



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 114632149 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 10

(21) 申请号 202011492017.5

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.16

A61K 35/768 (2015.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114632149 A

(56) 对比文件

Oliver Waidmann等.Recent developments with immunotherapy for hepatocellular carcinoma.Expert Opinion on Biological Therapy.

(43) 申请公布日 2022.06.17

(73) 专利权人 上海三维生物技术有限公司

地址 201206 上海市浦东新区中国(上海)

自由贸易试验区桂桥路1150号

审查员 谷城橙

(72) 发明人 琚姝 伊萌 刘建飞 顾玮蕾

杨文昊

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司

公司 31266

专利代理师 徐迅 崔佳佳

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

溶瘤病毒和免疫调节剂在协同抑制晚期肝癌中的应用

(57) 摘要

本发明公开了溶瘤病毒和免疫调节剂在协同治疗肿瘤中的应用。具体地,本发明提供了一种活性成分组合的用途,所述活性成分组合包括重组人5型腺病毒和抗PD-1单克隆抗体,并且所述组合用于制备协同治疗肿瘤的药物组合物。实验证明,本发明的活性成分组合能够有效地协同抑制肿瘤,尤其是晚期肝癌生长,并且可显著降低毒副作用,因此可在治疗肿瘤中得到广泛应用。

1. 一种活性成分组合的用途,其特征在于,所述活性成分组合包括第一活性成分溶瘤病毒和第二活性成分免疫调节剂,并且所述组合用于制备协同治疗晚期肝癌的药物组合物或药盒;

其中,所述的溶瘤病毒为重组人5型腺病毒,所述重组人5型腺病毒是指在所述病毒的基因组中,删除了人5型腺病毒的E1B-55kDa和E3区基因片段;所述的免疫调节剂为抗PD-1抗体。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的溶瘤病毒根据肿瘤体积以 $0.5 \times 10^{12}$ VP至 $2.5 \times 10^{12}$ VP的剂量施用;所述免疫调节剂以1至20 mg/kg的剂量施用。

3. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述免疫调节剂以2至15 mg/kg的剂量施用。

4. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述免疫调节剂以3至10 mg/kg的剂量施用。

## 溶瘤病毒和免疫调节剂在协同抑制晚期肝癌中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗肿瘤药物技术领域,具体地涉及溶瘤病毒和免疫调节剂在协同抑制肿瘤中的应用及其相关药物。

### 背景技术

[0002] 肝癌的治疗方式主要有手术、局部消融治疗、分子靶向治疗和全身系统化疗等,并逐步形成以手术为主的综合治疗模式。但是,这些治疗对于晚期肝癌患者并不理想,且预后较差。

[0003] 溶瘤病毒是指一类天然的或经过基因工程技术进行改构修饰,能够选择性感染肿瘤细胞进而裂解肿瘤细胞的病毒。早期发现一些感染病毒的肿瘤患者其肿瘤消退,但由于技术所限,无法控制其病原性。后来,随着基因工程技术的进步,可以对病毒进行改构,使其应用更加安全,肿瘤杀伤效率提高等。

[0004] 免疫治疗是指通过免疫调节剂来增强或抑制机体的免疫功能以达到治疗疾病目的的治疗方式。其中,针对程序性死亡受体(programmed cell death protein 1,PD-1)和细胞程序性死亡-配体1(Programmed cell death ligand 1,PD-L1)的抑制剂是近年世界范围内备受瞩目的抗肿瘤免疫治疗药物。PD-1抑制剂是阻断PD-1的一类新药,可激活免疫系统以攻击肿瘤,并用于治疗某些类型的癌症。2017年9月,美国FDA批准PD-1单抗——纳武利尤单抗(Opdivo,简称“O药”)用于多吉美耐药的肝癌患者;2018年11月,另一个PD-1单抗——帕博利珠(Keytruda,简称“K药”)获得FDA批准用于多吉美耐药的晚期肝癌治疗。目前,O药和K药均已被中国国家药品监督管理局批准上市,并且在国内取得了一定治疗效果。但仍然存在大多数肿瘤患者对其治疗效果差或不响应的情况。

[0005] 因此,探索与常规治疗方式不同的新型疗法和药物来改善晚期肝癌的疗效和预后极为重要。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的就是提供了一种有效且毒副作用低的治疗肿瘤的治疗方法和药物,具体地本发明提供了重组人5型腺病毒与抗PD-1抗体在协同治疗肿瘤中的用途。

[0007] 本发明的第一方面,提供了一种活性成分组合的用途,所述活性成分组合包括第一活性成分溶瘤病毒和第二活性成分免疫调节剂,并且所述组合用于制备协同治疗肿瘤的药物组合物或药盒。

[0008] 在另一优选例中,所述的溶瘤病毒为重组人5型腺病毒。

[0009] 在另一优选例中,所述的溶瘤病毒为商品名安柯瑞的重组人5型腺病毒注射液。

[0010] 在另一优选例中,在所述的溶瘤病毒的基因组中,删除了人5型腺病毒的E1B-55kDa和E3区基因片段。

[0011] 在另一优选例中,所述的免疫调节剂选自下组:抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、结合PD-1的融合蛋白、结合PD-L1的融合蛋白或其组合。

[0012] 在另一优选例中,所述的溶瘤病毒根据肿瘤体积以 $0.5 \times 10^{12}$ VP至 $2.5 \times 10^{12}$ VP的剂量施用;所述免疫调节剂以1至20mg/kg的剂量施用,较佳地2至15mg/kg,更佳地3至10mg/kg。

[0013] 在另一优选例中,所述的肿瘤为肝癌。

[0014] 在另一优选例中,所述的肿瘤为晚期肝癌。

[0015] 本发明的第二方面,提供了一种活性成分组合,所述组合由溶瘤病毒和免疫调节剂构成。

[0016] 在另一优选例中,所述溶瘤病毒是指重组人5型腺病毒或具有相同功能的衍生物,较佳地,为重组人5型腺病毒。

[0017] 在另一优选例中,所述的溶瘤病毒为商品名安柯瑞的重组人5型腺病毒注射液。

[0018] 在另一优选例中,在所述的溶瘤病毒的基因组中,删除了人5型腺病毒的E1B-55kDa和E3区基因片段。

[0019] 在另一优选例中,所述的免疫调节剂选自下组:抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、结合PD-1的融合蛋白、结合PD-L1的融合蛋白或其组合。

[0020] 本发明的第三方面,提供了一种药物组合物,所述的药物组合物包括(a)溶瘤病毒、(b)免疫调节剂和(c)药学上可接受的载体。

[0021] 在另一优选例中,所述溶瘤病毒是指重组人5型腺病毒或具有相同功能的衍生物,较佳地,为重组人5型腺病毒。

[0022] 在另一优选例中,所述的溶瘤病毒为商品名安柯瑞的重组人5型腺病毒注射液。

[0023] 在另一优选例中,在所述的溶瘤病毒的基因组中,删除了人5型腺病毒的E1B-55kDa和E3区基因片段。

[0024] 在另一优选例中,所述的免疫调节剂选自下组:抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、结合PD-1的融合蛋白、结合PD-L1的融合蛋白或其组合。

[0025] 本发明的第四方面,提供了一种药盒,所述药盒包括:

[0026] (a) 第一制剂,所述第一制剂含有溶瘤病毒以及药学上可接受的载体;

[0027] (b) 第二制剂,所述第二制剂含有免疫调节剂以及药学上可接受的载体;

[0028] (c) 说明书,所述说明书描述了将溶瘤病毒和免疫调节剂联用以治疗肿瘤的方法。

[0029] 在另一优选例中,所述的第一制剂和第二制剂是各自独立的。

[0030] 在另一优选例中,所述的第一制剂和第二制剂为冻干制剂或液态制剂。

[0031] 在另一优选例中,所述的第一制剂和第二制剂是注射剂。

[0032] 在另一优选例中,所述的第一制剂在施用第二制剂之前被施用。

[0033] 在另一优选例中,所述的溶瘤病毒为商品名安柯瑞的重组人5型腺病毒注射液。

[0034] 在另一优选例中,在所述的溶瘤病毒的基因组中,删除了人5型腺病毒的E1B-55kDa和E3区基因片段。

[0035] 在另一优选例中,所述的免疫调节剂选自下组:抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、结合PD-1的融合蛋白、结合PD-L1的融合蛋白或其组合。

[0036] 本发明的第五方面,提供了一种治疗肿瘤的方法,所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的如本发明第二方面所述活性成分组合和/或本发明第四方面所述的药物组合物,从而治疗肿瘤。

- [0037] 在另一优选例中,所述有需要的对象为人类或非人类哺乳动物。
- [0038] 在另一优选例中,所述的非人类哺乳动物包括猴、猩猩、牛、猪、狗、羊、兔或鼠。
- [0039] 在另一优选例中,所述有需要的对象为小鼠。
- [0040] 在另一优选例中,所述有需要的对象患有肿瘤。
- [0041] 在另一优选例中,所述肿瘤为肝癌。
- [0042] 在另一优选例中,所述肿瘤为晚期肝癌。
- [0043] 在另一优选例中,所述方法包括:在施用溶瘤病毒之后的1-6天,对所述对象施用免疫调节剂。
- [0044] 在另一优选例中,所述溶瘤病毒为商品名为安柯瑞的重组人5型腺病毒。
- [0045] 在另一优选例中,所述的免疫调节剂为抗PD-1单抗。
- [0046] 在另一优选例中,所述重组人5型腺病毒的施用方式为瘤内注射。
- [0047] 在另一优选例中,所述免疫调节剂的施用方式可以为静脉、腹腔或瘤内注射。
- [0048] 在另一优选例中,所述方法还包括向需要的对象施用治疗肿瘤的支持性治疗药物。
- [0049] 在另一优选例中,所述的支持性治疗药物包括:抗生素、止痛药物、营养药物或其组合。
- [0050] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

- [0051] 图1显示了实验开始后小鼠肝细胞癌Hepa1-6移植瘤的肿瘤抑制率(%)。
- [0052] 图2显示了实验开始后实验小鼠和对照组小鼠的体重相对下降幅度。

## 具体实施方式

- [0053] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次意外地发现,当特定的重组人5型腺病毒与特定的免疫调节剂联用时,在治疗肿瘤方面(尤其是晚期肝癌)具有协同的治疗效果。实验表明,联合运用重组人5型腺病毒与免疫调节剂能够有效抑制肿瘤的生长,其效果远优于二者的加合作用,并且可以显著降低使用传统治疗方案的副作用。在此基础上,完成了本发明。
- [0054] 术语说明
- [0055] 如本文所用,术语“第一活性成分”指重组人5型腺病毒,或溶瘤病毒。应理解,该术语包括与重组人5型腺病毒具有相同功能的衍生物。
- [0056] 如本文所用,术语“第二活性成分”指免疫调节剂,尤其是指针对PD-1和/或PD-L1的抑制剂,包括例如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、结合PD-1的融合蛋白、结合PD-L1的融合蛋白或其组合。
- [0057] 如本文所用,术语“本发明的活性成分组合”、“本发明的物质组合”、“本发明的药物成分组合”可互换使用,指上述第一活性成分和第二活性成分的组合。
- [0058] 如本文所用,术语“本发明的药物组合物”指包括或含有第一活性成分(或含所述

第一活性成分的第一制剂)和第二活性成分(或含所述第二活性成分的第二制剂)的组合物。在本发明中,所述的第一制剂和第二制剂可以是相同或不同的制剂。此外,第一制剂和第二制剂可以是同一制剂,或各自独立的制剂。

[0059] 重组人5型腺病毒注射液

[0060] 本发明所用重组人5型腺病毒注射液,商品名为安柯瑞,是中国第一个获得药监局批准,于2006年上市的溶瘤病毒治疗药物,其是利用基因工程技术对人5型腺病毒(Ad5)进行基因重组得到的一种溶瘤腺病毒,主要是删除了人5型腺病毒的E1B-55kDa(即5型腺病毒E1B区域的55kD,是由E1B-55k基因编码)和E3区基因片段,具有在肿瘤细胞中特异性复制,而最终导致溶瘤的特性。

[0061] 溶瘤病毒的溶瘤机制随着肿瘤免疫的研究进展而不断更新。早先认为,由于一些病毒天然对于肿瘤有嗜向性,能够选择性感染肿瘤细胞并能够裂解肿瘤细胞从而杀死肿瘤。随着研究的不断深入展开,发现溶瘤病毒不仅有着直接裂解肿瘤的能力,而且能够改善处于免疫抑制状态的肿瘤微环境,把“冷”肿瘤变为“热”肿瘤,进而激活固有免疫和适应性免疫,使得原先被肿瘤逃避的机体免疫系统被调动起来,对肿瘤进行攻击。

[0062] 腺病毒的E1B-55kDa和E3区基因片段

[0063] 腺病毒是研究较为深入的一类病原体,自20世纪60年代腺病毒就被作为基因表达载体,在分子生物学领域得到广泛应用,是基因治疗最常用的病毒载体。腺病毒载体具有其他载体不具备的诸多特点,多种类型的腺病毒载体得以成功构建,并获得工程化应用。

[0064] 腺病毒是一种DNA病毒,它没有包膜,是由252个壳粒呈廿面体排列构成的70至90nm的颗粒。其衣壳里是线状双链DNA分子,两端各有长约100bp的反向重复序列。由于每条DNA链的5'端同相对分子质量为 $55 \times 10^3$ Da的蛋白质分子共价结合,可以出现双链DNA的环状结构。

[0065] 腺病毒E3区基因是腺病毒基因组的早期转录单位,由E1A蛋白激活其启动子后转录形成蛋白。E3蛋白主要破坏宿主的免疫防御机制,使腺病毒在宿主体内免于遭受免疫系统的攻击。

[0066] 本发明所用重组人5型腺病毒经改造,在删除了E3区基因后,只具有在宿主细胞内复制的能力,而不对宿主的免疫系统产生破坏。

[0067] PD-1和PD-L1

[0068] PD-1为程序性死亡受体1,也称为CD279(分化簇279),是一种重要的免疫抑制分子。PD-1通过向下调节免疫系统对人体细胞的反应,以及通过抑制T细胞炎症活动来调节免疫系统并促进自身耐受。PD-1是免疫检查点,通过两种机制防止自身免疫。首先,它促进淋巴结中抗原特异性T细胞的凋亡(程序性细胞死亡)。其次,它减少了调节性T细胞(抗炎,抑制性T细胞)的细胞凋亡。PD-1与其配体PD-L1结合启动T细胞的程序性死亡,使肿瘤细胞获得免疫逃逸。

[0069] 在本发明中,给受试小鼠注射抗PD-1单克隆抗体后,其通过与小鼠免疫细胞表面的PD-1结合,阻断了PD-L1与PD-1的结合,使得原本处在抑制状态的免疫系统被再次激活,进而攻击体内肿瘤细胞。

[0070] 免疫调节剂

[0071] 免疫调节剂是一类对机体免疫功能具有调节作用的药物。此类药物可通过激活一

种或多种免疫活性细胞,增强机体的非特异性和特异性免疫功能。根据其来源不同,被分为生物来源的制剂,如微生物来源的制剂、人或动物免疫系统的产物和天然药物的有效成份;或化学合成药物。

[0072] 如本文所用,术语“免疫调节剂”指可增强哺乳动物的免疫系统针对肿瘤的免疫作用或杀伤作用的活性成分。

[0073] 优选地,可用于本发明的免疫调节剂为用于拮抗PD-1和/或PD-L1的活性成分(如抗体)。典型地,本发明的免疫调节剂可阻断哺乳动物体内肿瘤细胞表面上的PD-L1与免疫细胞(如T细胞)上的PD-1发生结合,即可阻断体内的PD-1/PD-L1结合的阻断剂。

[0074] 本发明的代表性免疫调节剂的例子包括(但并不限于):抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、结合PD-1的融合蛋白、结合PD-L1的融合蛋白或其组合

[0075] 在一个优选例中,实验表明,采用抗PD-1单克隆抗体并联合溶瘤病毒使用时,对小鼠肿瘤有协同的更为显著的抑制作用。

[0076] 免疫逃逸

[0077] 肿瘤细胞获得免疫逃逸是肿瘤的重大特征之一。肿瘤细胞通过多种机制躲避机体免疫系统的识别和攻击,得以在机体内生存和增殖。在多数肿瘤细胞表面高表达PD-L1,通过与T细胞表面的PD-1结合后启动T细胞程序性死亡,使机体免疫系统处于抑制状态,这是肿瘤细胞免疫逃逸的机制之一。

[0078] Hepa1-6肿瘤细胞

[0079] Hepa1-6是来源于C57L小鼠的BW7756小鼠肝癌细胞株,广泛应用于小鼠肝癌动物模型建立以及抗肿瘤药物筛选等。它是一种贴壁生长的上皮样细胞。

[0080] 本发明使用Hepa1-6构建了小鼠皮下移植瘤模型,并发现重组人5型腺病毒对移植瘤的生长具有抑制作用,联合免疫调节剂可取得更好的治疗效果。

[0081] 药物组合物以及给药方式

[0082] 本发明还提供一种可用于协同治疗肿瘤的组合物,它可用于抑制肿瘤生长和/或转移。

[0083] 本发明药物组合物包括:有效量的重组人5型腺病毒,和有效量的免疫调节剂,以及药学上可接受的载体。

[0084] 通常,可将本发明的重组人5型腺病毒,或免疫调节剂配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地,pH约为6-8。

[0085] 如本文所用,“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。

[0086] 术语指这样一些药剂载体:它们本身并不是必要的活性成分,且施用后没有过分的毒性。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在组合物中药学上可接受的载体可含有液体,如水、盐水、缓冲液。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如填充剂、润滑剂、助流剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。所述的载体中还可以含有细胞转染试剂。

[0087] 如本文所用,术语“有效量”或“有效剂量”是指可对人和/或动物和/或细胞产生功能或活性的且可被人/或动物所接受的量。

[0088] 如本文所用,“药学上可接受的”的成分是适用于人和/或哺乳动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接

受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、聚山梨酯、乙醇及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配,本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。所述的药物组合物宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量。本发明的药物制剂还可制成缓释制剂。

[0089] 此外,本发明的活性成分组合还可与其他治疗剂(如抗肿瘤剂或化疗剂)一起使用。

[0090] 使用药物组合物时,是将安全有效量的活性成分组合(包括第一活性成分(或其制剂)和/或第二活性成分(或其制剂))施用于哺乳动物。

[0091] 应理解,本发明所述活性成分组合中第一活性成分(或其制剂)和/或第二活性成分(或其制剂)的有效量,可随给药的模式和肿瘤的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于:药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等;肿瘤的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。

[0092] 典型地,对于第一活性成分,其治疗有效量通常至少为 $0.5 \times 10^{12}$ VP至 $2.5 \times 10^{12}$ VP,当然,具体剂量还应考虑肿瘤体积、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围之内的。

[0093] 对于第二活性成分,其安全有效量通常至少约1mg/kg体重,而且在大多数情况下不超过约20mg/kg体重,较佳地该剂量是约2mg/kg体重至10mg/kg体重。当然,具体剂量还应考虑所用药物的种类、剂型、给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围之内的。

[0094] 本发明所述的药物组合物的给药方式没有特别限制,代表性的例子包括(但并不限于):瘤内注射、腹腔注射、静脉注射。

[0095] 药盒

[0096] 本发明提供一种药盒,所述药盒包括:

[0097] 组分(1):含有重组人5型腺病毒的制剂;

[0098] 组分(2):含免疫调节剂的制剂;

[0099] 组分(3):说明书。

[0100] 所述的含有重组人5型腺病毒的制剂包括(但并不限于):冻干剂、液体制剂或注射液。

[0101] 所述的免疫调节剂的制剂包括(但并不限于):冻干剂、液体制剂、或注射液。

[0102] 典型地,药盒中装有一个或多个(如至少两个)含有重组人5型腺病毒的单元剂型和一个或多个(如至少两个)含有免疫调节剂的单元剂型;较佳地各为4-10个。

[0103] 如本文所用,术语“单元剂型”是指为了施用方便,将组合物制备成单次施用所需的剂型,包括但不限于各种固体剂(如片剂)、液体剂、胶囊剂、缓释剂。

[0104] 在本发明中,重组人5型腺病毒的单元剂型通常为液体剂。

[0105] 本发明提供的说明书中可以有如下描述:所述药盒的使用方法是同时使用含有重组人5型腺病毒的单元剂型和含有免疫调节剂的单元剂型。

[0106] 本发明提供的药盒通过下述步骤制备得到:将含有重组人5型腺病毒的制剂和含

有免疫调节剂的制剂,以及说明书一起放置,形成药盒。

[0107] 所述的含有重组人5型腺病毒的制剂优选含有重组人5型腺病毒的单元剂型,所述含有免疫调节剂的制剂优选含有免疫调节剂的单元剂型。

[0108] 所述步骤优选将至少一个含有重组人5型腺病毒的单元剂型和至少一个含有免疫调节剂的单元剂型,以及说明书一起放置,形成药盒。

[0109] 本发明的主要优点在于:

[0110] (1) 重组人5型腺病毒与抗PD-1抗体联合使用,可以协同地更为高效地抑制肿瘤(如晚期肝癌),因此溶瘤病毒联合免疫调节剂适合用于治疗包括肝癌(尤其是晚期肝癌)在内的多种不同的实体瘤。

[0111] (2) 本发明所提出的药物组合,在显著抑制肿瘤生长的情况下,不引发其他药物不良反应和毒副作用。

[0112] (3) 本发明提出的溶瘤病毒联合免疫调节剂的药物组合治疗,为晚期肝癌的治疗提供了新思路,有助于提高晚期肝癌患者的生存期和改善患者预后。

[0113] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。除非特别说明,否则本发明实施例中所用材料和试剂均为市售产品。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0114] 除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0115] 实验材料

[0116] 重组人5型腺病毒注射液,购自上海三维生物技术有限公司,规格为 $1.87 \times 10^{12}$  vp/ml;

[0117] anti-mPD-1(InVivoMAb anti-mouse PD-1)由BioXcell提供;

[0118] 磷酸盐缓冲液、胎牛血清、DMEM培养基均购自Gibco公司;

[0119] 胰蛋白酶-EDTA消化液(0.25%)和青霉素-链霉素混合液(100×)购自Solarbio公司;

[0120] Hepa1-6肿瘤细胞购自American Type Culture Collection(ATCC)。

[0121] 实施例1

[0122] 重组人5型腺病毒注射液联合免疫调节剂治疗晚期肝癌的动物体内实验

[0123] 在本实施例中,通过培养Hepa1-6肿瘤细胞并通过皮下注射的方式构建小鼠肝癌模型,经重组人5型腺病毒和PD-1抑制剂anti-mPD-1联合治疗后,通过测量小鼠肿瘤体积反映治疗效果。

[0124] 实验方法和步骤

[0125] (1) 细胞培养

[0126] 用含有灭活的10%胎牛血清,100U/ml的青霉素和100 $\mu$ g/ml的链霉素以及2mM谷氨酰胺的DMEM培养基在37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养Hepa1-6肿瘤细胞,每隔3天左右待细胞长满后分瓶传代,将处于对数生长期的肿瘤细胞用于体内肿瘤的接种。

[0127] (2) 构建小鼠皮下移植瘤模型

[0128] PBS重悬处于对数生长期的Hepa1-6肿瘤细胞,浓度为 $5 \times 10^7$ 个/ml,接种于实验小鼠的右侧肋部皮下,100 $\mu$ l/只。

[0129] (3) 溶瘤病毒与免疫调节剂联合给药治疗

[0130] 接种Hepa1-6肿瘤细胞的实验小鼠体内成瘤后,在平均肿瘤体积达到67mm<sup>3</sup>左右时(接种后第5天)分组给药,每组12只动物,具体给药方案见表1。

[0131] 其中重组人5型腺病毒注射液的给药容积根据肿瘤体积范围调整,具体调整方案见表2;anti-mPD-1的给药容积为10 $\mu$ l/g体重。

[0132] 表1重组人5型腺病毒与anti-mPD-1的给药方案

| 组别        | 动物数 | 治疗          | 剂量                                 | 给药途径  | 给药周期                     |
|-----------|-----|-------------|------------------------------------|-------|--------------------------|
| 1         | 12  | 溶媒          | -                                  | i. t. | qd, 5-day on, 2-day off; |
| [0133] 2a | 12  | 重组人5型腺病毒注射液 | 10 <sup>9</sup> vp/mm <sup>3</sup> | i. t. | qd, 5-day on, 2-day off; |
| 2b        | 12  | anti-mPD-1  | 5 mg/kg                            | i. p. | qw $\times$ 3            |
| 3         | 12  | 重组人5型腺病毒注射液 | 10 <sup>9</sup> vp/mm <sup>3</sup> | i. t. | qd, 5-day on, 2-day off; |
|           |     | anti-mPD-1  | 5 mg/kg                            | i. p. | qw $\times$ 3            |

[0134] 注:

[0135] i. t.:瘤内注射,按肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)确定给药量;i. p.:腹腔注射;

[0136] qd, 5-day on, 2-day off:每天一次,给药5天后停药2天;

[0137] qw:每周一次;

[0138] 表2重组人5型腺病毒注射液给药容积调整范围

| 肿瘤体积                                    | 注射体积( $\mu$ l) | 药物用量(vp)               |
|-----------------------------------------|----------------|------------------------|
| 50mm <sup>3</sup> -150mm <sup>3</sup>   | 50             | 9.35 $\times 10^{10}$  |
| 150mm <sup>3</sup> -500mm <sup>3</sup>  | 250            | 4.675 $\times 10^{11}$ |
| 500mm <sup>3</sup> -1000mm <sup>3</sup> | 500            | 9.35 $\times 10^{11}$  |
| >1000mm <sup>3</sup>                    | 1000           | 1.87 $\times 10^{12}$  |

[0140] (4) 实验小鼠治疗后指标检测

[0141] A、治疗开始后小鼠治疗组/对照组肿瘤体积比(T/C)

[0142] 每周使用游标卡尺对肿瘤体积进行3次的测量,测量肿瘤的长径和短径,其体积计算公式为:

[0143] 体积=0.5 $\times$ 长径 $\times$ 短径<sup>2</sup>

[0144] 治疗组/对照组肿瘤体积比T/C(%)=治疗组RTV/对照组RTV $\times 100\%$

[0145] 其中RTV=relative tumor volume,即相对肿瘤体积

[0146] B、治疗开始后实验小鼠的体重测量

[0147] 在进行肿瘤体积测量的同时,称量小鼠体重。记录小鼠体重的变化与给药时间的关系。同时观察小鼠的存活情况和健康状况如给药期间动物活动、进食等一般状态。

[0148] (5) 统计学分析

[0149] 应用One-Way ANOVA检验以及Student's t检验对肿瘤体积和小鼠体重进行组间统计学分析, $P<0.05$ 认为有显著性差异。

[0150] 实验结果

[0151] 实验小鼠经过不同治疗后,组2a(重组人5型腺病毒注射液)、组2b(anti-mPD-1)以及组3(重组人5型腺病毒注射液+anti-mPD-1)相对于组1(溶媒组)肿瘤体积随治疗过程逐渐减小。

[0152] 组2(包括2a和2b)或组3与组1的肿瘤体积相比,均具有统计学差异( $P<0.01$ )。其中,组3小鼠肿瘤体积显著小于组2(包括2a和2b)小鼠, $P<0.01$ ,具有统计学差异(如表3和图1所示)。

[0153] 表3受试物对小鼠肝癌Hepa1-6的抑瘤作用(D20肿瘤体积)

| 组别        | 治疗                     | 动物数(只) | 治疗前肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) <sup>a</sup> | 治疗后肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) <sup>a</sup> | T/C(%) | 肿瘤生长抑制率(%) | $P^b$     |
|-----------|------------------------|--------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------|------------|-----------|
| 1         | 溶媒                     | 12     | 67±3                                  | 3596±258                              | --     | --         | --        |
| [0154] 2a | 重组人5型腺病毒注射液            | 12     | 67±3                                  | 2780±144                              | 79     | 21         | 0.004     |
| 2b        | anti-mPD-1             | 12     | 67±3                                  | 3250±156                              | 90     | 10         | 0.005     |
| 3         | 重组人5型腺病毒注射液+anti-mPD-1 | 12     | 66±3                                  | 2020±133                              | 58     | 42         | 0.000, ** |

[0155] a.均数±标准误;

[0156] b.与溶媒对照组比较的p值;与重组人5型腺病毒注射液组(2a)和anti-mPD-1(组2b)比较, $p<0.01$ (\*\*)

[0157] 此外,各组小鼠体重较为平稳。联合给予重组人5型腺病毒注射液+anti-mPD-1的实验组(组3),与单独给予重组人5型腺病毒注射液的实验组(组2a)相比,其体重下降幅度较小(在第18天时,组2a的体重相对下降幅度为4.8%,而组3的体重相对下降幅度为1.7%),如图2所示。这提示,对于荷瘤模型动物,联合给予重组人5型腺病毒注射液+anti-mPD-1在有助于减轻肿瘤负荷的同时,可以减少注射溶瘤腺病毒造成的部分副作用(如体重下降)。

[0158] 综合以上结果,anti-mPD-1与重组人5型腺病毒联合治疗显著优于单独使用重组人5型腺病毒治疗,肿瘤生长抑制率有显著提高,显示出明显的抗肿瘤协同效果,且不产生额外的毒副作用,甚至可减少注射溶瘤腺病毒造成的部分副作用(如体重下降)。

[0159] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

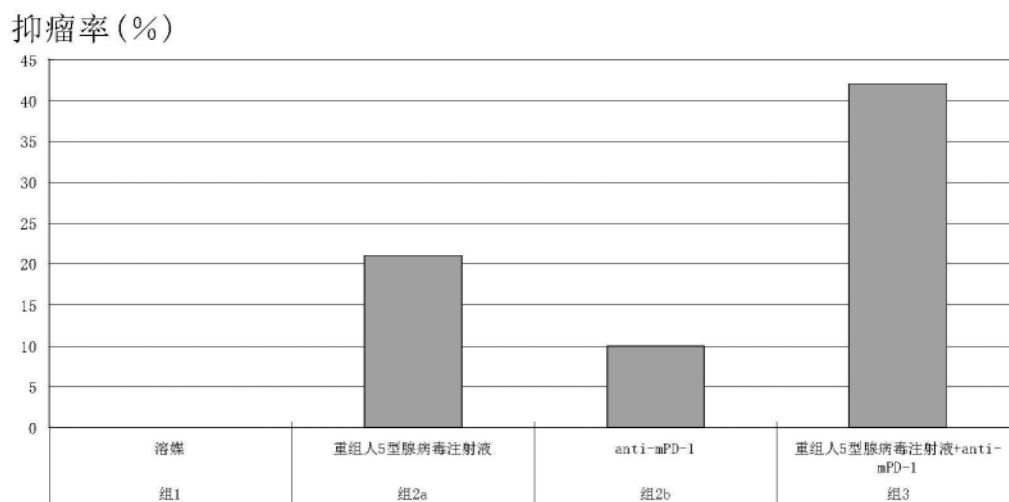


图1

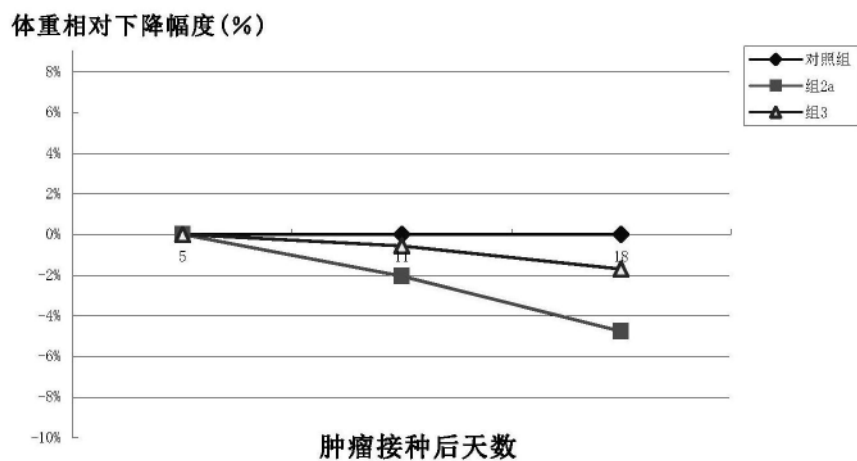


图2