



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114585376 A

(43) 申请公布日 2022.06.03

(21) 申请号 202080073316.7

(22) 申请日 2020.08.27

(30) 优先权数据

62/893,316 2019.08.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/034615 2020.08.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/040056 EN 2021.03.04

(71) 申请人 安斯泰来制药有限公司

地址 日本东京

(72) 发明人 中尾慎典 纲野伸明 荒井幸规

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 张佳鑫 钱文字

(51) Int.Cl.

A61K 35/768 (2015.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/39 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书59页

序列表2页 附图32页

(54) 发明名称

基因工程改造的溶瘤痘苗病毒及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供包含溶瘤痘苗病毒的药物组合物以及使用这种药物组合物来治疗患有癌症的对象的方法。

1. 一种药物组合物,其包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失。

2. 如权利要求1所述的药物组合物,其中,药学上可接受的运载体包含氨丁三醇和蔗糖。

3. 如权利要求2所述的药物组合物,其中,药学上可接受的运载体包含浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇。

4. 如权利要求2或3所述的药物组合物,其中,药学上可接受的运载体包含浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的药物组合物,其中,组合物的pH为约5.0~约8.5。

6. 一种药物组合物,其包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的药物组合物,其中,B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中的缺失包含SCR结构域1-4中的缺失。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中,B5R区域的SCR结构域中的缺失包含GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-237。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的药物组合物,其中,编码SCR结构域缺失的B5R区域的基因是编码含有B5R区域的信号肽、茎结构域、跨膜结构域和胞质尾结构域的多肽的基因。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的药物组合物,其中,SCR结构域缺失的B5R区域包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列相对应的B5R区域的氨基酸序列。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的药物组合物,其中,痘苗病毒是LC16mo病毒株。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的药物组合物,其中,溶瘤痘苗病毒是LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的药物组合物,其中包含约 1×10^7 ~约 1×10^9 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒。

14. 如权利要求1-12中任一项所述的药物组合物,其中包含约 1×10^7 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒。

15. 如权利要求1-12中任一项所述的药物组合物,其中包含约 5×10^7 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒。

16. 如权利要求1-12中任一项所述的药物组合物,其中包含约 1×10^8 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒。

17. 如权利要求1-12中任一项所述的药物组合物,其中包含约 5×10^8 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒。

18. 如权利要求1-12中任一项所述的药物组合物,其中包含约 1×10^9 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒。

19. 如权利要求1-12中任一项所述的药物组合物,其中包含约 5×10^9 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒。

20. 如权利要求2-19中任一项所述的药物组合物,其中,氨丁三醇的浓度为约15mmol/L~约45mmol/L、20mmol/L~约40mmol/L、或25mmol/L~约35mmol/L。

21. 如权利要求20所述的药物组合物,其中,氨丁三醇的浓度为约30mmol/L。

22. 如权利要求4-21中任一项所述的药物组合物,其中,蔗糖的浓度约6%w/v~约14%w/v、约7%w/v~约13%w/v、约8%w/v~约12%w/v、或约9%w/v~约11%w/v。

23. 如权利要求22所述的药物组合物,其中,蔗糖的浓度为约10%w/v。

24. 如权利要求5-23中任一项所述的药物组合物,其中,组合物的pH为约6.0~约8.0、约6.5~约8.0、或约6.8~约7.8。

25. 如权利要求24所述的药物组合物,其中,组合物的pH为约7.6。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的药物组合物,其中,组合物在储存于约-70℃时在至少约6个月~约2年内稳定。

27. 一种小瓶,其包含权利要求1-26中任一项所述的药物组合物。

28. 一种注射器,其包含权利要求1-26中任一项所述的药物组合物。

29. 一种治疗患有癌症的对象的方法,其包括给予对象治疗有效量的药物组合物以治疗对象,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失。

30. 一种治疗患有癌症的对象的方法,其包括给予对象治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失;其中,给予对象所述药物组合物可诱导远位效应,从而治疗对象。

31. 一种在患有癌症的对象中诱导远位效应的方法,其包括给予对象治疗有效量的药物组合物以在患有癌症的对象中诱导远位效应,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失。

32. 一种治疗患有癌症的对象的方法,其包括给予对象治疗有效量的药物组合物以治疗对象,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5。

33. 一种治疗患有癌症的对象的方法,其包括给予对象治疗有效量的药物组合物,所述

药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子 (VGF) 蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5;其中,给予对象所述药物组合物可诱导远位效应,从而治疗对象。

34. 一种在患有癌症的对象中诱导远位效应的方法,其包括给予对象治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子 (VGF) 蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5;其中,给予对象所述药物组合物可诱导远位效应,从而在对象中诱导远位效应。

35. 如权利要求30、31、33和34中任一项所述的方法,其中,远位效应发生在靠近原发性实体肿瘤的转移性肿瘤中。

36. 如权利要求30、31、33和34中任一项所述的方法,其中,远位效应发生在远离原发性实体肿瘤的转移性肿瘤中。

37. 如权利要求29-36中任一项所述的方法,其中,溶瘤痘苗病毒是LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7。

38. 如权利要求29-37中任一项所述的方法,其中,给予对象的剂量为约 1×10^7 ~约 1×10^9 颗粒形成单位 (pfu)。

39. 如权利要求29-37中任一项所述的方法,其中,给予对象的剂量为约 1×10^7 颗粒形成单位 (pfu)。

40. 如权利要求29-37中任一项所述的方法,其中,给予对象的剂量为约 5×10^7 颗粒形成单位 (pfu)。

41. 如权利要求29-37中任一项所述的方法,其中,给予对象的剂量为约 1×10^8 颗粒形成单位 (pfu)。

42. 如权利要求29-37中任一项所述的方法,其中,给予对象的剂量为约 5×10^8 颗粒形成单位 (pfu)。

43. 如权利要求29-37中任一项所述的方法,其中,给予对象的剂量为约 1×10^9 颗粒形成单位 (pfu)。

44. 如权利要求29-37中任一项所述的方法,其中,给药是肿瘤内给药。

45. 如权利要求29-44中任一项所述的方法,其中,药物组合物的剂量以达到约0.2~约0.8 (药物组合物体积/肿瘤体积) 的注射比例的体积向对象进行肿瘤内给药。

46. 如权利要求29-44中任一项所述的方法,其中,药物组合物约每周一次、每两周一次、每三周一次、或每四周一次给予对象。

47. 如权利要求29-44中任一项所述的方法,其中,药物组合物约每两周一次给予对象。

48. 如权利要求29-47中任一项所述的方法,其中,药物组合物按照给药方案给予对象。

49. 如权利要求48所述的方法,其中,给药方案包括在第1天给予对象第一剂药物组合

物,并在第15天给予对象第二剂药物组合物。

50. 如权利要求49所述的方法,其中,给药方案在第一剂药物组合物后第28天重新开始。

51. 如权利要求29-50中任一项所述的方法,其中,癌症是原发性肿瘤。

52. 如权利要求51所述的方法,其中,癌症是实体肿瘤。

53. 如权利要求50所述的方法,其中,实体肿瘤是晚期实体肿瘤。

54. 如权利要求29-50中任一项所述的方法,其中,癌症是转移性肿瘤。

55. 如权利要求29-50中任一项所述的方法,其中,癌症是皮肤、皮下、粘膜或粘膜下的肿瘤。

56. 如权利要求29-50中任一项所述的方法,其中,癌症是皮肤、皮下、粘膜或粘膜下位置以外的位置的原发性或转移性实体肿瘤。

57. 如权利要求29-50中任一项所述的方法,其中,癌症是头颈部鳞状细胞癌、皮肤科癌症、鼻咽癌、肉瘤或泌尿生殖系统/妇科肿瘤。

58. 如权利要求29-50中任一项所述的方法,其中,癌症是肝脏的原发性或转移性肿瘤。

59. 如权利要求29-50中任一项所述的方法,其中,癌症是原发性或转移性胃部肿瘤。

60. 如权利要求29-50中任一项所述的方法,其中,癌症是恶性黑色素瘤、肺腺癌、肺癌、小细胞肺癌、肺鳞癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、乳腺癌、食道癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、骨髓瘤、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肝细胞癌、间皮瘤、宫颈癌或胃癌。

61. 如权利要求29-60中任一项所述的方法,其中,对象是人。

62. 如权利要求29-61中任一项所述的方法,其中,对象是成年对象。

63. 如权利要求29-61中任一项所述的方法,其中,对象是青少年对象。

64. 如权利要求29-61中任一项所述的方法,其中,对象是儿童对象。

65. 权利要求29-64中任一项所述的方法,其中,给予对象药物组合物带来选自下组的至少一种效果:抑制肿瘤生长、肿瘤消退、减小肿瘤体积、减少肿瘤细胞数量、延迟肿瘤生长、远位效应、抑制肿瘤转移、随时间推移减少转移灶、减少化疗剂或细胞毒剂的使用、减少肿瘤负担、增加无进展生存期、增加总生存期、完全缓解、部分缓解、抗肿瘤免疫力和稳定疾病。

66. 如权利要求29-65中任一项所述的方法,其还包括给予对象其他治疗剂或疗法。

67. 如权利要求66所述的方法,其中,其他治疗剂或疗法选自下组:手术、放射线、化疗剂、癌症疫苗、检查点抑制剂、淋巴细胞活化基因3 (LAG3) 抑制剂、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR) 抑制剂、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3 (TIM3) 抑制剂、B-和T-淋巴细胞衰减剂 (BTLA) 抑制剂、带有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT) 抑制剂、CD47抑制剂、吡啶胺-2,3-双加氧酶 (IDO) 抑制剂、双特异性抗CD3/抗CD20抗体、血管内皮生长因子 (VEGF) 拮抗剂、血管生成素-2 (Ang2) 抑制剂、转化生长因子 β (TGF β) 抑制剂、CD38抑制剂、表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、环磷酸胺、针对肿瘤特异性抗原的抗体、卡介苗、细胞毒素、白细胞介素-6受体 (IL-6R) 抑制剂、白细胞介素-4受体 (IL-4R) 抑制剂、IL-10抑制剂、IL-2、IL-7、IL-21、IL-15、抗体-药物偶联物、抗炎药物和膳食补充剂。

68. 如权利要求30-67中任一项所述的方法,其还包括给予对象治疗有效量的检查点抑

制剂。

69. 如权利要求68所述的方法,其中,检查点抑制剂是程序性细胞死亡1 (PD-1) 抑制剂、程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 抑制剂、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 抑制剂、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3 (TIM-3) 抑制剂、淋巴细胞活化基因3 (LAG-3) 抑制剂、带有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT) 抑制剂、B-和T-淋巴细胞相关 (BTLA) 抑制剂、或含有V型免疫球蛋白结构域的T细胞活化抑制因子 (VISTA) 抑制剂。

70. 如权利要求69所述的方法,其中,检查点抑制剂是程序性细胞死亡1 (PD-1) 抑制剂、程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 抑制剂、或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 抑制剂。

71. 如权利要求69所述的方法,其中,检查点抑制剂选自下组:抗PD-1抗体或其抗原结合片段;抗PD-L1抗体或其抗原结合片段;抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段;抗TIM-3抗体或其抗原结合片段;抗LAG-3抗体或其抗原结合片段;抗TIGIT抗体或其抗原结合片段;抗BTLA抗体或其抗原结合片段;和,抗VISTA抗体或其抗原结合片段。

72. 如权利要求71所述的方法,其中,检查点抑制剂是抗程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体或其抗原结合片段;抗程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 抗体或其抗原结合片段;或抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 抗体或其抗原结合片段。

73. 如权利要求72所述的方法,其中,抗PD-1抗体是纳武单抗 (nivolumab) 或帕博利珠单抗 (pembrolizumab)。

74. 如权利要求72所述的方法,其中,抗PD-L1抗体是阿特珠单抗 (atezolizumab)。

75. 如权利要求72所述的方法,其中,抗CTLA-4抗体是伊匹单抗 (ipilimumab)。

76. 一种药物组合物,其包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml的LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7、浓度约30mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约10%w/v的蔗糖;其中,组合物的pH为约7.6。

77. 一种治疗患有癌症的对象的方法,其包括给予对象治疗有效量的药物组合物以治疗对象,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml的LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7、浓度约30mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约10%w/v的蔗糖;其中,组合物的pH为约7.6。

78. 一种治疗患有癌症的对象的方法,其包括给予对象治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml的LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7、浓度约30mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约10%w/v的蔗糖;其中,组合物的pH为约7.6;其中,给予对象所述药物组合物可诱导远位效应,从而治疗对象。

79. 一种在患有癌症的对象中诱导远位效应的方法,其包括给予对象治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml的LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7、浓度约30mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约10%w/v的蔗糖;其中,组合物的pH为约7.6;其中,给予对象所述药物组合物可诱导远位效应,从而在对象中诱导远位效应。

基因工程改造的溶瘤痘苗病毒及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2019年8月29日提交的美国临时申请第62/893,316号的权益或优先权,其完整内容通过引用纳入本文。

[0003] 本申请与美国专利公开第2017/0340687号、日本专利申请号JP 2018 223349和JP 2018 179632有关,上述各文献的完整内容通过引用纳入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含以ASCII格式电子提交的序列表并通过引用其全部内容纳入本文。所述ASCII副本创建于2020年8月25日,命名为127206_03920_SL.txt,大小为4,095字节。

背景技术

[0006] 最近开发出了各种利用病毒治疗癌症的技术。其中一种病毒是痘苗病毒,其作为向癌细胞递送治疗基因的载体、作为在癌细胞中增殖并破坏癌细胞的溶瘤病毒、或者作为表达肿瘤抗原或免疫调节分子的癌症疫苗而被研究(生物疗法的专家意见(Expert Opinion on Biological Therapy),2011,第11卷,第595-608页)。

[0007] 多种痘苗病毒已被工程改造成可作为溶瘤病毒使用(PCT公开号W0 2015/150809;和W0 2015/076422)。然而,表达免疫刺激分子的溶瘤痘苗病毒可能会通过受到该分子刺激的强烈免疫反应而被迅速清除,从而无法发挥治疗效果。还认为,就痘苗病毒介导的癌症治疗而言,强烈的免疫反应既可以作为敌人,也可以作为盟友(分子治疗(Molecular Therapy),2005,第11卷,第2期,第180-195页)。

[0008] 因此,本领域需要一种包含多核苷酸的溶瘤痘苗病毒,该多核苷酸表达的蛋白质能刺激免疫反应,但不会被迅速清除且具有治疗效果,还需要包含这种溶瘤痘苗病毒的药物组合物,以及将这种药物组合物单独使用或者与其他药剂或疗法联用以治疗患有癌症的对象的方法。

发明内容

[0009] 本发明至少部分基于包含所研究的溶瘤痘苗病毒的药物组合物的开发、以及这种组合物在体外对各种类型的人类癌细胞系具有细胞毒性这一发现。本发明还至少部分基于以下发现:这种药物组合物在体内具有抗肿瘤活性;使用特定的给药方案给予对象药物组合物是非常有效的(例如,发现在第1天和第15天给药比单次给药更有效);给予对象药物组合物可诱导鼠IL-12、人IL-7和鼠干扰素 γ (IFN- γ)蛋白的瘤内分泌,增加CD8+T细胞和CD4+T细胞的肿瘤浸润;本发明的药物组合物与检查点抑制剂、即抗PD-1抗体或抗CTLA4抗体的组合给药,与这些治疗中单独的任何一种相比,能诱导更高的抗肿瘤活性。本发明还至少部分基于以下发现:在给予本发明的药物组合物后实现肿瘤完全消退(CR)的小鼠,在CR后约90天再次受到攻击时排斥相同的癌细胞,证明了抗肿瘤免疫记忆的建立。此外,本发明至少部分基于以下发现:本发明的药物组合物的给药在双侧肿瘤模型中具有远位效应。

[0010] 因此,在一个方面,本发明提供一种药物组合物,其包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒

形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7。

[0011] 在一个实施方式中,药学上可接受的运载体包含氨丁三醇和蔗糖。

[0012] 在一个实施方式中,药学上可接受的运载体包含浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇。

[0013] 在一个实施方式中,药学上可接受的运载体包含浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖。

[0014] 在一个实施方式中,组合物的pH为约5.0~约8.5。

[0015] 在另一个方面,本发明提供一种药物组合物,其包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5。

[0016] 在一个实施方式中,B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中的缺失包含SCR结构域1-4中的缺失。

[0017] 在一个实施方式中,B5R区域的SCR结构域中的缺失包含GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-237。

[0018] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R区域的基因是编码含有B5R区域的信号肽、茎结构域、跨膜结构域和胞质尾结构域的多肽的基因。

[0019] 在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R区域包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列相对应的B5R区域的氨基酸序列。

[0020] 在一个实施方式中,痘苗病毒是LC16mo病毒株。

[0021] 在一个实施方式中,溶瘤痘苗病毒是LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7。

[0022] 本发明的药物组合物可以包含约 1×10^7 ~约 1×10^9 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒、约 1×10^7 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒、约 5×10^7 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒、约 1×10^8 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒、约 5×10^8 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒、约 1×10^9 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒、或约 5×10^9 颗粒形成单位 (pfu) /ml的溶瘤痘苗病毒。

[0023] 本发明的药物组合物可以包含浓度约15mmol/L~约45mmol/L、20mmol/L~约40mmol/L、或25mmol/L~约35mmol/L的氨丁三醇。在一个实施方式中,氨丁三醇的浓度为约30mmol/L。

[0024] 本发明的药物组合物可以包含浓度约6%w/v~约14%w/v、约7%w/v~约13%w/v、约8%w/v~约12%w/v、或约9%w/v~约11%w/v的蔗糖。在一个实施方式中,蔗糖的浓度为约10%w/v。

[0025] 药物组合物的pH可以为约8.0、约6.5~约8.0、或约6.8~约7.8。在一个实施方式中,组合物的pH为约7.6。

[0026] 在一个实施方式中,组合物在储存于约-70℃时在至少约6个月~约2年内稳定。

[0027] 本发明还提供一种小瓶和一种注射器,其包含本发明的任一药物组合物。

[0028] 在一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象治疗有效量的药物组合物以治疗对象,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7。

[0029] 在另一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7;其中,给予对象药物组合物可诱导远位效应,从而治疗对象。

[0030] 在另一个方面,本发明提供在患有癌症的对象中诱导远位效应的方法。该方法包括给予对象治疗有效量的药物组合物以在患有癌症的对象中诱导远位效应,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7。

[0031] 在一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象治疗有效量的药物组合物以治疗对象,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5。

[0032] 在另一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5;其中,给予对象药物组合物可诱导远位效应,从而治疗对象。

[0033] 在另一个方面,本发明提供在患有癌症的对象中诱导远位效应的方法。该方法包括给予对象治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%

w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5;其中,给予对象药物组合物可诱导远位效应,从而在对象中诱导远位效应。

[0034] 在一个实施方式中,远位效应发生在靠近原发性实体肿瘤的转移性肿瘤中。

[0035] 在另一个实施方式中,远位效应发生在远离原发性实体肿瘤的转移性肿瘤中。

[0036] 在一个实施方式中,溶瘤痘苗病毒是LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7。

[0037] 可以给予对象约 1×10^7 ~约 1×10^9 颗粒形成单位(pfu)的剂量、约 1×10^7 颗粒形成单位(pfu)的剂量、约 5×10^7 颗粒形成单位(pfu)的剂量、约 1×10^8 颗粒形成单位(pfu)的剂量、约 5×10^8 颗粒形成单位(pfu)、或约 1×10^9 颗粒形成单位(pfu)的剂量。

[0038] 在一个实施方式中,给药是肿瘤内给药。

[0039] 在一个实施方式中,药物组合物的剂量以达到约0.2~约0.8(药物组合物体积/肿瘤体积)的注射比例的体积向对象进行肿瘤内给药。

[0040] 药物组合物可以约每周一次、每两周一次、每三周一次、或每四周一次给予对象。在一个实施方式中,药物组合物约每两周一次给予对象。

[0041] 药物组合物可以按照给药方案给予对象。

[0042] 在一个实施方式中,给药方案包括在第1天给予对象第一剂药物组合物,并在第15天给予对象第二剂药物组合物。

[0043] 在一个实施方式中,给药方案在第一剂药物组合物后第28天重新开始。

[0044] 在一个实施方式中,癌症是原发性肿瘤,例如实体肿瘤。在一个实施方式中,实体肿瘤是晚期实体肿瘤。

[0045] 在一个实施方式中,癌症是转移性肿瘤。

[0046] 在一个实施方式中,癌症是皮肤、皮下、粘膜或粘膜下的肿瘤。

[0047] 在一个实施方式中,癌症是皮肤、皮下、粘膜或粘膜下位置以外的位置的原发性或转移性实体肿瘤。

[0048] 在一个实施方式中,癌症是头颈部鳞状细胞癌、皮肤科癌症、鼻咽癌、肉瘤或泌尿生殖系统/妇科肿瘤。

[0049] 在一个实施方式中,癌症是肝脏的原发性或转移性肿瘤。

[0050] 在一个实施方式中,癌症是原发性或转移性胃部肿瘤。

[0051] 在一个实施方式中,癌症是恶性黑色素瘤、肺腺癌、肺癌、小细胞肺癌、肺鳞癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、乳腺癌、食道癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、骨髓瘤、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肝细胞癌、间皮瘤、宫颈癌或胃癌。

[0052] 在一个实施方式中,所述对象是人。

[0053] 人对象可以是成年对象、青少年对象或儿童对象。

[0054] 在一个实施方式中,给予对象药物组合物带来选自下组的至少一种效果:抑制肿瘤生长、肿瘤消退、减小肿瘤体积、减少肿瘤细胞数量、延迟肿瘤生长、远位效应、抑制肿瘤转移、随时间推移减少转移灶、减少化疗剂或细胞毒剂的使用、减少肿瘤负担、增加无进展生存期、增加总生存期、完全缓解、部分缓解、抗肿瘤免疫力和稳定疾病。

[0055] 本发明的方法还可以包括给予对象其他治疗剂或疗法。

[0056] 在一个实施方式中,其他治疗剂或疗法选自下组:手术、放射线、化疗剂、癌症疫苗、检查点抑制剂、淋巴细胞活化基因3 (LAG3) 抑制剂、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR) 抑制剂、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3 (TIM3) 抑制剂、B-和T-淋巴细胞衰减剂 (BTLA) 抑制剂、带有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT) 抑制剂、CD47抑制剂、吡哆胺-2,3-双加氧酶 (IDO) 抑制剂、双特异性抗CD3/抗CD20抗体、血管内皮生长因子 (VEGF) 拮抗剂、血管生成素-2 (Ang2) 抑制剂、转化生长因子 β (TGF β) 抑制剂、CD38抑制剂、表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、环磷酰胺、针对肿瘤特异性抗原的抗体、卡介苗、细胞毒素、白细胞介素-6受体 (IL-6R) 抑制剂、白细胞介素-4受体 (IL-4R) 抑制剂、IL-10抑制剂、IL-2、IL-7、IL-21、IL-15、抗体-药物偶联物、抗炎药物和膳食补充剂。

[0057] 本发明的方法还可以包括给予对象治疗有效量的检查点抑制剂。

[0058] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是程序性细胞死亡1 (PD-1) 抑制剂、程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 抑制剂、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 抑制剂、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3 (TIM-3) 抑制剂、淋巴细胞活化基因3 (LAG-3) 抑制剂、带有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT) 抑制剂、B-和T-淋巴细胞相关 (BTLA) 抑制剂、或含有V型免疫球蛋白结构域的T细胞活化抑制因子 (VISTA) 抑制剂。

[0059] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是程序性细胞死亡1 (PD-1) 抑制剂、程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 抑制剂、或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 抑制剂。

[0060] 在一个实施方式中,检查点抑制剂选自下组:抗PD-1抗体或其抗原结合片段;抗PD-L1抗体或其抗原结合片段;抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段;抗TIM-3抗体或其抗原结合片段;抗LAG-3抗体或其抗原结合片段;抗TIGIT抗体或其抗原结合片段;抗BTLA抗体或其抗原结合片段;抗VISTA抗体或其抗原结合片段。

[0061] 在一个实施方式中,检查点抑制剂是抗程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体或其抗原结合片段;抗程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 抗体或其抗原结合片段;或抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 抗体或其抗原结合片段。

[0062] 在一个实施方式中,抗PD-1抗体是纳武单抗 (nivolumab) 或帕博利珠单抗 (pembrolizumab)。

[0063] 在一个实施方式中,抗PD-L1抗体是阿特珠单抗 (atezolizumab)。

[0064] 在一个实施方式中,抗CTLA-4抗体是伊匹单抗 (ipilimumab)。

[0065] 在一个实施方式中,本发明提供一种药物组合物,其包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml的LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7、浓度约30mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约10%w/v的蔗糖;其中,组合物的pH为约7.6。

[0066] 在一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象治疗有效量的药物组合物以治疗对象,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml的LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7、浓度约30mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约10%w/v的蔗糖;其中,组合物的pH为约7.6。

[0067] 在另一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) /ml

的LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7、浓度约30mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约10% w/v的蔗糖；其中，组合物的pH为约7.6；其中，给予对象药物组合物可诱导远位效应，从而治疗对象。

[0068] 在一个方面，本发明提供在患有癌症的对象中诱导远位效应的方法。该方法包括给予对象治疗有效量的药物组合物，所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7、浓度约30mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约10% w/v的蔗糖；其中，组合物的pH为约7.6；其中，给予对象药物组合物可诱导远位效应，从而在对象中诱导远位效应。

附图说明

[0069] 图1显示一系列描述携带hIL12和hIL7的痘苗病毒对人类癌细胞系的细胞毒性作用的图。所使用的人类细胞系有：人类癌细胞系：NCI-H28(间皮瘤)、U-87MG(胶质母细胞瘤)、HCT 116(结直肠癌)、A549(肺癌)、DMS 53(小细胞肺癌细胞)、GOTO(神经母细胞瘤)、Kato III(胃癌细胞)、OVMANA(卵巢癌细胞)、Detroit 562(头颈癌细胞)、SiHa(宫颈癌细胞)、BxPC-3(胰腺癌细胞)、MDA-MB-231(乳腺癌细胞)、Caki-1(肾癌细胞)、OE33(食道癌细胞)、RPMI 8226(骨髓瘤)、JHH-4(肝细胞癌)、LNCaP克隆FGC(前列腺癌细胞)、RPMI-7951(恶性黑色素瘤)、JIMT-1(乳腺癌细胞)、HCC4006(肺腺癌)、SK-OV-3(卵巢癌细胞)、RKO(结肠癌细胞)、647-V(膀胱癌细胞)和NCI-H226(肺鳞状细胞癌)。

[0070] 图2是显示携带hIL12和hIL7的痘苗病毒基因组在人类癌细胞或正常细胞中的复制的图。数值相对于18s核糖体RNA基因标准化，以两次重复测量的平均值表示。NCI-H520、HARA、LK-2和LUDLU-1是人类癌细胞系。

[0071] 图3A是显示经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒治疗的荷载COLO 741肿瘤细胞的小鼠中的肿瘤生长变化(肿瘤体积)的图。各个点表示平均值 \pm SEM(n=6)。在第21天对数值进行统计分析。COLO 741：人结直肠癌细胞系；载剂：含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。**P<0.01，与载剂治疗组相比(邓尼特多重比较检验)。

[0072] 图3B是显示经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒治疗的荷载COLO 741肿瘤细胞的小鼠中的体重变化的图。各个点表示平均值 \pm SEM(n=6)。**P<0.01，与载剂治疗组相比(邓尼特多重比较检验)。

[0073] 图4A是显示经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒治疗的荷载U-87MG的小鼠中的肿瘤生长(肿瘤体积)变化的图。各个点表示平均值 \pm SEM(n=6)。在第21天对数值进行统计分析。U-87MG：人胶质母细胞瘤细胞系；载剂：含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。**P<0.01，与载剂治疗组相比(邓尼特多重比较检验)。

[0074] 图4B是显示经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒治疗的荷载U-87MG的小鼠中的体重变化的图。各个点表示平均值 \pm SEM(n=6)。在第21天，在载剂治疗组和携带hIL12和hIL7的痘苗病毒治疗组之间无显著体重降低(邓尼特多重比较检验)。U-87MG：人胶质母细胞瘤细胞系；载剂：含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。

[0075] 图5A是显示经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗的荷载CT26.WT肿瘤细胞的小鼠中的肿瘤生长变化(肿瘤体积)的图。各个数值表示平均值 \pm SEM(n=6)。在第1、第3和第5天，将指定剂量的载剂或携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物肿瘤内注射至接种了

CT26.WT肿瘤细胞的小鼠中。在第18天使用肿瘤体积的数值进行统计分析。CT26.WT:鼠结直肠癌细胞系;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。 $**P<0.01$,与载剂对照组相比(邓尼特多重比较检验)。

[0076] 图5B是显示经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗的荷载CT26.WT肿瘤细胞的小鼠中的体重变化的图。各个数值表示平均值 \pm SEM($n=6$)。在第1、第3和第5天,将指定剂量的载剂或携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物肿瘤内注射至接种了CT26.WT肿瘤细胞的小鼠中。在第18天使用肿瘤体积的数值进行统计分析。CT26.WT:鼠结直肠癌细胞系;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。 $**P<0.01$,与载剂对照组相比(邓尼特多重比较检验)。

[0077] 图6A-6C是显示肿瘤内给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物对(6A)肿瘤生长(肿瘤体积)、(6B)第25天的肿瘤生长(肿瘤体积)和(6C)体重的影响的图。

[0078] 图6A是显示在第1天,在带有CT26.WT肿瘤的有免疫力的小鼠中肿瘤内给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的抗肿瘤效果的图。各个点表示平均值 \pm SEM($n=10$)。CT26.WT:鼠结直肠癌细胞系。 $**P<0.01$,NS:在第25天与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物单剂组相比无显著差异(邓尼特多重比较检验)。

[0079] 图6B是显示在第1天和第8天,在带有CT26.WT肿瘤的有免疫力的小鼠中肿瘤内给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的抗肿瘤效果的图。各个点表示平均值 \pm SEM($n=10$)。CT26.WT:鼠结直肠癌细胞系。 $**P<0.01$,NS:在第25天与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物单剂组相比无显著差异(邓尼特多重比较检验)。

[0080] 图6C是显示在第1天和第15天,在带有CT26.WT肿瘤的有免疫力的小鼠中肿瘤内给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的抗肿瘤效果的图。各个点表示平均值 \pm SEM($n=10$)。CT26.WT:鼠结直肠癌细胞系。 $**P<0.01$,NS:在第25天与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物单剂组相比无显著差异(邓尼特多重比较检验)。

[0081] 图7A是显示肿瘤中人IL-7水平的图。Cont-VV或携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物。IL-7:白细胞介素-7;Cont-VV:不携带免疫转基因的重组痘苗病毒;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。 $*,**P<0.05,0.01$ (曼-惠特尼U检验)。

[0082] 图7B是显示肿瘤中鼠IL-12水平的图。Cont-VV或携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物。IL-12:白细胞介素-12;Cont-VV:不携带免疫转基因的重组痘苗病毒;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。 $*,**P<0.05,0.01$ (曼-惠特尼U检验)。

[0083] 图7C是显示肿瘤中鼠IFN- γ 水平的图。Cont-VV或携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物。IFN- γ :干扰素 γ ;Cont-VV:不携带免疫转基因的重组痘苗病毒;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。 $*,**P<0.05,0.01$ (曼-惠特尼U检验)。

[0084] 图8A是显示肿瘤中鼠CD4+T细胞的图。各个点表示平均值 \pm SEM(载剂的 $n=12$,Cont-VV以及携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的 $n=11$)。CD4:对T辅助细胞亚群有特异性的表面抗原;Cont-VV:不携带免疫转基因的重组痘苗病毒;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。 $**P<0.01$ (曼-惠特尼U检验)。

[0085] 图8B是显示肿瘤中鼠CD8+T细胞的图。各个点表示平均值 \pm SEM(载剂的 $n=12$,Cont-VV以及携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的 $n=11$)。CD8:存在于细胞毒性T细胞上的表面抗原;Cont-VV:不携带免疫转基因的重组痘苗病毒;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L

Tris-HCl.**P<0.01(曼-惠特尼U检验)。

[0086] 图9A-9C是显示来自经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗的荷载CT26.WT肿瘤的小鼠的肿瘤样品中的人IL-7(A)、鼠IL-12(B)和鼠IFN- γ (C)的单独测量值的点图。

[0087] 图9A是显示在肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后,荷载CT26.WT肿瘤的小鼠中人IL-7的肿瘤水平的图。横杠表示3只动物的平均值。CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系;携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒。ELISA:酶联免疫吸附试验;IL-7:白细胞介素-7;MSD:中尺度探索(Meso Scale Discovery)。

[0088] 图9B是显示在肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后,荷载CT26.WT肿瘤的小鼠中鼠IL-12的肿瘤水平的图。横杠表示3只动物的平均值。CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系;携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒。ELISA:酶联免疫吸附试验;IL-12:白细胞介素-12;MSD:中尺度探索(Meso Scale Discovery)。

[0089] 图9C是显示在肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后,荷载CT26.WT肿瘤的小鼠中鼠IFN- γ 的肿瘤水平的图。横杠表示3只动物的平均值。CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系;携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒。ELISA:酶联免疫吸附试验;IFN- γ :干扰素 γ ;MSD:中尺度发现(Meso Scale Discovery)。

[0090] 图10A-10C是显示来自经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗的荷载CT26.WT肿瘤的小鼠的血清样品中的人IL-7(A)、鼠IL-12(B)和鼠IFN- γ (C)的单独测量值的点图。

[0091] 图10A是显示在肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后,荷载CT26.WT肿瘤的小鼠中人IL-7的血清水平的图。横杠表示3只动物的平均值。CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系;携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒。ELISA:酶联免疫吸附试验;IL-7:白细胞介素-7;MSD:中尺度探索(Meso Scale Discovery)。

[0092] 图10B是显示在肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后,荷载CT26.WT肿瘤的小鼠中鼠IL-12的血清水平的图。横杠表示3只动物的平均值。CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系;携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒。ELISA:酶联免疫吸附试验;IL-12:白细胞介素-12;MSD:中尺度探索(Meso Scale Discovery)。

[0093] 图10C是显示在肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后,荷载CT26.WT肿瘤的小鼠中鼠IFN- γ 的血清水平的图。横杠表示3只动物的平均值。CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系;携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒。ELISA:酶联免疫吸附试验;IFN- γ :干扰素 γ ;MSD:中尺度探索(Meso Scale Discovery)。

[0094] 图11A是显示在携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物单次肿瘤内注射后的肿瘤和血清人IL-7、鼠IL-12和鼠IFN- γ 水平的图。箱形图表示中位数、四分位距、最大值和最小值。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒;CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系;IFN- γ :干扰素 γ ;IL-7:白细胞介素-7;IL-12:白细胞介

素-12;MSD:中尺度探索(Meso Scale Discovery)。

[0095] 图11B是显示在携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物单次肿瘤内注射后的肿瘤和血清人IL-7、鼠IL-12和鼠IFN- γ 水平的图。箱形图表示中位数、四分位距、最大值和最小值。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒;CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系;IFN- γ :干扰素 γ ;IL-7:白细胞介素-7;IL-12:白细胞介素-12;MSD:中尺度探索(Meso Scale Discovery)。

[0096] 图12是显示在携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物反复肿瘤内注射后的肿瘤和血清人IL-7、鼠IL-12和鼠IFN- γ 水平的图。箱形图表示中位数、四分位距、最大值和最小值。以** $P < 0.01$ 确定显著性。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒;CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系;IFN- γ :干扰素 γ ;IL-7:白细胞介素-7;IL-12:白细胞介素-12;MSD:中尺度探索(Meso Scale Discovery)。

[0097] 图13是显示在携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物注射完成后90天实现CR的小鼠和年龄匹配的对照小鼠的体重比较的图。点图表示在最后一次注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后90天实现CR的小鼠和年龄匹配的对照小鼠的个体体重。每组的横线和竖杠分别表示平均值和SEM。诱导了CR的小鼠和年龄匹配的对照小鼠之间在体重上没有显著差异(非配对斯氏t检验)。CR:肿瘤完全消退;CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系。

[0098] 图14A-14B是显示接种CT26.WT肿瘤细胞后个体小鼠的肿瘤生长(肿瘤体积)的图。对经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗后实现CT26.WT肿瘤细胞的CR的小鼠(先前治愈的小鼠;图14A)和年龄匹配的对照小鼠(未经治疗的原初小鼠;图14B)皮下接种CT26.WT肿瘤细胞, 5×10^5 个细胞/小鼠($n=10$),接种后观察28天。CR:肿瘤完全消退;CT26.WT:小鼠结直肠癌细胞系。

[0099] 图15A是显示经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗的荷载CT26.WT肿瘤细胞的小鼠中的肿瘤生长(肿瘤体积)的图。各个点表示平均值 \pm SEM($n=10$)。Cont-VV:不携带免疫转基因的重组痘苗病毒;CT26.WT:鼠结直肠癌细胞系;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与载剂组相比(非配对斯氏t检验),# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,与Cont-VV相比(非配对斯氏t检验)。

[0100] 图15B是显示经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗的荷载CT26.WT肿瘤细胞的小鼠中的肿瘤生长(肿瘤体积)的图。各个点表示平均值 \pm SEM($n=10$)。Cont-VV:不携带免疫转基因的重组痘苗病毒;CT26.WT:鼠结直肠癌细胞系;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与载剂组相比(非配对斯氏t检验),# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,与Cont-VV相比(非配对斯氏t检验)。

[0101] 图15C是显示经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗的荷载CT26.WT肿瘤细胞的小鼠中的体重变化的图。各个点表示平均值 \pm SEM($n=10$)。Cont-VV:不携带免疫转基因的重组痘苗病毒;CT26.WT:鼠结直肠癌细胞系;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl。* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与载剂组相比(非配对斯氏t检验),# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,与Cont-VV相比(非配对斯氏t检验)。

[0102] 图16显示一系列描述经携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物与抗PD-1抗体或抗CTLA4抗体治疗的双侧荷载CT26.WT肿瘤的小鼠中的肿瘤生长变化(肿瘤体积)的图。所示为个体小鼠的肿瘤体积。Ab:抗体;:携带鼠IL-12基因和人IL-7基因的重组痘苗病毒;

CT26.WT:鼠结直肠癌细胞系;IL-7:白细胞介素-7;IL-12:白细胞介素-12;载剂:含有10%蔗糖的30mmol/LTris-HCl。

[0103] 图17显示首次人体试验(FIH)的I期研究模式。CT:计算机断层扫描;DLT:剂量限制性毒性;FIH:首次人体试验;HNSCC:头颈部鳞状细胞癌;MTD:最大耐受剂量;n:特定队列中的患者数;RP2D:推荐的2期剂量。¹拟采用的剂量递增水平。实际的剂量递增队列将根据临床数据来确定。²从上一队列的DLT观察期完成到下一队列的开始,将经历 ≥ 4 周时间。³B组剂量递增队列的招募将在A组的MTD/RP2D之后开始。

[0104] 图18显示首次人体试验(FIH)的I期研究随访模式。DLT:剂量限制性毒性;EOT:治疗终点;FIH:首次人体试验;IT:肿瘤内;Q:每一。

[0105] *第1周期的给药前活检物最早可在第一次注射前28天进行。第2周期的给药前活检物最早可在第1天的注射前5天采集。

[0106] 图19示意地显示重组痘苗病毒“LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/O1L-SP-IL7”的基因组结构,也称为“携带hIL12和hIL7的痘苗病毒”或“hIL12/hIL7病毒”。

具体实施方式

[0107] 本发明至少部分基于包含所研究的溶瘤痘苗病毒的药物组合物的开发、以及这种组合物在体外对各种类型的人类癌细胞系具有细胞毒性这一发现。本发明还至少部分基于以下发现:这种药物组合物在体内具有抗肿瘤活性;使用给药方案给予对象药物组合物是非常有效的(例如,发现在第1天和第15天给药比单次给药更有效);给予对象药物组合物可诱导鼠IL-12、人IL-7和鼠干扰素 γ (IFN- γ)蛋白的瘤内分泌,增加CD8+T细胞和CD4+T细胞的肿瘤浸润;本发明的药物组合物与检查点抑制剂、即抗PD-1抗体或抗CTLA4抗体的组合给药,与这些治疗中单独的任何一种相比,能诱导更高的抗肿瘤活性。本发明还至少部分基于以下发现:在给予本发明的药物组合物后实现肿瘤完全消退(CR)的小鼠,在CR后约90天再次受到攻击时排斥相同的癌细胞,证明了抗肿瘤免疫记忆的建立。此外,本发明至少部分基于以下发现:本发明的药物组合物的给药在双侧肿瘤模型中具有远位效应。

[0108] 以下详细说明描述了如何制备和应用本发明。

[0109] I. 定义

[0110] 为了更好地理解本发明,首先定义某些术语。此外应注意,每当提到一个参数的数值或数值范围时,其都意图将介于所提到的数值之间的数值和范围也作为本发明的一部分。

[0111] 如本文所用,冠词“一个”和“一种”是指一种或一种以上的(即至少一个)该冠词的语法对象。举例来说,“一个元件”是指一个元件或一个以上的元件,例如多个元件。

[0112] 如本文所用,术语“包括”是指“包括但不限于”,且可以与之互换使用。

[0113] 如本文所用,术语“或”是指术语“和/或”,且可以与之互换使用,除非上下文另有明确说明。如本文所用,术语“约”是指在本领域典型的公差范围之内。例如,“约”可以理解为在平均数的约2个标准差之内。在某些实施方式中,约是指+10%。在某些实施方式中,约是指+5%。当“约”出现在一个数字系列或一个范围之前时,可以理解为“约”可以更改该系列或范围中的每个数字。

[0114] 如本文所用,术语“溶瘤病毒”是指在体外或体内选择性地在分裂细胞(例如增殖

性细胞,如癌细胞)中复制以减缓分裂细胞的生长和/或裂解分裂细胞、而在非分裂细胞中不复制或极少复制的病毒。通常情况下,溶瘤病毒包含包装在病毒颗粒(或病毒体)中的病毒基因组,具有感染性(即能够感染并进入宿主细胞或对象)。如本文所用,该术语涵盖DNA和RNA载体(取决于所研究的病毒),以及由其产生的病毒颗粒。

[0115] 如本文所用,术语痘苗病毒是指属于痘病毒家族的一种大型、复杂的包膜病毒。痘苗病毒具有长度约为190kbp的线性双链DNA基因组,它编码约250个基因。病毒体的尺度大约为 $360 \times 270 \times 250\text{nm}$,质量大约为5-10fg。

[0116] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指氨基酸残基的聚合物,其中包含至少9个或更多个通过肽键结合的氨基酸。该聚合物可以是线性的、支链的或环状的,可以包含天然存在的和/或氨基酸类似物,其可以被非氨基酸打断。如果氨基酸聚合物超过50个氨基酸残基,则它更适合被称为多肽或蛋白质,而如果它的长度为50个氨基酸或更少,则它被称为“肽”。

[0117] 术语“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”和“核苷酸序列”可互换使用,定义多脱氧核糖核苷酸(DNA)(例如cDNA、基因组DNA、质粒、载体、病毒基因组、分离的DNA、探针、引物及其任意混合物)或多核糖核苷酸(例如mRNA、反义RNA、siRNA)或混合的多核糖核苷酸-多脱氧核糖核苷酸的任意长度的聚合物。其涵盖单链或双链的、线性或环状的、天然或合成的、经修饰或未经修饰的多核苷酸。此外,多核苷酸可以包含非天然存在的核苷酸,并且可以被非核苷酸成分打断。

[0118] “分离的”核酸分子是与存在于核酸天然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。例如,关于基因组DNA,术语“分离的”包括从与基因组DNA天然相关的染色体中分离出来的核酸分子。优选地,“分离的”核酸分子不含衍生所述核酸分子的生物体的基因组DNA中天然侧接于该核酸分子的序列(即位于核酸分子的5'和3'端的序列)。

[0119] 一般情况下,术语“相同性”是指两个多肽或核酸序列之间的氨基酸与氨基酸或核苷酸与核苷酸的对应性。两个序列间的相同性百分数是序列间共享的相同位置数量的函数,并考虑到为了最优比对而需要引入的缺口数量和各缺口的长度。本领域有各种计算机程序和数学算法可用于确定氨基酸序列之间的相同性百分比,例如NCBI的Blast程序或蛋白质序列和结构图集(Atlas of Protein Sequence and Structure)中的ALIGN(Dayhoffed,1981,增刊3:482-9)。专门的数据库中也有用于确定核苷酸序列之间相同性的程序(例如Genbank,威斯康星序列分析软件包(Wisconsin Sequence Analysis Package)、BESTFIT、FASTA和GAP程序)。出于说明的目的,“至少80%的相同性”是指80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0120] 术语“对象”通常是指需要本发明的任何产品和方法或可能因此受益的生物体。通常,生物体是哺乳动物,特别是选自家畜、农场动物、运动动物和灵长类动物的哺乳动物。优选地,对象是已被诊断为患有或有风险患有增殖性疾病如癌症的人。当指代人类生物体时,术语“对象”和“患者”可互换使用,并且涵盖男性和女性。

[0121] II. 本发明的药物组合物

[0122] 本发明提供一种药物组合物和制剂,其包含本发明的溶瘤痘苗病毒。这种药物组合物根据递送模式来配制。在一个示例中,组合物配制用于通过胃肠外递送、例如通过静脉内(IV)递送进行全身给药。在一个实施方式中,组合物配制用于腹膜内递送。在一个实

施方式中,组合物配制成用于肿瘤内递送。

[0123] 因此,本发明提供一种药物组合物,例如适合于肿瘤内递送的药物组合物,其包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒(例如hIL12/hIL7病毒)和药学上可接受的运载体。

[0124] 短语“药学上可接受的”是指合理医疗判断范围内的这些化合物、材料、组合物和/或剂型适用于接触人类对象和动物对象的组织而不会产生与合理的效益/风险比相适应的过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症。

[0125] 如本文所用,短语“药学上可接受的运载体”是指药学上可接受的材料、组合物或载剂,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、制造助剂(如润滑剂、滑石、硬脂酸镁、钙或锌,或硬脂酸)、或溶剂封装材料,参与将主题化合物从一个器官或身体的一部分携带或运输到另一个器官或身体的另一部分。各载体从与制剂的其他成分的相容性和对所治疗的对象无害的意义上而言应“可接受”。可以用作药学上可接受的运载体的材料的一些示例包括:(1)糖类,如蔗糖、乳糖或葡萄糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)粉末状的三角黄;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油类,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二元醇,如丙二醇;(11)多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氨丁三醇、氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐;(22)膨松剂,如多肽和氨基酸;(23)血清成分,如血清白蛋白、HDL和LDL;以及(22)药品配方中使用的其他无毒相容性物质。

[0126] 本发明的药物组合物可以位于适合人或动物使用的溶液中。溶液的溶剂或稀释剂可以是等渗的、低渗的或弱高渗的,并且具有相对低的离子强度。代表性的示例包括无菌水、生理盐水(如氯化钠)、林格氏溶液、葡萄糖、海藻糖或蔗糖溶液、汉克氏溶液和其他生理平衡盐水溶液(例如参见最新版本的《雷明顿:药学与实践》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),A.Gennaro编,LWW出版社(Lippincott,Williams&Wilkins)。

[0127] 在一个实施方式中,本发明的药物组合物经缓冲以供人使用。合适的缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液(如PBS)、碳酸氢盐缓冲液和/或Tris缓冲液,例如包含氨丁三醇的缓冲液,其能够保持生理pH或微碱性的pH(如约pH7~约pH9)。

[0128] 本发明的药物组合物还可以包含其他药学上可接受的赋形剂,以提供理想的药学或药效学特性,包括例如渗透压、粘度、透明度、颜色、无菌性、稳定性、制剂的溶解速率、改变或维持向人类或动物对象中的释放或吸收、促进跨越血液屏障的运输或在特定器官内的渗透。

[0129] 本发明的药物组合物还可以包含一种或多种佐剂,该佐剂在给药后能够刺激免疫(特别是T细胞介导的免疫)或促进肿瘤细胞的感染,例如通过toll样受体(TLR)如TLR-7、TLR-8和TLR-9,包括但不限于明矾、矿物油乳剂如弗氏完全和不完全佐剂(IFA)、脂多糖或其衍生物(Ribi等人,1986,细菌内毒素的免疫学和免疫药理学(Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins),Plenum出版社,纽约(NY),p407-419)、皂苷如QS21(Sumino等人,1998,J.Virol.72:4931;W098/56415)、咪唑并喹啉化合物如咪唑

莫特 (Imiquimod) (Suader, 2000, J. Am Acad Dermatol. 43: S6)、S-27609 (Smorlesi, 2005, Gene Ther. 12: 1324) 以及相关化合物 (例如 W02007/147529 中描述的哪些)、胞嘧啶磷酸盐鸟嘌呤寡脱氧核苷酸如 CpG (Chu 等人, 1997, J. Exp. Med. 186: 1623; Tritel 等人, 2003, J. Immunol. 171: 2358) 和阳离子性肽如 IC-31 (Kritsch 等人, 2005, J. Chromatogr Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 822: 263-70)。

[0130] 在一个实施方式中, 本发明的药物组合物经配制以用于提高稳定性。例如, 在制造和长期储存 (即至少 6 个月至 2 年) 的条件下, 在冷冻 (如 -70°C 、 -20°C)、冷藏 (如 4°C) 或环境温度下。本发明的药物组合物可以是通过涉及例如真空干燥和冷冻干燥的工艺获得的液体或固体 (如干粉或冻干)。

[0131] 在某些实施方式中, 本发明的药物组合物配制成在体内确保合适的分布或延迟释放。例如, 药物组合物可以配制成脂质体。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物, 例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。许多制备这类制剂的方法由例如 J. Robinson 在“持续和控释给药系统 (Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems)”, 马塞尔·德克尔出版社 (Marcel Dekker, Inc.), 纽约, 1978 中描述。

[0132] 在一个方面, 本文提供一种药物组合物, 其包含约 $1 \times 10^6 \sim$ 约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) / ml 的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体; 其中, 溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7 的多核苷酸和编码人白细胞介素-12 的多核苷酸, 缺乏功能性病毒生长因子 (VGF) 蛋白和功能性 O1L 蛋白, 并且在 B5R 膜蛋白胞外区内的 SCR 结构域中具有缺失, 如 hIL12/hIL7 病毒。在一个实施方式中, 药物组合物用于肿瘤内递送。

[0133] 在另一个方面, 本文提供一种药物组合物, 其包含约 $1 \times 10^6 \sim$ 约 1×10^{10} 颗粒形成单位 (pfu) / ml 的溶瘤痘苗病毒、浓度约 10 mmol/L \sim 约 50 mmol/L 的氨丁三醇、以及浓度约 5% w/v \sim 约 15% w/v 的蔗糖; 其中, 溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7 的多核苷酸和编码人白细胞介素-12 的多核苷酸, 缺乏功能性病毒生长因子 (VGF) 蛋白和功能性 O1L 蛋白, 并且在 B5R 膜蛋白胞外区内的 SCR 结构域中具有缺失, 如 hIL12/hIL7 病毒; 其中, 组合物的 pH 为约 5.0 \sim 约 8.5。在一个实施方式中, 药物组合物用于肿瘤内递送。

[0134] 含有本发明的溶瘤痘苗病毒如 hIL12/hIL7 病毒的药物组合物可用于治疗患有癌症的对象。

[0135] 本发明的药物组合物可以包含约 $1 \times 10^6 \sim$ 约 1×10^{10} 、约 $1 \times 10^7 \sim$ 约 1×10^9 、约 1×10^7 、约 5×10^7 、约 1×10^8 、约 5×10^8 、约 1×10^9 、或约 5×10^9 颗粒形成单位 (pfu) / ml 的本发明的溶瘤痘苗病毒, 如 hIL12/hIL7 病毒。意图将介于上述范围和数值之间的数值也作为本发明的一部分。此外, 还意图包括使用上述的任意值的组合作为上限和/或下限的数值范围。

[0136] 在一些实施方式中, 本发明的药物组合物包含氨丁三醇 (Tris-HCl)。本发明的药物组合物中氨丁三醇的浓度可以为约 10 mmol/L \sim 约 50 mmol/L、约 15 mmol/L \sim 约 45 mmol/L、20 mmol/L \sim 约 40 mmol/L、25 mmol/L \sim 约 35 mmol/L、或约 30 mmol/L。意图将介于上述范围和数值之间的数值也作为本发明的一部分。此外, 还意图包括使用上述的任意值的组合作为上限和/或下限的数值范围。

[0137] 在另一些实施方式中, 本发明的药物组合物含糖, 如蔗糖。本发明的药物组合物中蔗糖的浓度可以为约 5% w/v \sim 约 15% w/v、约 6% w/v \sim 约 14% w/v、约 7% w/v \sim 约 13% w/v

v、约8%w/v~约12%w/v、约9%w/v~约11%w/v、或约10%w/v的蔗糖。意图将介于上述范围和数值之间的数值也作为本发明的一部分。此外，还意图包括使用上述的任意值的组合作为上限和/或下限的数值范围。

[0138] 在一个实施方式中，本发明的药物组合物不含防腐剂。在本发明的另一个实施方式中，本发明的药物组合物包含防腐剂。

[0139] 本发明的药物组合物的pH可以为约5.0~约8.5、约5.5~约8.5、约6.0~约8.5、约6.5~约8.5、约7.0~约8.5、约5.0~约8.0、约5.5~约8.0、约6.0~约8.0、约6.5~约8.0、约7.0~约8.0、约6.5~约8.5、约7.5~约8.5、约7.5~约8.0、约6.8~约7.8、或约7.6。意图将介于上述范围和数值之间的范围和数值也作为本发明的一部分。此外，还意图包括使用上述的任意值的组合作为上限和/或下限的数值范围。

[0140] 本发明的药物组合物的物理和化学性质稳定。

[0141] 如本文所用，术语“稳定”是指基本上保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的药物组合物和/或这种药物组合物中的溶瘤痘苗病毒。本领域有各种分析技术可用于测量组合物及其中的dsRNA剂的稳定性，并且在本文中有所描述。

[0142] 如果在视觉检查或紫外线检查颜色和/或透明度时，或通过例如HPLC分析、如变性IP RP-HPLC、非变性IP RP-HPLC和/或变性AX-HPLC分析进行测量时，药物组合物基本上没有显示出例如杂质增加的迹象，则该药物组合物“保持其物理稳定性”。

[0143] 如果在给定时间的化学稳定性使人们认为溶瘤痘苗病毒仍然保持其生物学活性，则称药物组合物中的该溶瘤痘苗病毒“保持其化学稳定性”。

[0144] 如果组合物中的溶瘤痘苗病毒对其预期目的具有生物学活性，则该溶瘤痘苗病毒在该组合物中“保持其生物学活性”。

[0145] 在一些实施方式中，本发明组合物在储存于约-70℃时在至少约6个月~约2年内稳定。

[0146] III. 用于本发明的药物组合物中的溶瘤痘苗病毒

[0147] 适合用于本发明的溶瘤痘苗病毒在美国专利公开第2017/0340687号中有描述，其全文通过引用纳入本文。这种重组痘苗病毒包含编码hIL7的多核苷酸和编码hIL12的多核苷酸。图19示意地显示重组痘苗病毒“LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/01L-SP-IL7”的基因组结构，也称为“携带hIL12和hIL7的痘苗病毒”或“hIL12/hIL7病毒”。

[0148] 适合用于本发明的痘苗病毒衍生自痘病毒科(Poxviridae)的正痘病毒属(Orthopoxvirus)。本发明中所用的痘苗病毒的菌株包括但不限于李斯特(Lister)、纽约市卫生局(NYBH)、惠氏(Wyeth)、哥本哈根(Copenhagen)、西储(WR)、改良安卡拉疫苗(MVA)、EM63、池田(Ikeda)、大连(Dalian)、天坛(Tian Tan)等菌株。李斯特(Lister)和MVA菌株可由美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection)获取(分别为ATCC VR-1549和ATCC VR-1508)。由这些菌株构建的痘苗病毒菌株也可以用于本发明。例如，由这些菌株构建的LC16、LC16m8和LC16m0菌株也可以用于本发明。LC16m0菌株是通过将李斯特菌株作为母菌株在低温下进行传代培养而由LC16菌株产生的菌株。LC16m8菌株是通过将LC16m0菌株在低温下进一步传代培养而产生的菌株，其B5R基因有移码突变，该B5R基因是编码病毒膜蛋白的基因，该菌株通过失去该蛋白质的表达和功能而减毒(蛋白质、核酸、酶(Protein, Nucleic acid, Enzyme), 2003, 第48卷, 第1693-1700页)。

[0149] 李斯特、LC16m8和LC16m0菌株的全基因组序列是已知的,可以在例如GenBank登录号AY678276.1、AY678275.1和AY678277.1中找到,上述各项的全部内容通过引用纳入本文。因此,LC16m8和LC16m0菌株可以通过已知的技术(如同源重组或定点诱变)由李斯特菌株制备。

[0150] 在一个实施方式中,用于本发明的痘苗病毒是LC16m0菌株。

[0151] IL-7是一种分泌蛋白,起到IL-7受体激动剂的作用。IL-7有助于T细胞、B细胞等的生存、增殖和分化(最新药物靶点(Current Drug Targets),2006,第7卷,第1571-1582页)。在本发明中,IL-7涵盖天然存在的IL-7及其功能的修饰形式。在一个实施方式中,IL-7是人IL-7。在本发明中,人IL-7涵盖天然存在的人IL-7及其功能的修饰形式。在一个实施方式中,人IL-7选自下组:

[0152] 包含登录号NP_000871.1(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列的多肽;

[0153] 由在登录号NP_000871.1(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列中有1至10个氨基酸的缺失、取代、插入和/或添加的氨基酸序列构成的、具有人IL-7功能的多肽;以及

[0154] 包含与GenBank登录号NP_000871.1(其全部内容通过引用纳入本文)所示的整个氨基酸序列具有约85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或约100%的核苷酸相同性的氨基酸序列的、具有人IL-7功能的多肽。

[0155] 关于这一点,人IL-7的功能是指对人免疫细胞的生存、增殖和分化的影响。

[0156] 本发明中所用的人IL-7优选由GenBank登录号NP_000871.1(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列构成的多肽。

[0157] IL-12是IL-12亚基p40和IL-12亚基 α 的异源二聚体。据报道,IL-12具有激活和诱导T细胞和NK细胞分化的功能(癌症免疫学免疫治疗(Cancer Immunology Immunotherapy),2014,第63卷,第419-435页)。在本发明中,IL-12涵盖天然存在的IL-12及其功能的修饰形式。在一个实施方式中,IL-12是人IL-12。在本发明中,人IL-12涵盖天然存在的人IL-12及其功能的修饰形式。在一个实施方式中,作为人IL-12亚基p40(a)和人IL-12亚基 α (b)的组合,人IL-12选自下组(1-3):

[0158] (1) (a) 多肽,其包括:包含GenBank登录号NP_002178.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列的多肽;由在GenBank登录号NP_002178.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列中有1至10个氨基酸的缺失、取代、插入和/或添加的氨基酸序列构成的多肽;或者包含与GenBank登录号NP_002178.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的整个氨基酸序列具有约85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或约100%的核苷酸相同性的氨基酸序列的多肽;以及

[0159] (1) (b) 包含GenBank登录号NP_000873.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列的多肽;由在GenBank登录号NP_000873.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列中有1至10个氨基酸的缺失、取代、插入和/或添加的氨基酸序列构成的多肽;或者包含与GenBank登录号NP_002178.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的整个氨基酸序列具有约85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或约100%的核苷酸相同性的氨基酸序列的、具有人IL-12功能的多肽。

[0160] (2) (a) 多肽,其包括:由GenBank登录号NP_002178.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0161] (2) (b) 包含GenBank登录号NP_000873.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列的多肽;由在GenBank登录号NP_000873.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列中有1至10个氨基酸的缺失、取代、插入和/或添加的氨基酸序列构成的多肽;或者包含与GenBank登录号NP_000873.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的整个氨基酸序列具有约85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或约100%的核苷酸相同性的氨基酸序列的、具有人IL-12功能的多肽;以及

[0162] (3) (a) 多肽,其包括:包含GenBank登录号NP_002178.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列的多肽;由在GenBank登录号NP_002178.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列中有1至10个氨基酸的缺失、取代、插入和/或添加的氨基酸序列构成的多肽;或者包含与GenBank登录号NP_002178.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的整个氨基酸序列具有约85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或约100%的核苷酸相同性、或与GenBank登录号NP_002178.2所示的氨基酸序列具有更高的相同性的氨基酸序列的多肽;以及

[0163] (3) (b) 由GenBank登录号NP_000873.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列构成的、具有人IL-12功能的多肽。

[0164] 关于这一点,人IL-12的功能是指对T细胞或NK细胞的激活和/或分化作用。IL-12亚基p40和IL-12亚基 α 可以通过直接结合形成IL-12。此外,IL-12亚基p40和IL-12亚基 α 可以通过接头偶联。

[0165] 本发明中所用的人IL-12优选包含以下多肽的多肽:由GenBank登录号NP_002178.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列构成的多肽、和由GenBank登录号NP_000873.2(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列构成的多肽。

[0166] 如本文所用,“相同性”是指通过以默认参数使用NEEDLE程序(分子生物学杂志(Journal of Molecular Biology),1970,第48卷,第443-453页)进行研究而得的相同性(Identity)值。参数如下:

[0167] 缺口罚分=10

[0168] 延伸罚分=0.5

[0169] 矩阵=EBLOSUM62

[0170] 编码IL-7和IL-12的多核苷酸可以根据公开的序列信息,使用本领域已知的多核苷酸合成方法进行合成。此外,一旦获得了多核苷酸,就可以使用本领域技术人员已知的方法(如定点突变)在预定的位点引入突变,从而产生具有每个多肽功能的修饰形式(分子生物学编辑的最新方案(Current Protocols in Molecular Biology edition),1987,约翰威利父子公司(John Wiley&Sons)第8.1-8.5节)。

[0171] 各自编码IL-7和IL-12的多核苷酸可以通过已知的技术(如同源重组或定点诱变)引入到痘苗病毒中。例如,可以制备质粒(也称为转移载体质粒DNA)并将其引入感染了痘苗病毒的细胞中,其中所述多核苷酸被引入到核苷酸序列的欲引入的位点。引入各自编码IL-7和IL-12的多核苷酸即外源基因的区域,优选是对痘苗病毒的生命周期不重要的基因区域。例如,在某一方面,引入IL-7和/或IL-12的区域可以是VGF功能缺陷的痘苗病毒中的VGF

基因内的区域、O1L功能缺陷的痘苗病毒中的O1L基因内的区域、或VGF和O1L功能缺陷的痘苗病毒中的VGF和O1L基因中的一者或两者内的区域。上述情况下,可以引入外源基因,以使其转录的方向与VGF和O1L基因的转录方向相同或相反。

[0172] 用于将转移载体质粒DNA引入细胞的方法没有限制,但可以使用的的方法的示例包括磷酸钙法和电穿孔。

[0173] 在引入各自编码IL-7和IL-12的多核苷酸即外源基因时,合适的启动子可以操作性连接在外源基因的上游。这样,根据本发明的痘苗病毒、欲组合使用的痘苗病毒或用于组合试剂盒的痘苗病毒中的外源基因可以与可促进在肿瘤细胞中表达的启动子连接。这种启动子的示例包括PSFJ1-10、PSFJ2-16、p7.5K启动子、p11K启动子、T7.10启动子、CPX启动子、HF启动子、H6启动子和T7杂合启动子。

[0174] 用于本发明的痘苗病毒可以包括减毒和/或肿瘤选择性痘苗病毒。

[0175] 如本文所用,“减毒”是指对于正常细胞(如非肿瘤细胞)的低毒性(如低细胞溶解性)。

[0176] 如本文所用,“肿瘤选择性”是指对于肿瘤细胞的毒性(如溶瘤性)比对于正常细胞(如非肿瘤细胞)的毒性更高。

[0177] 本发明中可以使用经基因修饰以使其在特定蛋白质的功能上存在缺陷或抑制特定基因或蛋白质的表达的痘苗病毒(生物疗法专家意见(Expert Opinion on Biological Therapy),2011,第11卷,第595-608页)。

[0178] 例如,为了提高痘苗病毒的肿瘤选择性,可以执行以下操作:缺失胸苷激酶(TK)(癌症基因治疗(Cancer Gene Therapy),1999,第6卷,第409-422页);引入经修饰的TK基因、经修饰的血凝素(HA)基因、以及经修饰的F3基因或中断的F3基因座(国际公开第2005/047458号);缺失TK、HA和F14.5L的功能(癌症研究(Cancer Research),2007,第67卷,第10038-10046页);缺失TK和B18R的功能(PLoS药物(PLoS Medicine),2007,第4卷,第e353页);缺失TK和核糖核苷酸还原酶的功能(PLoS病原体(PLoS Pathogens),2010,第6卷,第e1000984页);缺失SPI-1和SPI-2的功能(癌症研究(Cancer Research),2005,第65卷,第9991-9998页);缺失SPI-1、SPI-2和TK的功能(基因治疗(Gene Therapy),2007,第14卷,第638-647页)或在E3L和K3L区域引入突变(国际公开第2005/007824号)。此外,可以缺失A34R区域(分子疗法(Molecular Therapy),2013年,第21卷,第1024-1033页),以期通过活体中的抗痘苗病毒抗体的中和作用来减弱对病毒的清除。此外,可以使白细胞介素-1b(IL-1b)受体缺失(国际公开第2005/030971号),以期通过痘苗病毒来激活免疫细胞。

[0179] 上述外源基因的插入或基因的缺失或突变可以通过公知的同源重组方法或定点诱变来实现。本发明的痘苗病毒可以具有上述基因修饰的组合。

[0180] 如本文所用,术语“缺乏”是指该术语所指定的基因区域不起作用,或者该术语所指定的基因区域已缺失。例如,关于“缺乏”,缺失可能发生在在一个特定的基因区域或一个特定基因区域周围的基因区域。

[0181] 合适的本发明的溶瘤痘苗病毒可以在编码B5R的基因中包含缺失。

[0182] B5R是痘苗病毒的1型膜蛋白。当病毒在细胞内增殖并扩散到附近的细胞或宿主的其他部位时,B5R会提高其效率。B5R包括具有GenBank登录号NP_AAA48316.1(其全部内容通过引用纳入本文)所示的氨基酸序列的B5R。B5R从N末端侧到C末端侧依次具有一个信号肽、

一个被称为四个SCR结构域(SCR结构域1-4)的区域、一个被称为茎的区域、一个跨膜结构域和一个胞质尾。

[0183] 更具体而言,在B5R中,信号肽是对应于GenBank登录号NP_AAA48316.1所示的氨基酸序列的第1个氨基酸至第19个氨基酸的B5R区域;SCR结构域1-4是对应于GenBank登录号NP_AAA48316.1所示的氨基酸序列的第20个氨基酸至第237个氨基酸的B5R区域;茎是对应于GenBank登录号NP_AAA48316.1所示的氨基酸序列的第238个氨基酸至第275个氨基酸的B5R区域;跨膜结构域是对应于GenBank登录号NP_AAA48316.1所示的氨基酸序列的第276个氨基酸至第303个氨基酸的B5R区域;胞质尾是对应于GenBank登录号NP_AAA48316.1所示的氨基酸序列的第304个氨基酸至第317个氨基酸的B5R区域(Journal of Virology,2005,第79卷,第6260-6271页)。

[0184] 如本文所用,术语“对应”不限于具有与该术语所指定的氨基酸序列完全精确匹配的氨基酸序列的概念,而是包括由于分析蛋白质功能的方法、痘苗病毒株的差异等原因而具有与该术语所指定的氨基酸序列不同的氨基酸序列(如氨基酸的缺失、取代、插入和/或添加)的概念。本领域技术人员可以根据上述的氨基酸序列,鉴别那些不同的痘苗病毒株中的B5R的基因和B5R的每个区域。当B5R在外膜上表达时,信号肽已经被去除,SCR结构域1-4和茎已经暴露在EEV的外膜上(病毒学杂志(Journal of Virology),1998,第72卷,第294-302页)。如本文所用,由SCR结构域1-4和茎构成的区域有时称为“胞外区”。

[0185] 如上所述,合适的本发明的溶瘤痘苗病毒可以在编码B5R的基因中包含缺失。在一个实施方式中,合适的本发明的溶瘤痘苗病毒包含编码SCR结构域缺失的B5R的基因。

[0186] 如本文所用,术语“编码SCR结构域缺失的B5R的基因”是指编码SCR结构域1-4完全或部分缺失且由此缺乏其功能的B5R的基因。

[0187] 用于确定痘苗病毒中的B5R的功能是否已被去除的合适方法包括:确认与SCR结构域未缺失的痘苗病毒相比,避免靶向B5R的中和抗体的中和的能力是否提高的方法。

[0188] 在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有除缺失区域外的B5R胞外区。

[0189] 在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有除缺失区域外的B5R胞外区和跨膜结构域。

[0190] 在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有除缺失区域外的B5R胞外区、跨膜结构域和胞质尾。

[0191] 在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有茎。在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有茎和跨膜结构域。

[0192] 在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0193] 在一个实施方式中,本发明的痘苗病毒可以有B5R,当它以EEV的形式存在时,其在病毒表面上完全或部分缺失带有SCR结构域1-4的胞外区。

[0194] 在一个实施方式中,本发明的痘苗病毒中的术语“SCR结构域缺失的B5R”是缺失四个SCR结构域(SCR结构域1-4)的B5R。

[0195] 如本文所用,在四个SCR结构域的上下文中描述的术语“缺失SCR结构域1-4”或与其类似的任何表述,并不限于完全精确地缺失由SCR结构域1-4构成的区域,而是包括上述区域末端的一个、两个或三个氨基酸留在B5R中的概念。本发明的痘苗病毒中的SCR结构域1-4的缺失包括B5R区域的缺失,该B5R区域对应于GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸

序列的氨基酸残基22-237。GenBank登录号AAA48316.1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0196] 在一个实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R包含B5R的胞外区。

[0197] 在一个实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R包含B5R的胞外区和跨膜结构域。

[0198] 在一个实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R包含B5R的胞外区、跨膜结构域和胞质尾。

[0199] 在一个实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R包含茎。

[0200] 在一个实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R包含茎和跨膜结构域。

[0201] 在一个实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R包含茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0202] 在一个实施方式中,本发明的痘苗病毒可以有B5R,当它以EEV的形式存在时,其在病毒表面上完全或部分缺失带有SCR结构域1-4的胞外区。

[0203] 在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R包含B5R区域,该B5R区域对应于GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸序列的氨基酸残基238-275 (SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-59)。

[0204] 在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R包含B5R区域,该B5R区域对应于GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸序列的氨基酸残基238-303 (SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-87)。

[0205] 在一个实施方式中,SCR结构域缺失的B5R包含B5R区域,该B5R区域对应于GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸序列的氨基酸残基238-317 (SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-101)。

[0206] 在一个实施方式中,本发明的痘苗病毒中编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码B5R的信号肽。

[0207] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码包含B5R的信号肽和B5R的胞外区的多肽。

[0208] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码包含B5R的信号肽、B5R的胞外区和跨膜结构域的多肽。

[0209] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码包含B5R的信号肽、B5R的胞外区、跨膜结构域和胞质尾的多肽。

[0210] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码包含B5R的信号肽和茎的多肽。

[0211] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码包含B5R的信号肽、茎和跨膜结构域的多肽。

[0212] 在一个实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R编码基本上包含B5R的信号肽、B5R的胞外区、跨膜结构域和胞质尾的多肽。

[0213] 在一个实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R编码基本上包含B5R的信号肽、茎、跨膜结构域和胞质尾的多肽。

[0214] 如本文所用,术语“基本上包含”是指该术语包含该术语所指定的元件,并且如果包含其他元件,则这些元件既不阻碍本发明所公开的所列元素的活性或作用,也无助于这种活性或作用。举例来说,有一个至数个氨基酸添加或缺失的形式是术语“基本上包含”所指定的形式之一。

[0215] B5R的信号肽的示例包括B5R的如下区域,该B5R区域对应于GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸序列的氨基酸残基1-19 (SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基1-19)。

[0216] B5R的茎的示例包括B5R的如下区域,该B5R区域对应于GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸序列的氨基酸残基238-275 (SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-59)。

[0217] B5R的跨膜结构域的示例包括B5R的如下区域,该B5R区域对应于GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸序列的氨基酸残基276-303 (SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基60-87)。

[0218] B5R的胞质尾的示例包括B5R的如下区域,该B5R区域对应于GenBank登录号AAA48316.1所示的氨基酸序列的氨基酸残基304-317 (SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基88-101)。

[0219] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码B5R的信号肽,其对应于SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基1-19。

[0220] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码B5R的信号肽,其具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基1-19的氨基酸序列。

[0221] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码包含B5R的信号肽和B5R的茎的多肽,其中,B5R的信号肽对应于SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基1-19,B5R的茎对应于SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-59。

[0222] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码包含B5R的信号肽和B5R的茎的多肽,其中,B5R的信号肽具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基1-19的氨基酸序列,B5R的茎具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-59的氨基酸序列。

[0223] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码包含B5R的信号肽、B5R的茎和B5R的跨膜结构域的多肽,其中,B5R的信号肽对应于SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基1-19的氨基酸序列,B5R的茎对应于SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-59的氨基酸序列,B5R的跨膜结构域对应于SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基60-87的氨基酸序列。

[0224] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码包含B5R的信号肽、B5R的茎和B5R的跨膜结构域的多肽,其中,B5R的信号肽具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基1-19的氨基酸序列,B5R的茎具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-59的氨基酸序列,B5R的跨膜结构域具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸残基60-87的氨基酸序列。

[0225] 在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码具有B5R的氨基酸序列的多肽,其对应于SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。在一个实施方式中,编码SCR结构域缺失的B5R的基因编码具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的多肽。

[0226] 可以使用公知的方法来确定本发明的痘苗病毒是否编码完全或部分缺失SCR结构域1-4的B5R。举例来说,可以通过免疫化学方法来确认SCR结构域1-4的存在,该方法使用与在痘苗病毒表面上表达的B5R的SCR结构域1-4结合的抗体,或者使用聚合酶链式反应(PCR)

确定编码SCR结构域1-4的区域的的存在或大小。

[0227] 可以使用合适的本发明的溶瘤痘苗病毒,其在O1L的功能上可能存在缺陷(病毒学杂志(Journal of Virology),2012,第86卷,第2323-2336页)。

[0228] 此外,为了减少活体中的抗痘苗病毒抗体的中和作用对病毒的清除,可以使用在B5R胞外区存在缺陷的痘苗病毒(病毒学(Virology),2004,第325卷,第425-431页)或在A34R区存在缺陷的痘苗病毒(分子疗法(Molecular Therapy),2013,第21卷,第1024-1033页)。

[0229] 此外,为了通过痘苗病毒来激活免疫细胞,可以使用PCT公开号W02005/030971(其全部内容通过引用纳入本文)中描述的在白细胞介素-1(IL-1)受体中存在缺陷的痘苗病毒。这种外源基因的插入或基因的缺失或突变例如可以通过已知的同源重组或定点诱变来实现。

[0230] 此外,本发明中可以使用具有这种基因修饰组合的痘苗病毒。

[0231] 如本文所用,“存在缺陷”是指该术语所指定的基因区没有功能,并且使用该术语的含义包括该术语所指定的基因区的缺失。例如,“存在缺陷”可能是由特定基因区组成的区域中的缺失或由包含特定基因区的邻近基因区中的缺失造成的。

[0232] 在一个实施方式中,用于本发明的痘苗病毒在VGF的功能上存在缺陷。

[0233] 在一个实施方式中,用于本发明的痘苗病毒在O1L的功能上存在缺陷。

[0234] 在一个实施方式中,用于本发明的痘苗病毒在VGF和O1L的功能上存在缺陷。

[0235] 可以根据PCT公开号W0 2015/076422(其全部内容通过引用纳入本文)中描述的方法,在痘苗病毒中产生VGF和/或O1L的功能缺陷。

[0236] VGF是一种与表皮生长因子(EGF)具有高度氨基酸序列同源性的蛋白质,像EGF一样与表皮生长因子受体结合,并激活来自Ras、Raf、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶(ERK)激酶(MAPK/ERK激酶,MEK),并跟随ERK促进细胞分裂。

[0237] O1L维持ERK的活化,与VGF一起有助于细胞分裂。

[0238] “痘苗病毒的VGF和/或O1L的功能缺陷”是指编码VGF的基因和/或编码O1L的基因表达丧失,或有表达时VGF和/或O1L的正常功能丧失。痘苗病毒的VGF和/或O1L的功能缺陷可能是由编码VGF的基因和/或编码O1L的基因的全部或部分缺失引起的。此外,这些基因可以通过核苷酸取代、缺失、插入或添加而发生突变,以阻止正常VGF和/或O1L的表达。此外,外源基因可以插入编码VGF的基因和/或编码O1L的基因中。在本发明中,当正常基因产物由于基因的取代、缺失、插入或添加等突变而不表达时,被称为缺乏该基因。

[0239] 在一个实施方式中,本发明中所用的痘苗病毒是缺乏VGF和O1L功能的LC16m0痘苗病毒株。

[0240] 如本文所用,当基因的正常产物由于基因的取代、缺失、插入或添加等突变而不表达时,该基因是“缺陷”的。

[0241] 根据本发明的痘苗病毒是否在VGF和/或O1L的功能上存在缺陷可以用已知的方法来确定,例如,通过评价VGF和/或O1L的功能,用使用抗VGF抗体或抗O1L抗体的免疫化学技术测试VGF或O1L的存在,或用聚合酶链式反应(PCR)确定编码VGF的基因或编码O1L的基因的存在。

[0242] 上述外源基因的插入或基因的缺失或突变可以通过公知的同源重组方法或定点

诱变来实现。在本发明中,可以使用具有上述基因修饰的组的痘苗病毒。

[0243] 在本发明的某些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还包含编码缺乏VGF和O1L功能且缺失SCR结构域的B5R的基因。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R可以具有茎。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R可以具有茎和跨膜结构域。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R可以具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0244] 在本发明的另一些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还包含编码缺乏VGF和O1L功能且缺失SCR结构域1-4的B5R的基因。在该实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R可以具有茎。在该实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R可以具有茎和跨膜结构域。在该实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R可以具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0245] 在本发明的另一些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还包含编码如下B5R的基因,该B5R中对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的区域缺失。在该实施方式中,上述区域缺失的B5R可以具有茎。在该实施方式中,上述区域缺失的B5R可以具有茎和跨膜结构域。在该实施方式中,上述区域缺失的B5R可以具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0246] 在本发明的一些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还缺乏VGF和O1L的功能,缺失B5R的SCR结构域,并且编码包含B5R的信号肽、茎、跨膜结构域和胞质尾的多肽。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0247] 在本发明的另一些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还缺乏VGF和O1L的功能,其中缺失SCR结构域的B5R具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相对应的B5R氨基酸序列。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0248] 在本发明的另一些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还包含编码缺乏VGF和O1L功能且缺失SCR结构域的B5R的基因。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R可以具有茎。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R可以具有茎和跨膜结构域。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R可以具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0249] 在本发明的一些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还包含编码缺乏VGF和O1L功能且缺失SCR结构域1-4的B5R的基因。在该实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R可以具有茎。在该实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R可以具有茎和跨膜结构域。在该实施方式中,缺失SCR结构域1-4的B5R可以具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0250] 在本发明的另一些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还包含编码如下B5R的基因,该B5R中对应于SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的区域缺失。在该实施方式中,上述区域缺失的B5R可以具有茎。在该实施方式中,上述区域缺失的B5R可以具有茎和跨膜结构域。在该实施方式中,上述区域缺失的B5R可以具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0251] 在本发明的另一些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还缺乏VGF和O1L的功能,缺失B5R的SCR结构域,并且具有编码包含B5R的信号肽、茎、跨膜结构域和胞质尾的多肽的基因。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0252] 在本发明的另一些实施方式中,本发明的溶瘤痘苗病毒除了包含编码IL-7的多核苷酸和编码IL-12的多核苷酸外,还缺乏VGF和O1L的功能,其中缺失SCR结构域的B5R具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相对应的B5R氨基酸序列。在该实施方式中,SCR结构域缺失的B5R具有茎、跨膜结构域和胞质尾。

[0253] 本发明的溶瘤痘苗病毒可以呈细胞内成熟病毒(IMV)形式或细胞外包膜病毒(EEV)形式。IMV占感染性原病毒的很大一部分,并在被感染细胞的细胞质中停留,直到被感染的细胞溶解。当细胞感染了IMV形式时,被感染的细胞中可以产生EEV形式。EEV形式适用于远离活体感染部位的远程感染细胞,其形式是用来源于宿主细胞的外膜包覆IMV(PNAS, 1998,第95卷,第7544-7549页)。EEV可以从产生痘苗病毒的载体或被痘苗病毒感染的细胞的培养基的上清液中获得。IMV和EEV的混合物可以从产生痘苗病毒的载体或含有被痘苗病毒感染的细胞的培养基的上清液的细胞裂解物中获得。细胞裂解物可以通过常规方法获得(例如,通过使用超声波解体法或渗透压冲击法破坏细胞)。IMV形式是痘苗病毒的主要给药形式之一。

[0254] 在一个实施方式中,本发明的痘苗病毒可以表达SCR缺失B5R的胞外区;但是,病毒不需要在任何时候都采取EVV形式,也就是说,能够在被感染的细胞中产生EEV形式时,病毒只要能表达SCR缺失B5R的胞外区就足够了。

[0255] 本发明的痘苗病毒可以称为远程感染血浆增强型重组痘苗病毒,因为它可以产生具有比具有编码保留着SCR的野生型B5R的基因的痘苗病毒更高的避免免疫的能力的EEV。

[0256] 本发明中所用的痘苗病毒具有溶瘤活性。评价测试病毒是否具有溶瘤活性的方法的示例包括评价加入病毒后癌细胞存活率的降低的方法。

[0257] 用于评价的癌细胞的示例包括恶性黑色素瘤细胞RPMI-7951(如ATCCHTB-66)、肺腺癌HCC4006(如ATCC CRL-2871)、肺癌A549(如ATCCCL-185)、小细胞肺癌细胞DMS 53(如ATCC CRL-2062)、肺鳞状细胞癌NCI-H226(如ATCC CRL-5826)、肾癌细胞Caki-1(如ATCC HTB-46)、膀胱癌细胞647-V(如DSMZ ACC 414)、头颈癌细胞Detroit 562(如ATCCCL-138)、乳腺癌细胞JIMT-1(如DSMZ ACC 589)、乳腺癌细胞MDA-MB-231(如ATCC HTB-26)、食道癌细胞OE33(如ECACC 96070808)、胶质母细胞瘤U-87MG(如ECACC 89081402)、神经母细胞瘤GOTO(如JCRB JCRB0612)、骨髓瘤RPMI 8226(如ATCC CCL-155)、卵巢癌细胞SK-OV-3(如ATCC HTB-77)、卵巢癌细胞OVMANA(如JCRB JCRB1045)、结肠癌细胞RKO(如ATCC CRL-2577)、结直肠癌HCT 116(如ATCCCL-247)、胰腺癌细胞BxPC-3(如ATCC CRL-1687)、前列腺癌细胞LNCaP克隆FGC(如ATCC CRL-1740)、肝细胞癌JHH-4(如JCRB JCRB0435)、间皮瘤NCI-H28(如ATCC CRL-5820)、宫颈癌细胞SiHa(如ATCC HTB-35)和胃癌细胞Kato III(如RIKEN BRC RCB2088)。

[0258] 在一个实施方式中,本发明中所用的合适的痘苗病毒不包含药物选择标志物基因。

[0259] 本发明中所用的合适的痘苗病毒可以通过用痘苗病毒感染宿主细胞并培养被感

染的宿主细胞来表达和/或增殖。痘苗表达可以通过本领域已知的方法来表达和/或增殖。用于表达或增殖根据本发明的痘苗病毒的宿主细胞无特别限制,只要根据本发明的痘苗病毒能够被表达和增殖即可。这种宿主细胞的示例包括动物细胞,如BS-C-1、A549、RK13、HTK-143、Hep-2、MDCK、Vero、HeLa、CV-1、COS、BHK-21和原代兔肾细胞。可以优选使用BS-C-1(ATCC CCL-26)、A549(ATCC CCL-185)、CV-1(ATCC CCL-70)或RK13(ATCC CCL-37)。宿主细胞的培养条件(例如温度、培养基的pH和培养时间)可酌情选择。

[0260] 产生根据本发明的痘苗病毒的方法可包括以下步骤:用根据本发明的痘苗病毒感染宿主细胞;培养被感染的宿主细胞;和表达根据本发明的痘苗病毒;以及任选地收集和/或纯化痘苗病毒。可用于纯化的方法包括用全能核酸酶(Benzonase)消化DNA,蔗糖梯度离心,碘克沙醇密度梯度离心,超滤和渗滤。

[0261] IV. 本发明的药物组合物的使用方法

[0262] 本发明的药物组合物可用于患有癌症(如实体肿瘤)的对象的治疗和预防。

[0263] 如本文所用,术语“治疗”是指有益的或期望的结果,包括但不限于减缓、减轻、改善、治愈或控制与癌症有关的一种或多种症状的进展。“治疗”也可以指与不治疗时的预期生存期相比延长生存期。

[0264] “治疗”涵盖预防(例如对有患癌风险的对象采取的预防措施)。例如,如果在给予本文所述的药物组合物后,对象的临床状况出现了可观察到的改善,则该对象就得到了癌症治疗。

[0265] 本发明的方法包括给予患有癌症的对象治疗有效量的本文所述的药物组合物。

[0266] 该药物组合物可以通过本领域已知的任何适当方式给药,例如静脉内、腹腔内或肿瘤内给药。在某些实施方式中,所述组合物通过静脉内输注或注射来给药。在另一些实施方式中,所述组合物通过静脉内注射来给药。

[0267] 如本文所用,“治疗有效量”是指足以产生一种或多种有益结果的溶瘤痘苗病毒的量。这种治疗有效量可因各种参数而变化,特别是给药模式;疾病状态;对象的年龄和体重;对象对治疗的反应能力;并用治疗的种类;治疗的频率;和/或预防或治疗的需要。考虑到预防性用途时,本发明的药物组合物以足够的剂量给药,以防止或推迟癌症的发病和/或建立和/或复发,特别是在有风险的对象中。对于“治疗性”用途,本发明的药物组合物给予被诊断为患有癌症的对象,以治疗癌症。特别是,治疗有效量可以是使临床状态与基线状态相比或与不治疗时的预期状态相比有可观察到的改善的必要量,例如,减少肿瘤数量;减小肿瘤大小,减少转移的数量或范围,增加缓解的时间,疾病状态的稳定(即不恶化),推迟或减缓疾病进展或严重程度,改善或缓解疾病状态,延长生存期,对标准治疗的更好反应,改善生活质量,降低死亡率等。

[0268] 治疗有效量也可以是引起有效的非特异性(先天性)和/或特异性抗肿瘤免疫反应发展的必要量。通常,免疫反应、特别是T细胞反应的发展,可以在体外在从对象收集的生物样品中进行评价。例如,可以用实验室中常规使用的技术(如流式细胞仪、组织学)进行肿瘤监测。人们还可以使用各种可用的抗体,以便鉴别参与抗肿瘤反应的不同免疫细胞群,这些细胞群存在于所治疗的对象中,例如细胞毒性T细胞、活化的细胞毒性T细胞、自然杀伤细胞和活化的自然杀伤细胞。临床状态的改善可以容易地通过医生或其他熟练的医护人员通常使用的任何相关临床测量来评估。

[0269] 在一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象(例如肿瘤内给予对象)治疗有效量的药物组合物以治疗对象,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失。

[0270] 在另一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象(例如肿瘤内给予对象)治疗有效量的药物组合物以治疗对象,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5。

[0271] 在本发明的某些实施方式中,给予对象药物组合物带来选自下组的至少一种效果:抑制肿瘤生长、肿瘤消退、减小肿瘤体积、减少肿瘤细胞数量、延迟肿瘤生长、远位效应、抑制肿瘤转移、随时间推移减少转移灶、减少化疗剂或细胞毒剂的使用、减少肿瘤负担、增加无进展生存期、增加总生存期、完全缓解、部分缓解、抗肿瘤免疫力和稳定疾病。

[0272] 在某些实施方式中,给予对象本发明的药物组合物可诱导远位效应。

[0273] 如本文所用,术语“远位效应”是指局部给药(例如肿瘤内给药)至肿瘤的本发明的药物组合物在使给予了该组合物的肿瘤缩小的同时也使未治疗的肿瘤缩小的能力。

[0274] 因此,在一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象(例如肿瘤内给予对象)治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失;其中,给予对象药物组合物可诱导远位效应,从而治疗对象。

[0275] 在另一个方面,本发明提供在患有癌症的对象中诱导远位效应的方法。该方法包括给予对象(例如肿瘤内给予对象)治疗有效量的药物组合物以在患有癌症的对象中诱导远位效应,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒和药学上可接受的运载体;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如hIL12/IL7病毒。

[0276] 在一个方面,本发明提供患有癌症的对象的的治疗方法。该方法包括给予对象(例如肿瘤内给予对象)治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如hIL12/IL7病毒;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5;其中,给予对象药物组合物可诱导远位效应,从而治疗

对象。

[0277] 在另一个方面,本发明提供在患有癌症的对象中诱导远位效应的方法。该方法包括给予对象(例如肿瘤内给予对象)治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 颗粒形成单位(pfu)/ml的溶瘤痘苗病毒、浓度约10mmol/L~约50mmol/L的氨丁三醇、以及浓度约5%w/v~约15%w/v的蔗糖;其中,溶瘤痘苗病毒在其基因组中包含编码人白细胞介素-7的多核苷酸和编码人白细胞介素-12的多核苷酸,缺乏功能性病毒生长因子(VGF)蛋白和功能性O1L蛋白,并且在B5R膜蛋白胞外区内的SCR结构域中具有缺失,如hIL12/IL7病毒;其中,组合物的pH为约5.0~约8.5;其中,给予对象药物组合物可诱导远位效应,从而在对象中诱导远位效应。

[0278] 远位效应可能发生在靠近已经肿瘤内给予了药物组合物的癌症(例如肿瘤,如原发性实体肿瘤)的转移性肿瘤中,或发生在远离已经肿瘤内给予了药物组合物的癌症(例如肿瘤,如原发性实体肿瘤)的转移性肿瘤中。

[0279] 本发明还提供一种抑制体内肿瘤细胞生长的方法,该方法包括给予(例如肿瘤内给予)患有癌症的对象治疗有效量的本发明的药物组合物。此外,本发明还提供一种增强患有癌症的对象对癌细胞的免疫反应的方法,该方法包括给予(例如肿瘤内给予)患有癌症的对象治疗有效量的本发明的药物组合物。

[0280] 在一个实施方式中,给予本发明的药物组合物诱发、刺激和/或重新调整免疫反应。特别是,该给予在接受治疗的宿主中诱导保护性T或B细胞反应,例如,针对溶瘤病毒。保护性T细胞反应可以由CD4+或CD8+细胞介导,或由CD4+和CD8+细胞两者介导。B细胞反应可以用ELISA测量,T细胞反应可以用传统的ELISpot、ICS试验由从对象收集的任何样品(如血液、器官、肿瘤等)进行评价。

[0281] 给予对象(例如肿瘤内给予对象)的药物组合物的剂量可以为约 1×10^6 ~约 1×10^{10} 、约 1×10^7 ~约 1×10^9 、约 1×10^7 、 5×10^7 、约 1×10^8 、约 5×10^8 、约 1×10^8 、或约 5×10^8 pfu。意图将介于上述范围和数值之间的范围和数值也作为本发明的一部分。此外,还意图包括使用上述的任意值的组合作为上限和/或下限的数值范围。

[0282] 包含例如约 5.0×10^8 pfu/ml的溶瘤痘苗病毒、适合于给予(如肿瘤内给予)对象的一剂本发明的药物组合物的体积可以为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、或约6.0ml。意图将介于上述范围和数值之间的范围和数值也作为本发明的一部分。此外,还意图包括使用上述的任意值的组合作为上限和/或下限的数值范围。

[0283] 在某些实施方式中,(例如肿瘤内)给予对象的药物组合物的剂量使得注射比例(药物组合物体积/肿瘤体积)达到约0.2~约0.8,例如约0.2~约0.6、约0.4~约0.8、约0.4~约0.6、或约0.6~约0.8。

[0284] 本发明的药物组合物可以每周一次、每两周一次、每三周一次、或每四周一次给予对象。在一个实施方式中,本发明的药物组合物每两周一次给予对象。

[0285] 本发明的药物组合物可以给予对象一次或多次。

[0286] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物按照给药方案给予对象。例如,在一个实

施方式中,合适的给药方案可以包括在第1天给予对象第一剂药物组合物,并在第15天给予对象第二剂药物组合物。给药方案可以一次性或反复地给予对象。例如,在一个实施方式中,包括在第1天给予对象第一剂药物组合物、并在第15天给予对象第二剂药物组合物的本发明的给药方案在给予第一剂药物组合物后第28天重新开始。

[0287] 将从本发明的药物组合物的治疗中受益的对象(如人类对象)包括患有癌症的对象。癌症可以是原发性肿瘤,例如实体肿瘤、如晚期实体肿瘤,或转移性肿瘤。

[0288] 癌症可以是恶性黑色素瘤、肺腺癌、肺癌、小细胞肺癌、肺鳞癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、乳腺癌、食道癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、骨髓瘤、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肝细胞癌、间皮瘤、宫颈癌或胃癌。

[0289] 在一些实施方式中,癌症是皮肤、皮下、粘膜或粘膜下的肿瘤。

[0290] 在另一些实施方式中,癌症是皮肤、皮下、粘膜或粘膜下位置以外的位置的原发性或转移性实体肿瘤。

[0291] 在又一些实施方式中,癌症是头颈部鳞状细胞癌、皮肤科癌症、鼻咽癌、肉瘤或泌尿生殖系统/妇科肿瘤。

[0292] 在一个实施方式中,癌症是肝脏的原发性或转移性肿瘤。在另一个实施方式中,癌症可以是原发性或转移性胃部肿瘤。

[0293] 将从本发明的方法中受益的合适对象(如人类对象)可以是成年对象,例如约18岁或以上的对象;青少年对象,例如约10至18岁的对象;或儿童对象,例如18岁以下的对象。

[0294] 本发明的方法可以单独实施或者与其他治疗剂或疗法(如手术、放疗、化疗、免疫疗法、激素疗法)联用。

[0295] 其他治疗剂或疗法可以在给予本发明的药物组合物之前、之后或同时给予对象。

[0296] 其他治疗剂可以存在于与包含本发明的溶瘤痘苗病毒的药物组合物相同的药物组合物中,或者其他治疗剂可以存在于与包含本发明的溶瘤痘苗病毒的药物组合物分开的药物组合物中。

[0297] 在一些实施方案中,其他治疗剂是烷基化剂,如丝裂霉素C、环磷酰胺、白消安、异环磷酰胺、异索法胺(isosfamide)、美法仑、六甲蜜胺、噻替派、苯丁酸氮芥、或达卡巴嗪。

[0298] 在一些实施方式中,其他治疗剂是抗代谢剂,如吉西他滨、卡培他滨、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、2-氟脱氧胞苷、甲氨蝶呤、依达曲沙(idatrexate)、拓优得(tomodex)或三甲曲沙。

[0299] 在一些实施方式中,其他治疗剂是拓扑异构酶II抑制剂,如多柔比星、表柔比星、依托泊苷、替尼泊苷或米托蒽醌。

[0300] 在一些实施方式中,其他治疗剂是拓扑异构酶I抑制剂,如伊立替康(CPT-11)、7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38)或拓扑替康。

[0301] 在一些实施方式中,其他治疗剂是抗有丝分裂药物,如紫杉醇、多西他赛、长春碱、长春新碱或长春瑞滨。

[0302] 在一些实施方式中,其他治疗剂是铂衍生物,如顺铂、奥沙利铂、螺铂或卡铂。

[0303] 在一些实施方式中,其他治疗剂是酪氨酸激酶受体的抑制剂,如舒尼替尼(辉瑞)和索拉非尼(拜尔)。

[0304] 在一些实施方式中,其他治疗剂是抗肿瘤抗体,特别是影响细胞表面受体调节的

抗体,如曲妥珠单抗(trastuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、帕尼单抗(panitumumab)、扎卢木单抗(zalutumumab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、马妥珠单抗(matuzumab)、贝伐单抗(bevacizumab)和雷珠单抗(ranibizumab)。

[0305] 在一些实施方式中,其他治疗剂是EGFR(代表表皮生长因子受体)抑制剂,如吉非替尼(gefitinib)、埃罗替尼(erlotinib)和拉帕替尼(lapatinib)。

[0306] 在一些实施方式中,其他治疗剂是免疫调节剂,如 α 、 β 或 γ 干扰素、白细胞介素(特别是IL-2、IL-6、IL-10或IL-12)或肿瘤坏死因子。

[0307] 在一个实施方式中,所述方法可以包括给予其他治疗剂,如癌症疫苗、检查点抑制剂、淋巴细胞活化基因3(LAG3)抑制剂、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)抑制剂、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3(TIM3)抑制剂、B-和T-淋巴细胞衰减剂(BTLA)抑制剂、带有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)抑制剂、CD47抑制剂、吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂、双特异性抗CD3/抗CD20抗体、血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂、血管生成素-2(Ang2)抑制剂、转化生长因子 β (TGF β)抑制剂、CD38抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、环磷酰胺、针对肿瘤特异性抗原的抗体、卡介苗、细胞毒素、白细胞介素-6受体(IL-6R)抑制剂、白细胞介素-4受体(IL-4R)抑制剂、IL-10抑制剂、IL-2、IL-7、IL-21、IL-15、抗体-药物偶联物、抗炎药物和/或膳食补充剂。

[0308] 在某些实施方式中,其他治疗剂是检查点抑制剂。因此,本发明的方法还包括给予对象治疗有效量的检查点抑制剂。

[0309] 如本文所用,术语“检查点抑制剂”或“免疫检查点抑制剂”是指能够抑制检查点蛋白功能、如抗原呈递细胞(APC)或癌细胞与T效应细胞之间的相互作用的分子。术语“免疫检查点”是指直接或间接参与免疫途径的蛋白质,在正常的生理条件下,它对于防止不受控制的免疫反应而言至关重要,并且因此,对于维持自我耐受和/或组织保护而言至关重要。

[0310] 合适的检查点抑制剂包括程序性细胞死亡1(PD-1)抑制剂、程序性细胞死亡配体1(PD-L1)抑制剂、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)抑制剂、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3(TIM-3)抑制剂、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)抑制剂、带有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)抑制剂、B-和T-淋巴细胞相关(BTLA)抑制剂、或含有V型免疫球蛋白结构域的T细胞活化抑制因子(VISTA)抑制剂。免疫检查点抑制剂可以与免疫检查点分子或其配体结合,例如以此抑制免疫抑制信号,从而抑制免疫检查点功能。举例来说,其可以抑制PD-1与PD-L1或PD-L2之间的结合,从而抑制PD-1信号。或者,其可以抑制CTLA-4与CD80或CD86之间的结合,从而抑制CTLA-4信号(Matthieu Collin,对治疗性专利的专家意见(Expert Opinion on Therapeutic Patents),2016,第26卷,第555-564页)。

[0311] PD-1是被称为程序性细胞死亡1的蛋白质,也称为PDCD-1或CD279。PD-1是一种免疫球蛋白超家族的膜蛋白,通过结合PD-L1或PD-L2起到抑制T细胞活化的作用,并被认为是有助于预防自身免疫性疾病。癌细胞在其表面表达PD-L1,以负性控制T细胞,从而避免T细胞的攻击。PD-1包括人PD-1(例如具有Genbank登录号NP_005009.1所登记的氨基酸序列的PD-1)。PD-1包括具有与登录号NP_005009.1所登记的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的PD-1。如本文所用,术语“对应于……的氨基酸序列”用于包括功能性PD-1,其中同源物和天然存在的氨基酸序列不完全相同。

[0312] PD-L1是PD-1的配体,也称为B7-H1或CD274。PD-L1包括人PD-L1(例如具有Genbank登录号NP_054862.1所登记的氨基酸序列的PD-L1)。PD-1包括具有与登录号NP_054862.1所登记的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的PD-1。

[0313] PD-L2是PD-1的配体,也称为B7-DC或CD273。PD-L2包括人PD-L2(例如具有Genbank登录号AAI13681.1所登记的氨基酸序列的PD-L2)。PD-2包括具有与Genbank登录号AAI13681.1所登记的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的PD-2。

[0314] CTLA-4是一种免疫球蛋白超家族的膜蛋白,在活化的T细胞中表达。CTLA-4与CD28相似,与抗原呈递细胞上的CD80和CD86结合。已知CTLA-4向T细胞发送抑制信号,而CD28向T细胞发送共刺激信号。CTLA-4包括人CTLA-4(例如具有Genbank登录号AAH74893.1所登记的氨基酸序列的CTLA-4)。CTLA-4包括具有与Genbank登录号AAH74893.1所登记的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的CTLA-4。

[0315] CD80和CD86是免疫球蛋白超家族的膜蛋白,在各种造血细胞中表达,并与T细胞表面的CD28和CTLA-4相互作用,如上所述。CD80包括人CD80(例如具有Genbank登录号NP_005182.1所登记的氨基酸序列的CD80)。CD80包括具有与Genbank登录号NP_005182.1所登记的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的CD80。CD86包括人CD86(例如具有Genbank登录号NP_787058.4所登记的氨基酸序列的CD86)。CD86包括具有与Genbank登录号NP_787058.4所登记的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的CD86。

[0316] 在本发明的某些实施方式中,合适的免疫检查点抑制剂是阻断通过PD-1发送信号的检查点抑制剂或阻断通过CTLA-4发送信号的检查点抑制剂。免疫检查点抑制剂可以是能够中和PD-1与PD-L1或PD-L2之间结合的抗体,以及能够中和CTLA-4与CD80或CD86之间结合的抗体。能够中和PD-1与PD-L1之间结合的抗体包括能够中和PD-1与PD-L1之间结合的抗PD-1抗体以及能够中和PD-1与PD-L1之间结合的抗PD-L1抗体。能够中和PD-1与PD-L2之间结合的抗体包括能够中和PD-1与PD-L2之间结合的抗PD-1和抗PD-L2抗体。能够中和CTLA-4与CD80或CD86之间结合的抗体包括能够中和CTLA-4与CD80或CD86之间结合的抗CTLA-4抗体。

[0317] 能够中和两种蛋白质结合的抗体可以通过以下方式获得:首先找到能够与这两种蛋白质中的任何一种结合的抗体,然后根据中和这两种蛋白质结合的能力将获得的抗体进行分选。

[0318] 举例来说,能够中和PD-1与PD-L1之间结合的抗体可以通过以下方式获得:找到能够与PD-1或PD-L1结合的抗体,然后根据中和PD-1与PD-L1之间结合的能力将获得的抗体进行分选。此外,例如,能够中和PD-1与PD-L2之间结合的抗体可以通过以下方式获得:找到能够与PD-1或PD-L2结合的抗体,然后根据中和PD-1与PD-L2之间结合的能力将获得的抗体进行分选。此外,例如,能够中和CTLA-4与CD80或CD86之间结合的抗体可以通过以下方式获得:找到能够与CTLA-4结合的抗体,然后根据中和CTLA-4与CD80或CD86之间结合的能力将获得的抗体进行分选。

[0319] 与某种蛋白质结合的抗体可以用本领域技术人员公知的方法获得。抗体中和两种蛋白质结合的能力可以通过以下方式检验:固定一种蛋白质,添加来自液相的另一种蛋白质,然后检验抗体是否能降低其结合量。例如,将从液相中加入的蛋白质作标记,如果加入抗体导致标签量下降,则可以确定抗体能够中和这两种蛋白质的结合。

[0320] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白,尤其是指含有通过二硫键稳定化的两条重链(H链)和两条轻链(L链)的生物分子。重链由重链可变区(VH)、重链恒定区(CH1、CH2、CH3)以及位于CH1和CH2之间的铰链区构成,轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)构成。其中,由VH和VL构成的可变区片段(Fv)直接参与抗原结合,从而使抗体具有多样性。由铰链区、CH2和CH3构成的区域称为Fc区。

[0321] 在可变区中,直接与抗原接触的区域的变化特别明显,被称为互补决定区(CDR)。除CDR外的变异较少的部分被称为框架区。在轻链和重链之间的可变区中存在三个CDR,从N末端侧开始依次称为重链CDR 1-3和轻链CDR 1-3。

[0322] 抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体;然而,本发明中优选使用单克隆抗体。该抗体可以是任何一种同种型,即IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。该抗体可以通过免疫非人动物如小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔子和鸡来制备,可以是重组抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体等。嵌合抗体是指通过连接来自不同物种的片段而制备的抗体,人源化抗体是指通过用人抗体的相应互补决定区替换非人动物(如非人哺乳动物)抗体的CDR而制备的抗体。人源化抗体可以是一种抗体,其中CDR来自于非人动物,其他部分来自于人。人抗体也被称为全人抗体,是抗体的所有部分都由人抗体基因编码的氨基酸序列构成的抗体。在本发明中,根据一个实施方式可以使用嵌合抗体,根据另一个实施方式可以使用人源化抗体,根据另一个实施方式可以使用人抗体(全人抗体)。

[0323] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指能够与抗原结合的抗体的片段。更具体而言,抗原结合片段包括由VL、VH、CL和CH1区构成的Fab,两个Fab通过二硫键连接在一起的F(ab')₂,双特异性抗体如由VL和VH构成的Fv,通过将VL和VH用人工制备的多肽接头连接而制备的单链抗体scFv,双抗体,单链双抗体(scDb)类型、串联scFv类型和亮氨酸拉链类型,以及重链抗体如VHH抗体(Ulrich Brinkmann等人,MAbs,2017,第9卷,第2期,第182-212页)。

[0324] 可用于本发明的免疫检查点抑制剂还可以包括通过与免疫检查点分子或其配体结合而抑制免疫抑制信号的抗原结合片段,在活体中表达抗原结合片段的载体,以及含有低分子量化合物的免疫检查点抑制剂。

[0325] 在一个实施方式中,本发明中所用的免疫检查点抑制剂是选自下组的抗体:抗PD-1抗体或其抗原结合片段;抗PD-L1抗体或其抗原结合片段;抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段;抗TIM-3抗体或其抗原结合片段;抗LAG-3抗体或其抗原结合片段;抗TIGIT抗体或其抗原结合片段;抗BTLA抗体或其抗原结合片段;抗VISTA抗体或其抗原结合片段;例如JNJ-61610588(国际公开第2016/207717号)。合适的抗免疫检查点抗体或其抗原结合片段可以是人抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0326] 在另一个实施方式中,本发明中所用的免疫检查点抑制剂是选自下组的抗体:抗PD-1抗体或其抗原结合片段;抗PD-L1抗体或其抗原结合片段;抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段。合适的免疫检查点抗体或其抗原结合片段可以是人抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0327] 抗免疫检查点抗体或其抗原结合片段可以在给予本发明的药物组合物之前、之后或同时给予对象。在一个实施方式中,抗免疫检查点抗体或其抗原结合片段在给予本发明的药物组合物之后给予对象。在另一个实施方式中,抗免疫检查点抗体或其抗原结合片段在给予本发明的药物组合物之前给予对象。

[0328] 在某些方面,包含本发明的溶瘤痘苗病毒和免疫检查点抑制剂的药物组合物按照包括一个给药周期的给药计划给予患有癌症的对象。

[0329] 例如,在一个实施方式中,在给药计划的一个或多个周期中,可以首先给予患有癌症的对象包含本发明的溶瘤痘苗病毒的药物组合物,然后给予对象免疫检查点抑制剂,如抗免疫检查点抗体或其抗原结合片段。

[0330] 在另一个实施方式中,可以完成首先给予患有癌症的对象包含本发明的溶瘤痘苗病毒的药物组合物的给药计划的一个或多个周期,然后给予对象免疫检查点抑制剂,如抗免疫检查点抗体或其抗原结合片段。

[0331] 在一个实施方式中,在给药计划的一个或多个周期中,可以首先给予患有癌症的对象免疫检查点抑制剂,如抗免疫检查点抗体或其抗原结合片段,然后给予对象包含本发明的溶瘤痘苗病毒的药物组合物。

[0332] 在另一个实施方式中,可以完成首先给予患有癌症的对象免疫检查点抑制剂,如抗免疫检查点抗体或其抗原结合片段的给药计划的一个或多个周期,然后给予对象包含本发明的溶瘤痘苗病毒的药物组合物。

[0333] 如上所示,在某些实施方式中,免疫检查点抑制剂是抗免疫检查点抗体,例如:抗PD-1抗体,如纳武单抗(Nivolumab)、帕博利珠单抗(Pembrolizumab)和皮地利珠单抗(Pidilizumab);抗PD-L1抗体,如阿特珠单抗(Atezolizumab)、度伐利尤单抗(Durvalumab)和阿维单抗(Avelumab);抗CTLA-4抗体,如伊匹单抗(Ipilimumab);抗TIM-3抗体,如TSR-022(国际公开第2016/161270号)和MBG453(国际公开第2015/117002号);抗LAG-3抗体,如LAG525(国际公开第2015/0259420号);抗TIGIT抗体,如MAB10(国际公开第2017/059095号);抗BTLA抗体,如BTLA-8.2(J.Clin.Investig,2010;120:157-167);抗VISTA抗体,如JNJ-61610588(国际公开第2016/207717号)。

[0334] 通过以下实施例进一步说明本发明,所述实施例不应解释为具有进一步的限制性。本申请中引用的所有参考文献、待审专利申请和已公开的专利的内容在此明确地通过引用纳入。

[0335] 实施例

[0336] 在以下实施例中,利用荷瘤免疫缺陷小鼠和非人灵长类动物进行的研究中所用的痘苗病毒是表达白细胞介素-12(IL-12)和白细胞介素-7(IL-7)的人转基因的减毒重组痘苗病毒,该病毒被设计成选择性地地在癌细胞中复制,本文中可互换称为“LC16m0 Δ SCR VGF-SP-IL12/01L-SP-IL7”、“携带hIL12和hIL7的痘苗病毒”、以及“hIL12/hIL7病毒”。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒病毒基因组的示意图示于图19。在携带hIL12和hIL7的痘苗病毒中,通过将表达人IL-12和人IL-7的基因分别插入病毒生长因子(VGF)和01L的基因座,这两个毒力基因在功能上已失活。此外,B5R膜蛋白已经通过缺失SCR结构域1-4而被修饰,以减少抗原性。

[0337] 为了测试携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在有免疫力的小鼠中的抗肿瘤免疫反应,制备了携带表达小鼠白细胞介素-12(IL-12)和人白细胞介素-7(IL-7)的转基因的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的替代物(“携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物”),因为人IL-12在小鼠中缺乏交叉反应性(Schoenhaut等人,J Immunol.1992;148:3433-40)。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的结构与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的结构相同,只是将鼠IL-12

的基因、而不是人IL-12的基因插入了病毒生长因子(VGF)基因座。

[0338] 下面描述的大多数非临床研究中使用的药物制剂是悬浮在含有10%蔗糖的30mmol/L Tris-HCl中、并通过切向流过滤进行了纯化的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒或携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物。该纯化方法也将用于获得药物物质。在另一些非临床研究中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒或携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物通过密度梯度超速离心法浓缩。

[0339] 实施例1.携带hIL12和hIL7的痘苗病毒对人类肿瘤细胞的细胞毒性作用

[0340] 进行这项研究是为了确定携带hIL12和hIL7的痘苗病毒是否在以下人类癌细胞系中显示出细胞毒性作用:人结直肠癌(COLO 741)细胞、人胶质母细胞瘤(U-87MG)细胞和人胆管癌(HuCCT1)细胞。

[0341] 所有细胞都以不同的感染复数(MOI)(0、0.1、1、10和100)感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒。在感染后45天,用CellTiter-Glo®2.0试验测量细胞活力。通过将未感染的细胞(MOI 0)和不含细胞的培养基对照孔分别设置为100%和0%的存活率来计算细胞活力。进行了一次实验,数据以三次重复测量的平均值表示。

[0342] 在感染后4天,细胞活力下降到<10%(表1)。这些结果表明,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒对于COLO 741、U-87MG和HuCCT1细胞具有细胞毒性。

[0343] 表1.携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的细胞毒性作用

携带 hIL12 和 hIL7 的 痘苗病毒 MOI	%细胞活力平均值(± SEM)		
	COLO 741	U-87 MG	HuCCT1
100	6.4 (0.7)	6.3 (0.1)	0.8 (0.0)
10	23.2 (1.4)	16.5 (0.7)	19.4 (1.2)
1	72.0 (1.0)	66.2 (2.4)	89.3 (0.5)
0.1	100.4 (0.5)	97.5 (0.9)	101.2 (0.2)

[0345] COLO 741:人结直肠癌细胞系;HuCCT1:人胆管癌细胞系;MOI:感染复数;U-87MG:人胶质母细胞瘤细胞系。

[0346] 实施例2.携带hIL12和hIL7的痘苗病毒对各种人类癌细胞系的细胞毒性活性

[0347] 进行这项研究是为了进一步检验携带hIL12和hIL7的痘苗病毒是否对于24种人类癌细胞系显示出细胞毒性作用。

[0348] 细胞以不同的感染复数(MOI)感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒。在感染后5天,用CellTiter-Glo®发光细胞活力试验测量细胞活力。通过将未感染的细胞(MOI 0)和不含细胞的培养基对照孔分别设置为100%和0%的存活率来计算细胞活力。进行了一次实验,数据以三次重复测量的平均值表示。

[0349] 如图1所示,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在以1.0、10或100的MOI感染后5天,对于所有受检的人类癌细胞都具有细胞毒性。

[0350] 实施例3.携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在人类癌细胞或正常细胞中的复制

[0351] 进行这项研究是为了检验携带hIL12和hIL7的痘苗病毒是否相对于正常细胞选择性地人类癌细胞中复制。

[0352] 人类癌细胞(NCI-H520、HARA、LK-2和LUDLU 1)或正常人支气管上皮细胞(HBEpC)以1的MOI感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒,或感染了载剂(MOI 0)。在感染后6小时或24小时收获细胞,通过标准定量聚合酶链式反应(qPCR)测量携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的

DNA量,其中引物设计用于扩增痘苗病毒血凝素(HA) J7R基因。数值相对于18s核糖体RNA基因标准化,以两次重复测量的平均值表示。

[0353] 如图2所示,在感染携带hIL12和hIL7的痘苗病毒后24小时,在所有人类癌细胞中检测到的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的基因组DNA量都高于正常细胞HBEpC中的情况,尽管在感染后6小时,所有测试细胞之间未见明显差异。

[0354] 这一结果表明,与正常细胞相比,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒更有选择性地人类癌细胞中复制。

[0355] 实施例4.从感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的人类肿瘤细胞分泌转基因产物

[0356] 进行这项研究是为了检验在携带hIL12和hIL7的痘苗病毒感染后,人类癌细胞COLO 741、U-87MG和HuCCT1是否会分泌转基因产物。

[0357] 所有癌细胞都以0或1的MOI感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒,并培养2天。然后收集细胞培养上清,用人IL-12p70 DuoSet®ELISA试剂盒检测分泌的人IL-12蛋白,或用人IL-7ELISA试剂盒检测分泌的人IL-7蛋白。在三个复孔中进行三次独立实验,数据以3次实验的平均值(±SEM)表示。

[0358] 如表2和表3所示,在所有以1的MOI感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的细胞的培养上清中都检测到了人IL-12和人IL-7蛋白,但在未感染的细胞的培养上清中未检测到。

[0359] 总之,在所有感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的测试细胞系的细胞培养上清中都证实了转基因产物的分泌。

[0360] 表2.分泌的人IL-12蛋白量

携带 hIL12 和 hIL7 的痘苗病毒MOI	人IL-12 平均值 ± SEM (ng/mL)		
	COLO 741	U-87 MG	HuCCT1
MOI 1	6.9 (0.1)	11.5 (0.5)	8.9 (0.6)
MOI 0	未检测到	未检测到	未检测到

[0362] COLO 741:人结直肠癌细胞系;ELISA:酶联免疫吸附试验;HuCCT1:人胆管癌细胞系;IL-12;白细胞介素-12;MOI:感染复数;未检测到;低于所用ELISA试剂盒的定量限(<0.3125ng/mL);U-87MG:人胶质母细胞瘤细胞系。

[0363] 表3.分泌的人IL-7蛋白量

携带 hIL12 和 hIL7 的痘苗病毒MOI	人IL-7 平均值 ± SEM (ng/mL)		
	COLO 741	U-87 MG	HuCCT1
MOI 1	71.1 (0.2)	37.2 (3.0)	31.5 (1.7)
MOI 0	未检测到	未检测到	未检测到

[0365] COLO 741:人结直肠癌细胞系;ELISA:酶联免疫吸附试验;HuCCT1:人胆管癌细胞系;IL-7;白细胞介素-7;MOI:感染复数;未检测到;低于所用ELISA试剂盒的定量限(<0.04115ng/mL);U-87MG:人胶质母细胞瘤细胞系。

[0366] 实施例5.携带hIL12和hIL7的痘苗病毒对人类肿瘤细胞的细胞毒性作用

[0367] 进行这项研究是为了检验携带鼠IL-12和人IL-7的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物是否对于人类癌细胞系COLO 741、U-87MG和HuCCT1显示出细胞毒性作用。

[0368] 所有癌细胞系以0~100范围内的各种MOI感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替

代物。在感染后4天,用CellTiter-Glo®发光细胞活力试验测量细胞活力。通过将未感染的细胞(MOI 0)和不含细胞的培养基对照孔分别设置为100%和0%的存活率来计算细胞活力。在三个复孔中进行三次独立实验,数据以3次实验的平均值(±SEM)表示。

[0369] 如表4所示,在以11、33和100的MOI感染后4天,细胞活力降至<20%。

[0370] 因此,与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒相似,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物对于人类癌细胞(COLO 741、U-87MG和HuCCT1细胞)显示出细胞毒性作用。

[0371] 表4. 携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物对人类癌细胞系的细胞毒性作用

携带 hIL12 和 hIL7 的 痘苗病毒替代物 (MOI)	细胞活力% 平均值(± SEM)		
	COLO 741	U-87 MG	HuCCT1
0	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
0.02	101.5 (0.6)	101.4 (0.4)	101.2 (0.7)
0.05	100.8 (0.8)	100.3 (0.5)	102.0 (1.4)
[0372] 0.1	99.8 (0.5)	98.3 (1.7)	103.4 (0.8)
0.4	93.5 (1.4)	84.7 (4.5)	98.9 (1.0)
1.2	66.4 (2.1)	49.6 (6.7)	90.3 (0.6)
3.7	31.9 (0.4)	22.0 (2.9)	61.6 (0.4)
11	16.3 (0.6)	11.2 (0.4)	16.3 (0.3)
33	7.6 (0.2)	8.5 (0.8)	1.9 (0.1)
100	3.0 (0.1)	6.2 (0.2)	0.7 (0.0)

[0373] COLO 741: 人结直肠癌细胞系;HuCCT1: 人胆管癌细胞系;MOI: 感染复数;U-87MG: 人胶质母细胞瘤细胞系。

[0374] 实施例6. 感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的人类肿瘤细胞的转基因产物分泌

[0375] 进行这项研究是为了检验在携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物感染后,人类癌细胞COLO 741、U-87MG和HuCCT1是否会分泌转基因产物。

[0376] 所有癌细胞都以0或1的MOI感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物,并培养2天。在感染后2天,收集细胞培养上清,用鼠IL-12p70 DuoSet®ELISA试剂盒检测分泌的鼠IL-12蛋白,或用人IL-7ELISA试剂盒检测分泌的人IL-7蛋白。在三个复孔中进行三次独立实验,数据以3次实验的平均值(±SEM)表示。

[0377] 如表5和表6所示,在所有感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的细胞的培养上清中都检测到了鼠IL-12和人IL-7蛋白,但在未感染的细胞的培养上清中未检测到。

[0378] 总之,在所有感染了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的测试细胞系的细胞培养上清中都证实了转基因产物的分泌。

[0379] 表5. 分泌的鼠IL-12蛋白量

携带 hIL12 和 hIL7 的 痘苗病毒替代物MOI	鼠IL-12 平均值 ± SEM (ng/mL)		
	COLO 741	U-87 MG	HuCCT1
MOI 1	86.2 (8.2)	392.4 (8.5)	89.8 (5.1)
MOI 0	未检测到	未检测到	未检测到

[0381] COLO 741: 人结直肠癌细胞系;ELISA: 酶联免疫吸附试验;HuCCT1: 人胆管癌细胞系;IL-12; 白细胞介素-12; MOI: 感染复数; 未检测到; 低于所用ELISA试剂盒的定量限; U-

87MG:人胶质母细胞瘤细胞系。

[0382] 表6.分泌的人IL-7蛋白量

[0383]	携带 hIL12 和 hIL7 的 痘苗病毒替代物MOI	人IL-7 平均值 ± SEM (ng/mL)		
		COLO 741	U-87 MG	HuCCT1
	MOI 1	55.4 (10.1)	114.5 (11.8)	27.5 (2.2)
	MOI 0	not detected	not detected	not detected

[0384] COLO 741:人结直肠癌细胞系;ELISA:酶联免疫吸附试验;HuCCT1:人胆管癌细胞系;IL-7;白细胞介素-7;MOI:感染复数;未检测到;低于所用ELISA试剂盒的定量限;U-87MG:人胶质母细胞瘤细胞系。

[0385] 实施例7.在皮下异位移植人结直肠癌细胞或胶质母细胞瘤细胞的免疫力低下的小鼠中肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的抗肿瘤活性

[0386] 进行这项研究是为了考察携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在皮下接种COLO 741或U-87MG的裸鼠中的抗肿瘤作用。肿瘤建立后,在第1天将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒以 $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^7$ pfu/小鼠的剂量范围肿瘤内注射至荷瘤小鼠。在第21天对数值进行统计分析。

[0387] 在COLO 741异种移植模型中,在第21天,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在剂量 $\geq 2 \times 10^5$ pfu/小鼠时显著抑制肿瘤生长,并且 2×10^7 pfu/小鼠的剂量诱导肿瘤消退(图3A)。在该模型中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒与对照组相比不诱导体重降低(图3B)。在U-87MG异种移植模型中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒也在剂量 $\geq 2 \times 10^3$ pfu/小鼠时显著抑制肿瘤生长,并且 2×10^7 pfu/小鼠的剂量诱导肿瘤消退(图4A)。在该模型中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒与对照组相比不诱导体重降低(图4B)。

[0388] 总之,本研究表明,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒对于COLO 741和U-87MG异种移植物显示出抗肿瘤活性,而不会降低免疫力低下小鼠的体重。

[0389] 实施例8.在皮下接种CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的抗肿瘤活性

[0390] 进行这项研究是为了考察携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物在皮下接种小鼠结直肠癌(CT26.WT)肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中的抗肿瘤作用。CT26.WT肿瘤建立后,在第1、3、5天将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$ pfu/小鼠的剂量范围肿瘤内注射至荷瘤小鼠。

[0391] 在第18天,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以 $\geq 2 \times 10^5$ pfu/小鼠的剂量诱导了肿瘤生长抑制;此外, 2×10^7 pfu/小鼠的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物诱导了74.1%的肿瘤消退(图5A)。到第28天,在用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以 2×10^6 pfu/小鼠和 2×10^7 pfu/小鼠的剂量进行治疗的组中,分别有6只小鼠中的3只和6只小鼠中的5只实现了CR。在研究期间,在载剂对照组和携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物组之间,体重没有显著差异(图5B)。

[0392] 总之,本研究证明了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物针对有免疫力的小鼠中的CT26.WT细胞的抗肿瘤活性。

[0393] 实施例9.在第1和第8天或在第1和第15天在带有CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的抗肿瘤活性

[0394] 进行这项研究是为了评估在第1和第8天或在第1和第15天给予的携带hIL12和

hIL7的痘苗病毒替代物针对同系小鼠模型中的CT26.WT肿瘤的抗肿瘤作用。

[0395] 在第1天、在第1和第8天或是在第1和第15天,将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物(2×10^7 pfu/40 μ L/小鼠)或载剂肿瘤内注射至CT26.WT荷瘤小鼠中。组1) 在第1天给予单剂的载剂,组2) 在第1天给予单剂的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物,组3) 给予总共2剂的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物(第1天和第8天各一次),组4) 给予总共2剂的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物(第1天和第15天各一次)。因为组1中的平均肿瘤体积超过2000mm³,所以该组中的小鼠被安乐死。

[0396] 图6A证明携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物在所有测试组中均抑制了肿瘤生长。图6B证明在第1和第15天给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后的抗肿瘤功效显著强于第1天的单剂给予。在第25天,在载剂对照组和携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物组之间,体重没有显著差异(图6C)。

[0397] 这些数据表明,在接种CT26.WT肿瘤细胞的小鼠中,与单次给药相比,在第1和第15天给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物实现更好的抗肿瘤作用。

[0398] 实施例10. 肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物对有免疫力的荷瘤小鼠中的免疫反应的影响

[0399] 进行这项研究是为了考察携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物对皮下接种CT26.WT细胞的有免疫力的小鼠中的免疫反应的影响。

[0400] 肿瘤建立后,在第1天以 2×10^7 pfu/小鼠的剂量肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物、不携带免疫转基因的重组痘苗病毒(Cont-VV)或载剂。给药次日,测量肿瘤内人IL-7、鼠IL-12和鼠IFN- γ 的水平。此外,在第1、3和5天多次肿瘤内给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物、Cont-VV或载剂后的第20天,对肿瘤浸润淋巴细胞进行了分析。

[0401] 单剂给药次日,与用载剂或Cont-VV治疗的肿瘤相比,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物显著增加了肿瘤内的细胞因子、人IL-7、鼠IL-12和鼠IFN- γ 的水平(图7)。此外,在3剂给药后第20天,与用载剂或Cont-VV治疗的肿瘤相比,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物在肿瘤中诱导出显著更高比例的肿瘤浸润淋巴细胞、CD4+T细胞和CD8+T细胞(图8)。

[0402] 这些结果表明,肿瘤内给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物在接种细胞的有免疫力的小鼠中激活免疫反应。

[0403] 实施例11. 在皮下接种CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗后的肿瘤和血清细胞因子水平的时程分析

[0404] 设计这项研究是为了考察用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物进行肿瘤内治疗后,皮下接种CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中的肿瘤和血清人IL-7、鼠IL-12和鼠IFN- γ 水平的时程变化。

[0405] 用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以 2×10^7 pfu/小鼠的剂量对CT26.WT荷瘤小鼠进行治疗,并在0小时(注射前)和注射后0.5小时、1小时、3小时、6小时、1天、2天、3天、7天和14天收集肿瘤和血清样品。低于定量限的数值认为是浓度0。每种细胞因子的肿瘤浓度用总蛋白浓度标准化,并以ng/g总蛋白浓度表示。人IL-7(A)的浓度通过ELISA测定,鼠IL-12(B)和鼠IFN- γ (C)通过MSD细胞因子板测定。

[0406] 如图9A和9B所示,人IL-7和鼠IL-12的肿瘤水平在治疗后0.5小时内迅速增加,并保持2天的高位,之后水平开始下降。如图9C所示,肿瘤中鼠IFN- γ 的产生在治疗后6小时开

始上升,这是在人IL-7和鼠IL-12增加之后发生的。鼠IFN- γ 的水平直到治疗后3天为止都保持高位,之后下降(图9C)。图10A表明,除了治疗后6小时的快速升高外,在所有测量的时间点,人IL-7的血清浓度都低于定量限(BLQ)。在治疗的前2天,血清中鼠IL-12的浓度缓慢增加,在治疗后6小时和2天之间达到峰值(图10B)。血清中鼠IFN- γ 的浓度从治疗后6小时开始迅速增加,并在治疗后1至2天达到峰值(图10C)。

[0407] 这些结果表明,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗导致CT26.WT荷瘤小鼠的肿瘤和血清中的人IL-7和鼠IL-12短暂增加,随后产生鼠IFN- γ 。

[0408] 实施例12.在皮下接种CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物单次和/或反复治疗后的肿瘤和血清细胞因子水平的分析

[0409] 设计这项研究是为了确定用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物进行单次或反复治疗后,皮下接种CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中的肿瘤和血清人IL-7、鼠IL-12和鼠IFN- γ 水平是否增加。

[0410] 按照下列方案之一将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物注射至CT26.WT荷瘤小鼠中:(1)单剂 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 或 2×10^7 pfu/小鼠,或者(2)在第1和第15天反复给药 2×10^7 pfu/小鼠。在0小时(注射前)和携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗后0.5小时、1小时、3小时、6小时、1天、2天、3天、7天和14天收集CT26.WT荷瘤小鼠的血清样品。低于定量限的数值认为是浓度0。人IL-7(A)的浓度通过ELISA测定,鼠IL-12(B)和鼠IFN- γ (C)通过MSD细胞因子板测定。在第二次给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物前(0小时)和第二次给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后6小时和2天(2d)收集CT26.WT荷瘤小鼠的肿瘤和血清样品。人IL-7、鼠IL-12和鼠IFN- γ 的浓度通过MSD V-plex细胞因子板测定。用Mann-Whitney检验在第二次肿瘤内注射前(0小时)和6小时后之间进行比较。6小时后血清中鼠IFN- γ 的浓度在10个样品中有2个超过了检测范围,被指定为浓度的检测上限。

[0411] 在单剂携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物6小时后,肿瘤中人IL-7和鼠IL-12的浓度在 2×10^6 和 2×10^7 pfu/小鼠的条件下显著增加,鼠IFN- γ 的产生也在 2×10^7 pfu/小鼠的条件下显著升高(图11A)。类似地,血清中人IL-7和鼠IL-12的浓度在 2×10^7 pfu/小鼠的条件下显著升高,而鼠IFN- γ 的产生从 2×10^6 pfu/小鼠开始显著增加(图11A)。在治疗后2天,在 2×10^7 pfu/小鼠的条件下,人IL-7的肿瘤水平和血清鼠IFN- γ 仍然明显高于基线(图11B)。尽管在最高剂量下,肿瘤中的鼠IL-12和鼠IFN- γ 以及血清中的鼠IL-12水平也保持不变,但结果没有统计学显著性(图11B)。然而,在治疗后2天,血清中的人IL-7浓度回到BLQ(图11B)。此外,在第二次治疗后6小时,以 2×10^7 pfu/小鼠的剂量反复给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物使得肿瘤和血清中的人IL-7、鼠IL-12和鼠IFN- γ 水平都显著升高(图12)。

[0412] 实施例13.携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物对用CT26.WT肿瘤细胞再攻击有免疫力的小鼠后的肿瘤植入情况的影响

[0413] 进行这项研究是为了检验用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物进行治疗是否会在皮下接种CT26.WT细胞的小鼠中诱导长效的免疫记忆。

[0414] 在第1、3和5天,将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以 2×10^7 pfu/小鼠的剂量肿瘤内注射至CT26.WT-荷瘤小鼠中。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物在30只小鼠中的26只中诱导出CR,直到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗完成后23天。在携带hIL12

和hIL7的痘苗病毒替代物的肿瘤内注射完成后90天,以 5×10^5 个细胞/小鼠的量用CT26.WT细胞皮下再攻击实现了CR的小鼠($n=10$),接种后观察28天。

[0415] 在再攻击时,所有26只先前具有与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗相关的CR的小鼠都存活,直到最后一次注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后90天,与年龄匹配的对照小鼠相比,体重没有显著差异(图13)。用CT26.WT细胞再攻击后,通过携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物实现了CR的10只小鼠中,有9只保持无肿瘤,而所有无治疗的原初小鼠在28天内都出现了肿瘤(图14)。

[0416] 总之,这些结果表明,通过携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物经历了CR的有免疫力的小鼠对于CT26.WT肿瘤细胞产生了长期的抗肿瘤免疫记忆。

[0417] 实施例14.在双侧接种CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的远位抗肿瘤作用

[0418] 进行这项研究是为了考察携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物在双侧接种CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中的远位抗肿瘤作用。

[0419] 将CT26.WT肿瘤细胞皮下接种到小鼠的右肋和左肋。在小鼠两肋的肿瘤建立后,在第1、第3和第5天将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物、Cont-VV或载剂注射至单侧肿瘤中。在第17天使用肿瘤体积的数值(A:经注射的肿瘤,B:未注射的肿瘤)或体重(C)进行统计分析。

[0420] 在第17天,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物在经注射的和对侧未注射的肿瘤中分别抑制了96%和64%的肿瘤生长(图15A和15B)。Cont-VV在经注射的肿瘤中抑制了70%的肿瘤生长;然而,其对未注射的肿瘤没有显示出抗肿瘤作用。到第28天,在携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗组中,10只小鼠中有8只实现了经注射的肿瘤的CR,10只小鼠中有1只实现了未注射的肿瘤的CR。在研究期间,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物组小鼠的平均体重逐渐增加,尽管在第17天时体重明显低于载剂治疗的小鼠,推测这是由于给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后肿瘤的大小减小(图15C)。

[0421] 总之,本研究表明,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物对于接种CT26.WT肿瘤细胞的小鼠中未注射的肿瘤具有远位抗肿瘤作用。

[0422] 实施例15.在双侧接种CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物与免疫检查点抑制剂的组合的抗肿瘤作用

[0423] 进行这项研究是为了考察携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物与免疫检查点抑制剂抗PD-1Ab或抗CTLA4 Ab的组合在双侧接种CT26.WT肿瘤细胞的有免疫力的小鼠中的抗肿瘤作用。

[0424] 肿瘤建立后,在第1、第3和第6天将载剂溶液或 2×10^7 pfu/小鼠的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物注射至单侧肿瘤中。在第6天,每周两次腹腔内给予磷酸盐缓冲生理盐水或抗PD-1抗体($100 \mu\text{g}$ /小鼠)或抗CTLA4抗体($200 \mu\text{g}$ /小鼠)。载剂组、抗PD-1抗体单一疗法组和抗CTLA-4抗体单一疗法组中的小鼠在第24天被安乐死,因为各组中的平均肿瘤体积超过 2000mm^3 。

[0425] 在该模型中,抗PD-1抗体或抗CTLA4抗体单一疗法在经注射和未注射的肿瘤中没有显示出明显的抗肿瘤活性。在注射了病毒的肿瘤部位,单独的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物、携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物与抗PD-1抗体的组合、以及携带hIL12和

hIL7的痘苗病毒替代物与抗CTLA4Ab的组合,在第37天分别在10只小鼠中的9只、10只和9只中诱导出CR。在未注射的肿瘤中,用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物与抗PD-1抗体或抗CTLA4抗体的组合进行治疗的组中,10只小鼠中分别有6只和4只实现了CR,而单独用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物治疗的组中,10只小鼠中只有1只实现了CR(图16)。

[0426] 总之,这一结果表明,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物与抗PD-1或抗CTLA4抗体的组合,比作为单一疗法给予的3种药剂中的任何一种都显示出更高的抗肿瘤功效。

[0427] 实施例1-15的汇总。

[0428] 携带hIL12和hIL7的痘苗病毒是一种复制能力很强的痘苗病毒,其中包含人IL-12和IL-7的转基因。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒是在痘苗株LC16m0的基础上设计的,进一步的修饰包括VGF和O1L的功能缺失(分别通过插入人IL-12和人IL-7)以及B5R的修饰(美国专利公开第2017/0340687号,其全部内容通过引用纳入本文)。

[0429] 在体外研究中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在各种类型的人类癌细胞中表现出细胞毒性,包括肺、肾、膀胱、头颈、乳腺、卵巢、食道、胃、结肠、结直肠、肝、胆管、胰腺、前列腺和宫颈癌以及胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、骨髓瘤和黑色素瘤。在体内研究中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在免疫力低下的小鼠中进行肿瘤内注射后,对于人结直肠癌和胶质母细胞瘤诱导了肿瘤消退。这些结果表明,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒对于人类癌细胞具有广谱的直接溶瘤活性。此外,在用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒治疗的几种类型的人类癌细胞中证实了人IL-12和人IL-7蛋白的分泌。在携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的病毒基因组中,VGF和O1L在功能上缺失。VGF和O1L是毒力因子,参与Raf/MEK/ERK信号通路的持续激活,以促进感染细胞中的病毒毒力(Schweneker等人, *J Virol.* 2012;86:2323-36)。与正常细胞中相比,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒基因组更有选择性地人类癌细胞中复制,表明这种选择性是由于携带hIL12和hIL7的痘苗病毒中VGF和O1L的功能缺失的缘故。在使用有免疫力的小鼠的研究中,携带鼠IL-12而不是人IL-12的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物被用来估计携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的免疫活化特性,因为众所周知,人IL-12在小鼠免疫细胞中没有交叉反应(Schweneker等人,同上)。除IL12转基因的物种来源外,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的结构与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒相同。据推测,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物(其中鼠IL-12和人IL-7使VGF和O1L插入失活)也会比正常细胞更有选择性地癌细胞中复制。此外,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物被证实对人类癌细胞显示出细胞毒性活性,并诱导从被感染的癌细胞中分泌鼠IL-12和人类IL-7蛋白,这与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒相似,表明携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物可以作为替代病毒来估计携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的抗肿瘤活性。

[0430] 在有免疫力的小鼠模型中,反复肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物显示出明显的抗肿瘤活性。在同一模型中,与单次给药相比,在第1天和第15天给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物显示出更优越的功效,表明反复给药对癌症患者可能是有效的。已知IL-12能激活先天性和适应性免疫,部分原因是自然杀伤细胞、CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞分泌的IFN- γ 。IL-7是T细胞稳态的关键,并且已知当与IL-12结合时对T细胞有协同刺激活性(Mehrotra等人, *J Immunol.* 1995;154:5093-102)。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物诱导鼠IL-12、人IL-7和IFN- γ 蛋白的肿瘤内分泌,并增加CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞的肿瘤浸润,表明由溶瘤痘苗病毒介导的IL-12和IL-7的肿瘤内表达具有在肿瘤微环境中上调

免疫反应的功能,从而达到抗肿瘤功效。在时程实验中,所有观察到的肿瘤和血清细胞因子水平的短暂增加都下降到接近基础水平,因为其在治疗第3天和第14天观察到的。此外,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物在双侧肿瘤模型中显示出远位效应,其中,将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物用到单侧肿瘤中进行治疗,可在经注射的肿瘤和对侧未注射的肿瘤中都产生明显的抗肿瘤效果,表明注射病毒的肿瘤中的局部免疫活化影响到未注射的远处肿瘤。此外,通过携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物实现了CR的小鼠,在CR后约90天的再攻击中能够排斥相同的癌细胞,表明通过携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物建立了抗肿瘤免疫记忆。在该双侧肿瘤模型中,在抗PD-1或抗CTLA4 Ab治疗前给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物,显示出优于单独给予3种药剂中的任何一种的功效,表明联合治疗可能对实体肿瘤患者有效。

[0431] 在这些研究中,给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后,体重没有明显变化,表明没有明显的自身免疫迹象,不过在临床上应密切监测自身免疫反应的潜在风险。

[0432] 综上所述,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒旨在选择性地、在肿瘤组织中复制,导致肿瘤的破坏和免疫调节剂的表达,从而导致肿瘤微环境中的免疫活化,并且潜在地诱导全身性抗肿瘤活性。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒可能通过对肿瘤细胞的直接细胞裂解和通过免疫介导的癌细胞破坏在各种肿瘤类型中显示出抗癌活性。

[0433] 实施例16-19.

[0434] 在实施例16-19中提供的生物分布和脱落研究中使用以下方法。

[0435] 在小鼠和食蟹猴中进行了生物分布和脱落研究。通过qPCR分析携带hIL12和hIL7的痘苗病毒以及携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒以及携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物共享共同的DNA序列。用于检测共同DNA序列的特异性引物对和探针被用来定量携带hIL12和hIL7的痘苗病毒以及携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物基因组数量。校正曲线的范围是小鼠 $100 \sim 1 \times 10^7$ (病毒基因组(vg)/ μg DNA),食蟹猴 $125 \sim 2.5 \times 10^7$ vg/ μg DNA。检测限为小鼠50vg/ μg DNA,食蟹猴31.25vg/ μg DNA。该分析方法具有足够的特异性,以及轮次内和轮次间的准确性和精确度。

[0436] 实施例16. 正常小鼠中携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的生物分布和脱落

[0437] 将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒以 8.5×10^9 pfu/kg的剂量一次性静脉内给予雄性和雌性CD-1小鼠。如表7所示,给药后至少28天在血液中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA,给药后84天在任何动物中都没有检测到。在除大脑外的所有被检验组织中都检测到了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。组织中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA随时间的推移而减少,并在给药后14天为BLQ。呈现最高水平的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA的组织是肝、肺和脾。研究期间在尿液或粪便中排出的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA为BLQ。未见显著性别差异。

[0438] 实施例17. 荷瘤小鼠中携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的生物分布和脱落

[0439] 将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以 2×10^7 pfu/小鼠的剂量一次性肿瘤内注射给予雄性和雌性荷瘤BALB/c小鼠。如表8所示,在肿瘤中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA,并且随时间的推移而减少。除5只动物中的1只外,在给药后14天,肿瘤中携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA为BLQ。在血液、脑、心、肾、肺、粪便、卵巢和尿液中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA为BLQ。在以下组织中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗

病毒替代物DNA:在给药后4小时,5只动物中有1只在髂淋巴结、脾、睾丸和子宫的每个组织中检测到;在给药后1天,5只动物中有1只在肝组织中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA。在随后的时间点(给药后1天第或第3至14天),在这些组织中没有检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA。未见显著性别差异。

[0440] 除肿瘤和髂淋巴结外,在来自那些检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA的动物的组织中测定了人IL-7和鼠IL-12。在被检验组织中,人IL-7和鼠IL-12为BLQ。

[0441] 实施例18. 荷瘤小鼠的皮肤拭子中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的确定

[0442] 将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以 2×10^7 pfu/小鼠的剂量一次性肿瘤内给予雄性和雌性荷瘤BALB/c小鼠。如表9所示,给药后立即(2分钟内)在注射部位的皮肤拭子中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物随时间的推移而减少,在给药后3天和随后的时间点均为BLQ,直到21天。未见显著性别差异。

[0443] 实施例19. 食蟹猴中携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的生物分布和脱落

[0444] 每周一次、持续4周,将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒以 3.4×10^8 和 3.4×10^9 pfu/kg的剂量静脉内给予雄性和雌性食蟹猴。

[0445] 如表10所示,在血液中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA,并且随时间的推移而减少。在 3.4×10^8 pfu/kg的剂量下,血液中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA在给药后3天和随后的时间点均为BLQ。在 3.4×10^9 pfu/kg的剂量下,在给药后7天检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。血液中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA随着剂量的增加而增加。

[0446] 在组织中,第四次给药后7天,仅在脾中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。

[0447] 在研究期间,在 3.4×10^8 pfu/kg的剂量下,口腔拭子样品、泪腺拭子样品、尿液或粪便中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA为BLQ。在 3.4×10^9 pfu/kg的剂量下,在给药后4小时和1天的口腔拭子样品和给药后3天的粪便中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。在第一次或第二次给药后7天,在口腔拭子样品和粪便中没有检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。在研究期间,泪腺拭子样品或尿液中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA为BLQ。

[0448] 总的来说,在食蟹猴中的生物分布和脱落方面未见显著性别差异。

[0449] 表7. 单次静脉内给药后在正常小鼠中的生物分布和脱落(qPCR)

[0450]

物种 / 菌株	小鼠/Swiss, CD-1							
动物的性别 (M/F)/数量	在每个时间点M和F各5只							
饲养条件	不固定							
给予药物	携带hIL12和hIL7的痘苗病毒							
载剂 / 制剂	30 mmol/L Tris HCl、10%蔗糖、pH 7.6							
给药方法	静脉内							
试验	qPCR							
采样时间	给药后4小时、1、3、7、14、28和84天							
	qPCR测量值(几何平均vg数/ μ g DNA)							
剂量 (pfu/kg)	0		8.5×10^9					
给药后时间	1天 (24小时)		4小时		1天(24小时)		3天(72小时)	
动物	5/M	5/F	5/M	5/F	5/M	5/F	5/M	5/F
血液	BLQ	BLQ	3.64E+03¶	4.77E+03¶	2.44E+03‡	1.45E+03	3.49E+03	4.26E+03¶
脑	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
心	BLQ	BLQ	7.20E+02	5.36E+02¶	2.06E+02‡	4.52E+02	5.27E+02	6.38E+02‡
肾	BLQ	BLQ	2.37E+02	3.69E+02¶	2.99E+02†	9.49E+02	BLQ	6.63E+02†
肝	BLQ	BLQ	4.30E+04	1.89E+04	4.61E+03‡	1.58E+04	5.01E+03	1.39E+03¶
肺	BLQ	BLQ	5.40E+03	2.58E+03	1.48E+03‡	2.51E+03	4.67E+02	1.24E+03¶
肠系膜淋巴结	BLQ	BLQ	1.50E+02‡	1.30E+02§	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
脾	BLQ	BLQ	1.21E+05	3.51E+04	2.65E+03‡	1.00E+04	1.75E+03	1.37E+03§
睾丸	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	2.81E+02†	NA
卵巢	NA	BLQ	NA	3.25E+02¶	NA	2.11E+03	NA	BLQ
子宫	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	5.08E+02‡	NA	BLQ
尿液 ^a	BLQ	BLQ	NA	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
粪便 ^a	BLQ	BLQ	NA	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
表格续下页								

剂量 (pfu/kg)	qPCR测量值(几何平均vg数/ μg DNA)							
	8.5×10^9							
	7天(168小时)		14天		28天		84天	
给药后时间	5/M	5/F	5/M	5/F	5/M	5/F	5/M	5/F
动物	5/M	5/F	5/M	5/F	5/M	5/F	5/M	5/F
血液	3.21E+03	2.27E+04§	2.72E+03	4.98E+03	2.13E+03¶	9.70E+02	BLQ	BLQ
脑	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
心	1.76E+02‡	1.87E+02†	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
肾	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
肝	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
[0451] 肺	7.00E+02†	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
肠系膜淋巴	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
结								
脾	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
睾丸	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA
卵巢	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ
子宫	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ
尿液 ^a	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
粪便 ^a	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
其他信息: 无								

[0452] 除非另有说明,数值数据以几何平均值表示。

[0453] BLQ: 低于定量限 (<100vg/ μg DNA); F: 雌性; M: 雄性; NA: 不适用; qPCR: 定量聚合酶链式反应。

[0454] ^a来自每个饲养组的尿液和粪便被汇集起来,分别进行分析。

[0455] †在1只动物中有数值数据,在4只动物中为BLQ。

[0456] ‡在2只动物中有数值数据,在3只动物中为BLQ。

[0457] §在3只动物中有数值数据,在2只动物中为BLQ。

[0458] ¶在4只动物中有数值数据,在1只动物中为BLQ。

[0459] 表8. 单次肿瘤内给药后在荷瘤小鼠中的生物分布和脱落 (qPCR)

物种/菌株	小鼠/BALB/c									
动物的性别(M/F)/数量	在每个时间点M和F各5只									
饲养条件	不固定									
给予药物	携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物									
载剂/制剂	30 mmol/L Tris-HCl、10%蔗糖、pH 7.6									
给药方法	肿瘤内									
剂量(pfu/小鼠)	2×10^7									
剂量(pfu/mL)	6.67×10^8									
试验	qPCR									
采样时间	给药后4小时、1、3、7和14天									
	qPCR测量值(几何平均vg数/μg DNA)									
给药后时间	4小时		1天		3天		7天		14天	
动物数量	5/M	5/F	5/M	5/F	5/M	5/F	5/M	5/F	5/M	5/F
肿瘤	1.15E+06	1.50E+06	1.04E+05	7.66E+05	2.67E+05	1.42E+05	1.01E+04	2.05E+04	1.06E+05	BLQ¶
血液	BLQ	BLQ	BLQ**	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
脑	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
心	BLQ*	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
肾	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
肝	BLQ	BLQ	1.08E+03	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
肺	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
髂淋巴结	1.24E+02	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
脾	1.16E+02	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
睾丸	2.71E+02	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA
卵巢	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ
子宫	NA	7.48E+02	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ	NA	BLQ
尿液	NA	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
粪便	NA	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
其他信息: 除肿瘤和髂淋巴结外, 在来自那些检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的动物的组织中测定了人IL-7和鼠IL-12。在被检验组织中, 人IL-7和鼠IL-12为BLQ。										

[0461] 除非另有说明,数值数据以几何平均值表示。

[0462] BLQ:低于定量限(<100vg/ μ g DNA);F:雌性;IL-7:白细胞介素-7;IL-12:白细胞介素-12;M:雄性;NA:不适用;qPCR:定量聚合酶链式反应。

[0463] *在4只动物中为BLQ,即使在1只动物中反复进行,也没有可重复的数据。

[0464] **分析了<1 μ g的DNA。

[0465] 脚注续下页

[0466] †在1只动物中有数值数据,在4只动物中为BLQ。

[0467] ‡在4只动物中有数值数据,在1只动物中为BLQ。

[0468] §数量为4只动物(在1只动物中有数值数据,在3只动物中为BLQ),因为有1只动物中的肿瘤在采样时无法用肉眼找到。

[0469] ¶ 数量为4只动物,因为有1只动物中的肿瘤在采样时无法用肉眼找到。

[0470] 表9.对荷瘤小鼠单次肿瘤内给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物后的皮肤拭子中病毒基因组的平均数量

[0471]	物种/菌株	小鼠/BALB/c															
	动物的性别(M/F)/数量	在每个时间点M和F各5只															
	饲养条件	不固定															
	给予药物	携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物															
	载剂/制剂	30 mmol/L Tris-HCl、10%蔗糖、pH 8.0															
	给药方法	肿瘤内注射															
	剂量(pfu/小时)	2×10^7															
	试验	qPCR															
	采样时间	给药前, 2分钟内, 给药后4小时、1、3、7、14和21天															
	qPCR测量值(几何平均vg数/ μ g DNA)																
给药后时间	给药前		2分钟内		4小时		1天		3天		7天		14天		21天		
性别	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
皮肤拭子	BLQ	BLQ	1.37E+08‡	7.35E+06§	1.20E+07†	9.43E+05‡	2.07E+06†	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	
其他信息: 无																	

[0472] 除非另有说明,数值数据以几何平均值表示。

[0473] BLQ: 低于定量限 (<100vg/ μ g DNA); F: 雌性; M: 雄性; qPCR: 定量聚合酶链式反应。

[0474] † 在2只动物中有数值数据,在3只动物中为BLQ。

[0475] ‡ 在3只动物中有数值数据,在2只动物中为BLQ。

[0476] § 在4只动物中有数值数据,在1只动物中为BLQ。

[0477] 表10.反复静脉内给药后在食蟹猴中的生物分布和脱落 (qPCR)

[0478]

物种/菌株	食蟹猴											
动物的性别(M/F)/数量	M和F/3											
饲养条件	不固定											
给予药物	携带hIL12和hIL7的痘苗病毒											
载剂/制剂	30 mmol/L Tris-HCl、10%蔗糖、pH 7.6											
给药方法	静脉内											
试验	qPCR											
采样时间	第一次给药后1小时、4小时、1、3、4、7、14、21和28天											
qPCR测量值(几何平均vg数/ μ g DNA)												
给药后时间			1小时		4小时		1天(24小时)		3天(72小时)		4天(96小时)	
组§ 剂量 (pfu/kg)			3/M	3/F	3/M	3/F	3/M	3/F	3/M	3/F	3/M	3/F
血液	3	3.4×10^8	2.41E+03	1.76E+03	5.92E+02	4.43E+03	1.82E+02 [‡]	3.22E+02 [‡]	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	4	3.4×10^9	NA	NA	9.45E+04	2.54E+05	2.62E+04	8.25E+04	7.32E+02	1.93E+03	9.36E+02 ^a	1.51E+03
口腔拭子	3	3.4×10^8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	4	3.4×10^9	NA	NA	5.85E+02 [‡]	2.41E+03 [‡]	1.49E+02 ^{+b}	1.09E+03 ^{+b}	BLQ	BLQ	BLQ ^d	BLQ
泪腺样品	3	3.4×10^8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	4	3.4×10^9	NA	NA	BLQ	BLQ	BLQ ^b	BLQ ^b	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
尿液	3	3.4×10^8	NA	NA	NA	NA	BLQ	BLQ	BLQ ^a	BLQ	NA	NA
	4	3.4×10^9	NA	NA	NA	NA	BLQ ^b	BLQ ^b	BLQ ^c	BLQ	NA	NA
粪便	3	3.4×10^8	NA	NA	NA	NA	BLQ ^f	BLQ ^f	BLQ	BLQ	NA	NA
	4	3.4×10^9	NA	NA	NA	NA	BLQ ^b	BLQ ^b	BLQ	1.40E+03 ^{+c}	NA	NA
表格续下页												

[0479]

qPCR测量值(几何平均vg数/ μ g DNA)												
给药后时间			7天 (第一次给药前)		14天 (第三次给药前 ^a)		21天 (第四次给药前)		28天 (第四次给药后7天)			
组§ 剂量 (pfu/kg)			3/M	3/F	3/M	3/F	3/M	3/F	3/M	3/F	3/M	3/F
血液	3	3.4×10^8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NA	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	4	3.4×10^9	5.78E+02 [‡]	7.43E+02 [‡]	BLQ ^c	3.77E+02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
口腔拭子	3	3.4×10^8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	4	3.4×10^9	BLQ	BLQ	BLQ ^c	BLQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
泪腺样品	3	3.4×10^8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	4	3.4×10^9	BLQ	BLQ	BLQ ^c	BLQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
尿液	3	3.4×10^8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	4	3.4×10^9	BLQ	BLQ	BLQ ^c	BLQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
粪便	3	3.4×10^8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	4	3.4×10^9	BLQ	BLQ	BLQ ^c	BLQ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
表格续下页												

给药后时间			qPCR测量值(几何平均vg数/ μg DNA)		
			28天 (第四次给药后7天)		
动物数量		组§	剂量 (pfu/kg)	3/M	3/F
[0480]	脑 心 肾 肝 肺 下颌淋巴结 肠系膜淋巴结 卵巢 脾 睾丸 子宫			3	3.4×10^8
其他信息: 无					

[0481] 除非另有说明,数值数据以几何平均值表示。

[0482] BLQ: 低于定量限 (<125vg/ μg DNA); F: 雌性; M: 雄性; NA: 不适用; qPCR: 定量聚合酶链式反应。

[0483] ^a 丢失了一个样品。

[0484] ^b 在第一次给药后45小时采样。

[0485] ^c 在指定的采样点前处死了一个动物。

[0486] ^d 失去了一个样品。

[0487] ^e 在第一次给药后96小时纳入1个样品。

[0488] ^f $n=1$ 。

[0489] ^g 第4组动物处死时。

[0490] § 第2组中的所有动物的数据均为BLQ。

[0491] † 在1只动物中有数值数据,在2只动物中为BLQ。

[0492] ‡ 在2只动物中有数值数据,在1只动物中为BLQ。

[0493] 实施例16-19的汇总。

[0494] 当携带hIL12和hIL7的痘苗病毒以 8.5×10^9 pfu/kg的剂量单次静脉内给予小鼠时,给药后至少28天在血液中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA,给药后84天在任何动物中都没有检测到。在除大脑外的所有被检验组织中都检测到了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。组织中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA随时间的推移而减少,并在给药后14天为BLQ。尿液或粪便中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA为BLQ。未见显著性别差异。

[0495] 当携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以 2×10^7 pfu/小鼠的剂量单次肿瘤内注射至荷瘤小鼠时,在肿瘤组织中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA,并且随时间的推移而减少。除5只动物中的1只外,在给药后14天,肿瘤组织中携带hIL12和hIL7的痘苗

病毒替代物DNA为BLQ。在血液、脑、心、肾、肺、粪便、卵巢和尿液中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物为BLQ。在以下组织中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA:在给药后4小时,5只动物中有1只在髂淋巴结、脾、睾丸和子宫的每个组织中检测到;在给药后1天,5只动物中有1只在肝组织中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA。在随后的时间点(给药后1天第或第3至14天),在这些组织中没有检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA。在尿液或粪便中没有检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA的排泄。未见显著性别差异。除肿瘤和髂淋巴结外,在来自那些检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物DNA的动物的组织中测定了人IL-7和鼠IL-12。在被检验组织中,人IL-7和鼠IL-12为BLQ。

[0496] 将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以 2×10^7 pfu/小鼠的剂量一次性肿瘤内给予雄性和雌性荷瘤BALB/c小鼠时,给药后立即(2分钟内)在注射部位的皮肤拭子中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物随时间的推移而减少,在给药后3天和随后的时间点均为BLQ,直到21天。未见显著性别差异。

[0497] 当每周一次、持续4周将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒以 3.4×10^8 和 3.4×10^9 pfu/kg的剂量静脉内给予食蟹猴时,在血液中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA,并且随时间的推移而减少。在 3.4×10^9 pfu/kg的剂量下,在给药后7天在血液中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。血液中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA随着剂量的增加而增加。在组织中,第四次给药后7天,仅在脾中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。在 3.4×10^9 pfu/kg的剂量下,在给药后4小时和1天的口腔拭子样品和给药后3天的粪便中检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。在随后的时间点,在口腔拭子样品或粪便中没有检测到携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA。在研究期间,泪腺拭子样品或尿液中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒DNA为BLQ。总的来说,在食蟹猴中的生物分布和脱落方面未见显著性别差异。

[0498] 实施例20. 食蟹猴中的单次静脉内给药毒性研究

[0499] 目的

[0500] 进行这项非GLP研究是为了评价携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在单次静脉内注射后在食蟹猴中的潜在毒性。此外,还评估了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在组织和血液中的生物分布情况,并测量了选定的细胞因子水平。

[0501] 研究设计

[0502] 单次静脉内给予每组2只雄性和2只雌性食蟹猴携带hIL12和hIL7的痘苗病毒,剂量水平为0(载剂:30mmol/L Tris-HCl、10%蔗糖、pH 7.6)、 2.9×10^7 或 2.9×10^8 pfu/kg。试验品组在5分钟内以慢速注射的方式接受5mL/kg的恒定剂量体积。在给药后2天,将每组每种性别的一只动物处死。在给药后14天,将其余动物处死。

[0503] 直到预定的处死时为止,每天至少检查和记录一次死亡率、发病率和临床指征。在治疗前以及治疗后的第1天(给药日)和第2、4、8和15天记录体重和直肠温度。在治疗前和第8天对存活的动物进行一次心电图(ECG)、血压和眼科评价。每天检查食物消耗。

[0504] 在治疗前期间以及第1、2、3(仅针对病毒DNA水平)、4、8和15天,从所有存活的动物手机血液样品,以测定血浆中的细胞因子和病毒DNA水平。

[0505] 在治疗前以及治疗后第2、4、8和15天,对所有存活的动物进行血液学、凝血和血液生物化学考察。在治疗前以及治疗后第2、8和15天进行尿液分析。

[0506] 在预定的处死时,进行全面的宏观尸检。将指定的器官和组织称重并保存,以进行

显微镜检查和生物分布的定量聚合酶链式反应考察。对来自所有动物的选定组织进行显微镜检查。

[0507] 结果

[0508] 研究期间没有发生过早死亡,也没有观察到与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒治疗有关的毒理学相关临床指征。

[0509] 在任何剂量水平下都没有发现对体重或食物消耗的影响。在第2天,高剂量组中有1只动物出现了短暂的高热。没有发现其他与治疗有关的直肠温度变化。在任何剂量水平下,对心血管参数(ECG和血压)没有影响,也都没有眼科疾病研究发现。

[0510] 细胞因子水平的测定没有证实人IL-7和IL-12p70血清水平与转基因表达之间的关系。在第2天发现猴干扰素 γ (IFN- γ)浓度的剂量相关性增加。在任何剂量水平下都没有发现肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度的变化。

[0511] 使用聚合酶链式反应检测方法,在生物分布阶段的任何时间点,在肝、脑、心、肾、肺、睾丸、卵巢或子宫样品中都没有检测到病毒DNA。

[0512] 在第3天在 $\geq 2.9 \times 10^7$ pfu/kg的脾样品中定量了病毒DNA,但在随后的时间点低于定量限(BLQ)。在第1天 2.9×10^7 pfu/kg的血液样品中,以及在第1、第2和第3天 2.9×10^8 pfu/kg的血液样品中,其也被短暂定量,而又被迅速清除,因为从第4天开始没有血液样品的病毒DNA呈阳性。

[0513] 在血液学方面,所有高剂量动物在第2天都表现出适度增加的白细胞计数($\times 1.6$ 至 $\times 2.5$)和嗜中性粒细胞计数($\times 3.0$ 至 $\times 4.3$),以及轻微至明显减少的嗜酸性粒细胞(完全消失至 $\times 0.8$)和淋巴细胞($\times 0.3$ 至 $\times 0.6$)计数。随后在第8天,在存活的雄性和雌性中出现轻度淋巴细胞减少,只有雄性中出现血小板计数增加。在同一只雄性中,在第2和第4天也可见纤维蛋白原浓度的轻微增加。另一只高剂量雄性的血小板计数在第2天下降。在第15天没有发现变化。这些血液学变化表明本组中存在炎症状态。因为这些现象的可逆性和没有相关的临床指征,所以它们被认为与试验品有关,但属于非不良反应。

[0514] 在血液生物化学和尿液分析中没有发现试验品的影响。

[0515] 在第3天或第15天处死的动物中,没有出现与试验品给药有关的器官重量差异、总体研究发现或微观研究发现。

[0516] 结论

[0517] 在这项研究的实验条件下,食蟹猴能很好地耐受高达 2.9×10^8 pfu/kg的单次静脉内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒。

[0518] 在第1天 2.9×10^7 pfu/kg的血液样品中,以及在第1、第2和第3天 2.9×10^8 pfu/kg的血液样品中,测到一定量的病毒DNA,而其又被迅速清除,因为从第4天开始没有血液样品的病毒DNA呈阳性。

[0519] 无论什么时间点,在肝、脑、心、肾、肺、睾丸、卵巢和子宫样品中都没有检测到病毒DNA。仅在第3天在 $\geq 2.9 \times 10^7$ pfu/kg的脾样品中定量了病毒DNA,但在第15天为BLQ。

[0520] 实施例21.小鼠中的四周反复静脉内给药毒性研究

[0521] 目的

[0522] 这项GLP研究的目的是评价携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在历时4周的每周静脉内注射期间对所给药的小鼠的毒性。在治疗期完成后,将指定的动物保持4周的非治疗期,以

评价任何研究发现的可逆性。

[0523] 研究设计

[0524] 每周一次、持续4周,静脉内给予每组10只雄性和10只雌性CD-1小鼠携带hIL12和hIL7的痘苗病毒,剂量水平为0(载剂:30mmol/L Tris-HCl、10%蔗糖、pH 7.6)、 8.5×10^7 、 8.5×10^8 和 8.5×10^9 pfu/kg。高剂量水平是基于测试项目浓度(1.7×10^9 pfu/mL)的最大可行剂量(MFD)和能够对小鼠静脉内注射的最高体积(5mL/kg,重复剂量)。另有6只雄性和6只雌性都被纳入对照组和高剂量组,保持4周的非治疗期。此外,每组包括6只卫星雄性和6只卫星雌性,仅用于可能的病毒血症、免疫原性和细胞因子的测量。

[0525] 每天检查两次动物的死亡率。每天记录一次临床指征。在治疗前期间和治疗当天至少记录一次体重和食物消耗,并直到研究结束为止每周至少记录一次。在第一次和第四次给药后的3天内,每天还记录体重。在治疗前期间和治疗期结束时都进行眼科检查。

[0526] 在治疗期和非治疗期结束时收集血液样品,以进行血液学和血液生物化学考察。在第一次给药后2天,从卫星动物采集血液样品用于病毒血症的测定,并在治疗期结束时采集血液样品用于可能的细胞因子测定和免疫原性测定。

[0527] 在治疗期或非治疗期结束时,将动物安乐死,并进行全面的宏观尸检。将指定的器官和组织称重并保存。对选定的组织进行显微镜检查。

[0528] 结果

[0529] 通过静脉内途径历时4周每周给予携带hIL12和hIL7的痘苗病毒,没有导致任何死亡。在任何剂量水平上都没有观察到与治疗有关的体重、食物消耗、眼科或血液学的变化。

[0530] 在 $\geq 8.5 \times 10^7$ pfu/kg的剂量下,观察到稍低的A/G比率,表明与载剂对照相比球蛋白浓度更高。还发现脾脏重量的增加和脾脏中生发中心的细胞性。认为这些研究发现与试验品有关。

[0531] 在 $\geq 8.5 \times 10^8$ pfu/kg的剂量下,发现脾脏增大(雄性和/或雌性)。认为这些研究发现与试验品有关。

[0532] 在 $\geq 8.5 \times 10^9$ pfu/kg的剂量下,在第三次和第四次给药后出现急性严重的临床指征,如弓身姿势、竖毛、活动减少、垂头、抓握反射减少、失去平衡、呼吸困难、半闭眼、蹒跚步态和/或转圈跑。所有这些临床指征都是在给药后15至30分钟内观察到的,并且通常在给药后的第二天不会观察到。这些临床指征表明即时的超敏反应。然而,它们是短暂的,对动物的整体状况没有影响。发现髂和腹股沟淋巴结增大(雌性),髂、腹股沟和下颌淋巴结的生发中心细胞性增加(雄性和雌性),注射部位的小血管周围炎症发生率增加(雄性和雌性)。

[0533] 在4周的非治疗期后,雄性的脾脏和淋巴结完全恢复,雌性的脾脏和淋巴结部分恢复。注射部位的研究发现完全恢复。

[0534] 在第3天, 8.5×10^7 pfu/kg剂量组中的病毒DNA在6只雌性中的3只的血液中被定量(几何平均值: 4.18×10^2 vg/ μ g的DNA),没有雄性。在 8.5×10^8 pfu/kg剂量组中,除1只雄性外,所有动物的病毒DNA均被定量为相似的量(雄性为 2.29×10^2 vg/ μ g的DNA,雌性为 5.05×10^2 vg/ μ g的DNA)。在 8.5×10^9 pfu/kg剂量组中,所有动物的病毒DNA均被定量为更高的量(雄性为 3.38×10^3 vg/ μ g的DNA,雌性为 8.92×10^3 vg/ μ g的DNA)。

[0535] 结论

[0536] 8.5×10^9 pfu/kg的剂量水平在第三次和第四次给药后导致不良的急性严重临床

指征。

[0537] 在 8.5×10^7 pfu/kg和 8.5×10^8 pfu/kg的剂量水平下, 试验品的影响包括与载剂对照相比更高的血球蛋白浓度和脾脏中生发中心的细胞性 (cellularity) 的非不良增加。

[0538] 因此, 在本研究的实验条件下, 携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的NOAEL (未观察到不良作用水平) 为 8.5×10^8 pfu/kg。

[0539] 实施例22. 食蟹猴中的四周反复静脉内给药毒性研究和生物分布研究

[0540] 目的

[0541] 进行这项GLP研究是为了评价携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在历时4周的每周静脉内注射期间对所给药的食蟹猴的潜在毒性。在治疗期完成后, 将指定的动物保持4周的非治疗期, 以评价任何研究发现的可逆性。此外, 在整个研究期间评估生物分布。

[0542] 研究设计

[0543] 每周一次、持续4周, 静脉内给予每组3只雄性和3只雌性食蟹猴携带hIL12和hIL7的痘苗病毒, 剂量水平为0 (载剂: 30mmol/L Tris-HCl、10%蔗糖、pH 7.6)、 3.4×10^7 、 3.4×10^8 和 3.4×10^9 pfu/kg (在第1、8、15和22天给药)。 3.4×10^9 pfu/kg的动物被指定为卫星动物, 以评价生物分布和脱落。高剂量水平是基于测试项目浓度 (1.7×10^9 pfu/mL) 的MFD和能够对食蟹猴静脉内注射的最高体积 (2mL/kg, 重复剂量)。在 3.4×10^9 pfu/kg的卫星动物在第15天终止, 其原因在于这个剂量水平的第二次给药后注意到的研究发现。因此, 另外指定3只雄性和3只雌性作为卫星动物, 以评估 3.4×10^8 pfu/kg组的生物分布和脱落。

[0544] 在对照组和 3.4×10^8 pfu/kg组中加入2只雄性和2只雌性, 以评估在给药期间观察到的毒性研究发现的可逆性。

[0545] 对于所有动物, 在研究期间每天至少检查和记录两次死亡率、发病率和临床指征。在治疗前和治疗当天记录体重, 并直到研究结束为止每周至少记录一次。每天检查食物消耗。收集血液样品用于可能的抗药抗体测定。

[0546] 对于主治期和恢复期的动物, 在治疗前期间、每次给药后2小时、每次给药后1天以及第一次和第四次给药后3天记录一次直肠温度。在治疗前和治疗期结束时进行ECG、血压和眼科检查。在治疗期结束时收集用于血液学、凝血和血液生物化学考察的样品以及用于尿液分析的样品。在第一次和第四次给药后的固定时间点, 收集血液样品用于可能的细胞因子水平测定和病毒血症分析。在治疗期或非治疗期结束时, 将动物处死, 并进行全面的宏观尸检。将指定的器官和组织称重并保存。对选定的组织进行显微镜检查。

[0547] 对于第3组卫星动物 (3.4×10^8 pfu/kg), 在整个研究过程中的固定时间点收集口腔和泪腺拭子以及血液、尿液和粪便样品, 以测定生物分布和脱落情况。对于第4组卫星动物 (3.4×10^9 pfu/kg), 在第9和第15天 (解剖前) 收集血液用于血液学和生物化学考察, 并且收集血清用于其他考察。

[0548] 在治疗期结束时, 从第3组卫星动物收集指定的组织, 以评价生物分布情况。在第15天, 将第4组卫星动物处死, 并进行全面的宏观尸检。将指定的器官和组织称重并保存。对选定的组织进行显微镜检查。

[0549] 结果

[0550] 在任何剂量水平上都没有观察到与治疗有关的食物消耗、ECG、血压、眼科或尿液分析的变化。

[0551] 在 $\geq 3.4 \times 10^7$ pfu/kg的剂量下,发现脾脏重量的增加(雄性: $\geq 3.4 \times 10^7$ pfu/kg,雌性: $\geq 3.4 \times 10^8$ pfu/kg)和脾脏中生发中心(雄性和雌性)的细胞性的非不良治疗相关性增加。在4周的非治疗期后,在 3.4×10^8 pfu/kg的剂量下没有发现这些变化。

[0552] 发现成熟红细胞质量如红细胞计数、血红蛋白浓度和血细胞比容的轻度至中度下降(雄性: $\geq 3.4 \times 10^8$ pfu/kg,雌性: 3.4×10^7 pfu/kg和 3.4×10^8 pfu/kg)。在对照动物中发现成熟红细胞质量的轻度下降。考虑到其幅度,不认为这些血液学变化是不良的。

[0553] 在 $\geq 3.4 \times 10^8$ pfu/kg的剂量下,发现脾脏增大(雄性和/或雌性)。在 $\geq 3.4 \times 10^8$ pfu/kg的剂量下,有1只雄性在第22天、即第四次给药后4小时出现活动减少,持续时间 < 24 小时。因为严重程度低,所以不认为这是不良的。在雄性中,第2天的直肠温度与治疗前的数值相比有所增加(分别为 40.3°C 和 39.5°C)。直肠温度在第4天恢复到治疗前的温度。不认为这种变化是不良的,因为它是短暂的且变化的幅度很小。

[0554] 在第8天,在第二次给予卫星动物 3.4×10^9 pfu/kg后,1只雄性呕吐,出现活动减少和虚脱,并演变成腹侧卧位和固定凝视。认为这只动物已经奄奄一息了,出于人道原因将其提前安乐死。在组织病理学检查中,认为造成奄奄一息的原因是多器官全身炎症反应,主要影响到胸腔和腹腔器官的表面。其他动物在第二次给药后4小时出现活动减少,持续24小时至48小时。一只雄性在第二次给药后4小时出现虚脱。存活的动物的体重下降。考虑到在第8天第二次给药后的严重反应,其他5只动物的治疗停止,动物在第15天被处死。

[0555] 血液学变化包括成熟红细胞质量的轻度至中度下降,血小板计数的改变和/或带状嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、大未染色细胞和/或网状细胞计数的轻度至中度增加。生物化学变化包括钠、氯、磷、白蛋白和总蛋白浓度的轻度至中度下降,尿素、肌酐和甘油三酯浓度的轻度至中度增加,葡萄糖浓度的轻度至中度改变,以及碱性磷酸酶、天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、肌酸激酶、乳酸脱氢酶和 γ -谷氨酰基转移酶活性的轻度至中度增加。这些都表明由于出血或红细胞寿命减少导致红细胞周转率增加,出现炎症和免疫反应,肾功能受损,胆汁淤积以及肝胆和骨骼肌细胞损伤。多器官全身炎症反应和一般状态的恶化被认为是导致所述改变的最可能的根本原因。

[0556] 在组织病理学检查中,发现各器官(心、肝、肺和体腔/肠系膜脂肪)中的炎症浸润小幅增加,与奄奄一息的动物中的研究发现一致。在第15天处死的1只雄性中出现双侧睾丸小管退化。附睾的继发性病变与大约1周前(即第8天的治疗时)的毒性作用一致。在 3.4×10^8 pfu/kg的剂量下,2只恢复期动物的睾丸中也出现类似但严重程度较低的单侧病变。睾丸中的研究发现不太可能是试验品的直接影响。然而,睾丸研究发现的确切机制无法确定。

[0557] 在 3.4×10^7 pfu/kg组中,任何血压样品中的病毒DNA均为BLQ。在 3.4×10^8 pfu/kg组中,在第2天,病毒DNA在5只雄性中的3只(几何平均数: 4.26×10^2 vg/ μg 的DNA)和5只雌性中的4只(3.78×10^2 vg/ μg 的DNA)被定量,在第3天,病毒DNA在5只雄性中的2只(2.34×10^2 vg/ μg 的DNA)和5只雌性中的1只(1.42×10^2 vg/ μg 的DNA)被定量。在第4或第5天,病毒DNA为BLQ。在第23天,病毒DNA在5只雄性中的3只(1.8×10^2 vg/ μg 的DNA)和5只雌性中的4只(2.09×10^3 vg/ μg 的DNA)中被定量,在第24天,病毒DNA在5只雄性中没有被定量,在5只雌性中的1只(4.03×10^2 vg/ μg 的DNA)中被量化。在第25天没有检测到病毒DNA。

[0558] 结论

[0559] 在生活或组织病理学检查中发现,以 3.4×10^7 pfu/kg和 3.4×10^8 pfu/kg的剂量给

药导致非不良结果,伴随完全恢复。有2只动物在恢复期处死时出现轻微的单侧睾丸退化。因为病变的严重程度低,所以不认为这是不良的。

[0560] 在 3.4×10^9 pfu/kg的高剂量下,有与治疗有关的不良研究发现。具体来说,一只雄性因为临床状况严重恶化而被安乐死,认为这是由于多器官全身炎症反应,主要影响到胸腔和腹腔器官的表面。此外,在1只雄性中出现双侧睾丸退化。不认为这是治疗的直接效果,而可能是继发于炎症变化,导致发热和对睾丸温度调节的干扰。

[0561] 因此,在本研究的实验条件下,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的NOAEL(未观察到不良作用水平)估计为 3.4×10^8 pfu/kg。

[0562] 实施例23. 荷瘤小鼠中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的五天反复肿瘤内给药毒性研究

[0563] 目的

[0564] 在荷瘤小鼠中进行毒性研究是为了评价以肿瘤内注射方式(临床给药途径)给药时病毒的潜在毒性。

[0565] 研究设计

[0566] 携带hIL12和hIL7的痘苗病毒是一种携带人IL-12和人IL-7转基因的重组痘苗病毒。在这项研究中,因为人IL-12在小鼠中没有交叉反应,所以使用携带鼠IL-12和人IL-7的携带IL-12和IL-7的痘苗病毒替代物。将CT26.WT肿瘤细胞以 3×10^5 个细胞/50 μ L/小鼠皮下注射至BALB/c小鼠的右肋。肿瘤建立后(平均肿瘤体积:75~81mm³),肿瘤内给予每组10只雄性和10只雌性小鼠携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物,剂量水平为0(载剂对照:30mmol/L Tris-HCl、10%蔗糖、pH7.6)、 2×10^5 、 2×10^6 和 2×10^7 pfu/小鼠/天,隔天给药,持续5天(第1、第3和第5天)。所有组都使用30 μ L/小鼠的剂量体积。在第15天处死动物。研究参数包括临床观察、体重、食物消耗、肿瘤体积、器官重量、尸检和组织病理学。此外,在第6天(第三次给药后24小时)对卫星动物(3只动物/品/性别/组)血清中人IL-7、鼠IL-12、鼠TNF- α 和鼠IFN- γ 的浓度进行评估。

[0567] 结果

[0568] 在 $\geq 2 \times 10^5$ pfu/小鼠的剂量下,在雄性中观察到注射部位的肿瘤大小减小,并且在雄性中观察到注射部位的肿瘤局灶性坏死增加(除 2×10^6 pfu/小鼠外)。

[0569] 在 $\geq 2 \times 10^6$ pfu/小鼠的剂量下,在雄性和雌性中观察到肿瘤中的淋巴浸润增加,以及注射部位的肿瘤中的真皮中纤维化的严重程度和巨噬细胞浸润的严重程度的增加。在雄性中观察到脾脏中的淋巴细胞增生。在雌性中观察到肿瘤大小减小。

[0570] 在 2×10^7 pfu/小鼠的剂量下,在雄性中观察到注射部位的肿瘤中的嗜中性粒细胞浸润增加,以及脾脏中髓外造血的严重程度和发生率下降,脾脏重量减少。在雌性中观察到脾脏中的淋巴细胞增生。

[0571] 在细胞因子方面,任何剂量组的任何性别的鼠IL-12和人IL-7的血清水平都没有增加,除了1只雄性在 2×10^6 pfu/小鼠的剂量下观察到鼠IL-12的浓度增加。在 2×10^6 和 2×10^7 pfu/小鼠的剂量下,雄性和雌性的鼠IFN- γ 的浓度增加。在所有剂量组中,雄性和雌性的鼠TNF- α 的浓度增加。

[0572] 结论

[0573] 本研究中的NOAEL(未观察到不良作用水平)估计为 2×10^7 pfu/小鼠(对于两种性

别),因为认为组织病理学变化表明携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物激活了免疫系统,或者组织病理学变化是与肿瘤大小减小有关的继发性变化的结果,因此不认为这是不良的。

[0574] 实施例20-23的汇总

[0575] 用携带hIL12和hIL7的痘苗病毒静脉内治疗4周的小鼠中观察到的主要变化在脾脏(生发中心的细胞性增加,特点是由于淋巴细胞的数量增加,脾脏淋巴滤泡的生发中心扩大)和淋巴结(髂、腹股沟和下颌)中。淋巴结的形态学变化似乎与脾脏相似。在食蟹猴中,在4周的静脉内注射后,出现的主要器官变化在脾脏(生发中心的细胞性增加)中。这些变化表明了免疫系统的活化和对携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的免疫反应,并认为属于非不良反应,因为这些变化与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的药理作用一致,并且是可逆的。

[0576] 然而,在最大可行剂量(MFD)下,在反复静脉注射后在小鼠和食蟹猴中发现了可能与活化的免疫系统或免疫反应有关的严重临床指征。在小鼠中,在第三次和第四次给药后第15和第22天,小鼠出现急性症状,如弓身姿势、竖毛、活动减少、垂头、蹒跚步态、抓握反射减少、失去平衡和呼吸困难。所有这些临床指征都是在给药后15至30分钟内观察到的,并且通常在给药后的第二天不会观察到。这些短暂的临床指征对动物的整体状况没有影响,并表明即时的超敏反应。在食蟹猴中,在最高剂量下有1只雄性呕吐,出现活动减少和虚脱,并在第二次给药后第8天演变成腹侧卧位和固定凝视。认为这只动物已经奄奄一息了,出于人道原因将其提前安乐死。其他动物在第二次给药后4小时出现活动减少,持续24小时至48小时。一只雄性在第二次给药后4小时出现虚脱。在组织病理学检查中,认为造成奄奄一息的原因是多器官全身炎症反应,主要影响到胸腔和腹腔器官的表面。

[0577] 仅在高剂量下发现这些变化,从人道的角度出发,根据药物物质和MFD体积对动物的协调,在每项研究中把该高剂量定为MFD。在荷瘤小鼠中,虽然发现类似的组织病理学变化,表明携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物激活了免疫系统,但在任何测量中都没有发现不良结果。

[0578] 在食蟹猴中,在最高剂量下有1只雄性显示出双侧生精小管退化。认为睾丸的发现代表了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒暴露的间接作用。然而,睾丸研究发现的明确发病机制无法确定。

[0579] 在小鼠和食蟹猴的重复剂量毒性研究中发现的与治疗有关的毒性研究发现和NOAEL汇编在(表11)。

[0580] 表11.小鼠和食蟹猴中的4周静脉内给药毒性研究中的与治疗有关的毒性研究发现

系统	与治疗有关的变化	NOAEL (pfu/kg)	
		小鼠	食蟹猴
临床指征和一般状况			
[0581] 活化的免疫系统/反应	在第15和第22天给药后15至30分钟内发现的急性症状，如弓身姿势、竖毛、活动减少、垂头、蹒跚步态、抓握反射减少、失去平衡和呼吸困难	8.5×10^8	NA
	在第8天给药后持续超过24小时的活动减少，包括虚脱、腹侧卧位和奄奄一息	NA	3.4×10^8
组织病理学			
生殖系统	睾丸退化†	NA	3.4×10^8

[0582] NA: 不适用; NOAEL: 未观察到不良作用水平

[0583] †认为睾丸的发现代表了携带hIL12和hIL7的痘苗病毒暴露的间接作用。

[0584] 实施例24. 携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的首次人体试验 (FIH) 的I期非盲剂量递增和剂量扩展研究

[0585] 在美国进行携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的I期非盲剂量递增和剂量扩展研究。

[0586] 概述

[0587] 本研究包括晚期或转移性实体肿瘤患者, 这些患者不符合治愈性意图的手术治疗或药物治疗的条件, 并且在现有的标准治疗中取得进展或不符合条件:

[0588] • A组: 可进行肿瘤内注射的皮肤或皮下肿瘤。

[0589] • B组: 在超声或计算机断层扫描 (CT) 引导下可进行肿瘤内注射的内脏病变。可以考虑内窥镜可触及的病变。

[0590] 要符合招募条件, 患者必须具有东部合作肿瘤组 (ECOG) 表现状态0或1和可测量的疾病。

[0591] 本研究设计包括一个剂量递增阶段和一个RP2D扩展阶段 (图17)。计划招募人数约为105名患者 (21至30名在剂量递增阶段, 约75名在剂量扩展阶段)。最初在剂量扩展阶段, 有60名患者被招募进扩展队列中。根据在扩展队列中观察到的反应, 最多可以加入15名患有特定肿瘤类型的其他患者, 以进一步表征该肿瘤类型中的抗肿瘤活性。可以扩展多于1个队列, 以包括其他患者。扩展队列中的患者总数将取决于观察到的抗肿瘤活性和生物标志物免疫反应。

[0592] 在剂量递增阶段, 计划采用的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒剂量水平为 1×10^7 pfu/mL、 1×10^8 pfu/mL和 5×10^8 pfu/mL。每位患者在前2个周期 (28天周期) 的第1天和第15天通过肿瘤内注射到同一肿瘤中而接受指定剂量的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒单一疗法。每个剂量水平的第一个患者的治疗与该水平的任何后续患者的治疗之间必须间隔至少7天。

[0593] 在前28天 (第1周期), 患者被评价为剂量限制性毒性 (DLT)。安全性和耐受性将从最后一剂携带hIL12和hIL7的痘苗病毒后的第1天起到第16周进行持续评估, 与FDA的反馈一致 (图18)。

[0594] 对于每个剂量水平,在计划的可评价患者数量(至少3名患者)完成DLT观察期后,评估该剂量水平的安全性。剂量递增或递减将根据贝叶斯最优区间(BOIN)设计([Liu和Yuan,2015])来指导,该设计是基于DLT的发生。

[0595] 在给定剂量水平的DLT观察期完成和下一剂量水平的首次给药之间将间隔至少4周,以便在下一剂量浓度水平开始前对潜在的延迟反应有额外的观察时间。

[0596] A组所有队列的招募和DLT评价将在B组开始招募前完成。B组的剂量递增将从比A组中鉴定的RP2D低一个剂量水平开始。

[0597] 主要目标是评估携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的安全性和耐受性,并确定携带hIL12和hIL7的痘苗病毒对晚期或转移性癌症患者的MTD和/或RP2D。次要目标是评估抗肿瘤活性(根据肿瘤大小的百分比变化)、经注射的肿瘤的客观反应率(ORR)、药代动力学和病毒脱落。探索性终点将评价抗肿瘤活性的其他测量值,包括非注射肿瘤直径之和相对于基线的百分比变化、非注射肿瘤的ORR、无进展生存期(PFS)、进展时间(TTP)、反应持续时间(DOR)和总生存期(OS)、以及药代动力学和预测性生物标志物。

[0598] 监测阳性样品的病毒脱落和后续的病毒感染性评估。

[0599] 给药逻辑原理

[0600] 在非临床研究的支持下,FIH研究用的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的起始剂量预计是安全的,而且药理活性最低。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒将以固定的浓度(pfu/mL)给药,剂量的体积将根据肿瘤的大小来调整。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的起始剂量浓度设定为 1×10^7 pfu/mL,每个病人的每个单一病灶和/或每一剂通过肿瘤内给药最多注射6mL。注射的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的体积将取决于肿瘤的大小,以确保对肿瘤细胞有一致的病毒暴露,这是由注射比例(注射的病毒体积/目标肿瘤大小)估计的。

[0601] 上文中在实施例1-15中讨论的非临床药理学数据表明,将携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物以30 μ L的体积肿瘤内给予50mm³的肿瘤(注射比例为0.6)时,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在动物肿瘤模型中的最小生物活性剂量为 2×10^5 pfu。因此,肿瘤内(即目标注射部位)的最小生物活性浓度约为 4×10^6 pfu/cm³肿瘤(= 2×10^5 pfu/50mm³)。预计类似的注射比例对人类肿瘤有效;因此,临床研究中的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒剂量浓度将是与携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物浓度(6.7×10^6 pfu/mL= 2×10^5 pfu/30 μ L)相似的目标,以达到肿瘤中的最小生物活性浓度。因此,这项FIH研究的初始剂量浓度估计为 1×10^7 pfu/mL,根据肿瘤大小(按最长尺寸分类),注射入肿瘤的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒剂量的体积所有不同,以达到注射比例约为0.2~0.8的目标范围。

[0602] 起始剂量也根据重复剂量的非临床毒理学研究结果来评估。在4周的静脉内给药(每周一次,共4剂)后,小鼠中的未观察到不良作用水平(NOEL)估计为 8.5×10^8 pfu/kg,猴子中为 3.4×10^8 pfu/kg。此外,对小鼠进行携带hIL12和hIL7的痘苗病毒替代物的肿瘤内注射后的NOEL估计为每个肿瘤 2×10^7 pfu(最大可行剂量[MFD])。携带hIL12和hIL7的痘苗病毒是一种经过工程改造以能够选择性地在肿瘤细胞中复制的溶瘤痘苗病毒,非临床生物分布研究结果支持携带hIL12和hIL7的痘苗病毒在肿瘤内给药后能够选择性地在肿瘤细胞中复制。通过利用静脉内给药的毒理学研究结果,以全身暴露为基础保守地估计对安全性的影响。 1×10^7 pfu/mL的起始剂量(计划采用的FIH研究中的剂量水平1)估计约为 1.0×10^6 pfu/kg(1×10^7 pfu/mL的给药体积,每60kg人最多6mL)。因此,与最敏感的物种(食蟹猴)

的NOAEL相比,安全边际超过340倍($3.4 \times 10^8 / 1.0 \times 10^6$)。最高计划剂量(剂量水平3)为 5×10^8 pfu/mL (MFD),其估计约为 5.0×10^7 pfu/kg (5.0×10^7 pfu/mL的给药体积,每60kg人最多6mL)。因此,最高计划剂量比食蟹猴中的NOAEL低6.8倍($3.4 \times 10^8 / 5.0 \times 10^7$)。计划采用 1×10^8 pfu/mL的中间剂量水平(剂量水平2),在起始剂量的基础上递加10倍。

[0603] 在FIH研究中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒将通过肿瘤内注射每2周给予一次,分两个28天周期进行,因为在非临床药理学研究中表明,与单次给药相比,以2周的间隔反复给药的抗肿瘤效果更好。没有达到任何单独的治疗中止标准并获得临床益处的患者可以继续延长治疗期(继续28天的周期),由研究者决定。

[0604] 病毒脱落

[0605] 在这项研究中,将收集所有患者的尿液和唾液,以监测病毒脱落。此外,对于皮肤或皮下可触及肿瘤的患者(A组),将进行皮肤的脱落分析。

[0606] 将通过用有效的定量聚合酶链式反应(qPCR)方法检测病毒DNA来监测病毒脱落,随后进行阳性样品的病毒感染性评估。在第1和第2周期,将在给药前收集尿液、唾液和皮肤(仅A组)样品,并在给药后3小时、6小时和24小时以及给药后第4和第8天的任何时候进行密集监测。在最后一个给药周期后(治疗结束[EOT]时)以及EOT后2、6和10周,将进行稀疏采样,作为后续监测的一部分,以确保病毒完全消除。

[0607] 患者群体的特征

[0608] 招募晚期或转移性实体肿瘤患者,这些患者不符合治愈性意图的手术治疗或药物治疗的条件,并且在现有的标准治疗中取得进展或不符合条件。患者必须具有可测量的疾病(实体肿瘤反应评价标准[RECIST])和ECOG表现状态0或1。过去2年内患有需要系统治疗的活动性或既往自身免疫性或炎症性疾病的患者将被排除,所述疾病包括炎症性皮肤病或严重湿疹、炎症性肠病、憩室炎(憩室病除外)、乳糜泻、系统性红斑狼疮、肉芽肿综合征、韦格纳综合征、格雷夫斯病、类风湿性关节炎、骨盆炎、葡萄膜炎等。

[0609] 已知有人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎表面抗原、表明有急性或慢性感染的乙型肝炎核心免疫球蛋白M或免疫球蛋白G抗体或丙型肝炎病史的患者被排除。这些患者的免疫系统的改变可能会对研究治疗对免疫细胞群的作用的特征造成影响。赞助商将根据这项研究中新获取的数据来评估是否取消这一排除标准。

[0610] 递增队列将包括可进行肿瘤内注射的皮肤或皮下肿瘤患者(A组)和在超声或CT引导下可进行肿瘤内注射的内脏病变患者(B组)。可以考虑内窥镜可触及的病变。A组(皮肤/皮下)扩展队列将包括以下肿瘤特异性队列:头颈部的鳞状细胞癌,皮肤科、泌尿生殖系统/妇科、胃肠道和其他皮肤/皮下可触及的实体肿瘤。

[0611] 研究设计

[0612] 这项I期研究将评估携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的安全性、耐受性、药代动力学特性和病毒脱落,并确定晚期或转移性实体肿瘤患者的MTD和/或RP2D。此外,该研究将通过经注射/非注射肿瘤大小的百分比变化、经注射/非注射肿瘤的ORR、PFS、TTP、DOR和OS来评价抗肿瘤活性。疾病反应和进展将由研究者根据RECIST 1.1和免疫改编RECIST(imRECIST)标准[Hodi et al, 2018]进行评价。imRECIST是对免疫相关RECIST的改编,并考虑到潜在的延迟反应,这种延迟反应可能在最初明显的放射学进展之前出现,包括新病变的出现。

[0613] 在这项研究中,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒将作为单一疗法给药;然而,通过修

改方案可以加入其他队列,以进一步评价作为单一药剂和/或与另一种抗癌剂(如PD-1/PD-L1抑制剂)联用的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒。在递增阶段,携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的起始浓度为 1×10^7 pfu/mL。每个肿瘤要注射的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的体积是根据每个目标肿瘤的大小来计算的,以确保各个病灶内药物暴露的一致性。病变将由研究者选择进行注射。在方案规定的大小范围内,最大和/或最具症状的病变应被优先选择注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒。在第1和第2周期中,病变选择可能不会改变。相同的肿瘤将在第1和第2周期的每个时间点被注射。患者将在第1和第2周期的第1天或之前分别进行基线和治疗中活检。

[0614] 统计学方面的考虑

[0615] 这项研究将招募约105名患者。在剂量递增阶段,将招募约21至30名患者。样本量不是基于统计能力计算。招募的患者数量将取决于DLT的发生率。估计的患者数量应该为研究的剂量递增和安全性目标提供足够的信息。

[0616] 在剂量扩展阶段,最初将招募60名患者,纳入6个肿瘤特异性扩展队列(每个队列10名患者)。假设经注射的肿瘤的真实ORR为20%,则在10名患者中观察到至少1名反应者的预测概率约为89%。扩展队列中的患者总数将取决于观察到的抗肿瘤活性和生物标志物免疫反应。

[0617] 扩展队列的规模可能会增加到25名患者,以更好地评估所有肿瘤的ORR(即不限于经注射的肿瘤)。假设真实的ORR至少为20%,则在25名患者中观察到至少5名反应者的预测概率为58%。就25名患者样品中的比例的频率估计而言,对于观察到的20%的反应率,90%双侧置信区间的界限为(7%,33%)。

[0618] 实施例25.携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的I期非盲单一疗法研究

[0619] 在晚期或转移性实体肿瘤的日本患者中进行携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的1期非盲单一疗法研究,这些患者不符合治愈性意图的手术治疗或药物治疗的条件,并且在现有的标准治疗中取得进展或不符合条件。

[0620] 该研究包括在超声或CT引导下可进行肿瘤内注射的内脏病变患者:

[0621] V1组:肝脏中的原发性或转移性肿瘤

[0622] V2组:原发性或转移性胃部肿瘤

[0623] 该研究包括一个剂量递增阶段和一个剂量扩展阶段。计划在剂量递增阶段招募最多18名患者(V1组),在剂量扩展阶段招募约30名患者(V1组20名,V2组10名)。在剂量扩展阶段可能会加入10名其他患者(第V3组),以评价另外一种尚未确定的肿瘤类型。

[0624] 对于所有患者,研究将由以下时期构成:筛选期(最多28天)、初始治疗期(两个28天的周期)、任选的延长治疗期(继续28天的周期)和随访期(安全性和生存期随访)。

[0625] 患者将在初始治疗期中的两个28天周期各自的第1天和第15天通过肿瘤内注射到同一肿瘤中而接受指定剂量的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒单一疗法。第2周期后,没有达到任何单独的治疗中止标准并获得临床益处的患者可以继续延长治疗期(继续28天的周期),由研究者决定。在延长治疗期内,患者将在每个周期的第1天和第15天接受携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的肿瘤内注射,直到达到治疗中止标准。在延长治疗期内,可以治疗先前未被选用于肿瘤内注射携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的肿瘤(包括先前被选用于活检的肿瘤)。

[0626] 剂量递增阶段将评估携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的安全性和耐受性以及日本患者的MTD/RP2D。在剂量递增阶段的安全性结果出来之前,剂量扩展队列将在剂量递增阶段的最后一名患者完成DLT评估期后至少4周开放招募。

[0627] 主要、次要和探索性目标与实施例24中描述的美国FIH研究的目标相似。

[0628] 实施例26. 携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的I期非盲研究

[0629] 一项携带hIL12和hIL7的痘苗病毒的1期非盲研究(安全性先导阶段,然后是携带hIL12和hIL7的痘苗病毒与检查点抑制剂[CPI]的联合疗法)正在晚期或转移性实体肿瘤的中国患者中进行。

[0630] 本研究将包括晚期或转移性实体肿瘤患者,这些患者不符合治愈性治疗的条件,并且在现有的标准治疗中取得进展或不符合条件:

[0631] • A组:可进行肿瘤内注射的皮肤或皮下肿瘤,包括头颈部鳞状细胞癌、鼻咽癌、肉瘤、泌尿生殖系统/妇科癌症或其他皮肤/皮下可触及的实体肿瘤的患者。

[0632] • B组:在超声或CT引导下可进行肿瘤内注射的肝转移灶(任何原发性肿瘤类型)。

[0633] 该研究包括一个安全性先导阶段和一个RP2D扩展阶段。在安全性先导阶段计划招募约24名患者,在RP2D扩展阶段计划招募70名患者。

[0634] 在这项研究的所有部分中,研究期将由以下时期构成:筛选(最长28天)、治疗(两个28天的周期)、安全性随访(最后一次给药后16周)和生存期随访(至少12周,直到死亡、撤销同意或研究结束)。

[0635] 所有患者都将通过肿瘤内注射接受总共4剂的携带hIL12和hIL7的痘苗病毒(研究第1、15、29和43天)。此外,联合队列的患者将从第1周期第1天开始通过静脉内输液接受CPI疗法,并根据当地产品标签继续治疗。

[0636] 主要目标是评估携带hIL12和hIL7的痘苗病毒作为单一疗法和与CPI疗法联用的安全性和耐受性,和确定中国患者的RP2D。次要和探索性目标与实施例24中描述的美国FIH研究的目标相似。

序列表

<110> 阿斯泰来制药有限公司 (ASTELLAS PHARMA INC.)

<120> 基因工程改造的溶瘤痘苗病毒及其使用方法

<130> 127206-03920

<140>

<141>

<150> 62/893,316

<151> 2019-08-29

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 317

<212> PRT

<213> 痘苗病毒 (Vaccinia virus)

<400> 1

```

Met Lys Thr Ile Ser Val Val Thr Leu Leu Cys Val Leu Pro Ala Val
1           5           10           15
Val Tyr Ser Thr Cys Thr Val Pro Thr Met Asn Asn Ala Lys Leu Thr
           20           25           30
Ser Thr Glu Thr Ser Phe Asn Asp Lys Gln Lys Val Thr Phe Thr Cys
           35           40           45
Asp Gln Gly Tyr His Ser Leu Asp Pro Asn Ala Val Cys Glu Thr Asp
           50           55           60
Lys Trp Lys Tyr Glu Asn Pro Cys Lys Lys Met Cys Thr Val Ser Asp
65           70           75           80
Tyr Val Ser Glu Leu Tyr Asp Lys Pro Leu Tyr Glu Val Asn Ser Thr
           85           90           95
Met Thr Leu Ser Cys Asn Gly Glu Thr Lys Tyr Phe Arg Cys Glu Glu
           100          105          110
Lys Asn Gly Asn Thr Ser Trp Asn Asp Thr Val Thr Cys Pro Asn Ala
           115          120          125
Glu Cys Gln Pro Leu Gln Leu Glu His Gly Ser Cys Gln Pro Val Lys
           130          135          140
Glu Lys Tyr Ser Phe Gly Glu Tyr Met Thr Ile Asn Cys Asp Val Gly
145          150          155          160
Tyr Glu Val Ile Gly Ala Ser Tyr Ile Ser Cys Thr Ala Asn Ser Trp
           165          170          175
Asn Val Ile Pro Ser Cys Gln Gln Lys Cys Asp Met Pro Ser Leu Ser

```

	180		185		190
Asn Gly Leu Ile Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ile Gly Gly Val Ile His					
	195		200		205
Leu Ser Cys Lys Ser Gly Phe Thr Leu Thr Gly Ser Pro Ser Ser Thr					
	210		215		220
Cys Ile Asp Gly Lys Trp Asn Pro Ile Leu Pro Thr Cys Val Arg Ser					
225		230		235	240
Asn Glu Lys Phe Asp Pro Val Asp Asp Gly Pro Asp Asp Glu Thr Asp					
	245		250		255
Leu Ser Lys Leu Ser Lys Asp Val Val Gln Tyr Glu Gln Glu Ile Glu					
	260		265		270
Ser Leu Glu Ala Thr Tyr His Ile Ile Ile Val Ala Leu Thr Ile Met					
	275		280		285
Gly Val Ile Phe Leu Ile Ser Val Ile Val Leu Val Cys Ser Cys Asp					
	290		295		300
Lys Asn Asn Asp Gln Tyr Lys Phe His Lys Leu Leu Pro					
305		310		315	
<210> 2					
<211> 101					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<221> 来源					
<223> /注="人工序列的描述：合成多肽"					
<400> 2					
Met Lys Thr Ile Ser Val Val Thr Leu Leu Cys Val Leu Pro Ala Val					
1	5		10		15
Val Tyr Ser Thr Cys Val Arg Ser Asn Glu Lys Phe Asp Pro Val Asp					
	20		25		30
Asp Gly Pro Asp Asp Glu Thr Asp Leu Ser Lys Leu Ser Lys Asp Val					
	35		40		45
Val Gln Tyr Glu Gln Glu Ile Glu Ser Leu Glu Ala Thr Tyr His Ile					
	50		55		60
Ile Ile Val Ala Leu Thr Ile Met Gly Val Ile Phe Leu Ile Ser Val					
65		70		75	80
Ile Val Leu Val Cys Ser Cys Asp Lys Asn Asn Asp Gln Tyr Lys Phe					
	85		90		95
His Lys Leu Leu Pro					
	100				

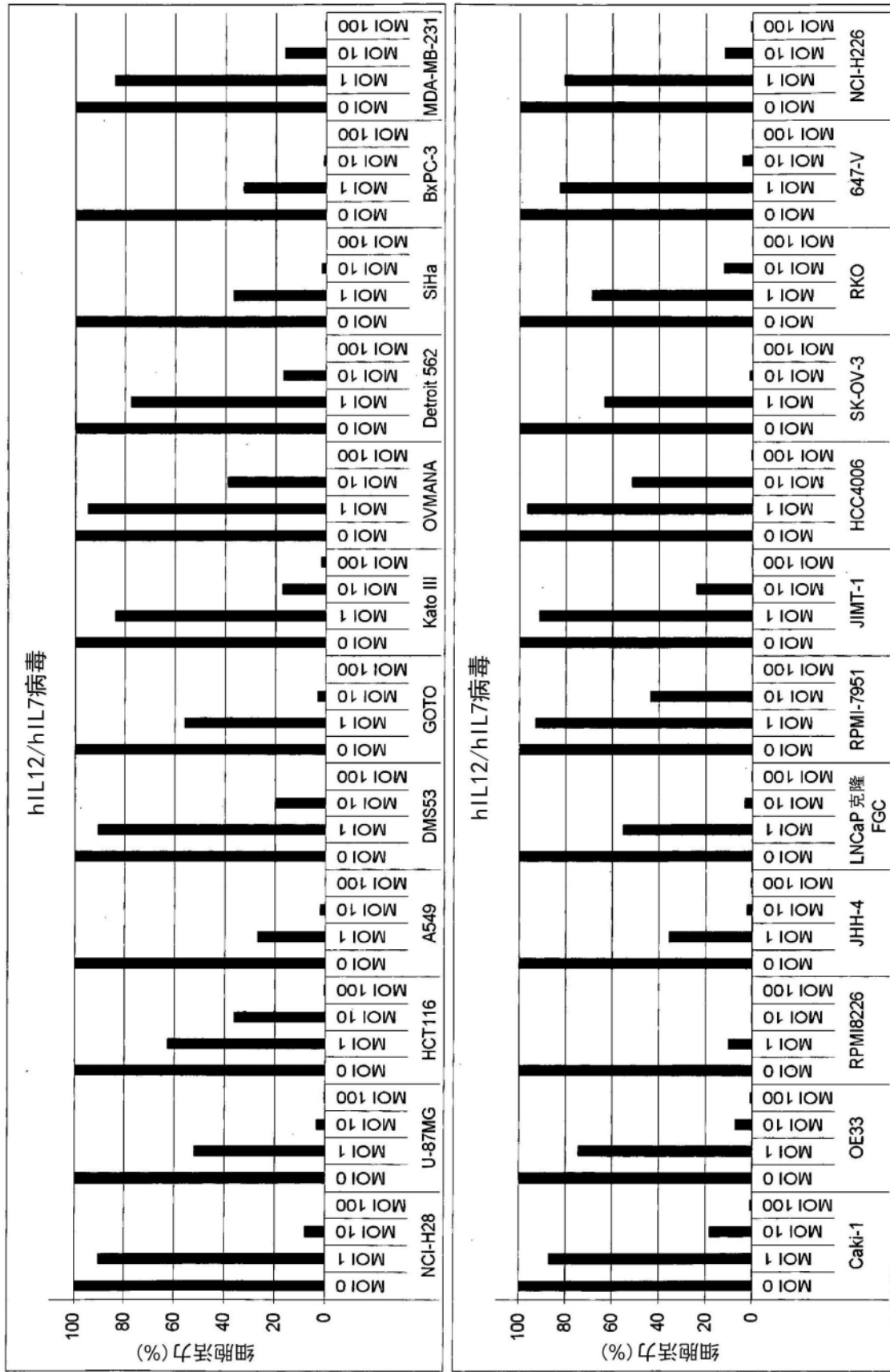


图1

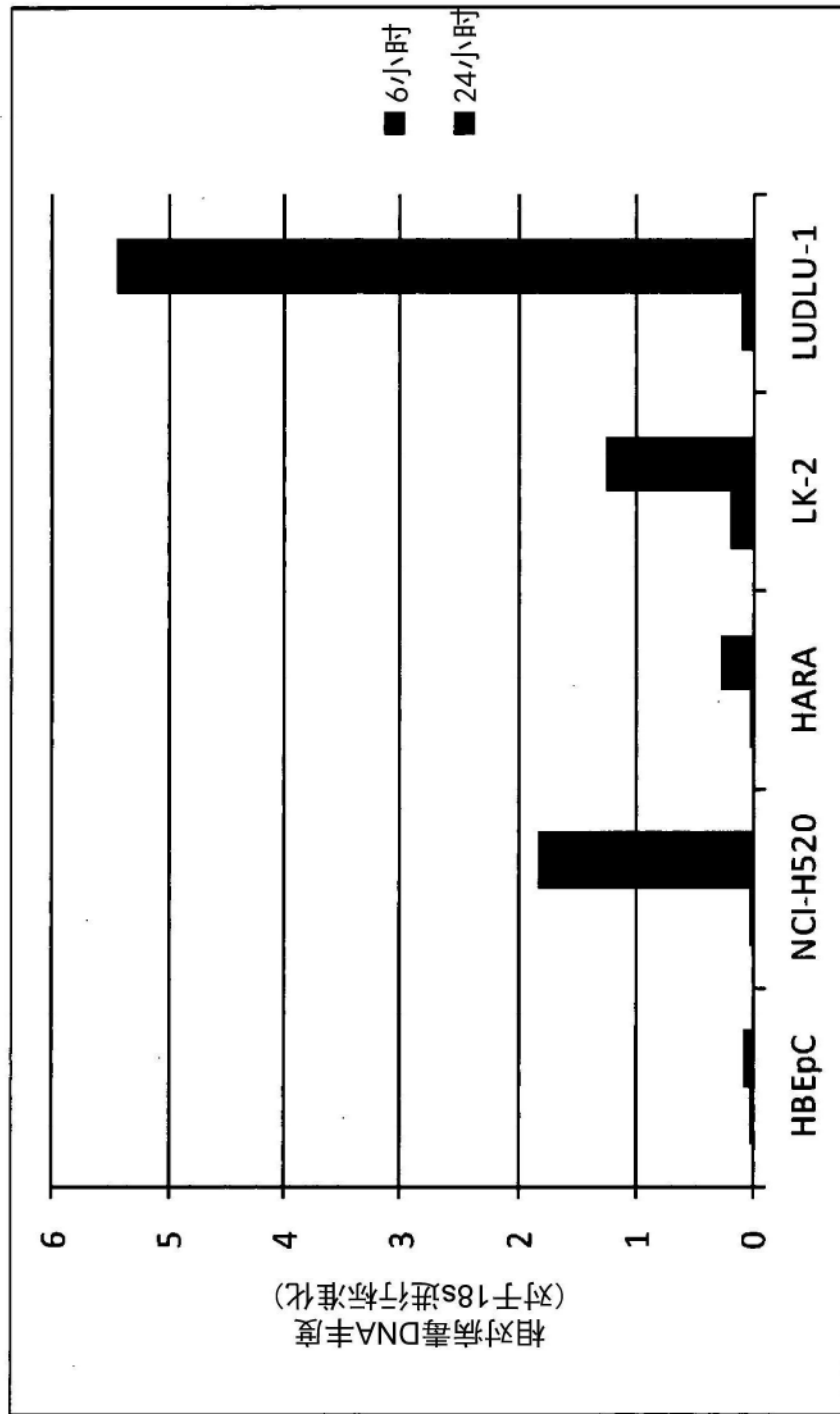


图2

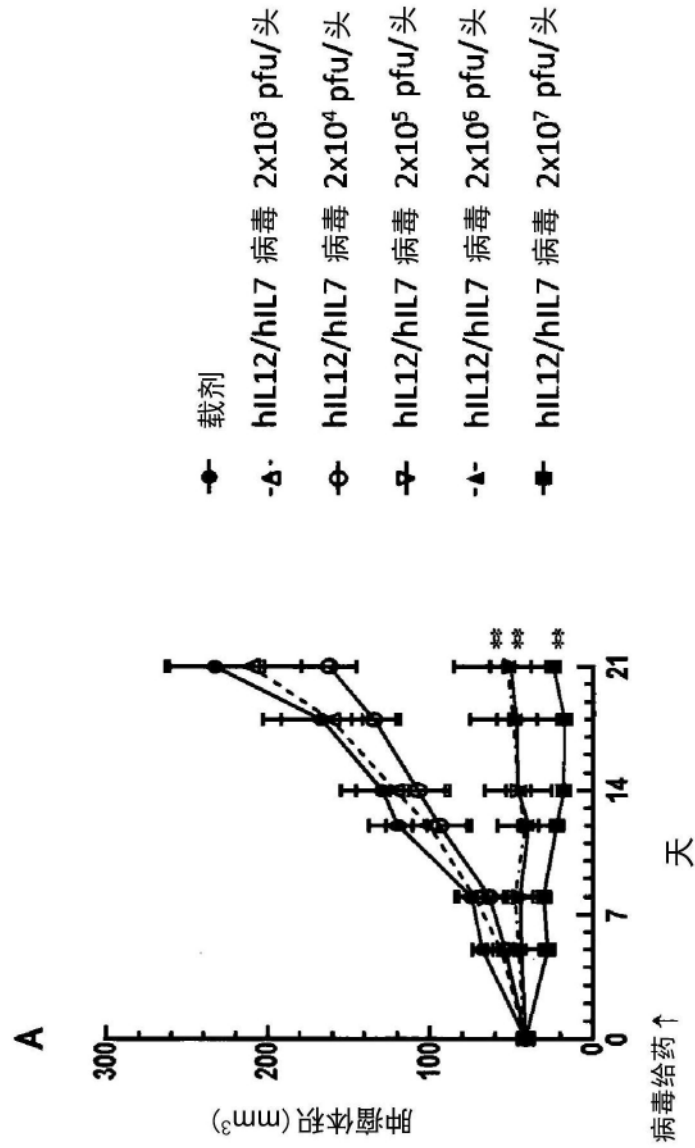


图3A

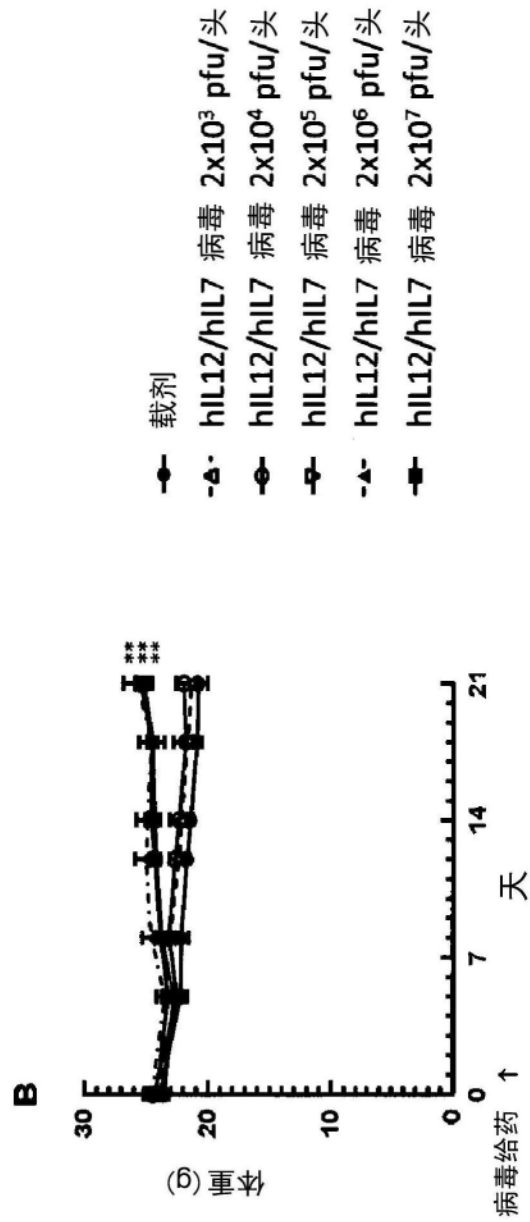


图3B

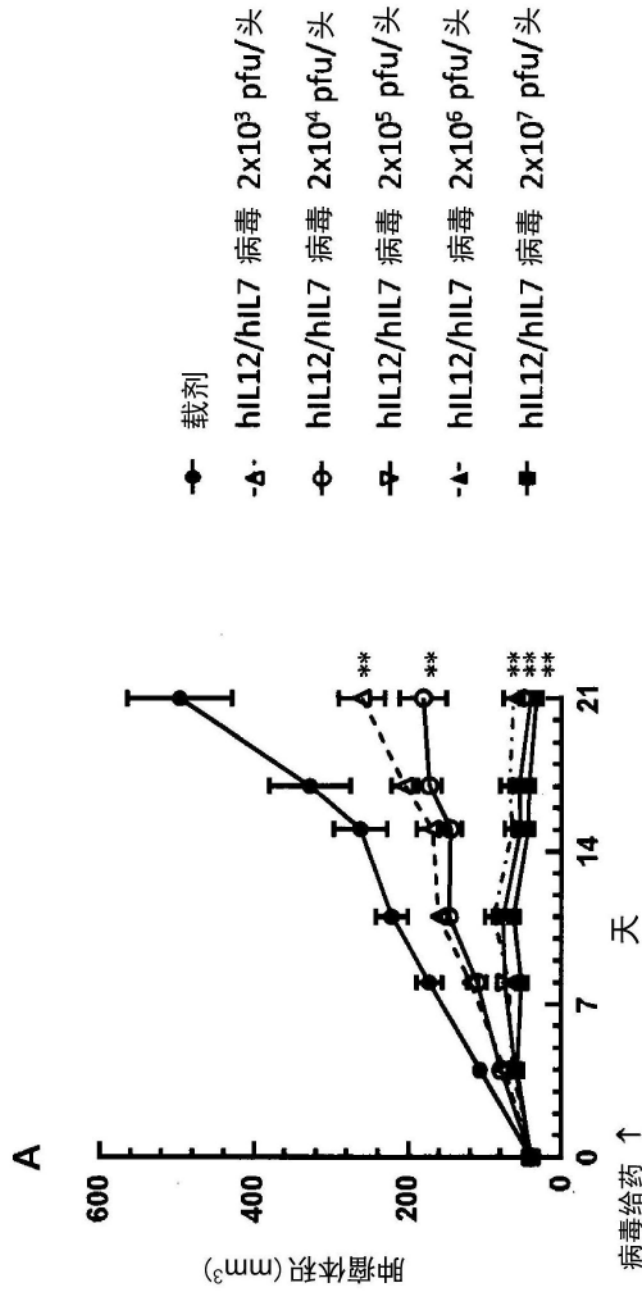


图4A

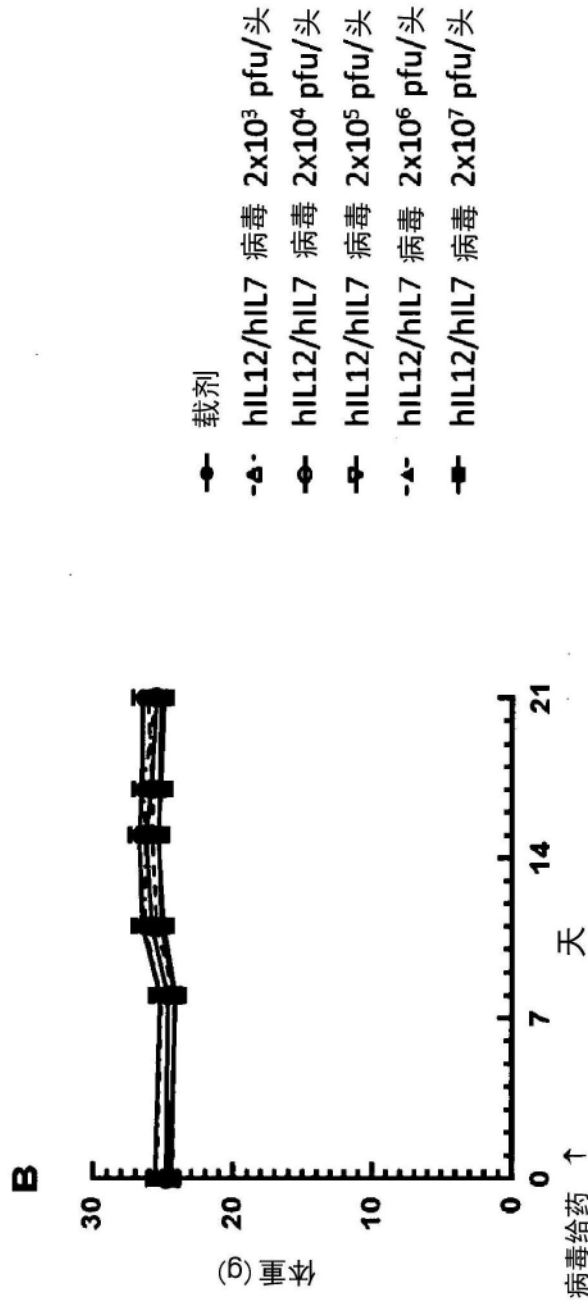


图4B

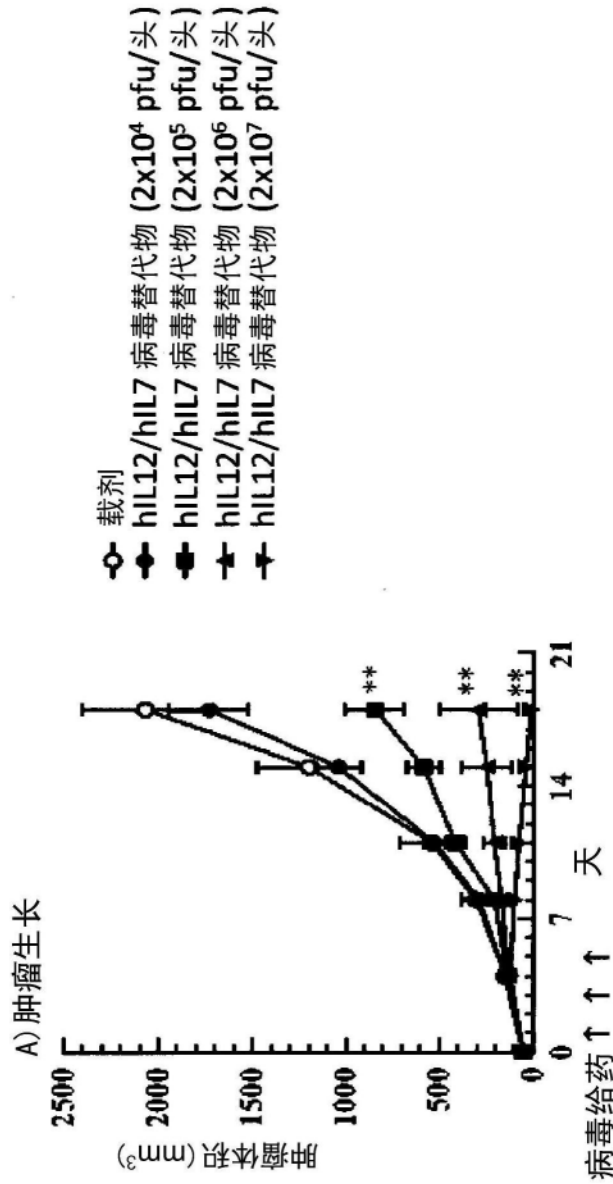


图5A

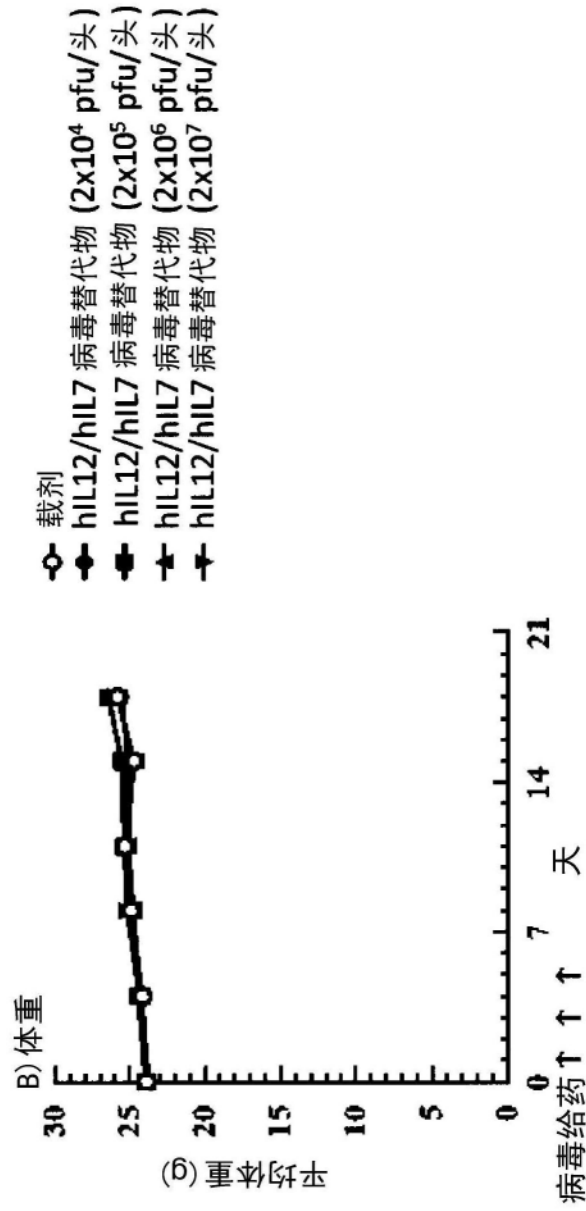


图5B

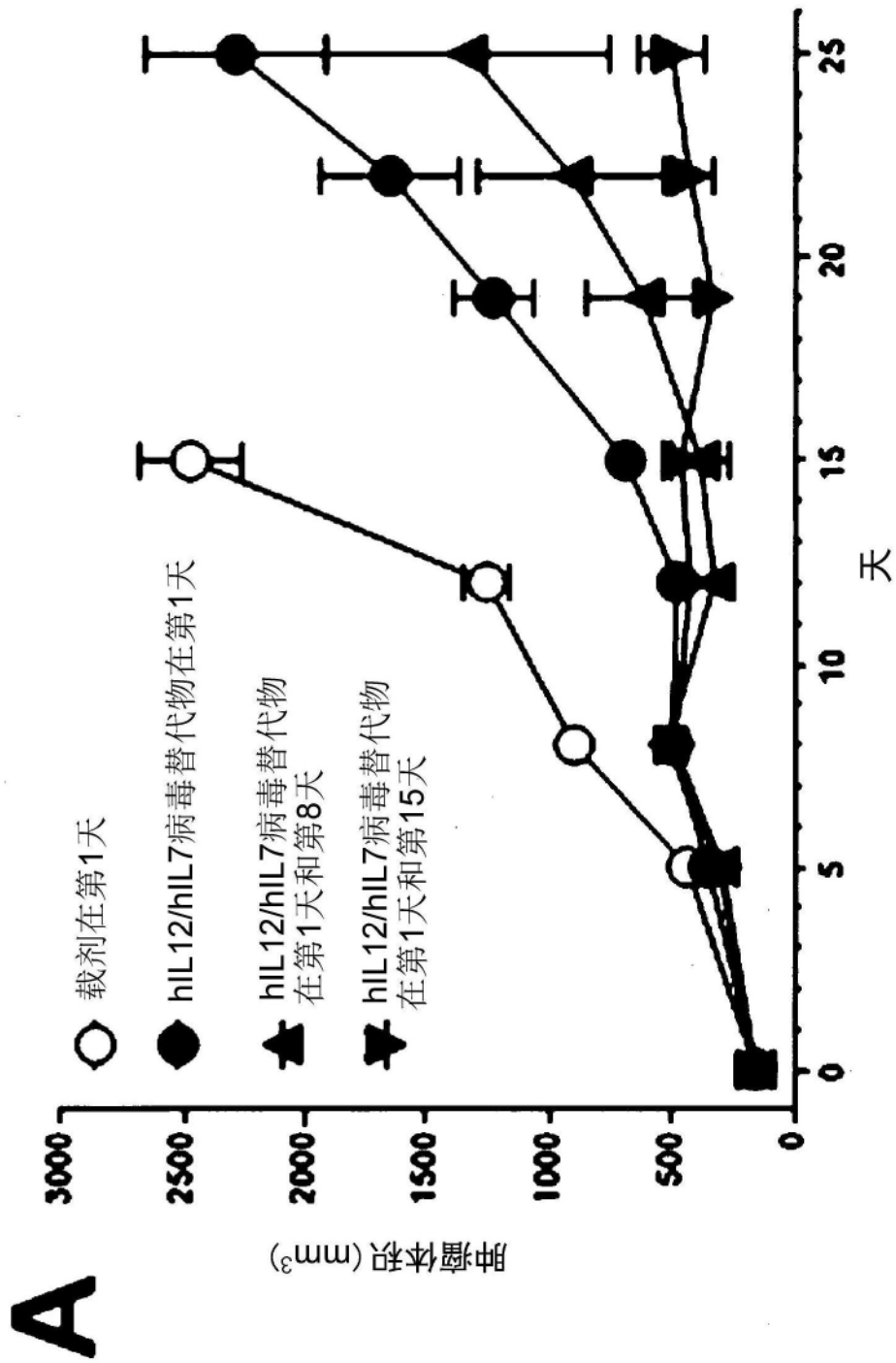


图6A

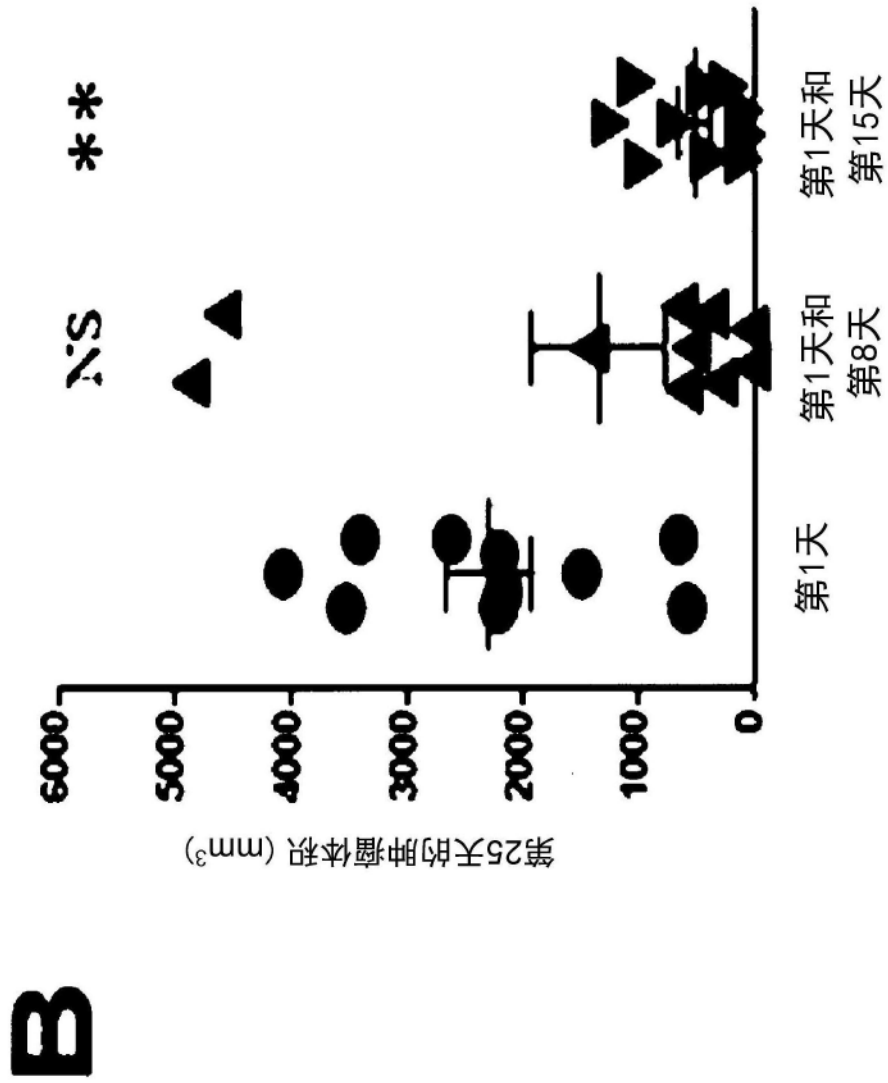


图6B

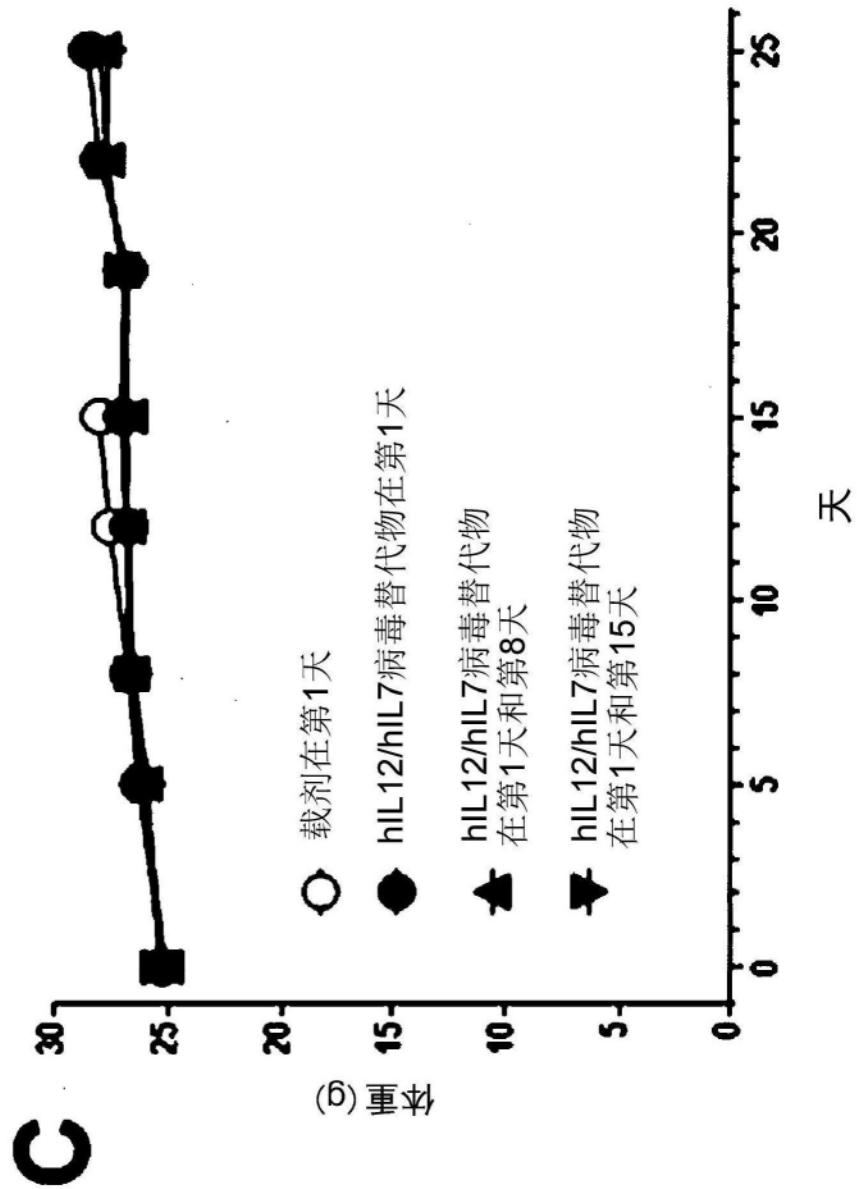


图6C

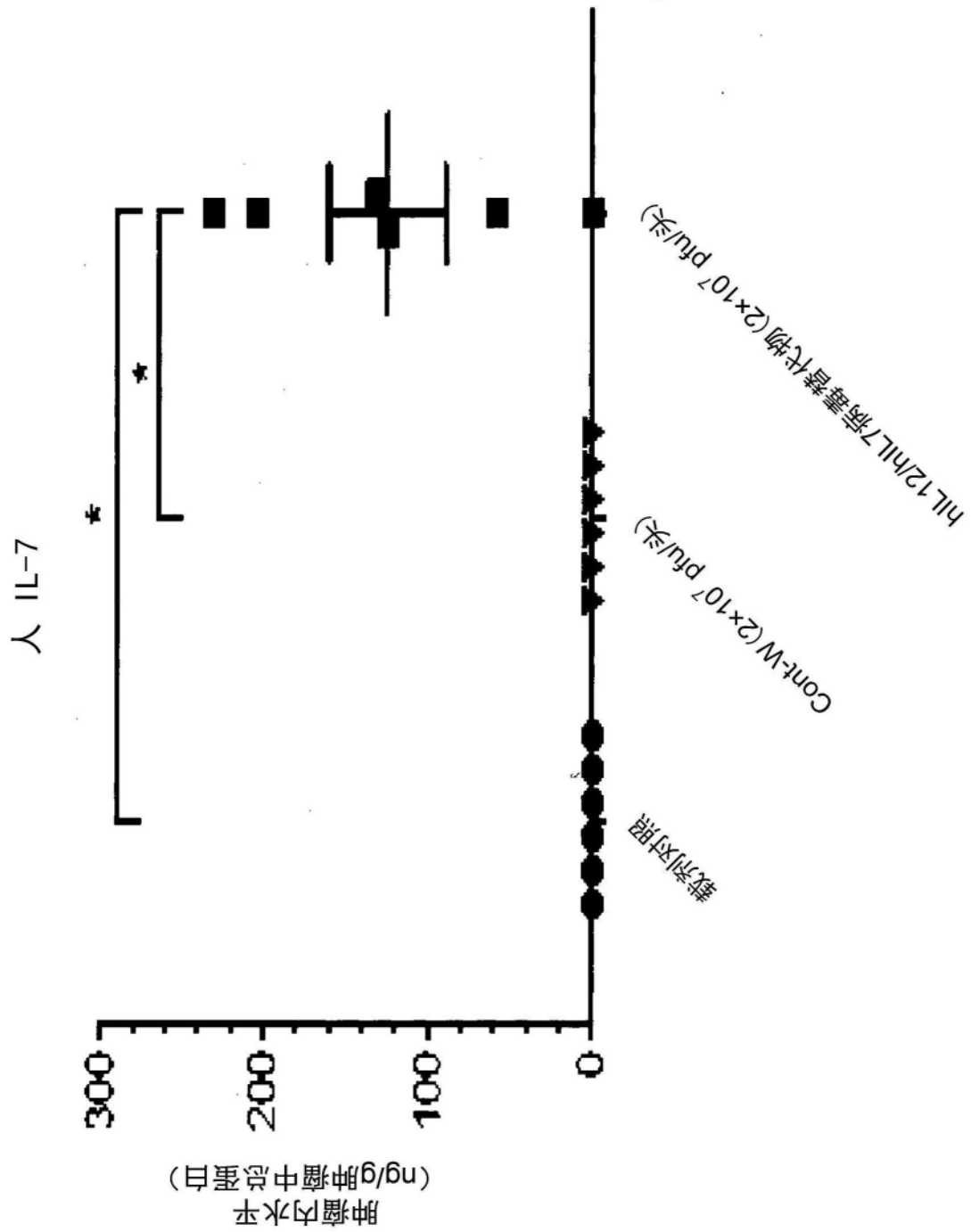


图7A

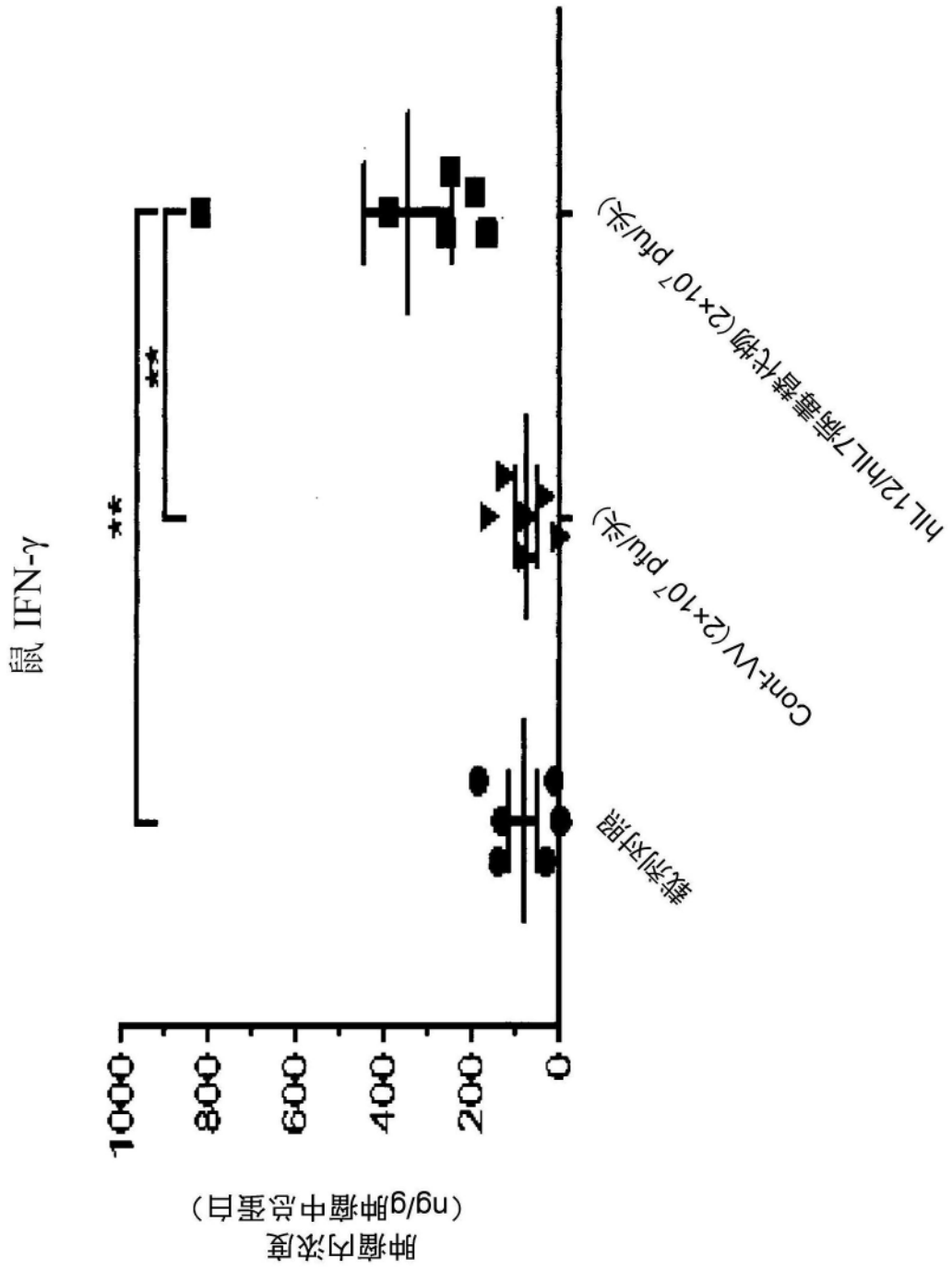


图7C

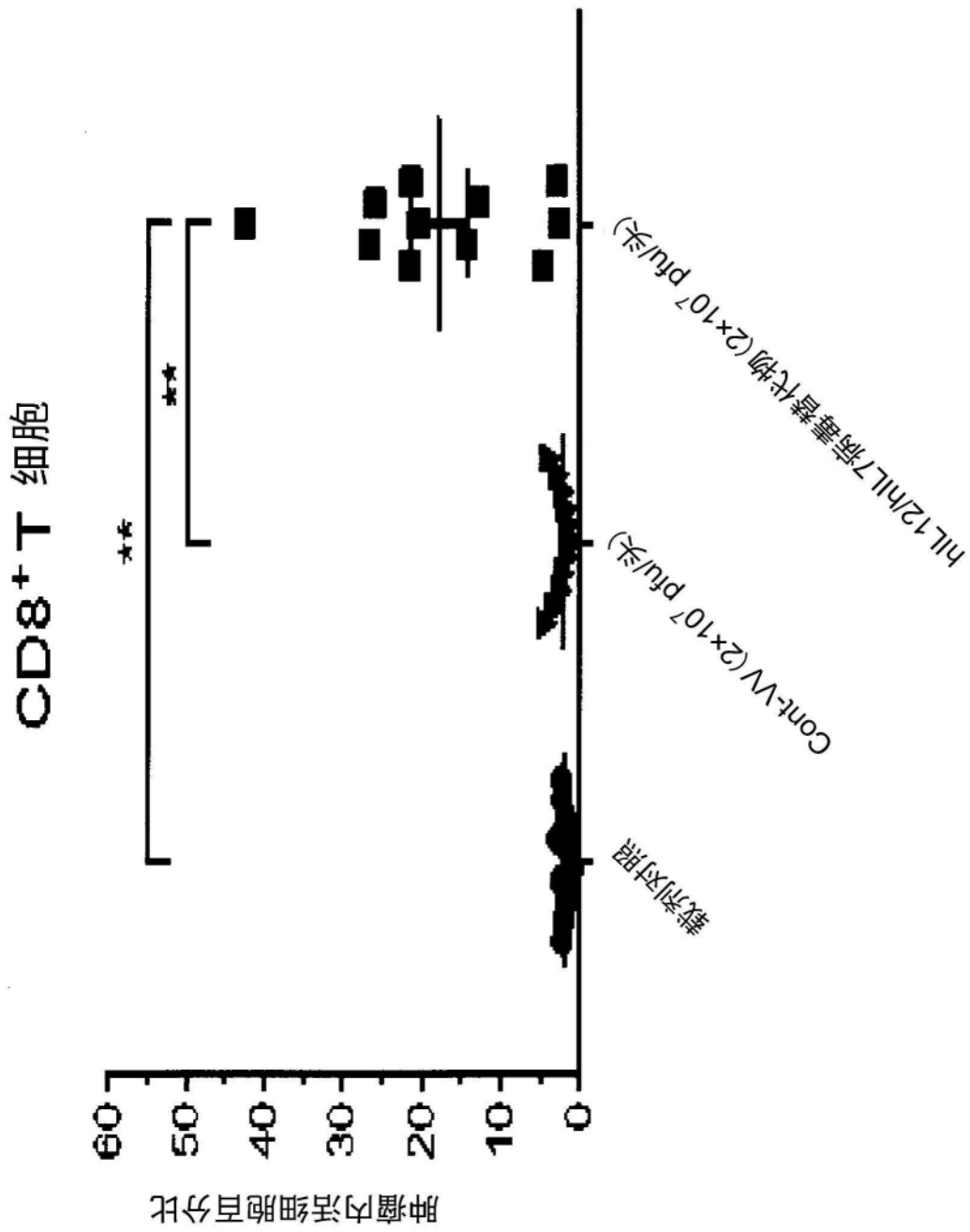


图8B

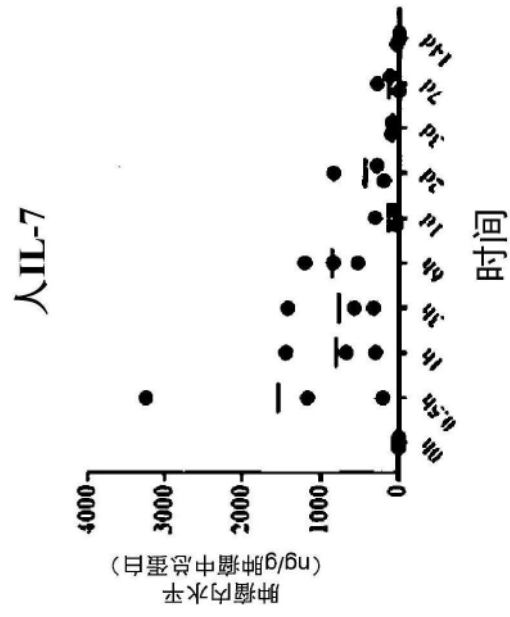


图9A

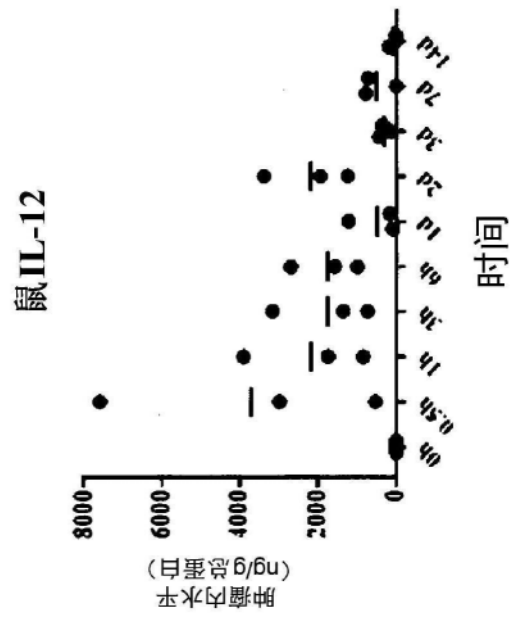


图9B

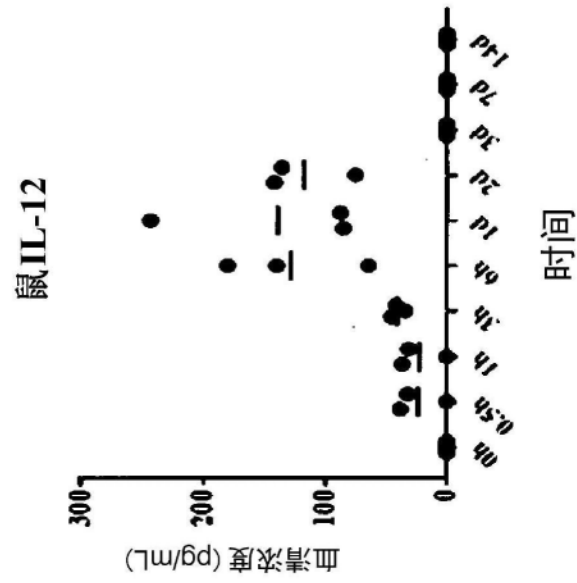


图10B

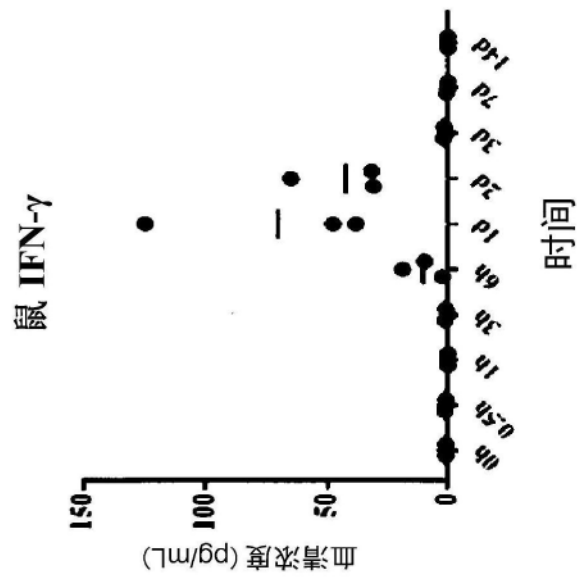


图10C

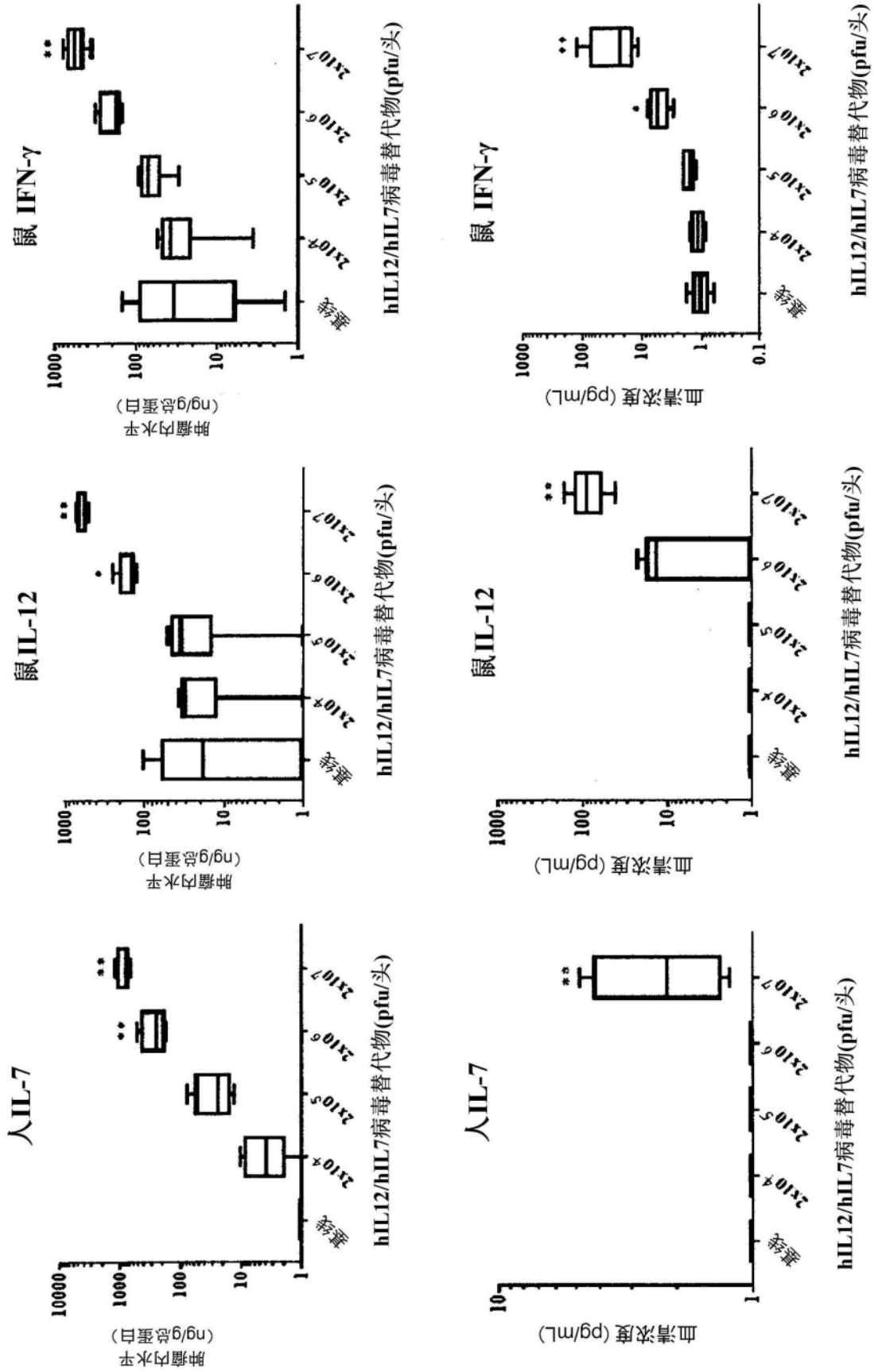


图11A

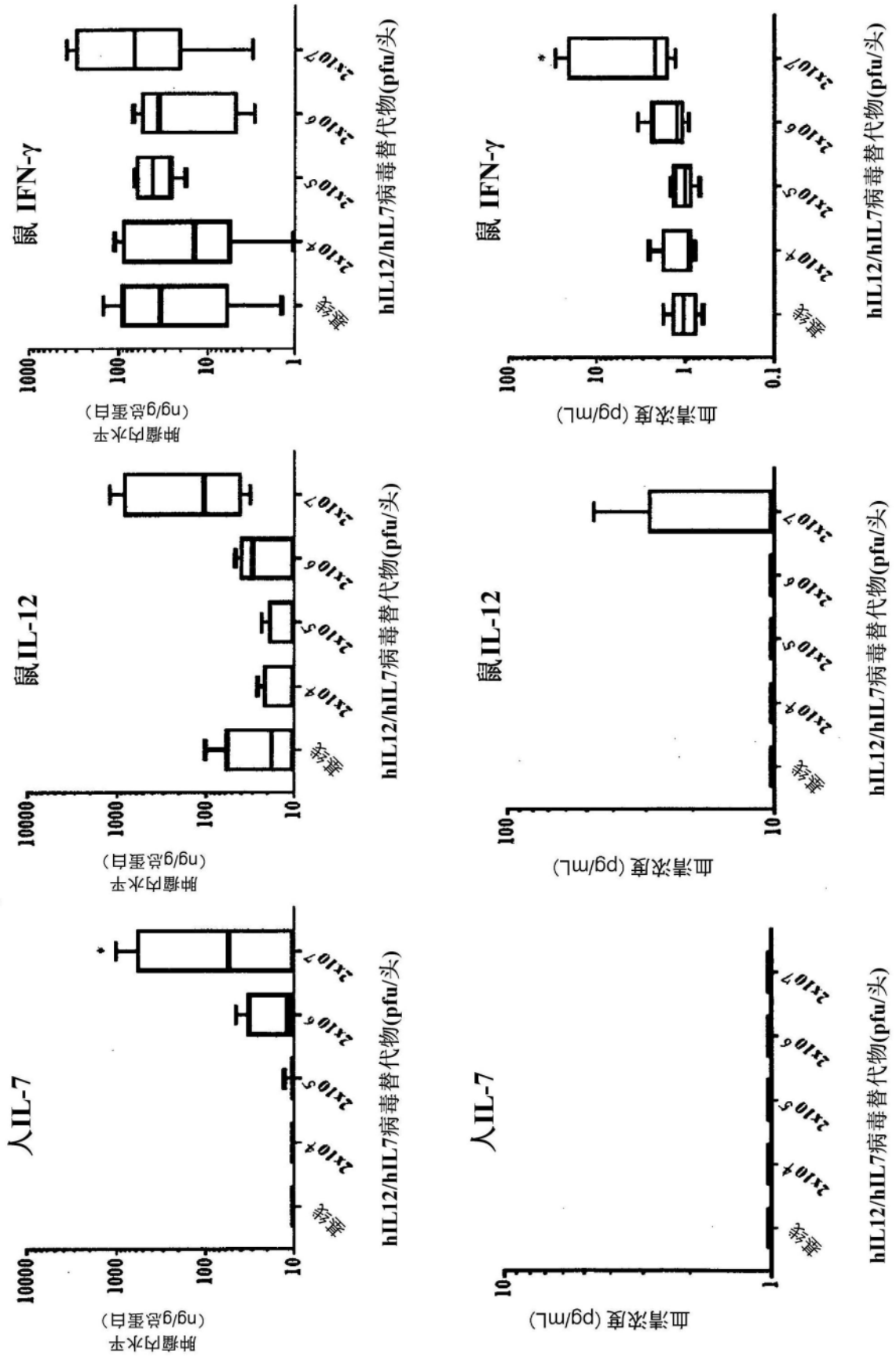


图11B

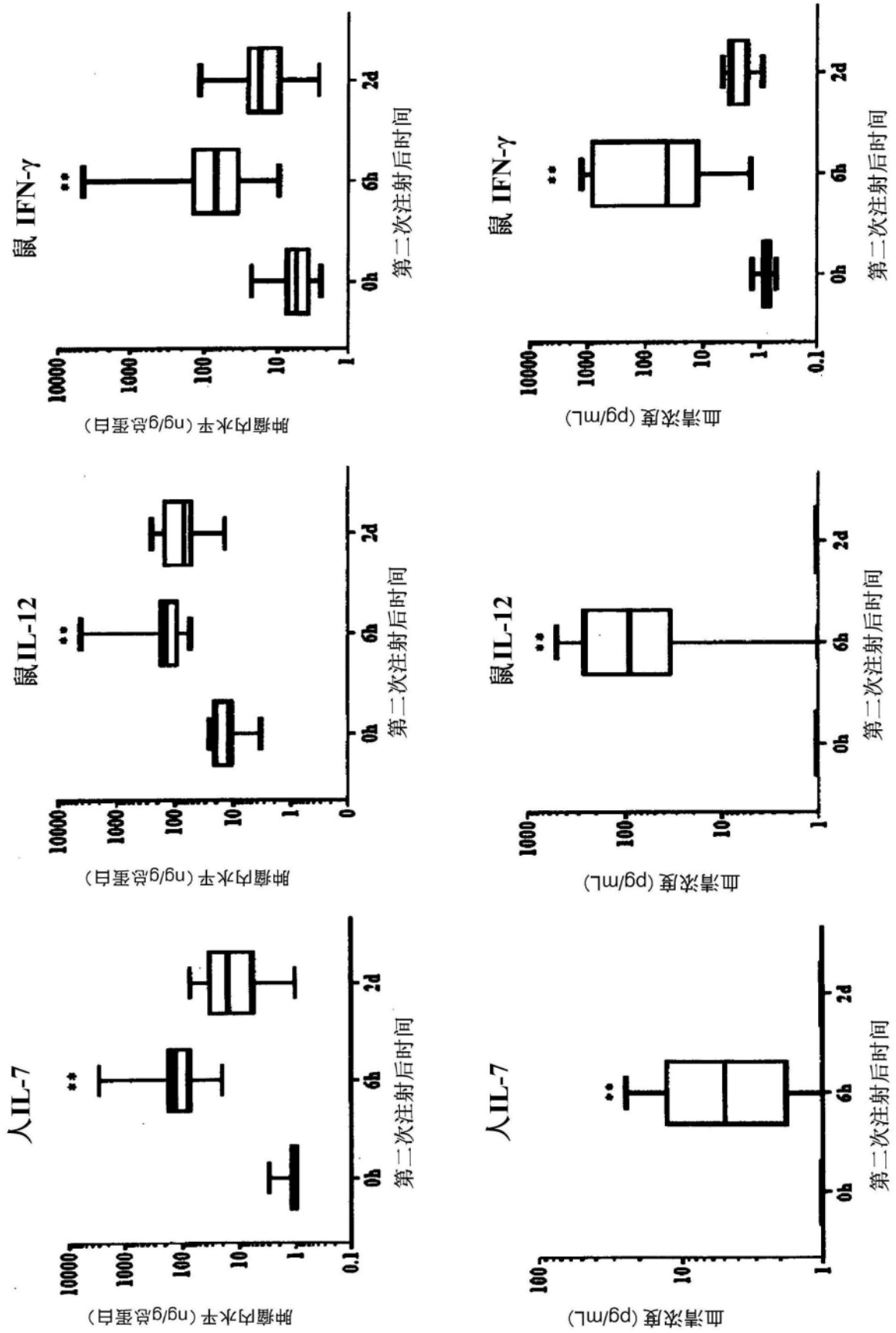


图12

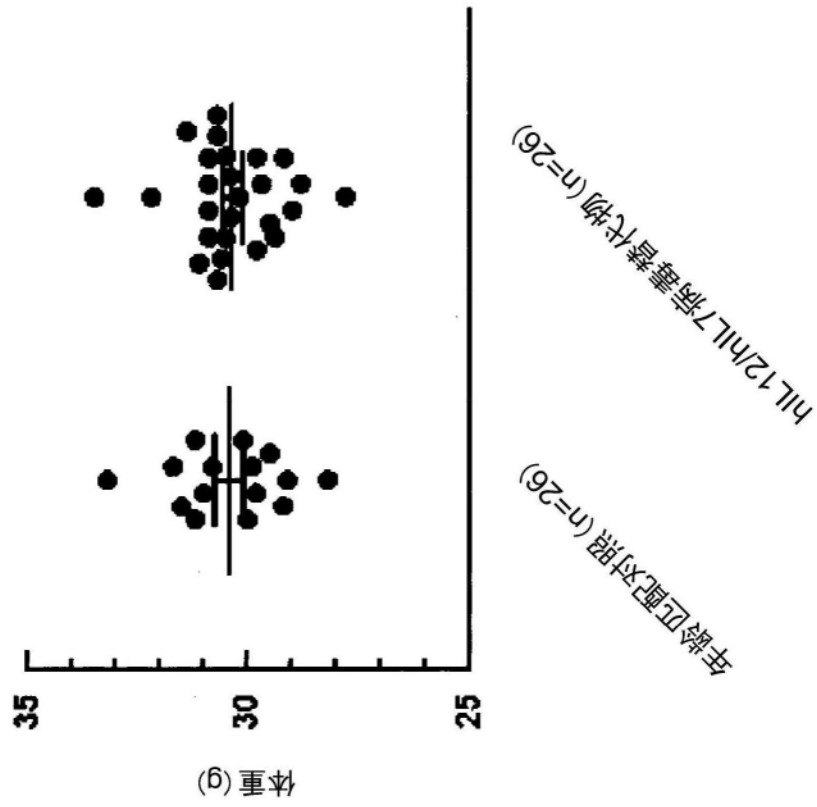


图13

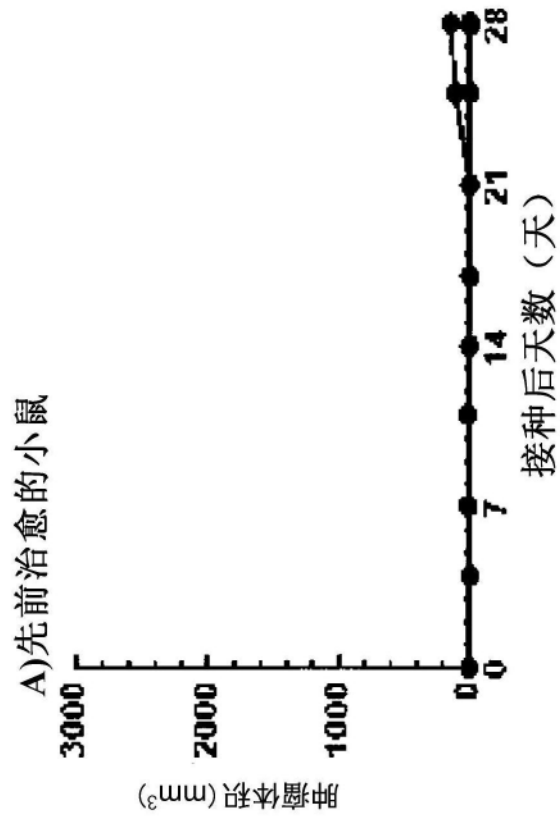


图14A

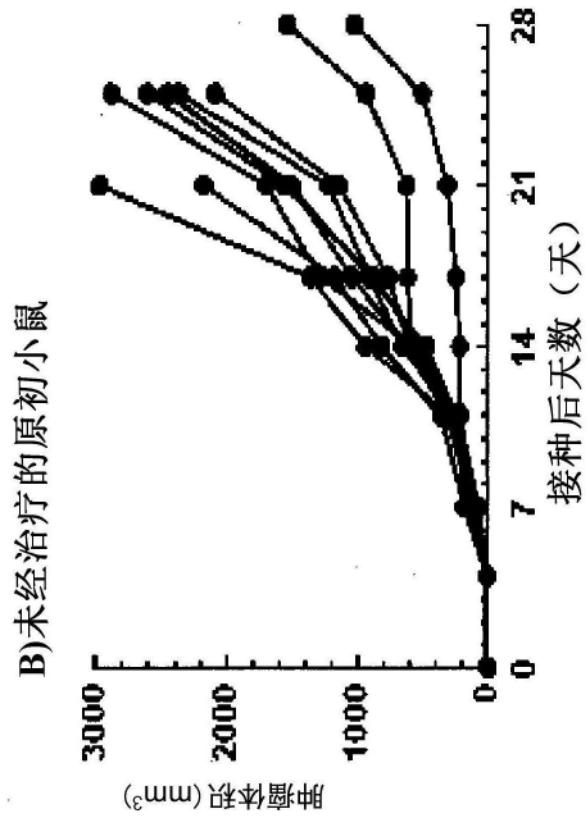


图14B

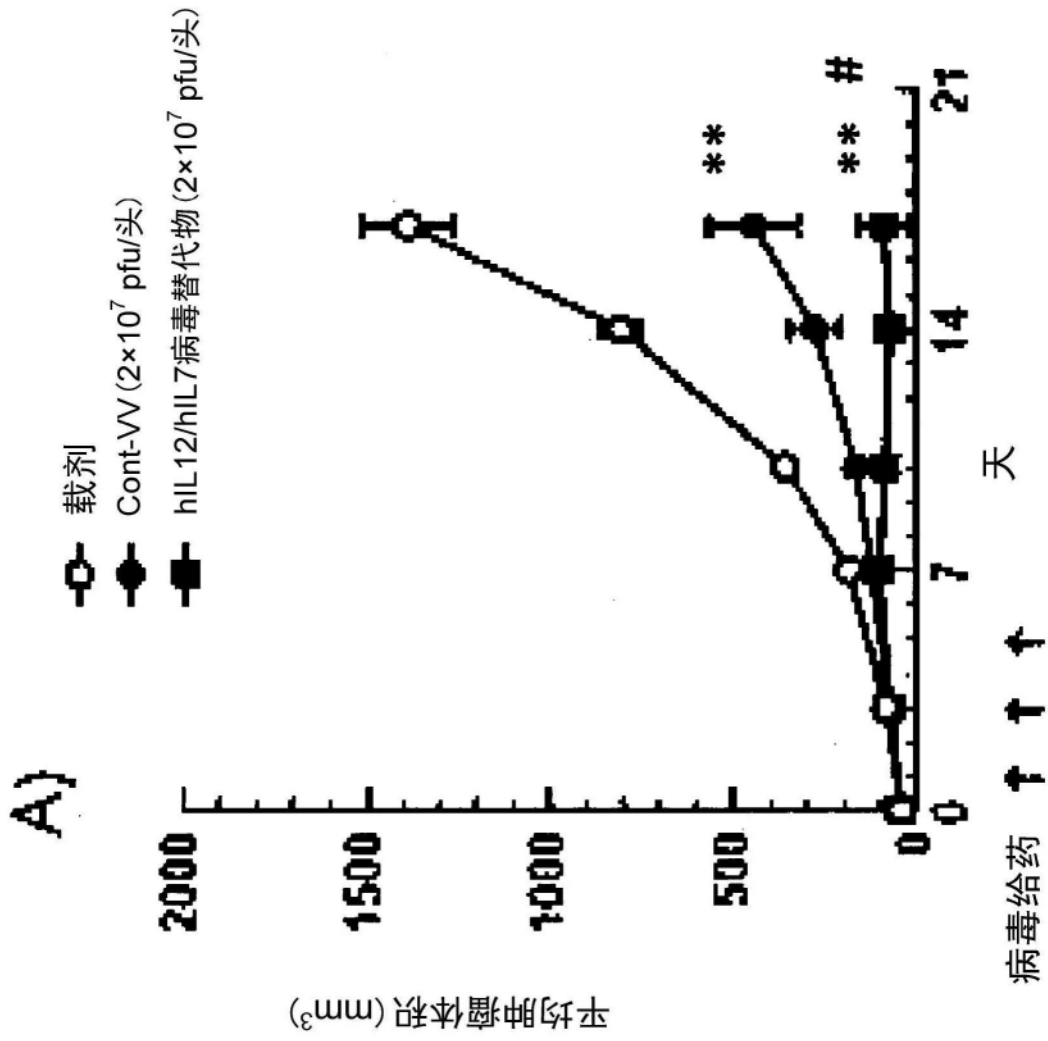


图15A

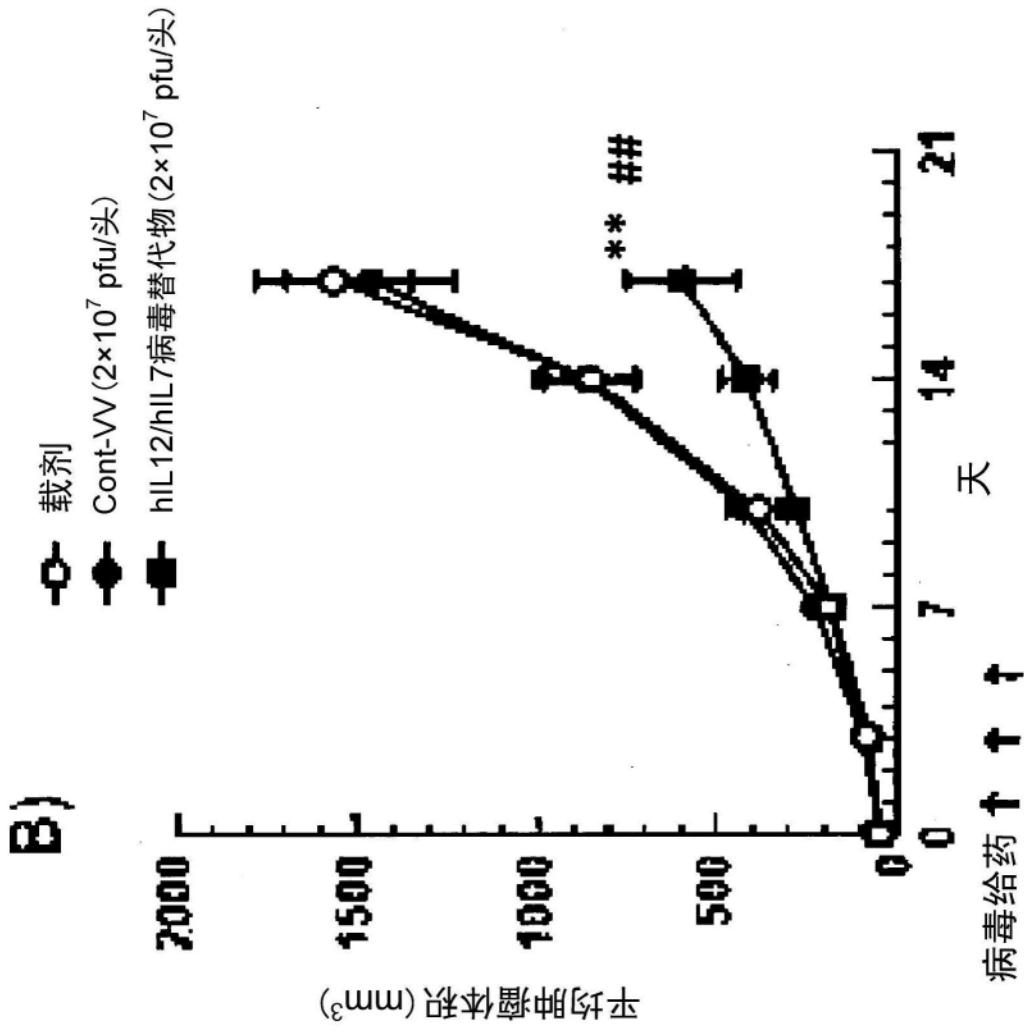


图15B

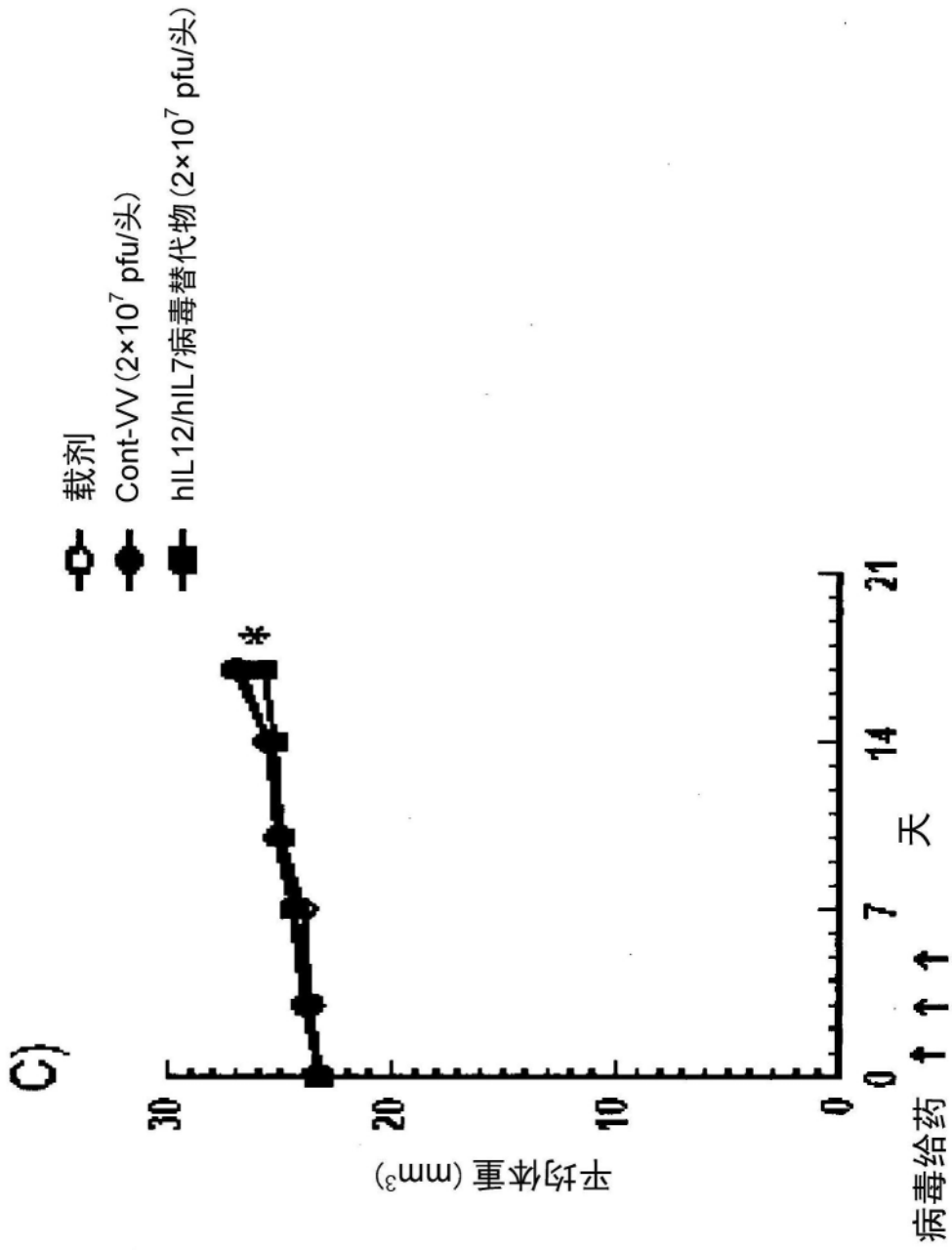


图15C

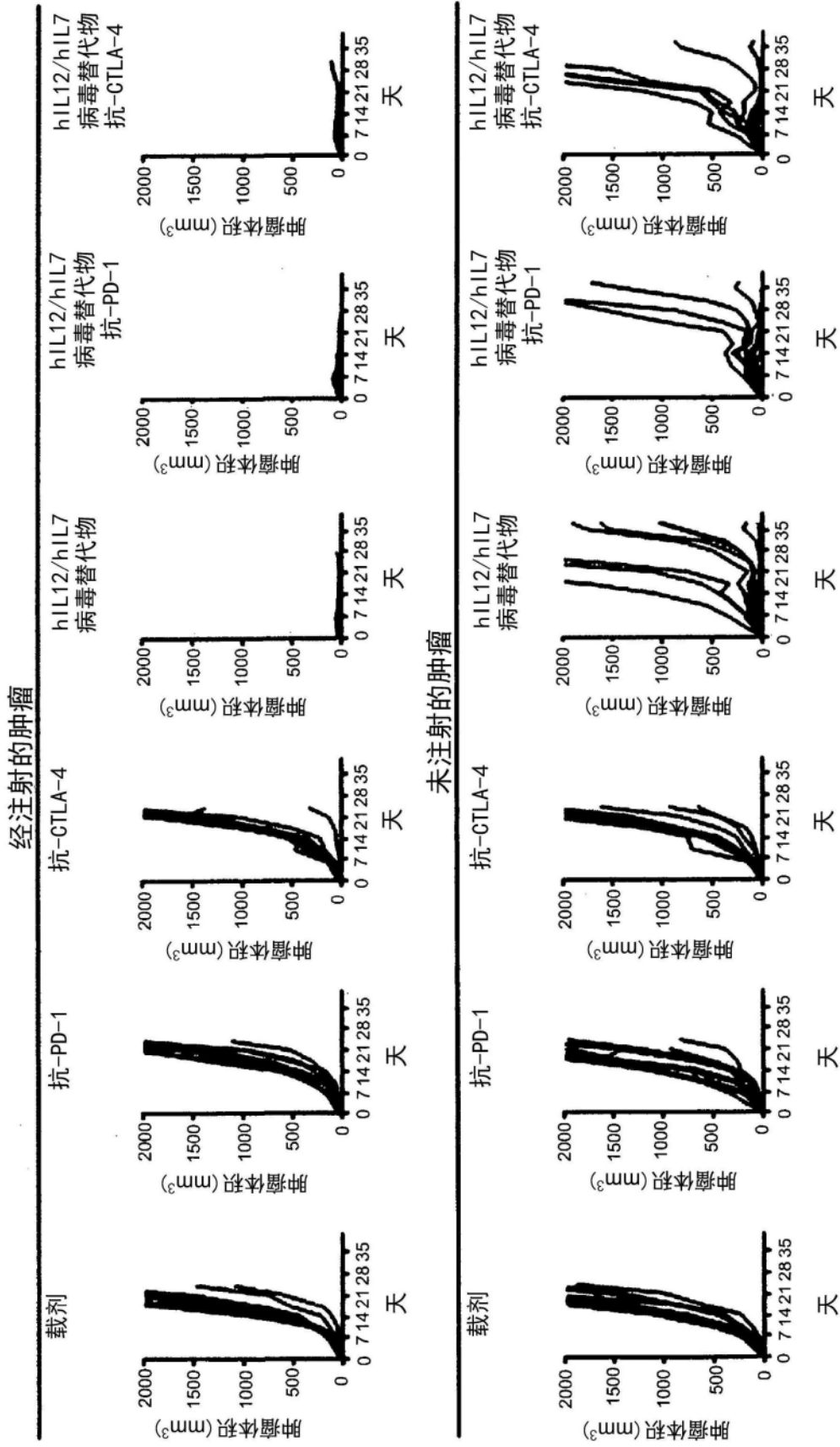


图16

第2部分: RP2D扩展

第1部分: 剂量递增^{1,2}

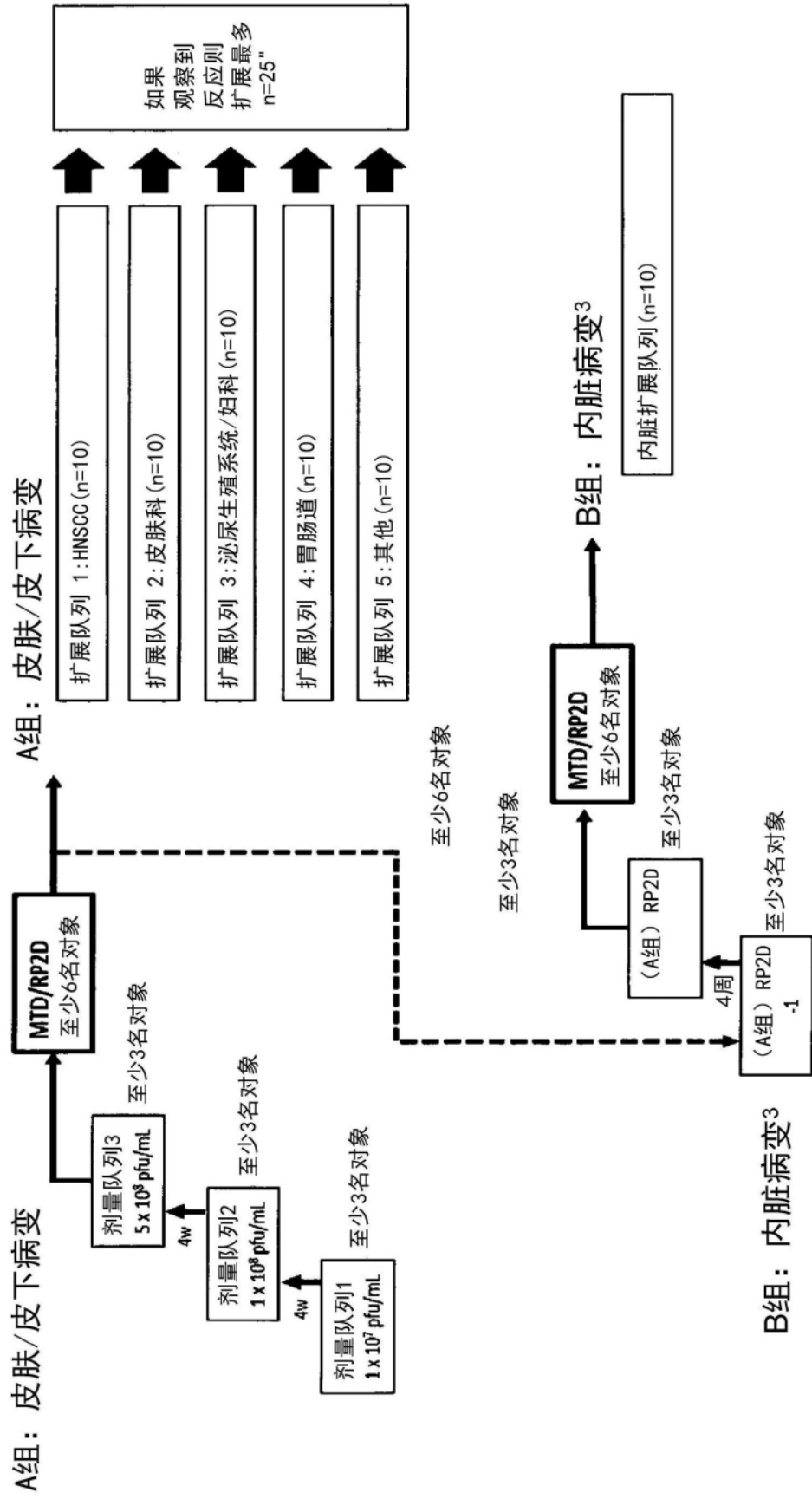


图17

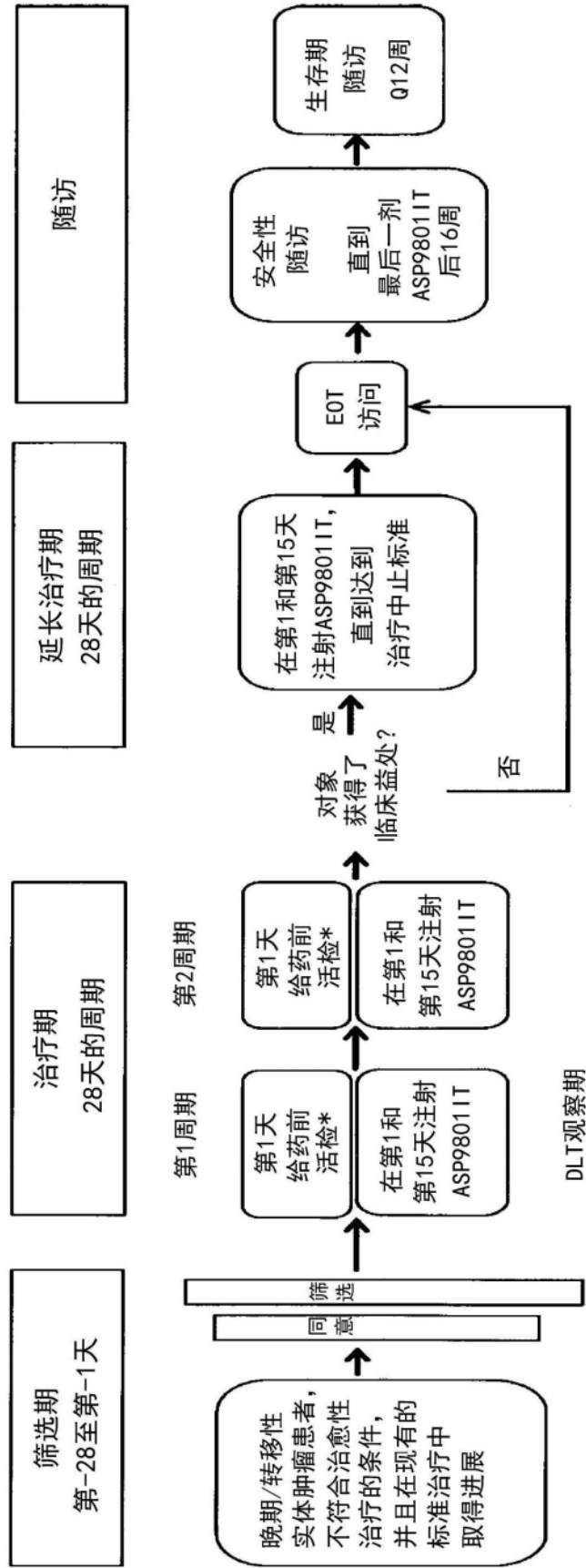


图18

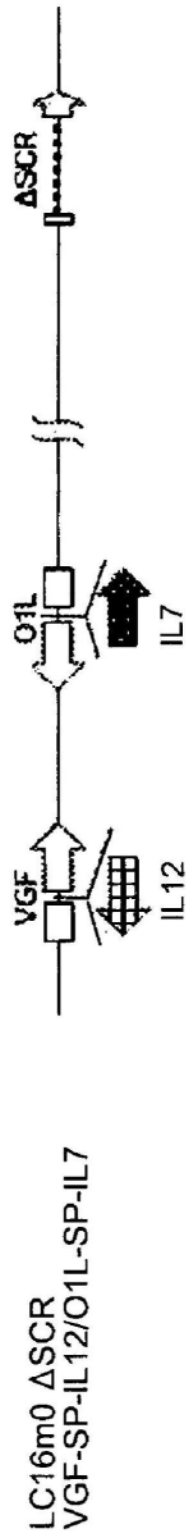


图19