



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114667154 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 24

(21) 申请号 202080076789.2

(22) 申请日 2020.09.01

(30) 优先权数据

62/894,929 2019.09.02 US

62/913,667 2019.10.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.05.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/048932 2020.09.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/046048 EN 2021.03.11

(71) 申请人 亚利桑那州立大学董事会

地址 美国亚利桑那州

(72) 发明人 道格拉斯·格兰特·麦克法登

穆罕默德·马斯姆杜尔·拉赫曼

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 贺淑东 武晶晶

(51) Int.Cl.

A61K 35/768 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

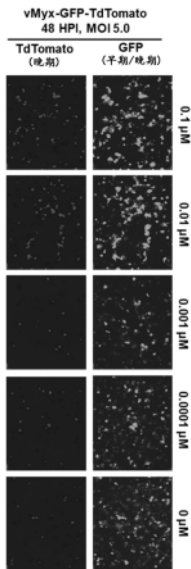
权利要求书4页 说明书25页 附图7页

(54) 发明名称

用于改善针对非允许性癌症的溶瘤病毒感染的方法和组合物

(57) 摘要

本文公开了治疗癌症的方法和组合物,这些方法和组合物包括向患有癌症的对象施用治疗有效量的溶瘤病毒和核质转运抑制剂。本文进一步描述了通过以下方式将非允许性癌细胞转化为允许性癌细胞的方法和杀伤癌细胞的方法:使癌细胞与治疗有效量的溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。



1. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向对象施用:  
治疗有效量的溶瘤病毒,以及  
核质转运抑制剂。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述溶瘤病毒来源于痘病毒科家族。
3. 如权利要求1或2中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒来源于脊椎动物痘病毒亚科亚家族或昆虫痘病毒亚科亚家族。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒来源于正痘病毒属、鹿痘病毒属、副痘病毒属、禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属、亚塔痘病毒属、甲型昆虫痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属或丙型昆虫痘病毒属的病毒属。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒来源于兔痘病毒属。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒是粘液瘤病毒(MYXV)。
7. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒来源于正痘病毒属。
8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述病毒是经遗传修饰的。
9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述核质转运抑制剂选自来普霉素A、来普霉素B、Ratjadone A、Ratjadone B、Ratjadone C、Ratjadone D、似蛇霉素A、哥纳香素、茛菪酰胺、白花丹素、姜黄素、缬草三酯、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯、异戊烯基香豆素蛇床子素、KOS2464、PKF050-638、CBS9106和塞利尼索。
10. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述核质转运抑制剂是来普霉素B。
11. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述核质转运抑制剂是塞利尼索。
12. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述癌症是实体瘤。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述实体瘤是肉瘤或癌。
14. 如权利要求12所述的方法,其中所述实体瘤是纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilms瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤或成视网膜细胞瘤。
15. 如权利要求12所述的方法,其中所述实体瘤是结肠直肠腺癌、胰腺癌或黑素瘤。
16. 如权利要求1至15中任一项所述的方法,其中将所述溶瘤病毒和所述核质转运抑制剂同时施用。
17. 如权利要求1至15中任一项所述的方法,其中将所述溶瘤病毒和所述核质转运抑制剂依序施用。
18. 如权利要求17所述的方法,其中将所述溶瘤病毒在施用所述核质转运抑制剂之前施用。
19. 如权利要求17所述的方法,其中将所述溶瘤病毒在施用所述核质转运抑制剂之后施用。
20. 如权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述溶瘤病毒和所述

核质转运抑制剂施用至少1天、至少2天、至少3天、至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少1个月、至少3个月、至少6个月或至少1年的时间段。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述溶瘤病毒、所述核质转运抑制剂或两者每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次或每两个月一次施用至所述对象。

22. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中将所述溶瘤病毒局部施用至待治疗的癌症组织。

23. 如权利要求22所述的方法,其中将所述溶瘤病毒通过肿瘤内注射施用。

24. 如权利要求22或23所述的方法,其中用于所述组织的所述溶瘤病毒的感染复数(MOI)是约0.01至约10。

25. 如权利要求22-24中任一项所述的方法,其中用于所述组织的所述溶瘤病毒的感染复数(MOI)是约0.05至约5。

26. 如权利要求22-25中任一项所述的方法,其中所述组织处所述核质转运抑制剂的浓度是约0.0001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M。

27. 如权利要求22-26中任一项所述的方法,其中所述组织处所述核质转运抑制剂的浓度是约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M。

28. 一种杀伤癌细胞的方法,所述方法包括:使所述癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触,从而杀伤所述癌细胞。

29. 一种增强癌细胞对溶瘤病毒的感染的易感性的方法,所述方法包括使所述癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

30. 一种将癌细胞诱导为对溶瘤病毒的感染易感的方法,所述方法包括使所述癌细胞与所述溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

31. 一种将非允许性癌细胞转化为允许性癌细胞的方法,所述方法包括使所述非允许性癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

32. 一种在对溶瘤病毒的感染不易感的癌细胞中增加所述溶瘤病毒的增殖的方法,所述方法包括使所述癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

33. 如权利要求28-32中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒是来自痘病毒科家族的病毒。

34. 如权利要求28-33中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒是来自脊椎动物痘病毒亚科亚家族或昆虫痘病毒亚科亚家族的病毒。

35. 如权利要求28-34中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒来自作为正痘病毒属、鹿痘病毒属、副痘病毒属、禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属、亚塔痘病毒属、甲型昆虫痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属或丙型昆虫痘病毒属的病毒属。

36. 如权利要求28-35中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒来自兔痘病毒属。

37. 如权利要求28-36中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒是粘液瘤病毒(MYXV)。

38. 如权利要求28-35中任一项所述的方法,其中所述溶瘤病毒来自正痘病毒属。

39. 如权利要求28-36中任一项所述的方法,其中所述病毒是经遗传修饰的。

40. 如权利要求28-39中任一项所述的方法,其中所述核质转运抑制剂选自来普霉素A、来普霉素B、Ratjadone A、Ratjadone B、Ratjadone C、Ratjadone D、似蛇霉素A、哥纳香素、

茛菪酰胺、白花丹素、姜黄素、缬草三酯、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯、异戊烯基香豆素蛇床子素、KOS2464、PKF050-638、CBS9106和塞利尼索。

41. 如权利要求28-40中任一项所述的方法,其中所述核质转运抑制剂是来普霉素B。

42. 如权利要求28-40中任一项所述的方法,其中所述核质转运抑制剂是塞利尼索。

43. 如权利要求28-42中任一项所述的方法,其中所述癌细胞是结肠直肠癌细胞、胰腺癌细胞、黑素瘤癌细胞。

44. 如权利要求28-43中任一项所述的方法,其中所述癌细胞是人癌细胞。

45. 如权利要求28-44中任一项所述的方法,其中使所述癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂体内接触。

46. 如权利要求28-44中任一项所述的方法,其中使所述癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂离体接触。

47. 如权利要求28-46中任一项所述的方法,其中所述方法包括使所述癌细胞与所述溶瘤病毒和所述核质转运抑制剂同时接触。

48. 如权利要求28-46中任一项所述的方法,其中所述方法包括使所述癌细胞与所述溶瘤病毒和所述核质转运抑制剂依序接触。

49. 如权利要求48所述的方法,其中使所述癌细胞在与所述核质转运抑制剂接触之前与所述溶瘤病毒接触。

50. 如权利要求48所述的方法,其中使所述癌细胞在与所述溶瘤病毒接触之前与所述核质转运抑制剂接触。

51. 如权利要求28-50中任一项所述的方法,其中使所述癌细胞以约0.01至约10的MOI与所述溶瘤病毒接触。

52. 如权利要求28-51中任一项所述的方法,其中使所述癌细胞以约0.05至约5的MOI与所述溶瘤病毒接触。

53. 如权利要求28-52中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述癌细胞在培养基中孵育,所述培养基包含浓度为约0.0001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的所述核质转运抑制剂。

54. 如权利要求28-53中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述癌细胞在培养基中孵育,所述培养基包含浓度为约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M的所述核质转运抑制剂。

55. 如权利要求28-54中任一项所述的方法,其中所述方法包括使所述癌细胞与培养基接触,所述培养基包含浓度为约0.0001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的所述核质转运抑制剂。

56. 如权利要求28-55中任一项所述的方法,其中所述方法包括使所述癌细胞与培养基接触,所述培养基包含浓度为约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M的所述核质转运抑制剂。

57. 如权利要求28-56中任一项所述的方法,所述方法进一步包括使所述溶瘤病毒与自体细胞或异源细胞离体接触。

58. 如权利要求57所述的方法,其中所述自体细胞或异源细胞是骨髓细胞或巨噬细胞。

59. 如权利要求57-58所述的方法,所述方法进一步包括将所述自体细胞或异源细胞注射至所述对象。

60. 一种药物组合物,所述药物组合物包含:

a. 溶瘤病毒,以及

b. 核质转运抑制剂。

61. 如权利要求60所述的药物组合物, 所述药物组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂或载体。

62. 如权利要求60-61中任一项所述的药物组合物, 其中所述溶瘤病毒来源于痘病毒科家族。

63. 如权利要求60-62中任一项所述的药物组合物, 其中所述溶瘤病毒来源于脊椎动物痘病毒亚科亚家族或昆虫痘病毒亚科亚家族。

64. 如权利要求60-63中任一项所述的药物组合物, 其中所述溶瘤病毒来源于正痘病毒属、鹿痘病毒属、副痘病毒属、禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属、亚塔痘病毒属、甲型昆虫痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属或丙型昆虫痘病毒属的病毒属。

65. 如权利要求60-64中任一项所述的药物组合物, 其中所述溶瘤病毒来源于兔痘病毒属。

66. 如权利要求60-65中任一项所述的药物组合物, 其中所述溶瘤病毒是粘液瘤病毒(MYXV)。

67. 如权利要求60-64中任一项所述的药物组合物, 其中所述溶瘤病毒来源于正痘病毒属。

68. 如权利要求60-67中任一项所述的药物组合物, 其中所述病毒是经遗传修饰的。

69. 如权利要求60-68中任一项所述的药物组合物, 其中所述核质转运抑制剂选自来普霉素A、来普霉素B、Ratjadone A、Ratjadone B、Ratjadone C、Ratjadone D、似蛇霉素A、哥纳香素、萆薢酰胺、白花丹素、姜黄素、缬草三酯、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯、异戊烯基香豆素、蛇床子素、KOS 2464、PKF050-638、CBS9106和塞利尼索。

70. 如权利要求60-69中任一项所述的药物组合物, 其中所述核质转运抑制剂是来普霉素B。

71. 如权利要求60-70中任一项所述的药物组合物, 其中所述核质转运抑制剂是塞利尼索。

72. 如权利要求60-71中任一项所述的药物组合物, 其中所述药物组合物呈适于肿瘤内或肠胃外施用的单位剂型。

73. 如权利要求72所述的药物组合物, 其中单位剂量包含约 $1 \times 10^3$ 噬斑形成单位(PFU)至约 $1 \times 10^{10}$ PFU的所述溶瘤病毒每mL。

74. 如权利要求72所述的药物组合物, 其中单位剂量包含约 $1 \times 10^5$ PFU至约 $1 \times 10^{10}$ PFU的所述溶瘤病毒每mL。

75. 如权利要求60-74中任一项所述的药物组合物, 其中所述溶瘤病毒与所述核质转运抑制剂之间的重量比是约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{-9}$ 。

## 用于改善针对非允许性癌症的溶瘤病毒感染的方法和组合物

### 交叉引用

[0001] 本申请要求于2019年10月10日提交的美国临时专利申请号62/913,667和于2019年9月2日提交的美国临时专利申请号62/894,929的权益,将所述临时专利申请中的每一个通过引用以其全文并入本文。

### 技术领域

[0002] 本公开内容涉及溶瘤病毒并且具体地涉及溶瘤病毒与核质转运抑制剂的组合的用途。

### 政府资助的声明

[0003] 本发明是根据由美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的拨款号R01 AI080607在政府支持下完成的。美国政府享有本发明的一定权利。

### 背景技术

[0004] 溶瘤病毒 (诸如来自痘病毒科病毒家族) 是针对其选择性感染并杀伤转化癌细胞的能力,以及根据其激活宿主的不仅针对病毒还针对肿瘤抗原的免疫系统的能力进行设计和/或选择的哺乳动物病毒 (参见例如, Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. 2014. Going viral with cancer immunotherapy. Nature Reviews Cancer 14:559-567)。然而,溶瘤病毒的应用可能在某些肿瘤细胞,例如非允许性肿瘤细胞中受限。因此,仍然存在改善基于溶瘤病毒的疗法的需要。

### 援引并入

[0005] 本说明书中所提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文,并入程度如同指示每个单独出版物、专利或专利申请明确且单独地通过引用并入一般。

### 发明内容

[0006] 在一些方面,本文公开了一种治疗癌症的方法,该方法包括向对象施用治疗有效量的溶瘤病毒和核质转运抑制剂。

[0007] 在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于痘病毒科家族。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于脊椎动物痘病毒亚科 (Chordopoxvirinae) 亚家族或昆虫痘病毒亚科 (Entomopoxvirinae) 亚家族。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于正痘病毒属 (Orthopoxvirus)、鹿痘病毒属 (Cervidpoxvirus)、副痘病毒属 (Parapoxvirus)、禽痘病毒属 (Avipoxvirus)、羊痘病毒属 (Capripoxvirus)、兔痘病毒属 (Leporipoxvirus)、猪痘病毒属 (Suipoxvirus)、软疣痘病毒属 (Molluscipoxvirus)、亚塔痘病毒属 (Yatapoxvirus)、甲型昆虫痘病毒属 (Alphaentomopoxvirus)、乙型昆虫痘病毒属 (Betaentomopoxvirus) 或丙型昆虫痘病毒属 (Gammaentomopoxvirus) 的病毒属。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于兔痘病毒属。在一些实施方案中,该溶瘤病毒是粘液瘤病毒 (MYXV)。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于正痘病毒属。在一些实施方案中,该病毒是经遗传修饰的。在一些实施方案

中,该核质转运抑制剂选自来普霉素 (Leptomycin) A、来普霉素B、RatjadoneA、Ratjadone B、Ratjadone C、Ratjadone D、似蛇霉素 (Anguinomycin) A、哥纳香素 (Goniothalamine)、茛菪酰胺 (piperlongumine)、白花丹素 (plumbagin)、姜黄素 (curcumin)、缬草三酯 (valtrate)、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯 (acetoxychavicol acetate)、异戊烯基香豆素蛇床子素 (prenylcoumarin osthole)、KOS 2464、PKF050-638、CBS9106和塞利尼索 (Selinexor)。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂是来普霉素B。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂是塞利尼索。在一些实施方案中,该癌症是实体瘤。在一些实施方案中,该实体瘤是肉瘤或癌。在一些实施方案中,该实体瘤是纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文肉瘤 (Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilms瘤 (Wilm's tumor)、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤或成视网膜细胞瘤。在一些实施方案中,该实体瘤是结肠直肠癌、胰腺癌或黑素瘤。在一些实施方案中,将该溶瘤病毒和该核质转运抑制剂同时施用。在一些实施方案中,将该溶瘤病毒和该核质转运抑制剂依序施用。在一些实施方案中,将该溶瘤病毒在施用该核质转运抑制剂之前施用。在一些实施方案中,将该溶瘤病毒在施用该核质转运抑制剂之后施用。在一些实施方案中,该方法包括将该溶瘤病毒和该核质转运抑制剂施用至少1天、至少2天、至少3天、至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少1个月、至少3个月、至少6个月或至少1年的时间段。在一些实施方案中,该方法包括将该溶瘤病毒、该核质转运抑制剂或两者每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次或每两个月一次施用至该对象。在一些实施方案中,将该溶瘤病毒局部施用至待治疗的癌症组织。在一些实施方案中,将该溶瘤病毒通过肿瘤内注射施用。在一些实施方案中,用于该组织的该溶瘤病毒的感染复数 (MOI) 是约0.01至约10。在一些实施方案中,用于该组织的该溶瘤病毒的感染复数 (MOI) 是约0.05至约5。在一些实施方案中,该组织处该核质转运抑制剂的浓度是约0.0001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M。在一些实施方案中,该组织处该核质转运抑制剂的浓度是约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M。

[0008] 在一些方面,本文公开了一种杀伤癌细胞的方法,该方法包括:使该癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触,从而杀伤该癌细胞。

[0009] 在一些方面,本文公开了一种增强癌细胞对溶瘤病毒的感染的易感性的方法,该方法包括使该癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

[0010] 在一些方面,本文公开了一种将癌细胞诱导为对溶瘤病毒的感染易感的方法,该方法包括使该癌细胞与该溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

[0011] 在一些方面,本文公开了一种将非允许性癌细胞转化为允许性癌细胞的方法,该方法包括使该非允许性癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

[0012] 在一些方面,本文公开了一种在对溶瘤病毒的感染不易感的癌细胞中增加该溶瘤病毒的增殖的方法,该方法包括使该癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

[0013] 在一些实施方案中,该溶瘤病毒是来自痘病毒科家族的病毒。在一些实施方案中,

该溶瘤病毒是来自脊椎动物痘病毒亚科亚家族或昆虫痘病毒亚科亚家族的病毒。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来自作为正痘病毒属、鹿痘病毒属、副痘病毒属、禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属、亚塔痘病毒属、甲型昆虫痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属或丙型昆虫痘病毒属的病毒属。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来自兔痘病毒属。在一些实施方案中,该溶瘤病毒是粘液瘤病毒(MYXV)。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来自正痘病毒属。在一些实施方案中,该病毒是经遗传修饰的。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂选自来普霉素A、来普霉素B、Ratjadone A、Ratjadone B、Ratjadone C、Ratjadone D、似蛇霉素A、哥纳香素、萆薢酰胺、白花丹素、姜黄素、缬草三酯、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯、异戊烯基香豆素蛇床子素、KOS 2464、PKF050-638、CBS9106和塞利尼索。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂是来普霉素B。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂是塞利尼索。在一些实施方案中,该癌细胞是结肠直肠癌、胰腺癌细胞、黑素瘤癌细胞。在一些实施方案中,该癌细胞是人癌细胞。

在一些实施方案中,使该癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂体内接触。在一些实施方案中,使该癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂离体接触。在一些实施方案中,该方法包括使该癌细胞与该溶瘤病毒和该核质转运抑制剂同时接触。在一些实施方案中,该方法包括使该癌细胞与该溶瘤病毒和该核质转运抑制剂依序接触。在一些实施方案中,使该癌细胞在与该核质转运抑制剂接触之前与该溶瘤病毒接触。在一些实施方案中,使该癌细胞在与该溶瘤病毒接触之前与该核质转运抑制剂接触。在一些实施方案中,使该癌细胞以约0.01至约10的MOI与该溶瘤病毒接触。在一些实施方案中,使该癌细胞以约0.05至约5的MOI与该溶瘤病毒接触。在一些实施方案中,该方法包括将该癌细胞在培养基中孵育,该培养基包含浓度为约0.0001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的该核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该方法包括将该癌细胞在培养基中孵育,该培养基包含浓度为约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M的该核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该方法包括使该癌细胞与培养基接触,该培养基包含浓度为约0.0001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的该核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该方法包括使该癌细胞与培养基接触,该培养基包含浓度为约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M的该核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括使该溶瘤病毒与自体细胞或异源细胞离体接触。在一些实施方案中,该自体细胞或异源细胞是骨髓细胞或巨噬细胞。在一些实施方案中,该方法进一步包括将该自体细胞或异源细胞注射至该对象。

[0014] 在一些方面,本文公开了一种药物组合物,该药物组合物包含:溶瘤病毒和核质转运抑制剂。

[0015] 在一些实施方案中,该药物组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂或载体。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于痘病毒科家族。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于脊椎动物痘病毒亚科亚家族或昆虫痘病毒亚科亚家族。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于正痘病毒属、鹿痘病毒属、副痘病毒属、禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属、亚塔痘病毒属、甲型昆虫痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属或丙型昆虫痘病毒属的病毒属。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于兔痘病毒属。在一些实施方案中,该溶瘤病毒是粘液瘤病毒(MYXV)。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来源于正痘病毒属。在一些实施方案中,该病毒是经遗传修饰的。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂选自来普霉素A、来普霉素B、Ratjadone A、Ratjadone B、Ratjadone C、Ratjadone D、似蛇霉素A、哥纳

香素、萜萘酰胺、白花丹素、姜黄素、缬草三酯、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯、异戊烯基香豆素蛇床子素、KOS 2464、PKF050-638、CBS9106和塞利尼索。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂是来普霉素B。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂是塞利尼索。在一些实施方案中,该药物组合物呈适于肿瘤内或肠胃外施用的单位剂型。在一些实施方案中,该单位剂量包含约 $1 \times 10^3$ 噬斑形成单位(PFU)至约 $1 \times 10^{10}$ PFU的该溶瘤病毒每mL。在一些实施方案中,该单位剂量包含约 $1 \times 10^5$ PFU至约 $1 \times 10^{10}$ PFU的该溶瘤病毒每mL。在一些实施方案中,该溶瘤病毒与该核质转运抑制剂之间的重量比是约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{-9}$ 。

[0016] 一些实施方案涉及一种治疗癌症的方法,该方法包括向对象施用治疗有效量的溶瘤病毒和核质转运抑制剂。在一个方面,本文描述了一种杀伤癌细胞的方法,该方法包括:使癌细胞与治疗有效量的溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触,从而杀伤所述癌细胞。在一个方面,本文描述了一种增强癌细胞对溶瘤病毒的感染的易感性的方法,该方法包括使该癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。在一个方面,本文描述了一种使癌细胞对溶瘤病毒的感染易感的方法,该方法包括使该癌细胞与该溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。在一个方面,本文描述了一种将非允许性癌细胞转化为允许性癌细胞的方法,该方法包括使该非允许性癌细胞与溶瘤病毒与治疗有效量的所述溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。在一个方面,本文描述了一种在对溶瘤病毒的感染不易感的癌细胞中增加该溶瘤病毒的增殖的方法,该方法包括:使该癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。在一些实施方案中,该溶瘤病毒是来自痘病毒科家族的病毒。在一些实施方案中,该溶瘤病毒是来自脊椎动物痘病毒亚科亚家族或昆虫痘病毒亚科亚家族的病毒。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来自作为正痘病毒属、鹿痘病毒属、副痘病毒属、禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属、亚塔痘病毒属、甲型昆虫痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属或丙型昆虫痘病毒属的病毒属。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来自兔痘病毒属。在一些实施方案中,该溶瘤病毒是粘液瘤病毒(MYXV)。在一些实施方案中,该溶瘤病毒来自正痘病毒属。在一些实施方案中,该病毒是经遗传修饰的。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂选自来普霉素A、来普霉素B、Ratjadone A、Ratjadone B、Ratjadone C、Ratjadone D、似蛇霉素A、哥纳香素、萜萘酰胺、白花丹素、姜黄素、缬草三酯、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯、异戊烯基香豆素蛇床子素、KOS 2464、PKF050-638、CBS9106和塞利尼索。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂是来普霉素B。在一些实施方案中,该核质转运抑制剂是塞利尼索。在一些实施方案中,该细胞是人A549细胞、HeLa细胞、239细胞或灵长类动物Vero细胞。在一些实施方案中,该细胞是人细胞。在一些实施方案中,该细胞是体内细胞、体外细胞或离体细胞。在一些实施方案中,该癌症是实体瘤。在一些实施方案中,该实体瘤是肉瘤或癌。在一些实施方案中,该实体瘤是纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilms瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤或成视网膜细胞瘤。在一些实施方案中,该实体瘤是结肠直肠癌、胰腺癌或黑素瘤。在一些实施方案中,将该溶瘤病

毒和所述核质转运抑制剂同时或依序施用。在一些实施方案中,该溶瘤病毒在施用所述核质转运抑制剂之前施用。在一些实施方案中,该溶瘤病毒在施用所述核质转运抑制剂之后施用。在一些实施方案中,该方法包括将所述溶瘤病毒和所述核质转运抑制剂施用至少1天、至少2天、至少3天、至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少1个月、至少3个月、至少6个月或至少1年的时间段。在一些实施方案中,该方法包括将所述溶瘤病毒、所述核质转运抑制剂或两者每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次或每两个月一次施用至所述对象。在一些实施方案中,将该溶瘤病毒局部施用至待治疗的癌症组织。在一些实施方案中,将该溶瘤病毒通过注射来施用。在一些实施方案中,用于所述组织的所述溶瘤病毒的感染复数(MOI)是约0.01至约10。在一些实施方案中,用于所述组织的所述溶瘤病毒的感染复数(MOI)是约0.05至约5。在一些实施方案中,所述组织处所述核质转运抑制剂的浓度是约0.0001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M。在一些实施方案中,所述组织处所述核质转运抑制剂的浓度是约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M。在一些实施方案中,该方法包括使所述癌细胞与所述溶瘤病毒和所述核质转运抑制剂同时或依序接触。在一些实施方案中,使该癌细胞在与所述核质转运抑制剂接触之前与所述溶瘤病毒接触。在一些实施方案中,使该癌细胞在与所述溶瘤病毒接触之前与所述核质转运抑制剂接触。在一些实施方案中,该方法包括在使所述癌细胞与所述溶瘤病毒接触之前用所述核质转运抑制剂预处理所述癌细胞。在一些实施方案中,使该癌细胞以约0.01至约10的MOI与所述溶瘤病毒接触。在一些实施方案中,使该癌细胞以约0.05至约5的MOI与所述溶瘤病毒接触。在一些实施方案中,该方法包括将所述癌细胞在培养基中孵育,该培养基包含浓度为约0.0001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的所述核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该方法包括将所述癌细胞在培养基中孵育,该培养基包含浓度为约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M的所述核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该方法包括使所述癌细胞与培养基接触,该培养基包含浓度为约0.0001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的所述核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该方法包括使所述癌细胞与培养基接触,该培养基包含浓度为约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M的所述核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该方法包括使所述溶瘤病毒与自体细胞或异源细胞离体接触。在一些实施方案中,该自体细胞或异源细胞是骨髓细胞或巨噬细胞。在一些实施方案中,该方法包括将所述自体细胞或异源细胞注射至所述对象中。

[0017] 在一个方面,本文描述了一种药物组合物,该药物组合物包含:溶瘤病毒和核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该药物组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂或载体。在一些实施方案中,该药物组合物呈适于肿瘤内或肠胃外施用的单位剂型。在一些实施方案中,该单位剂量包含约 $1 \times 10^3$ 噬斑形成单位(PFU)至约 $1 \times 10^{10}$ PFU的该溶瘤病毒每mL。在一些实施方案中,该单位剂量包含约 $1 \times 10^5$ PFU至约 $1 \times 10^{10}$ PFU的该溶瘤病毒每mL。在一些实施方案中,所述溶瘤病毒与所述核质转运抑制剂之间的重量比是约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{-9}$ 。

## 附图说明

[0018] 图1A和图1B说明用核质转运抑制剂来普霉素B处理人结肠直肠腺癌细胞系HT29增强了MYXV早期(GFP)和晚期(TdTomato)基因表达水平。将HT29细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时并且在抑制剂的存在下以5.0(图1A)或0.5(图1B)的MOI用vMyx-GFP-Tdtomato感染,并且在感染后24小时(图1A)和48小时(图1B)(HPI)使用荧光显微镜拍摄荧光图像。

[0019] 图2说明核质转运抑制剂来普霉素B增强了人结肠直肠腺癌细胞系HT29中的MYXV

复制。将HT29细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时。然后将细胞以0.5或0.05的MOI用vMyx-GFP-TdTomato感染1小时。在1小时之后去除未吸附的病毒,将细胞洗涤并且在抑制剂的存在与培养基一起孵育。在感染后72小时之后收获感染细胞,并且在系列稀释至RK13细胞上后确定病毒滴度。

[0020] 图3A和图3B说明用核质转运抑制剂来普霉素B处理人胰腺癌细胞系PANC-1增强了MYXV基因表达和复制。图3A显示将PANC-1细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时并且在抑制剂的存在下以5.0的MOI用vMyx-GFP-Tdtomato感染,并且在感染后48小时使用荧光显微镜拍摄荧光图像。图3B显示将PANC-1细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时。然后将细胞以5.0或0.5的MOI用vMyx-GFP-TdTomato感染1小时。在1小时之后去除未吸附的病毒,并且然后将细胞洗涤并且在抑制剂的存在与培养基一起孵育。在感染后48小时或72小时收获感染细胞,并且在系列稀释至RK13细胞上后确定病毒滴度。

[0021] 图4A和图4B说明用核质转运抑制剂来普霉素B处理人黑素瘤细胞系MDA-MB-435增强了MYXV基因表达和复制。图4A显示将MDA-MB-435细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时并且在抑制剂的存在下以5.0的MOI用vMyx-GFP-Tdtomato感染,并且在感染后48小时使用荧光显微镜拍摄荧光图像。图4B显示将MDA-MB-435细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时,并且然后将细胞以5.0或0.5的MOI用vMyx-GFP-TdTomato感染1小时。在1小时之后去除未吸附的病毒,并且然后将细胞洗涤并且在抑制剂的存在与培养基一起孵育。在感染后48小时或72小时收获感染细胞,并且在系列稀释至RK13细胞上后确定病毒滴度。

[0022] 图5A和图5B说明用核质转运抑制剂处理人癌细胞系且随后用MYXV感染降低了细胞活力。图5A显示HT29细胞并且图5B显示PANC-1细胞(100u1培养基中20,000个细胞/孔)在有或不透明壁的96孔板中培养过夜。然后将细胞与不同浓度的来普霉素B处理1小时并且在抑制剂的存在下以5.0的MOI用vMyx-GFP感染。通过在感染后64小时(图5A)和40小时(图5B)测量ATP的水平来确定细胞活力。

## 具体实施方式

[0023] 病毒天然地利用允许性细胞进行感染和复制;然而,并非所有肿瘤细胞对于溶瘤病毒感染是允许性的。本公开内容涉及以下出人意料的发现:用试剂诸如一种或多种核质转运抑制剂处理非允许性癌细胞可以将非允许性细胞转化为允许性细胞,促进溶瘤病毒在癌细胞中的复制,从而增强癌细胞杀伤。

[0024] 如本文所展示的核质转运抑制剂的使用可以有助于在通常对溶瘤病毒的感染不易感(即在不存在核质转运抑制剂下对溶瘤病毒感染不易感)的癌细胞中增强溶瘤病毒基因表达和复制。核质转运抑制剂的添加还可以在通常对感染不易感的宿主细胞中增强溶瘤病毒子代的产生或溶瘤病毒的增殖。核质转运抑制剂对非允许性癌细胞的作用在将核质转运抑制剂与溶瘤病毒组合使用时可以转变为增强的癌细胞杀伤作用,由此提供了更有效的用于治疗癌症的方法。

[0025] 本公开内容提供了通过施用溶瘤病毒和核质转运抑制剂来治疗癌症,例如对溶瘤病毒感染原本不易感或具有低易感性的癌症的方法。本文还提供了通过以下方式将非允许性癌细胞转化为允许性癌细胞的方法和杀伤癌细胞的方法:使癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。本文进一步提供了药物组合物,这些药物组合物包含溶瘤病毒和核质转运

抑制剂。

[0026] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可以在本公开内容的实践或测试中使用,但下文描述了合适的方法和材料。另外,材料、方法和实施例仅仅是说明性的,而不是限制性的。

[0027] 提供以下术语和方法的解释是为了更好地描述本发明的化合物、组合物和方法,并指导本领域普通技术人员实施本公开内容。还应理解的是,本公开内容中使用的术语仅用于描述特定实施方案和实施例,而非旨在限定。

[0028] 如本文所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”旨在还包括复数形式。

[0029] 如本文所用,术语“和/或”是指并涵盖一个或多个相关联的所列项目的任何和所有可能的组合,以及当以替代(“或”)解释时缺少的组合。

[0030] 术语“约”可以意指在如通过本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,其部分取决于该值的测量或确定方式,即测量系统的限度。例如,根据本领域的实践,“约”可以意指在1个标准偏差以内或超过1个标准偏差。可替代地,“约”可意指给定值的至多20%、至多15%、至多10%、至多5%或至多1%的范围。可替代地,特别是关于生物系统或过程,该术语可以意指在值的数量级以内、在值的5倍以内、或在值的2倍以内。

[0031] 如本文所用,“一个或多个”或至少一个可表示1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多,最多为任何数目。

[0032] 如本文所用,术语“包含(comprises)”或“包含(comprising)”意指“包括(includes)”。因此,“包含A或B”意指包括A、B或A和B。如本文所用,“包含(Comprise)”及该术语的变型,诸如“包含(comprising)”、“包含(comprises)”和“包含(comprised)”意指可以结合地采用各种不同的另外组分或步骤。

[0033] “有效量”是指足以产生所需作用,例如增加痘病毒的产生的化合物或组合物的量。在该实例中,有效量将随着细胞类型和施用的特定试剂、治疗持续时间、任何同时治疗的性质以及本领域技术人员的认知和专业知识的类似因素而变化。

[0034] 如本文所用,术语“允许性”是指细胞是否易于被本申请中所述的病毒感染。如本文所用,术语“对感染易感”是指细胞变为被病毒或另外的细胞内生物体感染的能力。虽然它涵盖“允许性”感染,但是不旨在该术语被如此限制,因为旨在该术语涵盖其中细胞被感染,但该生物体不一定复制和/或从感染细胞传播至其他细胞的情况。如本文所用,短语“病毒增殖”描述了感染性病毒从允许性细胞类型传播或传代至允许性或易感特征的另外的细胞。

[0035] 如本文所用,术语“宿主细胞”应广泛地理解为非限制地涵盖关于组织、器官或分离细胞的特定结构。此类细胞可以是独特类型的细胞或一组不同类型的细胞诸如培养的细胞系、原代细胞和分裂细胞。宿主细胞的实例可以包括但不限于原核细胞、低等真核细胞诸如酵母和其他真核细胞诸如昆虫细胞诸如昆虫细胞和哺乳动物(人或非人)细胞以及能够产生溶瘤病毒的细胞。宿主细胞可以是癌细胞,例如生物体内的癌细胞。

[0036] “核质转运抑制剂”是抑制分子通过核输出途径的转运的试剂。术语“核质转运抑制剂”与“核输出抑制剂”可互换使用。核质转运抑制剂的实例包括但不限于来普霉素A、来

普霉素B、Ratjadone A、Ratjadone B、Ratjadone C、Ratjadone D、似蛇霉素A、哥纳香素、茛菪酰胺、白花丹素、姜黄素、缬草三酯、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯、异戊烯基香豆素蛇床子素、KOS 2464、PKF050-638、CBS9106和塞利尼索。

[0037] “病毒”是在活细胞的内部繁殖的微观感染性生物体。病毒可以基本上由蛋白质外壳包围的单核酸的核心组成,并且仅在活细胞内部具有复制能力。“病毒复制”是由至少一个病毒生命周期的发生产生另外的病毒颗粒。病毒可以破坏宿主细胞的正常功能,导致细胞的行为方式由病毒确定。例如,病毒感染可能导致细胞在未感染细胞通常不产生细胞因子或对细胞因子有应答时产生细胞因子或对细胞因子有应答。本文所使用的术语“具有复制能力的”是指能够在特定宿主细胞内感染和复制的病毒。

[0038] “痘病毒”是来自痘病毒科家族的病毒。痘病毒是能够感染脊椎动物和无脊椎动物两者的双链DNA病毒。痘病毒包括例如被分类为以下的一部分的病毒物种和属:脊椎动物痘病毒亚科亚家族诸如正痘病毒属、副痘病毒属、禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属和亚塔痘病毒属,以及昆虫痘病毒亚科亚家族,包括甲型昆虫痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属和丙型昆虫痘病毒属。

[0039] “接触”意指呈直接物理关联的放置。接触包括分子(诸如抑制剂)与细胞之间的接触,例如通过将试剂与细胞放置为直接物理关联,诸如在与细胞一起培养中。在一些实施方案中,使试剂与细胞接触或暴露至细胞包括将试剂放置于细胞的生长培养基中。

[0040] “抑制”意指减少至可测量程度,例如意指减少核输出途径中的转运。“抑制剂”是能够例如将核输出途径中的转运抑制至一定可测量程度的物质。

[0041] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等意指涵盖预防(例如,在处于患有待治疗的病理状况的风险的对象中的预防性措施)和/或疗法(例如在被诊断为患有病理状况的对象中)。治疗的结果是减缓、治愈、减少、控制或改善与其相关的病症和/或症状。“治疗”包括“减轻”的概念,其是指减少与病症和/或相关副作用有关的任何症状或其他不良作用的发生或复发频率或严重程度。术语“治疗”还涵盖“管理”的概念,其是指降低患者体内特定疾病或病症的严重程度或延迟其复发,例如延长已经罹患疾病的患者的缓解期。术语“治疗”进一步涵盖如先前所述的“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”的概念。应理解,尽管没有排除,但治疗病症或病况并不需要完全消除病症、病况或与其相关的症状。

[0042] “药学上可接受的赋形剂或稀释剂”是指可以与试剂一起施用至对象并且在足以递送治疗量的试剂的剂量施用时不破坏其药理学活性且无毒的赋形剂、载体或稀释剂。

[0043] 在下面描述了用于实践或测试本公开内容的合适方法和材料。此类方法和材料仅是说明性的并且不旨在是限制性的。可以使用与本文所述的方法和材料相似或等效的其他方法和材料。例如,本公开内容所属领域中熟知的常规方法描述于各个通用和更具体参考文献中,包括例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989;Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Press,2001;Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates,1992(和至2000年的增刊);Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,第4版,Wiley&Sons,1999;

Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; 以及Harlow和Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999。另外, 材料、方法和实例仅仅是说明性的, 而不旨在是限制性的。

### 溶瘤病毒

[0044] 本文所述的溶瘤病毒涵盖这样的病毒, 该病毒能够在体外或者体内在分裂细胞(例如, 增殖性细胞诸如癌细胞)中选择性复制(目的为减缓生长和/或溶解所述分裂细胞), 而在非分裂细胞中未显示出复制或显示出极小复制。通常, 溶瘤病毒含有包装至病毒颗粒或病毒体中的病毒基因组并且是感染性的(即能够感染并进入宿主细胞或对象中)。如本文所用, 该术语涵盖DNA或RNA载体(取决于病毒类型)以及其产生的病毒颗粒。

[0045] 在一些实施方案中, 溶瘤病毒是针对其选择性感染并杀伤转染的癌细胞的能力, 以及根据其激活宿主的不仅针对病毒还针对肿瘤抗原的免疫系统的能力进行设计和/或选择的哺乳动物病毒。

[0046] 在一些实施方案中, 溶瘤病毒是来自痘病毒科家族的病毒或者来源于痘病毒科家族。痘病毒科病毒家族的成员是可以在感染细胞的细胞质中复制的一组广泛的大型复杂的双链DNA病毒。大多数痘病毒的基因组是约150,000至300,000个碱基对的长度并且编码大约150至300种蛋白质。大约一半的这些病毒蛋白在不同的痘病毒成员之间高度保守, 并且执行像细胞结合和进入、基因组复制、转录和病毒体组装的基本功能。其他病毒蛋白参与逃避许多宿主防御功能。痘病毒基因可以在不同的阶段中表达。例如, 早期基因产物可以包括为病毒DNA复制所必需并且在复制DNA之前表达的蛋白质。另一方面, 在DNA复制期间或之后表达的中期/晚期基因产物可以包括病毒体成熟所需的结构蛋白。该复杂的病毒复制过程的所有步骤(从对基因组脱外壳开始, 早期基因表达、DNA复制、晚期基因表达和甚至更复杂的病毒体成熟过程)可以仅在感染细胞的细胞质中发生。

[0047] 痘病毒是可以仅在感染细胞的细胞质内复制的大型DNA病毒。它们可以编码DNA和mRNA合成所需的所有蛋白质。除了参与痘病毒复制的病毒蛋白外, 大约一半的痘病毒基因组编码已经显示出为抑制或操纵在细胞质和核中起作用的不同细胞内抗病毒信号传导途径所需的蛋白质。然而, 有证据表明, 来自细胞质和核隔室的宿主细胞蛋白参与了痘病毒复制的至少一些步骤。许多不同的细胞蛋白和信号传导途径已经牵涉防御细胞免受痘病毒的感染和复制。这就是为什么超过一半的基因组编码的痘病毒蛋白参与了这些宿主抗病毒途径的特异性抑制或调节。在一些情况下, 病毒编码的蛋白质以宿主特异性方式起作用并且决定给定痘病毒是否将能够在特定的宿主物种中成功地感染和复制。痘病毒的成员(例如, 粘液瘤病毒(MYXV), 一种兔痘病毒, 和牛痘病毒(VACV), 一种正痘病毒)可以开发为用于治疗人癌症的溶瘤病毒。

[0048] 在某些实施方案中, 感兴趣的痘病毒是经遗传修饰的。例如, 可以修饰感兴趣的痘病毒以携带任何其他基因(诸如治疗性基因)和/或缺失或破坏一个或多个内源性病毒基因。在经修饰以治疗癌症的病毒的情况下, 通常将选择基因以增强治疗的抗癌效果。这样的基因可以是参与引发细胞凋亡的基因, 或者参与靶向感染细胞用于免疫杀伤, 诸如修复对干扰素缺乏应答的基因, 或导致刺激抗体应答的细胞表面标志物(诸如细菌细胞表面抗原)表达的基因。该病毒还可以被修饰以表达参与阻断赘生性或癌细胞的增殖和生长的基因,

从而防止细胞分裂。同样,该病毒可以被修饰以包括治疗基因,诸如参与化学治疗剂合成的基因,或者它可以被修饰以在特定物种的细胞中具有增加的复制水平,待抑制或杀死的细胞来源于所述特定物种的细胞,例如人细胞。

[0049] 在一些实施方案中,溶瘤病毒是来自脊椎动物痘病毒亚科亚家族或昆虫痘病毒亚科亚家族的病毒或者来源于脊椎动物痘病毒亚科亚家族或昆虫痘病毒亚科亚家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自作为正痘病毒属、鹿痘病毒属、副痘病毒属、禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属、亚塔痘病毒属、甲型昆虫痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属或丙型昆虫痘病毒属的属。在一些实施方案中,溶瘤病毒来源于来自作为正痘病毒属、鹿痘病毒属、副痘病毒属、禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属、亚塔痘病毒属、甲型昆虫痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属或丙型昆虫痘病毒属的属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自正痘病毒属或者来源于正痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是牛痘病毒或者来源于牛痘病毒。在一些实施方案中,牛痘病毒是选自以下项的牛痘病毒毒株:Lister、Wyeth、Western Reserve、改良型牛痘病毒安卡拉和LC16m系列。在一些实施方案中,溶瘤病毒是浣熊痘病毒(Raccoonpox virus)或者来源于浣熊痘病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自鹿痘病毒属或者来源于鹿痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是口疮病毒(Orf virus)或者来源于口疮病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自副痘病毒属或者来源于副痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自禽痘病毒属或者来源于禽痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自羊痘病毒属或者来源于羊痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自猪痘病毒属或者来源于猪痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自软疣痘病毒属或者来源于软疣痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自亚塔痘病毒属或者来源于亚塔痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自甲型昆虫痘病毒属或者来源于甲型昆虫痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自乙型昆虫痘病毒属或者来源于乙型昆虫痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自丙型昆虫痘病毒属或者来源于丙型昆虫痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自兔痘病毒属或者来源于兔痘病毒属的病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是粘液瘤病毒(MYXV)或者来源于MYXV。

[0050] MYXV潜在地非常适合用作针对实体癌症诸如骨肉瘤的治疗性病毒,这是由于其独特的生物学。MYXV是家族痘病毒科和兔痘病毒属的成员。因此,在某些实施方案中,感兴趣的痘病毒是候选溶瘤病毒。在某些实施方案中,感兴趣的痘病毒是兔痘病毒,诸如粘液瘤病毒。在某些实施方案中,感兴趣的痘病毒是正痘病毒属,诸如牛痘病毒,包括牛痘病毒的不同毒株,诸如Lister、Wyeth、Western Reserve (WR)、改良型牛痘病毒安卡拉(MVA)和LC16m系列;以及浣熊痘病毒(RCNV)。在某些实施方案中,感兴趣的痘病毒是亚塔痘病毒属,诸如塔纳痘病毒(Tanapoxvirus) (TPV)或雅巴(Yaba)样疾病病毒(YLDV)。在某些实施方案中,感兴趣的痘病毒是羊痘病毒,诸如口疮病毒。

[0051] MYXV是兔特异性病原体。MYXV可以是属于痘病毒的兔痘病毒属的任何病毒,其是有复制能力的。在一些实施方案中,MYXV是MYXV的野生型毒株或者来源于MYXV的野生型毒株。在一些实施方案中,MYXV是MYXV的经遗传修饰的毒株或者来源于MYXV的经遗传修饰的毒株。在一些情况下,MYXV是洛桑(Lausanne)毒株或者来源于洛桑毒株。在一些情况下,MYXV是在南美森林兔(*Sylvilagus brasiliensis*)中传播的南美MYXV毒株或者来源于在南

美森林兔中传播的南美MYXV毒株。在一些情况下,MYXV是在丛毛棉尾兔(*Sylvilagus bachmani*)中传播的加利福尼亚MYXV毒株或者来源于在丛毛棉尾兔中传播的加利福尼亚MYXV毒株。在一些情况下,MYXV是6918,即包含基因M009L、M036L、M135R和M148R中的修饰的减毒西班牙野生毒株(GenBank登录号EU552530,将其特此通过引用并入,如在2019年7月27日通过GenBank提供的)或者来源于6918。在一些情况下,MYXV是6918VP60-T2(GenBank登录号EU552531,将其特此通过引用并入,如在2019年7月27日通过GenBank提供的)或者来源于6918VP60-T2。在一些情况下,MYXV是称为标准实验室毒株(SLS)的毒株或者来源于SLS。

[0052] 在一些情况下,MYXV包含与以下文献中公开的序列的至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%,诸如在95%与98%、95%与99%之间,包括90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性:Cameron等人,“The complete DNA sequence of Myxoma Virus,”*Virology* 264:298-318(1999)(将该文献通过引用以其全文并入本文)。在一些情况下,MYXV包含以下文献中公开的序列:Cameron等人,“The complete DNA sequence of Myxoma Virus,”*Virology* 264:298-318(1999)。

[0053] 在一些实施方案中,MYXV在人(例如,有免疫能力的人)中是非致病性的,但能够感染和杀伤广泛范围的来源于不同组织的人癌细胞。在正常的原代人细胞中,MYXV的复制可能受到多个因素的限制,该多个因素例如像细胞结合决定因素、细胞内抗病毒信号传导途径和I型IFN和/或其他细胞因子介导的细胞抗病毒状态。在人癌细胞中,这些自卫细胞途径通常是缺陷型的。MYXV复制在一些人癌细胞中可能取决于细胞RNA解旋酶家族蛋白。不希望受理论的束缚,在核和细胞质隔室之间穿梭的RNA解旋酶可能影响病毒感染细胞中的MYXV复制。除RNA解旋酶外,其他核蛋白可能有助于MYXV和其他痘病毒的复制循环。例如,核蛋白可能影响转化的人宿主细胞系中痘病毒的复制效率。

[0054] 在一些实施方案中,溶瘤病毒来自以下项组成的病毒家族:痘病毒科、疱疹病毒科(Herpesviridae)、呼肠孤病毒科(Reoviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、腺病毒科(Adenoviridae)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)、小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)、细小病毒科(Parvoviridae)和小核糖核酸病毒科,或者来源于由以下组成的病毒家族:痘病毒科、疱疹病毒科、呼肠孤病毒科、副粘病毒科、逆转录病毒科、腺病毒科、弹状病毒科、小核糖核酸病毒科、细小病毒科和小核糖核酸病毒科。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自疱疹病毒科家族或者来源于疱疹病毒科家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自呼肠孤病毒科家族或者来源于呼肠孤病毒科家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自副粘病毒科家族或者来源于副粘病毒科家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自逆转录病毒科家族或者来源于逆转录病毒科家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自腺病毒科家族或者来源于腺病毒科家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自弹状病毒科家族或者来源于弹状病毒科家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自小核糖核酸病毒科家族或者来源于小核糖核酸病毒科家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自细小病毒科家族或者来源于细小病毒科家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自小核糖核酸病毒科家族。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自作为单纯疱疹病毒属(Simplexvirus)、腮腺炎病毒属(Rubulavirus)或塞内卡病毒(Senecavirus)的属或者来源于作为单纯疱疹病毒属、腮腺炎病毒属或塞内卡病毒的属。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自单纯疱疹病毒属或者来源于单纯疱疹病毒属。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自腮腺炎病毒属或者来源于腮腺炎病毒

属。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自塞内卡病毒属或者来源于塞内卡病毒属。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自作为麻疹、鸡痘、水泡性口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus)、腮腺炎病毒(Mumps rubulavirus)、柯萨奇病毒(Coxsackie Virus)和牛痘的病毒物种或者来源于麻疹、鸡痘、水泡性口炎病毒、腮腺炎病毒、柯萨奇病毒和牛痘的病毒物种。在一些实施方案中,溶瘤病毒是麻疹病毒或者来源于麻疹病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是鸡痘病毒或者来源于鸡痘病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是水泡性口炎病毒或者来源于水泡性口炎病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是腮腺炎病毒或者来源于腮腺炎病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是柯萨奇病毒或者来源于柯萨奇病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是牛痘病毒或者来源于牛痘病毒。

[0055] 在一些实施方案中,溶瘤病毒是有复制能力的。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自野生型毒株或者来源于野生型毒株。在一些实施方案中,溶瘤病毒来自经遗传修饰的毒株或者来源于经遗传修饰的毒株。在一些实施方案中,溶瘤病毒是经遗传修饰的。在一些实施方案中,溶瘤病毒在人中是非致病性的,但能够感染和杀伤广泛范围的来源于不同组织的人癌细胞。在一些实施方案中,溶瘤病毒的核酸序列包含与野生型病毒序列的核酸序列的至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%,诸如在95%与98%、95%与99%之间,包括90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%和99%序列同一性。

#### 核质转运抑制剂

[0056] 如本文所公开的,核质转运抑制剂可以针对癌细胞诸如非允许性癌细胞增强病毒复制并且降低细胞活力。在某些实施方案中,核质转运抑制剂是选择性抑制剂。在某些实施方案中,核质转运抑制剂是非选择性的。在一些实施方案中,所述的核质转运抑制剂是能够干扰核质运输的试剂。在一些实施方案中,这些试剂通过干扰蛋白质运输来抑制核质转运。在一些实施方案中,这些试剂包括盐酸三氟拉嗪(Trifluoperazine hydrochloride)、W13、ETP-45648、长春碱、Akt抑制剂X、INCA、SMIP001/004、白藜芦醇、玫瑰树碱(Elliticine)、WGA、cSN50肽、bimax1/2肽、来普霉素B、似蛇霉素、哥纳香素、Ratjadone、缬草三酯、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯、15d-PGJ2、Peumusolide A、PKF050-638、KOS-2464、CBS9106或其组合。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括小分子化合物。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括天然化合物,诸如Ratjadone、缬草三酯和乙酰氧基胡椒酚乙酸酯。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括选择性核输出抑制剂(SINE)。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括可逆核输出抑制剂诸如CBS9106。

[0057] 在某些实施方案中,核质转运抑制剂包括以下中的一种或多种:来普霉素A、来普霉素B、Ratjadone A、B、C和D、似蛇霉素A、哥纳香素、茛菪酰胺、白花丹素、姜黄素、缬草三酯、乙酰氧基胡椒酚乙酸酯、异戊烯基香豆素蛇床子素或合成的核质转运抑制剂诸如KOS 2464、PKF050-638 (N-吡唑基(azolyl) 丙烯酸酯类似物)、CBS9106、塞利尼索以及Mathew和Ghildyal, CRM1 inhibitors for antiviral therapy, Frontiers in Microbiology 2017, 第8卷, 文章1171 (将其通过引用并入本文) 中发现的那些。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括来普霉素A。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括来普霉素B。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括Ratjadone A。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括Ratjadone B。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括Ratjadone C。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括Ratjadone D。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括似蛇霉素A。在

一些实施方案中,核质转运抑制剂包括哥纳香素。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括草茛酰胺。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括白花丹素。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括姜黄素。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括缬草三酯。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括乙酰氧基胡椒酚乙酸酯。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括异戊烯基香豆素蛇床子素。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括KOS 2464。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括PKF050-638。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括CBS9106。在一些实施方案中,核质转运抑制剂包括塞利尼索。在一些实施方案中,核质转运抑制剂是来普霉素B。

#### 治疗方法

[0058] 核质转运抑制剂的使用出人意料地有助于将对溶瘤病毒(例如,MYXV)的感染不易感的癌细胞转化为对溶瘤病毒的感染易感的癌细胞,即诱导癌细胞对溶瘤病毒的感染的易感性。核质转运抑制剂的添加增加癌细胞对溶瘤病毒的感染的易感性。核质转运抑制剂可以用于使对溶瘤病毒的感染具有低易感性的癌细胞变为对溶瘤病毒的感染具有高易感性的癌细胞。因此,可以将核质转运抑制剂与溶瘤病毒组合施用以改善溶瘤病毒在治疗癌症和杀伤肿瘤细胞方面的功效。

[0059] 本文公开了使用溶瘤病毒和包含溶瘤病毒的组合物。在一些实施方案中,本文公开了用于通过以下方式治疗癌症的方法:向对象施用治疗有效量的溶瘤病毒(例如,MYXV或VACV)和核质转运抑制剂。在一个方面,本文公开了将非允许性细胞转化为允许性细胞的方法,这些方法包括:使对溶瘤病毒非允许性的癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触,从而转化所述癌细胞。在另一个方面,本文公开了杀伤癌细胞的方法,这些方法包括:使癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触,从而杀伤所述癌细胞。因此,在一些实施方案中,本公开内容提供了通过以下方式在非允许性癌细胞中增加病毒复制的方法:用核质转运抑制剂处理非允许性细胞。

[0060] 一些实施方案涉及一种增强癌细胞对溶瘤病毒的感染的易感性的方法,该方法包括使癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。一些实施方案涉及一种使癌细胞对溶瘤病毒的感染易感的方法,该方法包括使癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

[0061] 一些实施方案涉及一种在对溶瘤病毒的感染不易感的癌细胞中增加溶瘤病毒的增殖的方法,该方法包括:使癌细胞与溶瘤病毒和核质转运抑制剂接触。

[0062] 可以将溶瘤病毒和核质转运抑制剂一起或单独施用。在一些实施方案中,可以将溶瘤病毒和核质转运抑制剂一起施用。在一些实施方案中,可以将溶瘤病毒和核质转运抑制剂单独施用。当将溶瘤病毒和核质转运抑制剂单独施用时,溶瘤病毒可以在核质转运抑制剂之前施用。当将溶瘤病毒和核质转运抑制剂单独施用时,溶瘤病毒可以在核质转运抑制剂之后施用。

[0063] 在一些实施方案中,癌细胞(例如非允许性癌细胞)是动物细胞诸如哺乳动物细胞。在一些实施方案中,癌细胞(例如非允许性癌细胞)是人细胞。在某些实施方案中,细胞是永生化人或灵长类动物细胞。在一些实施方案中,细胞来自癌细胞系。在一些实施方案中,细胞是人A549细胞、HeLa细胞、239细胞或灵长类动物Vero细胞。癌细胞可以是体内细胞、体外细胞或离体细胞。在一些实施方案中,癌细胞是待治疗的对象的癌症组织的细胞。

[0064] 癌症可以是实体瘤或血液肿瘤。在一些实施方案中,癌症是白血病(例如,急性白

血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性成髓细胞性白血病、急性早幼粒细胞性白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性粒细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如,霍奇金(Hodgkin's)病、非霍奇金病)、瓦尔登斯特伦(Waldenstrom's)巨球蛋白血症、重链疾病或实体瘤。在一些实施方案中,该癌症是实体瘤。在一些实施方案中,该实体瘤是肉瘤或癌。在一些实施方案中,该实体瘤是纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilms瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤或成视网膜细胞瘤。在一些实施方案中,该实体瘤是结肠直肠癌、胰腺癌或黑素瘤。在一些实施方案中,该实体瘤是骨癌诸如软骨肉瘤、尤文肉瘤和骨肉瘤。在一些实施方案中,该实体瘤是骨肉瘤。

[0065] 可以将溶瘤病毒和核质转运抑制剂同时或依序施用至患有癌症的对象。在一些实施方案中,将溶瘤病毒和核质转运抑制剂同时施用至对象。在一些实施方案中,将溶瘤病毒和核质转运抑制剂在其施用至对象之前预混合。在一些实施方案中,将溶瘤病毒和核质转运抑制剂单独施用至对象。在一些实施方案中,将溶瘤病毒在核质转运抑制剂之前施用。在一些实施方案中,将溶瘤病毒在核质转运抑制剂之后施用。在一些实施方案中,该方法包括使癌细胞或癌症组织与溶瘤病毒和核质转运抑制剂同时或依序接触。在一些实施方案中,使癌细胞或癌症组织在其与核质转运抑制剂接触之前与溶瘤病毒接触。在一些实施方案中,使癌细胞或癌症组织在其与溶瘤病毒接触之前与核质转运抑制剂接触。在一些实施方案中,该方法包括使癌细胞或癌症组织与溶瘤病毒和核质转运抑制剂的预混合物接触。在一些实施方案中,使癌细胞或癌症组织与溶瘤病毒和核质转运抑制剂单独接触。

[0066] 在一些实施方案中,该方法包括用核质转运抑制剂预处理癌细胞或癌症组织。在一些实施方案中,在使癌细胞或癌症组织与溶瘤病毒接触之前,将该细胞或组织用核质转运抑制剂预处理至少1分钟、至少2分钟、至少5分钟、至少10分钟、至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少6小时、至少12小时、至少24小时或至少1周。在一些实施方案中,在使癌细胞或癌症组织与溶瘤病毒接触之前,将该细胞或组织用核质转运抑制剂预处理至多1分钟、至多2分钟、至多5分钟、至多10分钟、至多30分钟、至多1小时、至多2小时、至多6小时、至多12小时、至多24小时或至多1周。在一些实施方案中,在使癌细胞或癌症组织与溶瘤病毒接触之前,将该细胞或组织用核质转运抑制剂预处理约1分钟至约1天、约5分钟至约12小时、约10分钟至约2小时或约30分钟至约90分钟的时间段。在一些实施方案中,在使癌细胞或癌症组织与溶瘤病毒接触之前,将该细胞或组织用核质转运抑制剂预处理约1小时。

[0067] 在一个方面,本文描述了方法,这些方法包括向对于患有癌症的对象为自体的、同种异体的或异源的细胞施用溶瘤病毒。溶瘤病毒可以体内或离体施用。在一些实施方案中,该方法包括将溶瘤病毒离体施用至自体细胞。在一些实施方案中,该方法包括将溶瘤病毒离体施用至同种异体细胞。在一些实施方案中,该方法包括将溶瘤病毒离体施用至异源细

胞。在一些实施方案中,自体、同种异体或异源细胞是骨髓细胞或巨噬细胞。在一些实施方案中,自体、同种异体或异源细胞是干细胞。在一些实施方案中,自体、同种异体或异源细胞是对溶瘤病毒非允许性的任何细胞。在一些实施方案中,自体、同种异体或异源细胞是对溶瘤病毒允许性的任何细胞。在一些实施方案中,自体、同种异体或异源细胞是健康细胞。在一些实施方案中,施用包括使溶瘤病毒与自体、同种异体或异源细胞接触。在一些实施方案中,该方法包括将所述自体、同种异体或异源细胞施用至对象中。在一些实施方案中,该方法包括将所述自体、同种异体或异源细胞注射至对象中。在一些实施方案中,该方法包括在施用自体、同种异体或异源细胞前施用核质转运抑制剂。在一些实施方案中,该方法包括在施用自体、同种异体或异源细胞之后施用核质转运抑制剂。

[0068] 在一些实施方案中,该方法包括将溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者施用至对象一定时间段。在一些实施方案中,该时间段是至少1天、至少2天、至少3天、至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少1个月、至少3个月、至少6个月或至少1年。在一些实施方案中,该时间段是至多1天、至多2天、至多3天、至多1周、至多2周、至多3周、至多4周、至多1个月、至多3个月、至多6个月、至多1年或至多10年。在一些实施方案中,该时间段是约1天至约1年、约1个月至约12个月或1个月至约6个月。在一些实施方案中,该方法包括将该溶瘤病毒、该核质转运抑制剂或两者每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次或每两个月一次施用至该对象。在一些实施方案中,将溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者相隔1至4周,例如相隔约1周、相隔约2周或相隔约3周施用至对象。

[0069] 在一些实施方案中,该方法包括将溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者根据初始剂量方案和后续剂量方案施用。在一些实施方案中,初始剂量方案包括与后续剂量方案不同的给药方案。在一些实施方案中,初始剂量方案包括频率低于后续剂量方案的施用。在一些实施方案中,初始剂量方案包括溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者的1至10次治疗,诸如1至4次治疗或2至3次治疗。在一些实施方案中,根据初始剂量方案,溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者的每次治疗相隔1周至约6周施用。在一些实施方案中,根据初始剂量方案,溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者的每次治疗相隔约1周、相隔约2周、相隔约3周或相隔约4周施用。在一些实施方案中,根据后续剂量方案,溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者的每次治疗相隔1周至约6周施用。在一些实施方案中,根据后续剂量方案,溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者的每次治疗相隔约1周、相隔约2周、相隔约3周或相隔约4周施用。在一些实施方案中,溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者在初始剂量方案中相隔约3周施用并且在后续剂量方案中相隔约2周施用。

[0070] 在一些实施方案中,该方法包括局部施用至待治疗的癌症组织。例如,在一些实施方案中,将溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者局部施用至待治疗的癌症组织。在一些实施方案中,将溶瘤病毒局部施用而未将核质转运抑制剂局部施用。在一些实施方案中,将溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者肠胃外施用。在一些实施方案中,将核质转运抑制剂或两者通过注射来施用。在一些实施方案中,将溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者通过皮肤注射、皮下注射或向结节病变的注射来施用。在一些实施方案中,将溶瘤病毒、核质转运抑制剂或两者通过注射施用至癌症组织或含有癌症组织的癌器官。

[0071] 在一些实施方案中,该方法包括将治疗有效量的核质转运抑制剂施用在癌症组织处或附近。在一些实施方案中,该方法包括使癌细胞或癌症组织与包含治疗有效量的核质

转运抑制剂的培养基接触。在一些实施方案中,该方法包括将癌细胞或癌症组织与包含治疗有效量的核质转运抑制剂的培养基一起孵育。

[0072] 在一些实施方案中,核质转运抑制剂的治疗有效量针对给定癌细胞或癌症组织(例如,给定抑制剂、病毒毒株和宿主细胞系)而确定。核质转运抑制剂的有效量可以例如通过以下方式来确定:如本文公开的,滴定抑制剂的量,以及定量病毒子代和/或细胞活力的复制。在一些实施方案中,核质转运抑制剂的治疗有效量包括约0.000001 $\mu$ M至约100 $\mu$ M、约0.000001 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约0.00001 $\mu$ M至约1 $\mu$ M、约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M、约0.00001 $\mu$ M至约0.1 $\mu$ M、约0.00005 $\mu$ M至约0.05 $\mu$ M或约0.00005 $\mu$ M至约0.005 $\mu$ M的浓度。在一些实施方案中,核质转运抑制剂的治疗有效量包括约0.01 $\mu$ M至约1 $\mu$ M的浓度。在一些实施方案中,核质转运抑制剂的治疗有效量包括大于约0.000001 $\mu$ M、约0.000005 $\mu$ M、约0.00001 $\mu$ M、约0.00005 $\mu$ M、约0.0001、约0.0005 $\mu$ M、约0.001 $\mu$ M、约0.005 $\mu$ M、约0.01 $\mu$ M、约0.05 $\mu$ M或约0.1 $\mu$ M的浓度。在一些实施方案中,核质转运抑制剂的治疗有效量包括不超过约0.0005 $\mu$ M、约0.001 $\mu$ M、约0.0015 $\mu$ M、约0.002 $\mu$ M、约0.0025 $\mu$ M、约0.003 $\mu$ M、约0.0035 $\mu$ M、约0.004 $\mu$ M、约0.0045 $\mu$ M、约0.005 $\mu$ M、约0.01 $\mu$ M、约0.015 $\mu$ M、约0.02 $\mu$ M、约0.025 $\mu$ M、约0.03 $\mu$ M、约0.035 $\mu$ M、约0.04 $\mu$ M、约0.045 $\mu$ M、约0.05 $\mu$ M、约0.1 $\mu$ M、约0.2 $\mu$ M、约0.25 $\mu$ M、约0.3 $\mu$ M、约0.4 $\mu$ M、约0.5 $\mu$ M、约0.75 $\mu$ M、约0.9 $\mu$ M、约1 $\mu$ M、约1.25 $\mu$ M、约1.5 $\mu$ M、约1.75 $\mu$ M、约2 $\mu$ M、约3 $\mu$ M、约4 $\mu$ M、约5 $\mu$ M、约6 $\mu$ M、约7 $\mu$ M、约8 $\mu$ M、约9 $\mu$ M或约10 $\mu$ M的浓度。在一些实施方案中,核质转运抑制剂的治疗有效量在约0.000001 $\mu$ M与约10 $\mu$ M之间,诸如约0.0005 $\mu$ M、约0.001 $\mu$ M、约0.0015 $\mu$ M、约0.002 $\mu$ M、约0.0025 $\mu$ M、约0.003 $\mu$ M、约0.0035 $\mu$ M、约0.004 $\mu$ M、约0.0045 $\mu$ M、约0.005 $\mu$ M、约0.01 $\mu$ M、约0.015 $\mu$ M、约0.02 $\mu$ M、约0.025 $\mu$ M、约0.03 $\mu$ M、约0.035 $\mu$ M、约0.04 $\mu$ M、约0.045 $\mu$ M、约0.05 $\mu$ M、约0.1 $\mu$ M、约0.2 $\mu$ M、约0.3 $\mu$ M、约0.4 $\mu$ M、约0.5 $\mu$ M、约0.6 $\mu$ M、约0.7 $\mu$ M、约0.8 $\mu$ M、约0.9 $\mu$ M、约1.0 $\mu$ M、约1.1 $\mu$ M、约1.2 $\mu$ M、约1.3 $\mu$ M、约1.4 $\mu$ M、约1.5 $\mu$ M、约1.6 $\mu$ M、约1.7 $\mu$ M、约1.8 $\mu$ M、约1.9 $\mu$ M、约2.0 $\mu$ M、约3.0 $\mu$ M、约4.0 $\mu$ M和约5.0 $\mu$ M。

[0073] 在一些实施方案中,该方法包括将治疗有效量的溶瘤病毒(例如,MYXV或VACV)施用在癌症组织处或附近。在一些实施方案中,该方法包括用治疗有效量的溶瘤病毒感染癌细胞或癌症组织。在一些实施方案中,当以有效感染复数(MOI)感染癌细胞或癌症组织时,存在治疗有效量的溶瘤病毒。在一些实施方案中,该方法包括使癌细胞或癌症组织以如本文所述的MOI与溶瘤病毒接触。MOI可以例如通过以下方式针对给定细胞或组织而确定:如本文公开的,滴定病毒与细胞或组织的比率,以及定量病毒子代和/或细胞活力的复制。在一些实施方案中,有效MOI可以最小化药物特异性细胞毒性,同时增强病毒的复制并降低癌细胞活力。在一些实施方案中,使癌细胞与溶瘤病毒(例如,MYXV或VACV)一起孵育允许感兴趣的病毒吸附至细胞的表面的时间段,诸如约20分钟至约5小时,例如约20分钟、约25分钟、约30分钟、约35分钟、约40分钟、约45分钟、约50分钟、约55分钟、约60分钟、约65分钟、约70分钟、约75分钟、约80分钟、约85分钟、约90分钟、约95分钟、约100分钟、约105分钟、约110分钟、约115分钟、约2小时、约2.5小时、约3小时、约3.5小时、约4小时、约4.5小时、约5小时、12小时、18小时、20小时、24小时、30小时、36小时或甚至更长。

[0074] 在某些实施方案中,溶瘤病毒与癌细胞或癌症组织的MOI在约0.001至2.0或约0.01与1.0之间,诸如是约0.001、约0.005、0.01、约0.02、约0.03、约0.04、约0.05、约0.06、约0.07、约0.08、约0.09、约0.1、约0.15、约0.2、约0.25、约0.3、约0.35、约0.4、约0.45、约

0.5、约0.55、约0.6、约0.65、约0.7、约0.75、约0.8、约0.85、约0.9、约0.95、约1.0、约1.1、约1.2、约1.3、约1.4、约1.5、约1.6、约1.7、约1.8、约1.9或约2.0。在某些实施方案中,溶瘤病毒与癌细胞或癌症组织的MOI是约0.01至约10、约0.05至约5和/或其间的范围。在某些实施方案中,溶瘤病毒与癌细胞或癌症组织的MOI是约0.05、约0.5或约5。在一些实施方案中,溶瘤病毒与癌细胞或癌症组织的MOI是至少约0.001、至少约0.005、至少约0.01、至少约0.02、至少约0.03、至少约0.04、至少约0.05、至少约0.06、至少约0.07、至少约0.08、至少约0.09、至少约0.1、至少约0.15、至少约0.2、至少约0.25、至少约0.3、至少约0.35、至少约0.4、至少约0.45、至少约0.5、至少约0.55、至少约0.6、至少约0.65、至少约0.7、至少约0.75、至少约0.8、至少约0.85、至少约0.9、至少约0.95、至少约1.0、至少约1.1、至少约1.2、至少约1.3、至少约1.4、至少约1.5、至少约1.6、至少约1.7、至少约1.8、至少约1.9、至少约2.0、至少约2.5、至少约3.0、至少约4.0、至少约5.0或至少约6.0。在一些实施方案中,溶瘤病毒与癌细胞或癌症组织的MOI是至多约0.01、至多约0.02、至多约0.03、至多约0.04、至多约0.05、至多约0.06、至多约0.07、至多约0.08、至多约0.09、至多约0.1、至多约0.15、至多约0.2、至多约0.25、至多约0.3、至多约0.35、至多约0.4、至多约0.45、至多约0.5、至多约0.55、至多约0.6、至多约0.65、至多约0.7、至多约0.75、至多约0.8、至多约0.85、至多约0.9、至多约0.95、至多约1.0、至多约1.1、至多约1.2、至多约1.3、至多约1.4、至多约1.5、至多约1.6、至多约1.7、至多约1.8、至多约1.9、至多约2.0、至多约2.5、至多约3.0、至多约4.0、至多约5.0、至多约6.0或至多约10。

[0075] 在一些实施方案中,使用核质转运抑制剂增加癌细胞或癌症组织中溶瘤病毒(例如,MYXV或VACV)的复制。在一些实施方案中,与在不存在核质转运抑制剂下的复制速率相比,溶瘤病毒的复制速率快至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。在一些实施方案中,与在不存在核质转运抑制剂下的复制速率相比,溶瘤病毒的复制速率快到至少1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在一些实施方案中,在感染后24小时之后,核质转运抑制剂使癌细胞或癌症组织中溶瘤病毒的复制增加至少30%、50%、70%、90%,增加到至少2倍、3倍、5倍、7倍、9倍、10倍、12倍或15倍。在一些实施方案中,在感染后24小时之后,核质转运抑制剂使癌细胞或癌症组织中溶瘤病毒的复制增加到不超过5倍、10倍、12倍、15倍、20倍、30倍、50倍、70倍或100倍。

[0076] 在一些实施方案中,与在不存在核质转运抑制剂下使用溶瘤病毒相比,使用核质转运抑制剂与溶瘤病毒的组合降低了癌细胞或癌症组织的活力。在一些实施方案中,与在不存在核质转运抑制剂下使用溶瘤病毒时相比,使细胞活力降低至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%的癌细胞。

[0077] 进一步公开了递送策略,其中首先将治疗性MYXV病毒与来自骨髓或外周血单核细胞的离体混合白细胞一起孵育,然后将细胞引入至患有癌症的对象中。在一些实施方案中,将白细胞和MYXV与核质转运抑制剂一起离体孵育。在该策略中,可以将MYXV经由用病毒离体预感染的白细胞的迁移而递送至癌症位点。该全身性递送方法有时被称为“离体病毒疗法”或EVV(亦称EV2),因为在输注至患者体内前首先将病毒递送至分离的白细胞。MYXV构建体和该递送策略可以在有需要的对象中显著降低肿瘤负荷并且增加存活期。在一些实施方案中,将BM或PBMC细胞与MYXV构建体一起离体孵育一小时,且然后将MYXV负载的白细胞输注回至接受者中。在一些实施方案中,与核质转运抑制剂一起的孵育增加了白细胞对MYXV

的摄取和/或增加了MYXV至肿瘤位点的递送。

[0078] 在某些实施方案中,单核外周血细胞和/或骨髓细胞从对象获得,例如作为自体细胞。在一些实施方案中,单核外周血细胞和/或骨髓细胞从一名或多名同种异体供体获得,这些供体例如与接受者针对至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7或至少8个HLA等位基因(诸如HLA-A、HLA-B、HLA-A和/或HLA-DR等位基因的一个或两个拷贝)匹配。可以例如使用基于DNA的方法对HLA等位基因进行分型。在一些实施方案中,单核外周血细胞和/或骨髓细胞从一名或多名异源供体获得。

#### 增加病毒产量的方法

[0079] 在一个方面,本文公开了一种用于复制溶瘤病毒诸如痘病毒的方法,该方法包括:使宿主细胞在允许溶瘤病毒吸附至宿主细胞的表面的条件下暴露于有效量的核质转运抑制剂和溶瘤病毒;以及将感染宿主细胞在培养基中孵育以允许溶瘤病毒的复制。在一些实施方案中,溶瘤病毒是痘病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是MYXV。

[0080] 在一些实施方案中,该方法进一步包括收获在宿主细胞中产生的痘病毒。在一些实施方案中,该方法进一步包括在用痘病毒感染宿主细胞前使宿主细胞与核质转运抑制剂接触。在一些实施方案中,该方法进一步包括在用痘病毒感染宿主细胞之后使宿主细胞与核质转运抑制剂接触。在一些实施方案中,该方法进一步包括使宿主细胞同时暴露于核质转运抑制剂和痘病毒。在一些实施方案中,与不存在核质转运抑制剂下的复制速率相比,痘病毒的复制速率快至少30%。在一些实施方案中,在感染后24小时之后,核质转运抑制剂使痘病毒的复制增加到至少3倍。在一些实施方案中,使宿主细胞以低于2.0的感染复数(MOI)与痘病毒接触。在一些实施方案中,核质转运抑制剂的有效量在约0.0005 $\mu$ M至约0.5 $\mu$ M的范围内。在一些实施方案中,培养基包含核质转运抑制剂。在一些实施方案中,宿主细胞是永生化人或灵长类动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞来自在用于制造痘病毒的良好操作规范(good manufacturing practices,GMP)中使用的细胞系。在一些实施方案中,宿主细胞是人A549细胞、HeLa细胞、239细胞或灵长类动物Vero细胞。在一些实施方案中,该方法进一步包括去除未吸附的痘病毒。

[0081] 在一些方面,本文公开了一种在细胞中以增加的生长速率和/或滴度产生溶瘤病毒的方法,该方法包括:使宿主细胞与有效量的核质转运抑制剂接触;使宿主细胞在允许感兴趣的溶瘤病毒吸附至宿主细胞的表面的条件下与感兴趣的溶瘤病毒接触;以及培养宿主细胞以产生感兴趣的溶瘤病毒的子代。在一些实施方案中,该方法进一步包括收获感兴趣的溶瘤病毒的子代。在一些实施方案中,溶瘤病毒是痘病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是MYXV。

[0082] 在一些实施方案中,本文公开了用于使用核质转运途径的药物抑制剂增加或增强溶瘤病毒基因表达和子代病毒形成的方法。在一些实施方案中,可以利用对通常用于溶瘤病毒的GMP制造的永生化人细胞中的核输出途径的抑制来增加来自这些细胞的病毒产量。因此,本公开内容提供了一种制造潜在治疗性溶瘤病毒的稳健方法。在一些实施方案中,溶瘤病毒是MYXV。

[0083] 在一些实施方案中,当例如在临首次病毒吸附之时前开始将细胞用有效量的抑制剂处理时,该增强的病毒复制是最强效的。在一些实施方案中,抑制剂的有效量针对给定细胞培养系统(例如,给定抑制剂、病毒毒株和宿主细胞系)而确定。抑制剂的有效量可以例如

通过以下方式来确定：如本文公开的，滴定细胞培养系统中抑制剂的量，以及定量病毒子代的产量。在一些实施方案中，抑制剂的有效量可以最小化药物特异性细胞毒性，同时增加病毒子代的产量。在一些实施方案中，核质转运抑制剂的有效量是约0.000001 $\mu$ M至约1 $\mu$ M、约0.000001 $\mu$ M至约0.1 $\mu$ M、约0.00001 $\mu$ M至约0.1 $\mu$ M、约0.00005 $\mu$ M至约0.05 $\mu$ M或约0.00005 $\mu$ M至约0.005 $\mu$ M。在一些实施方案中，核质转运抑制剂的有效量大于约0.000001 $\mu$ M、约0.000005 $\mu$ M、约0.00001 $\mu$ M、约0.00005 $\mu$ M、约0.0001、约0.0005 $\mu$ M、约0.001 $\mu$ M、约0.005 $\mu$ M、约0.01 $\mu$ M、约0.05 $\mu$ M或约0.1 $\mu$ M。在一些实施方案中，核质转运抑制剂的有效量不超过约0.0005 $\mu$ M、约0.001 $\mu$ M、约0.0015 $\mu$ M、约0.002 $\mu$ M、约0.0025 $\mu$ M、约0.003 $\mu$ M、约0.0035 $\mu$ M、约0.004 $\mu$ M、约0.0045 $\mu$ M、约0.005 $\mu$ M、约0.01 $\mu$ M、约0.015 $\mu$ M、约0.02 $\mu$ M、约0.025 $\mu$ M、约0.03 $\mu$ M、约0.035 $\mu$ M、约0.04 $\mu$ M、约0.045 $\mu$ M、约0.05 $\mu$ M、约0.1 $\mu$ M、约0.2 $\mu$ M、约0.25 $\mu$ M、约0.3 $\mu$ M、约0.4 $\mu$ M、约0.5 $\mu$ M、约0.75 $\mu$ M、约0.9 $\mu$ M、约1 $\mu$ M、约1.25 $\mu$ M、约1.5 $\mu$ M、约1.75 $\mu$ M、约2 $\mu$ M、约3 $\mu$ M、约4 $\mu$ M、约5 $\mu$ M、约6 $\mu$ M、约7 $\mu$ M、约8 $\mu$ M、约9 $\mu$ M或约10 $\mu$ M。

[0084] 在一些实施方案中，增强的病毒复制在当将细胞以有效感染复数 (MOI) 感染时发生，并且然后例如在核质转运抑制剂的存在下维持。MOI可以例如通过以下方式针对给定细胞培养系统（例如，给定抑制剂、病毒毒株和宿主细胞系）而确定：如本文公开的，滴定细胞培养系统中病毒与宿主细胞的比率，以及定量病毒子代的产量。在一些实施方案中，有效MOI可以最小化药物特异性细胞毒性，同时增强病毒的复制并增加病毒子代的产量。

[0085] 可以使宿主细胞与感兴趣的痘病毒（例如，MYXV）在允许感兴趣的痘病毒吸附至宿主细胞的表面的条件下接触。在某些实施方案中，使细胞以下述感染复数 (MOI) 与感兴趣的痘病毒接触，该感染复数在约0.001至2.0或约0.01与1.0之间，诸如约0.001MOI、约0.005MOI、0.01MOI、约0.02MOI、约0.03MOI、约0.04MOI、约0.05MOI、约0.06MOI、约0.07MOI、约0.08MOI、约0.09MOI、约0.1MOI、约0.15MOI、约0.2MOI、约0.25MOI、约0.3MOI、约0.35MOI、约0.4MOI、约0.45MOI、约0.5MOI、约0.55MOI、约0.6MOI、约0.65MOI、约0.7MOI、约0.75MOI、约0.8MOI、约0.85MOI、约0.9MOI、约0.95MOI、约1.0MOI、约1.1MOI、约1.2MOI、约1.3MOI、约1.4MOI、约1.5MOI、约1.6MOI、约1.7MOI、约1.8MOI、约1.9MOI或约2.0MOI。在一些实施方案中，在培养细胞前，例如通过洗涤细胞来去除未吸附的感兴趣的痘病毒。在用核质转运抑制剂处理之后，将宿主细胞在药物的存在下培养以产生感兴趣的痘病毒的子代。适当的培养条件可以基于具体细胞类型选择。在一些实施方案中，使细胞与感兴趣的痘病毒一起孵育允许感兴趣的痘病毒吸附至宿主细胞的表面的时间段，诸如约20分钟至约5小时，例如约20分钟、约25分钟、约30分钟、约35分钟、约40分钟、约45分钟、约50分钟、约55分钟、约60分钟、约65分钟、约70分钟、约75分钟、约80分钟、约85分钟、约90分钟、约95分钟、约100分钟、约105分钟、约110分钟、约115分钟、约2小时、约2.5小时、约3小时、约3.5小时、约4小时、约4.5小时、约5小时、12小时、18小时、20小时、24小时、30小时、36小时或甚至更长。在某些实施方案中，将宿主细胞在有效量的（例如在以上所述的浓度下的）核质转运抑制剂的存在下培养。可以将宿主细胞培养约一至数天，诸如3至5天，然后收获子代病毒。在一些实施方案中，该方法包括收获感兴趣的痘病毒的子代。

[0086] 如本文所公开的，核质转运抑制剂可以增强此类细胞中的病毒复制和子代病毒产量。该药物强化方法提供了用于增加痘病毒诸如MYXV和VACV的产量的实用方法，该实用方法可以开发用于这些病毒的大规模GMP生产和临床用途。在一些实施方案中，本公开内容证

明,当应用至永生化人和灵长类动物细胞中的痘病毒GMP制造时,核质转运抑制剂可以用于增加痘病毒的产量包括候选溶瘤病毒诸如牛痘病毒(VACV)和粘液瘤病毒(MYXV)。

[0087] 本公开内容提供了一种在转化的人和灵长类动物细胞(例如通常用于GMP制造或病毒诸如溶瘤病毒)的那些中增加痘病毒产量的方法。与已经提出为候选溶瘤病毒的其他病毒相比,痘病毒诸如MYXV和VACV在大规模制造和纯化方面存在一些独特的挑战。由于其大小较大,牛痘病毒不能通过过滤灭菌,且因此任何制造过程通常是封闭的。在宿主细胞细胞质内发生的整个生命周期,大部分感染性颗粒未释放至细胞培养基中,而是保留在感染细胞内,因此纯化需要裂解感染细胞和从细胞碎片纯化病毒颗粒。

[0088] 在一些实施方案中,本文公开了用例如当临病毒吸附之时前添加时抑制核输出途径的试剂诸如小分子处理永生化人细胞系的方法。例如在整个后续感染循环中在试剂的存在下培养细胞可以增加总体感染性痘病毒的复制和最终产量。所公开的方法因此提供了一种用于在用于病毒GMP制造的转化的人和灵长类动物细胞中增加痘病毒,诸如粘液瘤病毒(MYXV)和牛痘病毒(VACV)的总体产量的巧妙方式。

[0089] 使用核质转运抑制剂增加了痘病毒的复制。在一些实施方案中,与在不存在核质转运抑制剂下的复制速率相比,痘病毒的复制速率快至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。在一些实施方案中,与在不存在核质转运抑制剂下的复制速率相比,痘病毒的复制速率快到至少1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

[0090] 在一些实施方案中,在感染后24小时之后,核质转运抑制剂使痘病毒的复制增加至少30%、50%、70%、90%、2倍、3倍、5倍、7倍、9倍、10倍、12倍或15倍。在一些实施方案中,在感染后24小时之后,核质转运抑制剂使痘病毒的复制增加到不超过5倍、10倍、12倍、15倍、20倍、30倍、50倍、70倍或100倍。

[0091] 本公开内容的方面涉及一种在细胞中以增加的生长速率和/或滴度产生溶瘤病毒诸如痘病毒的方法。在一些实施方案中,该方法包括使宿主细胞与有效量的核质转运抑制剂(其也可以被称为核输出途径抑制剂)接触。可以将抑制剂的浓度选择为低于通常将引起任何细胞毒性或抗病毒作用的浓度,但仍然足以导致感兴趣的痘病毒的产生增加。在一些实施方案中,核质转运抑制剂的有效量在约0.000001 $\mu$ M与约0.1 $\mu$ M之间,诸如约在约0.000001 $\mu$ M、约0.00001 $\mu$ M、约0.0001、约0.0005 $\mu$ M与约0.05 $\mu$ M之间,诸如是约0.0005 $\mu$ M、约0.001 $\mu$ M、约0.0015 $\mu$ M、约0.002 $\mu$ M、约0.0025 $\mu$ M、约0.003 $\mu$ M、约0.0035 $\mu$ M、约0.004 $\mu$ M、约0.0045 $\mu$ M、约0.005 $\mu$ M、约0.01 $\mu$ M、约0.015 $\mu$ M、约0.02 $\mu$ M、约0.025 $\mu$ M、约0.03 $\mu$ M、约0.035 $\mu$ M、约0.04 $\mu$ M、约0.045 $\mu$ M和约0.05 $\mu$ M。

#### 药物组合物

[0092] 在一个方面,本文公开了药物组合物,这些药物组合物包含溶瘤病毒、核质转运抑制剂、药学上可接受的赋形剂或载体或其组合。当作为组合施用时,可以将治疗剂(即,溶瘤病毒和核质转运抑制剂)配制成在相同时间或不同时间给予的单独组合物,或者可以将治疗剂作为单一组合物给予。

[0093] 可以将组合物每日一次、每日两次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每七天一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每两个月一次、每六个月一次或每年一次施用。可以根据单独对象的需要调整给药间隔。在某些实施方案中,将本公开内容的治疗剂施用超过两周、三周、一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个

月、一年、两年、三年、四年或五年、十年或十五年的时间段；或者例如，以数天、数月或数年计的任何时间段范围，其中范围的下端是14天与15年之间的任何时间段且范围的上端在15天与20年之间（例如，4周与15年、6个月与20年）。在一些情况下，在患者的剩余寿命内施用治疗剂可能是有利的。在一些实施方案中，监测患者以检查疾病或病症的进展，并且相应地调整剂量。在一些实施方案中，根据本发明的治疗在至少两周、三周、一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、一年、两年、三年、四年或五年、十年、十五年、二十年内或在对象的剩余寿命内是有效的。

[0094] 为了制备根据本公开内容的药物组合物，可以根据常规药物复合技术将治疗有效量的一种或多种治疗剂与药学上可接受的载体紧密混合以产生剂量。载体可以采取广泛多种形式，这取决于施用（例如，眼部、口服、局部或肠胃外）所需的制剂的形式，在众多其他形式之间包括凝胶、霜剂、膏剂、洗剂和定时释放植入制剂。在某些实施方案中，药学上可接受的载体是水性溶剂，即包含水的溶剂，任选地具有另外的共溶剂。示例性的药学上可接受的载体包括水、水中的缓冲溶液（诸如磷酸盐缓冲盐水（PBS））和糖醇诸如山梨糖醇。可以将适于肠胃外施用的组合物封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。在一些实施方案中，适于肠胃外施用的配制品包括水性和非水性无菌注射溶液，其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配制品与预期接受者的血液等渗的溶质；以及水性和非水性无菌悬浮液，其可以包含悬浮剂和增稠剂。配制品可以呈现在单位剂量或多剂量容器例如密封的安瓿和小瓶中，并且可以储存在冷冻干燥（冻干）的条件下，从而仅需紧临使用前添加无菌液体载体（例如，注射用水）。即时注射溶液及悬浮液可以从先前所述种类的无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备。

[0095] 在一些实施方案中，将核质转运抑制剂作为药学上可接受的盐、复合物或前药施用。药学上可接受的盐或复合物可以是指保留本发明化合物的所需生物活性并且对正常细胞展现出有限的毒理学作用的根据本公开内容的活性化合物的适当的盐或复合物。此类盐的非限制性实例是（a）与无机酸（例如，盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等）形成的酸加成盐，和与有机酸形成的盐，这些有机酸尤其是诸如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、鞣酸、扑酸、海藻酸及聚谷氨酸；（b）与金属阳离子形成的碱加成盐，这些金属阳离子在众多其他阳离子之间是诸如锌、钙、钠、钾等。

[0096] 在一些实施方案中，药物组合物呈单位剂型。在一些实施方案中，单位剂型适于肿瘤内或肠胃外，例如静脉内施用。单位剂量配制品可以是含有施用成分的每日剂量或单位、每日亚剂量、每周剂量或单位或其适当部分的那些。在一些实施方案中，单位剂量包括约0.1mL至约100mL和/或其间的范围的可递送体积。在一些实施方案中，单位剂量包括约0.5mL至约5mL、约0.75mL至约2.5mL、约0.9mL至约1.1mL的可递送体积。在一些实施方案中，单位剂量包括约0.5mL、约1mL、约1.5mL或约2mL的可递送体积。在一些实施方案中，单位剂量包含约 $1 \times 10^3$ 噬斑形成单位（PFU）至约 $1 \times 10^{10}$ PFU和/或其间的范围的溶瘤病毒每mL。在一些实施方案中，单位剂量包含约 $1 \times 10^4$ PFU至约 $1 \times 10^9$ PFU或约 $1 \times 10^6$ PFU至约 $1 \times 10^8$ PFU和/或其间的范围的溶瘤病毒每mL。在一些实施方案中，单位剂量包含约 $1 \times 10^5$ PFU至约 $1 \times 10^{10}$ PFU、约 $1 \times 10^6$ PFU至约 $1 \times 10^{10}$ PFU、约 $1 \times 10^5$ PFU至约 $1 \times 10^{11}$ PFU、约 $1 \times 10^5$ PFU至约 $1 \times 10^9$ PFU、约 $1 \times 10^6$ PFU至约 $1 \times 10^9$ PFU或约 $1 \times 10^7$ PFU至约 $1 \times 10^8$ PFU和/或其间的范围的溶瘤病毒每mL。

[0097] 在一些实施方案中，单位剂量包含约1皮克至约1000微克和/或其间的范围的溶瘤

病毒。在一些实施方案中,单位剂量包含约10皮克至约100微克和/或其间的范围的溶瘤病毒。在一些实施方案中,单位剂量包含约10皮克至约100微克和/或其间的范围的溶瘤病毒。在一些实施方案中,单位剂量包含约10皮克至约10微克、约10皮克至约1微克、约10皮克至约100微克、约100皮克至约100微克、约1000皮克至约100微克、约10000皮克至约100微克、约100皮克至约10微克或约100皮克至约1微克和/或其间的范围的溶瘤病毒。在一些实施方案中,单位剂量包含约1皮克、约10皮克、约100皮克、约1纳克、约10纳克、约100纳克、约1微克、约10微克、约100微克或约1000微克的溶瘤病毒。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.01皮克至约500微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.05皮克至约50微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含在约0.1皮克、约1皮克、约10皮克、约100皮克或约1纳克至约0.1微克、约1微克、约10微克或约50微克的范围内和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约10皮克至约10微克、约10皮克至约1微克、约100皮克至约50微克、约1000皮克至约50微克、约10000皮克至约50微克、约100皮克至约5微克或约100皮克至约1微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.05皮克、约0.5皮克、约5皮克、约50皮克、约500皮克、约5纳克、约50纳克、约500纳克、约5微克、约50微克或约500微克的溶瘤病毒。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.05皮克至约50微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.01皮克至约100微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.05皮克至约100微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.01皮克至约90微克、约0.01皮克至约80微克、约0.01皮克至约60微克、约0.01皮克至约50微克、约0.05皮克至约80微克、约0.05皮克至约40微克、约0.1皮克至约50微克或约0.1皮克至约30微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.01皮克、约0.05皮克、约0.075皮克、约0.1皮克、约0.5皮克、约1皮克、约5皮克、约10皮克、约100皮克、约500皮克、约1纳克、约10纳克、约100纳克、约1微克、约10微克或约100微克的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.01皮克至约500微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.05皮克至约50微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含在约0.1皮克、约1皮克、约10皮克、约100皮克或约1纳克至约0.1微克、约1微克、约10微克或约50微克的范围内和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约10皮克至约10微克、约10皮克至约1微克、约100皮克至约50微克、约1000皮克至约50微克、约10000皮克至约50微克、约100皮克至约5微克或约100皮克至约1微克和/或其间的范围的核质转运抑制剂。在一些实施方案中,单位剂量包含约0.05皮克、约0.5皮克、约5皮克、约50皮克、约500皮克、约5纳克、约50纳克、约500纳克、约5微克、约50微克或约500微克的核质转运抑制剂。

[0098] 在一些实施方案中,溶瘤病毒与核质转运抑制剂的重量比是约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{-9}$ 和/或其间的范围。在一些实施方案中,溶瘤病毒与核质转运抑制剂的重量比是约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{-8}$ 、约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{-7}$ 、约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{-6}$ 、约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{-5}$ 、约 $1 \times 10^4$ 至约 $1 \times 10^{-3}$ 、约 $1 \times 10^2$ 至约 $1 \times 10^{-2}$ 或约10至约0.1。在一些实施方案中,溶瘤病毒与核质转运抑制剂的重量比是约1至约 $1 \times 10^{-9}$ 、约1至约 $1 \times 10^{-8}$ 、约1至约 $1 \times 10^{-7}$ 、约1至约 $1 \times 10^{-6}$ 、约1至约 $1 \times 10^{-5}$ 、约1至约 $1 \times 10^{-4}$ 、约1至约 $1 \times 10^{-3}$ 、约1至约 $1 \times 10^{-2}$ 或约1至约0.1。在一些实施方案中,溶瘤病毒与核

质转运抑制剂的重量比是约 $1 \times 10^{-9}$ 至约1、约 $1 \times 10^{-8}$ 至约1、约 $1 \times 10^{-7}$ 至约1、约 $1 \times 10^{-6}$ 至约1、约 $1 \times 10^{-5}$ 至约1、约 $1 \times 10^{-4}$ 至约1、约 $1 \times 10^{-3}$ 至约1、约 $1 \times 10^{-2}$ 至约1或约0.1至约1。

#### 实施例

##### 实施例1:核质转运抑制剂药物增强非允许性人癌细胞系中的MYXV基因表达

[0099] 在某些人类癌细胞系中,MYXV基因表达、特别是晚期基因表达受到限制。抑制MYXV基因表达可以帮助限制病毒复制。然而,没有明确记录哪种途径和细胞蛋白质限制这些非允许性人癌细胞系中的MYXV复制。将核质转运抑制剂在通常限制MYXV基因表达和复制的人癌细胞系,例如结肠直肠癌癌细胞系HT29、胰腺癌细胞系PANC-1和黑素瘤细胞系MDA-MB-435中进行测试。

[0100] 将来普霉素B作为代表性核质转运抑制剂进行测试。将人HT29 (图1A和图1B)、PANC-1 (图3A) 和MDA-MB-435 (图4A) 细胞模拟处理或用不同浓度的来普霉素B预处理1小时。然后将细胞以5.0或0.5的感染复数(MOI)用vMyx-GFP-TdTomato (表达在痘病毒合成早期/晚期启动子下的GFP和在痘病毒p11晚期启动子下的TdTomato的野生型MYXV) 感染。

[0101] 将HT29细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时并且在抑制剂的存在下以0.5或5.0的MOI用vMyx-GFP-Tdtomato感染,并且在感染后24小时(图1A)或48小时(图1B)使用荧光显微镜拍摄荧光图像。

[0102] 将PANC-1细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时并且在抑制剂的存在下以5.0的MOI用vMyx-GFP-Tdtomato感染,并且在感染后48小时使用荧光显微镜拍摄荧光图像(图3A)。

[0103] 将MDA-MB-435细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时并且在抑制剂的存在下以5.0的MOI用vMyx-GFP-Tdtomato感染,并且在感染后48小时使用荧光显微镜拍摄荧光图像(图4A)。

[0104] 在荧光显微镜下观察细胞以监测GFP和TdTomato的表达,TdTomato的表达指示病毒感染的进展。在来普霉素B(例如,1 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M和0.01 $\mu$ M)的存在下,在所有测试的人癌细胞系中观察到增强的GFP(早期/晚期)和TdTomato(晚期)表达(图1A、图1B、图3A、图4A)。用核质转运抑制剂的处理也允许在这些限制性人癌细胞系中形成小焦点。

[0105] 这些结果显示用核质转运抑制剂的处理增强感染细胞中的粘液瘤病毒基因表达。这些结果也表明,某些核蛋白直接或间接限制这些人癌细胞系中的MYXV复制。

##### 实施例2:核质转运抑制剂药物处理增强非允许性人癌细胞系中的MYXV子代病毒产生

[0106] 为了定量评估所观察到的核质转运抑制剂来普霉素B对病毒基因表达的影响是否可以反映在子代病毒形成方面,进行定量病毒滴定测定。将HT29(图2)、PANC-1(图3B)和MDA-MB-435(图4B)人癌细胞系模拟处理或用不同浓度的来普霉素B预处理。

[0107] 将HT29细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时。然后将细胞以0.05或0.5的MOI用vMyx-GFP-TdTomato感染1小时。在1小时之后去除未吸附的病毒,并且然后将细胞洗涤并且在抑制剂的存在与培养基一起孵育。在感染后72小时收获感染细胞,并且在系列稀释至RK13细胞上后确定病毒滴度。来普霉素B处理增强病毒复制(图2)。

[0108] 将PANC-1细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时。然后将细胞以5.0或0.5的MOI用vMyx-GFP-TdTomato感染1小时。在1小时之后去除未吸附的病毒,并且然后将细胞洗

涤并且在抑制剂的存在下与培养基一起孵育。在感染后48小时和72小时收获感染细胞,并且在系列稀释至RK13细胞上后确定病毒滴度。在所有条件下,来普霉素B处理将病毒复制增强到至少10倍(图3B)。

[0109] 将MDA-MB-435细胞用不同浓度的来普霉素B预处理1小时,并且然后将细胞以5.0或0.5的MOI用vMyx-GFP-TdTomato感染1小时。在1小时之后去除未吸附的病毒,并且然后将细胞洗涤并且在抑制剂的存在下与培养基一起孵育。在感染后48小时和72小时收获感染细胞,并且在系列稀释至RK13细胞上后确定病毒滴度。在所有条件下,来普霉素B处理将病毒复制增强到至少10倍(图4B)。

[0110] 在所有测试的细胞系中,当以MOI 5.0或0.5感染时,来普霉素B处理将子代MYXV形成显著增强到至少10至20倍(图2、图3B、图4B)。相比之下,在允许性A549细胞系中,来普霉素B仅在0.1或更低的MOI下增加病毒复制。

[0111] 这些结果表明,使用核质转运抑制剂阻断核输出途径可以显著增强非允许性人癌细胞系中的MYXV复制。

实施例3:用核质转运抑制剂预处理人癌细胞系增强MYXV介导的癌细胞杀伤

[0112] 为了测试核质转运抑制剂增强的MYXV复制是否也增强癌细胞杀伤,通过测量ATP测试感染细胞的活力。在这种情况下,测试HT29和PANC-1细胞。

[0113] 将HT29和PANC-1细胞以100u1培养基中20,000个细胞/孔接种在有透明壁的96孔板中,并且过夜培养。然后将细胞与不同浓度的来普霉素B处理1小时并且在抑制剂的存在下以5.0的MOI用vMyx-GFP感染。然后基于ATP含量测量细胞活力。通过以下方式在感染后64小时(HT-29细胞,图5A)或40小时(PANC-1细胞,图5B)测量ATP含量:添加100 ulCellTiter-Glo®试剂(Promega)并且使用读板仪记录发光。所示出的数据表示平均值 $\pm$ SD(n=3或4)。

[0114] 这些结果显示,在所指示的时间点处,HT29和PANC-1细胞两者均对单独的来普霉素B处理敏感。随着来普霉素B的浓度增加,细胞活力降低。在这些时间点(对于HT29的64hpi和对于PANC-1的40hpi)处,单独的MYXV也将细胞活力降低至40%-50%。然而,用来普霉素B预处理HT29和PANC-1细胞两者进一步降低了这些人癌细胞系的活力。有趣的是,在HT29细胞系中,实现最小细胞活力的来普霉素B的最低浓度在与MYXV组合之后进一步增强MYXV的细胞杀伤能力。一并考虑,这些结果显示,核质转运抑制剂不仅可以增强非允许性人癌细胞系中的MYXV复制,还协同地增强MYXV的细胞杀伤能力。

实施例4:用粘液瘤病毒(MYXV)和核质转运抑制剂的溶瘤病毒疗法

[0115] 将对象鉴定为患有癌症(例如,非允许性血液学癌症或实体瘤)。

[0116] 将MYXV与塞利尼索(一种批准用于在人癌症患者体内使用的核质转运抑制剂)组合如本文所公开那样施用(例如,经由注射或输注施用)至对象。MYXV感染对象中的癌细胞,从而导致癌细胞死亡和增加的抗肿瘤免疫应答。施用核质转运抑制剂增强了粘液瘤病毒的抗癌活性,从而导致肿瘤负荷的降低和更长的存活期。

[0117] 虽然本公开内容已经在着重于特定实施方案的情况下得以描述,但是对于本领域普通技术人员而言将显而易见的是,可以使用特定实施方案的变型,并且本公开内容旨在可以以与本文具体描述的方式不同的方式来实现。与本发明的特定方面、实施方案或实施例结合描述的特征、特性、化合物或实例应被理解为适用于本发明的任何其他方面、实施方

案或实施例。因此,本公开内容包括如由以下权利要求限定的本公开内容的精神和范围内所涵盖的所有修改。我们因此主张在这些权利要求的范围和精神内的全部作为我们的发明。

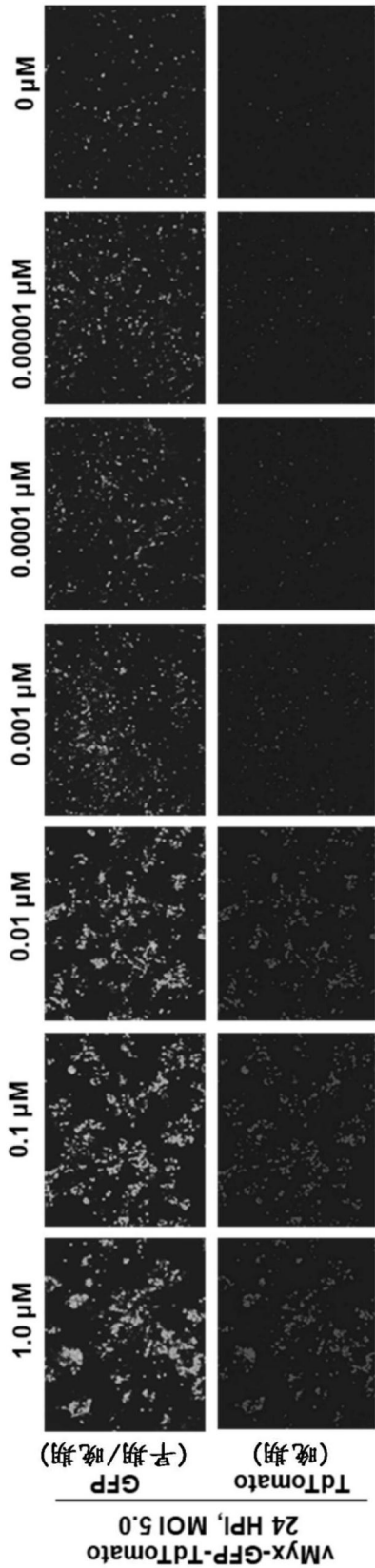


图1A

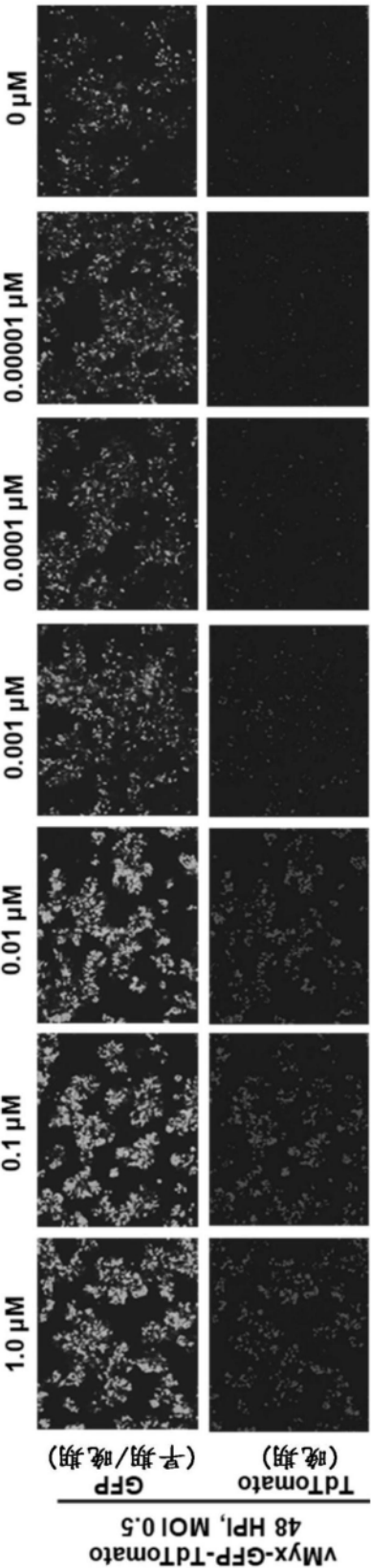


图1B

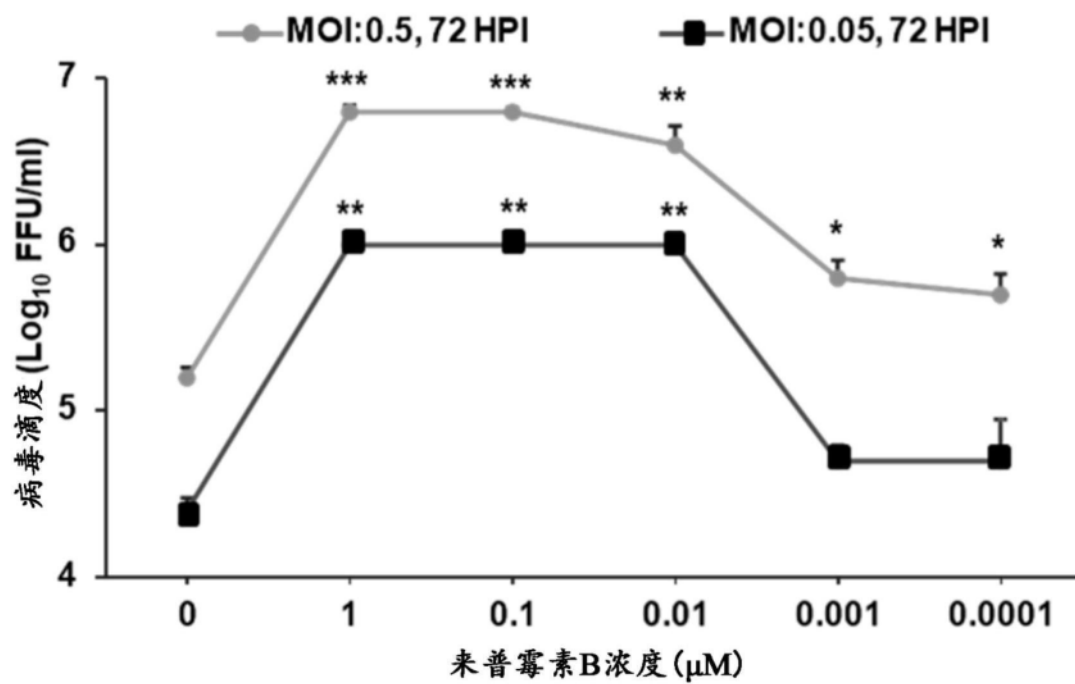


图2

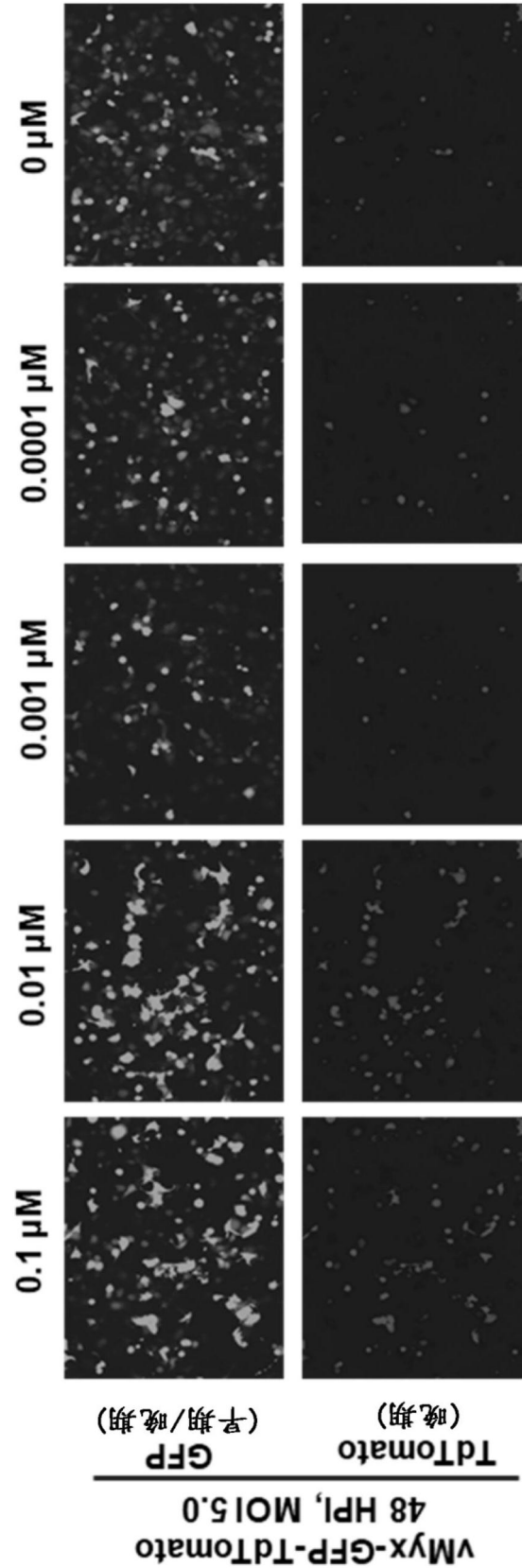


图3A

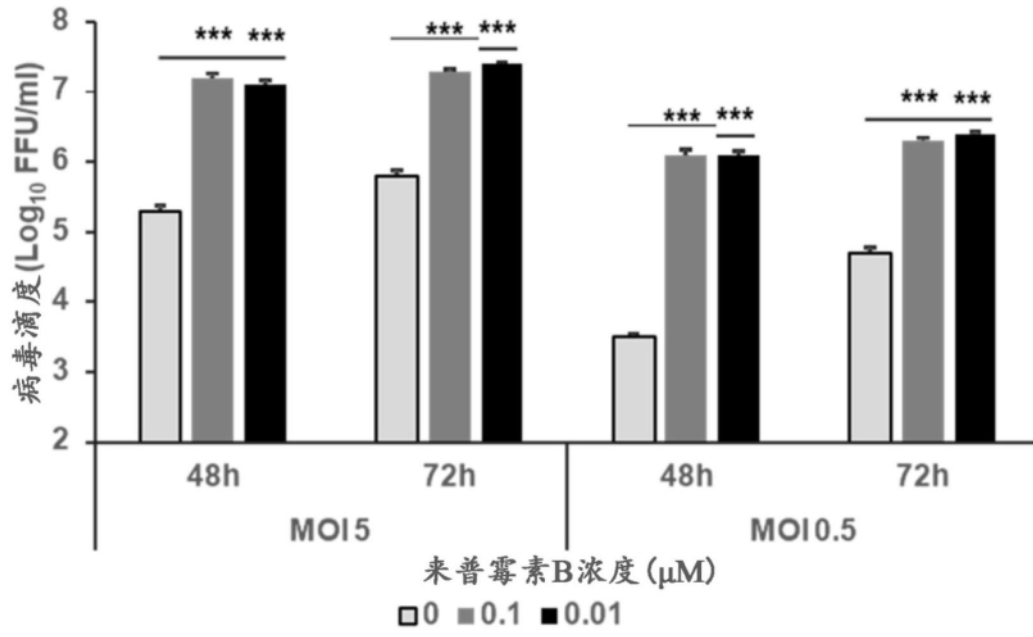


图3B

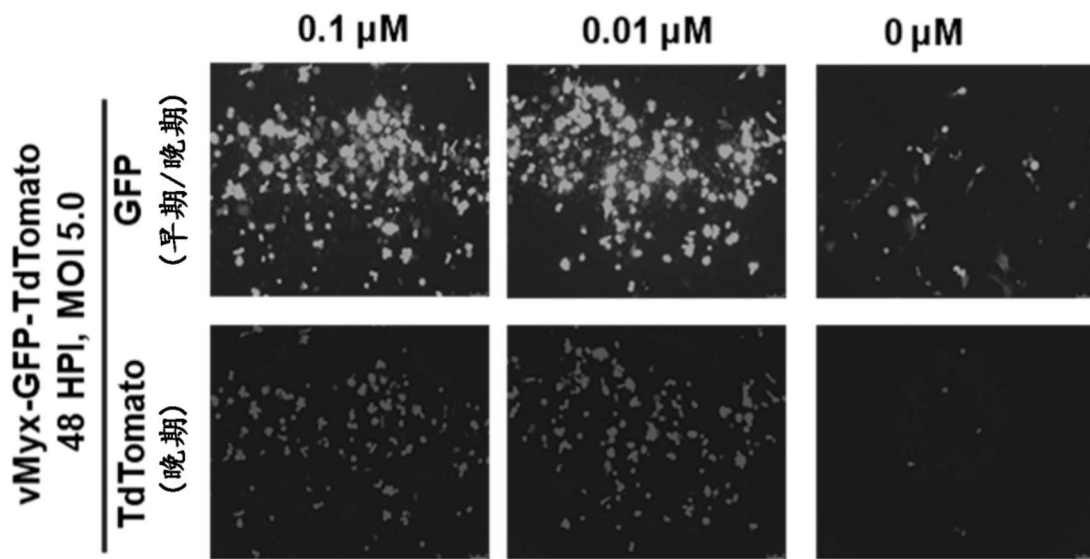


图4A

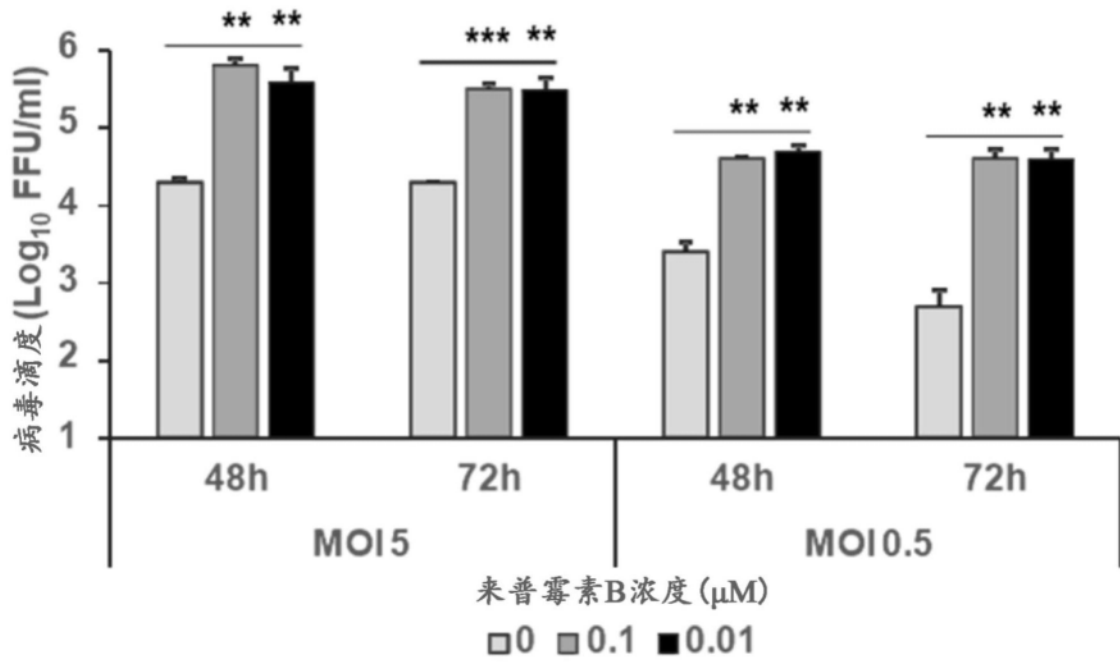


图4B

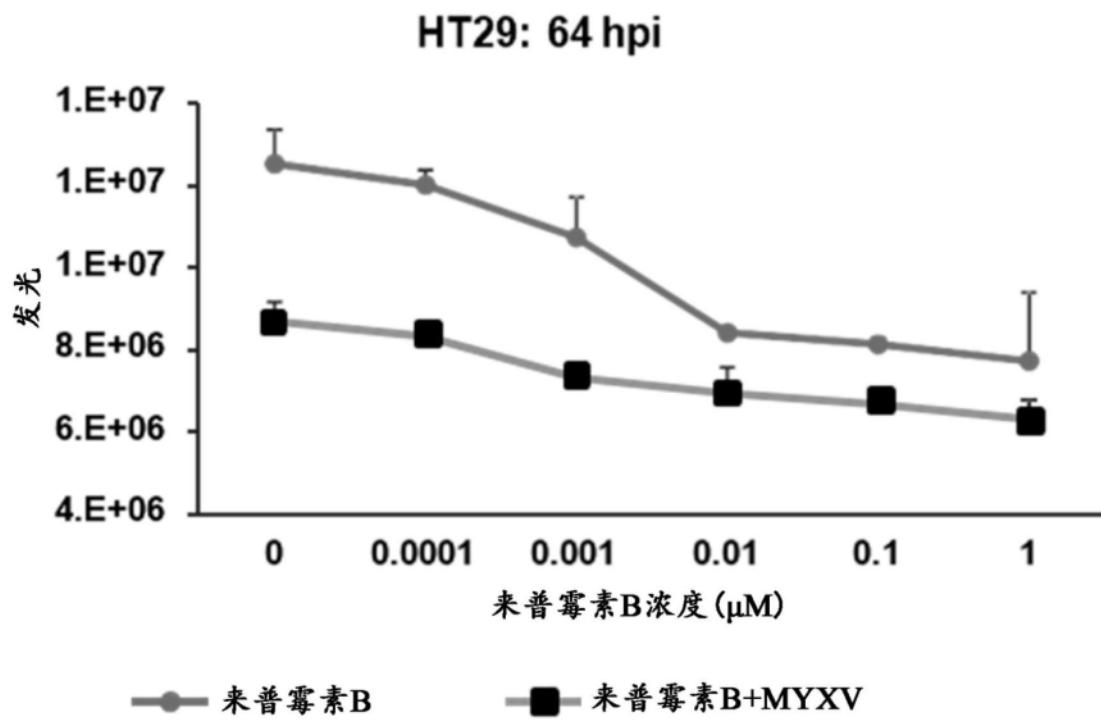


图5A

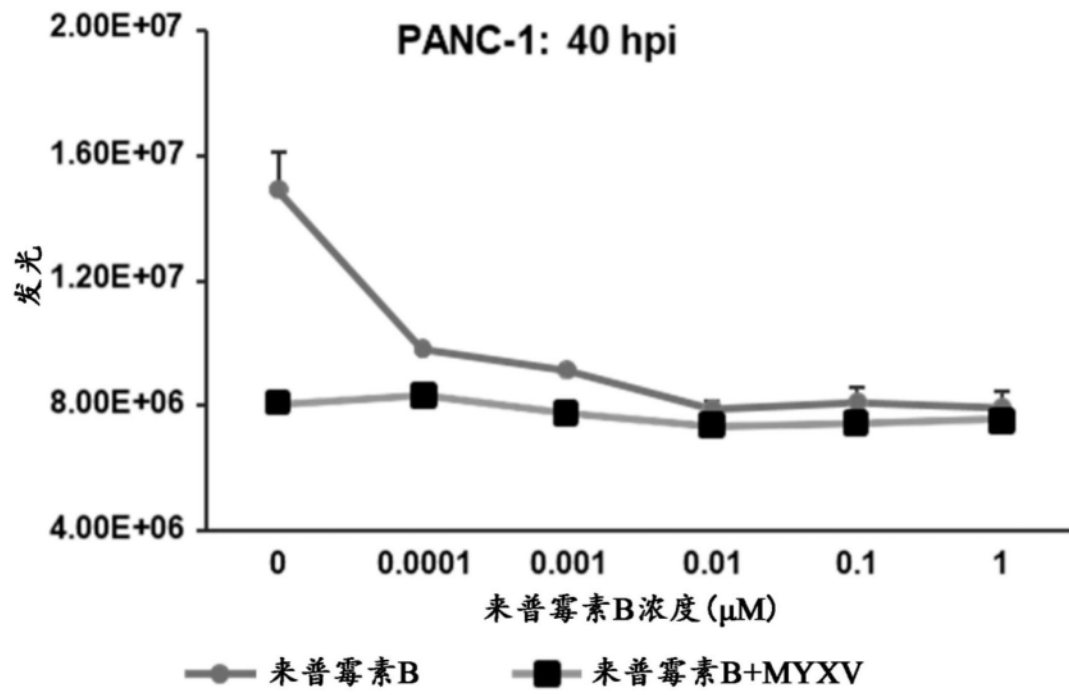


图5B