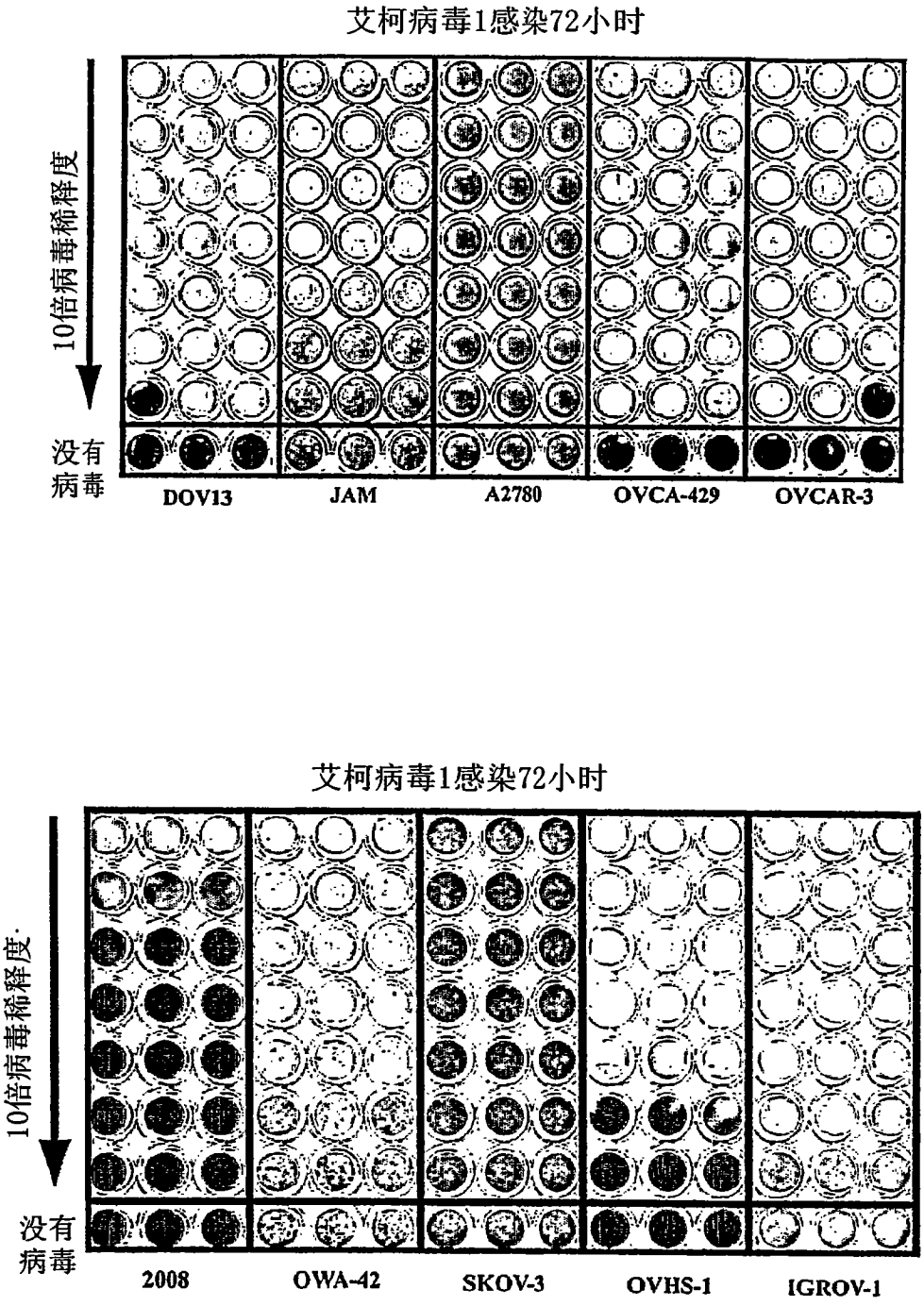

艾柯病毒1感染72小时
10倍病毒稀释度
没有病毒
DOV13
JAM
A2780
OVCA-429
OVCAR-3
艾柯病毒1感染72小时
10倍病毒稀释度
没有病毒
2008
OWA-42
SKOV-3
OVHS-1
IGROV-1

图 10

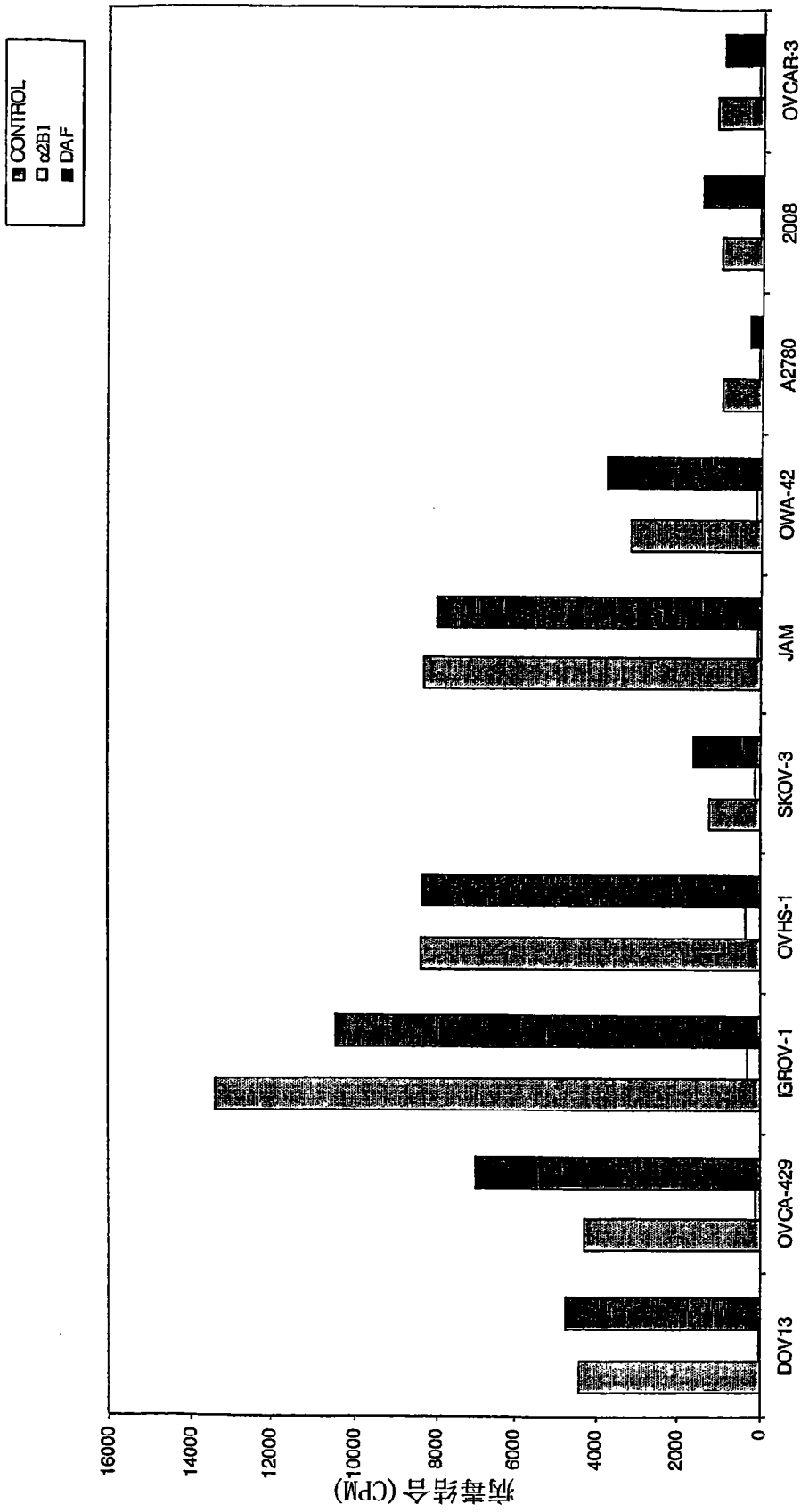

CONTROL
α2B1
DAF
病毒结合(CPM)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
DOV13
OVCA-429
IGROV-1
OVHS-1
SKOV-3
JAM
OWA-42
A2780
2008
OVCAR-3

图11

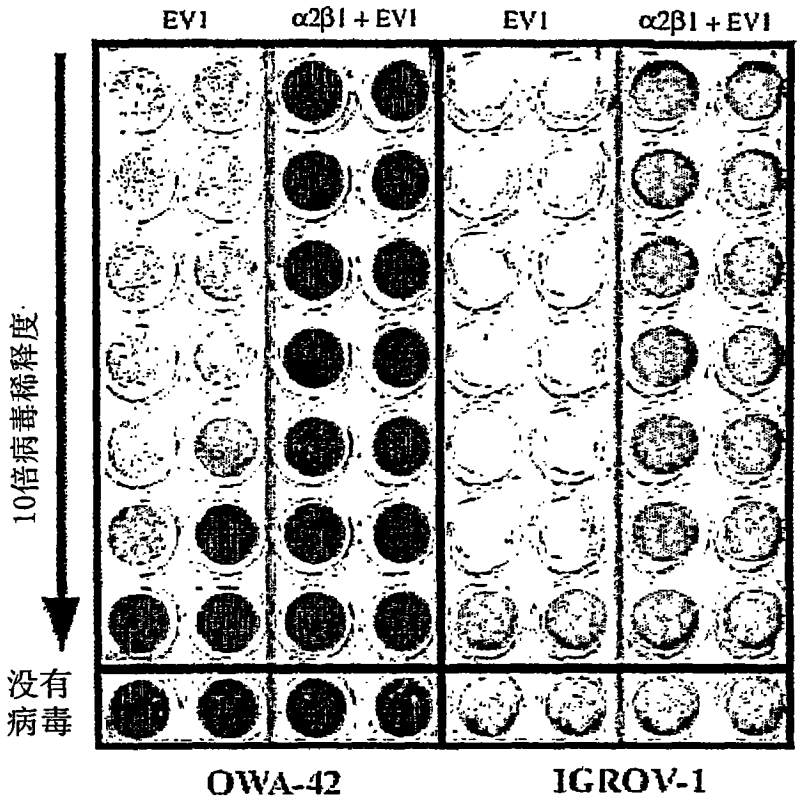


图 12

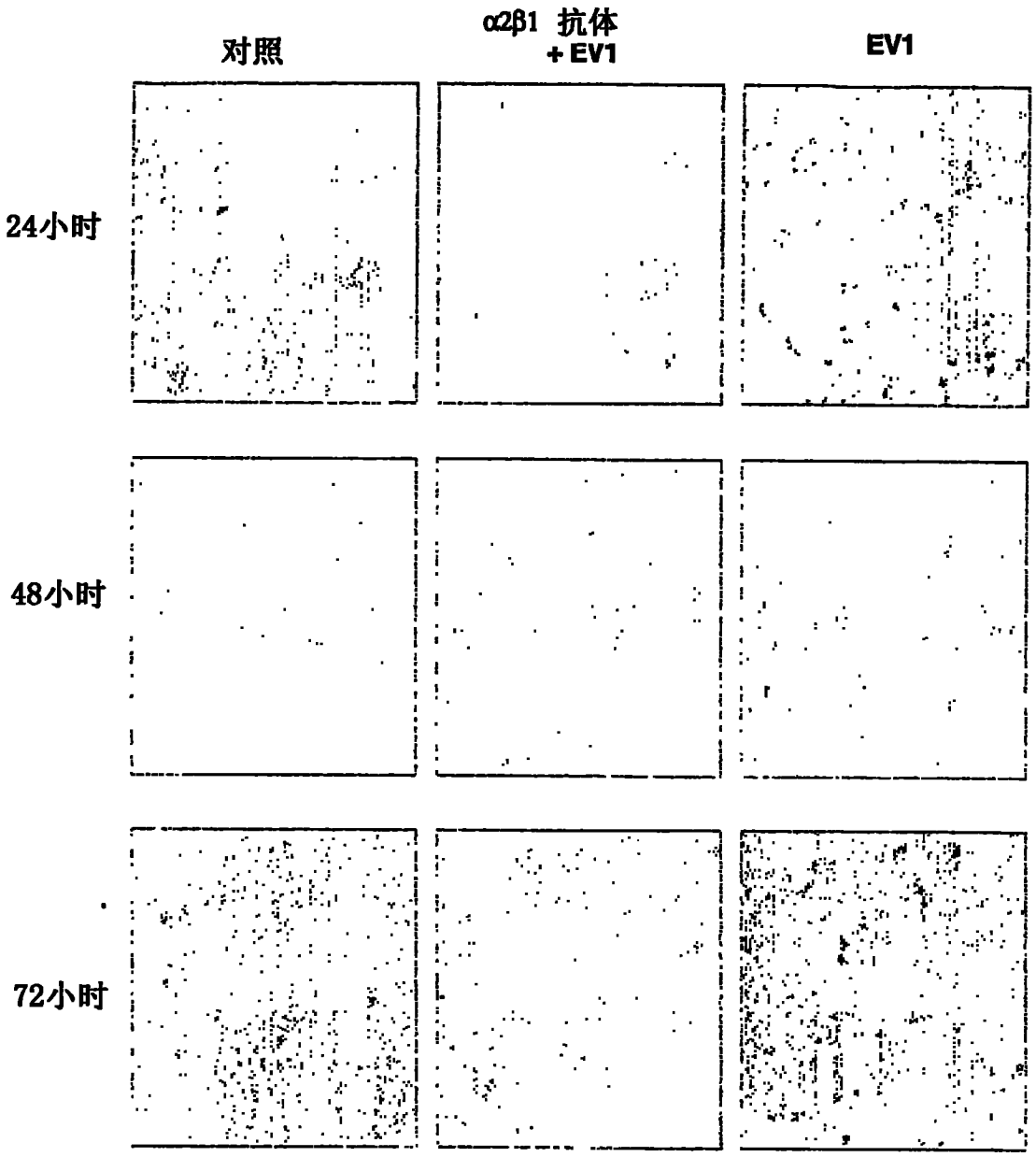


图 13

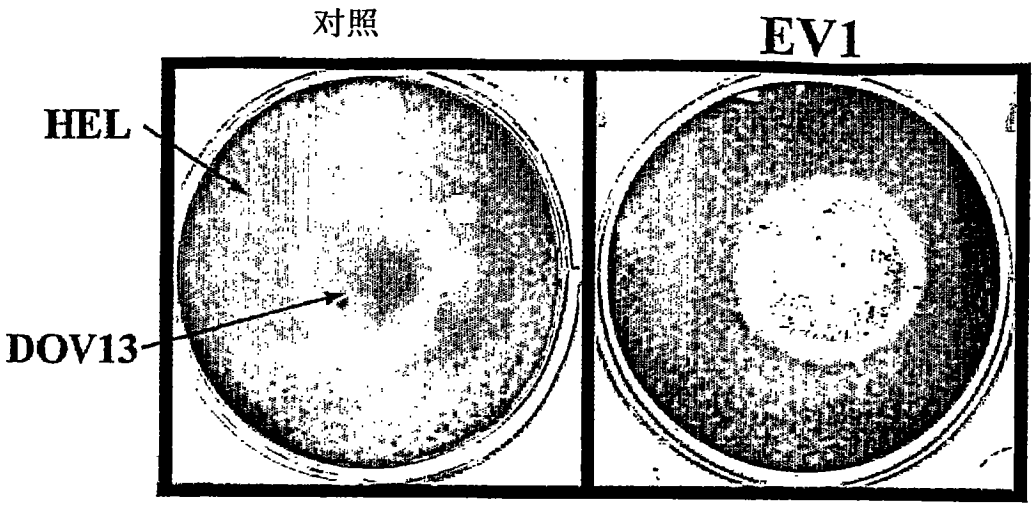

对照
EV1
HEL
DOV13

图 14

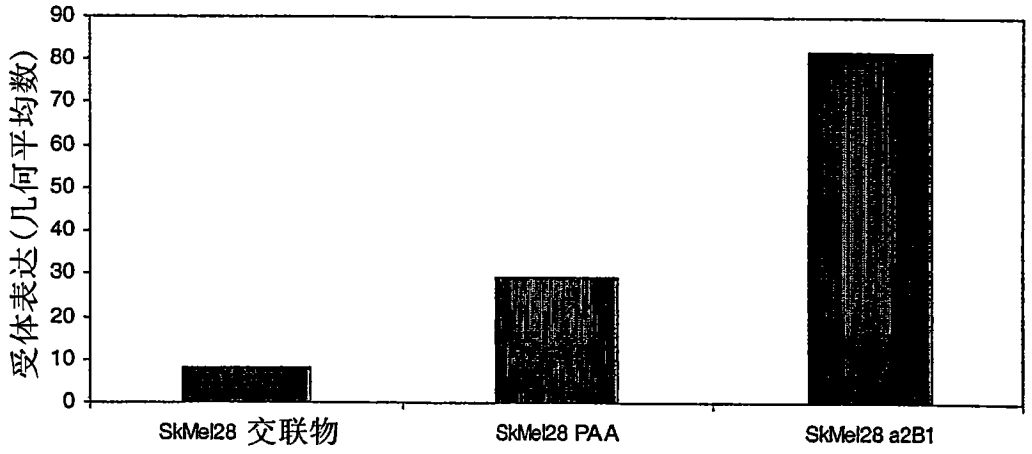

受体表达(几何平均数)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
SkMel28 交联物
SkMel28 PAA
SkMel28 a2B1

图 15

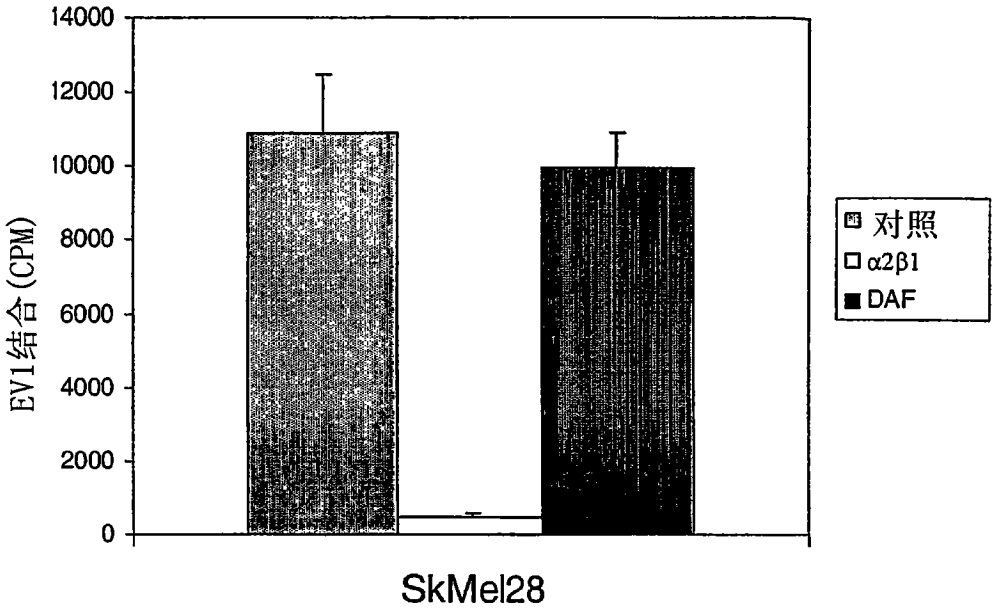

14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
EV1结合(CPM)
SkMel28
对照
α2β1
DAF

图 16

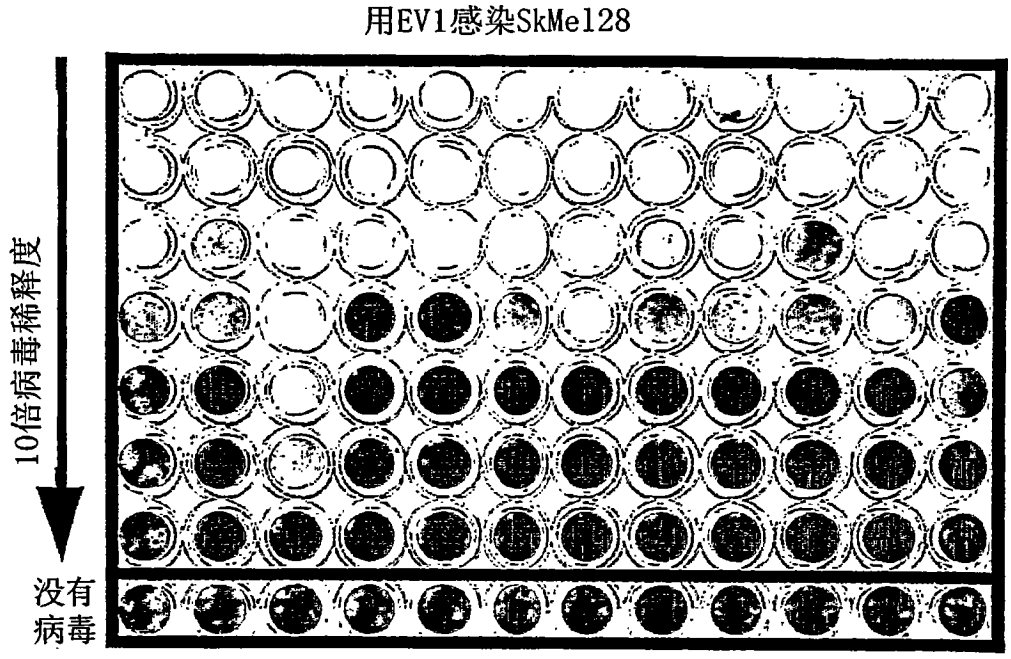
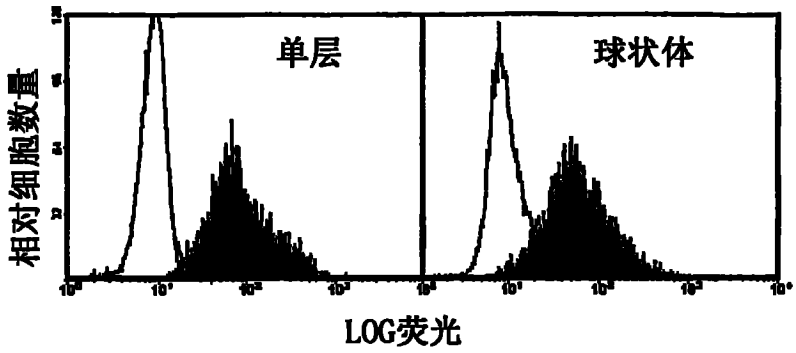
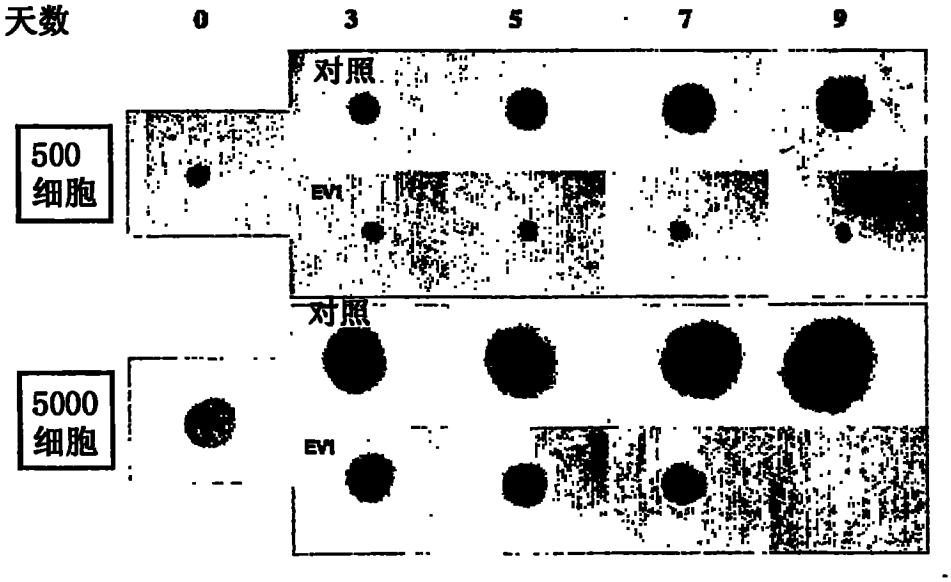

用EV1感染SkMel28
10倍病毒稀释度
没有
病毒

图 17



A



B

图 18

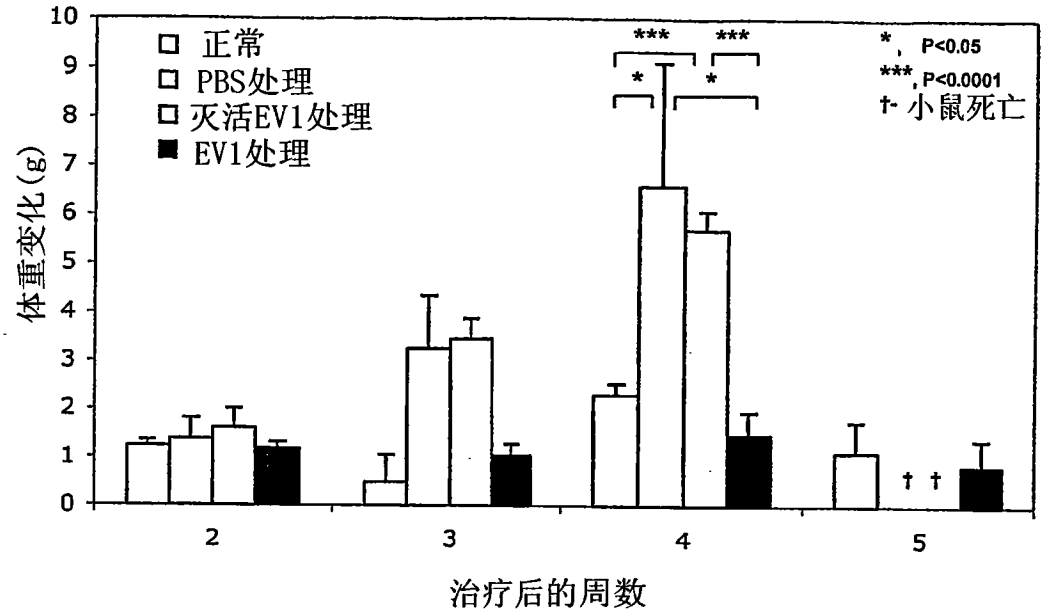

正常
PBS处理
灭活EV1处理
EV1处理
***
***
*
*
*, P<0.05
***, P<0.0001
† 小鼠死亡
体重变化(g)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
2
3
4
5
治疗后的周数

图 19a

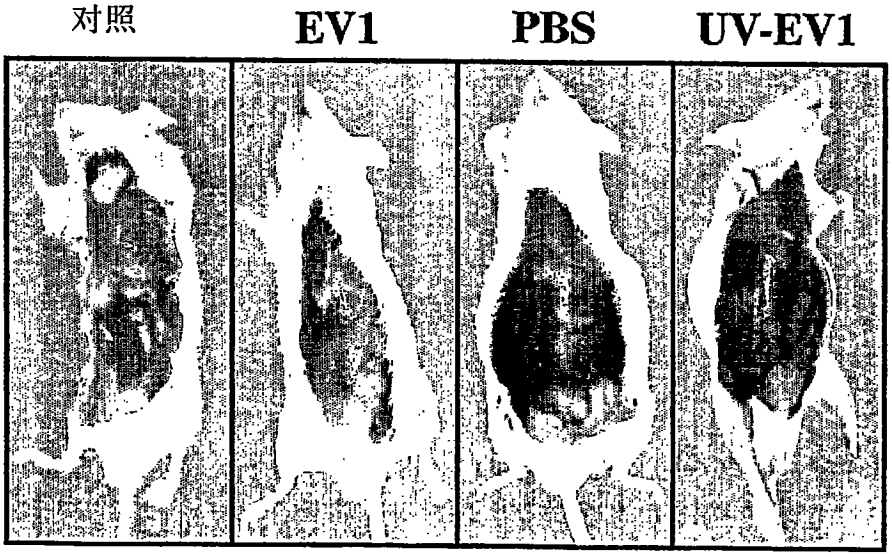

对照
EV1
PBS
UV-EV1

图 19b