(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111655845 A
(43)申请公布日 2020.09.11

(21)申请号 201980010099.4

(22)申请日 2019.01.28

(30)优先权数据
62/622,547 2018.01.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/015434 2019.01.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/148109 EN 2019.08.01

(71)申请人 联邦高等教育系统匹兹堡大学
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 G·M·德尔戈夫 D·里瓦德内拉 P·萨姆帕思 S·H·索恩

(74)专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理事务所(普通合伙) 11436
代理人 程淼

(51)Int.Cl.
C12N 7/01(2006.01)
A61K 31/7032(2006.01)
A61K 35/763(2015.01)
A61K 35/765(2015.01)
A61K 35/761(2015.01)
A61K 35/768(2015.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 38/22(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书34页
序列表11页 附图40页

(54)发明名称

代谢调节剂在肿瘤微环境中的表达以改善肿瘤的治疗

(57)摘要

表达一种或多种代谢调节蛋白诸如脂肪因子(例如瘦素或趋化素)、胰岛素和/或IGF-1的重组溶瘤病毒(OV),及其用于治疗癌症的方法,例如在免疫疗法抗癌治疗中。在一些示例中,此类重组OV和方法增加了T细胞向肿瘤或肿瘤微环境中的浸润。

CN 111655845 A

1.重组溶瘤病毒,包括:

编码一种或多种代谢调节蛋白的核酸分子。

2.根据权利要求1所述的重组溶瘤病毒,其中所述核酸可操作地连接至启动子。

3.根据权利要求1或2所述的重组溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒是单纯疱疹病毒(HSV)、痘苗病毒、腺病毒、痘病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、塞内卡山谷病毒、ECHO病毒、新城疫病毒、鸡贫血病毒或细小病毒。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的重组溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒是单纯疱疹病毒(HSV)、痘病毒或痘苗病毒。

5.根据权利要求4所述的重组溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒是HSV。

6.根据权利要求5所述的重组溶瘤病毒,其中所述HSV是talimogene laherparepvec(T-VEC)。

7.根据权利要求4所述的重组溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒是痘病毒。

8.根据权利要求7所述的重组溶瘤病毒,其中所述痘病毒是痘苗病毒。

9.根据权利要求8所述的重组溶瘤病毒,其中所述痘苗病毒是西部保留地株痘苗病毒。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的重组溶瘤病毒,其中所述一种或多种代谢调节蛋白包括脂肪因子、胰岛素、胰岛素样生长因子1或其任意组合。

11.根据权利要求10所述的重组溶瘤病毒,其中所述脂肪因子是瘦素、脂联素、阿珀林、趋化素、白介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)、视黄醇结合蛋白4(RBP4)、肿瘤坏死因子-α(TNFα)、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体或CTRP-4。

12.根据权利要求11所述的重组溶瘤病毒,其中所述脂肪因子是瘦素。

13.根据权利要求8至12中任一项所述的重组溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒是痘苗病毒,并且所述一种或多种代谢调节蛋白包括瘦素。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的重组溶瘤病毒,其中所述一种或多种代谢调节蛋白包括融合蛋白,其中所述融合蛋白包括第一蛋白和第二蛋白,其中所述第一蛋白包括一种或多种代谢调节蛋白中的一种。

15.根据权利要求14所述的重组溶瘤病毒,其中所述第二蛋白是细胞因子、趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和/或肿瘤坏死因子。

16.根据权利要求14或15所述的重组溶瘤病毒,其中所述第二蛋白是细胞因子。

17.根据权利要求15或16所述的重组溶瘤病毒,其中所述细胞因子是IL-1、IL-2、IL-17、IL-18、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、IL-4、IL-10、IL-13、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21、TNFα、IFN-γ或其任意组合。

18.根据权利要求14至17中任一项所述的重组溶瘤病毒,其中所述第一蛋白是瘦素、胰岛素、趋化素或胰岛素样生长因子1,并且所述第二蛋白是白介素(IL)-2或IL-15。

19.根据权利要求14至18中任一项所述的重组溶瘤病毒,其中所述融合蛋白包括所述第一蛋白与所述第二蛋白之间的接头。

20.根据权利要求19所述的重组溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒是痘苗病毒,所述第一蛋白是N端瘦素,所述第二蛋白是C端IL-2或IL-15,并且其中所述第一蛋白和所述第二蛋白通过所述接头连接。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的重组溶瘤病毒，其中所述一种或多种代谢调节蛋白与SEQ ID NO:2、4、6或8具有至少约80％、至少约90％或至少约95％的序列同一性。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的重组溶瘤病毒，其中编码所述一种或多种代谢调节蛋白的核酸分子与SEQ ID NO:1、3、5或7具有至少约80％、至少约90％或至少约95％的序列同一性。

23.根据权利要求2至22中任一项所述的重组溶瘤病毒，其中所述启动子对于所述一种或多种代谢调节蛋白不是天然的。

24.根据权利要求2至23中任一项所述的重组溶瘤病毒，其中所述启动子是组成型启动子。

25.治疗受试者的肿瘤的方法，其包括

向受试者施用治疗有效量的权利要求1至24中任一项所述的重组溶瘤病毒，从而治疗所述肿瘤；或者

向受试者施用治疗有效量的一种或多种代谢调节蛋白或编码该蛋白的核酸分子，从而治疗所述肿瘤。

26.增加T细胞向肿瘤中浸润的方法，其包括

向患有肿瘤的受试者施用治疗有效量的权利要求1至24中任一项所述的重组溶瘤病毒，从而增加T细胞向肿瘤的浸润；或者

向患有肿瘤的受试者施用治疗有效量的一种或多种代谢调节蛋白或编码该蛋白的核酸分子，从而增加T细胞向肿瘤的浸润。

27.根据权利要求25或26所述的方法，其中所述肿瘤是癌症。

28.根据权利要求27所述的方法，其中所述癌症是肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、子宫颈癌或卵巢癌。

29.根据权利要求28所述的方法，其中所述癌症是黑色素瘤。

30.根据权利要求25至29中任一项所述的方法，其中所述施用包括全身施用。

31.根据权利要求25至29中任一项所述的方法，其中所述施用包括肿瘤内施用。

32.根据权利要求22至31中任一项所述的方法，其中所述受试者是哺乳动物受试者。

33.根据权利要求32所述的方法，其中所述哺乳动物受试者是人。

34.根据权利要求25至33中任一项所述的方法，其进一步包括施用治疗有效量的一种或多种其他治疗剂。

35.根据权利要求34所述的方法，其中所述一种或多种其他治疗剂包括施用一种或多种其他抗癌剂。

36.根据权利要求35所述的方法，其中所述一种或多种其他抗癌剂包括化学疗法、放射疗法、生物剂、手术或其组合。

37.根据权利要求36所述的方法，其中所述化学疗法包含烷化剂、抗代谢物、激素或激素拮抗剂中的一种或多种。

38.根据权利要求36或37所述的方法，其中所述生物剂包括：

PD-1拮抗剂；

PD-L1拮抗剂；

CTLA4拮抗剂；

T细胞激动剂;或

其组合。

39.组合物或试剂盒,其包括:

(a)权利要求1至24中任一项所述的重组溶瘤病毒;和

(b)PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、CTLA4拮抗剂、T细胞激动剂;或其组合。

40.根据权利要求38所述的方法或根据权利要求39所述的组合物或试剂盒,其中所述T细胞激动剂是4-1BB的激动剂、OX40的激动剂、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子(TNF)受体(GITR)的激动剂,或其组合。

41.根据权利要求40所述的方法或组合物或试剂盒,其中所述T细胞激动剂是单克隆抗体、适体或配体。

代谢调节剂在肿瘤微环境中的表达以改善肿瘤的治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年1月26日提交的美国临时申请第62/622,547号的优先权,其全部内容通过引用并入此文。

技术领域

[0003] 本公开提供了表达一种或多种代谢调节蛋白例如瘦素的重组溶瘤病毒(OV),包括该重组溶瘤病毒的试剂盒,及其用于治疗癌症的方法。

背景技术

[0004] 免疫疗法作为一种癌症治疗方法的成功已导致了癌症研究和临床实践的重大转变,主要集中于理解和调节肿瘤部位的免疫活性。但是,单试剂免疫疗法的现实是大多数患者将不会经历长期的持久获益。这种抗药性可能由于多种原因而发生,但一个原因是未能将T细胞募集到肿瘤以及其他更主要的免疫抑制机制,其限制了肿瘤微环境中的T细胞功能(Sharma等,Cell 2017;168(4):707-23)。因此,需要可以克服这些耐药机制的新的治疗方式。

[0005] 瘦素是一种典型的脂肪因子(adipokine),具有强大的代谢重编程功能,例如促进葡萄糖和脂肪氧化以及线粒体的生物发生。然而,迄今为止,瘦素在免疫方面的研究尚未在治疗中得以确认,更不用说在癌症治疗的背景下。

发明内容

[0006] 本文提供了由溶瘤痘苗病毒诱导的侵袭性黑素瘤的浸润。显示溶瘤病毒促进强大的肿瘤浸润物的浸润,但部分由于代谢不足,最终无法有效促进完全应答。在本公开的一些实施方案中,证明了瘦素作为通过促进肿瘤浸润T细胞的代谢重编程来克服观察到的代谢不足的工具的实用性。使用其中瘦素在肿瘤微环境中局部升高的新型黑素瘤模型,观察到与代谢重编程有关的有效的T细胞活化和肿瘤控制。此外,所使用的痘苗病毒被工程化以遗传表达瘦素并将其递送至肿瘤微环境。与野生型病毒相比,该疗法产生完全的治疗应答。表达瘦素的痘苗病毒同时裂解肿瘤细胞,从而刺激新的T细胞浸润,同时还通过瘦素的局部分泌在代谢上支持了该浸润的活性。

[0007] 在一些实施方案中,本文提供了重组溶瘤病毒(oncolytic virus,OV),其可以包括可编码一种或多种蛋白的核酸分子,该蛋白能够诱导T细胞代谢重编程,例如导致肿瘤中T细胞的浸润增强,或者能够在肿瘤微环境中调节抗肿瘤免疫应答。例如,在一些情况下,OV可以包含一种或多种核酸分子,其可以编码一种或多种代谢调节蛋白(例如,激素诸如脂肪因子(例如瘦素、脂联素、阿珀林(apelin)、趋化素(chemerin)、白介素6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)、视黄醇结合蛋白4(RBP4)、肿瘤坏死因子-α(TNFα)、内脂素(visfatin)、网膜素(omentin)、vaspin、颗粒蛋白前体(progranulin)或CTRP-4),胰岛素和/或胰岛素样生长因子1(IGF-1))。在一些示例中,核酸可以可操作地

连接至启动子。OV的例子包括单纯疱疹病毒(HSV)(例如T-VEC)、痘苗病毒(例如西部保留地株(West Reserve strain))、腺病毒、痘病毒、呼肠孤病毒(reovirus)、脊髓灰质炎病毒(poliovirus)、柯萨奇病毒、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus,VSV)、塞内卡山谷病毒(Seneca valley virus)、ECHO病毒、新城疫病毒、鸡贫血病毒或细小病毒(parovirus)。在一些示例中,重组OV表达与SEQ ID NO:2、4、6或8具有至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的重组蛋白。在一些示例中,重组OV包括编码与SEQ ID NO:1、3、5或7具有至少80%、至少90%或至少95%的序列同一性的代谢调节蛋白的核酸分子。在一些示例中,由重组OV表达的一种或多种代谢调节蛋白是融合蛋白的部分,例如包括两个部分的融合蛋白,(1)代谢调节蛋白和(2)第二蛋白(例如细胞因子)(例如IL-2或IL-15)、趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和/或肿瘤坏死因子)。在一个示例中,融合蛋白在其N端具有代谢调节蛋白,并且在其C端具有细胞因子。在一些示例中,融合蛋白的两个部分通过接头(例如GSG肽)连接。在一个具体的示例中,重组OV表达融合蛋白,其包括瘦素-接头-IL-2、瘦素-IL-2、瘦素-接头-IL-15或瘦素-IL-15。

[0008] 还提供了治疗受试者的肿瘤,增加T细胞向肿瘤或肿瘤微环境或两者的浸润的方法。在一些示例中,此类方法包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种本文公开的重组OV,从而治疗肿瘤。在一些示例中,这样的方法包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种代谢调节蛋白(例如瘦素、胰岛素、趋化素和/或胰岛素样生长因子1)或编码该蛋白的核酸分子,从而治疗肿瘤。在一些示例中,肿瘤是癌症,例如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、子宫颈癌或卵巢癌。在具体的示例中,癌症是黑色素瘤。在具体的示例中,癌症是乳腺癌。这样的方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或多种其他治疗,例如其他抗癌剂,例如化学疗法、放射疗法、生物剂、手术或其组合。在一个示例中,抗癌剂包括一种或多种免疫调节剂,例如PD-1的拮抗剂、PD-L1的拮抗剂、CTLA4拮抗剂和T细胞激动剂(例如4-1BB的激动剂、OX40的激动剂、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子(TNF)受体(GITR)的激动剂),或其组合。在一个示例中,抗癌剂包括T细胞激动剂,例如4-1BB的激动剂、OX40的激动剂或GITR的激动剂(例如对免疫检查点蛋白具有特异性的单克隆抗体(mAb),例如上面所列蛋白之一,这些蛋白之一的配体或这些蛋白之一的适体)。

[0009] 还提供了试剂盒和组合物,其可以包括(1)本文提供的一种或多种重组OV,和(2)一种或多种免疫调节剂(例如免疫检查点抑制剂),例如PD-1的拮抗剂、PD-L1拮抗剂、CTLA4拮抗剂和T细胞激动剂(例如4-1BB激动剂、OX40激动剂或GITR激动剂)。试剂盒的组分可以放在单独的容器中。在一些示例中,试剂盒包括(1)本文提供的一种或多种重组OV,和(2)T细胞激动剂(例如4-1BB的激动剂、OX40的激动剂、GITR的激动剂或其组合)。在一些示例中,所述组合物包含(1)本文提供的一种或多种重组OV,和(2)一种或多种T细胞激动剂(例如4-1BB的激动剂、OX40的激动剂或GITR的激动剂)。这样的组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。在一些示例中,例如将组合物冻干。在一些示例中,例如组合物存在于诸如玻璃或塑料容器的容器中。

[0010] 根据下面的详细描述,本公开的前述和其他目的和特征将变得更加显而易见,下面的详细描述参照附图进行。

附图说明

[0011] 图1A-1C.从Ptenf/fBrafLSL-V600ETyrCre.ERT2小鼠产生克隆24,以及从带有CL24^{lep}或CL24^{潮霉素}的小鼠中耗尽CD8^{+}T细胞。(A)C57BL/6J小鼠来自注射CL24的小鼠。来自LN和TIL的CD8^{+}T细胞的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据。(B)C57BL/6J小鼠来自注射CL24的小鼠。然后每隔一天用抗PD1治疗肿瘤并监测肿瘤生长。LN和TIL中CD8和CD4染色的代表性流式细胞图。(C)每隔一天用抗CD8(200μg)处理C57BL/6J小鼠。在第6天,给小鼠注射CL24^{潮霉素}或CL24^{瘦素}。

[0012] 图2A-2C.溶瘤痘苗病毒具有强大的免疫刺激活性,可以通过改造的瘦素表达来增强这种活性。(A)C57BL/6J小鼠皮下注射CL24细胞。注射肿瘤细胞后5-7天,用PBS、2.5×10^{6}PFU的对照痘苗病毒(VV^{对照})瘤内治疗肿瘤并监测肿瘤生长。每行代表单只小鼠。(B)按(A)处理的4000个CD45+分选细胞的单细胞RNA-seq数据。在第7天提取细胞。通过Seurat程序通过无监督聚类产生数据。(C)PBS和VV^{对照}处理的小鼠的t-SNE分析。数据代表每个条件n=2。

[0013] 图3A-3C.溶瘤痘苗病毒处理的TIL的单细胞RNA测序分析。(A,B)定义不同淋巴细胞群体的基因的特征图。紫色强度指示基因表达的标准化水平。(C)使用Seurat聚类(SLM聚类)的PBS、VV^{对照}或VV^{瘦素}处理后CD45+TIL的转录组(每个条件n=2)。每列代表在每个簇之间给定基因表达差异最大的细胞。

[0014] 图4A-4D.瘦素受体在肿瘤浸润性T细胞中被上调,并且瘦素能够代谢重编程皮下注射CL24细胞的C57BL/6J小鼠。肿瘤细胞注射后5-7天,用PBS、对照痘苗病毒(VV^{对照1})瘤内治疗肿瘤。(A)按(A)处理的小鼠的LN和TIL的CD8和CD4表达分析。LN和TIL中CD8和CD4染色的代表性流式细胞图以及列表流式细胞术数据。(B)按照(A)处理的小鼠中抑制性分子PD1和TIM3的表达。LN和TIL中PD1和Tim3染色的代表性流式细胞图以及列表流式细胞术数据。(C)CD8^{+}T细胞上的代表性直方图PD1表达和列表数据。(D)按照(A)处理的小鼠的CD8^{+}T细胞中,通过线粒体示踪剂染色分析线粒体含量。针对LN和TIL中2NBDG染色的线粒体示踪剂的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据。数据代表至少3个独立实验,通过配对t检验,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。误差棒表示s.e.m.。

[0015] 图5A-5E.瘦素受体在肿瘤浸润性T细胞中上调,并且瘦素能够进行代谢重编程。(A)在抗CD28(2μg/mL)存在下以3μg/mL固定化的抗CD3活化24小时的CD8^{+}T细胞的代表性OCR曲线和列表显示的OCR和备用呼吸能力(SRC)。用0.0、0.1和1.0nM小鼠重组瘦素处理细胞24小时。(B)按照(A)处理的细胞的代表性ECAR曲线。(C)来自按照(A)处理的CD8^{+}T细胞中通过线粒体示踪剂染色分析线粒体含量,并通过2NBDG染色法分析葡萄糖摄取。针对LN和TIL中2NBDG染色的线粒体示踪剂的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据。(D)小鼠淋巴结(LN)的CD8^{+}T细胞和荷瘤小鼠的肿瘤浸润性CD8^{+}T细胞(TIL)的瘦素受体染色。(E)LN和TIL的CD8^{+}T细胞中PD1和Tim3的瘦素受体表达染色。数据代表至少3个独立实验,通过未配对t检验,*p<0.05。误差棒表示s.e.m.数据代表至少3个独立实验,通过配对t检验,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。误差棒表示s.e.m.。

[0016] 图6A-6F.在肿瘤细胞中瘦素过表达的表征及其在肿瘤微环境中的作用。(A)用对照质粒(CL24^{潮霉素})和小鼠瘦素基因质粒(CL24^{瘦素})稳定转导的CL24细胞系的小鼠瘦素蛋白表达的免疫印迹分析。(B)对照质粒和瘦素基因转导的细胞培养基中瘦素的ELISA分析。(C)

CL24^{潮霉素}和CL24^{瘦素}细胞系之间的体外生长分析。(H)分别来自注射CL24^{潮霉素}和CL24^{瘦素}的小鼠的LN和TIL上的自然杀伤细胞和B细胞的NK1.1和B220分析。(D)每隔一天用抗CD8(200μg)处理C57BL/6J小鼠。在第6天,给小鼠注射CL24^{潮霉素}或CL24^{瘦素},并监测肿瘤的生长。淋巴结(LN)中的CD8和CD4表达分析。(E)LN和TIL中NK1.1和B220染色的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据。(F)来自经CL24^{潮霉素}和CL24^{瘦素}注射的小鼠LN和TIL的CD8+T细胞的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据分析pSTAT3、pAKT和pp38MAPK表达。数据代表至少3个独立实验,通过双向ANOVA,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。误差棒表示s.e.m.。

[0017] 图7A-7G.瘦素在癌细胞中的表达导致免疫介导的肿瘤控制,并在代谢上改善了肿瘤浸润淋巴细胞的功能。(A)将CL24^{潮霉素}和CL24^{瘦素}皮下注射到C57BL/6J小鼠上,并监测肿瘤的生长。每行代表一只鼠标。(B)按照(A)处理的小鼠的存活图。(C)每隔一天用抗CD8(200μg)处理C57BL/6J小鼠。在第6天,给小鼠注射CL24^{潮霉素}或CL24^{瘦素},并监测肿瘤的生长。(D)对来自注射了CL24^{潮霉素}和CL24^{瘦素}的小鼠的LN和TIL进行CD8和CD4表达分析。LN和TIL中CD8和CD4染色的代表性流式细胞图以及列表流式细胞术数据。(E)来自注射了CL24^{潮霉素}和CL24^{瘦素}的小鼠的LN和TIL的代表性流式细胞图,细胞用PMA和离子霉素刺激过夜,以通过对CD8^{+}T细胞的IFNγ和TNFα染色进行细胞因子产生分析。显示了列表流式细胞仪数据。(F)来自注射了CL24^{潮霉素}和CL24^{瘦素}的小鼠LN和TIL的CD8^{+}T细胞的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据,分析了Ki67表达和代谢标志物Mitotracker FM染色和2NBDG摄取(G)。数据代表至少3个独立实验,通过配对t检验,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。误差棒表示s.e.m.。

[0018] 图8A-8F.瘦素改造的溶瘤痘苗病毒可在体内和体外诱导瘦素分泌,而不会影响感染性。(A)以2.5×10^{6}PFU的VV^{瘦素}在体外处理24小时和48小时的CL24细胞系的小鼠瘦素蛋白表达的免疫印迹分析。(B)用VV^{瘦素}处理的CL24细胞的培养基中瘦素的ELISA分析。(C)用VV^{对照}或VV^{瘦素}处理的肿瘤的间质液中的瘦素的ELISA分析。来自白色脂肪组织(WA)的间质液用作对照。数据代表至少3次独立实验,通过双向ANOVA分析,*p<0.05。误差棒表示s.e.m.。(D)C57BL/6J小鼠皮下注射CL24细胞。注射肿瘤细胞后5-7天,用PBS、VV^{对照}或VV^{瘦素}瘤内治疗肿瘤。24小时后,给小鼠注射IP荧光素(30mg/ml)10分钟,并进行体内生物发光成像。(E)C57BL/6J小鼠皮下注射CL24细胞。肿瘤细胞注射后5-7天,用PBS、VV^{对照}或VV^{瘦素}瘤内治疗肿瘤。治疗后第10天,从TIL中分离出淋巴细胞。瘦素受体(瘦素R)表达的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据。误差棒表示s.e.m.。(F)来自注射了PBS、VV^{对照}或VV^{瘦素}的小鼠LN和TIL的CD4+Foxp3+T细胞(T调节细胞)的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据。数据代表至少3个独立实验,通过双向ANOVA,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。误差棒表示s.e.m.。

[0019] 图9A-9E.瘦素改造的痘苗病毒促进记忆样T细胞克隆的积累。(A)C57BL/6J小鼠皮下注射CL24细胞。肿瘤细胞注射后5-7天,用2.5×10^{6}PFU的PBS、VV^{对照}或VV^{瘦素}瘤内治疗肿瘤,并监测肿瘤生长。每一行代表单只小鼠。治疗后第10天,从TIL和LN中分离出淋巴细胞。(B)CD8和CD4表达的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据。(C-D)从携带CL24的小鼠中提取的基因组DNA的TCR测序,该小鼠用2.5×10^{6}PFU的PBS、VV^{对照}或VV^{瘦素}瘤内治疗。(每次治疗n=5)(C)总模板数和生产性重排(Total templates and productiverearrangements)。(D)样本克隆性和平均频率的分析。(E)按照(A)处理小鼠。对CD127表达染色的CD8^{+}T细胞的代表性直方图和列表流式细胞术数据。数据代表至少3个独立实验,通过双向ANOVA,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。误差棒表示s.e.m.。

[0020] 图10A-10C.瘦素通过代谢重编程定性改善了溶瘤病毒诱导的T细胞浸润。C57BL/6J小鼠皮下注射CL24细胞。肿瘤细胞注射后5-7天，用PBS、$VV^{对照}$或$VV^{瘦素}$瘤内治疗肿瘤。治疗后第10天，从TIL和LN中分离出淋巴细胞。(A)针对线粒体蛋白VDAC，分析了从LN和TIL分离的CD8+T细胞的代表性直方图和列表流式细胞术数据。(B)用PMA和离子霉素将分离的淋巴细胞刺激过夜。通过对IFNγ和TNFα染色来进行细胞因子生产分析的代表性流式细胞图和列表流式细胞术数据。(C)针对Ki67表达，分析来自按照(A)处理的小鼠LN和TIL的$CD8^+$T细胞的代表性直方图和流式细胞术表格数据。数据代表至少3个独立实验，通过双向ANOVA，*$p<0.05$，**$p<0.01$，***$p<0.001$。误差棒表示s.e.m.。

[0021] 序列表

[0022] 使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸三字母代码，如37C.F.R.1.822中所定义，显示随附序列表中列出的核酸和氨基酸序列。仅显示了每个核酸序列的一条链，但是当提及所显示的链时，互补链应理解为包括在内。此处提交的序列表于2018年1月28日生成，大小为32kb，通过引用并入本文。

[0023] SEQ ID NO:1和2:分别为示例性的人类瘦素核酸和蛋白序列(分别参见GenBank®登录号NM_000230.2和NP_000221.1)。编码序列是SEQ ID NO:1的nt 58-561。信号肽是SEQID NO:2的aa 1-21，而成熟肽是aa 22-167。

[0024] SEQ ID NO:3和4:分别为示例性的人胰岛素核酸和蛋白序列(分别参见GenBank®登录号AH002844.2和AAA59172.1)。编码序列是SEQ ID NO:3的nt 2424..2610、3397..3542。信号肽是SEQ ID NO:4的aa 1-24，而成熟肽是aa 25-110。

[0025] SEQ ID NO:5和6:分别为示例性的人类趋化素(也称为视黄酸受体应答蛋白2)核酸和蛋白序列(分别参见GenBank®登录号NM_002889.3和NP_002880.1)。编码序列是SEQ IDNO:5的nt 118-609。信号肽是SEQ ID NO:6的aa 1-20，而成熟肽是aa 21-157。

[0026] SEQ ID NO:7和8:分别为示例性人胰岛素样生长因子1(IGF-1)核酸和蛋白序列(分别参见GenBank®登录号NM_001111283.2和NP_001104753.1)。编码序列是SEQ ID NO:7的nt 265-741。信号肽是SEQ ID NO:8的aa 1-21，而成熟肽是aa 49-118。

具体实施方式

[0027] 除非另有说明，否则根据常规用法使用技术术语。分子生物学中常用术语的定义可以在以下中找到:Benjamin Lewin,Genes VII,由Oxford University Press出版,1999;Kendrew等,(eds.),The Encyclopedia of Molecular Biology,由Blackwell Science Ltd.出版,1994;和Robert A.Meyers(ed.),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc.出版,1995;和其他类似参考书。

[0028] 如本文所使用的，单数形式的“一/一个/一种(a)”、“一/一个/一种(an)”和“该/所述(the)”可以指单数以及复数，除非上下文另外明确指出。如本文所使用的，术语“包括(comprise)”可以表示“包含(include)”。因此，“包括核酸分子”可以表示“包含核酸分子”而不排除其他要素。应当进一步理解，除非另有说明，否则针对核酸给出的任何和所有碱基大小都是近似的，并且出于描述目的而提供。尽管可以使用与本文描述的方法或材料相似或等同的许多方法和材料，但是下面描述了特定的合适的方法和材料。在发生冲突的情况

下,以本说明书(包括术语解释)为准。另外,材料、方法和实施例仅是说明性的,并不意图是限制性的。所有参考文献,包括专利申请和专利以及与所列GenBank®登记号相关的序列(截至2018年1月26日)均通过引用并入本文。

[0029] 为助于审读本公开的各种实施方案,提供了对特定术语的以下解释:

[0030] 施用:通过任何有效途径向受试者提供或给予受试者诸如公开的重组OV或其他治疗剂(例如抗癌剂)之类的药剂。示例性的施用途径包括但不限于注射(例如皮下(subcutaneous)、真皮下(subdermal)、肌内、皮内、腹膜内、肿瘤内和静脉内)、透皮、鼻内、口服、阴道、直肠和吸入途径。

[0031] 癌:以细胞生长异常或不受控制为特征的恶性肿瘤。通常与癌症相关的其他特征包括转移,干扰邻近细胞的正常功能,以异常水平释放细胞因子或其他分泌产物以及抑制或加剧炎症或免疫反应,侵袭周围或远处的组织或器官,例如淋巴结等。"转移性疾病"是指已经离开原始肿瘤部位并例如经由血流或淋巴系统迁移到身体其他部位的癌细胞。

[0032] 趋化素(Chemerin):(例如OMIM 601973):也称为视黄酸受体应答蛋白2(RARRES2)。趋化素是一种化学吸引蛋白,可作为G蛋白偶联受体CMKLR1的配体。由于其在脂肪细胞分化和葡萄糖摄取中的作用,趋化素被归类为脂肪因子。人趋化素由7号染色体上的RARRES2基因编码,天然蛋白约为14kDa,以无活性的形式作为前趋化素被分泌,并通过炎性和凝血丝氨酸蛋白酶裂解C端而被激活。趋化素序列是可公开获得的,例如可从GenBank®序列数据库中获得(例如登录号NP_002880.1和NP_001013445.1提供示例性趋化素蛋白序列,而登录号NM_002889.3和NM_001013427.1提供示例性趋化素核酸序列)。本领域普通技术人员可以鉴定其他趋化素核酸和蛋白序列,包括趋化素变体,例如与这些GenBank®序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性,例如与SEQ ID NO:6的aa 21-157的肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0033] 接触:直接物理结合放置,包括固体或液体形式。接触可以在体外或离体进行,例如通过向样品(例如一种含有肿瘤细胞的样品)中添加试剂,或通过向受试者施用而在体内进行。

[0034] 有效量(或治疗有效量):足以实现有益或期望结果的试剂(例如本文公开的重组OV以及其他抗癌剂)的量。

[0035] 有效量(也称为治疗有效量)可以根据以下一项或多项而变化:受试者和所治疗的疾病状况,受试者的体重和年龄,疾病状况的严重程度,施用方式等等,这可以由本领域普通技术人员容易地确定。有益的治疗效果可以包括诊断测定的实现;改善疾病、症状、病症或病理状况;减少或预防疾病、症状、病症或病理状况的发作;并且通常可以抵抗疾病、症状、病症或病理状况。

[0036] 在一个实施方案中,(例如瘦素、胰岛素、趋化素或IGF-1蛋白,本文公开的表达此类蛋白的重组OV的)"有效量"可以是这样的量,其足以减少肿瘤的体积/大小、肿瘤的重量、转移瘤的数量/程度,减少转移瘤的体积/大小、转移瘤的重量或其组合例如至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约50%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约90%、至少约95%或至少约99%(与不施用治疗剂相比)。在一个实施方案中,(例如瘦素、胰岛素、趋化素或IGF-1或表达此类蛋白的OV的)"有效量"可以是这样的量,其足以增加T细胞浸润,例

如浸入肿瘤或肿瘤微环境中至少约10％、至少约20％、至少约25％、至少约50％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约99％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％(与不施用治疗剂相比)。

[0037] 融合蛋白(或嵌合蛋白):含有来自至少两个不同(异源)蛋白或肽的氨基酸序列的蛋白。融合蛋白可以例如通过表达从编码两种不同(异源)蛋白的至少一部分的核酸序列改造而来的核酸序列来产生。为了产生融合蛋白,核酸序列通常在相同的阅读框中,并且不包含内部终止密码子。在一个示例中,可通过本文提供的OV表达包含代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素或趋化素)、胰岛素或IGF-1)和细胞因子(例如IL-2或IL-15)的融合蛋白。

[0038] 融合蛋白包括第一部分和第二部分,它们可以直接或通过接头(例如肽接头)连接。在一些示例中,第一部分是代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素或趋化素)、胰岛素或IGF-1),第二部分是细胞因子(例如IL-2或IL-15)。在一些示例中,第一部分是N端,第二部分是C端。在一些示例中,第一部分是C端,第二部分是N端。

[0039] 胰岛素:(例如OMIM 176730):胰岛细胞的β细胞产生的激素。它例如通过促进碳水化合物特别是葡萄糖从血液中吸收到肝脏、脂肪和骨骼肌细胞中来调节碳水化合物、脂肪和蛋白的代谢。人胰岛素由11号染色体上的Ins基因编码。在脊椎动物中,胰岛素的氨基酸序列是高度保守的。牛胰岛素与人的区别仅在于三个氨基酸残基,而猪胰岛素则仅差一个。胰岛素序列是可公开获得的,例如可从GenBank®序列数据库获得(例如登录号AAA59172.1和AAA41439.1提供示例性胰岛素蛋白序列,而登录号AH002844.2和V01242.1提供示例性胰岛素核酸序列)。本领域普通技术人员可以鉴定其他胰岛素核酸和蛋白序列,包括胰岛素变体,例如与这些GenBank®序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性的那些,例如与SEQ ID NO:4的aa 25-110的肽具有至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性的那些。

[0040] 胰岛素样生长因子1(IGF-1):(例如OMIM 147440):也称为生长调节素C(somatomedin C),是一种主要由肝脏产生的激素,受生长激素刺激。人IGF-1由12号染色体上的IGF1基因编码,天然蛋白为70个氨基酸。IGF-1序列是可公开获得的,例如可从GenBank®序列数据库获得(例如登录号NP_001104753.1(成熟肽aa 49-118),而NP_034642.2(成熟肽aa 49-116)提供了示例性IGF-1蛋白序列,而登录号NM_000618.4、NM_001111283.2和NM_010512.5提供了示例性的IGF-1核酸序列)。本领域普通技术人员可以鉴定另外的IGF-1核酸和蛋白序列,包括IGF-1变体,例如与这些GenBank®序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性的那些,例如与SEQ ID NO:8的aa 49-118的肽具有至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性的那些。

[0041] 瘦素:(例如OMIM 164160):一种主要由脂肪细胞产生的激素,可通过抑制饥饿来帮助调节能量平衡。人瘦素由7号染色体上的Lep基因编码,天然蛋白为16kDa和167个氨基酸。瘦素序列是可公开获得的,例如可从GenBank®序列数据库获得(例如登录号NP_000221.1、NP_001003070.1、NP_999005.1、NP_037208.1、NP_032519.1和NP_001036220.1提供了示例性的瘦素蛋白序列,而登录号NM_000230.2、NM_001003070.1、NM_213840.1和NM_013076.3提供了示例性的瘦素核酸序列)。本领域普通技术人员可以鉴定其他瘦素核酸和

蛋白序列，包括瘦素变体，例如与这些GenBank®序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性的那些，例如与SEQ ID NO:2的aa 22-167的肽具有至少80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性的那些。

[0042] 增加或减少：与对照值(例如代表无治疗剂的值)相比，在统计学上显著的数量正或负变化。增加是正变化，例如与对照值相比增加至少50％、至少100％、至少200％、至少300％、至少400％或至少500％。减少是负变化，例如与对照值相比减少至少20％、至少25％、至少50％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或至少100％。在一些示例中，减少小于100％，例如减少不超过90％、不超过95％或不超过99％。

[0043] 分离的：“分离的”生物组分(例如OV、核酸分子或蛋白)已经与产生该组分的生物的细胞或组织中的其他生物组分基本分离、分开或纯化，例如其他细胞(例如RBC)、染色体和染色体外的DNA和RNA以及蛋白。已“分离”的核酸和蛋白包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白。该术语还涵盖通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白，以及化学合成的核酸和蛋白。在一些示例中，分离的重组OV是至少50％的纯度，例如至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少98％或至少100％的纯度。

[0044] 接头：结合或连接两个或多个离散的独立肽或蛋白(例如单体结构域)，例如以产生融合蛋白的部分(moiety)或部分的集合(group of moieties)。在一个示例中，接头是基本上线性的部分。可用于产生本文提供的融合蛋白的示例性接头包括但不限于：肽、核酸分子、肽核酸和具有并入碳骨架中的一个或多个氧原子的任选取代的亚烷基部分。接头可以是天然序列、其变体或合成序列的一部分。接头可包括天然存在的氨基酸、非天然存在的氨基酸或两者的组合。在一个示例中，接头由至少5个、至少10个、至少15个或至少20个氨基酸组成，例如5至10、5至20或5至50个氨基酸。在一个示例中，接头是聚丙氨酸。接头可以是柔性接头(例如(GGGGS)n)，刚性接头(例如(EAAAK)n)或可裂解的接头(例如二硫键，蛋白酶敏感的)。

[0045] 代谢调节蛋白：一种蛋白，其可以增加或减少细胞，例如T细胞，例如患有癌症的受试者体内T细胞的代谢活性。在一个示例中，代谢调节蛋白增加T细胞(例如肿瘤浸润T细胞)的代谢活性。在一些示例中，例如相对于不存在代谢调节蛋白(例如不施用表达代谢调节蛋白的OV)，代谢调节蛋白使细胞，例如T细胞，例如肿瘤浸润性T细胞的代谢活性增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，例如相对于不存在代谢调节蛋白(例如不施用表达代谢调节蛋白的OV)，代谢调节蛋白使细胞，例如T细胞，例如肿瘤浸润性T细胞的线粒体功能增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，例如相对于不存在代谢调节蛋白(例如不施用表达代谢调节蛋白的OV)，代谢调节蛋白使细胞，例如T细胞，例如肿瘤浸润性T细胞的氧化磷酸化增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，例如

相对于不存在代谢调节蛋白(例如不施用表达代谢调节蛋白的OV),代谢调节蛋白使记忆T细胞增加至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约200%、至少约300%、至少约400%、至少约500%或至少约600%。在一些示例中,例如相对于不存在代谢调节蛋白(例如不施用表达代谢调节蛋白的OV),代谢调节蛋白使肿瘤(例如癌症)中T细胞克隆扩增增加至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约200%、至少约300%、至少约400%、至少约500%或至少约600%。在一些示例中,可以实现这些影响中的一种或多种的组合。

[0046] 在一个示例中,代谢调节蛋白是脂肪因子。脂肪因子可以是脂肪组织分泌的细胞因子。脂肪因子的示例包括但不限于:瘦素、脂联素、阿珀林、趋化素、白介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)、视黄醇结合蛋白4(RBP4)、肿瘤坏死因子-α(TNFα)、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和CTRP-4。在一个示例中,代谢调节蛋白是胰岛素。在一个示例中,代谢调节蛋白是IGF-1。

[0047] 溶瘤病毒(OV):一种优先感染并杀死癌细胞的病毒。OV可以通过与细胞表面上的受体结合或与质膜融合而进入细胞,并在肿瘤中建立裂解周期,而对正常组织基本上没有损害。由于被溶瘤破坏了被感染的癌细胞,它们释放出新的感染性病毒颗粒或病毒粒子,以帮助破坏剩余的肿瘤。示例性溶瘤病毒包括但不限于单纯疱疹病毒(HSV)、痘苗病毒、腺病毒、痘病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、塞内卡谷地病毒、ECHO病毒、新城疫病毒、鸡贫血病毒和细小病毒。溶瘤病毒的具体示例包括ECHO-7株肠病毒RIGVIR,名为H101的基因修饰的腺病毒和talimogene laherparepvec(T-VEC)。

[0048] 重组OV是包括非天然序列的OV,所述非天然序列例如编码代谢调节蛋白(例如瘦素、胰岛素、趋化素和胰岛素样生长因子1中的一种或多种)的核酸分子,以及编码包括该蛋白和细胞因子的融合蛋白的核酸分子。

[0049] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列(例如瘦素、胰岛素、趋化素或胰岛素样生长因子1编码序列)的转录或表达,则该启动子与编码序列可操作地连接。通常,可操作连接的序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白编码区的情况下,是在同一阅读框中。

[0050] 药学上可接受的载体:可用于本发明的药学上可接受的载体是常规的。Remington'sPharmaceutical Sciences,E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,PA,15th Edition(1975)描述了适用于治疗剂例如本文公开的重组OV的药物递送的组合物和制剂。

[0051] 通常,载体的性质将取决于所采用的特定施用方式。例如,肠胃外制剂通常包含注射液,所述注射液包括药学上和生理学上可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为载体。除生物中性载体外,待施用的药物组合物还可包含少量的无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨醇单月桂酸酯。

[0052] 启动子:指导核酸转录的核酸控制序列的阵列。启动子包括靠近转录起始位点的必需核酸序列,例如在聚合酶II型启动子的情况下,是TATA元件。启动子还任选地包括远端增强子或阻遏子元件,其可位于距转录起始位点多达数千个碱基对的位置。

[0053] 可以与公开的重组OV一起使用的启动子的例子包括但不限于病毒启动子,例如7.5启动子、SV40启动子、CMV增强子启动子和CMV增强子/β-肌动蛋白启动子。组成型和诱导型启动子均可使用(参见,例如Bitter等,Methods in Enzymology 153:516-544,1987)。还包括那些足以使启动子依赖性基因表达对于细胞类型特异性、组织特异性可控或对于外部信号或试剂可被诱导的启动子元件;这样的元件可以位于基因的5'或3'区域。通过重组DNA或合成技术产生的启动子也可以用于提供核酸序列的转录。

[0054] 重组:重组核酸分子是具有非天然存在的序列(例如具有非天然序列的OV,例如哺乳动物的瘦素、胰岛素、趋化素或胰岛素样生长因子1编码序列)或具有由两个原本是分开的序列片段的人工组合制成的序列的核酸分子。可以通过常规方法,例如化学合成或通过人工操作分离的核酸片段,例如通过基因工程技术,来实现这种人工组合。类似地,重组蛋白是由重组核酸分子编码的蛋白。类似地,重组或转基因细胞是包含重组核酸分子(例如重组OV)并表达重组蛋白的细胞。

[0055] 序列同一性:氨基酸(或核苷酸)序列之间的相似性以序列之间的相似性表示,亦称为序列同一性。序列同一性经常用百分比同一性(或相似性或同源性)来衡量。百分比越高,两个序列越相似。

[0056] 用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。各种程序和比对算法描述于以下:Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.2:482,1981;Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48:443,1970;Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444,1988;Higgins和Sharp,Gene73:237,1988;Higgins和Sharp,CABIOS 5:151,1989;Corpet等,Nucleic Acids Research16:10881,1988;和Pearson和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444,1988。Altschul等,Nature Genet.6:119,1994,提出了序列比对方法和同源性计算的详细研究。

[0057] NCBI基本局部比对搜索工具(NCBI Basic Local Alignment Search Tool,BLAST)(Altschul等,J.Mol.Biol.215:403,1990)可从多种渠道获得,包括美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI,Bethesda,MD)和互联网,可与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。互联网NCBI网站上提供了有关如何使用此程序确定序列同一性的描述。

[0058] 通常天然瘦素、胰岛素、趋化素或IGF-1蛋白或编码序列的变体的特征在于在与氨基酸序列的全长比对中(使用NCBI Blast 2.0,将间隙blastp为默认参数)具有至少约80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。为了比较大于约30个氨基酸的氨基酸序列,采用Blast 2序列功能,使用设置为默认参数的默认BLOSUM62矩阵(缺口存在成本为11,每个残基缺口成本为1)。比对短肽(少于约30个氨基酸)时,应使用Blast 2序列功能进行比对,采用将PAM30矩阵设置为默认参数(开发缺口9,延伸缺口1罚分)。当通过这种方法评估时,与参考序列具有更高相似性的蛋白将显示出越来越高的同一性百分比,例如至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。当比较少于整个序列的序列同一性时,同源物和变体通常在10-20个氨基酸的短窗口内具有至少80%的序列

同一性，并且取决于它们与参考序列的相似性，可以具有至少85％或至少90％或至少95％的序列同一性。在这样的短窗口上确定序列同一性的方法可在互联网NCBI网站上找到。本领域的技术人员将意识到，这些序列同一性范围仅用于指导；完全有可能获得超出所提供范围的非常重要的同源物。

[0059] 因此，变体瘦素、胰岛素、趋化素或IGF-1蛋白或核酸序列可与本文提供的GenBank®登录号中所示的任何序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性(例如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0060] 受试者：脊椎动物，例如哺乳动物，例如人。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿猴、人类、农场动物、竞赛动物和宠物。在一个实施方案中，所述受试者是非人类哺乳动物受试者，例如猴子或其他非人类灵长类动物，小鼠、大鼠、兔、猪、山羊、绵羊、狗、猫、马或牛。在一些示例中，受试者患有可以使用本文公开的重组OV治疗的肿瘤，例如癌症。在一些示例中，受试者是实验室动物/生物，例如小鼠、兔或大鼠。

[0061] T细胞：在其细胞表面含有T细胞受体的白细胞，其在细胞介导的免疫中起作用。

[0062] 治疗剂：指在施用于受试者后赋予某种有益作用的一种或多种分子或化合物。有益的治疗效果可以包括诊断测定的实现；改善疾病、症状、病症或病理状况；减少或预防疾病、症状、病症或病理状况的发作；并且通常可以抵抗疾病、症状、疾病或病理状况。

[0063] 转导和转化：当病毒或载体将核酸转移到细胞中时，其“转导”细胞。当核酸分子通过将核酸掺入细胞基因组中或通过游离复制而被细胞稳定复制时，细胞被转导入该细胞的核酸“转化”或“转染”。

[0064] 许多转染方法是本领域技术人员已知的，例如：化学方法(例如磷酸钙转染)，物理方法(例如电穿孔、显微注射、粒子轰击)，融合(例如脂质体)，受体介导的内吞作用(例如DNA-蛋白复合物、病毒包膜/衣壳-DNA复合物)以及被病毒如重组病毒生物感染{Wolff，J.A.，ed，Gene Therapeutics，Birkhauser，Boston，USA(1994)}。

[0065] 转基因：载体例如重组OV提供的外源基因。在一个示例中，转基因包括一种或多种瘦素、胰岛素、趋化素或IGF-1编码序列。

[0066] 治疗(Treating)、治疗(Treatment)和疗法(Therapy)：减轻或改善伤害、病理或病症的任何成功或成功标志，包括任何客观或主观参数，例如消减、缓解、症状减轻或使患者更容易忍受病症，减慢退化或衰退的速度，使退化的最终点不那么衰弱，改善受试者的身心健康，或延长生存时间。可以通过客观或主观参数评估治疗；包括身体检查，血液和其他临床检查(例如影像检查)的结果等。在一些示例中，用所公开的方法进行治疗导致肿瘤和/或转移瘤的数量、体积和/或重量减少。

[0067] 肿瘤、赘生物、恶性肿瘤或癌症：肿瘤是由于过度的细胞分裂导致的组织或细胞的异常生长。肿瘤生长可产生肿瘤。个体中肿瘤的量就是“肿瘤负担(tumor burden)”，其可以用肿瘤的数量、体积或重量来衡量。“非癌组织”是来自其中形成了恶性肿瘤的同一器官的组织，但是不具有该肿瘤的特征性病理。通常，非癌组织在组织学上看起来是正常的。“正常组织”是来自器官的组织，其中该器官不受该器官的癌症或另一疾病或病症的影响。“无癌”受试者尚未被诊断出患有该器官的癌症，也没有可检测的癌症。

[0068] 可以使用公开的重组OV治疗的示例性肿瘤例如癌症包括实体瘤，例如乳腺癌(例

如小叶和导管癌,例如三阴性乳腺癌)、肉瘤、肺部癌(例如非小细胞癌、大细胞癌、鳞状癌和腺癌)、肺间皮瘤、结直肠腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌(例如浆液性囊腺癌和粘液性囊腺癌)、卵巢生殖细胞肿瘤、睾丸癌和生殖细胞肿瘤、胰腺腺癌、胆腺癌、肝细胞癌、膀胱癌(包括例如移行细胞癌、腺癌和鳞状癌)、肾细胞腺癌、子宫内膜癌(包括例如腺癌和穆勒混合瘤(mixed Mullerian tumors)(癌肉瘤))、子宫颈内膜癌、子宫颈癌和阴道癌(例如各自的腺癌和鳞状癌)、皮肤肿瘤(例如鳞状细胞癌、基底细胞癌、恶性黑色素瘤、皮肤附属器瘤、卡波西肉瘤、皮肤淋巴瘤、皮肤附件肿瘤和各种类型的肉瘤和默克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma))、食道癌、鼻咽和口咽癌(包括其鳞状癌和腺癌)、唾液腺癌、脑和中枢神经系统肿瘤(包括例如神经胶质、神经元和脑膜来源的肿瘤)、周围神经肿瘤、软组织肉瘤和骨骼和软骨肉瘤、头颈部鳞状细胞癌和淋巴瘤(包括B细胞和T细胞恶性淋巴瘤)。在一个示例中,所述肿瘤是腺癌。

[0069] 所公开的重组OV也可以用于治疗液体瘤(liquid tumors),例如淋巴、白细胞或其他类型的白血病。在特定示例中,所治疗的肿瘤是血液肿瘤,例如白血病(例如急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)、T细胞前淋巴细胞性白血病(T-PLL)、大颗粒淋巴细胞性白血病和成人T细胞白血病)、淋巴瘤(诸如霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤)或骨髓瘤。

[0070] 在足以满足……的条件下:用于描述允许所需活性的任何环境的短语。在一个示例中,所需活性是瘦素、胰岛素、趋化素或IGF-1的一种或多种的表达或活性增加,例如在被表达该蛋白的重组OV感染的肿瘤细胞中。在一个示例中,所需活性是体内肿瘤的治疗,例如使用所公开的重组溶瘤病毒。

[0071] 载体:将核酸分子引入宿主细胞(例如肿瘤细胞),从而产生转化的宿主细胞。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可以包括一个或多个瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1编码序列,例如与其他序列组合。载体可以转导、转化或感染细胞,从而使细胞表达除细胞天然核酸和/或蛋白以外的核酸和/或蛋白。载体任选地包括有助于实现核酸进入细胞内的物质,例如病毒颗粒、脂质体、蛋白涂层等。

[0072] 概述

[0073] 免疫疗法可以恢复对癌症的休眠反应,但是由于包括免疫学无视(immunologic ignorance)/排斥和代谢异常的微环境在内的多种抵抗机制,反应率仍然很低。可以在癌细胞中复制的溶瘤病毒(OV)可诱导肿瘤溶解和免疫引发。本文证明溶瘤痘苗病毒诱导肿瘤微环境的实质性重塑,其主要是效应T细胞的流入。然而,发明人观察到对溶瘤病毒的应答是不完全的,可能是由于肿瘤微环境引起的代谢不足。已确定脂肪因子瘦素是一种有效的代谢重编程剂,其可支持抗肿瘤反应。瘦素在体外可对T细胞进行代谢重编程,而表达瘦素的黑素瘤细胞则在体内受到免疫控制。改造溶瘤病毒以在肿瘤细胞中表达瘦素诱导了荷瘤小鼠的完全应答,并促进了功能优越的肿瘤浸润。荷瘤动物的瘦素治疗增加了T细胞浸润和有效的代谢重编程。经改造以过表达瘦素的肿瘤比野生型肿瘤更有效地受到免疫系统的控制,并且在代谢上也更加充分。因此,瘦素利用通过增加肿瘤浸润T细胞的代谢活性来促进抗肿瘤免疫力的轴。因此,瘦素和其他代谢重编程剂(例如其他脂肪因子如趋化素,或其他蛋白如胰岛素或IGF-1)可以为肿瘤免疫提供代谢支持,且溶瘤病毒代表了递送代谢治疗的平台。

[0074] 在实体瘤中免疫反应遇到的许多挑战中，渗透能力差，以及在不利的微环境中能够适当地发挥其效应子功能。本文的数据表明，可以通过改造可直接将代谢调节(例如脂肪因子瘦素)递送至微环境的OV来克服这两个障碍，从而改善治疗效果。最近的研究已经探索了由OV在肿瘤中定义的遗传特征，并确定了可以在OV中表达的靶标(Zamarin等，Nat Commun 2017;8:14340)。本文数据是第一个描述利用单细胞RNA-seq分析进行溶瘤病毒治疗后免疫格局变化的数据。这些发现揭示了在肿瘤尚未消退的早期时间点，肿瘤浸润的惊人变化。这些数据表明OV不是简单地溶解一部分肿瘤细胞并促进某些免疫原性细胞死亡，而是具有完全重塑肿瘤免疫微环境的能力。数据不仅显示了在T细胞区室中浸润的增加，这对观察到的抗肿瘤免疫可能是首要的，而且还显示了髓样群体的广泛变化。这些结果为由OV诱导的强力免疫力提供了新思路，并表明可以以特定方式加强这种免疫反应以促进更持久的反应。

[0075] 改善肿瘤微环境中的T细胞代谢功能可能会带来更好的治疗反应。本公开提供了特别是在癌症中采用瘦素(或免疫应答的其他代谢调节剂，例如其他脂肪因子或其他激素例如胰岛素)的新方法。此外，所公开的方法利用OV作为可以特异性调节肿瘤微环境并改善治疗反应的分子的有效递送系统。

[0076] 先前的研究表明，免疫细胞表达瘦素受体，而瘦素作为细胞因子可在先天性和适应性免疫反应中具有促炎功能(Loffreda等，FASEB J 1998;12(1):57-65;La Cava等，Nat Rev Immunol 2004;4(5):371-9;Santos-Alvarez等，Cell Immunol 1999;194(1):6-11)。关于适应性免疫应答，瘦素可以激活和增强人T淋巴细胞的增殖(Martin-Romero等，Cell Immunol 2000;199(1):15-24)。尽管有一些观察表明瘦素可能在炎症和自身免疫模型中抑制调节性T细胞增殖和功能(Feuerer等，Nat Med 2009;15(8):930-9)，但本文使用溶瘤剂的数据表明在富含瘦素的肿瘤环境中未刺激Treg细胞。

[0077] 瘦素或瘦素受体在癌症，特别是在肿瘤微环境中的作用知之甚少。本文的发现表明，与次级淋巴器官相比，在肿瘤微环境中的T细胞中瘦素受体表达增加。瘦素可通过线粒体功能的持续存在和氧化磷酸化的增加来代谢增强肿瘤浸润性T细胞效应子的功能。先前的研究表明，瘦素可以促进骨骼肌中的脂肪酸氧化。瘦素缺陷型小鼠的CD4+T细胞显示葡萄糖摄取减少，以及增殖和细胞因子产生减少。本文中的数据表明瘦素通过STAT3和PI3K的激活而发出信号，并且可以增加线粒体的含量和质量。瘦素可促进PGC1α活化并促进氧化磷酸化以及通过表达mitofusin 1来促进线粒体融合(Roman等，Mol Cell Endocrinol 2010;314(1):62-9;Hsu等，Int J Obes(Lond)2015;39(12):1750-6.)。随着肿瘤浸润性T细胞抑制PGC1α的表达(Scharping等，Immunity 2016;45(3):701-3)，瘦素可能通过维持该轴来支持TIL功能。

[0078] 公开的对野生型和瘦素改造的溶瘤性痘苗的T细胞浸润的分析揭示了在用表达瘦素的痘苗病毒治疗的肿瘤中更主要的免疫群体。观察到记忆T细胞比例增加，这解释了观察到的持续治疗反应。记忆T细胞是优异的抗肿瘤T细胞，具有较高的线粒体含量和氧化磷酸化能力(van der Windt等，Immunity 2012;36(1):68-78;Sukumar等，Cell Metab 2016;23(1):63-76)，与本文显示线粒体含量增加的数据一致。TCR测序分析进一步证明了OV对肿瘤浸润淋巴细胞的影响。当溶瘤剂诱导新的T细胞克隆浸润肿瘤时，观察到用表达瘦素的痘苗病毒治疗的肿瘤中T细胞克隆扩增。

[0079] 对肿瘤浸润淋巴细胞中代谢增强的线粒体功能是有益的。本文提供的方法增加了可直接递送至肿瘤的代谢调节剂的组成成分(repertoire)。这些代谢调节剂的治疗性递送的一种方法是利用OV,其可以将遗传编码的有效载荷(payload)直接递送至肿瘤微环境。到目前为止,大多数溶瘤递送的基因本质上是免疫的(例如细胞因子、共刺激分子等)。然而,所公开的方法提供了由OV递送的第一代谢调节剂。尽管本文证明了痘苗病毒是有效的,但也可以使用其他溶瘤剂,例如HSV、新城疫病毒、腺病毒和VSV。尽管scRNA-seq显示溶瘤剂在感染后早期具有强大的免疫刺激潜力,但要实现持久完全的应答,代谢支持可提供进入长效记忆的强早期效应子应答,其能够介导强大的抗肿瘤作用。

[0080] 基于这些观察,本文提供了增加或增强T细胞代谢从而增加抗肿瘤免疫力,增加肿瘤对免疫疗法的响应或两者的组合物和方法。通过调节肿瘤微环境代谢,例如通过在肿瘤微环境中提供代谢调节蛋白,例如通过从重组OV表达这种蛋白,增强了抗肿瘤作用。此类方法可与其他抗癌疗法结合使用,例如与T细胞激动剂(例如与一种或多种4-1BB、OX40或GITR的激动剂)组合使用。

[0081] 在一些示例中,(例如作为蛋白或作为编码该蛋白的核酸,例如通过载体诸如病毒载体)以治疗量施用瘦素(或其他代谢调节蛋白,例如另一种脂肪因子(例如趋化素)、胰岛素或IGF-1),例如与其他抗癌疗法(例如免疫疗法,诸如T细胞激动剂,诸如一种或多种4-1BB、OX40和GITR的激动剂)组合使用。在一些示例中,使用在肿瘤细胞中表达或过表达瘦素(或其他代谢调节蛋白,例如另一种脂肪因子(例如趋化素)、胰岛素或IGF-1)的重组OV。

[0082] 表达瘦素(或其他代谢调节蛋白,例如另一种脂肪因子(例如趋化素)、胰岛素或IGF-1)的OV可以杀死肿瘤细胞并刺激免疫系统,但是瘦素(或其他代谢调节蛋白,例如另一种脂肪因子(例如趋化素)、胰岛素或IGF-1)的释放还改善肿瘤部位的T细胞代谢。因此,这些重组OV成为一种有效的自我支持免疫疗法。重组瘦素(或其他代谢调节蛋白,例如另一种脂肪因子(例如趋化素)、胰岛素或IGF-1)增加T细胞浸润。

[0083] 重组溶瘤病毒(OV)

[0084] 本文提供了可用于改善细胞免疫疗法,例如癌症免疫疗法的重组OV。例如,本公开提供了重组OV,其含有编码一种或多种代谢调节蛋白,例如脂肪因子(例如瘦素或趋化素)、趋化素或IGF-1的核酸分子。在一些示例中,代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素或趋化素)、趋化素或IGF-1)是由OV表达的融合蛋白的一部分,例如包含代谢调节蛋白和γ链细胞因子的融合蛋白(例如IL-2或IL-15)。该蛋白在被OV感染的肿瘤细胞中的表达可以导致这些蛋白中的一种或多种的表达增加,从而增加这些蛋白的活性,从而增加抗肿瘤活性。

[0085] OV可以是任何OV,例如天然OV或基因改造的OV。例子包括单纯疱疹病毒(HSV)、痘苗病毒、腺病毒、痘病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、塞内卡谷地病毒、ECHO病毒、新城疫病毒、鸡贫血病毒或细小病毒。在一个具体的示例中,OV可以是talimogene laherparepvec(T-VEC)。在一个具体的示例中,OV可以是西部保留地株痘苗病毒。在一个具体的示例中,OV可以是痘苗病毒,并且一种或多种代谢调节蛋白可以是瘦素。在一个具体的示例中,OV可以是西部保留地株痘苗病毒,且一种或多种代谢调节蛋白是瘦素。在一个具体的示例中,OV可以是西部保留地株痘苗病毒,并且一种或多种代谢调节蛋白可以是瘦素-IL-2或瘦素-IL-15融合蛋白(其中瘦素和细胞因子可以通过接头连接)。

[0086] 在一些示例中，编码一种或多种代谢调节蛋白的核酸分子可操作地连接至启动子，例如组成型或可调节启动子。在一个示例中，启动子对蛋白可以不是天然的。例如，启动子可以是来自病毒的启动子，例如7.5启动子。

[0087] 在一个示例中，一种或多种代谢调节蛋白可包含与SEQ ID NO:2、4、6或8具有至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约98％、至少约99％或100％的序列同一性。在一个示例中，编码一种或多种代谢调节蛋白的核酸分子可包含与SEQ ID NO:1、3、5或7具有至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约98％、至少约99％或100％的序列同一性。在一个示例中，一种或多种代谢调节蛋白可以是包括第一蛋白和第二蛋白的融合蛋白，其中第一蛋白可包含与SEQ ID NO:2、4、6或8具有至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约98％、至少约99％或100％的序列同一性。在一个示例中，编码一种或多种代谢调节蛋白的核酸分子可包含与SEQ ID NO:1、3、5或7具有至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约98％、至少约99％或100％的序列同一性。在一个示例中，编码一种或多种代谢调节蛋白的核酸分子可编码包括代谢蛋白的融合蛋白，其中所述融合蛋白可包括第一蛋白和第二蛋白，其中第一蛋白可由包含与SEQ ID NO:1、3、5或7至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约98％、至少约99％或100％的序列同一性的核酸分子编码。在一些示例中，重组OV可以进一步表达一种或多种免疫刺激蛋白，例如共刺激分子、细胞因子、趋化因子，例如IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IFN-α/β、TNF-α和GM-CSF中的一种或多种，或其组合。

[0088] 在一些示例中，当通过所公开的重组OV感染肿瘤细胞时，例如相对于不施用OV或相对于施用不表达脂肪因子的OV，被感染的肿瘤细胞中脂肪因子的表达和/或活性可以增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，当通过所公开的重组OV感染肿瘤细胞时，例如相对于不施用OV或相对于施用不表达瘦素的OV，被感染的肿瘤细胞中的瘦素表达和/或活性可以增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，当通过所公开的重组OV感染肿瘤细胞时，例如相对于不施用OV或相对于施用不表达胰岛素的OV，被感染的肿瘤细胞中的胰岛素表达和/或活性可以增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，当通过所公开的重组OV感染肿瘤细胞时，例如相对于不施用OV或相对于施用不表达趋化素的OV，被感染的肿瘤细胞中的趋化素表达和/或活性可以增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，当通过所公开的重组OV感染肿瘤细胞时，例如相对于不施用OV或相对于施用不表达IGF-1的OV，被感染的肿瘤细胞中的IGF-1表达和/或活性可以增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。

[0089] 在一些示例中，例如相对于不施用OV或相对于施用不表达代谢调节蛋白的OV，来自OV的肿瘤细胞中表达脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1可以使T细胞向肿瘤或肿瘤微环境的浸润增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，例如相对于不施用OV或相对于施用不表达代谢调节蛋白的OV，来自OV的肿瘤细胞中表达脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1可以使肿瘤部位的T细胞中的线粒体活性增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，例如相对于不施用OV或相对于施用不表达代谢调节蛋白的OV，来自OV的肿瘤细胞中表达脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1可以使T细胞氧化磷酸化增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，例如相对于不施用OV或相对于施用不表达代谢调节蛋白的OV，来自OV的肿瘤细胞中表达脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1可以使肿瘤中的T细胞克隆扩增增加至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约200％、至少约300％、至少约400％、至少约500％或至少约600％。在一些示例中，可以实现这些效果的组合。

[0090] 1.代谢调节蛋白

[0091] OV中的代谢调节蛋白，例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1、编码序列(可以是融合蛋白编码序列的一部分)可以是野生型(例如非突变的)或变体序列。在一个具体的示例中，代谢调节蛋白是瘦素。在一个具体的示例中，代谢调节蛋白是趋化素。在一个具体的示例中，代谢调节蛋白是胰岛素。在一个具体的示例中，代谢调节蛋白是IGF-1。

[0092] 例如，本文通过GenBank®登录号提供野生型瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1序列(并且序列在SEQ ID NO:1-8中提供)。因此，在一些示例中，引入肿瘤细胞的重组OV可以包括天然的瘦素、胰岛素、趋化素和/或IGF-1编码序列。在一些示例中，引入肿瘤细胞的重组OV包括非天然脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1编码序列，但是编码天然的脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1蛋白序列(例如简并的编码序列)。在一些示例中，由重组OV表达的脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀

林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1蛋白包括信号序列。

[0093] 变体脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1蛋白,包括上文通过GenBank®登录号提供的蛋白序列的变体,可以包含一个或多个突变,例如单个插入、单个缺失、单个替换。在一些示例中,变体脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1蛋白包括1-20个插入、1-20个缺失、1-20个替换和/或其任何组合(例如单个插入和1-19个替换)。在一些示例中,本公开内容提供了具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个其他氨基酸变化的任何天然脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1蛋白的变体,其中蛋白保留天然或增加的生物活性。在一些示例中,变体脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1蛋白包括1-8个插入,1-15个缺失,1-10个替换和/或其任何组合(例如1-15、1-4或1-5个氨基酸缺失以及1-10、1-5或1-7个氨基酸替换)。在一些示例中,变体脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1蛋白具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21,22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸变化。在一个示例中,通过使用标准方法例如定点诱变或PCR来操控编码肽的核苷酸序列,来产生这样的变体肽。

[0094] 一种修饰类型包括用具有相似的生化特性的氨基酸残基替换氨基酸,即保守替换(例如1-4、1-8、1-10或1-20个保守替换)。通常,保守替换对所得肽的活性几乎没有影响。例如,保守替换是任何天然脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1蛋白序列中的氨基酸替换,其基本上不影响蛋白的天然功能。丙氨酸扫描可用于鉴定蛋白中哪些氨基酸残基可耐受氨基酸替换。在一个示例中,当丙氨酸或其他保守氨基酸替换1-4、1-8、1-10或1-20个天然氨基酸时,脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1的天然功能改变不超过25%,例如不超过20%,例如不超过10%。可以替换蛋白中原始氨基酸并被认为是保守替换的氨基酸的例子包括:Ser替换Ala;Lys、Gln、或Asn替换Arg;Gln或His替换Asn;Glu替换Asp;Ser替换Cys;Asn替换Gln;Asp替换Glu;Pro替换Gly;Asn或Gln替换His;Leu或Val替换Ile;Ile或Val替换Leu;Arg或Gln替换Lys;Leu或Ile替换Met;Met、Leu或Tyr替换Phe;Thr替换Ser;Ser替换Thr;Tyr替换Trp;Trp或Phe替换Tyr;以及Ile或Leu替换Val。

[0095] 通过使用保守性较低的替换,例如选择在维持(a)替换区域中多肽骨架的结构,例如片状或螺旋构象;(b)在靶位点多肽的电荷或疏水性;或(c)侧链体积的效果上差异更大的残基,可以进行更实质性的改变。通常预期会在多肽功能上产生最大变化的替换是:(a)亲水残基(例如丝氨酸或苏氨酸)替换疏水残基(例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸)(或被其替换);(b)半胱氨酸或脯氨酸替换任何其他残基(或被其替换);(c)具有

带正电侧链的残基(赖氨酸、精氨酸或组氨酸)替换负电性残基(谷氨酸或天冬氨酸)(或被其替换);或(d)具有庞大侧链的残基(例如苯丙氨酸)替换没有侧链的残基(例如甘氨酸)(或被其替换)。这些氨基酸替换(或其他缺失和/或添加)的效果可通过分析变体瘦素、胰岛素、趋化素或IGF-1蛋白的功能,通过分析该蛋白的天然功能来评估。

[0096] OV表达的代谢调节蛋白可以是融合蛋白的一部分。因此,本公开内容涵盖表达融合蛋白的OV,所述融合蛋白包含脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1,并且所述表达融合蛋白的OV可以用于所公开的用于治疗肿瘤/癌症的方法中。在一些实施方案中,由OV表达的融合蛋白可包括至少两个部分,代谢调节蛋白和其他蛋白。在一个具体示例中,融合蛋白的代谢调节蛋白可以是瘦素、趋化素、胰岛素和/或IGF-1。在一些示例中,其他蛋白可以是细胞因子蛋白,例如趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子、肿瘤坏死因子或包含其任何组合的融合蛋白。融合蛋白的代谢调节蛋白部分可以是天然的或突变的代谢调节蛋白(这样的蛋白与SEQ ID NO:2、4、6或8具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少99%或100%的序列同一性)。在一个示例中,其他蛋白是细胞因子蛋白,例如天然或突变的细胞因子,例如γ链细胞因子,例如属于以下的天然或突变蛋白:IL-2亚家族的细胞因子蛋白(例如天然的IL-2或Super IL-2(例如参见Levin等,Nature 484:529-33,2012),IL-1家族的细胞因子蛋白(例如IL-18),IFN亚家族的细胞因子蛋白,IL-17家族的细胞因子蛋白,TGF超家族的细胞因子蛋白(例如TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3)、IL-4、IL-10、IL-13、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21、TNFα、IFN-γ或其任何组合。在某些情况下,细胞因子蛋白可以是天然人蛋白。在一个具体示例中,融合蛋白的细胞因子蛋白部分可以是IL-2(例如GenBank®登录号AAB46883.1),Super IL-2(例如参见Levin等,Nature 484:529-33,2012)或IL-15(例如GenBank®登录号AAI00963.1或GenBank®登录号AAI00963.1的aa 10-127)。在具体示例中,融合蛋白可包括瘦素和IL-2,或瘦素和IL-15。在一些示例中,融合蛋白的代谢调节蛋白直接连接至细胞因子蛋白,例如在N端或C端。在一些示例中(例如溶瘤病毒,其包含可编码包含代谢调节蛋白和细胞因子的融合蛋白的核酸),编码代谢调节蛋白部分的核酸和编码另一部分(例如细胞因子)的核酸可通过使用编码接头的核酸间接地连接,所述接头为例如由至少5个、至少10个、至少15个或至少20个氨基酸,例如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸组成的肽接头。在一些示例中,接头可以是柔性的。在一个示例中,接头可以是聚丙氨酸。在一个示例中,接头可以是柔性接头,例如包括Gly和Ser残基的接头(例如GSG、GSGSGS或GGSGGGGSGG)。在具体的示例中,融合蛋白是瘦素-GSG-IL-2或瘦素-GSG-IL-15。

[0097] 2.示例性溶瘤病毒

[0098] 所公开的重组OV可以从任何OV产生。OV是病毒株,其可以感染并杀死恶性细胞(溶瘤作用),同时又保留其正常对应物。溶瘤可以是病毒的天然特性(天然存在的OV,例如呼肠孤病毒),也可以是病毒基因组操纵的结果(基因改造的OV,例如腺病毒)。

[0099] 在一个示例中,重组OV是DNA病毒,例如双链DNA(例如单纯疱疹病毒(HSV)(例如HSV-1)、痘苗病毒或腺病毒)或单链DNA病毒(例如细小病毒和鸡贫血病毒,例如H-1PV)。示例性的HSV OV包括T-VEC(例如用于治疗黑素瘤)、G207(例如用于治疗神经胶质瘤)、NV1020(例如用于治疗CRC)、HFA10(例如用于治疗乳腺癌、头颈癌和胰腺癌)。示例性痘苗OV包括

vvDD(TK突变株)、JX-594(TK突变/GM-CSF表达株)(例如用于治疗HCC、CRC)和GL-ONC1(TK突变/HA表达株)(例如治疗实体瘤)。在一个示例中,使用了包括胸苷激酶(TK)和生长因子基因(VGF)的基因缺失的痘苗病毒,例如西部保留地实验室菌株痘苗病毒(参见例如Zeh等,Mol.Ther 23:202-14,2015)。示例性腺病毒OV包括ONYX(E1B55突变体)、Ad5-D24、CFAd、DNX-2401、Ad5/3D24-GMCSF和CGTG-102、ColoAd1以及Ad5/d hTERT和CD40配体表达株(例如治疗神经胶质瘤和实体瘤)。

[0100] 在一个示例中,重组OV是RNA病毒,例如双链RNA(例如呼肠孤病毒)或单链RNA病毒(例如柯萨奇病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、水疱性口炎病毒、塞内卡谷地病毒或ECHO)。

[0101] 可以在本文提供的组合物和方法中使用的其他示例性OV包括在Fountzilas等(Oncotarget,8:102617-39,2017)、Jhawar等(Front.Oncol.,7:202,2017)和Guo等(Front.Oncol.,8:555,2017)中提供的那些(全部通过引用整体并入本文)。在一些示例中,重组OV可以是慢病毒、门戈病毒(mengovirus)或粘液瘤病毒(myxomavir)。

[0102] 重组溶瘤病毒的使用方法

[0103] 例如使用所公开的方法产生的本文提供的重组OV可以用于癌症免疫疗法,例如体内治疗肿瘤。在一些示例中,癌症可包括黑素瘤、肝细胞癌、乳腺癌、肺癌、腹膜癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、白血病、淋巴瘤、肾癌、胰腺癌、上皮癌、胃癌、结肠癌、十二指肠癌、胰腺腺癌、间皮瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、多发性骨髓瘤、前列腺癌、肝细胞癌、胆管肉瘤、胰腺腺癌、头颈鳞状细胞癌、结肠直肠癌、肠型胃腺癌、宫颈鳞状细胞癌、骨肉瘤、上皮性卵巢癌、急性淋巴细胞性淋巴瘤、骨髓增生性肿瘤或肉瘤。在一些示例中,癌细胞可以存在于选自以下的受试者的器官中:膀胱、血液、骨骼、骨髓、脑、乳腺、结肠、食道、胃肠道、牙龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈部、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫。在一些示例中,癌症可以是转移性的。

[0104] 实体瘤和液体瘤可以用公开的方法治疗。可以治疗的肿瘤的具体例子包括但不限于白血病、淋巴瘤、胰腺癌、结肠直肠癌、黑素瘤、宫颈癌、肺癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌、前列腺癌、HCC、RCC或头颈癌。在一个示例中,癌症是黑色素瘤。在一个示例中,癌症是乳腺癌。在一个示例中,癌症是腺癌。本文提供了其他示例。

[0105] 本文提供了在受试者(例如哺乳动物受试者,例如人类或兽医学受试者)中治疗肿瘤(例如癌症),增加T细胞向肿瘤(或肿瘤微环境)的浸润,增加在肿瘤或肿瘤微环境中T细胞的代谢活性,或其组合的方法。这样的方法可以包括向受试者(例如全身或肿瘤内)施用治疗有效量的一种或多种本文公开的重组OV,从而治疗肿瘤。例如,在被重组OV感染的肿瘤细胞中由OV表达代谢调节蛋白(例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种)可以杀死肿瘤细胞并增加肿瘤附近的T细胞活性。在一些示例中,代替使用重组OV,该方法可包括向受试者施用(例如全身或肿瘤内)治疗有效量的一种或多种代谢调节蛋白或编码该蛋白的核酸分子,从而治疗肿瘤。例如通过增加肿瘤附近的T细胞活性,在肿瘤细胞附近表达代谢调节蛋白(例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种)可具有抗肿瘤作用。

[0106] 在一些示例中,此类方法还包括施用治疗有效量的一种或多种其他抗癌剂,例如化学疗法(例如烷化剂、抗代谢物、激素或激素拮抗剂)、放射疗法、生物剂(例如单克隆抗体(例如单克隆抗体如特异性结合并拮抗PD-1或PD-L1的抗体,或T细胞激动剂如4-1BB、OX40或GITR的mAb激动剂)、手术或其组合。在一些示例中,在施用所公开的重组OV(或代谢调节

蛋白或编码该蛋白的核酸分子)之前、之后或之前和之后,还向受试者施用有效量的IL-2(例如10,000至100,000单位/kg体重)。

[0107] 例如,将有效量的所公开的重组OV(例如至少1×10^6pfu重组OV、至少2×10^6pfu重组OV、至少5×10^6pfu重组OV或至少1×10^7pfu重组OV)施用给受试者,从而治疗受试者中的肿瘤(例如原发性肿瘤和/或转移瘤)。在一些实施方案中,施用给受试者的有效量的本公开内容的重组OV可以包含约1×10^3至约1×10^{12}PFU重组OV,或约1×10^5至1×10^{10}PFU重组OV,或约1×10^5至1×10^8PFU重组OV,或约1×10^8至1×10^{10}PFU重组OV,约1×10^{11}PFU重组OV,1×10^{12}PFU重组OV,1×10^{13}PFU重组OV,1×10^{14}PFU重组OV或1×10^{15}PFU重组OV。

[0108] 在一些示例中,静脉内施用重组OV。在一些示例中,肿瘤内施用重组OV。在一些示例中,皮下施用重组OV。在一些示例中,通过诸如直肠、尿道内、阴道内、鼻内、鞘内或腹膜内的途径施用重组OV。

[0109] 在一些示例中,施用了所公开的重组OV的受试者先前未成功地用化学疗法、放射疗法、生物疗法或其组合治疗(例如受试者中的肿瘤的大小没有显著减小或者甚至增大和/或转移)。在一些示例中,受试者患有对PD-1拮抗剂或PD-L1拮抗剂无响应的肿瘤(例如受试者中的肿瘤的大小没有显著减小或者甚至增大和/或转移),例如特异性结合并拮抗PD-1或PD-L1的抗体,诸如阿特朱单抗(Atezolizumab)、MPDL3280A、BNS-936558(尼沃鲁单抗(Nivolumab))、兰洛利珠单抗(Pembrolizumab)、匹地利珠单抗(Pidilizumab)、CT011、AMP-224、AMP-514、MEDI-0680、BMS-936559、BMS935559、MEDI-4736、MPDL-3280A、MSB-0010718C、MGA-271、Indoximod、依帕克多司他(Epacadostat)、BMS-986016、MEDI-4736、MEDI-4737、MK-4166、BMS-663513、PF-05082566(PF-2566)、Lirlumab和Durvalumab。在一些示例中,受试者患有对T细胞激动剂(例如4-1BB、OX40或GITR的激动剂)无响应的肿瘤(例如受试者中的肿瘤的大小没有显著减小或者甚至增大和/或转移)(本文提供此类试剂的特定示例)。

[0110] 在一些示例中,该方法包括监测肿瘤微环境中的T细胞,例如确定细胞数量,确定或测量线粒体活性(例如氧化代谢)以及确定或测量TIL的线粒体质量。

[0111] 在一些示例中,该方法包括监测响应治疗的肿瘤生长。

[0112] 编码序列

[0113] 包含重组OV的载体可用于在肿瘤区域(或甚至在肿瘤细胞中)表达代谢调节蛋白,其中该载体包括编码一种或多种代谢调节蛋白(例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种,它们可能是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的核酸分子。可以使用的载体的例子包括质粒、病毒载体,例如OV。

[0114] 核酸分子包括编码肽的DNA、cDNA和RNA序列。编码序列中的沉默突变是由遗传密码的简并性(即冗余)产生的,由此一个以上的密码子可以编码相同的氨基酸残基。因此,例如,亮氨酸可以由CTT、CTC、CTA、CTG、TTA或TTG编码;丝氨酸可以由TCT、TCC、TCA、TCG、AGT或AGC编码;天冬酰胺可以由AAT或AAC编码;天冬氨酸可以由GAT或GAC编码;半胱氨酸可以由TGT或TGC编码;丙氨酸可以由GCT、GCC、GCA或GCG编码;谷氨酰胺可以由CAA或CAG编码;酪氨酸可以通过TAT或TAC编码;异亮氨酸可以通过ATT、ATC或ATA编码。

[0115] 特定物种的密码子偏好和密码子使用表可用于改造编码代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1;在一个示例中,瘦素、胰岛素、趋

化素和IGF-1中的一种或多种)的分离的核酸分子,其利用该特定物种的密码子使用偏好。例如,可以将由载体表达的代谢调节蛋白(例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种)设计成具有特定目的生物优先使用的密码子(例如在引入治疗的生物中)。

[0116] 编码代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种],其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的核酸可以通过体外方法进行克隆或扩增,例如聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、基于转录的扩增系统(TAS)、自持序列复制系统(3SR)和Qβ复制酶扩增系统(QB)。多种克隆和体外扩增方法是已知的。另外,可以通过克隆技术制备编码代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种],其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的核酸编码序列。合适的克隆和测序技术的示例以及说明可在以下中找到,Sambrook等(ed.),Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2nd ed.,vol.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring,Harbor,N.Y.,1989,和Ausubel等,(1987)in"Current Protocols in Molecular Biology,"John Wiley and Sons,New York,N.Y.。

[0117] 编码代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种],其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的核酸序列可以通过任何合适的方法来制备,包括例如克隆合适的序列或通过以下方法的直接化学合成,诸如Narang等,Meth.Enzymol.68:90-99,1979的磷酸三酯法;Brown等,Meth.Enzymol.68:109-151,1979的磷酸二酯法;Beaucage等,Tetra.Lett.22:1859-1862,1981的二乙基亚磷酰胺法;Beaucage&Caruthers,Tetra.Letts.22(20):1859-1862,1981描述的固相亚磷酰胺三酯法,例如使用如Needham-VanDevanter等Nucl.Acids Res.12:6159-6168,1984所述的自动合成仪;以及美国专利第4,458,066号的固体载体方法。化学合成产生单链寡核苷酸。可以通过与互补序列杂交或通过使用单链作为模板的DNA聚合酶聚合将其转化为双链DNA。虽然DNA的化学合成通常限于约100个碱基的序列,但可以通过连接较短的序列获得较长的序列。

[0118] 在一个示例中,通过将编码蛋白的cDNA插入载体中来制备代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种],其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)。可以进行插入,以便在框中读入蛋白,从而产生蛋白。制备含有编码该蛋白的异源核酸序列的重组载体(例如质粒或病毒)的技术是已知的。

[0119] 可以将用于代谢调节蛋白(例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种,其可以是融合蛋白的一部分,该融合蛋白还包含其他蛋白,例如细胞因子)的核酸编码序列插入表达载体,该表达载体包括但不限于质粒、病毒或其他可以被操纵以允许插入或掺入序列并可以(例如在肿瘤细胞中)被表达的载体。从载体表达编码序列的方法是已知的。表达载体可以包含其他元件,其对于细胞中表达载体的转移和随后复制是必需的,所述表达载

体含有代谢调节蛋白(例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种,它们可能是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)编码序列。此类元件的示例包括但不限于复制起点和选择标记,例如胸苷激酶基因或抗生素抗性标记。

[0120] 编码代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种],其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的核酸序列可以与表达控制序列可操作地连接。连接与代谢调节蛋白(例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种,其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)编码序列可操作连接的表达控制序列,使得在与表达控制序列相容的条件下实现代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种])编码序列的表达。示例性的表达控制序列包括但不限于合适的启动子、增强子、转录终止子,在代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种],其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)编码基因前面的起始密码子(即ATG)、内含子的剪接信号、维持该基因的正确阅读框以允许mRNA的正确翻译和终止密码子。可以使用的表达控制元件的示例包括但不限于lac系统,噬菌体λ的操纵子和启动子区域,以及衍生自多瘤、腺病毒、逆转录病毒或SV40的启动子。其他的操作元件包括但不限于前导序列、终止密码子、聚腺苷酸化信号和细胞中编码代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种],其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的核酸序列的适当转录和随后翻译所必需的任何其他序列。在一个示例中,启动子是7.5启动子。在一个示例中,使用IRES来驱动表达。在一些示例中,使用两个启动子。

[0121] 可以制备编码代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种],其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的病毒载体。可以使用的示例性病毒载体包括但不限于多瘤、SV40、腺病毒、痘苗病毒、腺相关病毒、疱疹病毒包括HSV和EBV、辛德比斯病毒(Sindbis viruses)、α病毒以及禽、鼠和人来源的逆转录病毒。也可以使用杆状病毒(加州卷柏多核多角体病毒(Autographa californica multinuclear polyhedrosis virus);AcMNPV)载体。其他合适的载体包括正痘载体、禽痘载体(avipox vectors)、鸡痘载体(fowlpox vectors)、羊痘载体、猪痘载体(suipox vectors)、慢病毒载体、α病毒载体和脊髓灰质炎病毒载体。具体的示例性载体是痘病毒载体,例如痘苗病毒、鸡痘病毒和高度减毒的痘苗病毒(MVA)、腺病毒、杆状病毒等。使用的痘病毒包括正痘病毒、猪痘病毒、禽痘病毒和羊痘病毒。正痘包括痘苗、鼠痘和浣熊痘。使用正痘的一个示例是痘苗。禽痘包括鸡痘、金丝雀痘和鸽子痘。羊痘包括山羊痘和绵羊痘。在一个示例中,猪痘(suipox)是猪痘(swinepox)。可以使用的其他病毒载体包括其他DNA病毒,例如疱疹病毒和腺病毒,以及RNA病毒,例如逆转录病

毒和脊髓灰质炎病毒。

[0122] 代谢调节蛋白的施用

[0123] 在一些示例中，代替使用重组OV来表达代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种]，其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)，将代谢调节蛋白或编码该蛋白的核酸分子施用于受试者。

[0124] 在一个示例中，载体用于在肿瘤区域中表达代谢调节蛋白，其中所述载体包括编码一种或多种代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种]，其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的核酸分子。可以使用的载体的例子包括质粒、病毒载体，例如慢病毒载体或逆转录病毒。在另一个示例中，施用编码代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种]，其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的裸核酸分子。

[0125] 可以将编码天然或变体的代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种]，其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的核酸分子掺入载体中。可以产生编码天然的或变体的代谢调节蛋白(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素、趋化素和IGF-1中的一种或多种]，其可以是包含细胞因子的融合蛋白的一部分)的核酸序列，例如与本文提供的GenBank®登录号中显示的序列(例如SEQ ID NO:1、3、5或7)具有至少90％、至少92％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的序列。另外，技术人员可以容易地构建各种包含功能上等同的核酸的克隆，例如序列不同但编码相同蛋白序列的核酸。在一些示例中，这样的序列被优化用于在宿主细胞中表达，所述宿主细胞例如是用于表达所需蛋白的宿主肿瘤。

[0126] 其他治疗剂

[0127] 用所公开的重组溶瘤病毒治疗的受试者可以接受一种或多种另外的疗法，例如有效量的化学疗法，有效量的放射疗法(例如向肿瘤部位施用放射性物质或能量(例如外射束疗法(external beam therapy))以帮助根除肿瘤或缩小肿瘤)，有效量的生物剂(例如治疗性单克隆抗体、配体或适体)和手术(例如手术切除癌症或其部分)中的一种或多种。因此，在一些示例中，提供了试剂盒，其包括一种或多种所公开的重组溶瘤病毒和一种或多种抗癌剂(例如化学治疗剂或生物剂)。

[0128] 在一个示例中，用一种或多种化学治疗剂进一步治疗受试者。化学治疗剂包括在治疗以异常细胞生长为特征的疾病如癌症中具有治疗作用的任何化学剂。本领域技术人员可以容易地确定使用的化学治疗剂(参见例如Slapak和Kufe,Principles of Cancer Therapy,Chapter 86in Harrison's Principles of Internal Medicine,14th edition;

Perry等,Chemotherapy,Ch.17in Abeloff,Clinical Oncology 2nd ed.,©2000Churchill Livingstone,Inc;Baltzer,L.,Berkery,R.(eds):Oncology Pocket Guide to Chemotherapy,2nd ed.St.Louis,Mosby-Year Book,1995;Fischer,D.S.,Knobf,M.F.,Durivage,H.J.(eds):The Cancer Chemotherapy Handbook,4th ed.St.Louis,Mosby-Year Book,1993;Chabner和Longo,Cancer Chemotherapy and Biotherapy:Principles and Practice(4th ed.).Philadelphia:Lippincott Willians&Wilkins,2005;Skeel,Handbook of Cancer Chemotherapy(6th ed.).Lippincott Williams&Wilkins,2003)。联合化疗是施用一种以上药物以治疗癌症。

[0129] 可以使用的化学治疗剂的示例包括烷基化剂、抗代谢物、天然产物或激素及其拮抗剂。烷基化剂的示例包括氮芥(例如二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、环磷酰胺、美法仑、尿嘧啶芥或苯丁酸氮芥)、烷基磺酸盐(例如白消安)、亚硝基脲(例如卡莫斯汀、洛莫司汀、苏木汀、链脲菌素或达卡巴嗪)。烷基化剂的具体非限制性示例是替莫唑胺和达卡巴嗪。抗代谢物的示例包括叶酸类似物(例如甲氨蝶呤)、嘧啶类似物(例如5-FU或阿糖胞苷)和嘌呤类似物,例如巯基嘌呤或硫代鸟嘌呤。天然产物的示例包括长春花碱生物碱(如长春碱、长春新碱或长春地碱)、表鬼臼毒素(如依托泊苷或替尼泊苷)、抗生素(如放线菌素、柔红霉素、阿霉素、博来霉素、普卡霉素或丝裂霉素C)和酶(例如L-天冬酰胺酶)。混杂剂(miscellaneous agent)的例子包括铂配位络合物(例如顺式二胺-二氯铂II,也称为顺铂)、取代的尿素(例如羟基脲)、甲基肼衍生物(例如丙卡巴肼(procarbazine))和肾上腺皮质激素抑制剂(例如米托坦和氨基谷氨酰胺)。激素和拮抗剂的示例包括肾上腺皮质类固醇(如泼尼松)、孕激素(如己酸羟孕酮、醋酸甲羟孕酮和乙酸孕甾酮)、雌激素(如己二烯雌酚和炔雌醇)、抗雌激素(如他莫昔芬)和雄激素(例如丙酸睾丸酮和氟甲睾酮)。

[0130] 可以与所公开的表达一种或多种代谢调节蛋白的OV组合使用的常用化疗药物的例子包括阿霉素、美法仑(Alkeran)、Ara-C、BiCNU、白消安、CCNU、卡铂、顺铂、细环磷酰胺(Cytoxan)、柔红霉素、DTIC、5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟达拉滨、Hydrea,依达比星、异环磷酰胺、甲氨蝶呤、光辉霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、氮芥末、紫杉醇(或其他紫杉烷类化合物,例如多西紫杉醇)、长春花碱、长春新碱、VP-16,而其他一些较新的药物包括吉西他滨(Gemzar)、赫赛汀、伊立替康(Camptosar,CPT-11)、克拉屈滨、诺维苯(Navelbine)、利妥昔单抗STI-571、泰素帝、拓扑替康(美新)、希罗达(卡培他滨)、泽文林(Zevelin)和骨化三醇。可以使用的免疫调节剂的非限制性示例包括AS-101(Wyeth-Ayerst Labs.)、溴嘧啶(Upjohn)、γ干扰素(Genentech)、GM-CSF(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子;Genetics Institute)、IL-2(Cetus或Hoffman-LaRoche)、人类免疫球蛋白(Cutter Biological)、IMREG(来自Imreg of New Orleans,La.)、SK&F 106528和TNF(肿瘤坏死因子;Genentech)。

[0131] 可以与所公开的表达一种或多种代谢调节蛋白的OV组合使用的其他治疗剂包括微管结合剂、DNA嵌入剂或交联剂、DNA合成抑制剂、DNA和/或RNA转录抑制剂、抗体、酶、酶抑制剂、基因调节剂、血管生成抑制剂。这些试剂(以治疗有效量施用)和治疗可单独或组合使用。此类试剂的方法和治疗剂量是已知的,并且可以由熟练的临床医生确定。

[0132] 微管结合剂是指与微管蛋白相互作用以稳定或破坏微管形成从而抑制细胞分裂的试剂。可以与所公开的疗法结合使用的微管结合剂的示例包括但不限于紫杉醇、多西他赛、长春碱、长春地辛、长春瑞滨(navelbine)、埃博霉素、秋水仙碱、多拉司汀15、诺考达唑、

鬼臼毒素和根瘤菌素。也可以使用此类化合物的类似物和衍生物。例如，合适的埃坡霉素和埃坡霉素类似物描述于在国际公开号WO 2004/018478中。可以使用紫杉醇，例如紫杉醇和多西紫杉醇，以及美国专利号6,610,860;5,530,020和5,912,264教导的紫杉醇类似物。

[0133] 合适的DNA和/或RNA转录调节剂，包括但不限于放线菌素D、柔红霉素、阿霉素及其衍生物和类似物，也适合与所公开的疗法组合使用。可以施用于受试者的DNA嵌入剂和交联剂包括但不限于顺铂、卡铂、奥沙利铂、丝裂霉素例如丝裂霉素C、博来霉素、苯丁酸氮芥、环磷酰胺及其衍生物和类似物。适合用作治疗剂的DNA合成抑制剂包括但不限于甲氨蝶呤、5-氟-5'-脱氧尿苷、5-氟尿嘧啶(5-FU)及其类似物。合适的酶抑制剂的示例包括但不限于喜树碱、依托泊苷、福尔马坦、曲古抑素(trichostatin)及其衍生物和类似物。影响基因调控的合适化合物包括导致一种或多种基因表达增加或减少的试剂，例如雷洛昔芬、5-氮杂胞苷、5-氮杂-2'-脱氧胞苷、他莫昔芬、4-羟基他莫昔芬、米非司酮及其衍生物和类似物。

[0134] 所公开的方法可以进一步包括向受试者施用治疗有效量的免疫疗法。可以使用的免疫调节剂的非限制性示例包括AS-101(Wyeth-Ayerst Labs.)、溴嘧啶(Upjohn)、γ干扰素(Genentech)、GM-CSF(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子;Genetics Institute)、IL-2(Cetus或Hoffman-LaRoche)、人类免疫球蛋白(Cutter Biological)、IMREG(来自Imreg of New Orleans,La.)、SK&F 106528和TNF(肿瘤坏死因子;Genentech)。免疫治疗剂可以是PD-1拮抗剂或PD-L1拮抗剂，例如特异性结合PD-1或PD-L1的抗体(例如单克隆抗体)，例如阿特朱单抗(Atezolizumab)、MPDL3280A、BNS-936558(尼沃鲁单抗(Nivolumab))、兰洛利珠单抗(Pembrolizumab)、匹地利珠单抗(Pidilizumab)、Durvalumab、CT011、AMP-224、AMP-514、MEDI-0680、BMS-936559、BMS935559、MEDI-4736、MPDL-3280A、MSB-0010718C。免疫治疗剂也可以是CTLA-4、LAG-3或B7-H3拮抗剂，例如Tremelimumab、BMS-986016和MGA271。

[0135] 在一些示例中，所施用的其他治疗剂是T细胞激动剂，例如4-1BB(CD137)、OX40和/或GITR的激动剂。OX40是I型跨膜糖蛋白。人OX40序列包括191aa的细胞外N端部分和36aa的细胞内区域。OX40L是II型跨膜糖蛋白。在一个示例中，OX40激动剂是抗OX40抗体，例如单克隆抗体(mAb)(例如PF-04518600、MEDI-6469、MEDI-0562、MEDI-6383、MOXR-0916、BMS 986178或GSK3174998)。模拟天然OX40配体(OX40L)，抗OX40单克隆抗体选择性结合并激活OX40受体。在一个示例中，OX40激动剂是OX40配体OX40L，例如天然配体(例如人OX40L)。在一个示例中，OX40激动剂是OX40适体。4-1BB(CD137/TNFSF9)属于TNF受体家族，其包括多个T细胞共刺激受体。它在包括CD8和CD4T细胞在内的T细胞中发现。4-1BB在T细胞和抗原呈递细胞上的表达，以及其促进活化T细胞存活、扩增和增强效应子功能的能力，使其成为肿瘤免疫疗法的靶标。在一个示例中，4-1BB激动剂是4-1BB激动剂抗体，例如mAb。可以与所公开的方法一起使用的特定激动剂mAb包括PF-05082566(utomilumab)和BMS-663513(Urelumab)。在一个示例中，4-1BB激动剂是4-1BB配体(4-1BBL)，例如天然的4-1BBL(例如人4-1IBBL)或链霉亲和素的4-1BBL(SA-4-1BBL)复合物。在一个示例中，4-1BB激动剂是4-1BB适体。GITR(糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子(TNF)受体，或TNFRSF18)是一种I型跨膜蛋白，与其他TNF受体家族成员(例如OX40、CD27和4-1BB)具有同源性。GITR通常在静息的CD4+foxp3-和CD8+T细胞上低水平表达，但在CD4+CD25+foxp3+调节性T细胞(Tregs)上以高水平组成型表达。它的配体GITRL(TNFSF18)也是TNF超家族的成员，主要由包括DC、巨噬细胞和活化B细胞在内的活化抗原呈递细胞(APC)表达。在一个示例中，GITR激动剂是GITR激动剂

抗体，例如mAb。可以与所公开的方法一起使用的特定GITR激动剂mAb包括DTA-1、TRX518、MK-4166、MK-1248、AMG 228、INCAGN01876、GWN323(来自Novartis)、CK-302(来自Checkpoint Therapeutics)和BMS-986156。在一个示例中，GITR激动剂是GITR配体(GITRL)，例如天然GITLL或多价GITR配体融合蛋白。在一个示例中，GITR激动剂是MEDI1873，其为具有人IgG1 Fc结构域的六聚体GITLL分子。在一个示例中，GITR激动剂是GITR适体。

[0136] 抗血管生成剂的非限制性示例包括分子，例如蛋白、酶、多糖、寡核苷酸、DNA、RNA和重组载体，以及起到减少或甚至抑制血管生长的作用的小分子。可以与所公开的方法一起使用的合适的血管生成抑制剂的示例包括但不限于血管抑素K1-3、星形孢菌素、染料木黄酮、富马霉素、甲羟孕酮、苏拉明、干扰素-α、金属蛋白酶抑制剂、血小板因子4、生长抑素、血小板反应蛋白、内皮抑素、沙利度胺及其衍生物和类似物。例如，在一些实施方案中，抗血管生成剂是与VEGF(例如阿瓦斯汀(Avastin)，Roche)或VEGF受体(例如VEGFR2抗体)特异性结合的抗体。在一个示例中，抗血管生成剂包括VEGFR2抗体或DMXAA(也称为Vadimezan或ASA404;可商购获得，例如可从Sigma Corp.,St.Louis,MO购得)，或二者。抗血管生成剂可以是贝伐单抗、舒尼替尼、抗血管生成酪氨酸激酶抑制剂(TKI)，例如舒尼替尼、西替尼和达沙替尼。这些可以单独使用或组合使用。

[0137] 可以与所公开的方法一起使用的示例性激酶抑制剂包括格列伐克(Gleevac)、易瑞沙(Iressa)和特罗凯(Tarceva)、舒尼替尼、索拉非尼、阿尼替尼和达沙替尼，其可防止磷酸化和激活生长因子。可以使用的抗体包括阻断生长因子和血管生成途径的赫赛汀和阿瓦斯汀。这些可以单独使用或组合使用。

[0138] 在一些示例中，所施用的其他治疗剂是生物剂，例如单克隆抗体，例如3F8、阿巴伏单抗(Abagovomab)、阿德木单抗(Adecatumumab)、阿夫土珠(Afutuzumab)、阿珠单抗(Alacizumab)、阿仑单抗(Alemtuzumab)、喷替酸阿妥莫单抗(Altumomab pentetate)、麻安莫单抗(Anatumomab mafenatox)、阿泊珠单抗(Apolizumab)、阿西莫单抗(Arcitumomab)、巴维昔单抗(Bavituximab)、贝妥莫单抗(Bectumomab)、贝利木单抗(Belimumab)、贝索单抗(Besilesomab)、贝伐单抗(Bevacizumab)、Bivatuzumab mertansine、博纳吐单抗(Blinatumomab)、本妥昔单抗(Brentuximab vedotin)、莫坎妥珠单抗(Cantuzumab mertansine)、卡罗单抗喷地肽(Capromab pendetide)、卡妥索(Catumaxomab)、CC49、西妥昔单抗(Cetuximab)、柏托-西他妥珠单抗(Citatuzumab bogatox)、西妥木单抗(Cixutumumab)、泰坦-克利妥珠单抗(Clivatuzumab tetraxetan)、西他土珠(Conatumumab)、达西珠单抗(Dacetuzumab)、地莫单抗(Detumomab)、Ecromeximab、依库丽单抗(Eculizumab)、依决洛单抗(Edrecolomab)、依帕珠单抗(Epratuzumab)、Ertumaxomab、伊瑞西珠(Etaracizumab)、法乐妥珠单抗(Farletuzumab)、菲吉妥木单抗(Figitumumab)、加利昔单抗(Galiximab)、奥-吉妥珠单抗(Gemtuzumab ozogamicin)、吉仑妥昔单抗(Girentuximab)、Glembatumumab vedotin、替坦-艾瑞妥莫单抗(Ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗(Igovomab)、英西单抗(Imciromab)、英特妥木单抗(Intetumumab)、奥英妥珠单抗(Inotuzumab ozogamicin)、易普利姆玛(Ipilimumab)、艾雷妥木单抗(Iratumumab)、Labetuzumab、来沙木单抗(Lexatumumab)、林妥珠单抗(Lintuzumab)、莫星-洛沃妥珠单抗(Lorvotuzumab mertansine)、鲁卡妥木单抗(Lucatumumab)、鲁昔单抗(Lumiliximab)、马

帕木单抗(Mapatumumab)、马妥珠单抗(Matuzumab)、美泊利单抗(Mepolizumab)、美替木单抗(Metelimumab)、米妥珠单抗(Milatuzumab)、米妥莫单抗(Mitumomab)、莫洛利木单抗(Morolimumab)、他那可单抗(Nacolomab tafenatox)、埃托-那普妥莫单抗(Naptumomab estafenatox)、奈昔单抗(Necitumumab)、尼妥珠单抗(Nimotuzumab)、Nofetumomab merpentan、奥法木单抗(Ofatumumab)、奥拉妥单抗(Olaratumab)、蒙托-奥珀妥珠单抗(Oportuzumab monatox)、奥戈伐单抗(Oregovomab)、帕尼单抗(Panitumumab)、Pemtumomab、帕托珠单抗(Pertuzumab)、Pintumomab、普妥木单抗(Pritumumab)、雷莫芦单抗(Ramucirumab)、雷洛托单抗(Rilotumumab)、利妥昔单抗(Rituximab)、罗巴珠单抗(Robatumumab)、Satumomab pendetide、西罗珠单抗(Sibrotuzumab)、松帕西珠单抗(Sonepcizumab)、泰坦-他卡妥珠单抗(Tacatuzumab tetraxetan)、帕托-他利妥莫单抗(Taplitumomab paptox)、特那妥莫单抗(Tenatumomab)、TGN1412、Ticilimumab(tremelimumab)、替加珠单抗(Tigatuzumab)、TNX-650、曲妥单抗(Trastuzumab)、Tremelimumab、土库珠单抗西莫白介素(Tucotuzumabcelmoleukin)、维妥珠单抗(Veltuzumab)、伏洛昔单抗(Volociximab)、伏妥莫单抗(Votumumab)、扎鲁木单抗(Zalutumumab)或其组合。在一些示例中,治疗性抗体对PD-1或PDL-1具有特异性。

[0139] 在一些示例中,还向受试者施用有效量的非清髓性化学疗法或放射疗法。例如,受试者可以接受有效量的非清髓性化学治疗剂,例如施用顺铂、氟达拉滨、伊达比星、美法仑、ara-C、2-氯脱氧腺苷、抗胸腺细胞球蛋白和环磷酰胺中的一种或多种(例如10至50mg/kg体重)。在一些示例中,受试者接受有效量的实体瘤照射、胸腺照射或全身照射(例如2Gy)或其组合。

[0140] 在一些示例中,在施用重组溶瘤病毒之后,向受试者施用有效量的他克莫司、环孢霉素和/或甲氨蝶呤中的一种或多种。

[0141] 在一些示例中,重组OV和一种或多种其他疗法可以是,例如但不限于,同时对所治疗的受试者施用,或者同时或以任何顺序或在不同的时间点依次施用。

[0142] 可以在各种示例中以液体剂型、固体剂型、栓剂、可吸入剂型、鼻内剂型、脂质体制剂、包含纳米颗粒的剂型、包含微粒的剂型、聚合物剂型或其任何组合施用其他疗法。在某些情况下,可以经约1周至约2周,约2周至约3周,约3周至约4周,约4周至约5周,约6周至约7周,约7周至约8周,约8周至约9周,约9周至约10周,约10周至约11周,约11周至约12周,约12周至约24周,约24周至约48周,约48周或约52周或更长时间施用其他疗法。在某些情况下,其他疗法的施用频率可以是每天一次、每天两次、每周一次、每三周一次、每四周一次(或每月一次)、每8周一次(或每两个月一次)、每12周一次(或每三个月一次)或每24周(每6个月一次)。在某些情况下,治疗患有癌症的受试者的方法可以包括向受试者施用有效量的本公开的重组OV,例如重组痘苗病毒,其包含可以编码一种或多种代谢调节蛋白的一种或多种核酸。

[0143] 临床应答

[0144] 此类方法可通过减少肿瘤的体积或重量,减少转移瘤的数量,减少转移瘤的大小或重量,或其组合来治疗受试者的肿瘤。在一些示例中,转移瘤是皮肤或皮下的。因此,在一些示例中,例如与不施用所公开的重组溶瘤病毒或施用不包含代谢调节蛋白编码序列(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网

膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素趋化素和IGF-1中的一种或多种])的重组溶瘤病毒相比，施用所公开的重组溶瘤病毒(单独或与其他抗癌治疗剂联合使用)可通过将肿瘤的大小或体积减小至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少98％或至少99％来治疗受试者的肿瘤。在一些示例中，例如与不施用所公开的重组溶瘤病毒或施用不包含代谢调节蛋白编码序列(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素趋化素和IGF-1中的一种或多种])的重组溶瘤病毒相比，施用所公开的重组溶瘤病毒通过使肿瘤的重量减少至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少98％或至少99％来治疗受试者的肿瘤。在一些示例中，例如与不施用所公开的重组溶瘤病毒或施用不包含代谢调节蛋白编码序列(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素趋化素和IGF-1中的一种或多种])的重组溶瘤病毒相比，施用所公开的重组溶瘤病毒可通过使转移瘤的大小或体积减少至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少98％或至少99％来治疗受试者的肿瘤。在一些示例中，例如与不施用所公开的重组溶瘤病毒或施用不包含代谢调节蛋白编码序列(例如脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)、胰岛素和/或IGF-1[例如瘦素、胰岛素趋化素和IGF-1中的一种或多种])的重组溶瘤病毒相比，施用所公开的重组溶瘤病毒可通过使转移瘤的数量减少至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少98％或至少99％来治疗受试者的肿瘤。在一些示例中，实现了这些效果的组合。

[0145] 组合物和试剂盒

[0146] 还提供了可以与所公开的方法一起使用的组合物和试剂盒。在一些示例中，组合物或试剂盒包括一种或多种所公开的表达代谢调节蛋白的重组溶瘤病毒，和例如药学上可接受的载体。在一个示例中，OV表达脂肪因子(例如瘦素、趋化素、脂联素、阿珀林、IL-6、MCP-1、PAI-1、RBP4、TNFα、内脂素、网膜素、vaspin、颗粒蛋白前体和/或CTRP-4)。在一个示例中，OV表达胰岛素和/或IGF-1。在一个示例中，OV表达瘦素。脂肪因子、胰岛素和/或IGF-1可以是融合蛋白的一部分，该融合蛋白还包括第二种蛋白，例如γ链细胞因子(例如L-2或IL-15)。在一些示例中，第二蛋白可以是细胞因子蛋白，例如趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子、肿瘤坏死因子或包含其任何组合的融合蛋白。上面提供了其他示例。

[0147] 在一个示例中，OV表达瘦素、胰岛素、趋化素或IGF-1(其可以是融合蛋白的一部分，所述融合蛋白还包括γ链细胞因子，例如IL-2或IL-15)。在一个具体的示例中，OV是talimogene laherparepvec(T-VEC)。在一个具体的示例中，OV是西部保留地株痘苗病毒。在一个具体的示例中，OV是痘苗病毒，并且一种或多种代谢调节蛋白是瘦素。在一个具体的示例中，OV是西部保留地株痘苗病毒，并且一种或多种代谢调节蛋白是瘦素。在一个具体的示例中，OV是西部保留地株痘苗病毒，并且一种或多种代谢调节蛋白是瘦素-IL-2或瘦素-IL-15融合蛋白(其中瘦素和细胞因子可以通过接头连接)。

[0148] 试剂盒可以包括其他试剂，例如一种或多种抗癌试剂，例如化学治疗剂、生物剂或其组合。在一些示例中，在试剂盒中，OV和抗癌试剂存在于分开的容器中。

[0149] 在一个示例中，该试剂盒还包括生物剂，例如PD-1拮抗剂;PD-L1拮抗剂;CTLA4拮抗剂;T细胞激动剂;或其组合。在一个示例中，PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、CTLA4拮抗剂和T细胞激动剂是mAb。示例性的T细胞激动剂包括4-1BB的激动剂、OX40的激动剂和GITR的激动剂，例如mAb、适体或这些受体的配体。试剂盒中可包含的4-1BB激动剂包括mAb，例如PF-05082566(utomilumab)或BMS-663513(Urelumab)或配体(例如4-1BBL或SA-4-1BBL)。试剂盒中可包括的OX40的示例性激动剂包括mAb(例如PF-04518600、MEDI6469、MEDI0562、MEDI6383、MOXR0916、BMS 986178或GSK3174998)或配体(例如OX40L)。试剂盒中可包含的激动剂GITR的示例性激动剂包括GITR激动剂mAb，例如DTA-1、TRX518、MK-4166、MK-1248、AMG 228、INCAGN01876、GWN323(来自Novartis)、CK-302(来自Checkpoint Therapeutics)或BMS-986156。试剂盒中可包含的GITR激动剂包括GITR配体(GITRL)，例如天然GITRL或多价GITR配体融合蛋白，例如MEDI1873。

[0150] 还提供了包括本文公开的组合物例如本文提供的OV的容器。在一些实施例中，容器是注射器。在一些示例中，注射器包括针头。注射器中的柱塞可以具有阻挡器，以防止在抽吸过程中意外将其取出。一次性注射器通常包含单剂疫苗。注射器可具有尖端盖，以在附接针头之前密封尖端。在非限制性示例中，尖端盖由橡胶制成，例如丁基橡胶。

[0151] 在其他实施例中，容器是小瓶。在一些示例中，小瓶由玻璃制成，例如无色玻璃，例如硼硅酸盐。在其他示例中，小瓶由塑料制成。小瓶可包括塞子例如橡胶塞，或盖例如适于使注射器能够插入的盖。在一些示例中，小瓶包括单剂量的组合物。在其他示例中，小瓶包括多剂量的组合物，例如2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多剂量的组合物。通常，在添加组合物之前将小瓶灭菌。

[0152] 还提供了包括本文公开的容器的试剂盒。在一些实施方案中，试剂盒包括小瓶(例如包含组合物的小瓶)、注射器(例如空注射器或包含组合物的注射器)、针头或其任意组合。所述组合物可以在悬浮液中，例如在PBS或其他药学上可接受的载体中。或者，组合物可以是干燥或粉末形式，例如冻干或冷冻干燥，然后可以由最终用户(例如用PBS或其他药学上可接受的载体)重构。在一些示例中，容器可以包括药学上可接受的载体例如PBS，或者药学上可接受的载体例如PBS可以在单独的容器中(例如如果组合物被冷冻干燥或冻干)。在一些示例中，试剂盒中的容器还包括一种或多种稳定剂。在一些示例中，试剂盒还包括允许将组合物施用于受试者的装置。这种装置的例子包括注射器。试剂盒可与包括组合物细节的说明书包装在一起(例如在同一盒子中)，所述组合物细节例如施用说明和/或组合物内OV的细节。

[0153] 实施例1

[0154] 材料和方法

[0155] 该实施例描述了用于产生以下实施例中描述的结果的材料和方法。

[0156] 小鼠

[0157] C57/BL6小鼠和$Pten^{f/f}Braf^{V600E}Tyr^{Cre.ER}$小鼠获自Jackson Laboratories，并在室内繁殖。

[0158] 肿瘤系

[0159] 使用源自由涂有他莫昔芬的$Pten^{f/f}Braf^{V600E}Tyr^{Cre.ER}$形成的黑色素瘤肿瘤的单细胞克隆进行肿瘤实验(克隆24)。瘦素的cDNA获自OriGene,并转染到克隆24中,然后进行潮霉素选择(空载体质粒用作对照)。选择单细胞克隆并将其生长为用于对照质粒的细胞系$CL24^{潮霉素}$和用于表达瘦素的细胞系$CL24^{瘦素}$。

[0160] 肿瘤模型

[0161] 在第0天向C57BL/6J小鼠注射$CL24^{潮霉素}$或$CL24^{瘦素}$黑色素瘤细胞系(皮内250,000个细胞),然后直至肿瘤在任何方向上达到15毫米。每隔一天用数字卡尺测量肿瘤,并通过LxW计算肿瘤大小。当肿瘤达到约20mm^2时,在肿瘤内用PBS、$VV^{对照}$或$VV^{瘦素}$(2.5×10^6PFU)治疗肿瘤,并监测肿瘤生长直至用PBS治疗的肿瘤在任何方向上达到15mm。对于CD8耗竭实验,从第0天开始每隔一天以每只小鼠200μg的剂量注射抗CD8(YTS)。在第7天,给小鼠注射$CL24^{潮霉素}$或$CL24^{瘦素}$黑素瘤细胞系(皮内250,000个细胞),然后跟踪直至肿瘤在任何方向上达到15mm。

[0162] 溶瘤病毒的产生

[0163] 野生型痘苗病毒西部保留地(WR)菌株获自美国典型培养物保藏中心(BEI资源)。WR.TK-.Luc+先前已有描述(Kirn等,PLoS Med 2007;4(12):e353),并为此工作进行了构建,克隆了pSC65质粒(来自Bernie Moss教授,NIH)以从病毒pSE/L启动子表达萤火虫荧光素酶,并从p7.5启动子表达小鼠瘦素(Lep)。将其重组到病毒TK基因中。通过使用吉布森克隆(New England BioLabs)将瘦素基因克隆到痘苗质粒中来产生表达瘦素的痘苗病毒。从小鼠瘦素ORF哺乳动物表达质粒(Sino Biological Inc.)克隆瘦素基因。

[0164] 来自淋巴结和肿瘤的T细胞分离物

[0165] 从野生型小鼠分离脾脏和淋巴结$CD8^+$T细胞。收获组织,进行机械破坏,并与生物素化的抗体混合物一起温育,该混合物由针对B220、CD11b、CD11c、CD16/32、CD19、CD25、CD105、NK1.1、TCRγδ和CD4的抗体(BioLegend)组成。洗涤步骤后,将细胞与链霉亲和素包被的磁性纳米颗粒(BioLegend)温育。洗涤后,通过施加磁场并去除未接触的细胞来分离$CD8^+$细胞。

[0166] 为了获得肿瘤浸润淋巴细胞的单细胞悬液,处死患荷瘤小鼠并获取肿瘤。使用装有含10%FBS的RPMI缓冲液中的2mg/mL VI型胶原酶、2U/mL透明质酸酶(Dispase)和10U/mLDNAse I(Sigma)的20G针反复注射切下的整个肿瘤,并在37℃温育30分钟。然后将肿瘤在磨砂载玻片之间机械破坏,过滤以除去颗粒,然后涡旋2分钟。在许多实验中(尤其是在分选之前),使用CD105-生物素介导的磁耗竭来清除肿瘤匀浆中的肿瘤细胞。

[0167] 代谢分析

[0168] 如先前所述(Scharping等,Cancer Immunol.Res.2017;5:9-16),通过Seahorse技术测量T细胞代谢输出。简而言之,将100,000个T细胞接种到含有25mM葡萄糖、2mM谷氨酰胺和1mM丙酮酸钠的基本非缓冲测定培养基中的Cell-Tak包被的XFe96板上。细胞接受顺序注射2μM寡霉素、2μM FCCP,10mM 2-脱氧葡萄糖和0.5μM鱼藤酮/抗霉素A。

[0169] 通过流式细胞术测定单细胞代谢能力。具体而言,使用2-NBD-葡萄糖(CaymanChemical)和MitoTracker FM染料(ThermoFisher)来测定细胞摄取葡萄糖或通过线粒体产生中间体的倾向。将不引流和引流的淋巴结或肿瘤制剂在含5%FBS的培养基中用20μM 2-NBDG脉冲处理,在37℃下进行30分钟。将细胞表面染色并用MitoTracker FM染料上样以测量线粒体质量和功能。

[0170] 免疫印迹

[0171] 如先前所述进行免疫印迹(Delgoffe等,Mol.Immunol.2009;46(13):2694-8)。瘦素抗体获自小鼠瘦素/OB抗体(R&D系统BAF498)。

[0172] ELISA

[0173] ELISA板用50μL捕获抗体(在PBS中为1:1000)包被,并在4℃放置过夜。第二天,将板用洗涤缓冲液(1L PBS+0.05%Tween 20)洗涤3次。在室温下将板用200μL封闭缓冲液(200mL PBS+1%BSA)封闭1小时。在封闭缓冲液中将样品(50μl)与标准曲线样品一起添加到孔中。将板在室温温育2小时。加入第二抗体(在封闭缓冲液中为1:2000),并在室温下温育1小时。1小时后,加入HRP链霉亲和素(在封闭缓冲液中为1:2000),并在室温下温育30分钟。加入40μL TMB底物A和40μL TMB底物B以使样品显影。在酶标仪中于450nm下读板。瘦素Elisa实验所用的抗体:捕获小鼠瘦素/OB抗体(R&D系统AF498)和检测抗体小鼠瘦素/OB抗体(R&D系统BAF498)。

[0174] TCR测序

[0175] 切除不同处理的CL24肿瘤并进行基因组DNA提取(DNeasy QIAGEN试剂盒)。然后在免疫SEQ测定(Adaptive Biotechnologies)之后进行TCR测序(Robins等,Blood 2009;114(19):4099-107)。

[0176] 单细胞RNA测序分析

[0177] 用PBS、$VV^{对照}$或$VV^{瘦素}$(2.5×10^{6}PFU)瘤内治疗CL24肿瘤7天。分离肿瘤浸润淋巴细胞,并分选$CD45^{+}$淋巴细胞。将$CD45^{+}$细胞上样到Chromium仪器(10X Genomics,Pleasanton,CA)中,然后将所得的带条形码的cDNA用于构建文库。然后将每个样品的文库进行RNA测序。使用Seurat(Satija等,Nat Biotechnol 2015;33(5):495-502)生成并分析细胞基因独特的分子标识符计数矩阵,并使用Cluster 3.0(de Hoon等,Bioinformatics 2004;20(9):1453-4)进行分层聚类。

[0178] 实施例2

[0179] 溶瘤痘苗病毒处理肿瘤重塑肿瘤免疫微环境

[0180] 尽管诸如T-vec之类的溶瘤病毒为经FDA批准的用于癌症治疗的免疫疗法(例如参见Andtbacka等,J Clin Oncol 2015;33(25):2780-8),但这些药物的免疫后果尚不清楚。系统分析了溶瘤病毒感染诱导的免疫浸润。溶瘤病毒疗法的一个主要局限性在于,包括T-VEC在内的许多病毒)在缺氧状态下均无法有效复制(Friedman等,Transl Oncol 2012;5(3):200-7;Pipiya等,Gene Ther 2005;12(11):911-7)。因此,使用了易于工程改造,编码其自身聚合酶并在低氧肿瘤细胞中维持复制功能的溶瘤痘苗病毒。使用了西部保留地实验室株痘苗病毒。该病毒具有胸腺嘧啶激酶和痘苗生长因子基因的遗传缺失,从而产生有效的溶瘤病毒剂(Buller等,Nature 1985;317(6040):813-5;Whitman等,Surgery 1994;116(2):183-8;Puhlmann等,Cancer Gene Ther 2000;7(1):66-73)。使用从他莫昔芬施用后发展成黑色素瘤的$Pten^{f/f}Braf^{LSL.V600E}Tyr2^{Cre.ER}$小鼠的单细胞产生的称为克隆24(CL24)的黑色素瘤细胞系(Dankort等,Nat Genet 2009;41(5):544-52)(图1A)。该细胞系与C57/BL6小鼠同源,携带人类黑素瘤中常见的驱动突变(与常用的B16相反)。另外,该CL24细胞系渗透性差(图1B),并且对于抗PD1单一疗法完全不敏感(图1C)。

[0181] 当肿瘤达到4mm大小时,瘤内注射痘苗病毒,这导致肿瘤实质性消退,但是没有完

全响应(图2A)。为了确定溶瘤病毒诱导的肿瘤浸润的特征,通过10X Genomics分析测定了PBS或经痘苗病毒感染的克隆24肿瘤的$CD45^+$肿瘤浸润白细胞的单细胞RNA测序。使用无监督的聚类数据分析将$CD45^+$细胞分为不同的免疫群的组(图2B)。然后根据每个群的已知标记物的表达对这些免疫群进行分类(图3A-3C)。重要的是,这些分析是在肿瘤尚未消退时进行的。当汇总分析时,该数据鉴定了已知的免疫细胞群,但是基于治疗组的亚组显示痘苗病毒溶瘤免疫疗法诱导了肿瘤免疫微环境的显著变化(图2C)。痘苗病毒感染的肿瘤表现出大量流入的新效应子和效应子,例如$CD8^+$T细胞、M1巨噬细胞,以及功能障碍或抑制性细胞的丧失,例如MDSC、M2巨噬细胞,枯竭T细胞和调节性T细胞(图2C)。因此,溶瘤痘苗病毒诱导了肿瘤免疫微环境的显著重塑,但是其最终却屈服于肿瘤诱导的免疫抑制和最终的生长(图2A)。

[0182] 实施例3

[0183] 溶瘤痘苗病毒促进严重的代谢缺乏的T细胞浸润

[0184] 来自溶瘤病毒治疗的小鼠的TIL的流式细胞术分析证实,新免疫细胞的流入似乎由$CD8^+$T细胞控制,而我们观察到T调节性T细胞的减少(图4A)。对这些细胞的共抑制性标志物表达的分析显示了仅表达Tim3(图4B)以及低至中等表达PD1(图C)的$CD8^+$T细胞的流入,表明这些细胞不是重新活跃的肿瘤居留物,而是新迁入物并且还没有完全耗尽T细胞。尽管共抑制分子的表达与T细胞功能障碍有关,但代谢不足也可以预测T细胞功能。分析了作为代谢充足性的标志物的线粒体含量,揭示了尽管“非竭尽”的共抑制分子模式的表达,但溶瘤病毒治疗的肿瘤的TIL仍归因于代谢衰竭(图4D)。

[0185] 实施例4

[0186] 瘦素通过代谢重编程活化的T细胞

[0187] 鉴于溶瘤病毒刺激了新的免疫浸润,该浸润仍归因于代谢不足,确定了增强那些新的T细胞的方法,以使其在肿瘤微环境中更具竞争力。目的是利用遗传编码的有效载荷,以便可以在病毒载体中编码这种试剂。瘦素是一种调节能量稳态并促进炎症反应的细胞因子。为了确定瘦素在T细胞上的代谢重编程功能,从外周淋巴结(LN)中分离出的活化$CD8^+$T细胞在逐渐增加的瘦素浓度下进行培养。

[0188] 瘦素诱导$CD8^+$T细胞的基础耗氧率和备用呼吸能力(定义长寿记忆T细胞(20)的线粒体储备量的量度)的增加(图5A),但对活化T细胞进行糖酵解的能力影响不大,如通过细胞外酸化法所测量的(图5B)。流式细胞术分析加强了该数据,表明在瘦素暴露下线粒体质量增加,表明较高的氧化磷酸化,而未观察到葡萄糖摄取的变化(图5C)。因此,瘦素可以刺激T细胞增加其氧化活性和能力,这是肿瘤微环境中非常需要的代谢重编程事件。

[0189] 如先前所观察到的,在鼠T细胞中证实了瘦素受体的表达(18)(图5D)。此外,与淋巴结中的T细胞相比,黑素瘤肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)表达更高水平的瘦素受体(图5D)。根据它们的共抑制分子的表达水平对TIL进行分类,在具有PD1和Tim3的高表达的活化或耗尽的T细胞中观察到瘦素受体的较高表达(图5E)。因此,瘦素可以促进T细胞中的代谢重编程,而肿瘤浸润的T细胞带有其受体。

[0190] 实施例5

[0191] 在肿瘤微环境中升高局部瘦素水平可实现抗肿瘤免疫

[0192] 瘦素在肿瘤浸润淋巴细胞中的治疗作用尚未进行过研究。假设瘦素可以增强肿瘤

浸润淋巴细胞的代谢能力,从而增强它们在肿瘤中的功能。

[0193] 用重组瘦素治疗荷瘤小鼠的初步研究表明,即使以相对较高的剂量进行全身递送,也不能显著改善肿瘤间质液中瘦素的水平。因此,为了首先单独测试瘦素的代谢重编程功能(溶瘤病毒感染之外),将CL24改造为表达空载体($CL24^{潮霉素}$)或瘦素($CL24^{瘦素}$)的细胞。$CL24^{瘦素}$细胞在细胞内表达瘦素(图6A),并将其释放到培养上清液中(图6B)。在体外,$CL24^{瘦素}$显示出与表达CL24的对照质粒($CL24^{潮霉素}$)相当的生长动力学(图6C)。然而,当将$CL24^{瘦素}$细胞皮下注射到C57BL/6J小鼠中时,它们以与$CL24^{潮霉素}$对照(图7A)相比显著更慢的速率生长,并且具有显著延长的存活率(图7B),表明瘦素可以刺激宿主免疫。确实,$CD8^+$T细胞的耗竭(图6D)表明在$CL24^{瘦素}$肿瘤中观察到的受控肿瘤生长需要功能免疫(图7C)。因此,在肿瘤微环境中局部升高的瘦素诱导免疫介导的肿瘤生长控制。在第10天(当肿瘤在各组之间的大小相当时)的肿瘤浸润淋巴细胞的分析显示,与对照肿瘤相比,在表达瘦素的肿瘤中$CD8^+$T细胞的浸润增加(图7D)。观察到天然杀伤细胞的浸润增加,但未在其他免疫群如B细胞中观察到(图6E)。

[0194] 实施例6

[0195] 瘦素代谢改善肿瘤浸润淋巴细胞的功能

[0196] 观察到瘦素在功能上改善了T细胞。在用PMA和离子霉素再刺激后,浸润到过表达瘦素的肿瘤中的$CD8^+$T细胞合成了升高水平的IFNγ和TNFα(图7E)。另外,如通过Ki67染色所测量的,浸润到表达瘦素的肿瘤中的$CD8^+$T细胞在原位更具增殖性(图7F)。瘦素可以通过JAK-Stat3和MAPK途径通过瘦素受体激活下游信号,并且确实,浸润过表达瘦素的肿瘤的T细胞的AKT、STAT3和p38-MAPK的稳态磷酸化更高(图6F)。因此,尽管这些细胞在表型上似乎更“枯竭(exhausted)”,但瘦素诱导的代谢支持使细胞具有多功能性、增殖性并介导肿瘤控制作用。

[0197] 实施例7

[0198] 表达瘦素的溶瘤痘苗病毒可诱导出色的抗肿瘤反应

[0199] 为了产生表达瘦素的痘苗病毒,在痘苗p7.5启动子的控制下将瘦素基因(Lep)克隆到表达荧光素酶的pSC65载体中。产生了包含瘦素的重组痘苗病毒($VV^{瘦素}$)和对照荧光素酶表达病毒($VV^{对照}$),并用于感染CL24细胞。感染后24和48小时分析瘦素在CL24细胞中的表达(图8A)以及瘦素在培养基中的释放(图8B)。用VV^{ctrl}或$VV^{瘦素}$以2.5×10^6PFU的剂量瘤内治疗携带CL24肿瘤的小鼠,其足以在肿瘤中特异性地诱导荧光素酶表达(图8D)并检测肿瘤间质液中的游离瘦素;白色脂肪(WA)组织间质液充当阳性对照(图8C)。此外,分析TIL中的瘦素受体(瘦素R)表达表明在三种治疗条件之间没有变化(图8E)。

[0200] 与以前的结果一致,所有注射了对照病毒的小鼠都发生了部分反应,最终导致了肿瘤的长大。由于这种侵袭性黑色素瘤系对抗PD1免疫疗法完全耐药,因此对对照病毒的部分应答尤其令人兴奋(图1C)。与用$VV^{对照}$治疗的小鼠相比,注射相同剂量的$VV^{瘦素}$的小鼠具有更大的消退,包括相当大比例的完全响应(图9A)。

[0201] 通过分析肿瘤浸润证实转录组谱。与scRNAseq数据一致,对用$VV^{对照}$和$VV^{瘦素}$处理的肿瘤中的免疫浸润进行分析表明,两种溶瘤病毒均诱导了肿瘤部位T细胞浸润的增加(图9B)。由于据称溶瘤病毒诱导新的T细胞引发病毒和肿瘤抗原(Brown等,Sci Transl Med 2017;9(408);Russell等,Cancer Cell 2018;33(4):599-605),检查了该治疗对肿瘤部位T

细胞组成成分(repertoire)的影响。TCR测序表明,尽管用PBS处理的肿瘤几乎没有由寡克隆群体控制的浸润性T细胞,但用痘苗病毒进行处理会导致具有多克隆组成成分(polyclonal repertoire)的新T细胞的大量流入(图9C)。瘦素改造的痘苗病毒的克隆群略少,表明在这个时间点(病毒治疗后7天),一些克隆优先扩增(图9D)。克隆扩增可以表明一些记忆前体的扩增,并且确实瘦素改造的VV诱导了更大百分比的$CD127^{hi}$记忆前体(图9E)。

[0202] 瘦素抑制自身免疫性疾病中的调节性T细胞(T_{reg})并调节炎症反应。此外,溶瘤病毒疗法可以减少T_{reg}细胞的浸润(Barve等,J Clin Oncol 2008;26(27):4418-25;Ricca J等,MolTher 2018;26(4):1008-19)。一致地,在$VV^{对照}$和$VV^{瘦素}$的溶瘤病毒处理之后,观察到与PBS处理相比,在$VV^{对照}$和$VV^{瘦素}$之间可比较的水平下观察到与PBS处理相比T_{reg}群体百分比的降低(图8F),表明瘦素不一定在T_{reg}细胞调节水平上起作用。

[0203] 记忆T细胞具有增加的线粒体储备,并且依赖于该储备来发挥其记忆功能(van der Windt等,PNAS 2013;110(35):14336-41)。这样,瘦素可以代谢支持$CD8^+$T细胞。用$VV^{瘦素}$处理的肿瘤中的$CD8^+$T细胞显示出线粒体质量的增加,如通过VDAC染色所测量的(图10A)。此外,$CD8^+$T细胞浸润处理的肿瘤的分析显示,$VV^{瘦素}$诱导了定性上优异的肿瘤浸润:在肿瘤部位的T细胞活性增加,表现为细胞因子能力的增加(图10B),以及增殖能力的增加(图10C)。

[0204] 总之,这些数据表明,通过为溶瘤病毒治疗诱导的新浸润的T细胞提供代谢支持,具有优异抗肿瘤能力的记忆前体群可以优先扩展和介导完全应答。

[0205] 考虑到可以应用所公开的发明的原理的许多可能的实施方案,应当认识到,所示出的实施方案仅是本发明的示例,而不应被认为是对本发明范围的限制。相反,本发明的范围由所附权利要求书限定。因此,我们要求保护所有落入这些权利要求的范围和精神内的发明。

序列表

<110> 联邦高等教育系统匹兹堡大学

<120> 代谢调节剂在肿瘤微环境中的表达以改善肿瘤的治疗

<130> 8123-100245-02

<150> US 62/622,547

<151> 2018-01-26

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3444

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

gtaggaatcg cagcgccagc ggttgcaagg cccaagaagc ccatcctggg aaggaaaatg 60
cattggggaa ccctgtgcgg attcttgtgg ctttggccct atcttttcta tgtccaagct 120
gtgcccatcc aaaaagtcca agatgacacc aaaaccctca tcaagacaat tgtcaccagg 180
atcaatgaca tttcacacac gcagtcagtc tcctccaaac agaaagtcac cggtttggac 240
ttcattcctg ggctccaccc catcctgacc ttatccaaga tggaccagac actggcagtc 300
taccaacaga tcctcaccag tatgccttcc agaaacgtga tccaaatatc caacgacctg 360
gagaacctcc gggatcttct tcacgtgctg gccttctcta agagctgcca cttgccctgg 420
gccagtggcc tggagacctt ggacagcctg gggggtgtcc tggaagcttc aggctactcc 480
acagaggtgg tggccctgag caggctgcag gggtctctgc aggacatgct gtggcagctg 540
gacctcagcc ctgggtgctg aggccttgaa ggtcactctt cctgcaagga ctacgttaag 600
ggaaggaact ctggcttcca ggtatctcca ggattgaaga gcattgcatg gacacccctt 660
atccaggact ctgtcaattt ccctgactcc tctaagccac tcttccaaag gcataagacc 720
ctaagcctcc ttttgcttga aaccaaagat atatacacag gatcctattc tcaccaggaa 780
gggggtccac ccagcaaaga gtgggctgca tctgggattc ccaccaaggt cttcagccat 840
caacaagagt tgtcttgtcc cctcttgacc catctccccc tcactgaatg cctcaatgtg 900
accaggggtg atttcagaga gggcagaggg gtaggcagag cctttggatg accagaacaa 960
ggttccctct gagaattcca aggagttcca tgaagaccac atccacacac gcaggaactc 1020
ccagcaacac aagctggaag cacatgttta tttattctgc attttattct ggatggattt 1080
gaagcaaagc accagcttct ccaggctctt tggggtcagc cagggccagg ggtctccctg 1140
gagtgcagtt tccaatccca tagatgggtc tggctgagct gaacccattt tgagtgactc 1200
gagggttggg ttcatctgag caagagctgg caaaggtggc tctccagtta gttctctcgt 1260
aactggtttc atttctactg tgactgatgt tacatcacag tgtttgcaat ggtgttgccc 1320
tgagtggatc tccaaggacc aggttatttt aaaaagattt gttttgtcaa gtgtcatatg 1380
taggtgtctg cacccagggg tggggaatgt ttgggcagaa gggagaagga tctagaatgt 1440
gttttctgaa taacatttgt gtggtgggtt ctttggaagg agtgagatca ttttcttatc 1500

ttctgcaatt gcttaggatg tttttcatga aaatagctct ttcaggggg ttgtgaggcc 1560
tggccaggca ccccctggag agaagtttct ggccctggct gaccccaaag agcctggaga 1620
agctgatgct ttgcttcaaa tccatccaga ataaaacgca aagggctgaa agccatttgt 1680
tggggcagtg gtaagctctg gctttctccg actgctaggg agtggtcttt cctatcatgg 1740
agtgacggtc ccacactggt gactgcgatc ttcagagcag gggtccttgg tgtgaccctc 1800
tgaatggtcc agggttgatc acactctggg tttattacat ggcagtgttc ctatttgggg 1860
cttgcatgcc aaattgtagt tcttgtctga ttggctcacc caagcaaggc caaaattacc 1920
aaaaatcttg gggggttttt actccagtgg tgaagaaaac tcctttagca ggtggtcctg 1980
agacctgaca agcactgcta ggcgagtgcc aggactcccc aggccaggcc accaggatgg 2040
cccttcccac tggaggtcac attcaggaag atgaaagagg aggtttgggg tctgccacca 2100
tcctgctgct gtgtttttgc tatcacacag tgggtggtgg atctgtccaa ggaaacttga 2160
atcaaagcag ttaactttaa gactgagcac ctgcttcatg ctcagccctg actggtgcta 2220
taggctggag aagctcaccc aataaacatt aagattgagg cctgccctca gggatcttgc 2280
attcccagtg gtcaaaccgc actcacccat gtgccaaggt ggggtattta ccacagcagc 2340
tgaacagcca aatgcatggt gcagttgaca gcaggtggga aatggtatga gctgaggggg 2400
gccgtgccca ggggcccaca gggaaccctg cttgcacttt gtaacatgtt tacttttcag 2460
ggcatcttag cttctattat agccacatcc ctttgaaaca agataactga gaatttaaaa 2520
ataagaaaat acataagacc ataacagcca acaggtggca ggaccaggac tatagcccag 2580
gtcctctgat acccagagca ttacgtgagc caggtaatga gggactggaa ccagggagac 2640
cgagcgcttt ctggaaaaga ggagtttcga ggtagagttt gaaggaggtg agggatgtga 2700
attgcctgca gagagaagcc tgttttgttg gaaggtttgg tgtgtggaga tgcagaggta 2760
aaagtgtgag cagtgagtta cagcgagagg cagagaaaga agagacagga gggcaagggc 2820
catgctgaag ggaccttgaa gggtaaagaa gtttgatatt aaaggagtta agagtagcaa 2880
gttctagaga agaggctggt gctgtggcca gggtgagagc tgctctggaa aatgtgaccc 2940
agatcctcac aaccacctaa tcaggctgag gtgtcttaag ccttttgctc acaaaacctg 3000
gcacaatggc taattcccag agtgtgaaac ttcctaagta taaatggttg tctgtttttg 3060
taacttaaaa aaaaaaaaaa aagtttggcc gggtgcggtg gctcacgcct gtaatcccag 3120
cactttggga ggccaaggtg gggggatcac aaggtcacta gatggcgagc atcctggcca 3180
acatggtgaa accccgtctc tactaaaaac acaaaagtta gctgagcgtg gtggcgggcg 3240
cctgtagtcc cagccactcg ggaggctgag acaggagaat cgcttaaacc tgggaggcgg 3300
agagtacagt gagccaagat cgcgccactg cactccggcc tgatgacaga gcgagattcc 3360
gtcttaaaaa aaaaaaaaaa aaagtttgtt tttaaaaaaa tctaaataaa ataactttgc 3420
cccctgcaaa aaaaaaaaaa aaaa 3444

<210> 2
<211> 167
<212> PRT
<213> 智人
<400> 2
Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu

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

<210> 3
<211> 4969
<212> DNA
<213> 智人
<220>
<221> 杂项特征
<222> (4045)..(4144)
<223> n is a, c, g, t or u
<400> 3
ctcgaggggc ctagacattg ccctccagag agagcaccca acaccctcca ggcttgaccg 60
gccagggtgt ccccttccta ccttggagag agcagcccca gggcatcctg caggggggtgc 120
tgggacacca gctggccttc aaggtctctg cctccctcca gccaccccac tacacgctgc 180
tgggatcctg gatctcagct ccctggccga caacactggc aaactcctac tcatccacga 240
aggccctcct gggcatggtg gtccttccca gcctggcagt ctgttcctca cacaccttgt 300
tagtgcccag cccctgaggt tgcagctggg ggtgtctctg aagggctgtg agcccccagg 360
aagccctggg gaagtgcctg ccttgcctcc ccccggccct gccagcgcct ggctctgccc 420
tcctacctgg gctcccccca tccagcctcc ctccctacac actcctctca aggaggcacc 480
catgtcctct ccagctgccg ggcctcagag cactgtggcg tcctggggca gccaccgcat 540

gtcctgctgt ggcatggctc agggtggaaa gggcggaagg gaggggtcct gcagatagct 600
ggtgcccact accaaacccg ctcggggcag gagagccaaa ggctgggtgt gtgcagagcg 660
gccccgagag gttccgaggc tgaggccagg gtgggacata gggatgcgag gggccggggc 720
acaggatact ccaacctgcc tgcccccatg gtctcatcct cctgcttctg ggacctcctg 780
atcctgcccc tggtgctaag aggcaggtaa ggggctgcag gcagcagggc tcggagccca 840
tgccccctca ccatgggtca ggctggacct ccaggtgcct gttctgggga gctgggaggg 900
ccggaggggt gtaccccagg ggctcagccc agatgacact atgggggtga tggtgtcatg 960
ggacctggcc aggagagggg agatgggctc ccagaagagg agtgggggct gagagggtgc 1020
ctgggggccc aggacggagc tgggccagtg cacagcttcc cacacctgcc cacccccaga 1080
gtcctgccgc cacccccaga tcacacggaa gatgaggtcc gagtggcctg ctgaggactt 1140
gctgcttgtc cccaggtccc caggtcatgc cctccttctg ccaccctggg gagctgaggg 1200
cctcagctgg ggctgctgtc ctaaggcagg gtgggaacta ggcagccagc agggagggga 1260
cccctccctc actcccactc tcccaccccc accaccttgg cccatccatg gcggcatctt 1320
gggccatccg ggactgggga caggggtcct ggggacaggg gtccggggac agggtcctgg 1380
ggacaggggt gtggggacag gggtctgggg acaggggtgt ggggacaggg gtgtggggac 1440
aggggtctgg ggacaggggt gtggggacag gggtccgggg acaggggtgt ggggacaggg 1500
gtctggggac aggggtgtgg ggacaggggt gtggggacag gggtctgggg acaggggtgt 1560
ggggacaggg gtcctgggga caggggtgtg gggacagggg tgtggggaca ggggtgtggg 1620
gacaggggtg tggggacagg ggtcctgggg atagggGtgt ggggacaggg gtgtggggac 1680
aggggtcccg gggacagggg tgtggggaca ggggtgtggg gacaggggtc ctggggacag 1740
gggtctgagg acaggggtgt gggcacaggg gtcctgggga caggggtcct ggggacaggg 1800
gtcctgggga caggggtctg gggacagcag cgcaaagagc cccgccctgc agcctccagc 1860
tctcctggtc taatgtggaa agtggcccag gtgagggctt tgctctcctg gagacatttg 1920
cccccagctg tgagcaggga caggtctggc caccgggccc ctggttaaga ctctaatgac 1980
ccgctggtcc tgaggaagag gtgctgacga ccaaggagat cttcccacag acccagcacc 2040
agggaaatgg tccggaaatt gcagcctcag cccccagcca tctgccgacc cccccacccc 2100
gccctaatgg gccaggcggc aggggttgac aggtagggga gatgggctct gagactataa 2160
agccagcggg ggcccagcag ccctcagccc tccaggacag gctgcatcag aagaggccat 2220
caagcaggtc tgttccaagg gcctttgcgt caggtgggct cagggttcca gggtggctgg 2280
accccaggcc ccagctctgc agcagggagg acgtggctgg gctcgtgaag catgtggggg 2340
tgagcccagg ggccccaagg cagggcacct ggccttcagc ctgcctcagc cctgcctgtc 2400
tcccagatca ctgtccttct gccatggccc tgtggatgcg cctcctgccc ctgctggcgc 2460
tgctggccct ctggggacct gacccagccg cagcctttgt gaaccaacac ctgtgcggct 2520
cacacctggt ggaagctctc tacctagtgt gcggggaacg aggcttcttc tacacaccca 2580
agacccgccg ggaggcagag gacctgcagg gtgagccaac cgcccattgc tgcccctggc 2640
cgcccccagc cacccccTgc tcctggcgct cccacccagc atgggcagaa gggggcagga 2700
ggctgccacc cagcaggggg tcaggtgcac ttttttaaaa agaagttctc ttggtcacgt 2760
cctaaaagtg accagctccc tgtggcccag tcagaatctc agcctgagga cggtgttggc 2820
ttcggcagcc ccgagataca tcagagggtg ggcacgctcc tccctccact cgcccctcaa 2880

acaaatgccc cgcagcccat ttctccaccc tcatttgatg accgcagatt caagtgtttt 2940
gttaagtaaa gtcctgggtg acctggggtc acagggtgcc ccacgctgcc tgcctctggg 3000
cgaacacccc atcacgcccg gaggagggcg tggctgcctg cctgagtggg ccagacccct 3060
gtcgccagcc tcacggcagc tccatagtca ggagatgggg aagatgctgg ggacaggccc 3120
tggggagaag tactgggatc acctgttcag gctcccactg tgacgctgcc ccggggcggg 3180
ggaaggaggt gggacatgtg ggcgttgggg cctgtaggtc cacacccagt gtgggtgacc 3240
ctccctctaa cctgggtcca gcccggctgg agatgggtgg gagtgcgacc tagggctggc 3300
gggcaggcgg gcactgtgtc tccctgactg tgtcctcctg tgtccctctg cctcgccgct 3360
gttccggaac ctgctctgcg cggcacgtcc tggcagtggg gcaggtggag ctgggcgggg 3420
gccctggtgc aggcagcctg cagcccttgg ccctggaggg gtccctgcag aagcgtggca 3480
ttgtggaaca atgctgtacc agcatctgct ccctctacca gctggagaac tactgcaact 3540
agacgcagcc tgcaggcagc cccacacccg ccgcctcctg caccgagaga gatggaataa 3600
agcccttgaa ccagccctgc tgtgccgtct gtgtgtcttg ggggccctgg gccaagcccc 3660
acttcccggc actgttgtga gcccctccca gctctctcca cgctctctgg gtgcccacag 3720
gtgccaacgc cggccaggcc cagcatgcag tggctctccc caaagcggcc atgcctgttg 3780
gctgcctgct gcccccaccc tgtggctcag ggtccagtat gggagcttcg ggggtctctg 3840
aggggccagg gatggtgggg ccactgagaa gtgacttctt gttcagtagc tctggactct 3900
tggagtcccc agagaccttg ttcaggaaag ggaatgagaa cattccagca attttccccc 3960
cacctagccc tcccaggttc tatttttaga gttatttctg atggagtccc tgtggaggga 4020
ggaggctggg ctgagggagg gggtnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 4080
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 4140
nnnnctcgag ggaggagccc ggggctgggg tacggaggcc tctgcacatc ttagagtaaa 4200
acaagcagga gaggctgggt gcggtggctc atgcctataa tcccagcact ttaggaggct 4260
gaggcgggca gatcacctga ggtcgggagt tcaagaccag cctgaccaac agggagaaac 4320
cccatcttta ctaaaactac aaaattagct gggtgtggtg gcacatgcct gtaatcccag 4380
atattcggga ggctgaggca ggagaatcgc ttgaacctgg gaagcagagg ttgcgctgag 4440
ccgagatggc accattgcac tccagcctgg gcaacgagag cgaaactccg tctcaaaaaa 4500
acaaaaacaa aaaaatcaaa acaatcaaaa aaacaagcag gaggggctct gaggtgcctg 4560
caacacccag gtacaatccg tggccctgag gcccatcaca gggaaggggt ctttgcagct 4620
ctttcaaccc ccagcccagc atccaaggaa gcccagggca gggagaaacc tcagctgcac 4680
catcagagct cagaacagag aaggcagaaa ttagcaggga gtggggctgg ggaggcttcc 4740
tagaagacgt gtctcccgcc ttgctggcac tgaggccttg aggatgggtc catactgggc 4800
ccccactgcc agggatgcag atccggccca ctgctgaaat ctgtgctcct ggagcctccc 4860
tcctgttcat gggccacagg ctgtgaaaac cccagagtcc tcccaggcag caagttttgt 4920
tttgtttttt gtttgtttgc ttgtttgttt tttgagagtc tgctcgtca 4969

<210> 4
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15
Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
20 25 30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
35 40 45
Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
50 55 60
Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
65 70 75 80
Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
85 90 95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
100 105 110

<210> 5
<211> 767
<212> DNA
<213> 智人
<400> 5

gccgccccgc gagaagaaga gcgggaagag gcggacagcg aggccaagat ttcagctgcg 60
ggacggtcag gggagacctc caggcgcagg gaaggacggc cagggtgaca cggaagcatg 120
cgacggctgc tgatccctct ggccctgtgg ctgggtgcgg tgggcgtggg cgtcgccgag 180
ctcacggaag cccagcgccg gggcctgcag gtggccctgg aggaatttca caagcacccg 240
cccgtgcagt gggccttcca ggagaccagt gtggagagcg ccgtggacac gcccttccca 300
gctggaatat ttgtgaggct ggaatttaag ctgcagcaga caagctgccg gaagagggac 360
tggaagaaac ccgagtgcaa agtcaggccc aatgggagga aacggaaatg cctggcctgc 420
atcaaactgg gctctgagga caaagttctg ggccggttgg tccactgccc catagagacc 480
caagttctgc gggaggctga ggagcaccag gagacccagt gcctcagggt gcagcgggct 540
ggtgaggacc cccacagctt ctacttccct ggacagttcg ccttctccaa ggccctgccc 600
cgcagctaag ccagcactga gatgcgtggt gcctccagga ccgctgcggg tggtaaccag 660
tggaagaccc cagcccccag ggagaggaac ccgttctatc cccagccatg ataataaagc 720
tgctctccca gctgcctctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 767

<210> 6
<211> 163
<212> PRT
<213> 智人
<400> 6

Met Arg Arg Leu Leu Ile Pro Leu Ala Leu Trp Leu Gly Ala Val Gly

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

<210> 7
<211> 7415
<212> DNA
<213> 智人
<400> 7

gaaggcaaat gttcccccag ctgtttcctg tctacagtgt ctgtgttttg tagataaatg 60
tgaggatttt ctctaaatcc ctcttctgtt tgctaaatct cactgtcact gctaaattca 120
gagcagatag agcctgcgca atggaataaa gtcctcaaaa ttgaaatgtg acattgctct 180
caacatctcc catctctctg gatttctttt tgcttcatta ttcctgctaa ccaattcatt 240
ttcagacttt gtacttcaga agcaatggga aaaatcagca gtcttccaac ccaattattt 300
aagtgctgct tttgtgattt cttgaaggtg aagatgcaca ccatgtcctc ctcgcatctc 360
ttctacctgg cgctgtgcct gctcaccttc accagctctg ccacggctgg accggagacg 420
ctctgcgggg ctgagctggt ggatgctctt cagttcgtgt gtggagacag gggcttttat 480
ttcaacaagc ccacagggta tggctccagc agtcggaggg cgcctcagac aggcatcgtg 540
gatgagtgct gcttccggag ctgtgatcta aggaggctgg agatgtattg cgcacccctc 600
aagcctgcca agtcagctcg ctctgtccgt gcccagcgcc acaccgacat gcccaagacc 660
cagaagtatc agcccccatc taccaacaag aacacgaagt ctcagagaag gaaaggaagt 720
acatttgaag aacgcaagta gagggagtgc aggaaacaag aactacagga tgtaggaaga 780
ccctcctgag gagtgaagag tgacatgcca ccgcaggatc ctttgctctg cacgagttac 840

ctgttaaact ttggaacacc taccaaaaaa taagtttgat aacatttaaa agatgggcgt 900
ttcccccaat gaaatacaca agtaaacatt ccaacattgt ctttaggagt gatttgcacc 960
ttgcaaaaat ggtcctggag ttggtagatt gctgttgatc ttttatcaat aatgttctat 1020
agaaaagaaa aaaaaaatat atatatatat atatcttagt ccctgcctct caagagccac 1080
aaatgcatgg gtgttgtata gatccagttg cactaaattc ctctctgaat cttggctgct 1140
ggagccattc attcagcaac cttgtctaag tggtttatga attgtttcct tatttgcact 1200
tctttctaca caactcgggc tgtttgtttt acagtgtctg ataatcttgt tagtctatac 1260
ccaccacctc ccttcataac ctttatattt gccgaatttg gcctcctcaa aagcagcagc 1320
aagtcgtcaa gaagcacacc aattctaacc cacaagattc catctgtggc atttgtacca 1380
aatataagtt ggatgcattt tattttagac acaaagcttt atttttccac atcatgctta 1440
caaaaaagaa taatgcaaat agttgcaact ttgaggccaa tcatttttag gcatatgttt 1500
taaacataga aagtttcttc aactcaaaag agttccttca aatgatgagt taatgtgcaa 1560
cctaattagt aactttcctc tttttatttt ttccatatag agcactatgt aaatttagca 1620
tatcaattat acaggatata tcaaacagta tgtaaaactc tgtttttttag tataatggtg 1680
ctattttgta gtttgttata tgaaagagtc tggccaaaac ggtaatacgt gaaagcaaaa 1740
caatagggga agcctggagc caaagatgac acaaggggaa gggtactgaa aacaccatcc 1800
atttgggaaa gaaggcaaag tccccccagt tatgccttcc aagaggaact tcagacacaa 1860
aagtccactg atgcaaattg gactggcgag tccagagagg aaactgtgga atggaaaaag 1920
cagaaggcta ggaattttag cagtcctggt ttctttttct catggaagaa atgaacatct 1980
gccagctgtg tcatggactc accactgtgt gaccttgggc aagtcacttc acctctctgt 2040
gcctcagttt cctcatctgc aaaatggggg caatatgtca tctacctacc tcaaaggggt 2100
ggtataaggt ttaaaaagat aaagattcag atttttttta ccctgggttg ctgtaagggt 2160
gcaacatcag ggcgcttgag ttgctgagat gcaaggaatt ctataaataa cccattcata 2220
gcatagctag agattggtga attgaatgct cctgacatct cagttcttgt cagtgaagct 2280
atccaaataa ctggccaact agttgttaaa agctaacagc tcaatctctt aaaacacttt 2340
tcaaaatatg tgggaagcat ttgattttca atttgatttt gaattctgca tttggtttta 2400
tgaatacaaa gataagtgaa aagagagaaa ggaaaagaaa aaggagaaaa acaaagagat 2460
ttctaccagt gaaaggggaa ttaattactc tttgttagca ctcactgact cttctatgca 2520
gttactacat atctagtaaa acctcgttta atactataaa taatattcta ttcattttga 2580
aaaacacaat gattccttct tttctaggca atataaggaa agtgatccaa aatttgaaat 2640
attaaaataa tatctaataa aaagtcacaa agttatcttc tttaacaaac tttactctta 2700
ttcttagctg tatatacatt tttttaaaag tttgttaaaa tatgcttgac tagagtttcc 2760
agttgaaagg caaaaacttc catcacaaca agaaatttcc catgcctgct cagaagggta 2820
gcccctagct ctctgtgaat gtgttttatc cattcaactg aaaattggta tcaagaaagt 2880
ccactggtta gtgtactagt ccatcatagc ctagaaaatg atccctatct gcagatcaag 2940
attttctcat tagaacaatg aattatccag cattcagatc tttctagtca ccttagaact 3000
ttttggttaa aagtacccag gcttgattat ttcatgcaaa ttctatattt tacattcttg 3060
gaaagtctat atgaaaaaca aaaataacat cttcagtttt tctcccactg ggtcacctca 3120
aggatcagag gccaggaaaa aaaaaaaaaa gactccctgg atctctgaat atatgcaaaa 3180

agaaggcccc atttagtgga gccagcaatc ctgttcagtc aacaagtatt ttaactctca 3240
gtccaacatt atttgaattg agcacctcaa gcatgcttag caatgttcta atcactatgg 3300
acagatgtaa aagaaactat acatcatttt tgccctctgc ctgttttcca gacatacagg 3360
ttctgtggaa taagatactg gactcctctt cccaagatgg cacttctttt tatttcttgt 3420
ccccagtgtg tacctttaa aattattccc tctcaacaaa actttatagg cagtcttctg 3480
cagacttaac gtgttttctg tcatagttag atgtgataat tctaagagtg tctatgactt 3540
atttccttca cttaattcta tccacagtca aaaatccccc aaggaggaaa gctgaaagat 3600
gcactgccat attatctttc ttaacttttt ccaacacata atcctctcca actggattat 3660
aaataaattg aaaataactc attataccaa ttcactattt tatttttaa tgaattaaaa 3720
ctagaaaaca aattgatgca aaccctggaa gtcagttgat tactatatac tacagcagaa 3780
tgactcagat ttcatagaaa ggagcaacca aaatgtcaca acccaaaact ttacaagctt 3840
tgcttcagaa ttagattgct ttataattct tgaatgaggc aatttcaaga tatttgtaaa 3900
agaacagtaa acattggtaa gaatgagctt tcaactcata ggcttatttc caatttaatt 3960
gaccatactg gatacttagg tcaaatttct gttctctctt ccccaaataa tattaaagta 4020
ttatttgaac tttttaagat gaggcagttc ccctgaaaaa gttaatgcag ctctccatca 4080
gaatccactc ttctagggat atgaaaatct cttaacaccc accctacata cacagacaca 4140
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacattcacc ctaaggatcc aatggaatac 4200
tgaaaagaaa tcacttcctt gaaaatttta ttaaaaaaca aacaaacaaa caaaaagcct 4260
gtccaccctt gagaatcctt cctctccttg gaacgtcaat gtttgtgtag atgaaaccat 4320
ctcatgctct gtggctccag ggtttctgtt actattttat gcacttggga gaaggcttag 4380
aataaaagat gtagcacatt ttgctttccc atttattgtt tggccagcta tgccaatgtg 4440
gtgctattgt ttctttaaga aagtacttga ctaaaaaaaa aagaaaaaaa gaaaaaaaag 4500
aaagcataga catatttttt taaagtataa aaacaacaat tctatagata gatggcttaa 4560
taaaatagca ttaggtctat ctagccacca ccacctttca acttttatc actcacaagt 4620
agtgtactgt tcaccaaatt gtgaatttgg gggtgcaggg gcaggagttg gaaatttttt 4680
aaagttagaa ggctccattg ttttgttggc tctcaaactt agcaaaatta gcaatatatt 4740
atccaatctt ctgaacttga tcaagagcat ggagaataaa cgcgggaaaa aagatcttat 4800
aggcaaatag aagaatttaa aagataagta agttccttat tgatttttgt gcactctgct 4860
ctaaaacaga tattcagcaa gtggagaaaa taagaacaaa gagaaaaaat acatagattt 4920
acctgcaaaa aatagcttct gccaaatccc ccttgggtat tctttggcat ttactggttt 4980
atagaagaca ttctcccttc acccagacat ctcaaagagc agtagctctc atgaaaagca 5040
atcactgatc tcatttggga aatgttggaa agtatttcct tatgagatgg gggttatcta 5100
ctgataaaga aagaatttat gagaaattgt tgaaagagat ggctaacaat ctgtgaagat 5160
tttttgtttc ttgtttttgt ttttttttt tttttacttt atacagtctt tatgaatttc 5220
ttaatgttca aaatgacttg gttcttttct tctttttta tatcagaatg aggaataata 5280
agttaaaccc acatagactc tttaaaacta taggctagat agaaatgtat gtttgacttg 5340
ttgaagctat aatcagacta tttaaaatgt tttgctattt ttaatcttaa aagattgtgc 5400
taatttatta gagcagaacc tgtttggctc tcctcagaag aaagaatctt tccattcaaa 5460
tcacatggct ttccaccaat attttcaaaa gataaatctg atttatgcaa tggcatcatt 5520

tattttaaaa cagaagaatt gtgaaagttt atgcccctcc cttgcaaaga ccataaagtc 5580
cagatctggt agggggggcaa caacaaaagg aaaatgttgt tgattcttgg ttttggattt 5640
tgttttgttt tcaatgctag tgtttaatcc tgtagtacat atttgcttat tgctatttta 5700
atattttata agaccttcct gttaggtatt agaaagtgat acatagatat ctttttttgtg 5760
taatttctat ttaaaaaaga gagaagactg tcagaagctt taagtgcata tggtacagga 5820
taaagatatc aatttaaata accaattcct atctggaaca atgcttttgt tttttaaaga 5880
aacctctcac agataagaca gaggcccagg ggatttttga agctgtcttt attctgcccc 5940
catcccaacc cagcccttat tattttagta tctgcctcag aattttatag agggctgacc 6000
aagctgaaac tctagaatta aaggaacctc actgaaaaca tatatttcac gtgttccctc 6060
ttttttttt tccttttttgt gagatggggt ctcgcactgt cccccaggct ggagtgcagt 6120
ggcatgatct cggctcactg caacctccac ctcctgggtt taagcgattc tcctgcctca 6180
gcctcctgag tagctgggat tacaggcacc caccactatg cccggctaat tttttggatt 6240
tttaatagag acggggtttt accatgttgg ccaggttggt ctcaaactcc tgaccttgtg 6300
atttgcccgc ctcagcctcc caaattgctg ggattacagg catgagccac cacaccctgc 6360
ccatgtgttc cctcttaatg tatgattaca tggatcttaa acatgatcct tctctcctca 6420
ttcttcaact atctttgatg gggtctttca aggggaaaaa aatccaagct tttttaaagt 6480
aaaaaaaaaa aaagagagga cacaaaacca aatgttactg ctcaactgaa atatgagtta 6540
agatggagac agagtttctc ctaataaccg gagctgaatt acctttcact ttcaaaaaca 6600
tgaccttcca caatccttag aatctgcctt tttttatatt actgaggcct aaaagtaaac 6660
attactcatt ttattttgcc caaaatgcac tgatgtaaag taggaaaaat aaaaacagag 6720
ctctaaaatc cctttcaagc cacccattga ccccactcac caactcatag caaagtcact 6780
tctgttaatc ccttaatctg attttgtttg gatatttatc ttgtacccgc tgctaaacac 6840
actgcaggag ggactctgaa acctcaagct gtctacttac atcttttatc tgtgtctgtg 6900
tatcatgaaa atgtctattc aaaatatcaa aacctttcaa atatcacgca gcttatattc 6960
agtttacata aaggccccaa ataccatgtc agatcttttt ggtaaaagag ttaatgaact 7020
atgagaattg ggattacatc atgtattttg cctcatgtat ttttatcaca cttataggcc 7080
aagtgtgata aataaactta cagacactga attaatttcc cctgctactt tgaaaccaga 7140
aaataatgac tggccattcg ttacatctgt cttagttgaa aagcatattt tttattaaat 7200
taattctgat tgtatttgaa attattattc aattcactta tggcagagga atatcaatcc 7260
taatgacttc taaaaatgta actaattgaa tcattatctt acatttactg tttaataagc 7320
atattttgaa aatgtatggc tagagtgtca taataaaatg gtatatcttt ctttagtaat 7380
tacattaaaa ttagtcatgt ttgattaatt agttc 7415

<210> 8
<211> 158
<212> PRT
<213> 智人
<400> 8

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe
1 5 10 15

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

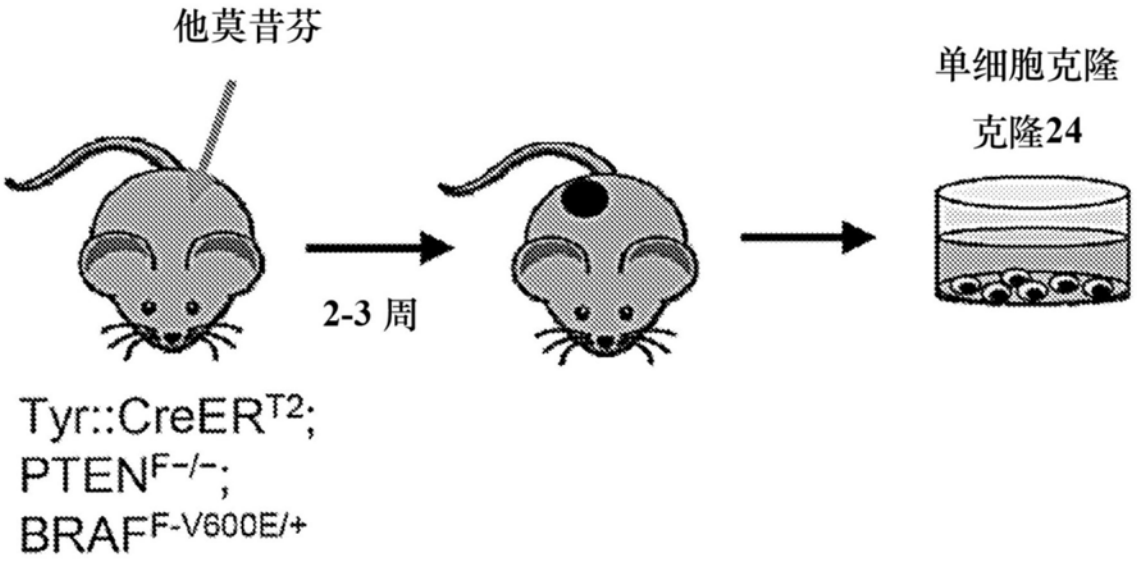

他莫昔芬
单细胞克隆
克隆24
2-3 周
Tyr::CreER^{T2};
PTEN$^{F-/-}$;
BRAF$^{F-V600E/+}$

图1A

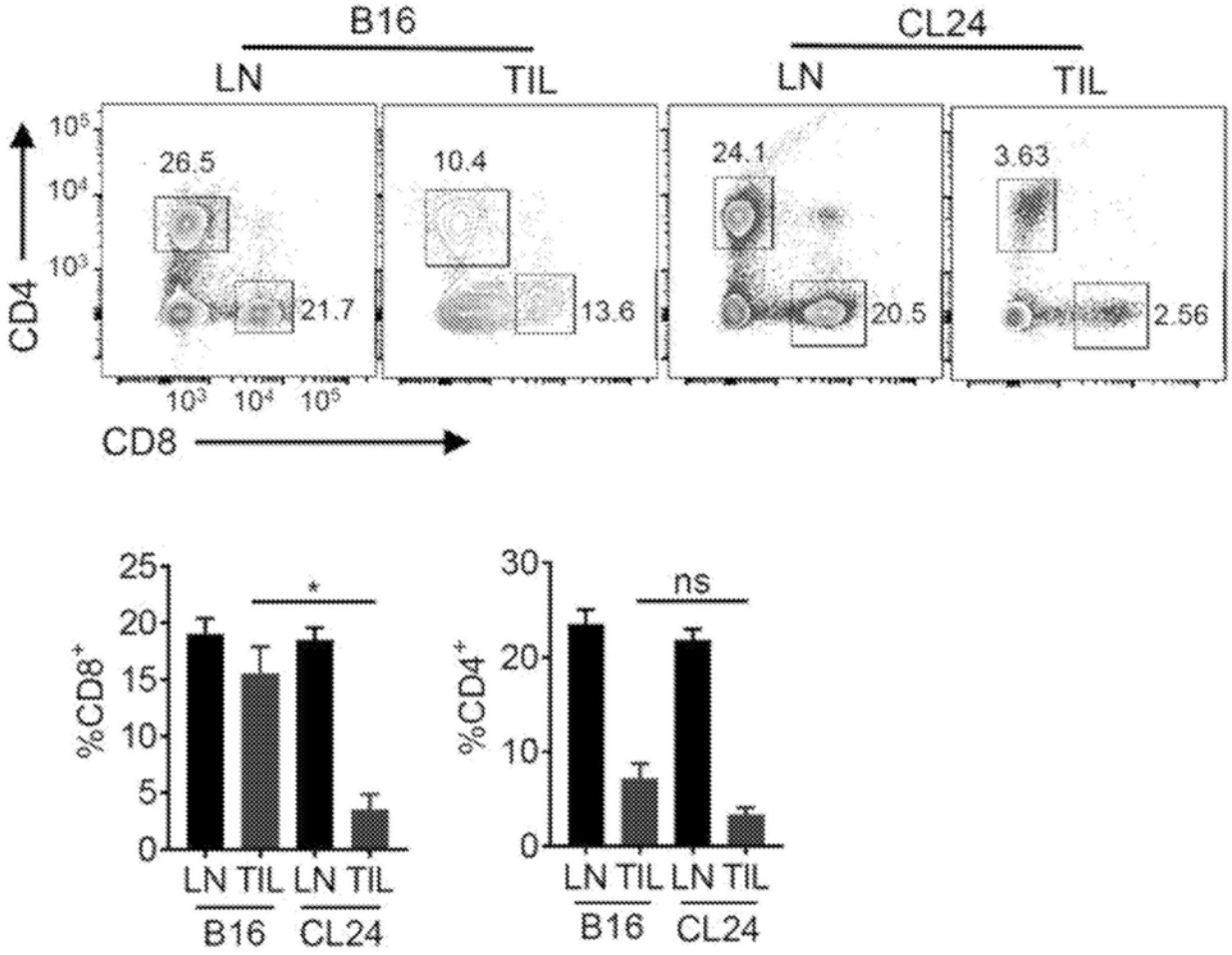

B16
CL24
LN
TIL
LN
TIL
CD4
CD8
26.5
21.7
10.4
13.6
24.1
20.5
3.63
2.56
%CD8+
%CD4+
*
ns
LN TIL LN TIL
B16 CL24

图1B

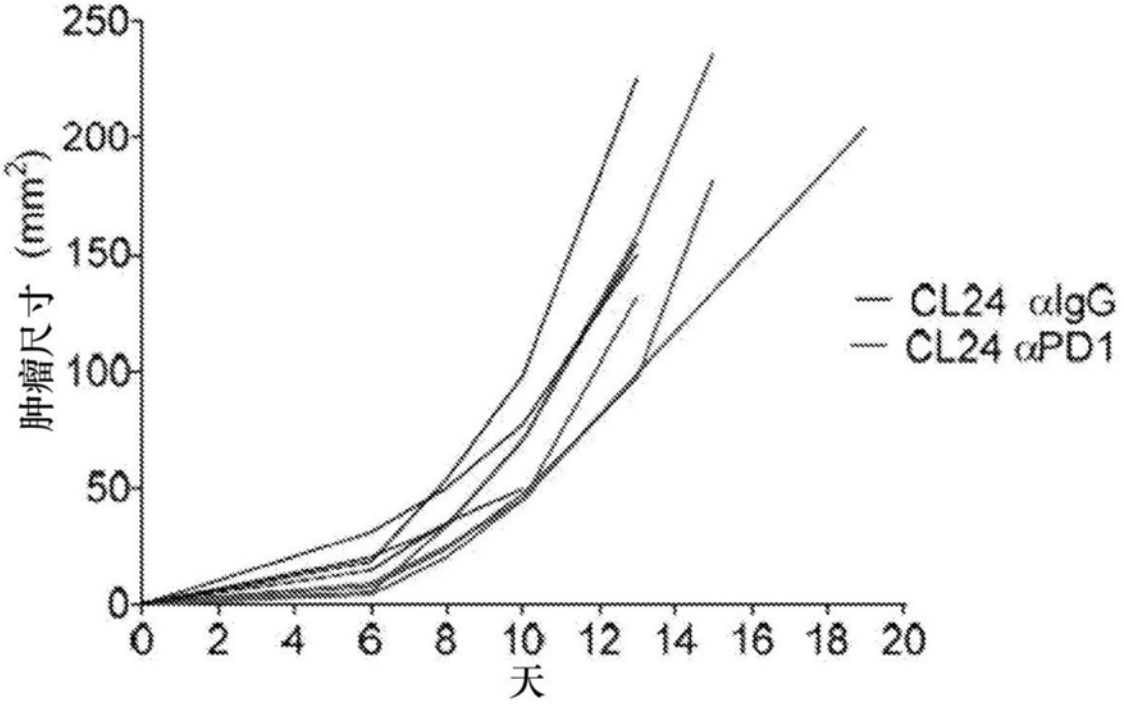

250
200
150
100
50
0
肿瘤尺寸 (mm^2)
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
天
CL24 αIgG
CL24 αPD1

图1C

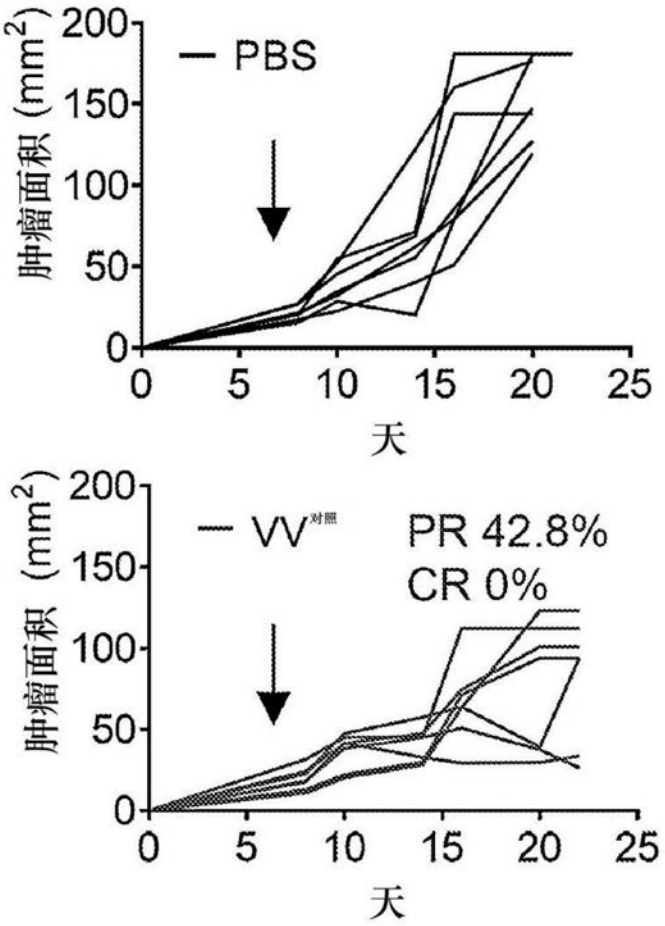

— PBS
肿瘤面积 (mm²)
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25
天
— VV对照
PR 42.8%
CR 0%
肿瘤面积 (mm²)
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25
天

图2A

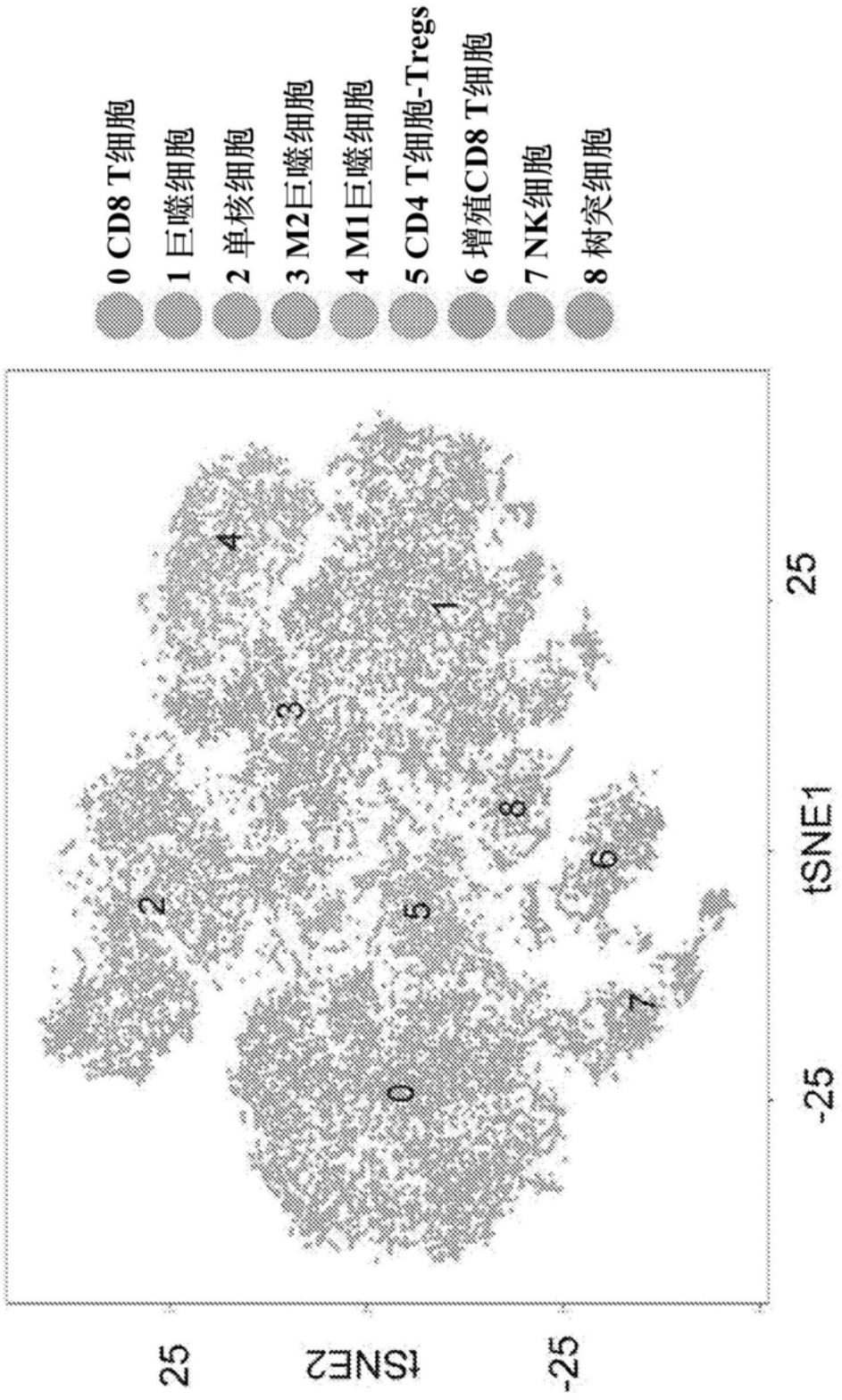

0 CD8 T细胞
1 巨噬细胞
2 单核细胞
3 M2巨噬细胞
4 M1巨噬细胞
5 CD4 T细胞-Tregs
6 增殖CD8 T细胞
7 NK细胞
8 树突细胞
25
tSNE2
-25
-25
tSNE1
25

图2B

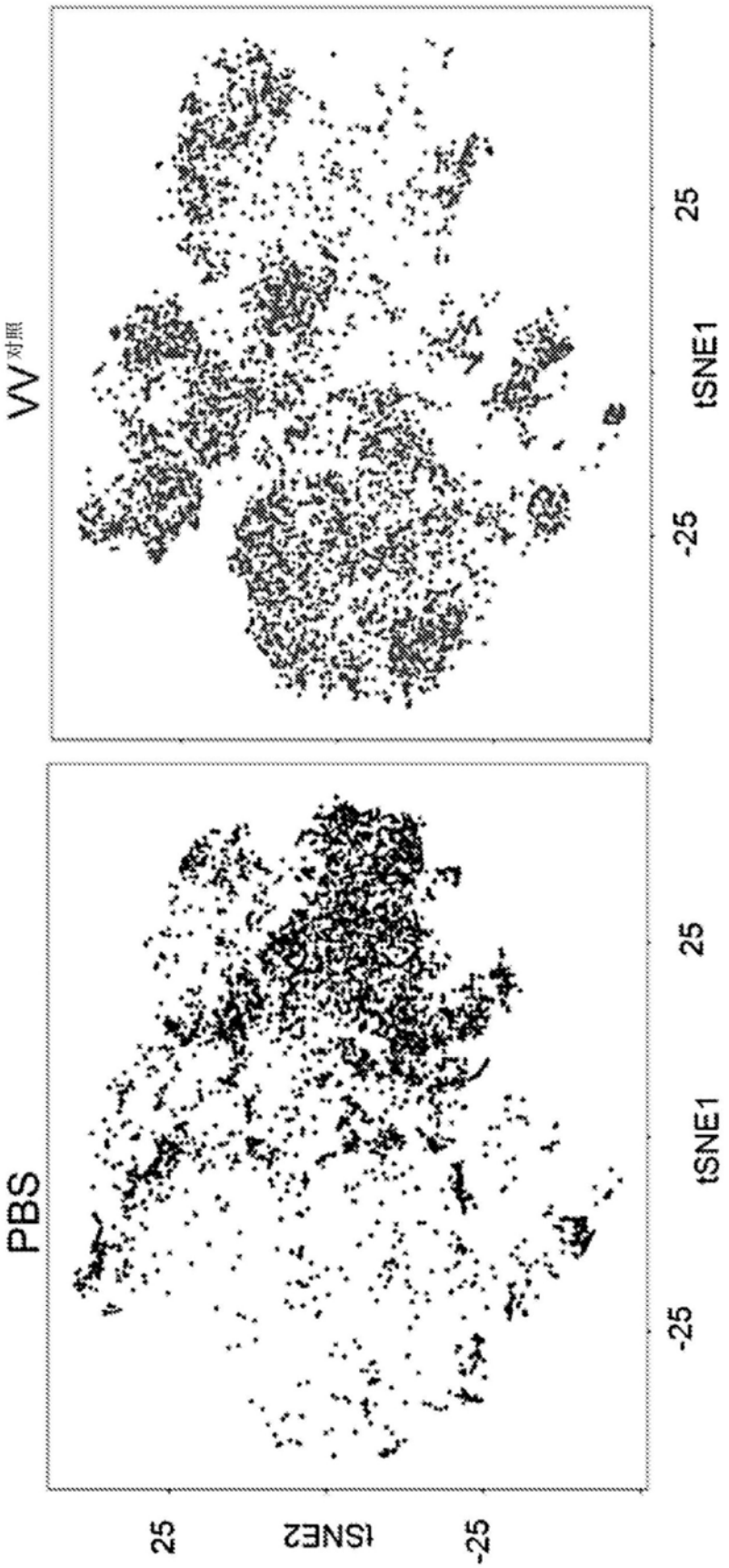


图2C

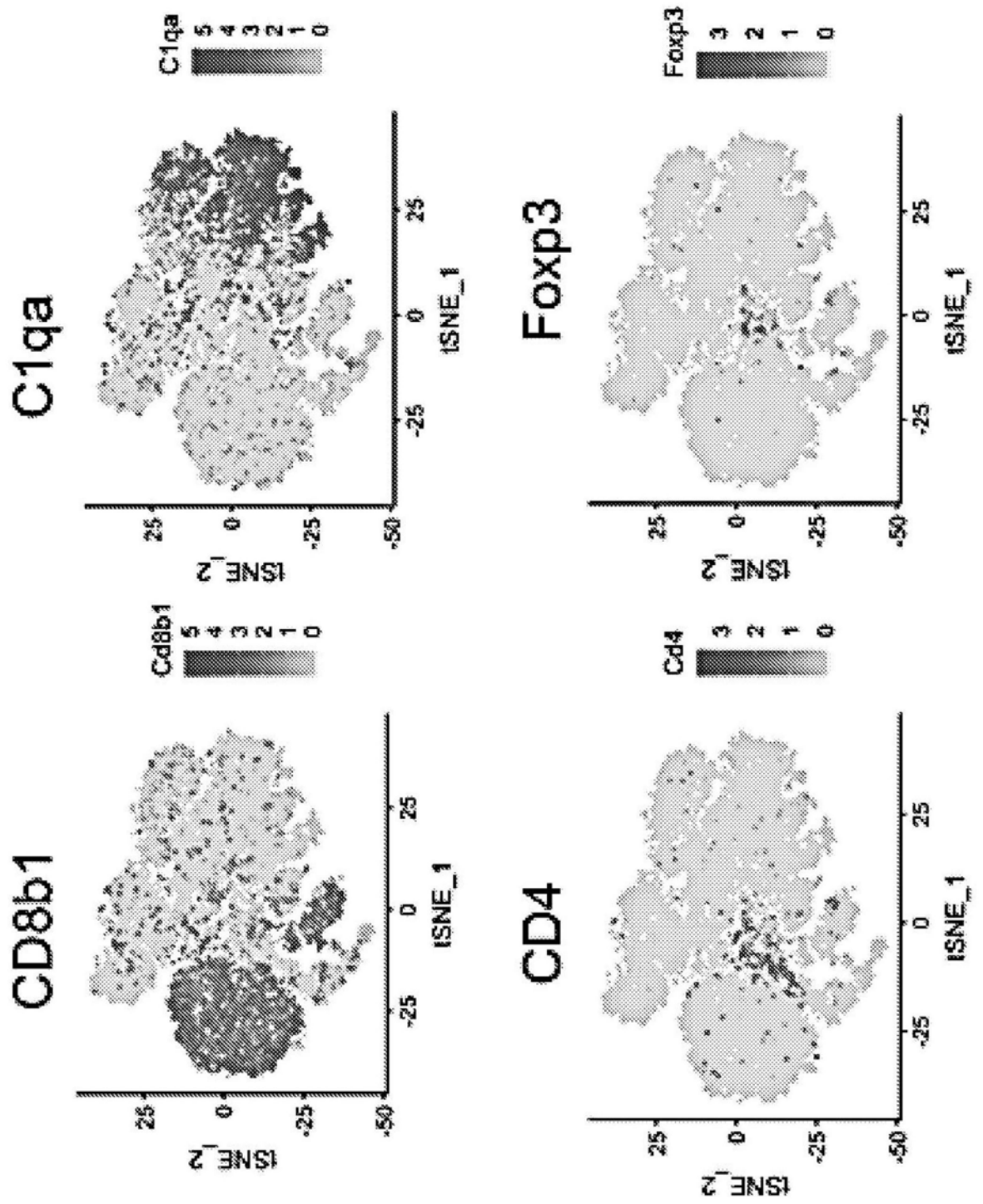

C1qa
C1qa
5 4 3 2 1 0
tSNE_2
tSNE_1
25 0 -25 -50
25 0 -25
Foxp3
Foxp3
3 2 1 0
CD8b1
Cd8b1
5 4 3 2 1 0
CD4
Cd4
3 2 1 0

图3A

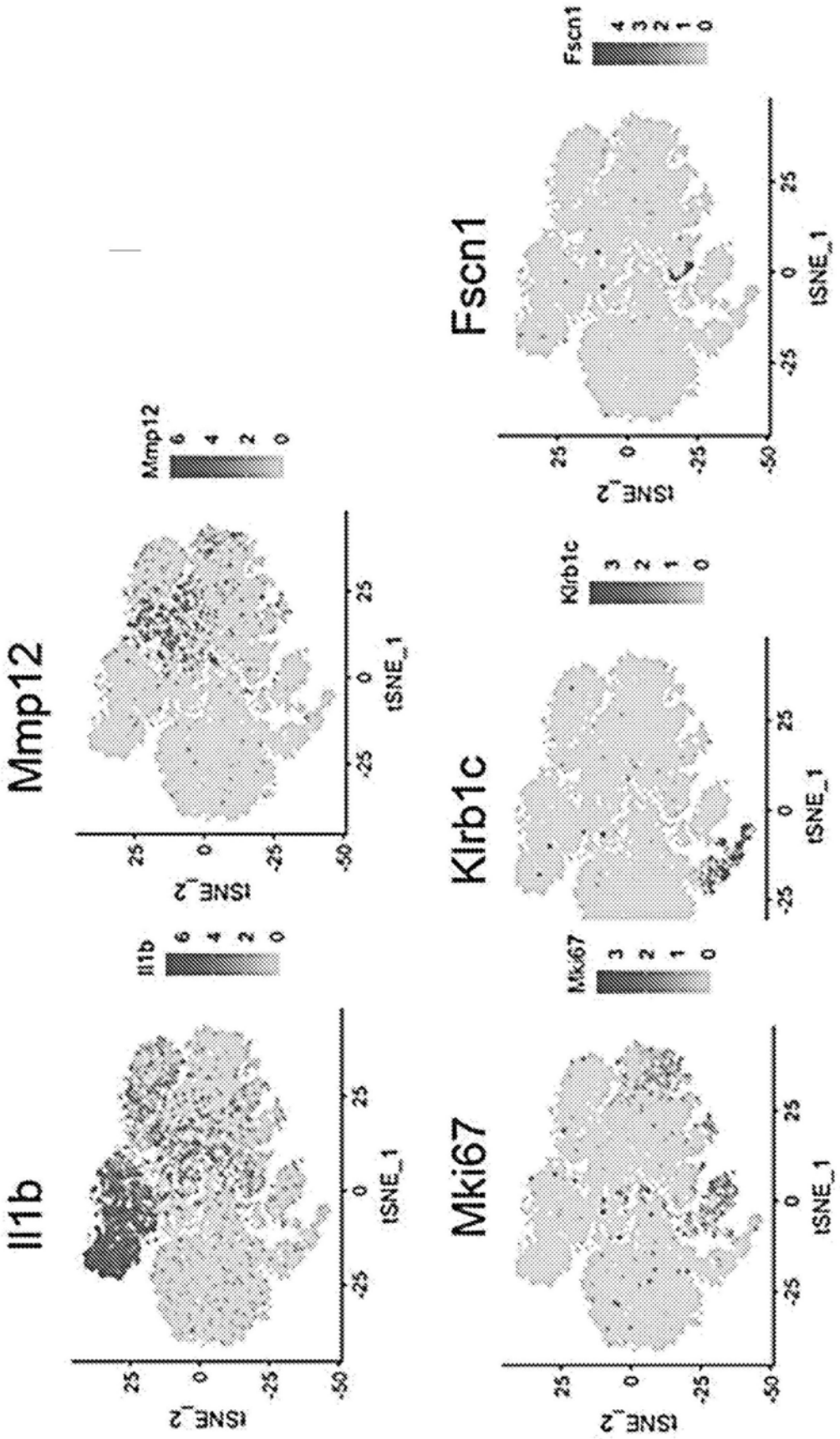


图3B

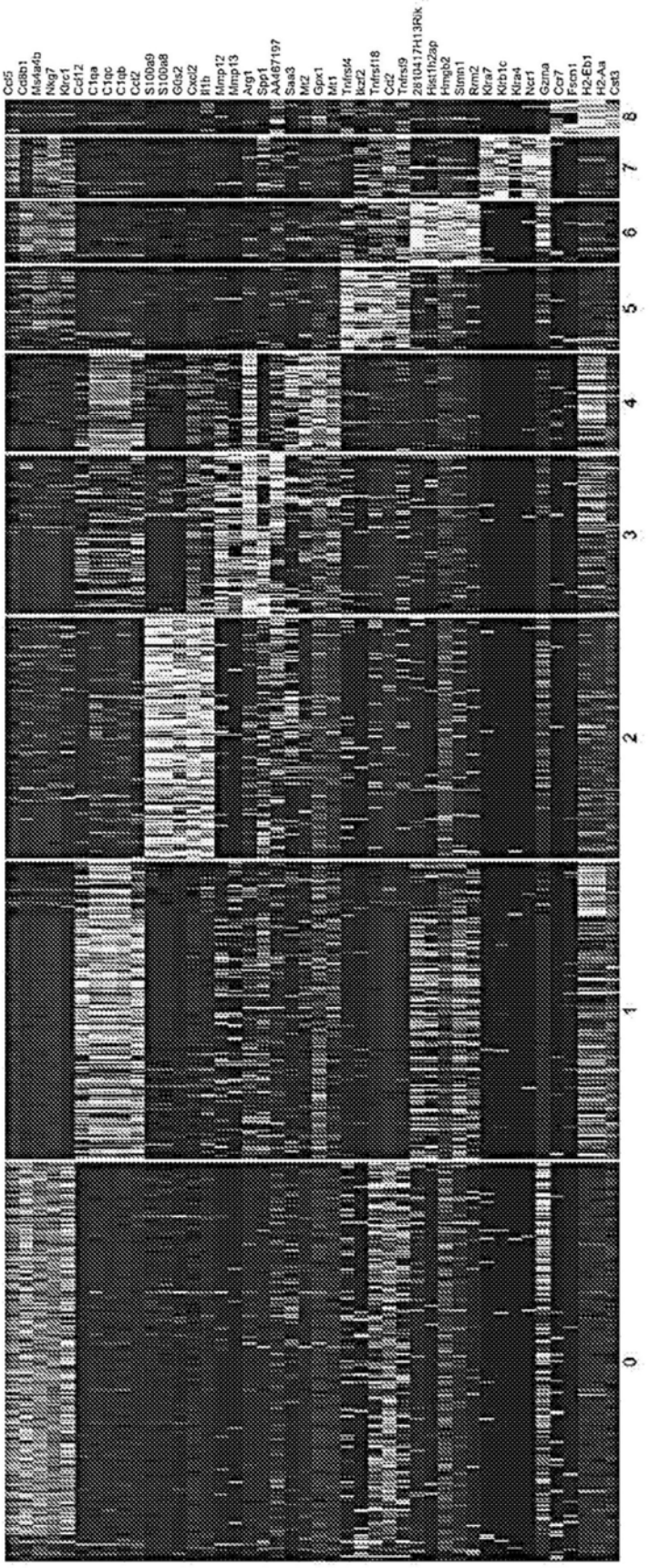

Ccl5
Cd8b1
Ms4a4b
Nkg7
Klrc1
Ccl12
C1qa
C1qc
C1qb
Ccl2
S100a9
S100a8
Gbp2
Cxcl2
Il1b
Mmp12
Mmp13
Arg1
Spp1
AA467197
Saa3
Mt2
Gpx1
Mt1
Tnfrsf4
Ikzf2
Tnfrsf18
Ccl2
Tnfrsf9
2810417H13Rik
Hist1h2ap
Hmgb2
Stmn1
Rrm2
Klra7
Klrb1c
Klra4
Ncr1
Gzma
Car7
Fcn1
H2-Eb1
H2-Aa
Cst3
0
1
2
3
4
5
6
7
8

图3C

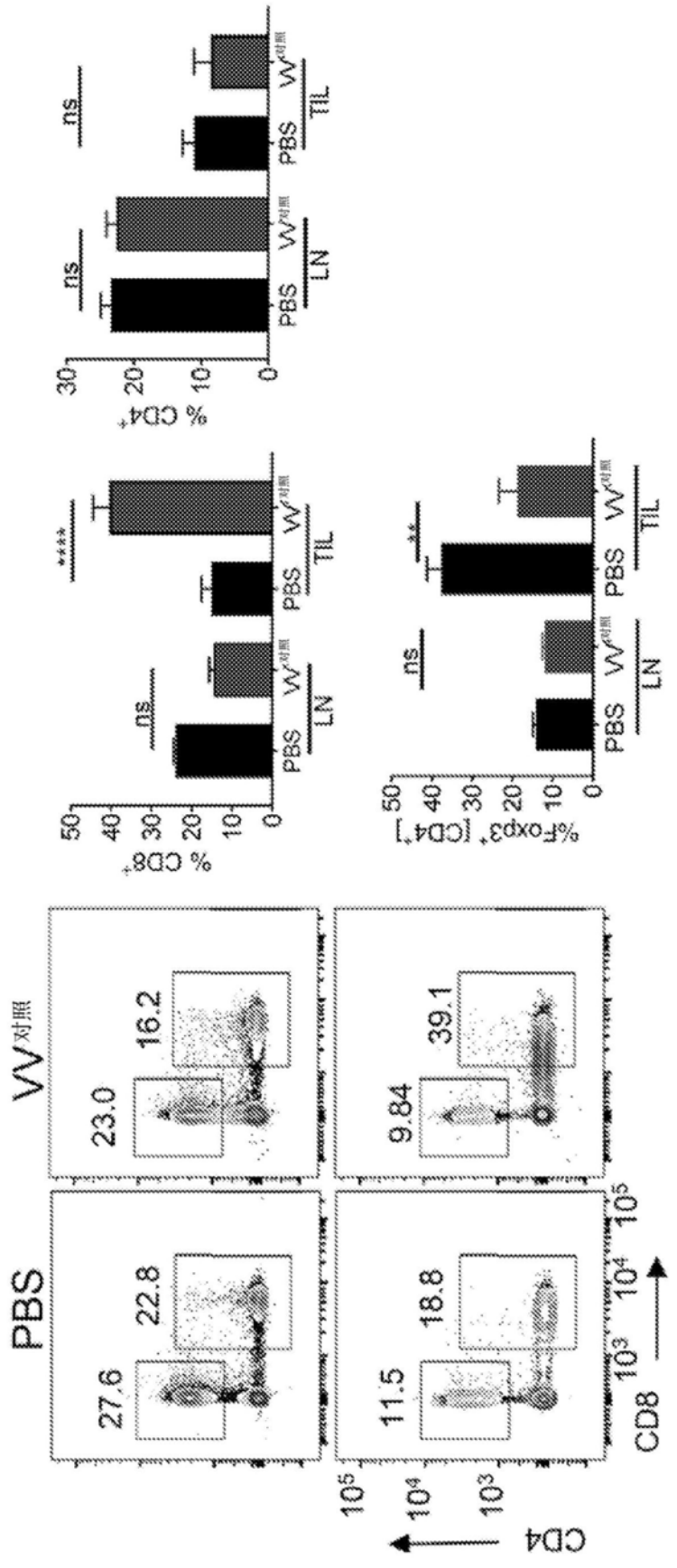

PBS
VV对照
27.6
22.8
23.0
16.2
11.5
18.8
9.84
39.1
CD4
CD8
% CD4+
% CD8+
%Foxp3+ [CD4+]
LN
TIL
PBS
VV对照
ns
****
**

图4A

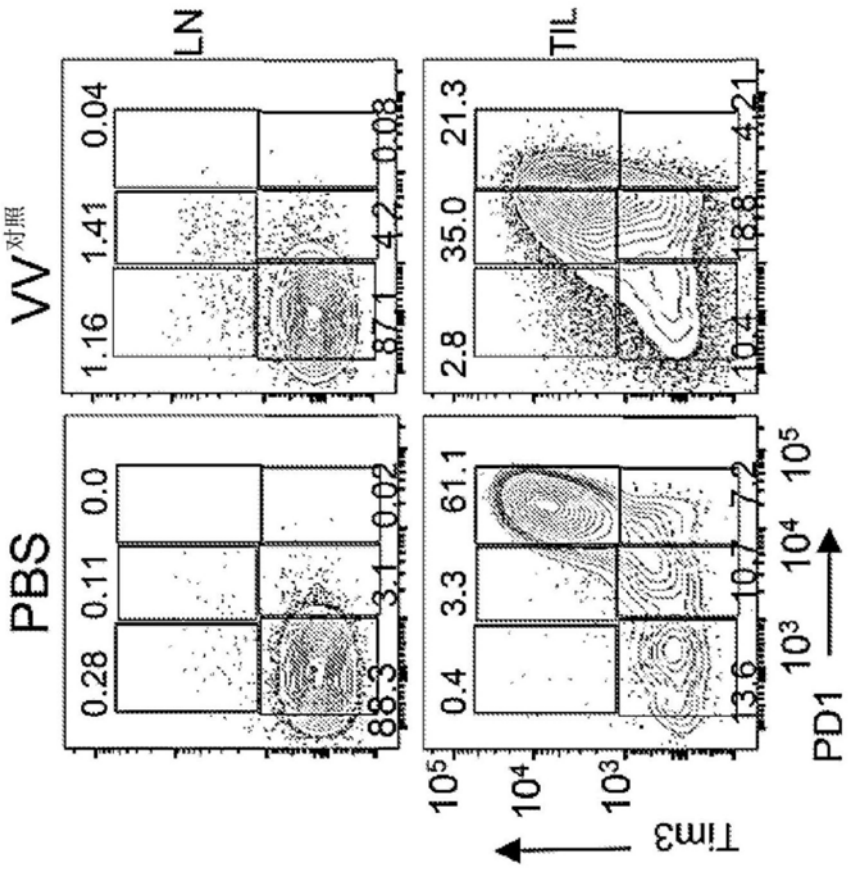

LN
TIL
VV对照
PBS
1.16
1.41
0.04
87.1
4.2
0.08
2.8
35.0
21.3
10.4
18.8
4.21
0.28
0.11
0.0
88.3
3.1
0.02
0.4
3.3
61.1
13.6
10.7
7.2
10^5
10^4
10^3
Tim3
PD1

图4B

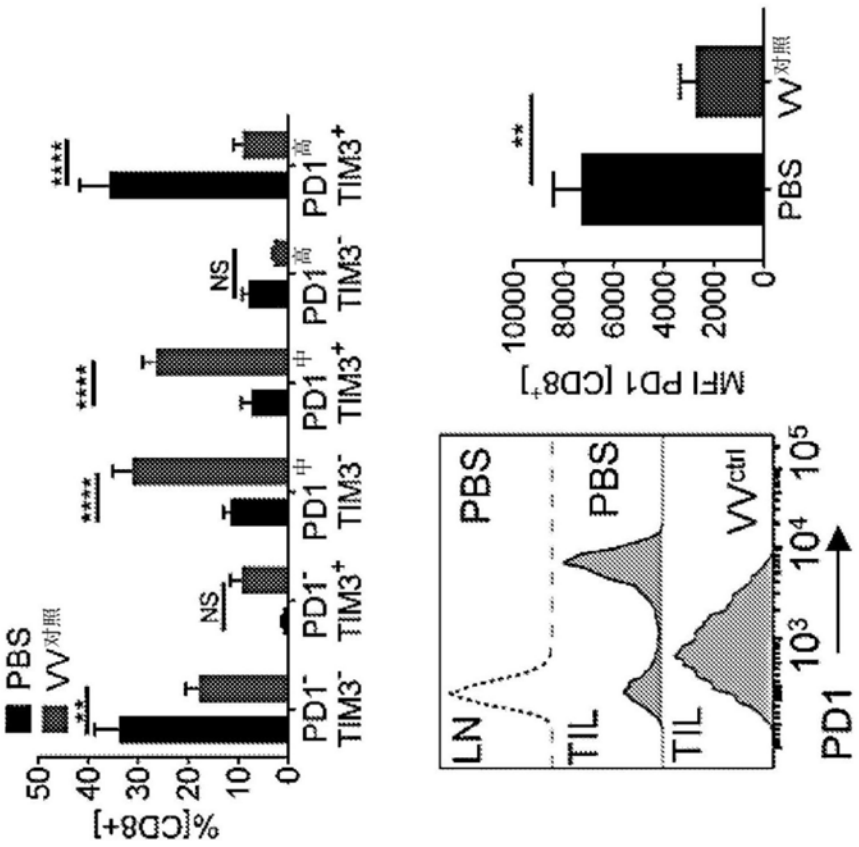

PBS
VV对照
%[CD8+]
50
40
30
20
10
0
**
NS
****
****
NS
****
PD1- TIM3-
PD1- TIM3+
PD1中 TIM3-
PD1中 TIM3+
PD1高 TIM3-
PD1高 TIM3+
MFI PD1 [CD8+]
10000
8000
6000
4000
2000
0
**
PBS
VV对照
LN
PBS
TIL
PBS
TIL
VVctrl
10³ 10⁴ 10⁵
PD1

图4C

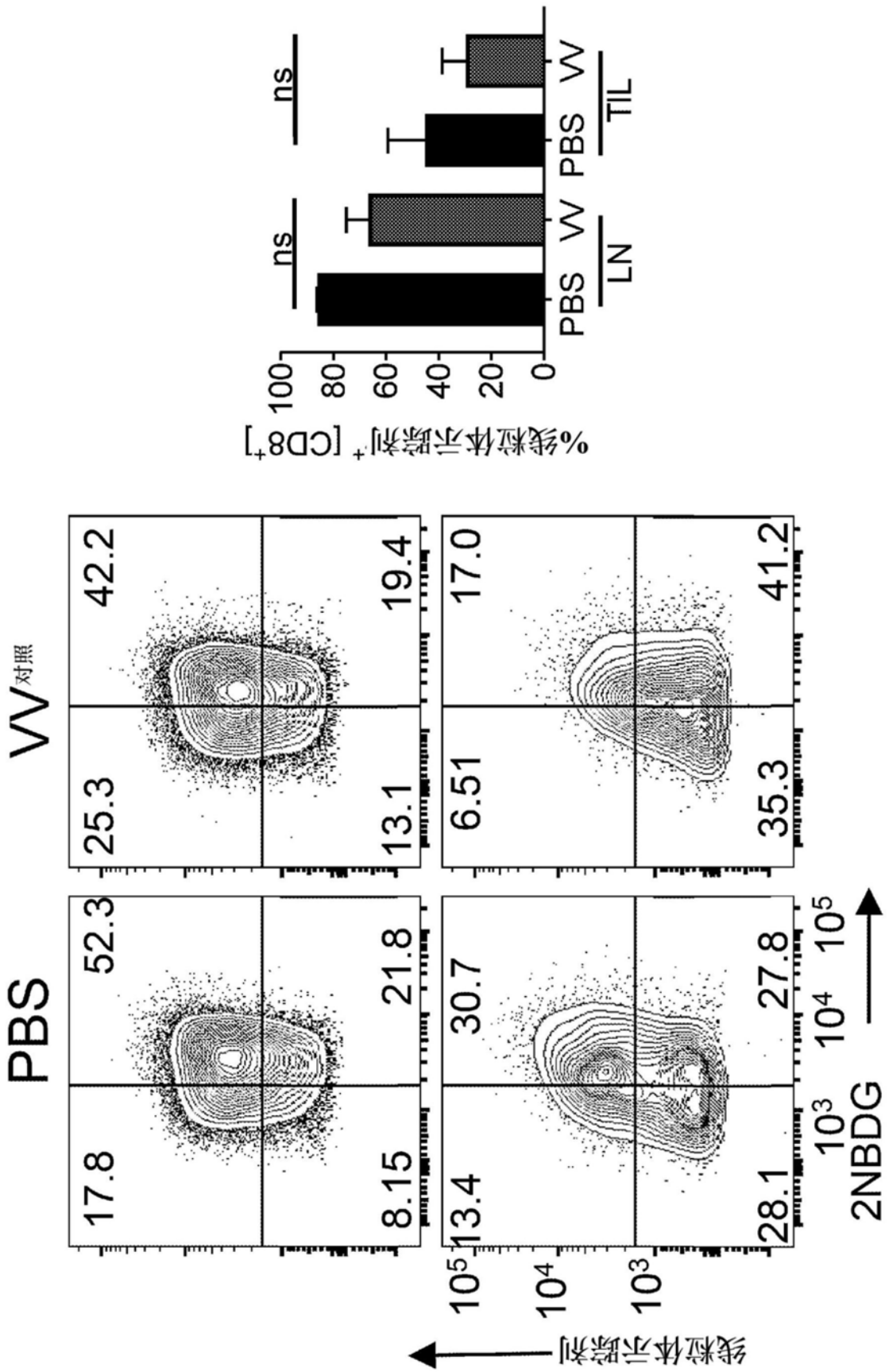

%线粒体示踪剂+ [CD8+]
100
80
60
40
20
0
ns
ns
PBS
VV
PBS
VV
LN
TIL
PBS
VV对照
线粒体示踪剂
2NBDG
17.8
52.3
8.15
21.8
13.4
30.7
28.1
27.8
25.3
42.2
13.1
19.4
6.51
17.0
35.3
41.2
10^3
10^4
10^5

图4D

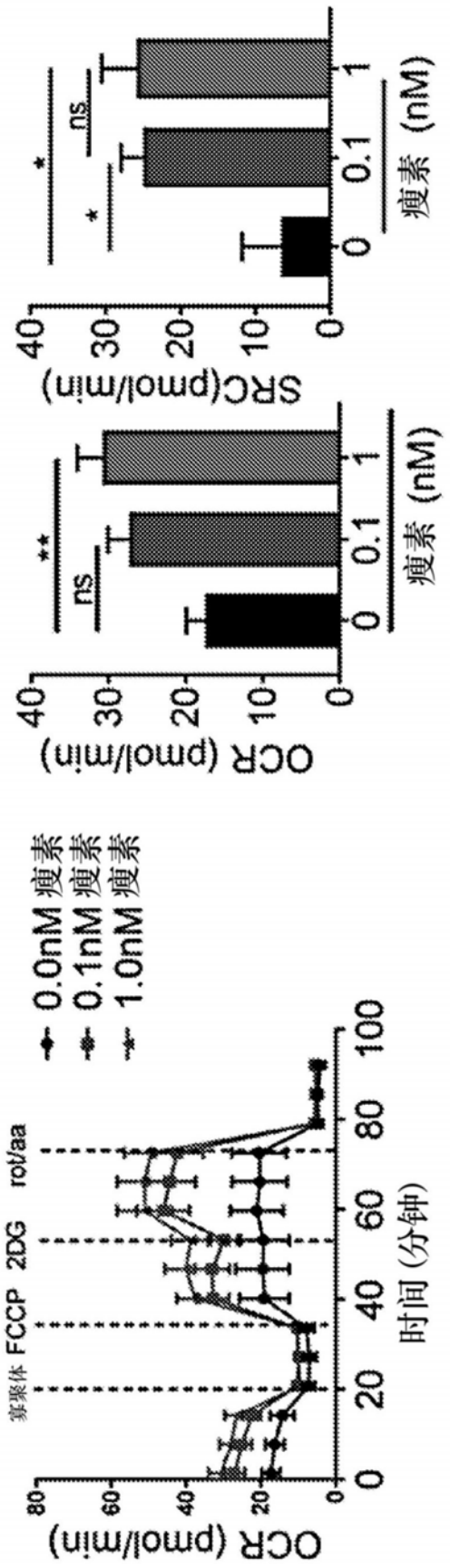

0.0nM 瘦素
0.1nM 瘦素
1.0nM 瘦素
寡聚体 FCCP 2DG rot/aa
OCR (pmol/min)
时间 (分钟)
OCR (pmol/min)
瘦素 (nM)
ns
**
SRC(pmol/min)
瘦素 (nM)
*
ns
*

图5A

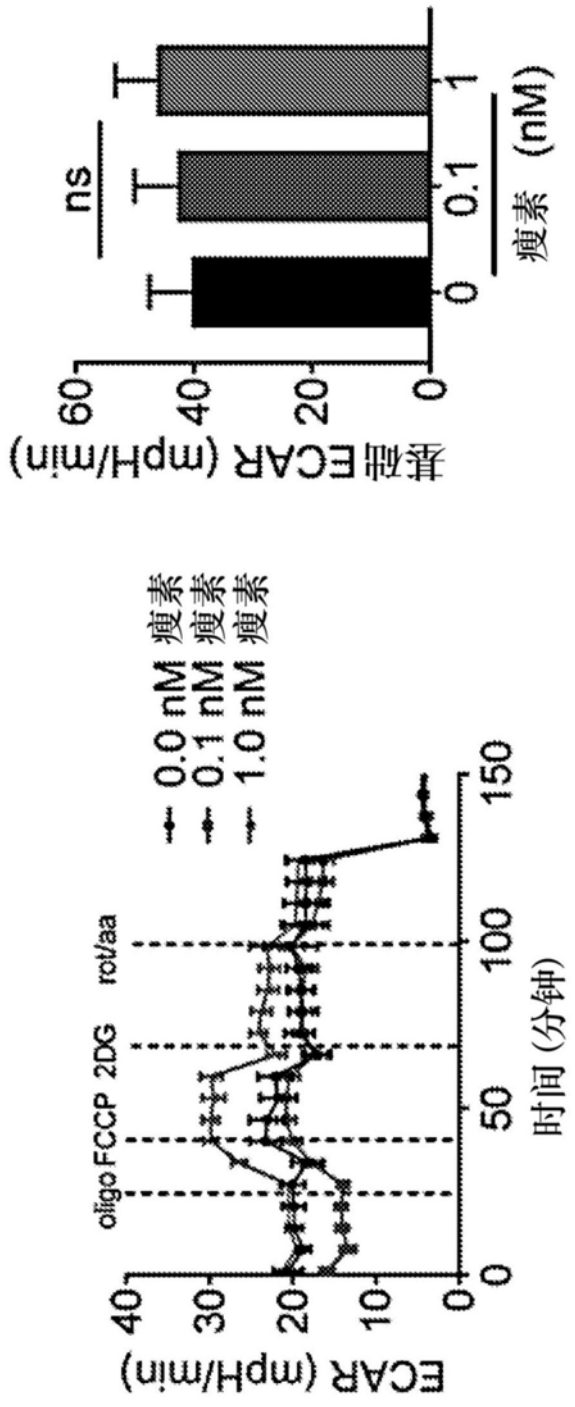

基础ECAR (mpH/min)
60
40
20
0
ns
0
0.1
1
瘦素 (nM)
ECAR (mpH/min)
40
30
20
10
0
oligo
FCCP
2DG
rot/aa
0
50
100
150
时间 (分钟)
0.0 nM 瘦素
0.1 nM 瘦素
1.0 nM 瘦素

图5B

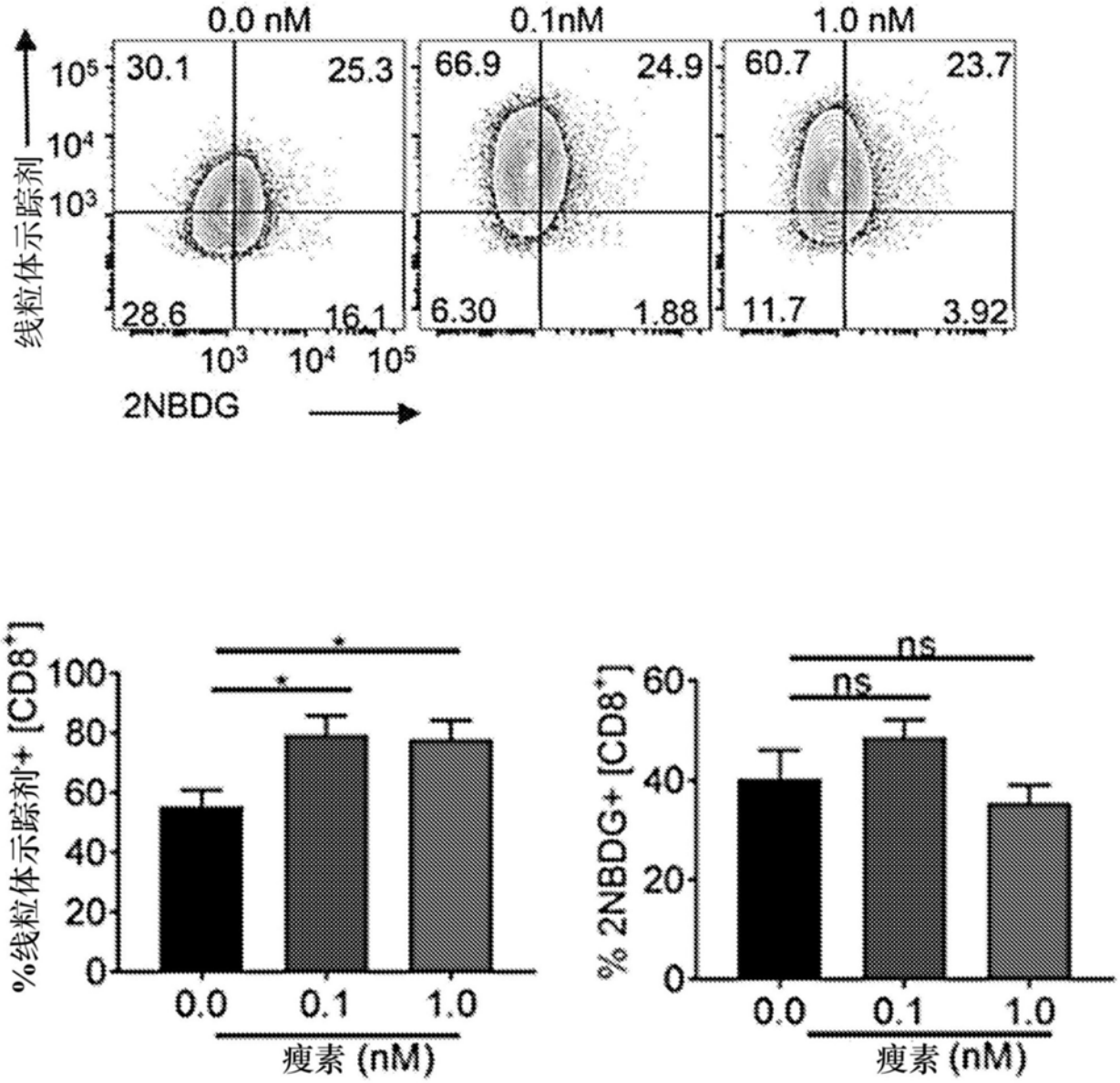

0.0 nM
0.1nM
1.0 nM
线粒体示踪剂
2NBDG
30.1
25.3
28.6
16.1
66.9
24.9
6.30
1.88
60.7
23.7
11.7
3.92
%线粒体示踪剂+ [CD8+]
% 2NBDG+ [CD8+]
瘦素 (nM)
瘦素 (nM)
ns
ns

图5C

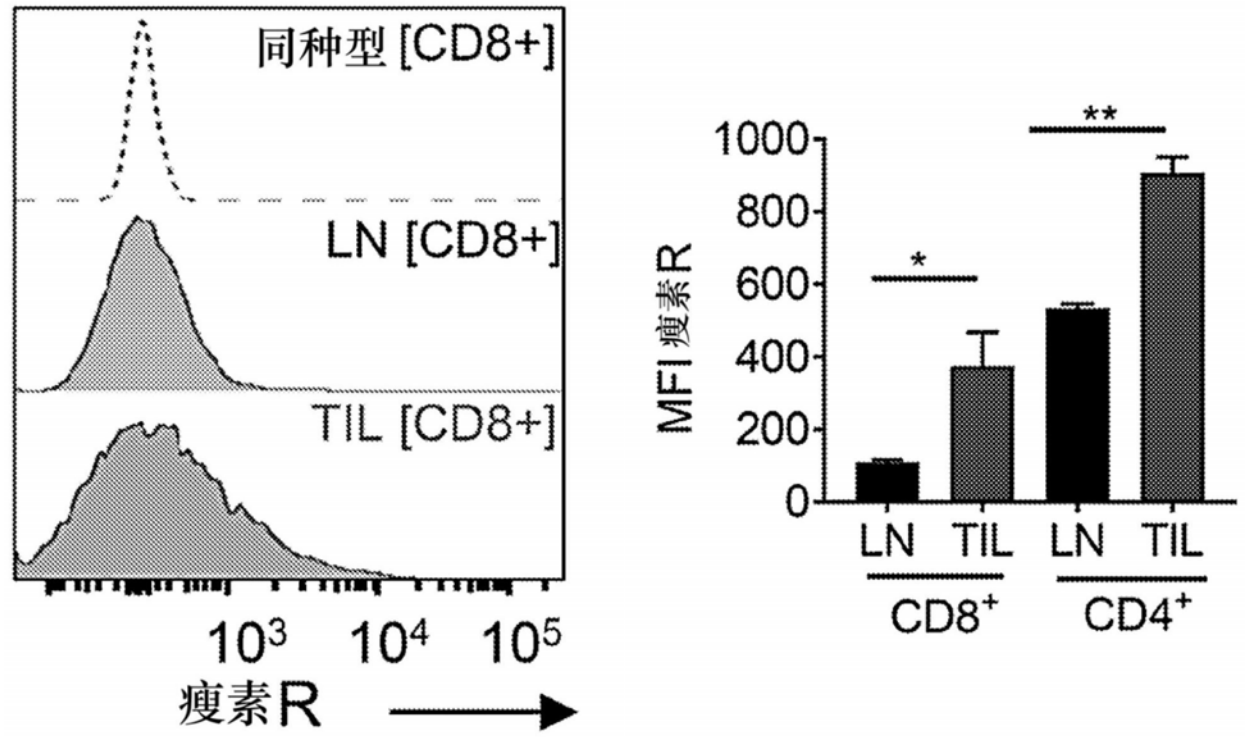

同种型 [CD8+]
LN [CD8+]
TIL [CD8+]
10³ 10⁴ 10⁵
瘦素R
MFI 瘦素R
1000
800
600
400
200
0
*
**
LN TIL LN TIL
CD8⁺ CD4⁺

图5D

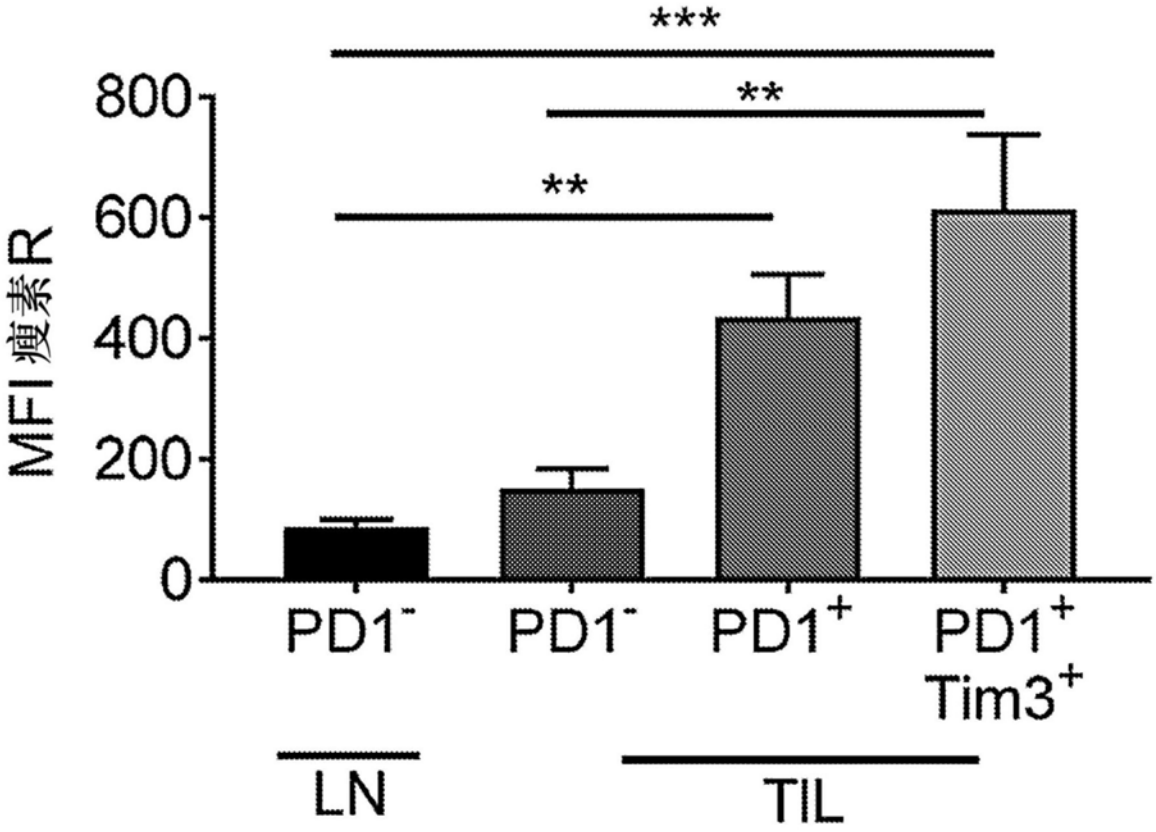

***
**
**
MFI 瘦素R
800
600
400
200
0
PD1⁻ PD1⁻ PD1⁺ PD1⁺ Tim3⁺
LN
TIL

图5E

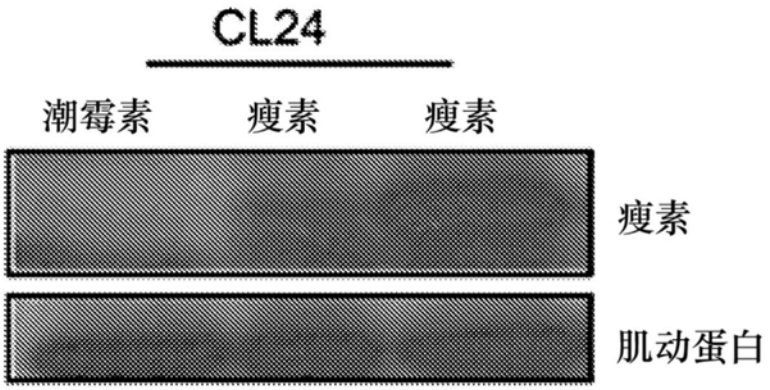


图6A

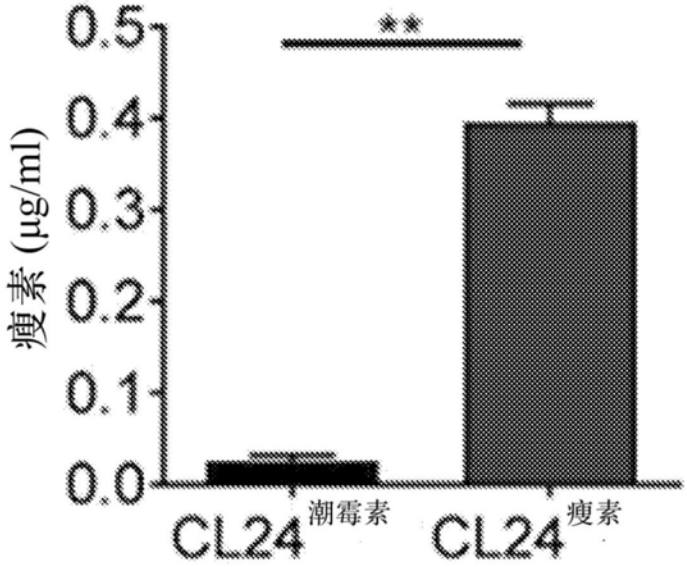


图6B

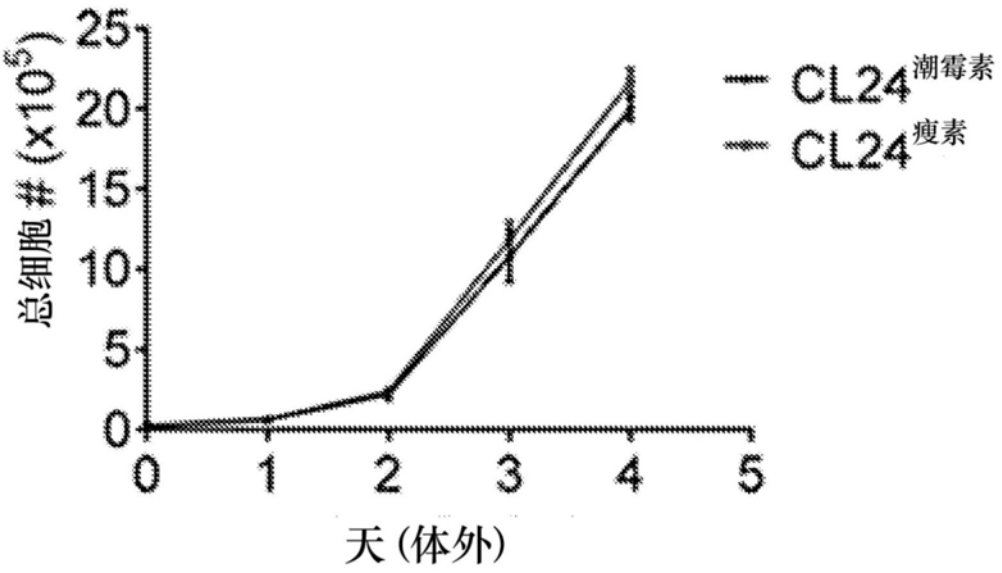


图6C

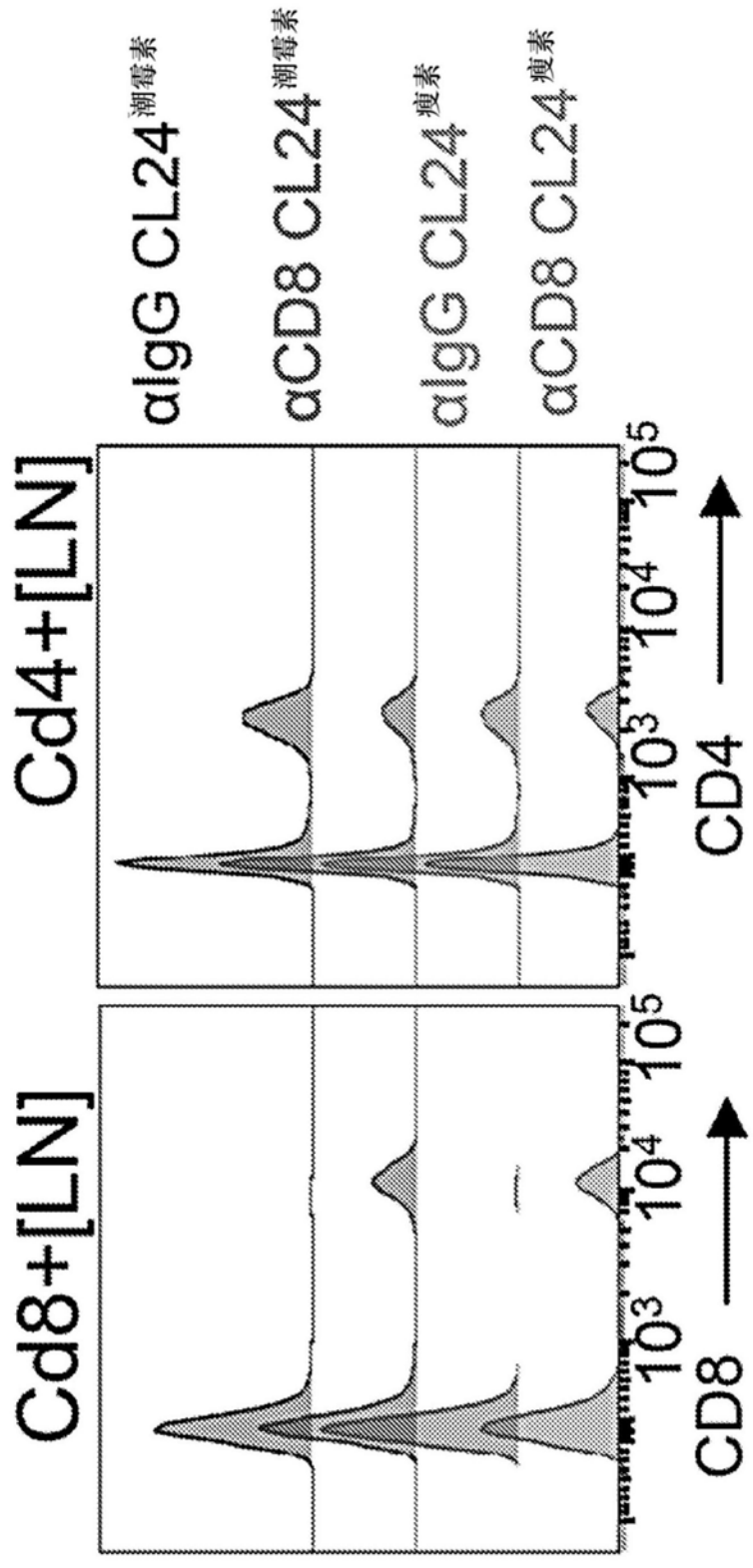

αIgG CL24 潮霉素
αCD8 CL24 潮霉素
αIgG CL24 瘦素
αCD8 CL24 瘦素
Cd4+[LN]
Cd8+[LN]
10^3
10^4
10^5
CD4
CD8

图6D

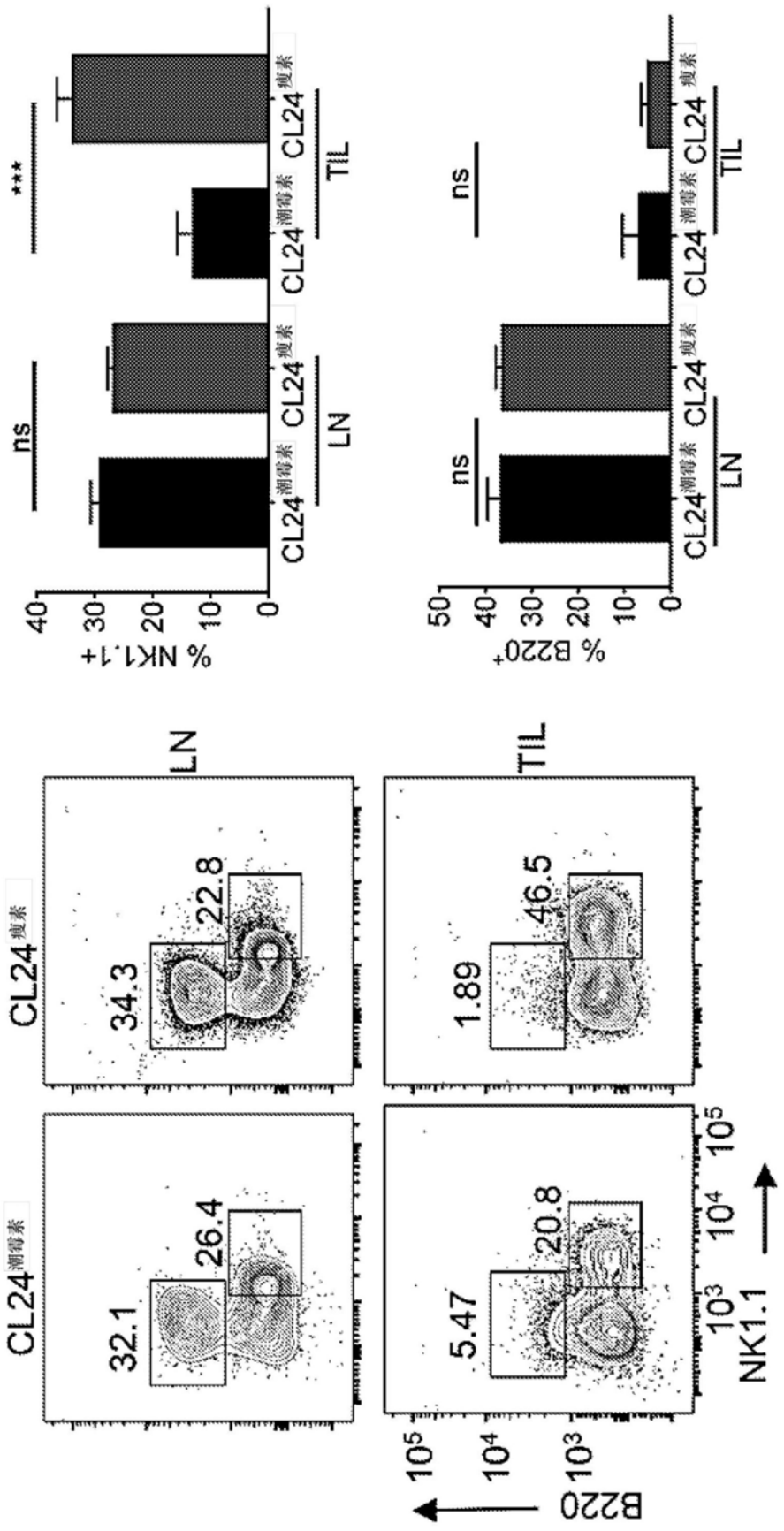

% NK1.1+
% B220+
ns
***
CL24潮霉素
CL24瘦素
LN
TIL
CL24潮霉素
CL24瘦素
32.1
26.4
34.3
22.8
5.47
20.8
1.89
46.5
B220
NK1.1
10^3
10^4
10^5

图6E

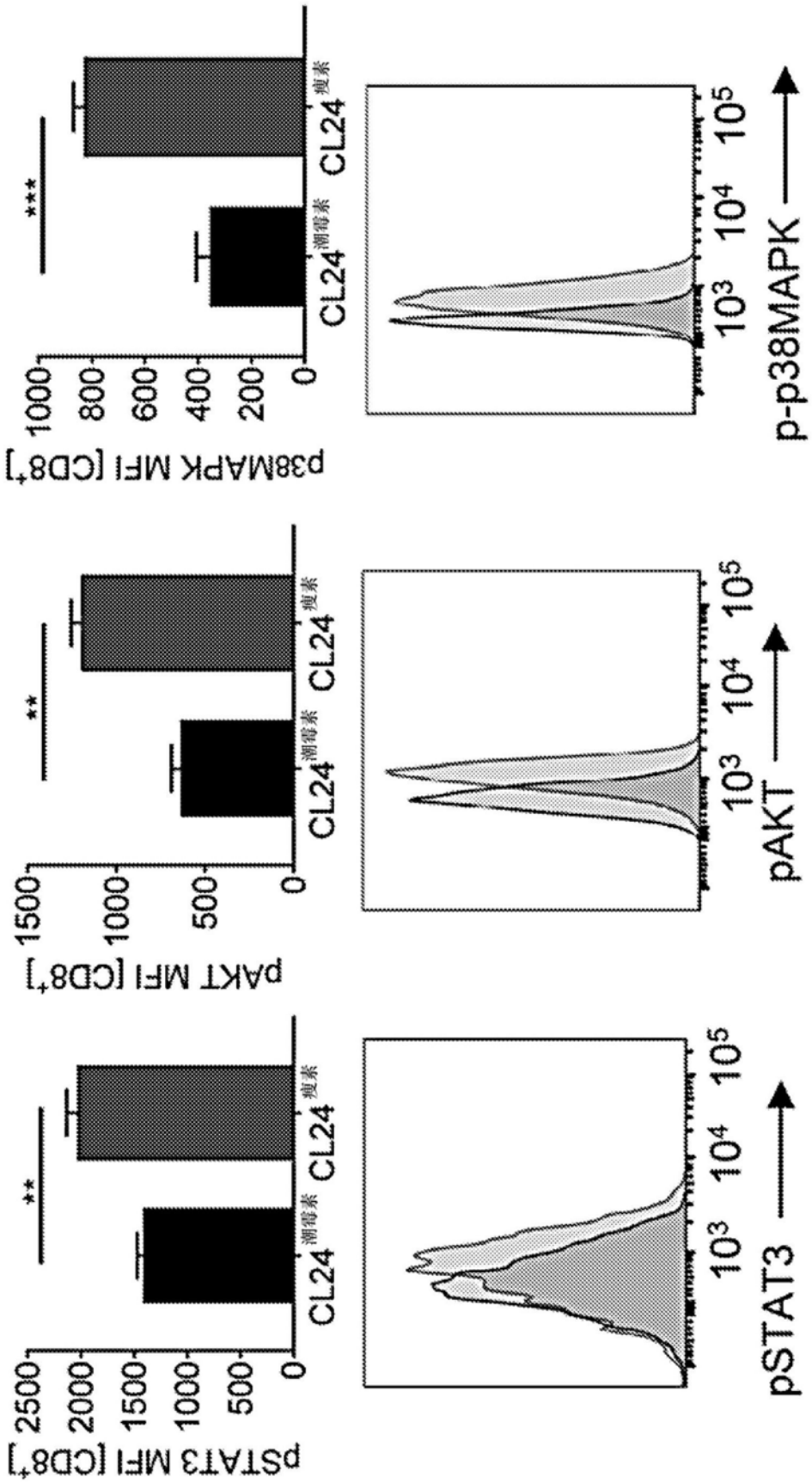

pSTAT3 MFI [CD8+]
2500
2000
1500
1000
500
0
**
CL24 潮霉素
CL24 瘦素
pSTAT3
10^3 10^4 10^5
pAKT MFI [CD8+]
1500
1000
500
0
**
CL24 潮霉素
CL24 瘦素
pAKT
10^3 10^4 10^5
p38MAPK MFI [CD8+]
1000
800
600
400
200
0
***
CL24 潮霉素
CL24 瘦素
p-p38MAPK
10^3 10^4 10^5

图6F

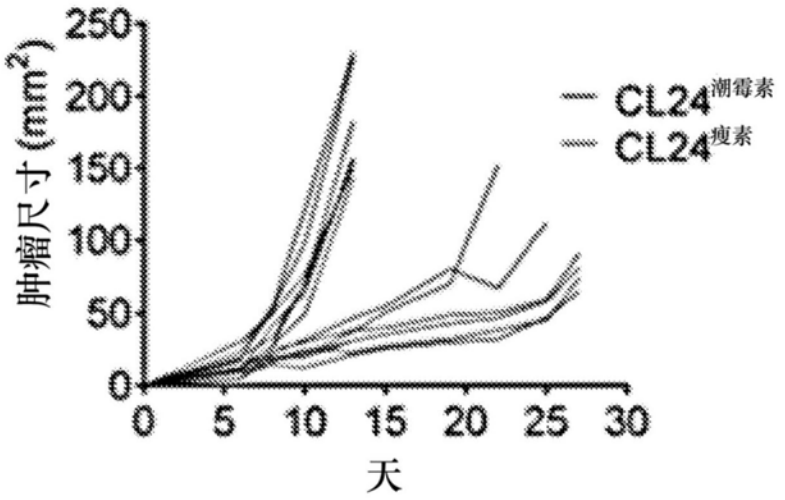

250
200
150
100
50
0
肿瘤尺寸 (mm²)
0 5 10 15 20 25 30
天
CL24潮霉素
CL24瘦素

图7A

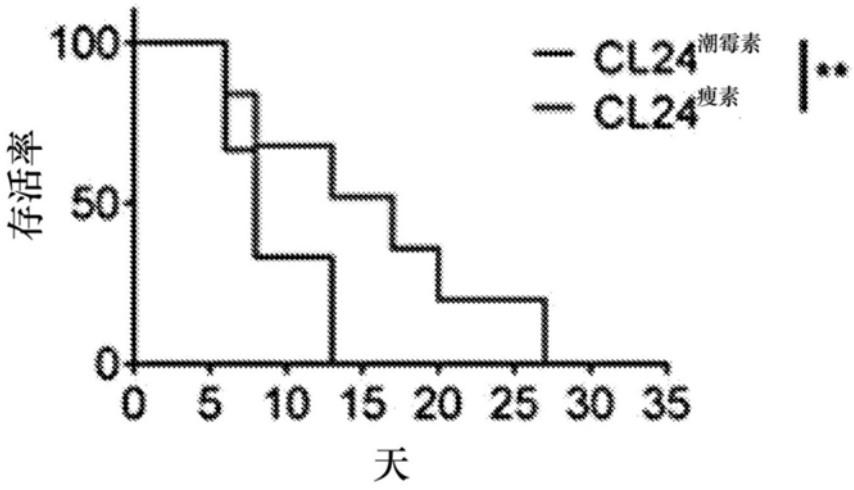

100
50
0
存活率
0 5 10 15 20 25 30 35
天
CL24潮霉素
CL24瘦素
**

图7B

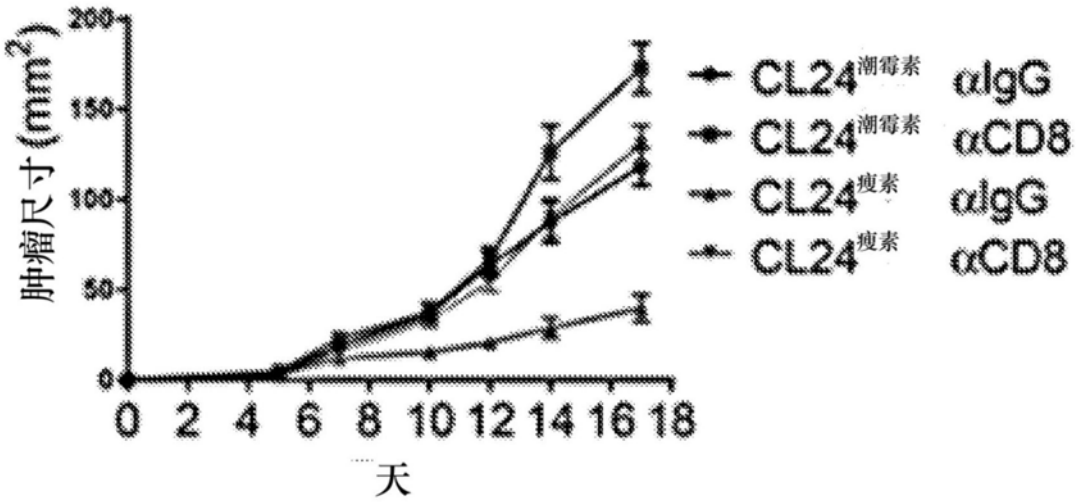

肿瘤尺寸 (mm^2)
200
150
100
50
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
天
CL24潮霉素 αIgG
CL24潮霉素 αCD8
CL24瘦素 αIgG
CL24瘦素 αCD8

图7C

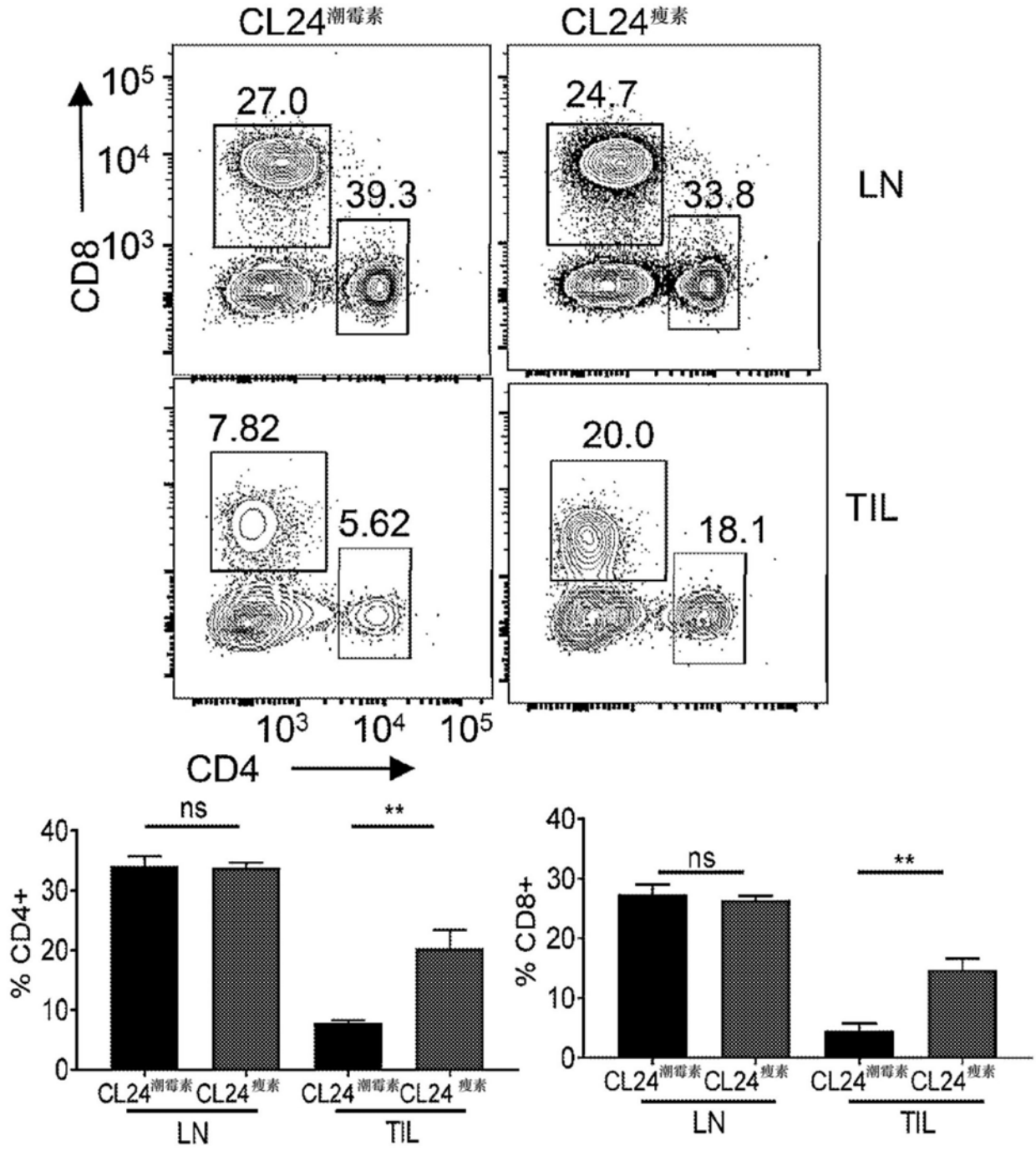

CL24潮霉素
CL24瘦素
CD8
CD4
27.0
39.3
24.7
33.8
7.82
5.62
20.0
18.1
LN
TIL
ns
**
% CD4+
% CD8+
CL24潮霉素
CL24瘦素

图7D

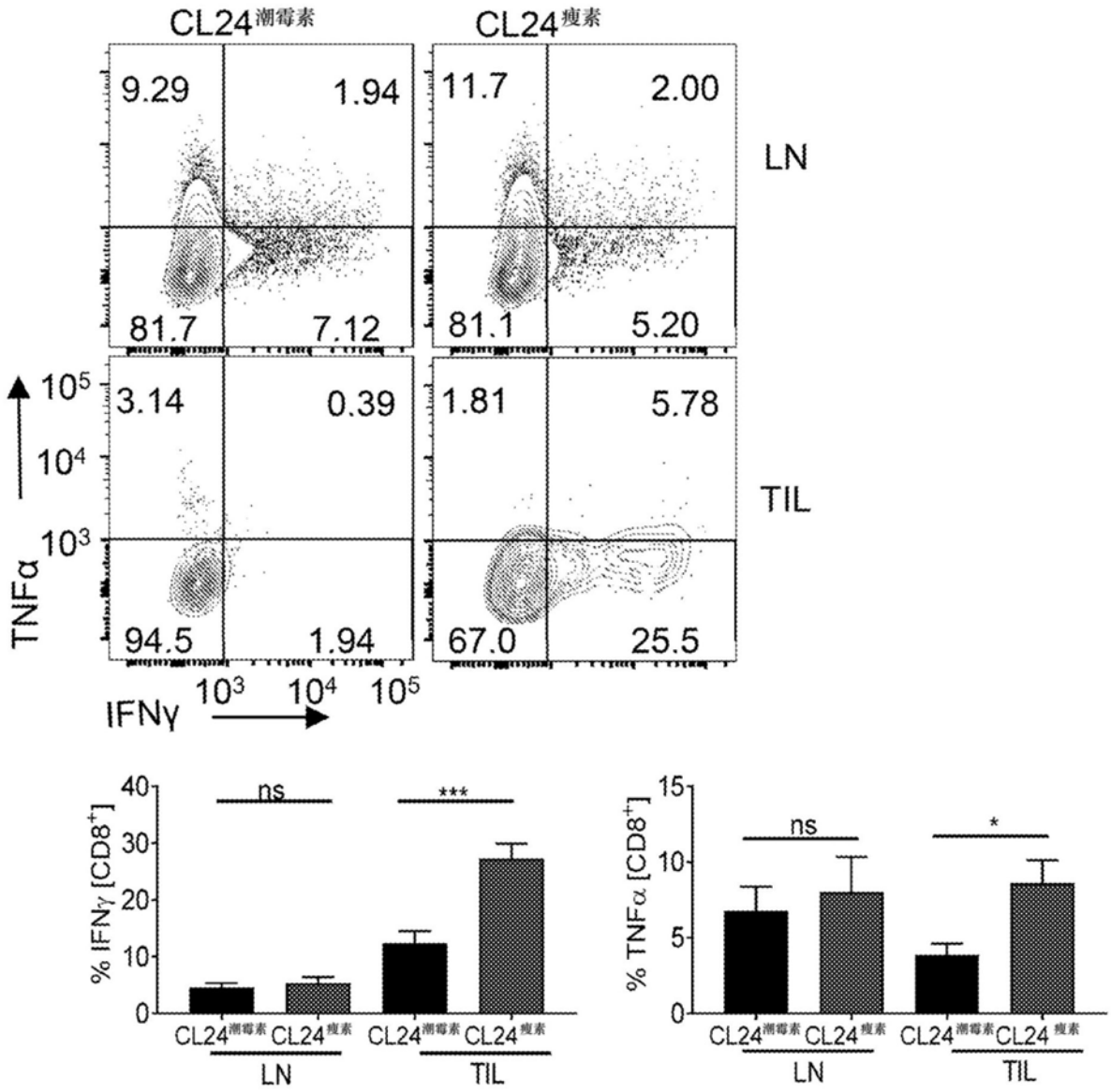
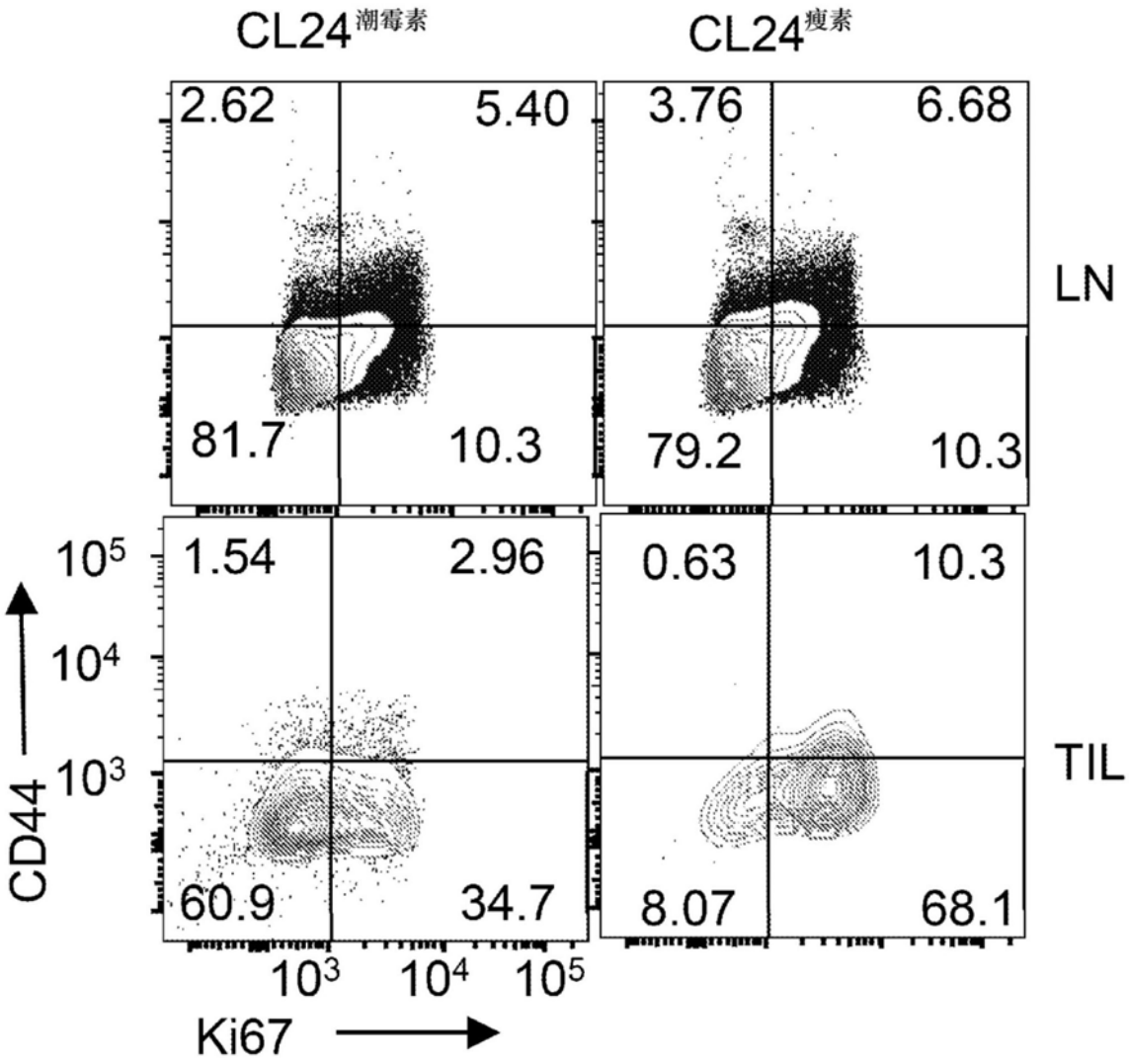

CL24潮霉素
CL24瘦素
9.29
1.94
81.7
7.12
11.7
2.00
81.1
5.20
LN
3.14
0.39
94.5
1.94
1.81
5.78
67.0
25.5
TIL
TNFα
IFNγ
10^5
10^4
10^3
% IFNγ [CD8+]
% TNFα [CD8+]
ns
***
*
LN
TIL

图7E


CL24潮霉素
CL24瘦素
2.62
5.40
3.76
6.68
LN
81.7
10.3
79.2
10.3
1.54
2.96
0.63
10.3
TIL
60.9
34.7
8.07
68.1
CD44
Ki67
10³
10⁴
10⁵

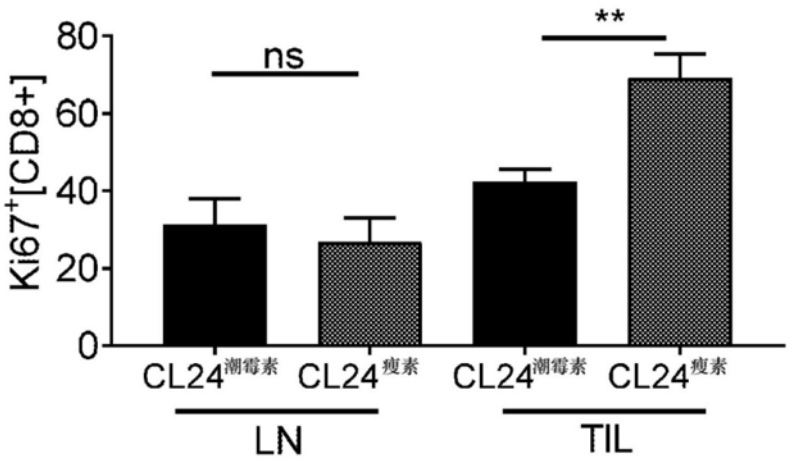

Ki67⁺[CD8+]
80
60
40
20
0
ns
**
CL24潮霉素
CL24瘦素
CL24潮霉素
CL24瘦素
LN
TIL

图7F

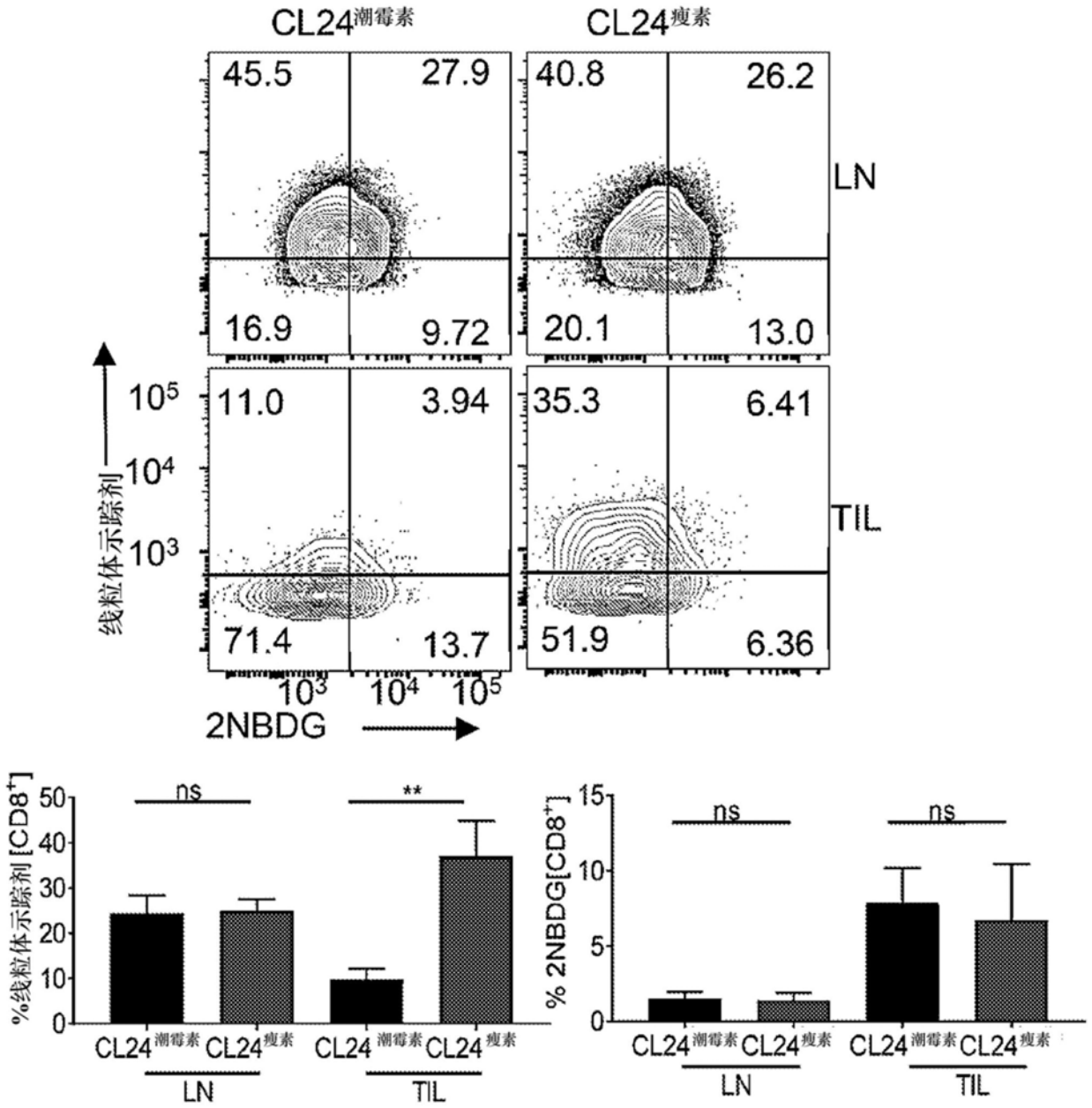

CL24潮霉素
CL24瘦素
45.5
27.9
40.8
26.2
LN
16.9
9.72
20.1
13.0
线粒体示踪剂
10^5
10^4
10^3
11.0
3.94
35.3
6.41
TIL
71.4
13.7
51.9
6.36
10^3
10^4
10^5
2NBDG
%线粒体示踪剂[CD8+]
ns
**
CL24潮霉素
CL24瘦素
LN
TIL
% 2NBDG[CD8+]
ns
ns

图7G

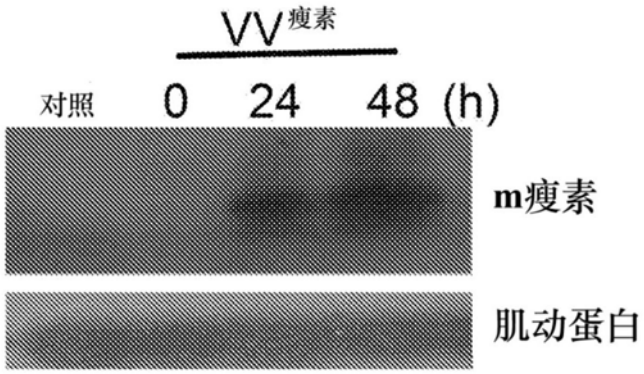


图8A

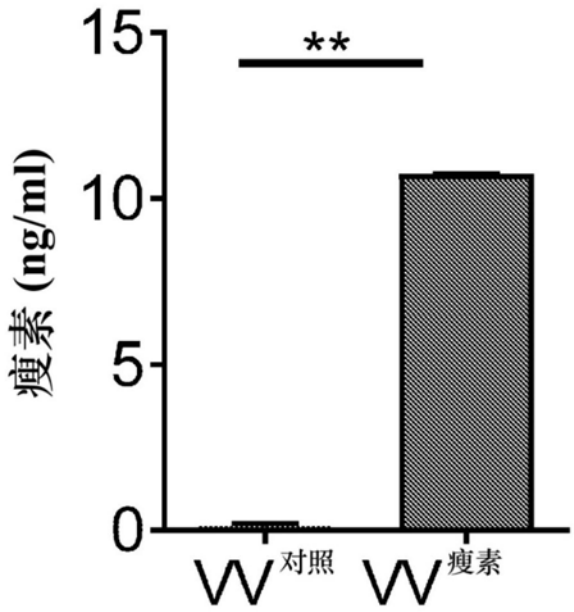


图8B

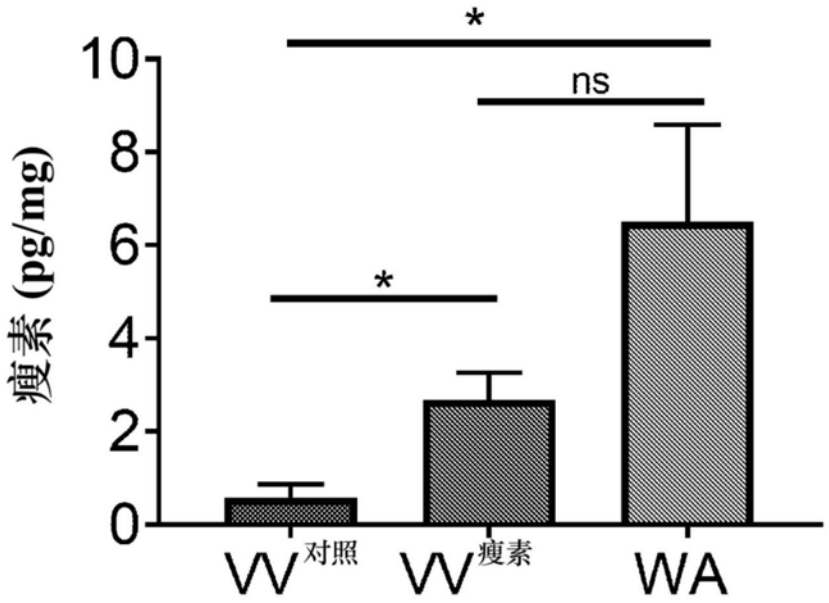


图8C

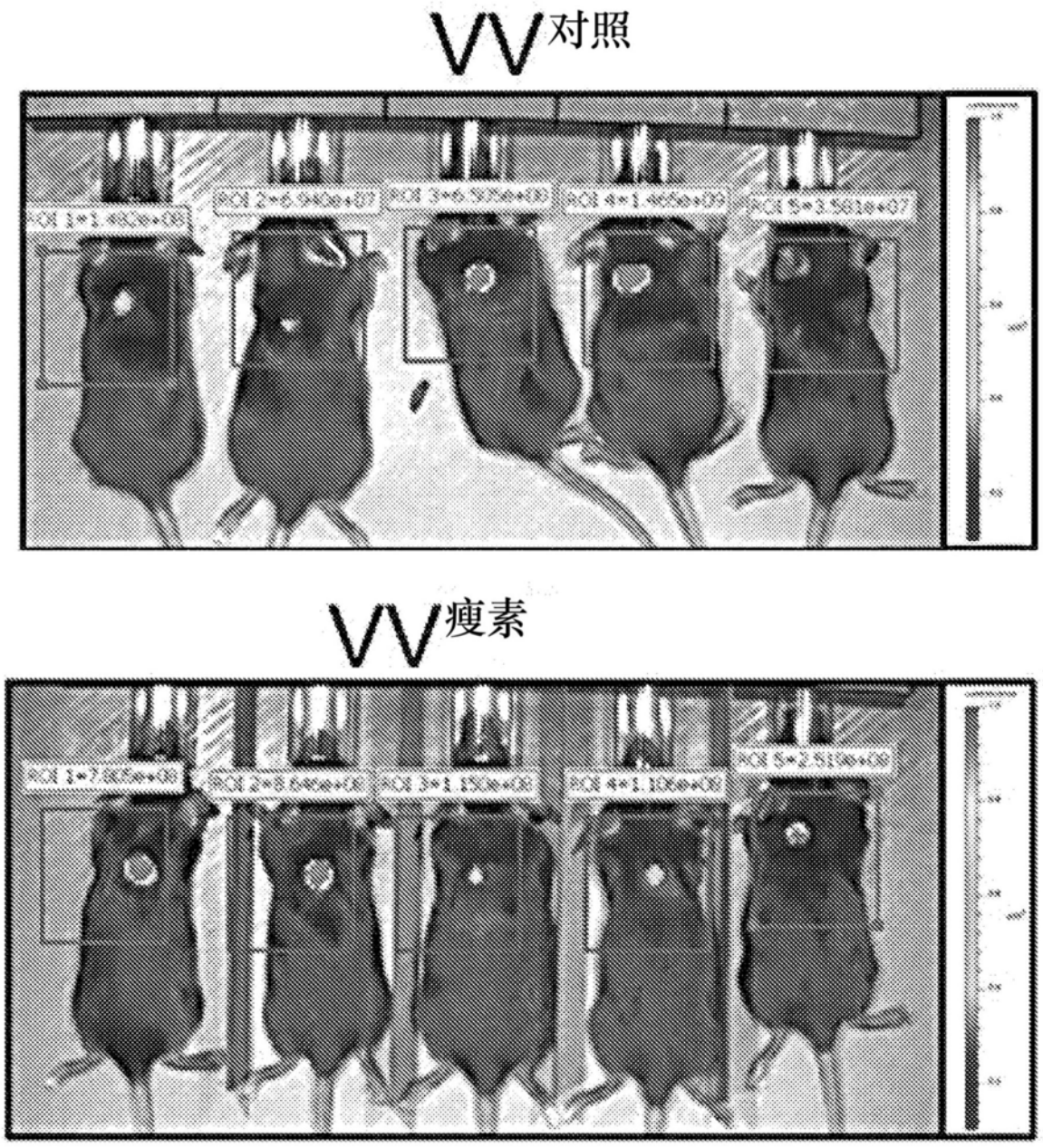


图8D

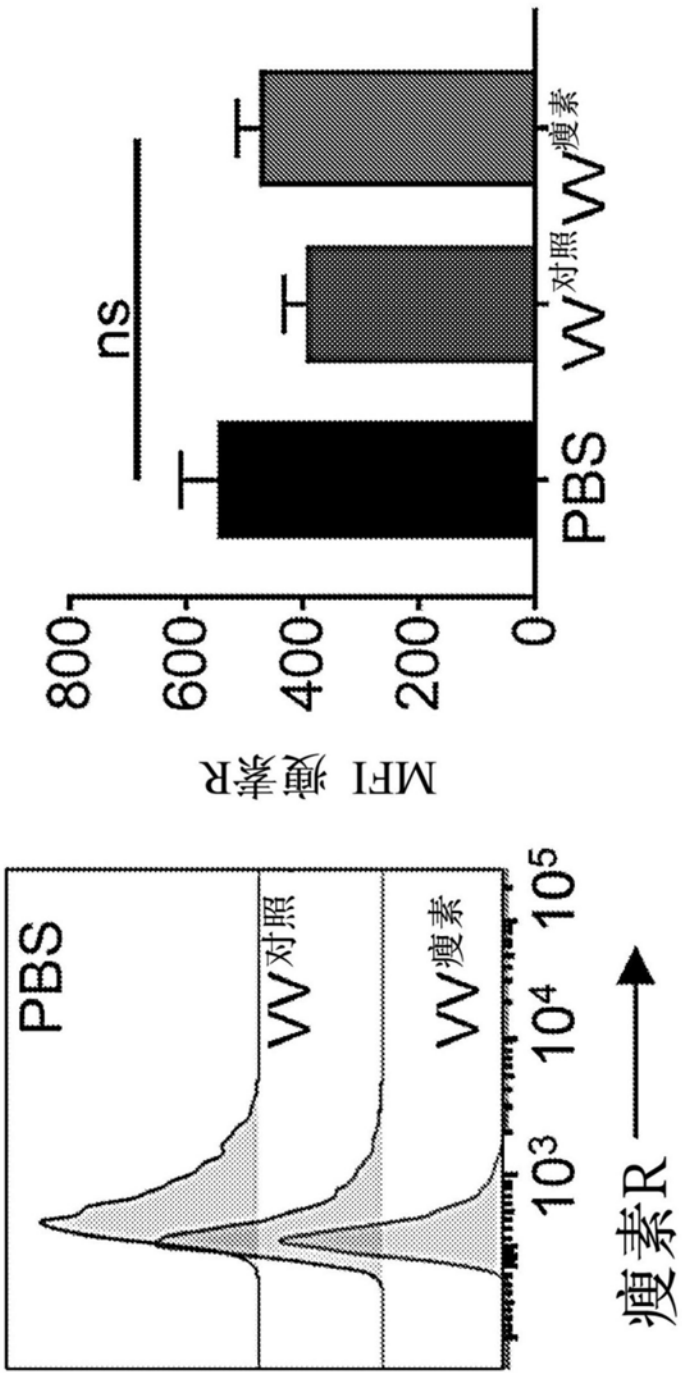

MFI 瘦素R
800
600
400
200
0
ns
PBS
VV对照
VV瘦素
PBS
VV对照
VV瘦素
10^3
10^4
10^5
瘦素R

图8E

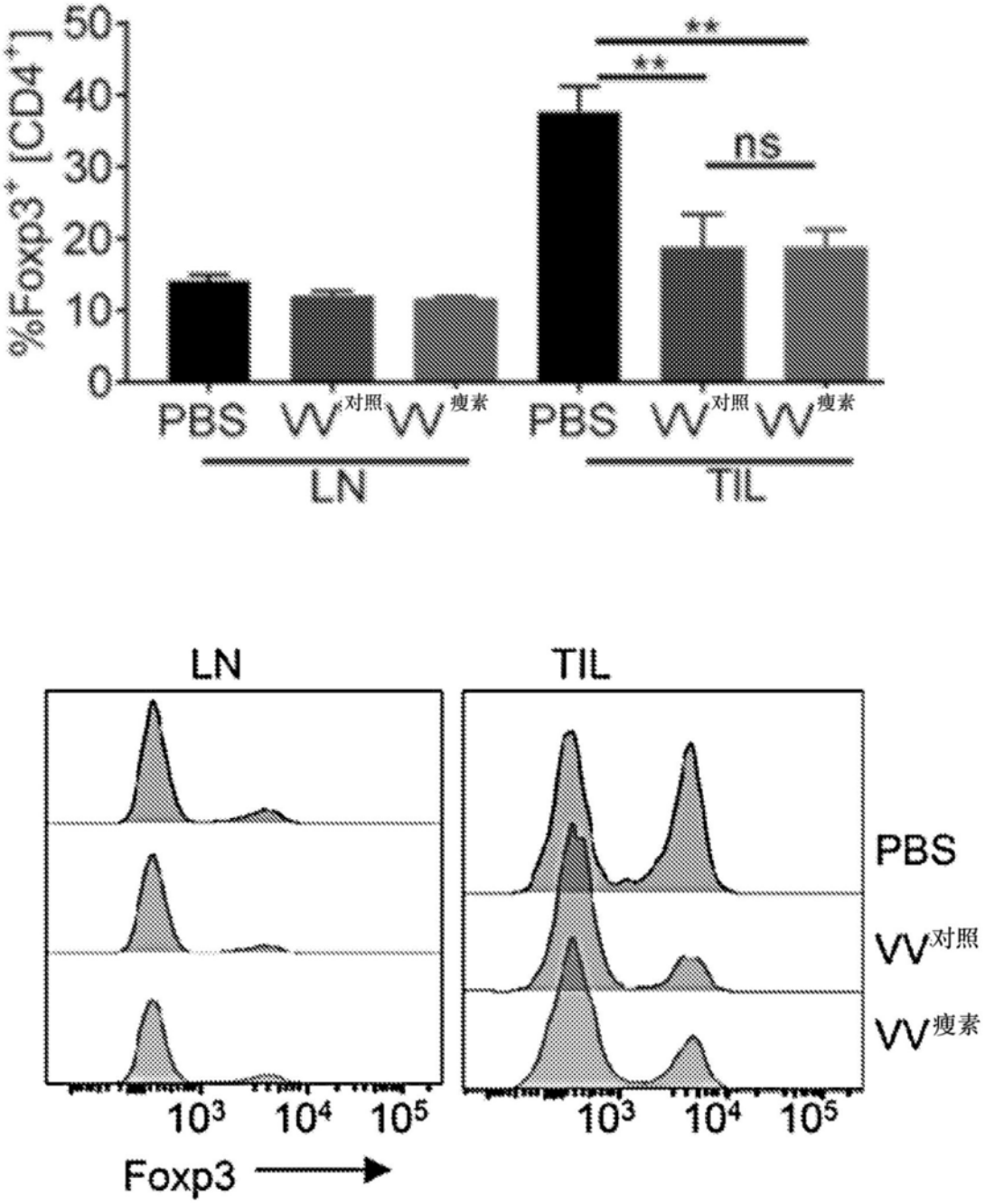

%Foxp3+ [CD4+]
50
40
30
20
10
0
**
**
ns
PBS
W对照
W瘦素
PBS
W对照
W瘦素
LN
TIL
LN
TIL
PBS
W对照
W瘦素
10³
10⁴
10⁵
10³
10⁴
10⁵
Foxp3

图8F

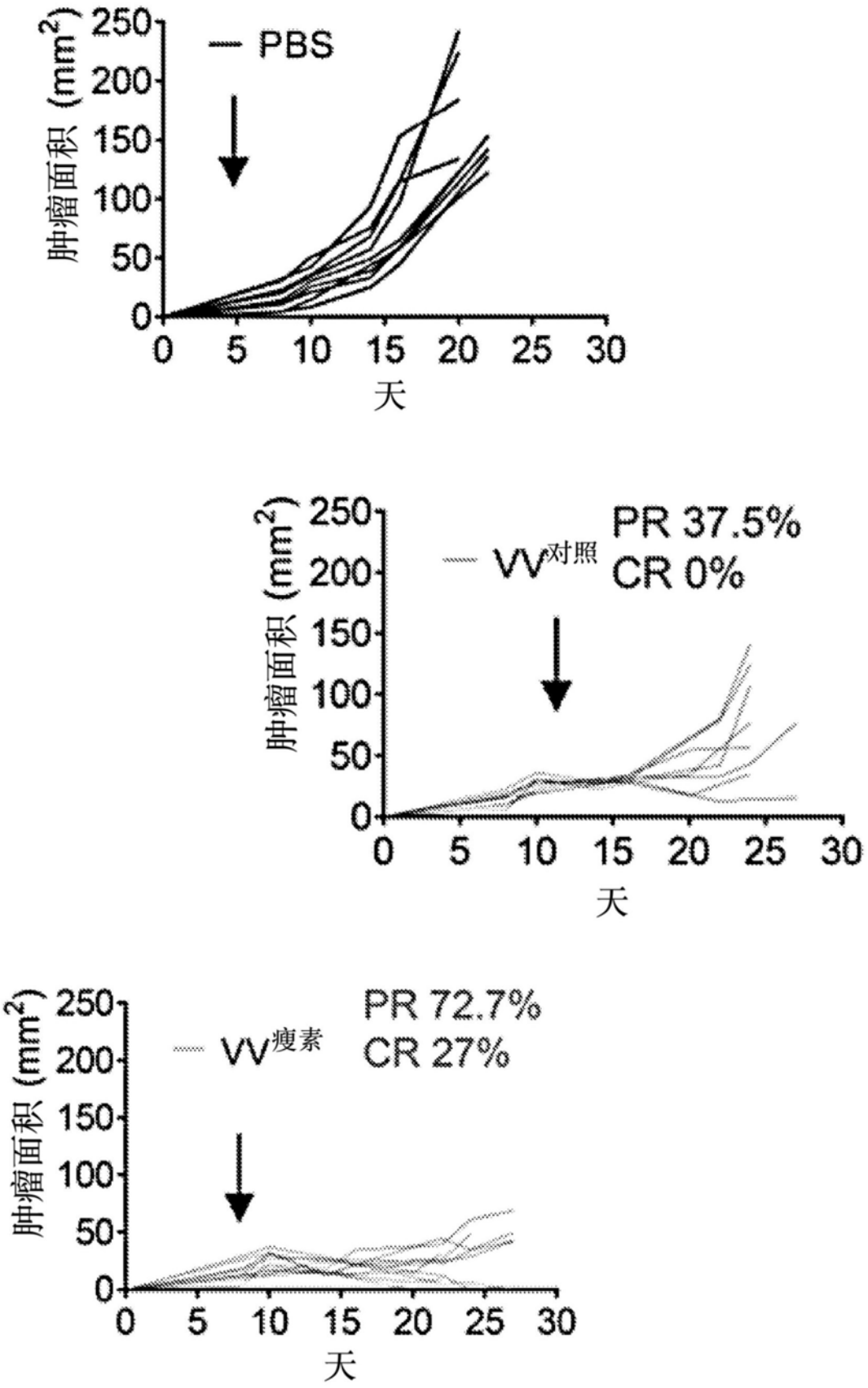

PBS
肿瘤面积 (mm^2)
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30
天
VV对照
PR 37.5%
CR 0%
肿瘤面积 (mm^2)
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30
天
VV瘦素
PR 72.7%
CR 27%
肿瘤面积 (mm^2)
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30
天

图9A

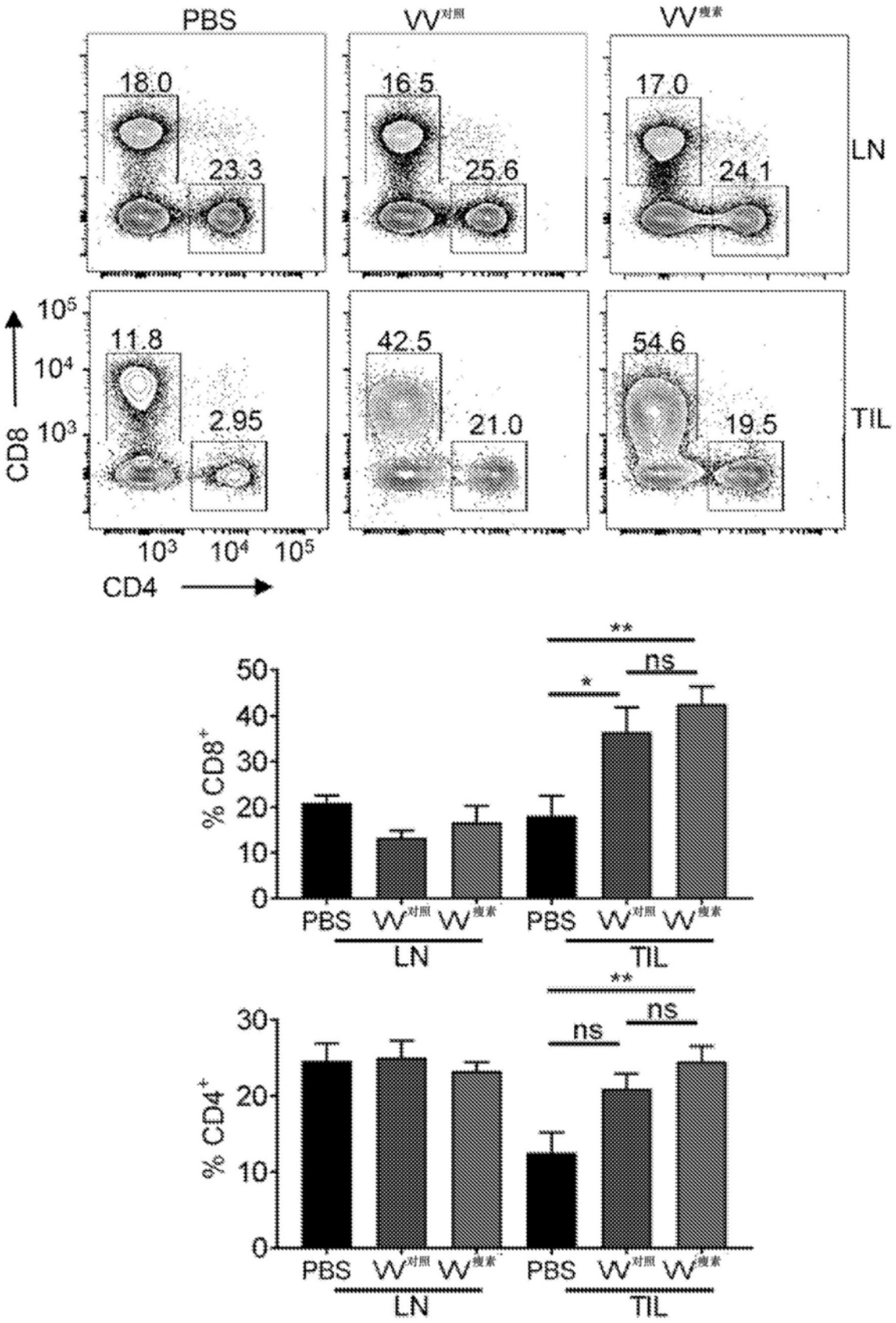
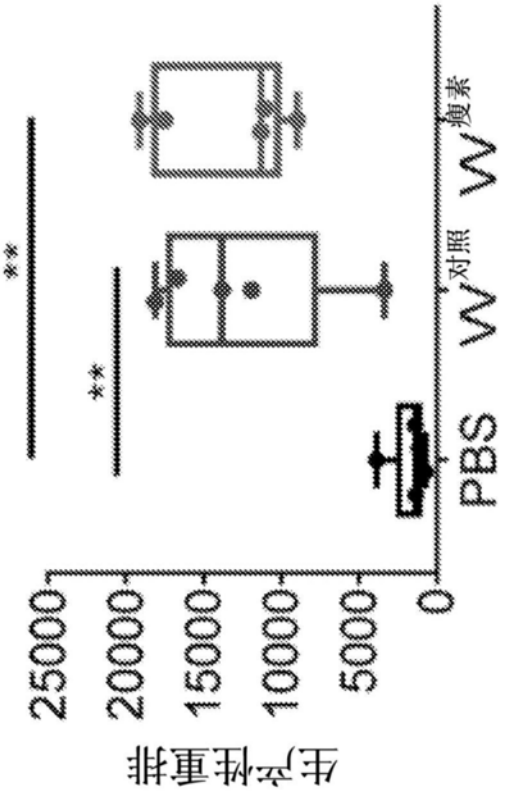

PBS
VV对照
VV痘素
18.0
23.3
16.5
25.6
17.0
24.1
LN
CD8
10^5
10^4
10^3
11.8
2.95
42.5
21.0
54.6
19.5
TIL
10^3
10^4
10^5
CD4
% CD8+
% CD4+
**
ns
*
PBS
VV对照
VV痘素
LN
TIL

图9B


生产性重排
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
W对照
W瘦素
**
**

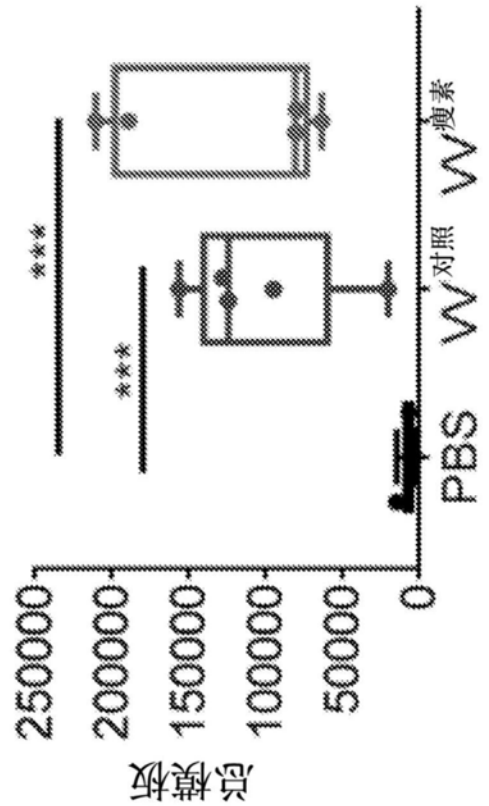

总模板
250000
200000
150000
100000
50000
0
PBS
W对照
W瘦素
***
***

图9C

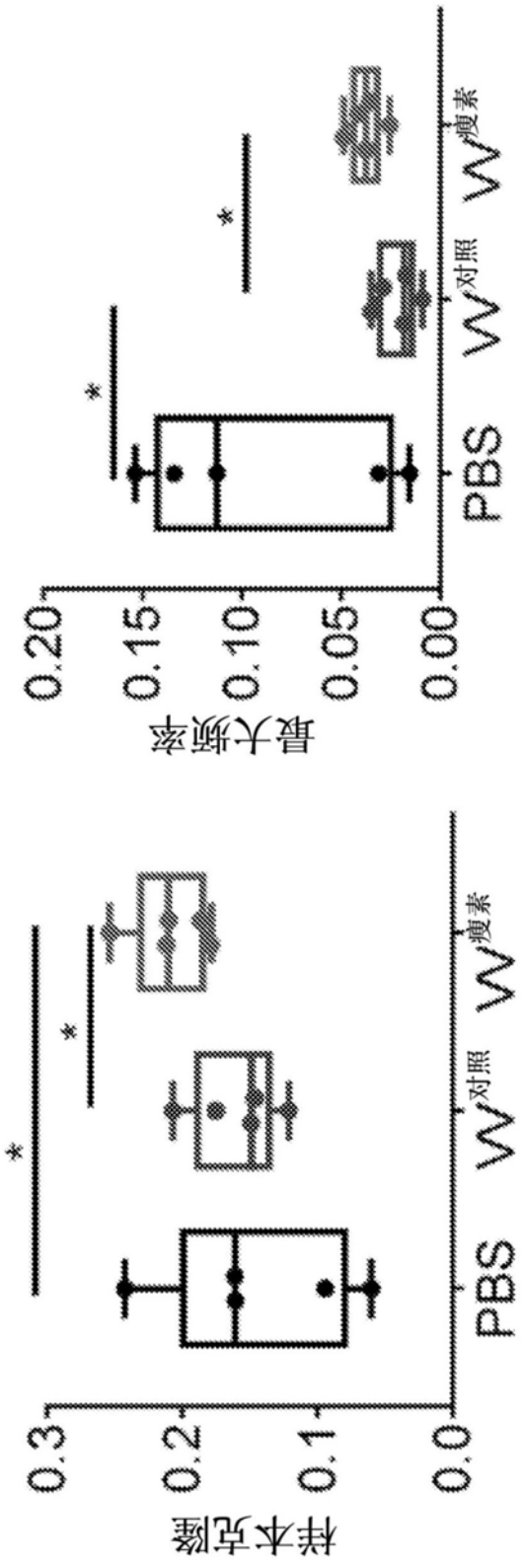


图9D

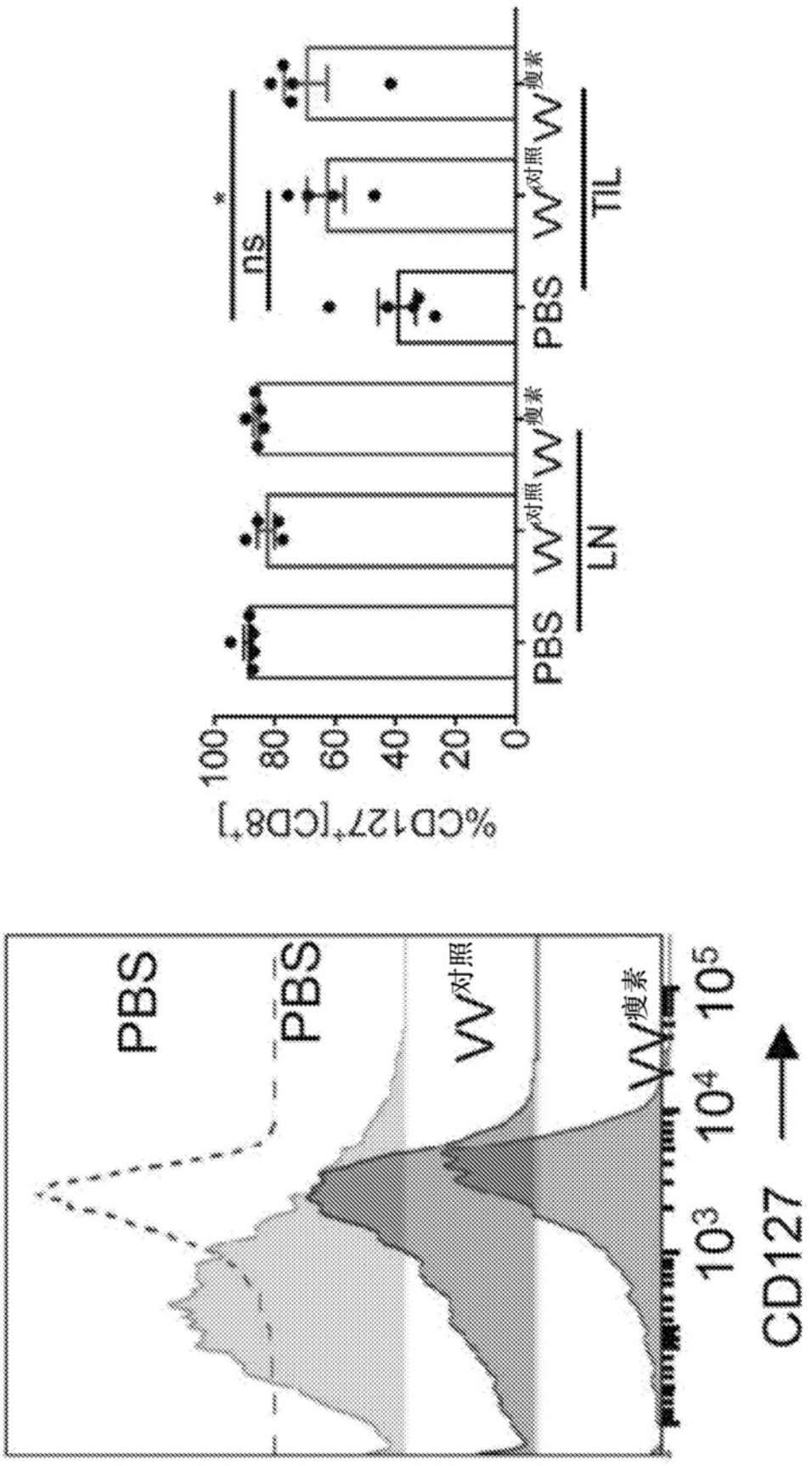

%CD127+(CD8+)
100
80
60
40
20
0
PBS
VV对照
VV瘦素
LN
PBS
VV对照
VV瘦素
TIL
ns
*
PBS
PBS
VV对照
VV瘦素
CD127
10³
10⁴
10⁵

图9E

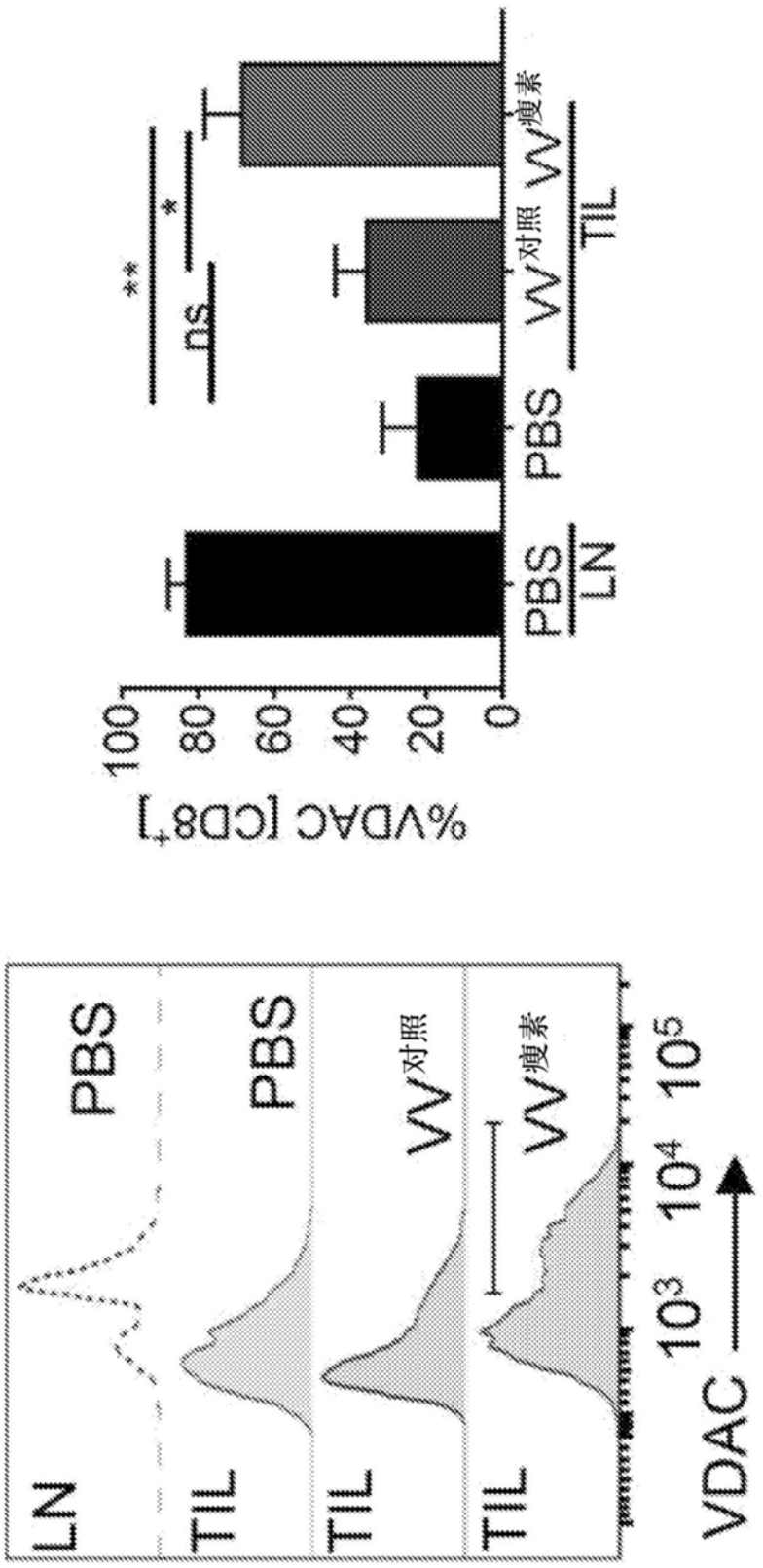

%VDAC [CD8+]
100
80
60
40
20
0
PBS
LN
PBS
VV对照
VV瘦素
TIL
ns
*
**
LN
PBS
TIL
PBS
TIL
VV对照
TIL
VV瘦素
VDAC
10^3
10^4
10^5

图10A

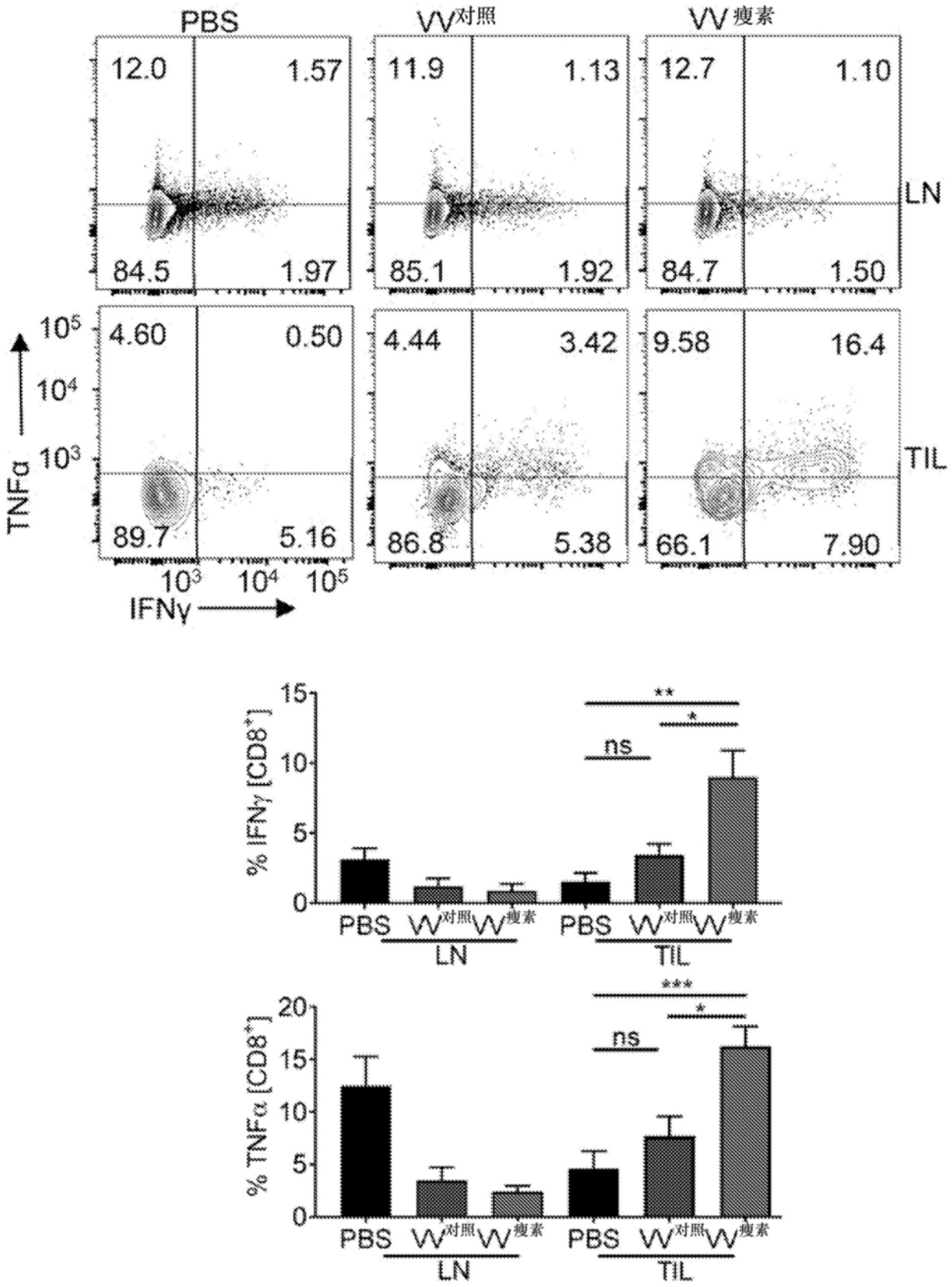

PBS
VV对照
VV痩素
12.0
1.57
84.5
1.97
11.9
1.13
85.1
1.92
12.7
1.10
84.7
1.50
LN
4.60
0.50
89.7
5.16
4.44
3.42
86.8
5.38
9.58
16.4
66.1
7.90
TIL
TNFα
IFNγ
10^5
10^4
10^3
% IFNγ [CD8+]
% TNFα [CD8+]
ns
*
**
***
PBS
LN
TIL

图10B

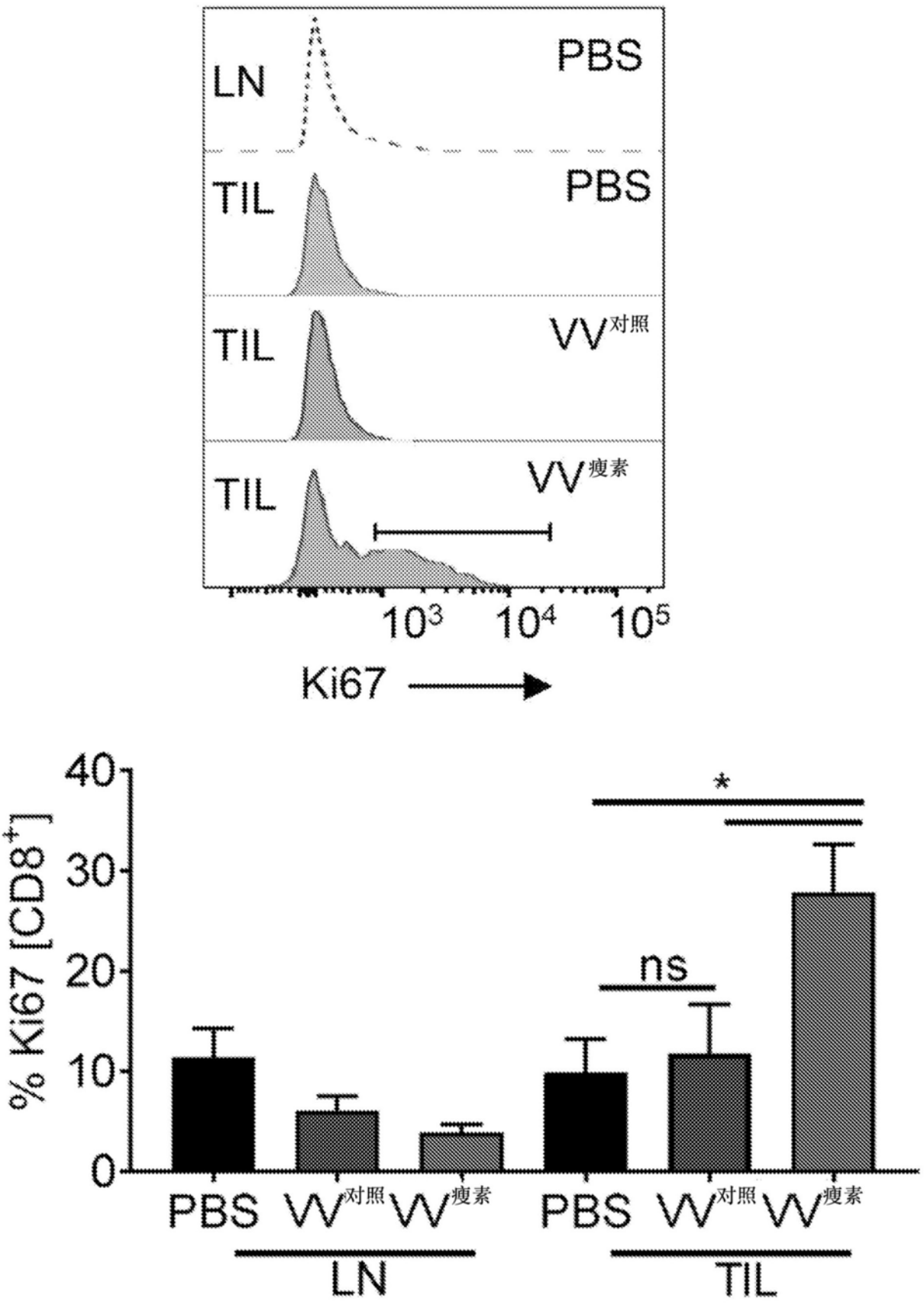

LN
PBS
TIL
PBS
TIL
VV对照
TIL
VV痩素
10³
10⁴
10⁵
Ki67
% Ki67 [CD8⁺]
40
30
20
10
0
*
ns
PBS
VV对照
VV痩素
PBS
VV对照
VV痩素
LN
TIL

图10C