



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108025056 B

(45) 授权公告日 2022.01.14

(21) 申请号 201680048316.5
 (22) 申请日 2016.06.17
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108025056 A
 (43) 申请公布日 2018.05.11
 (30) 优先权数据
 62/182,383 2015.06.19 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.02.13
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/IB2016/000993 2016.06.17
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02017/037523 EN 2017.03.09
 (73) 专利权人 新罗杰股份有限公司
 地址 韩国釜山
 (72) 发明人 黄泰皓 李南喜 赵檬 田雄培
 卞道秦
 (74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
 代理人 封新琴

A61K 39/245 (2006.01)
 A61K 39/165 (2006.01)
 A61K 35/768 (2006.01)
 A61K 9/16 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101790310 A, 2010.07.28
 CN 101708165 A, 2010.05.19
 US 2010119572 A1, 2010.05.13
 WO 2008105504 A1, 2008.09.04
 US 2014086976 A1, 2014.03.27

Jennifer Altomonte. Synergistic antitumor effects of transarterial viroembolization for multifocal hepatocellular carcinoma in rats. 《Hepatology》. 2008, 第48卷(第6期), 第1864-1873页. (续)

审查员 滕瑞芳

(51) Int. Cl.
 A61K 39/12 (2006.01)

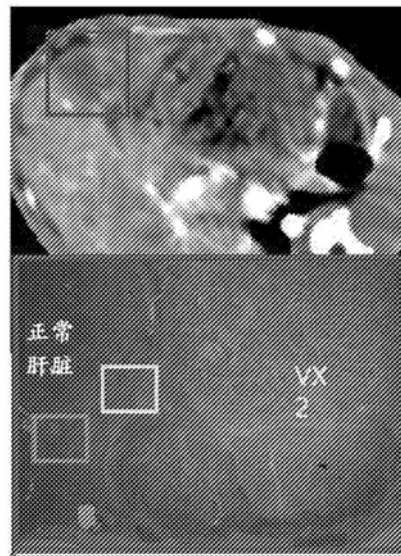
权利要求书2页 说明书44页 附图5页

(54) 发明名称

用于病毒栓塞的组合物和方法

(57) 摘要

本申请涉及用于经导管动脉病毒栓塞方法的溶瘤病毒。本申请还提供了具有所述溶瘤病毒与适合于活性栓塞的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂组合的组合物。本申请进一步提供了优选以减积肿瘤的方式使用所述溶瘤病毒和组合物的经导管动脉病毒栓塞的方法。



CN 108025056 B

[接上页]

(56) 对比文件

Jeong Heo. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer.《Nature Medicine》.2013,第19卷第329-336页.

Byeong-Ho Park. Vascular administration of adenoviral vector soaked in absorbable gelatin sponge particles (GSP) prolongs the transgene expression in hepatocytes.《Cancer Gene Therapy》.2004,第12卷第116-121页.

1. 一种组合物在制备用于哺乳动物的血管部位的活性栓塞的药物中的用途,所述组合物包含痘病毒家族的有复制能力的溶瘤病毒或疱疹病毒家族的溶瘤病毒以及适合于活性栓塞的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂,其中所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂选自自由以下组成的组:可降解的淀粉、聚乙烯醇、明胶海绵和磺化的聚乙烯醇水凝胶。

2. 如权利要求1所述的组合物的用途,其中,所述溶瘤病毒是溶瘤痘苗病毒。

3. 如权利要求2所述的组合物的用途,其中,所述溶瘤痘苗病毒不包含活性胸苷激酶基因和/或不包含活性痘苗病毒生长因子(VGF)基因。

4. 如权利要求2所述的组合物的用途,其中,所述溶瘤痘苗病毒包含编码海肾荧光素酶、绿色荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶和 β -葡糖醛酸糖苷酶的转基因。

5. 如权利要求2的组合物用途,其中,所述溶瘤痘苗病毒是Copenhagen毒株、Western Reserve毒株、Wyeth毒株或Lister毒株。

6. 如权利要求2所述的组合物的用途,其中,所述溶瘤痘苗病毒进一步包含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子蛋白、胞嘧啶脱氨酶蛋白和生长抑素2型受体蛋白中的一个或多个。

7. 如权利要求1所述的组合物的用途,其中,所述溶瘤病毒沿其最短轴的直径为至少 $0.1\mu\text{m}$,或沿其最短轴的直径为至少 $0.2\mu\text{m}$ 。

8. 如权利要求1所述的组合物的用途,其中,所述生物相容性微粒剂的微粒的大小为 $100\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}\sim 250\mu\text{m}$ 、 $250\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$,或 $300\mu\text{m}\sim 350\mu\text{m}$ 。

9. 如权利要求1所述的组合物的用途,其中,所述生物相容性微粒剂的单独微粒的大小在 $0\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 、 $0\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$ 或 $0\mu\text{m}$ 至 $25\mu\text{m}$ 内变化。

10. 如权利要求1所述的组合物的用途,其中,所述生物相容性微粒剂的每个微粒的直径的平均差为: $100\mu\text{m}$ 或更小、 $50\mu\text{m}$ 或更小、 $25\mu\text{m}$ 或更小、 $10\mu\text{m}$ 或更小、或 $5\mu\text{m}$ 或更小。

11. 如权利要求1所述的组合物的用途,其中,所述生物相容性微粒剂的单独微粒是 $10\sim 200\mu\text{m}$ 的微粒或 $10\sim 100\mu\text{m}$ 的聚集物。

12. 如权利要求1所述的组合物的用途,其中,所述亲水性聚合物凝胶剂包含 $10\sim 200\mu\text{m}$ 或 $10\sim 100\mu\text{m}$ 的颗粒。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的组合物的用途,其中,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是暂时栓塞剂或永久栓塞剂。

14. 如权利要求1-12中任一项所述的组合物的用途,其中,所述血管部位在肿瘤中,向所述肿瘤提供血液,或最接近所述肿瘤。

15. 如权利要求14所述的组合物的用途,其中,所述肿瘤是位于肝脏中的原发性肿瘤或继发性肿瘤。

16. 如权利要求15所述的组合物的用途,其中,所述肿瘤是继发性肿瘤和转移的恶性黑色素瘤。

17. 如权利要求14所述的组合物的用途,其中,所述哺乳动物是人。

18. 如权利要求14所述的组合物的用途,其与将造影剂引入到脉管系统中联合使用。

19. 如权利要求18所述的组合物的用途,其中,所述造影剂包含:甲泛葡胺、碘帕醇、碘克沙醇、碘海醇、碘普罗胺、碘比醇、碘美普尔、碘喷托、碘必乐、碘昔仑、碘曲仑、钆双胺、钆特醇、伊索显、碘佛醇或它们的组合。

20. 如权利要求14所述的组合物的用途,其中所述组合物是用于通过施用所述组合物以减小肝脏的肿瘤块来治疗癌症的组合物,其中诱导至少75%的栓塞的肿瘤块的坏死,并且所述组合物被引入肝动脉中。

21. 如权利要求1-12中任一项所述的组合物的用途,其中所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是明胶海绵。

用于病毒栓塞的组合物和方法

技术领域

[0001] 本申请涉及与使用溶瘤病毒的经动脉栓塞有关的组合物和方法。

背景技术

[0002] 治疗血管阻塞(栓塞)是通过将阻塞剂(栓塞物质)注射到血管中用来原位治疗病理状态的技术。通过导管进行栓塞,这使在循环系统中放置特定阻塞剂或凝胶(栓子)成为可能。在活性栓塞治疗中,栓塞剂与治疗剂(如药物或化学治疗剂)一起配制,这导致机械堵塞和治疗剂的原位递送。也已经建立了在癌症治疗中使用栓塞。例如,通过将栓塞物质注射到血管中故意堵塞滋养癌性肿瘤的血管。血管阻塞可限制外科手术期间的失血,并且有助于肿瘤坏死和衰退。将阻塞剂与化学治疗剂组合可允许将化学治疗剂直接递送到肿瘤而没有显著的全身递送,这允许使用较高剂量的化学治疗剂。

[0003] 已经广泛使用经动脉栓塞(TAE)或经动脉化学栓塞(TACE)来治疗患有局限于肝脏的多血管肿瘤或肝脏内的组分是发病率和死亡率的主要来源的肿瘤的患者。认为TAE/TACE是不可切除的肿瘤的有效姑息护理或者是管理术后再发性肿瘤的佐剂(Camma et al., (2002) *Radiology*, 224:47-54; Llovet et al., (2002) *Lancet* 359:1734-1739; Jelic et al., (2010) *Ann Oncol.* 21Suppl 5:v59-v64)。已经使用多种栓塞剂和化学治疗剂,尽管尚未证明明确优于任何特定方案或化学治疗(Nakamura et al., (1994) *Cancer Chemother Pharmacol* 33Suppl:S89-S92; Bruix et al., (2004) *Gastroenterology* 127:S179-S188)。

[0004] 平行地,正在开发溶瘤病毒用于治疗癌症。例如,复制选择溶瘤病毒有希望用于治疗癌症(Kirn et al., (2001) *Nat. Med.*, 7(7):781-787)。这些病毒可通过直接复制依赖和/或病毒基因表达依赖溶瘤作用导致肿瘤细胞死亡(Kirn et al., (2001) *Nat. Med.*, 7(7):781-787)。另外,病毒能够增强诱导宿主中的细胞介导的抗肿瘤免疫力(Todo et al., (2001) *Cancer Res.*, 61:153-161; Sinkovics et al., (2000) *J. Clin. Viro.*, 16:1-15)。还可工程改造这些病毒来表达肿瘤中的治疗转基因,以增强抗肿瘤功效(Hermiston, (2000) *J. Clin. Invest.*, 105:1169-1172)。

[0005] 然而,主要局限存在于这些治疗方法。尽管可证明一些病毒物种的天然肿瘤选择性的程度,新方法仍需要工程改造和/或增强溶瘤病毒的肿瘤选择性以最大化安全性和功效。当使用静脉内施用,和当将潜在毒性治疗基因添加到这些病毒以增强抗肿瘤潜力时,该选择性特别重要;在正常组织中会需要紧紧地限制基因表达。另外,通过另外的机制如诱导抗肿瘤免疫力或靶向肿瘤相关的脉管系统增加的抗肿瘤潜力是非常可取的。因此,需要用于治疗癌症的更有效和更小毒性的治疗。

[0006] 已经开始尝试组合溶瘤病毒治疗与栓塞。已经在肿瘤模型中测试疱疹性口炎病毒(VSV)的溶瘤形式(Altomonte et al. (2008) *Hepatology* 48:1864-1873)。VSV是测试栓塞的理想候选者。VSV,弹状病毒家族的成员,是负义RNA病毒,长180nm且宽75nm。VSV进入极性细胞的基底外侧表面,并从中释放。VSV的基底外侧释放允许其容易地感染下面的组织,其包括肿瘤组织(Basak et al., (1989) *J. Virology*, 63(7):3164-3167)。另外,VSV的大小,特

别是其最小轴的直径为75nm,允许其通过血管细胞之间的泄露连接,允许感染下面的组织并且通过血管细胞的基底外侧表面。由于其大小小,并且基底表面芽殖,本领域的技术人员可预期在VSV的病毒栓塞期间成功感染肿瘤组织。

[0007] 鉴于VSV的理想特征,难以推算其他溶瘤病毒。例如,沿最小轴的直径大于血管的细胞之间的连接的病毒可能不能从血流传递到周围组织。相似地,从极性细胞的顶端侧释放的病毒通常局限于沿上皮细胞内衬的感染 (Basak et al. (1989) *J.Virology*, 63 (7) : 3164-3167)。当这样的病毒感染极性内皮血管细胞时,如果从顶端释放,复制的病毒可简单地被释放回到血流中,而不是回到下面的组织中。痘苗病毒是具有许多不需要的特征的病毒的实例,所述特征可被预期以防止有效栓塞。痘苗病毒 (VV),痘病毒家族的成员,是大小为约360nm×250nm的大病毒。痘苗病毒优选地通过极性细胞的基底外侧表面感染,但是其病毒后代从顶端表面释放 (Vermeer et al., (2007) *J.Virology*, 81 (18) : 9891-9899)。因此由创造血管壁的极性内皮细胞从顶端释放的病毒处于被血流冲走的风险。另外,由于其大小大,痘苗病毒应该难以通过血管壁的细胞之间的细胞连接到达内皮细胞的基底外侧表面并且随后以任何相当大的量感染下面的组织。基于其生命周期和大小,不能从VSV结果推算出溶瘤病毒度或从顶端表面释放的其他大病毒或病毒,就此而言,能够实现现在血管栓塞期间显著渗透到肿瘤中。

[0008] 本文应用的所有参考文献,其包括专利申请和专利公开,通过提述以其整体由此并入。

发明内容

[0009] 本发明的一些方面是基于以下发现:溶瘤痘苗病毒(不管大小和从极性细胞的顶端释放),作为示例性溶瘤病毒,可与栓塞疗法组合以令人惊奇有效的方式使用。

[0010] 本发明的一方面包括组合物,其包含溶瘤痘病毒、溶瘤疱疹病毒或溶瘤麻疹病毒,和适合于活性栓塞的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是选自下组的痘病毒:痘苗病毒、粘液瘤病毒和副痘病毒。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是溶瘤痘苗病毒。在一些实施方式中,所述溶瘤痘苗病毒不包含活性胸苷激酶基因。在一些实施方式中,所述实施方式可与包括溶瘤痘苗病毒的任何前述实施方式组合,所述溶瘤痘苗病毒不包含活性痘苗病毒生长因子 (VGF) 基因。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括溶瘤痘苗病毒的任何前述实施方式组合,所述溶瘤痘苗病毒包含编码海肾荧光素酶 (*Renilla luciferase*)、绿色荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶和 β -葡糖醛酸糖苷酶的转基因。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括溶瘤痘苗病毒的任何前述实施方式组合,所述溶瘤痘苗病毒是Copenhagen毒株、Western Reserve毒株、Wyeth毒株或Lister毒株。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括溶瘤痘苗病毒的任何前述实施方式组合,所述溶瘤痘苗病毒进一步包含粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子蛋白、胞嘧啶脱氨酶蛋白和生长抑素2型受体蛋白中的一个或多个。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是选自下组的疱疹病毒:单纯疱疹病毒-1、单纯疱疹病毒-2和巨细胞病毒。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是单纯疱疹病毒1。在某些实施方式中,所述单纯疱疹病毒-1源自毒株JS-1。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括单纯疱疹病毒-1的任何前述实施方式组合,所述单纯疱疹病毒-1具有以下一个或多个:失活的ICP34.5基因、失活的ICP45基因、US11基因的更早插入、失活的ICP6

基因、人粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子基因和硝基还原酶基因。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括单纯疱疹病毒-1的任何前述实施方式组合,所述单纯疱疹病毒-1具有失活的ICP34.5基因、失活的ICP45基因和人粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子基因。在一些实施方式中,溶瘤病毒是粘液瘤病毒。在一些实施方式中,所述粘液瘤病毒源自毒株Lausanne。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括粘液瘤病毒的任何前述实施方式组合,所述粘液瘤病毒具有选自以下的一个或多个失活基因:M010L、M011L、M-T5、M151R、M001R、M152R、M153R、M154L、M156R、M008.1R、M008R、M007R、M006R、M005R、M004.1R、M004R、M003.2R、M003.1R和M002R。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是副痘病毒。在一些实施方式中,所述副痘病毒源自羊传染性口疮病毒毒株。在一些实施方式中,所述羊传染性口疮病毒毒株选自OV NZ-2、OV NZ-7和OV-SA00。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括副痘病毒的任何前述实施方式组合,所述副痘病毒具有一个或多个异源宿主范围基因的插入。在一些实施方式中,所述异源宿主范围基因选自SPI-1、SPI-2、KIL、C7L、p28/N1R、B5R、E3L、K3L、M-T2、M-T4、M-T5、M11L、M13L、M063和F11L。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是麻疹病毒。在一些实施方式中,所述麻疹病毒源自埃德蒙顿(Edmonston)毒株、Moraten毒株、伦宁格拉德(Leningrad)毒株、莫斯科(Moscow)毒株或施瓦茨(Schwarz)毒株。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括麻疹病毒的任何前述实施方式组合,所述麻疹病毒具有编码人甲状腺碘化钠同向转运蛋白(NIS)的基因的插入。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述溶瘤病毒沿其最短轴的直径为至少0.1 μm 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述溶瘤病毒沿其最短轴的直径为至少0.2 μm 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂选自由以下组成的列表:可降解的淀粉、聚乙烯醇、明胶海绵和磺化的聚乙烯醇水凝胶。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂的微粒的大小为100 μm ~2000 μm 、150 μm ~350 μm 、150 μm ~200 μm 、200 μm ~250 μm 、250 μm ~300 μm ,或大小为300 μm ~350 μm 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒在以下大小变化:约0 μm 至约100 μm 、约0 μm 至约50 μm 或约0 μm 至约25 μm 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒具有以下直径的平均差:100 μm 或更小、约50 μm 或更小、约25 μm 或更小、约10 μm 或更小或约5 μm 或更小。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒是10~200 μm 或10~100 μm 的颗粒的聚集物。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括亲水性聚合物凝胶剂的任何前述实施方式组合,所述亲水性聚合物凝胶剂包含10~200 μm 或10~100 μm 的颗粒。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是暂时栓塞剂或永久栓塞剂。

[0011] 本发明的另一方面包括组合物,其包含沿病毒的最短轴的直径为至少0.1 μm 的溶瘤病毒和适合于活性栓塞的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒沿其最短轴的直径为至少0.15 μm 或至少0.2 μm 。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒沿病毒的最短轴的直径为0.1-0.2 μm 、0.2-0.3 μm 、0.3-0.4 μm 、0.4-0.5 μm 、0.5-0.6 μm 、0.6-0.7 μm 、0.1-0.7 μm 、0.15-0.7 μm 或0.2-0.7 μm 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合物,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂选自由以下组成的

列表:可降解的淀粉、聚乙烯醇、明胶海绵和磺化的聚乙烯醇水凝胶。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合物,所述生物相容性微粒剂的微粒的大小为 $100\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}\sim 350\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}\sim 250\mu\text{m}$ 、 $250\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$,或大小为 $300\mu\text{m}\sim 350\mu\text{m}$ 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合物,生物相容性微粒剂的单独微粒在以下大小变化:约 $0\mu\text{m}$ 至约 $100\mu\text{m}$ 、约 $0\mu\text{m}$ 至约 $50\mu\text{m}$ 或约 $0\mu\text{m}$ 至约 $25\mu\text{m}$ 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒具有以下直径的平均差: $100\mu\text{m}$ 或更小、约 $50\mu\text{m}$ 或更小、约 $25\mu\text{m}$ 或更小、约 $10\mu\text{m}$ 或更小或约 $5\mu\text{m}$ 或更小。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒是 $10\sim 200\mu\text{m}$ 或 $10\sim 100\mu\text{m}$ 的颗粒的聚集物。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括亲水性聚合物凝胶剂的任何前述实施方式组合,所述亲水性聚合物凝胶剂包含 $10\sim 200\mu\text{m}$ 或 $10\sim 100\mu\text{m}$ 的颗粒。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是暂时栓塞剂或永久栓塞剂。

[0012] 本发明的还一方面包括组合物,其包含从感染的极性细胞的顶端芽殖的溶瘤病毒,和适合于活性栓塞的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂。在某些实施方式中,所述溶瘤病毒沿其最短轴的直径为至少 $0.1\mu\text{m}$ 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述溶瘤病毒沿其最短轴的直径为至少 $0.2\mu\text{m}$ 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂选自以下组成的列表:可降解的淀粉、聚乙烯醇、明胶海绵和磺化的聚乙烯醇水凝胶。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂的微粒的大小为 $100\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}\sim 350\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}\sim 250\mu\text{m}$ 、 $250\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$,或大小为 $300\mu\text{m}\sim 350\mu\text{m}$ 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒在以下大小变化:约 $0\mu\text{m}$ 至约 $100\mu\text{m}$ 、约 $0\mu\text{m}$ 至约 $50\mu\text{m}$ 或约 $0\mu\text{m}$ 至约 $25\mu\text{m}$ 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒具有以下直径的平均差: $100\mu\text{m}$ 或更小、约 $50\mu\text{m}$ 或更小、约 $25\mu\text{m}$ 或更小、约 $10\mu\text{m}$ 或更小或约 $5\mu\text{m}$ 或更小。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒是 $10\sim 200\mu\text{m}$ 或 $10\sim 100\mu\text{m}$ 的颗粒的聚集物。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括亲水性聚合物凝胶剂的任何前述实施方式组合,所述亲水性聚合物凝胶剂包含 $10\sim 200\mu\text{m}$ 或 $10\sim 100\mu\text{m}$ 的颗粒。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是暂时栓塞剂或永久栓塞剂。

[0013] 本发明的又一方面包括溶瘤病毒和适合于活性栓塞的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂,其中,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂使来自体外培养的肿瘤细胞中的病毒输出增加至少50%。在一些实施方式中,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂使来自体外培养的肿瘤细胞的病毒输出增加至少75%、至少100%、至少150%、至少200%或至少300%。在一些实施方式中,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂使来自体外培养的肿瘤细胞的病毒输出增加50%~400%、75%~400%、100%~400%、150%~400%、200%~400%或300%~400%。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合物,所述组合物包含溶瘤痘病毒、溶瘤疱疹病毒或溶瘤麻疹病毒,和适合于活性栓塞的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是选自下组的痘病毒:痘苗病毒、粘液瘤病毒和副痘病毒。在一些实施方式中,所

述溶瘤病毒是溶瘤痘苗病毒。在一些实施方式中,所述溶瘤痘苗病毒不包含活性胸苷激酶基因。在一些实施方式中,所述实施方式可与包括溶瘤痘苗病毒的任何前述实施方式组合,所述溶瘤痘苗病毒不包含活性痘苗病毒生长因子(VGF)基因。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括溶瘤痘苗病毒的任何前述实施方式组合,所述溶瘤痘苗病毒包含编码海肾荧光素酶、绿色荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶和 β -葡糖醛酸糖苷酶的转基因。

[0014] 在某些实施方式中,所述实施方式可与包括溶瘤痘苗病毒的任何前述实施方式组合,所述溶瘤痘苗病毒是Copenhagen毒株、Western Reserve毒株、Wyeth毒株或Lister毒株。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括溶瘤痘苗病毒的任何前述实施方式组合,所述溶瘤痘苗病毒进一步包含粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子蛋白、胞嘧啶脱氨酶蛋白和生长抑素2型受体蛋白中的一个或多个。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是选自下组的疱疹病毒:单纯疱疹病毒-1、单纯疱疹病毒-2和巨细胞病毒。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是单纯疱疹病毒1。在某些实施方式中,所述单纯疱疹病毒-1源自毒株JS-1。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括单纯疱疹病毒-1的任何前述实施方式组合,所述单纯疱疹病毒-1具有以下一个或多个:失活的ICP34.5基因、失活的ICP45基因、US11基因的更早插入、失活的ICP6基因、人粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子基因和硝基还原酶基因。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括单纯疱疹病毒-1的任何前述实施方式组合,所述单纯疱疹病毒-1具有失活的ICP34.5基因、失活的ICP45基因和人粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子基因。在一些实施方式中,溶瘤病毒是粘液瘤病毒。在一些实施方式中,所述粘液瘤病毒源自毒株Lausanne。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括粘液瘤病毒的任何前述实施方式组合,所述粘液瘤病毒具有选自以下的一个或多个失活基因:M010L、M011L、M-T5、M151R、M001R、M152R、M153R、M154L、M156R、M008.1R、M008R、M007R、M006R、M005R、M004.1R、M004R、M003.2R、M003.1R和M002R。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是副痘病毒。在一些实施方式中,所述副痘病毒源自羊传染性口疮病毒毒株。在一些实施方式中,所述羊传染性口疮病毒毒株选自OV NZ-2、OV NZ-7和OV-SA00。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括副痘病毒的任何前述实施方式组合,所述副痘病毒具有一个或多个异源宿主范围基因的插入。在一些实施方式中,所述异源宿主范围基因选自SPI-1、SPI-2、KIL、C7L、p28/N1R、B5R、E3L、K3L、M-T2、M-T4、M-T5、M11L、M13L、M063和F11L。在一些实施方式中,所述溶瘤病毒是麻疹病毒。在一些实施方式中,所述麻疹病毒源自埃德蒙顿(Edmonston)毒株、Moraten毒株、伦宁格拉德(Leningrad)毒株、莫斯科(Moscow)毒株或施瓦茨(Schwarz)毒株。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括麻疹病毒的任何前述实施方式组合,所述麻疹病毒具有编码人甲状腺碘化钠同向转运蛋白(NIS)的基因的插入。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述溶瘤病毒沿其最短轴的直径为至少 $0.1\mu\text{m}$ 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述溶瘤病毒沿其最短轴的直径为至少 $0.2\mu\text{m}$ 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂选自由以下组成的列表:可降解的淀粉、聚乙烯醇、明胶海绵和磺化的聚乙烯醇水凝胶。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂的微粒的大小为 $100\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}\sim 350\mu\text{m}$ 、 $150\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}\sim 250\mu\text{m}$ 、 $250\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$,或大小为 $300\mu\text{m}\sim 350\mu\text{m}$ 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒在以下大小变化:约 $0\mu\text{m}$ 至约 $100\mu\text{m}$ 、约 $0\mu\text{m}$ 至

约50 μm 或约0 μm 至约25 μm 。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒具有以下直径的平均差:100 μm 或更小、约50 μm 或更小、约25 μm 或更小、约10 μm 或更小或约5 μm 或更小。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,生物相容性微粒剂的单独微粒是10~200 μm 或10~100 μm 的颗粒的聚集物。在某些实施方式中,所述实施方式可与包括亲水性聚合物凝胶剂的任何前述实施方式组合,所述亲水性聚合物凝胶剂包含10~200 μm 或10~100 μm 的颗粒。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是暂时栓塞剂或永久栓塞剂。

[0015] 本发明的另一方面包括用于哺乳动物中的血管部位的活性栓塞的方法,其包括将任何前述四个方面以及任何它们的实施方式和实施方式的组合的组合物引入哺乳动物的血管部位。在某些实施方式中,所述血管部位在肿瘤中,向所述肿瘤提供血液,或最接近所述肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤在肝脏中。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述肿瘤是原发性肿瘤或继发性肿瘤。在某些实施方式中,所述继发性肿瘤是转移的恶性黑素瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤在肝脏中。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述哺乳动物是人。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,在脉管系统中引入造影剂。在某些实施方式中,所述造影剂选自:甲泛葡胺(metrizamide)、碘帕醇(iopamidol)、碘克沙醇(iodixanol)、碘海醇(iohexol)、碘普罗胺(iopromide)、碘比醇(iobtiridol)、碘美普尔(iomeprol)、碘喷托(iopentol)、碘必乐(iopamiron)、碘昔仑(ioxilan)、碘曲仑(iotrolan)、钆双胺(gadodiamide)、钆特醇(gadoteridol)、伊索显(iotrol)、碘佛醇(ioversol)或它们的组合。

[0016] 本发明的还一方面包括用于通过减积(debulking)肿瘤块来治疗癌症的方法,其包括将前述四种组合物相关方面中的任何一个以及任何它们的实施方式和实施方式的组合的组合物引入到哺乳动物的血管部位,其中,所述方法诱导至少75%的栓塞的肿瘤块的坏死。在某些实施方式中,所述方法诱导至少85%的栓塞的肿瘤块的坏死,至少90%的栓塞的肿瘤块的坏死,或甚至至少95%的栓塞的肿瘤块的坏死。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述血管部位在肿瘤中,向所述肿瘤提供血液,或最接近所述肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤在肝脏中。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述肿瘤是原发性肿瘤或继发性肿瘤。在某些实施方式中,所述继发性肿瘤是转移的恶性黑素瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤在肝脏中。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述哺乳动物是人。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,在脉管系统中引入造影剂。在某些实施方式中,所述造影剂选自:甲泛葡胺、碘帕醇、碘克沙醇、碘海醇、碘普罗胺、碘比醇、碘美普尔、碘喷托、碘必乐、碘昔仑、碘曲仑、钆双胺、钆特醇、伊索显、碘佛醇或它们的组合。

[0017] 本发明的又一方面包括包括用于哺乳动物中的血管部位的活性栓塞的方法,其包括将包含溶瘤病毒和适合于活性栓塞的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂的组合物引入哺乳动物的血管部位,其中,在引入步骤后一天的哺乳动物具有每ml的血液小于10pfu的溶瘤病毒。在某些实施方式中,组合物可以是前述四种组合物相关方面中的任何一个以及任何它们的实施方式和实施方式的组合。在某些实施方式中,在引入步骤后一天的

哺乳动物具有每ml的血液小于5pfu的溶瘤病毒,或甚至每ml的血液小于2pfu的溶瘤病毒。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述血管部位在肿瘤中,向所述肿瘤提供血液,或最接近所述肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤在肝脏中。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述肿瘤是原发性肿瘤或继发性肿瘤。在某些实施方式中,所述继发性肿瘤是转移的恶性黑素瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤在肝脏中。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,所述哺乳动物是人。在某些实施方式中,所述实施方式可与任何前述实施方式组合,在脉管系统中引入造影剂。在某些实施方式中,所述造影剂选自:甲泛葡胺、碘帕醇、碘克沙醇、碘海醇、碘普罗胺、碘比醇、碘美普尔、碘喷托、碘必乐、碘昔仑、碘曲仑、钆双胺、钆特醇、伊索显、碘佛醇或它们的组合。

[0018] 应该理解,本文所述的多种实施方式的一个、一些或所有性质可组合形成本公开的其他实施方式。本公开的这些和其他方面会对本领域技术人员之一变得显而易见。

附图说明

[0019] 图1显示感染有与碘油(Lipiodol)、阿霉素(Adriamycin)和/或凝胶海绵(Gelfoam)预培养的JX-594病毒的HuH-7细胞的病毒输出。在感染后24(图1A和B)和48(图1C和D)小时以100(图1A和C)或1(图1B和D)MOI收集的细胞培养上清液中测量病毒输出。

[0020] 图2显示用于在兔子肝脏肿瘤模型中使用凝胶海绵(Gelfoam)配制的Pexa-Vec的经导管的栓塞治疗的实验时间线(图2A)和组织收集和分析计划(图2B)。

[0021] 图3显示来自对照动物(图3A)和使用凝胶海绵配制的Pexa-Vec治疗的动物(图3B)的代表性CT和肿瘤组织的组织学染色图像。图3C显示来自使用凝胶海绵配制的Pexa-Vec治疗的动物的胆管的代表性血管造影术图像。图3D和E显示在使用凝胶海绵配制的Pexa-Vec治疗的动物的正常肝脏和肿瘤组织(图3D)以及正常肝实质(图3E)之间的连接的代表性H&E染色的图像。

[0022] 图4显示在兔子肿瘤模型中用于TAVE比溶瘤病毒疗法和栓塞的功效和药代动力学(PK)研究的实验时间线。

具体实施方式

[0023] 本文公开的本发明的某些方面基于令人惊奇的发现,即溶瘤痘苗病毒可有效地通过经动脉的栓塞技术施用,而不管其大小以及从上皮细胞(如形成血管壁的细胞)的次最优基底外侧感染和顶端释放。基于该令人惊奇的发现,人们可轻而易举地推算相同大小和更小的其他溶瘤病毒,并推算相似次最优生命周期的其他溶瘤病毒。示例性溶瘤病毒包括双链DNA病毒如痘病毒和疱疹病毒、沿其最小轴大于100nm的病毒和从极性细胞如血管内皮细胞的顶端膜芽殖的病毒。

[0024] 本文公开的本发明的某些方面基于与现有技术的直接肿瘤注射和经动脉溶瘤VSV栓塞相比的其他令人惊奇的改善,其包括但不限于缺乏渗入血流中的来自所要求保护的组合物和方法的溶瘤病毒。优选地,在引入或施用如本文所公开的溶瘤病毒后,受试者会具有施用后一天每ml的血液小于10pfu的溶瘤病毒,每ml的血液小于5pfu的溶瘤病毒,或每ml的血液小于2pfu的溶瘤病毒。

[0025] 使用如本说明书中所公开的溶瘤病毒的栓塞的方面是,使用病毒介导的杀伤肿瘤细胞比单独通过溶瘤病毒的经导管的栓塞或直接肿瘤注射更有效地减积肿瘤块。在优选的实施方式中,使用如本说明书中所公开的溶瘤病毒的栓塞使用肿瘤细胞的病毒介导的杀伤比单独通过溶瘤病毒的经动脉的栓塞、经动脉的化学栓塞、经动脉的放射栓塞或直接肿瘤注射更有效地减积肿瘤块。当与栓塞剂一起递送时,将本公开的溶瘤病毒保留在肿瘤微环境中,由此允许癌细胞的更多病毒感染,并防止溶瘤病毒进入血流。暂时血管关闭和病毒复制随后导致整个肿瘤微环境而不仅是位于脉管系统的肿瘤微环境的肿瘤坏死,由此“减积”肿瘤块而没有对周围健康组织的可见损伤。在优选的实施方式中,减积的方法导致栓塞的肿瘤块的至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的坏死。在一方面,本公开提供了组合物,其含有溶瘤病毒和适合于活性栓塞的生物相容性微粒或亲水性聚合物凝胶。在另一方面,本公开提供了用于通过将溶瘤病毒和适合于活性栓塞的生物相容性微粒或亲水性聚合物凝胶引入哺乳动物的脉管系统来活性栓塞哺乳动物的血管部位的方法。

[0026] 溶瘤病毒

[0027] 本说明书所公开的组合物和方法会涉及除了VSV之外的溶瘤病毒。示例性溶瘤病毒包括双链DNA病毒,如痘病毒和疱疹病毒。优选的溶瘤病毒是痘苗病毒。在一方面,溶瘤病毒从感染的极性细胞的顶端表面芽殖。在优选的实施方式中,从感染的极性细胞的顶端表面芽殖的溶瘤病毒是溶瘤痘苗病毒。在另一方面,所述方面可与任何前述方面组合,溶瘤病毒沿病毒的最短轴的直径为至少0.1 μm 。在一个实施方式中,溶瘤病毒沿其最短轴的直径为至少0.1 μm 、至少0.15 μm 或至少0.2 μm 。溶瘤病毒沿病毒的最短轴的直径可为0.1-0.2 μm 、0.2-0.3 μm 、0.3-0.4 μm 、0.4-0.5 μm 、0.5-0.6 μm 、0.6-0.7 μm 、0.1-0.7 μm 、0.15-0.7 μm 或0.2-0.7 μm 。

[0028] A. 溶瘤痘苗病毒

[0029] 在优选的实施方式中,溶瘤病毒是痘病毒,如溶瘤痘苗病毒,痘苗病毒是具有大约190K bp并编码大约250个基因的线性双链DNA基因组的复杂的有包膜病毒。痘苗病毒是大小粗略为360nm \times 250nm的大病毒。痘苗病毒由于其作为根除天花的痘苗的作用而公知。根除天花后,科学家正在探索在基因治疗和基因工程应用中痘苗作为用于将基因递送至生物组织的工具的用途。

[0030] 痘苗病毒优选通过细胞的基地外侧感染,但是其病毒后代从顶端表面释放。极性细胞包括但不限于,上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞、破骨细胞、神经元和成纤维细胞。

[0031] 痘苗病毒和其他痘病毒在DNA病毒中是独特的,由于他们仅在宿主细胞的细胞质中复制。因此,需要大基因组编码病毒DNA复制所需的多种酶和蛋白质。在复制期间,痘苗产生不同于它们的外膜的一些感染形式:胞内成熟病毒体(IMV)、细胞内有包膜的病毒体(IEV)、细胞相关的有包膜病毒体(CEV)和胞外有包膜病毒体(EEV)。IMV是最大量的感染形式,并且认为其负责宿主之间的传播。另一方面,认为CEV起细胞间传播的作用,并且认为EEV对宿主有机体中的长距离散布很重要。以上形式仅用作说明用于本公开中的组合物和方法中的溶瘤病毒的形式。

[0032] 痘苗病毒的任何溶瘤毒株可用作本公开的组合的痘苗病毒组分。在优选的实施方式中,本公开的组合物和方法的溶瘤痘苗病毒是Copenhagen毒株、Western Reserve毒株和Wyeth毒株。可以很容易地使用其他菌株,其包括例如,在韩国流通的毒株。

[0033] 可工程改造本公开的溶瘤痘苗病毒来表达异体蛋白,如粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子或GM-CSF。GM-CSF是通过刺激干细胞产生粒细胞(嗜中性粒细胞、嗜酸粒细胞和嗜碱粒细胞)和巨噬细胞的巨噬细胞分泌的蛋白质。在氨基酸残基23(亮氨酸)、27(天冬氨酸)和39(谷氨酸)处糖基化人GM-CSF(见美国专利5,073,627,通过提述并入本文)。

[0034] 可将溶瘤痘苗病毒工程改造成为缺乏一个或多个功能基因,以增加病毒的癌症选择性。在一方面,可将溶瘤痘苗病毒工程改造成为缺乏胸苷激酶(TK)活性。TK缺乏的痘苗病毒需要用于DNA合成的胸苷三磷酸,这导致单独细胞(特别是癌细胞)中的优选复制。在另一方面,可将溶瘤痘苗病毒工程改造成为缺乏痘苗病毒生长因子(VGF)。该分泌蛋白在感染过程的早期产生,作为促分裂原起作用为感染准备好周围的细胞。在另一方面,可将溶瘤痘苗病毒工程改造成为缺乏VFG和TK活性。在其他方面,可将溶瘤痘苗病毒工程改造成为缺乏涉及逃避宿主干扰素(IFN)反应的一个或多个基因,如E3L、K3L、B18R或B8R。在一些实施方式中,溶瘤痘苗病毒是Western Reserve毒株和Wyeth毒株,并且缺乏功能TK基因。在其他实施方式中,溶瘤痘苗病毒是缺乏功能B18R和/或B8R基因的Western Reserve毒株。

[0035] 在一些实施方式中,溶瘤痘苗病毒缺乏功能TK基因并且表达人GM-CSF。在优选的实施方式中,溶瘤痘苗病毒是Wyeth毒株溶瘤痘苗病毒,其缺乏功能TK基因并表达人GM-CSF。

[0036] 在特别优选的实施方式中,溶瘤痘苗病毒是JX-594。JX-594是源自纽约卫生局痘苗毒株的有复制能力的、重组痘苗病毒,由Dryvax®(Wyeth Laboratories)商业售卖,现在一般称为Wyeth毒株痘苗病毒。通过将人GM-CSF和大肠杆菌(E.coli) β -半乳糖苷酶的基因JX-594插入到病毒的胸苷(TK)激酶基因中(分别在合成早期-晚期和p7.5启动子的控制下),由此导致TK基因失活。已经显示出TK基因的失活减少痘苗病毒的毒力并增加肿瘤特异性复制。JX-594上以高达 1×10^9 pfu/剂的剂量经由瘤内和静脉内施用证明了与临床试验的患者的肿瘤反应相关的复制和GM-CSF表达。

[0037] 在一些实施方式中,溶瘤痘苗病毒是SJ103 β (也称为vvDD-CDSR)。vvDD-CDSR病毒是具有TK和痘苗生长因子(VGF)基因的双重缺失的复制选择性溶瘤痘苗病毒。vvDD-CDSR通过将胞嘧啶脱氨酶(CD)、人生长抑素2型受体(SSTR2)和gpt插入到痘苗病毒的Western Reserve(WR)毒株的TK基因中(分别在合成早期-晚期、合成晚期和p7.5启动子的控制下)。大肠杆菌 β -半乳糖苷酶以同源重组插入到VGF基因中。显示了TK和VGF基因的失活降低痘苗病毒的毒力以保证安全,以及增强肿瘤特异性复制的选择性。任一或两者的失活可通过基因的这样的插入、通过使基因的突变失活和/或通过基因的部分或全部缺失实现。在一些实施方式中,溶瘤痘苗病毒是vvDD。vvDD是复制选择性溶瘤痘苗病毒,具有亲代WR毒株的TK和VGF基因的双重分裂。两个基因的失活增加了对病毒复制的肿瘤特异性并减弱病毒以保证安全性。在一些实施方式中,溶瘤痘苗病毒是SJ-102。SJ-102是源自Wyeth小牛改良的纽约市卫生局实验室毒株的有复制能力的、重组痘苗病毒。亲代痘苗病毒Wyeth毒株通过在TK座位处插入gpt和绿色荧光蛋白(GFP)产生SJ-102病毒。Gpt是选择标记,其控制在p7.5早期-晚期病毒启动子下,并且赋予对酶肌苷一磷酸脱氢酶的抑制剂的抗性。GFP是另外的病毒选择标记,并且控制在合成早期-晚期启动子pSE/L下。在一些实施方式中,溶瘤痘苗病毒是SJ-103。重组病毒SJ-103的亲代痘苗病毒是Western Reserve(WR)毒株。Western Reserve毒株通过在小鼠中传代而从Wyeth毒株得到,以增强小鼠细胞系中的肿瘤选择性并增加体

外的溶瘤作用。通过插入gpt和绿色荧光蛋白(GFP)来分裂WR毒株的胸苷激酶(TK)基因而产生SJ-103病毒。Gpt控制在p7.5早期-晚期病毒启动子下,并且GFP控制在合成早期-晚期启动子pSE/L下。在一些实施方式中,溶瘤痘苗病毒是WR TK(-)。用于重组病毒WR TK(-)的亲代痘苗病毒是Western Reserve(WR)毒株。通过插入选择标记而在WR TK(-)中分裂WR毒株的胸苷激酶基因。在一些实施方式中,溶瘤痘苗病毒是来自病毒制剂研究所(LIVP)的Lister毒株变体。在一些实施方式中,溶瘤痘苗毒株是GL-ONC1(Genelux),也被称为GLV-1h68或RVGL21。GL-ONC1是遗传工程改造的减弱的LIVP毒株痘苗病毒,其携带编码荧光素酶、绿色荧光蛋白(两者在F14.5L座位处插入)、 β -半乳糖苷酶(在J2R座位处插入的,其编码胸苷激酶)和 β -葡萄糖醛酸酶(在A56R座位处插入的,其编码血凝素)的转基因。在一些实施方式中,溶瘤痘苗病毒是WR Δ B18R luc+。WR Δ B18R luc+是WR痘苗病毒,具有删除的B18R基因和插入到TK基因的荧光素酶基因。

[0038] 痘苗病毒使用由Earl和Moss(Ausubel et al.(1994)Current Protocols in Molecular Biology,pages 16.15.1to 16.18.10)描述的方法或在WIPO公开No.W02013/022764描述的方法(两者通过提述并入本文)来繁殖。

[0039] B.其他痘病毒

[0040] 正痘病毒属是比脊椎动物痘病毒亚科亚家族的其他成员相对更同种的,并且包括11个有区别但紧密相关的物种,其包括痘苗病毒、天花病毒(天花的病原体)、牛痘病毒、水牛痘病毒、猴痘病毒、小鼠痘病毒和马痘病毒种及其它(见Moss,(1996)Fields Virology,3:3637-2672)。本公开的某些实施方式,如本文所述,可扩大至正痘病毒属以及副痘病毒属、禽痘病毒属、山羊痘病毒属、兔子痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属和亚塔痘病毒属的其他成员。痘病毒家族的属通常通过血清学方法(包括实验动物的中性和交叉反应度)来定义。正痘病毒属的多种成员以及脊椎动物痘病毒亚科亚家族的其他成员利用免疫调节分子(其实例在本文中提供)抵消宿主有机体的免疫应答。因此,本文所述的本公开不限于痘苗病毒,但可适用于多个病毒。

[0041] 粘液瘤病毒

[0042] 在一个实施方式中,用于本公开的组合物和方法中的溶瘤病毒是粘液瘤病毒。粘液瘤病毒("MV")是兔子的多发性粘液瘤病的病原体。MV属于痘病毒家族的兔子痘病毒属,最大的DNA病毒。MV在天然宿主(美洲的棉尾兔子)中诱导良性疾病。然而,它是有毒力的和宿主特异性的痘病毒,其导致欧洲兔子的致命疾病,其特征在于系统性地并且特别地在粘膜区周围发现的损伤。(Cameron C,Hota-Mitchell S,Chen L,Barrett J,Cao J X,Macaulay C,Wilier D,Evans D,McFadden G.Virology 1999,264(2):298-318;Kerr P&McFadden G.Viral Immunology 2002,15(2):229-246)。

[0043] MV是大病毒,具有在感染的细胞的细胞质中复制的163kb的双链DNA基因组(B.N.Fields,D.M.Knipe,P.M.Howley,Eds.,Virology Lippincott Raven Press,New York,2nd ed.,1996)。已知MV编码多种细胞相关的蛋白和分泌蛋白,其涉及宿主的免疫和炎症反应的下调和病毒感染的细胞的凋亡的抑制。通过所有人体细胞可吸收MV。MV可感染并杀伤癌细胞,包括人肿瘤细胞。

[0044] 粘液瘤病毒可为任何病毒,其属于有复制能力的痘病毒的兔子痘病毒种。粘液瘤病毒可为粘液瘤病毒的野生型毒株,或它可为粘液瘤病毒的一般改良的毒株。

[0045] 可使用技术人员已知的和在Sambrook等人((2001)Molecular Cloning:a Laboratory Manual,3rd ed.,Cold Spring Harbour Laboratory Press)中举例描述的标准分子生物学技术将粘液瘤病毒基因组轻而易举地改良成表达一个或多个治疗转基因。技术人员应该能够轻而易举地确定粘液瘤病毒基因组的哪个部分可删除,从而病毒仍然能够产生感染。例如,可删除的病毒基因组的非必需区可从比较公开的病毒基因组序列与其他很好表征的病毒的基因组推断(见例如C.Cameron,S.Hota-Mitchell,L.Chen,J.Barrett,J.-X.Cao,C.Macaulay,D.Willer,D.Evans,and G.McFadden,Virology(1999)264:298-318)。

[0046] 在一些实施方式中,溶瘤粘液瘤病毒是vMyxlac:一种重组洛桑毒株,其含有在开放读码框M010L和M011L之间在无害位点处插入的大肠杆菌lacZ基因。在一些实施方式中,溶瘤粘液瘤病毒是vMyxT5K0,一种重组病毒,具有由lacZ代替的M-T5基因的拷贝。在一些实施方式中,溶瘤粘液瘤病毒是SG33,也称为CNCM 1-1594。SG33病毒在她的基因组的右手边部分含有大约15kb的缺失。与参考Lausanne毒株相比,基因M151R和M001R仅部分缺失,产生失活截短的蛋白质。将基因M152R、M153R、M154L、M156R,以及右手边的基因ITR M008.1R、M008R、M007R、M006R、M005R、M004.1R、M004R、M003.2R、M003.1R和M002R完全删除。毒株的基因组和参考Lausanne毒株的基因组的另外的替换是在M011L基因(Lausanne毒株的基因组中的14125-13628位)(其编码凋亡的抑制剂)(M11L,GenBank NP—051725)的水平。可能使用表达所需基因的改良的减毒的粘液瘤病毒(例如,疱疹病毒胸苷激酶类的治疗基因或FCU1,其从编码胞嘧啶脱氨酶和尿嘧啶磷酸核糖基转移酶的基因之间的融合产生)(ERBS et al,Cancer Gene Therapy,15,18-28,2008)。在FR2736358中描述改良以表达感兴趣的基因的减毒的粘液瘤病毒。

[0047] 副痘病毒

[0048] 在一个实施方式中,用于本公开的组合物和方法中的溶瘤病毒是副痘病毒。副痘病毒羊传染性口疮病毒是痘病毒,其不同哺乳动物物种包括人类中诱导急性皮肤损伤。副痘病毒羊传染性口疮病毒通过破碎或损坏的皮肤自然地感染绵阳、山羊和人,在再生的表皮细胞中复制,并诱导转变为痂的脓疱性损伤。副痘病毒羊传染性口疮病毒编码基因OV20.0L,其涉及堵塞PKR活性。副痘病毒羊传染性口疮病毒不能再没有活化的Ras通路的细胞中复制。更优选的溶瘤病毒是“减毒的副痘病毒羊传染性口疮病毒”或“改良的副痘病毒羊传染性口疮病毒”,其中基因产物或防止PKR的活化的产物是缺乏、抑制或突变的,从而堵塞PKR活化。优选地,不转录基因OV20.0L。这样的减毒的或改良的副痘病毒羊传染性口疮病毒应该不能够在没有活化的Ras通路的正常细胞中复制,但是能够在具有活化的Ras通路的细胞中感染并复制。

[0049] 在一些实施方式中,溶瘤副痘病毒是选自以下的羊传染性口疮病毒:OV NZ-2(新西兰-2)、OV NZ-7(新西兰-7)和OV-SA00。在一些实施方式中,溶瘤副痘病毒是重组羊传染性口疮病毒(ORFV),其含有一个或多个异源宿主范围基因,其中,所述基因允许在人类细胞中的病毒的复制。异种宿主范围基因可包括,但不限于,SPI-1、SPI-2、KIL、C7L、p28/N1R、B5R、E3L、K3L、M-T2、M-T4、M-T5、M11L、M13L、M063和F11L。

[0050] C. 疱疹病毒

[0051] 单纯疱疹病毒

[0052] 在一方面,本公开提供了组合物,其含有溶瘤病毒和适合于活性栓塞的生物相容性微粒和亲水性聚合物凝胶。在一个实施方式中,溶瘤病毒是疱疹病毒,如单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 或单纯疱疹病毒-2 (HSV-2)。人疱疹病毒包括单纯疱疹病毒-1 (“HSV-1”)、单纯疱疹病毒-2 (“HSV-2”)、人巨细胞包含体病毒 (“HCMV”)、爱泼斯坦-巴尔病毒 (Epstein-Barr virus) (“EBV”)、卡波西肉瘤 (“HHV-8”)、蔷薇疹病毒-6A (“HHV-6A”) 和蔷薇疹病毒-6B (“HHV-6B”)。

[0053] HSV病毒体是具有二十面体外壳的大的(直径为120至300nm)、有包膜的病毒。其具有具有编码至少70个多肽的基因组的双链DNA。这样大量的调控信息准许病毒控制它自己的基因表达,并且修改感染的细胞内的多个复杂事件。单纯疱疹病毒通过直接接触进入宿主,仅传播到目标组织,经由神经元轴突流在宿主内传播,靶向背根神经节,并且在从急性感染中回收宿主后,仍然潜伏在目标组织中。有限的传播使得HSV成为溶瘤病毒的良好候选者。

[0054] 在HSV中,允许选择性溶瘤活性的突变包括编码ICP34.5、ICP6和/或胸苷激酶(TK) 优选ICP34.5的基因的突变。在Chou et al 1990,Maclean et al 1991中描述在HSV的实验室毒株中编码ICP34.5的基因的这样的突变,尽管可以使用任何突变,其中ICP34.5是非功能性的。因此,在HSV毒株中,优选修饰病毒,从而缺乏一个或多个功能性ICP34.5编码基因、功能性ICP6编码基因、功能性糖蛋白H编码基因、功能性胸苷激酶编码基因;或在非HSV毒株中,病毒缺乏等同于所述HSV基因之一的功能基因。更优选地,病毒缺乏功能性ICP34.5编码基因。还可进行其他修饰。特别地,可修饰HSV病毒,从而缺乏功能ICP47基因。这是因为ICP47通常在HSV感染的细胞中起堵塞抗原呈递的作用,因此其分裂导致没有赋予感染的肿瘤细胞特定性质的病毒,这可使这样的HSV感染的细胞远离宿主的免疫系统。此外,可修饰HSV病毒来表达人GM-CSF基因。分泌的或另外释放的GM-CSF可将树突细胞吸引至肿瘤增强对抗肿瘤细胞的免疫应答。

[0055] 当本发明的病毒是单纯疱疹病毒时,病毒可从例如HSV1或HSV2毒株,或其衍生物,优选为HSV1得到。优选的HSV-1毒株是JS-1,其可通过ICP34.5和ICP47的失活和人GM-CSF的添加来修饰(例如,Senzer et al. JCO (2009) 27 (34) :5763-5771)。在一些实施方式中,野生型HSV-1从ATCC (VR-735) 获得,并且没进行工程改造。在一些实施方式中,HSV-1毒株是MP (1型单纯疱疹病毒的突变毒株)。在一些实施方式中,HSV-1毒株是长叶烯 (Talimogene laherparepvec),也称为OncoVEX GMCSF或T-VEC (AMGEN)。通过修饰HSV-1JS-1亲株来产生T-VEC,以减弱病毒病并增加癌细胞的选择性。经由删除ICP34.5和ICP47基因(以分别防止感染非肿瘤细胞并能够抗原呈递),更早插入US11基因(以增加复制和溶瘤能力)和插入人GM-CSF基因(以增加抗肿瘤免疫应答)来修饰JS-1毒株。在一些实施方式中,溶瘤HSV-1病毒是HSV1716,也称为SEPREHVIR。HSV1716毒株含有ICP34.5基因的缺失,这允许在肿瘤细胞中选择复制。在一些实施方式中,HSV-1病毒是HSV1716NTR,一种通过将酶硝基还原酶(NTR) 插入到病毒HSV1716中作为基因定向的酶前体药物治疗(GDEPT) 策略而生成的溶瘤病毒。在一些实施方式中,HSV-1病毒是G207,一种由ICP34.5基因的缺失和通过将大肠杆菌LacZ基因插入到亲本HSV-1实验室毒株F导致的ICP6基因的失活而得到的溶瘤病毒。在一些实施方式中,HSV-1病毒是NV1020,一种通过ICP34.5基因的一个拷贝的缺失得到的溶瘤病毒。

[0056] 衍生物包括跨型重组体(inter-type recombinant),其含有来自HSV1和HSV2毒株

的DNA。在本领域中,例如在Thompson等人(1998)和Meignier等人(1988)中描述了这样的跨型重组体。衍生物可具有由核苷酸取代修饰的HSV1或HSV2基因组,例如1、2或3至10、25、50或100个取代。HSV1或HSV2基因组可通过一个或多个插入和/或缺失和/或通过任一或两端的延长而备选地或另外地修饰。

[0057] 巨细胞病毒

[0058] 在一些实施方式中,用于本公开的组合物和方法的溶瘤病毒是巨细胞病毒。巨细胞病毒(CMV),也称为人疱疹病毒5(HHV-5),是被归为疱疹病毒的β亚家族的成员的一种疱疹病毒。根据疾病控制和预防中心,CMV感染相当广泛地在人群中发现,估计感染了美国成年人的40-80%。病毒主要通过体液传播,并且从妊娠母亲向胎儿或新生儿频繁地传送。在大多数个体中,CMV感染是潜在的,虽然病毒活化可到至高热、恶寒、疲乏、头痛、恶心和脾大。

[0059] 尽管大多数人CMV感染是无症状的,免疫减弱个体(如HIV阳性患者、同种异体移植患者和癌症患者)或免疫系统尚未完全发育的人(如新生儿)中的CMV感染可能是特别有问题的(Mocarski et al., Cytomegalovirus, in *Field Virology*, 2701-2772, Editor: Knipes and Howley, 2007)。这样的个体中的CMV感染在其他有害条件中可导致严重的病态,其包括肺炎、肝炎、脑炎、结肠炎、葡萄膜炎、视网膜炎、失明和神经病。另外,妊娠期间的CMV感染是先天畸形的主要原因(Adler, 2008 *J. Clin Virol*, 41:231; Arvin et al, 2004 *Clin Infect Dis*, 39:233; Revello et al, 2008 *J Med Virol*, 80:1415)。CMV感染体内的多种细胞,其包括单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞、神经元、平滑肌细胞、干细胞和基质细胞(Plachter et al. 1996, *Adv. Virus Res.* 46:195)。尽管临床CMV分离株在多种细胞类型中复制,实验室毒株AD169(Elek&Stem, 1974, *Lancet* 1:1)和Towne(Plotkin et al., 1975, *Infect. Immun.* 12:521)几乎专门地在成纤维细胞(Hahn et al., 2004, *J. Virol.* 78:10023)中复制。规定向性的限制(其由病毒在成纤维细胞中的连续传代和最终适应导致)是减毒作用的标记(Gerna et al., 2005, *J. Gen. Virol.* 86:275; Gerna et al, 2002, *J. Gen Virol.* 83:1993; Gerna et al, 2003, *J. Gen Virol.* 84:1431; Dargan et al, 2010, *J. Gen Virol.* 91:1535)。已经将导致人CMV实验室毒株中上皮细胞、内皮细胞、白细胞和树突细胞向性丢失的突变映射到3个开放读码框(ORF):UL128、UL130和UL131(Hahn et al., 2004, *J. Virol.* 78:10023; Wang and Shenk, 2005 *J. Virol.* 79:10330; Wang and Shenk, 2005 *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:18153)。生化和重构研究显示了UL128、UL130和UL131装配到gH/gL支架上形成五聚体gH复合物(Wang and Shenk, 2005 *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:1815; Ryckman et al, 2008 *J. Virol.* 82:60)。该复合物在病毒体中的恢复恢复了实验室毒株的病毒上皮向性(Wang and Shenk, 2005 *J. Virol.* 79:10330)。怀疑内皮和上皮向性的损失为事先评价为疫苗如Towne的不足(Gerna et al, 2002, *J. Gen Virol.* 83:1993; Gerna et al, 2003, *J. Gen Virol.* 84:1431)。天然CMV感染的人受试者血清中的中和抗体对抗病毒上皮进入的活性比对抗成纤维细胞进入的活性高15倍以上(Cui et al, 2008 *Vaccine* 26:5760)。具有原发感染的人快速将中和抗体发展为病毒内皮和上皮进入,但是仅将中和抗体缓慢发展为病毒成纤维细胞进入(Gerna et al, 2008 *J. Gen. Virol.* 89:853)。此外,对抗病毒上皮和内皮进入的中和活性在来自接受Towne疫苗(Cui et al, 2008 *Vaccine* 26:5760)的人受试者的免疫血清中是不存

在的。近来,描述了来自具有HCMV感染的四个供体的人单克隆抗体的固定样本,并且来自固定样本的更有效的中和克隆识别出五聚体gH复合物 (Macagno et al,2010J.Virol.84:1005)的抗原。

[0060] D. 麻疹病毒

[0061] 在一个实施方式中,用于本公开的组合物和方法的溶瘤病毒是麻疹病毒。麻疹病毒是大的并且多向性的,具有高达~550nm的直径。麻疹病毒是负链RNA病毒,它的基因组编码了6个蛋白产物,N(核壳)、P(聚合物辅因子磷蛋白)、M(基质)、F(融合物)、H(血凝素)和L(大RNA聚合酶)蛋白。H蛋白是表面糖蛋白,其介导了麻疹病毒与其受体CD46 (Dorig, et al., Cell 75:295-305,1993) 衔接。F蛋白在已经发生病毒衔接后对细胞-细胞融合负责。麻疹病毒对淋巴细胞并且特别是癌性淋巴细胞具有天然向性。

[0062] 病毒的肿瘤选择性是由于对病毒的生命周期的胞内限制,其在非转化的细胞中强烈抑制病毒繁殖,但被存在于赘生细胞中的细胞因子覆盖 (Robbins, et al., Virology 106:317-326,1980;Robbins, Intervirology 32:204-208,1991)。淋巴细胞的麻疹感染性导致非常特有的致细胞病变效应。由于格罗斯细胞-细胞融合 (Warthin, Arch. Pathol. 11:864-874,1931) 的结果,多核巨细胞在淋巴结中在麻疹病毒复制期间发育。在组织培养中,感染麻疹病毒可导致整个单层细胞的融合。在感染的细胞表面发现了F和H抗原。因此,被麻疹病毒感染的并且它的膜表达F和H蛋白的细胞变得高度融合,并且不但可导致其他感染细胞的融合还导致未感染的相邻细胞的融合 (Norrby and Oxman, "Measles Virus." In Virology,1990,B.N.Fields, et al., eds. New York, Raven Press, Ltd., pp 1013-1044)。病毒抗原在肿瘤细胞的表面上的表达还可介导肿瘤特异性免疫应答。

[0063] 病毒的减毒毒株可通过在细胞培养(例如非人细胞)中病毒的传代培养来获得,直到鉴定出产生免疫原性但无致病性的病毒。虽然野生型病毒会在猴属中导致致命感染,但是疫苗毒株不会。在人类中,感染有野生型病毒毒株通常不致命,而是与典型麻疹疾病相关。典型麻疹疾病包括10-14天的潜伏期,然后是发热、伤风、咳嗽和结膜炎的症状,然后出现斑丘疹和科泼利克氏斑 (Koplik's spots) (在口腔的内侧发现的小、红、不规则形斑,带有蓝-白色中心)。皮疹的发病与出现免疫应答和开始病毒清除一致。相反,接受减毒麻疹病毒疫苗的个体没有表现出典型麻疹症状。减毒作用与减少的病毒复制(如在体内由于不能在猴子中引起麻疹所测量的)、减少的病毒血症和在组织中(例如,细胞-细胞融合,多核细胞)诱导细胞病理学效应的失败有关。然而,这些生物学改变尚未被映射到病毒基因组中的任何单一遗传改变。

[0064] 已经作为麻疹感染的疫苗临床测试的麻疹病毒的减毒毒株用来提供有效剂量,其会限制和/或导致一组癌细胞如肿瘤的衰退。病毒的Moraten减毒形式已经在全世界用作疫苗,并且具有优异的安全记录 (Hilleman, et al., J. Am. Med. Assoc. 206:587-590,1968)。因此,在本发明的一个实施方式中,Moraten毒株用来提供有效剂量。Moraten疫苗可从Merck®商购,并且在小瓶中冻干提供,其当重构成0.5ml时,包含103pfu/ml。抗Moraten Berna毒株的疫苗可从瑞士血清疫苗研究所伯尔尼 (Swiss Serum Vaccine Institute Berne) 获得。

[0065] 在本发明进一步的实施方式中,使用麻疹病毒的埃德蒙顿-B疫苗株 (MV-Edm) (Enders and Peebles, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86:277-286,1954)。MV-Edm在肿瘤细胞中

有效生长,但是它的生长在人外周血单核细胞、正常表皮成纤维细胞和血管平滑肌细胞的原代培养中严重受限。Enders减毒的埃德蒙顿毒株的形式可从(Attenuvax®)商购。在一些实施方式中,麻疹病毒是MV-NIS。MV-NIS是编码人甲状腺碘化钠同向转运蛋白的麻疹病毒(MV-NIS)。MV-NIS的麻疹病毒是减毒的溶瘤埃德蒙顿(ED)毒株。MV-NIS对骨髓瘤浆细胞选择性破坏,并且MV-NIS感染的细胞可经由吸收碘123(I-123)成像。

[0066] 其他减毒的麻疹病毒毒株也包括在本发明的范围内,如列宁格勒-16(Leningrad-16)和莫斯科-5(Moscow-5)毒株(Sinitsyna, et al., Res. Virol. 141(5):517-31, 1990),施瓦茨毒株(Fourrier, et al., Pédatrie 24(1):97-8, 1969), 9301B毒株(Takeda, et al. J. VIROL. 72/11:8690-8696), AIK-C毒株(Takehara, et al., Virus Res 26(2):167-75, 1992 November),和在Schneider-Shaulies, et al., PNAS 92(2):3943-7, 1995(其整体通过提述并入本文)中描述的那些。

[0067] 在本发明进一步的实施方式中,麻疹病毒在包含减毒的溶瘤病毒的混合物的组合物中提供。在一个实施方式中,使用腮腺炎、麻疹和风疹疫苗(MMR)。MMR疫苗在1972年引入美国并且在1998年引入英国。可商购的MMR疫苗的制剂可从默克公司(Merck)、巴斯德-梅里厄-康纳公司(Pasteur Merieux Connaught)或史克必成公司(SmithKline Beecham)获得,并且还含有1PFU/ml的最小效价的减毒的麻疹病毒的Moraten毒株。在本发明的又进一步的实施方式中,麻疹病毒在含有Edmonston Zagreb麻疹毒株(从Edmonston-enders毒株获得的减毒的毒株)和风疹的Wistar RA 27/3毒株(瑞士血清疫苗研究所伯尔尼)的组合物中提供。对本领域技术人员应该显而易见的是任何临床试验的麻疹疫苗可用于本发明,并且包括在本发明的范围内。

[0068] 在本发明的又进一步的实施方式中,包含遗传修饰的重组麻疹病毒从野生型麻疹病毒得到以生成减毒的病毒,例如具有高免疫原性(如通过70-100%血清转化所测量的)且无致病性(例如,如产生典型麻疹症状,如上所述)的病毒。在本发明的一个实施方式中,通过包含野生型麻疹病毒的序列的质粒的随机突变引入遗传修饰。野生型分离株的序列在美国专利No. 5,578,448(其整体通过提述并入本文)中公开。

[0069] 在本发明的另一个实施方式中,靶向麻疹病毒基因组的特定顺反子以修饰它的表达与监督作用相关的修饰基因(Schneider-Shaulies, et al. PNAS 92(2):3943-7, 1995; Takeda, et al. J. Virol. 1998 72/11(8690-8696))。因此,在本发明的一个实施方式中,生成重组麻疹病毒毒株,其包含H蛋白、V蛋白、C蛋白中的任一个的单个点突变和多个非连续的点突变,以及它们的组合。在本发明的又进一步的实施方式中,鉴定野生型的天然变体或减毒的麻疹病毒(例如,如从来自感染的患者的病毒的培养物),在它们的基因组中具有至少一个点突变。

[0070] 溶瘤病毒的工程改造

[0071] 在某些实施方式中,可将用于本公开的组合物和方法的溶瘤病毒工程改造以改善病毒的功效、安全性或其他特征。病毒频繁地被免疫调节分子如干扰素(- α 、- β 、- γ)和肿瘤坏死因子- α (TNF)(Moss, 1996)灭活、抑制或清除。可通过灭活病毒基因实现失活,所述灭活病毒基因可通过插入到基因中,通过灭活基因中的突变和/或通过基因的部分或完全缺失来实现。宿主组织和炎症/免疫细胞在病毒感染的反应中频繁地分泌这些分子。这些分子可具有直接抗病毒作用和/或通过招募和/或活化炎症细胞和淋巴细胞的间接作用。鉴于这些

免疫学清除基质的重要性,病毒进化成表达抑制这些细胞因子/趋化因子和干扰素的诱导和/或功能的基因产物。例如,痘苗病毒(VV;和一些其他痘病毒)编码分泌的蛋白vCKBP(B29R),其集合并抑制CC(两个相邻的半胱氨酸)趋化因子(例如,RANTES、嗜酸细胞活化趋化因子、MIP-1- α) (Alcami et al.,1998)。一些VV毒株还表达分泌的病毒蛋白,其结合TNF并使其失活(例如,Lister A53R) (Alcami et al.,1999)。大多数痘病毒毒株具有编码分泌的蛋白的基因,所述分泌的蛋白结合并抑制干扰素 α/β (例如,B18R)或干扰素- γ (B8R)的功能。vC12L是IL-18-结合蛋白,其防止IL-18诱导IFN- γ 和NK细胞/细胞毒性T细胞活化。

[0072] 在小鼠中进行了大多数痘病毒毒力研究。这些蛋白中的许多,但不是全部在小鼠中有活性(例如,B18R没有)。在这些蛋白对小鼠版本的靶细胞因子有活性的情况下,这些基因的缺失导致具有这些基因的缺失或功能突变的VV突变体的降低的毒力和增加的安全性。另外,与表达抑制蛋白的亲代病毒毒株相比对这些突变的炎症反应/免疫应答和这些突变的病毒清除经常是增加的。例如,痘病毒-分泌蛋白(趋化因子-结合/-抑制蛋白)的T1/35kDa家族的缺失可导致白细胞渗透到病毒感染的组织中的显著增加(Graham et al.,1997)。VV中vC12L基因的缺失导致在小鼠中鼻内施用后的降低的病毒效价/毒性;另外,NK和细胞毒性T淋巴细胞活性连同IFN- γ 诱导一起增加(Smith et al.,2000)。粘液瘤病毒T7基因的缺失(能够结合IFN- γ 和广泛的趋化因子)导致在毒性模型中的降低的毒力和显著增加的组织炎症/渗透(Upton et al.,1992;Mossman et al.,1996)。来自粘液瘤病毒的M-T2基因的缺失也导致在兔子模型中降低的毒力(Upton et al.1991)。B18R抗干扰素- $\alpha/-\beta$ 基因产物的缺失也导致对IFN介导的清除增加的病毒敏感性、在正常组织中的降低的效价和减低的毒力(Symons et al.,1995;Colamonici et al.,1995;Alcami et al.,2000)。总之,这些病毒基因产物在病毒感染的组织中起减少抗病毒免疫应答和炎症细胞渗透的作用。通过缺失/突变的蛋白功能的丢失导致宿主组织中病毒的减少的毒力和/或增加的促炎反应性质。见PCT/US2003/025141,其通过提述由此并入。

[0073] 细胞因子和趋化因子可具有潜在的抗肿瘤作用(Vicari et al.,2002;Homey et al.,2002)。这些作用可直接作用于肿瘤细胞本身(例如,TNF)或它们可通过作用于非癌性细胞间接作用。后者的实例是TNF,其可以通过对肿瘤相关的血管造成毒性而具有抗肿瘤作用;这导致血流至肿瘤的丢失,然后肿瘤坏死。另外,趋化因子可起招募(并且在一些情况下活化)免疫效应细胞如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和/或淋巴细胞的作用。这些免疫效应细胞可通过许多基质导致肿瘤破坏。这些机制包括抗肿瘤细胞因子(例如,TNF)的表达,fas-配体的表达、穿孔素和颗粒酶的表达、天然杀伤细胞的招募等。炎症反应甚至可导致诱导系统性肿瘤特异性免疫。最终,许多这些细胞因子(例如,TNF)或趋化因子可与化学疗法或放射疗法一起协同地起破坏肿瘤的作用。

[0074] 这些免疫刺激蛋白的重组版本的临床有效全身施用是不可行的,由于(1)施用全身施用诱导严重毒性和(2)需要肿瘤组织中的局部表达以刺激局部渗透和抗肿瘤作用。需要方法来实现肿瘤块中的这些分子的高局部浓度,同时最小化体循环的水平。可将病毒工程改造来表达细胞因子或趋化因子基因以试图增强他们的功效。来自复制选择性载体的这些基因的表达与来自非复制载体的表达相比具有潜在的优势。来自复制病毒的表达可导致肿瘤块中更高的局部浓度;另外复制病毒可通过肿瘤细胞破坏/肿瘤细胞溶解帮助诱导抗肿瘤免疫,并在促炎反应环境中释放肿瘤抗原。然而,该方法具有一些局限。严重的安全性

问题由将有复制能力的病毒(虽然是肿瘤选择性的)释放到环境中的可能性引起,所述病毒具有如果以高局部浓度表达就可能有毒的基因。因此,从它们的基因组表达有效促炎症基因的病毒可对治疗的患者并对一般公众造成安全风险。即使使用肿瘤靶向表达这些基因的复制选择性病毒,基因表达仍可发生在正常组织中导致毒性。另外,大小限制防止病毒如腺病毒表达多个和/或大基因;这些分子一定会更有效地组合作用。最终,使用的许多溶瘤病毒表达抗炎蛋白,并且因此这些病毒会抵消诱导感染的肿瘤块中的促炎症环境。该结果会抑制诱导抗肿瘤免疫力、抗血管作用和化学疗法-/放射疗法-致敏。

[0075] 栓塞剂

[0076] 许多生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂可使用本公开的组合物和方法。在优选的实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂选自:可降解的淀粉微粒、聚乙烯醇微粒、明胶海绵微粒和磺化的聚乙烯醇水凝胶微粒。在一方面,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂增加至少50%、至少75%、至少100%、至少150%、至少200%或至少300%的从体外培养的肿瘤细胞的病毒输出。在相关方面,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂增加50%~400%、75%~400%、100%~400%、150%~400%、200%~400%或300%~400%的从体外培养的肿瘤细胞的病毒输出。

[0077] 生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂(“栓塞剂”)可为暂时的或永久的。示例性暂时栓塞剂包括凝胶海绵、胶原蛋白和凝血酶。示例性永久栓塞剂包括颗粒如聚乙烯醇颗粒(PVA)和栓塞球,线圈如可推注、可注射、可拆卸、机械、电解和水解线圈,液体试剂如胶水、onyx、醇和ALGEL™(水凝胶、衍生自藻酸盐的糖基聚合物),以及其他试剂,其包括封堵塞、Gianturco-Grifka血管阻塞性装置(GGVOD)和可拆气球。可根据要栓塞的血管的大小,栓塞后血管阻塞的所需长度和阻塞后栓塞的组织是否应该仍然有活力使用不同栓塞剂。鉴于栓塞的广泛使用,熟练的介入性放射学家应该不难选择适当类型的试剂、试剂的大小范围等,以实现所需栓塞。血管阻塞在临床情况如创伤性损伤和出血中是有用的,或当需要重复的栓塞程序时,如在本说明书所公开的使用溶瘤病毒的肿瘤栓塞可能是希望的。

[0078] 在一个实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是明胶海绵微粒。示例性明胶海绵包括由Alicon/Scion Medical Technologies生产的凝胶海绵(Gelfoam)。凝胶海绵是由纯化的皮肤明胶制作的生物物质,并且配制成无菌片或为粉末。凝胶海绵已经用于栓塞应用超过30年,并且是低成本、多用途的栓塞剂。凝胶海绵通过引起机械性阻塞使血流变慢。凝胶海绵粉末由大小的范围是150-1000 μ m的颗粒组成,并且在吸水时可聚集形成更大的聚集颗粒。可将凝胶海绵片切成许多不同尺寸和形状,并在注射时根据所需应用与其它水性试剂一起配制。含有造影剂和凝胶海绵海绵的凝胶海绵浆可用来形成最接近栓塞的血管的“管型”,同时凝胶海绵鱼雷(torpedo)或立方体可用于更大血管。凝胶海绵通过使血流变慢暂时阻塞血管,增加血栓形成,并作为支架或凝块起作用。

[0079] 在一个实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是可降解的淀粉微粒。示例性可降解淀粉微粒(DSM)是由Pharmaceut生产的EMBOCEPTS颗粒和由Mangle Life Sciences生产的SPHEREX颗粒。EMBOCEPTS颗粒(阿米洛姆(Amilomer)作为活性物质)是由水解的马铃薯淀粉组成的交联的颗粒。这些颗粒适合于暂时栓塞,因为他们具有约35分钟的半衰期并且是可降解的。SPHEREX颗粒由DSM-S微粒组成,在盐溶液中消毒和悬浮。可通过在聚合物溶液的外相中形成淀粉微滴的乳液,将淀粉微滴转化为凝胶并且干燥淀粉颗粒从纯

化的支链淀粉基淀粉的水溶液制备淀粉微粒。释放控制壳也任选地应用于颗粒。肠胃外施用后,生物可降解的微粒溶于体内形成内生物质,最终形成例如葡萄糖。生物降解能力可通过在体外与合适的酶例如 α -淀粉酶培养来确定或检查。生物降解能力还可通过微粒的肠胃外注射,例如皮下地或肌内地,和组织的组织学检查作为时间的函数来检查。生物可降解的淀粉微粒正常地在几周之内并且通常在一周之内从组织中消失。在淀粉微粒使用释放控制壳例(如涂层)涂布的那些情况下,通常这个壳确定了生物降解率,继而确定何时 α 淀粉酶变为可用于淀粉基质。

[0080] 在一个实施方式中,生物可降解微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是聚乙烯醇(PVA)微粒。示例性聚乙烯醇微粒由Boston Scientific公司(Natick,MA)生产。PVA颗粒由真空干燥并刮擦成颗粒的PVA海绵片制作。该颗粒使用筛子过滤并且可用大小范围从 $100\mu\text{m}$ 到 $1100\mu\text{m}$ 。聚乙烯醇颗粒大小和形状不规则,这促进聚集。在悬浮后,PVA颗粒在悬浮后可以是长方形、椭圆形、不规则的、尖的和有角的小片段。聚乙烯醇颗粒通过粘附于血管壁和通过堵塞它们通过的最小血管来递送永久阻塞。PVA阻塞导致炎症反应、局部血管坏死和随后的血管纤维化。

[0081] 在一个实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂是磺化的聚乙烯醇水凝胶微粒。示例性磺化的聚乙烯醇水凝胶微粒是由Biocompatibles(UK,Surrey,UK)生产的DC-珠。DC珠是基于使用磺酸基团修饰的聚乙烯醇水凝胶的栓塞微粒产物。DC珠有能力从溶液主动螯合蒽环类化合物成它们的盐形式,如盐酸阿霉素(doxorubicin HCl),并以控制和持续的形式释放它。可在栓塞前立即添加药物,允许同时递送药物和装置的一步程序,这导致药物的持续局部递送。

[0082] 如上所述,本领域的技术人员可基于其他因素肿瘤脉管系统的大小和所需栓塞的性质轻而易举地选择适当大小的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂。在优选的实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂的大小为 $100\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ 。在优选的实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂的大小为 $150\mu\text{m}\sim 350\mu\text{m}$ 。在一个实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂的大小为 $150\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 。在一个实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂的大小为 $200\mu\text{m}\sim 250\mu\text{m}$ 。在一个实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂的大小为 $250\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ 。在一个实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂的大小为 $300\mu\text{m}\sim 350\mu\text{m}$ 。

[0083] 在某些实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂的大小是均一的。这意味着个体颗粒之间直径的差异为约 $0\mu\text{m}$ 至约 $100\mu\text{m}$ 、约 $0\mu\text{m}$ 至约 $50\mu\text{m}$ 或约 $0\mu\text{m}$ 至约 $25\mu\text{m}$ 。在一些实施方式中,微粒具的直径的差异为 $100\mu\text{m}$ 或更小、约 $50\mu\text{m}$ 或更小、约 $25\mu\text{m}$ 或更小、约 $10\mu\text{m}$ 或更小或约 $5\mu\text{m}$ 更小。

[0084] 栓塞的方法

[0085] 在一方面,本公开提供了用于通过将本公开的溶瘤病毒和适合于活性栓塞的生物相容性微粒或亲水性聚合物凝胶引入哺乳动物的脉管系统而活性栓塞哺乳动物的血管部位的方法。在一方面,本公开提供了用于通过将沿最短轴的直径为至少 $0.1\mu\text{m}$ 的溶瘤病毒和适合于活性栓塞的生物相容性微粒或亲水性聚合物凝胶引入哺乳动物的脉管系统而活性栓塞哺乳动物的血管部位的方法。在一方面,本公开提供了用于通过将感染的极性细胞的顶端表面芽殖的溶瘤病毒引入哺乳动物的脉管系统而活性栓塞譬如动物的血管部位的

方法。在另一方面,本公开提供了用于通过减积肿瘤块而治疗癌症的方法,所述方法包括将溶瘤病毒和适合于活性栓塞的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂引入哺乳动物的脉管系统。此外,病毒复制和暂时血管关闭随后导致肿瘤坏死,由此“减积”肿瘤块而没有对周围健康组织的可见损伤。在优选的实施方式中,减积的犯法导致栓塞的肿瘤块至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少85%的坏死。

[0086] 一般通过注入肿瘤附近和周围的血管而进行本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物的引入。在某些实施方式中,通过导管引入本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物。在其他实施方式中,通过由与注射器附接的导管注射而引入本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物。在一些实施方式中,引入是进入直接供养肿瘤或部分肿瘤的血管。在其他实施方式中,引入直接到作用的部位,例如进入肿瘤最接近端的血管。可以引入已经负载有溶瘤病毒的根据本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂(即,本公开的组合物)。在其他实施方式中,生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂与溶瘤病毒组合引入,其中在引入生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂之前、同时或之后引入病毒。当引入时,本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物适合于注射。在特定的实施方式中,本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物是无菌的。

[0087] 可以使用导管或微导管递送本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物。递送本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物的导管可为小直径医用导管。与本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物相容的导管材料可包括聚乙烯、氟聚合物和硅氧烷。一旦导管就位,就通过导管缓慢引入本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和/或组合物,一般借助荧光镜透视导向。可将本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物直接引入关键的血管,或可将它们引入目标血管的上游。在栓塞期间引入的本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂或组合物的量会是足够导致栓塞的量以例如降低或停止通过目标血管的血流。递送的本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物的量可根据例如要栓塞的脉管系统的总的大小或面积以及肿瘤的大小和性质改变。在栓塞后,可进行另外的动脉造影片以确认完成程序。动脉血流仍会在一定程度上存在于最接近栓塞的健康身体组织中,然后堵塞流向患病的或靶向的组织。此外,可事先、同时或随后向患者施用血管扩张剂(例如,腺苷)以促进该程序。

[0088] 医药或栓塞领域的技术人员之一会理解并了解如本文所述的本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物如何可通过将递送机制导向所希望的血管体部位,和将一定量的本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒或组合物递送至该部位而用于多种栓塞过程,导致限制、阻塞、填塞或堵塞一个或多个所希望的血管并降低或停止通过血管的血流。将该过程应用于任何特定的栓塞过程的可考虑、控制或适应的因素可包括选择本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和/或组合物(例如,以说明不透射线颗粒基质的成像,追踪和检测);递送至身体部位的本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物;递送的方法,其包括使用的特定设备(例如导管)和用来在所希望的身体部位放置导管的分配端的方法和途

径等。这些因素中的每一个会被普通技术人员之一所理解,并且可以容易地处理以将所描述的方法应用于无数的栓塞过程。

[0089] 在一个实施方式中,原发性和转移性肝肿瘤可利用本公开的栓塞疗法治疗。肝肿瘤可以是原发性或继发性肿瘤。继发性肿瘤可为例如转移的恶性黑素瘤。简言之,导管优选经由股动脉插入并在荧光镜透视导向下通过动脉系统前进到肝动脉中。尽可能远的使导管前进到肝动脉树中以允许完全堵塞供给肿瘤的血管,同时尽可能多的节省供给正常结构的动脉分支。理想地,这会是肝动脉的节段分支,但可能是,会根据肿瘤的程度和其个体血液供给,需要堵塞胃十二指肠动脉起源远端的整个肝动脉或甚至多个单独的动脉。一旦实现所希望的导管位置,通过将本公开的生物相容性微粒剂或亲水性聚合物凝胶剂、溶瘤病毒和组合物由动脉导管引入来栓塞动脉,直到要堵塞的动脉中的流动停止。动脉的阻塞可通过由导管注射的不透射线造影剂,并优选地由荧光镜透视检查来证明而确认,事先填充有造影剂的血管不再这样进行。每个供养动脉都可以重复相同的程序来阻塞。

[0090] 联合治疗

[0091] 在一些实施方式中,另外的治疗剂与本公开的经导管动脉病毒栓塞(“TAVE”)方法组合使用。另外的治疗剂包括,但不限于酪氨酸激酶抑制剂(舒尼替尼(sunitinib)、索拉非尼(sorafenib))、放射治疗和传统化学治疗。可在TAVE后,例如在TAVE后2-3周施用另外的治疗剂。在一些实施方式中,在TAVE之前施用另外的治疗剂。在一些实施方式中,TAVE与施用另外的治疗剂同时发生。在一些实施方式中,随后施用TAVE和另外的治疗剂在多个循环中重复。

[0092] 可视化方法

[0093] 在一些实施方式中,在进行活性栓塞之前,造影剂用来使脉管系统可视。造影剂可视化能够指导并监测脉管系统中的导管放置,允许在希望的血管中活性栓塞。可通过已知方法追踪并监测造影剂,所述方法包括放射照相术和荧光镜透视检查。造影剂可为能够以希望的成像形式增强对比的任何物质(例如,磁共振、X射线(例如CT)、超声、磁体层摄影术、电阻抗成像、光成像(例如共焦显微镜成像和荧光成像)和核成像(例如闪烁显像、SPECT和PET))。造影剂是栓塞和相似医疗实践领域中公知的,多种这样的造影剂中的任一种适合于用于本公开的制剂和方法。

[0094] 在一些实施方式中,造影剂是不透射线的;特别是显示出永久不透射线性的不透射线的物质。永久射线不透性不同于用于栓塞或类似医疗应用的其他对比-增强剂或不透射线物质,其在一定时间例如数天或数周,如7至14天内生物降解或另外损失它们的有效性(不透射线性)。(见例如PCT/GB98/02621)。永久不透射线物质经常是优选的,因为它们可被监测或追踪的,只要它们保留在体内,而其他非永久性对比-增强剂或不透射线物质在可检测和追踪它们的过程中,具有有限的时间。

[0095] 不透射线物质包括顺磁性物质(例如,持久的自由基或更优选的化合物、盐和顺磁性金属种类的复合物,例如过度金属或镧系元素离子);重原子(即37或更大的原子数)化合物、盐或复合物(例如重金属化合物、碘化的化合物等);含有放射性核素的化合物、盐或复合物(例如,放射性金属同位素或放射碘化的有机化合物的盐、化合物或复合物);和超顺磁性颗粒(例如,金属氧化物或混合的氧化物颗粒,特别是氧化铁)。优选的顺磁性金属包括Gd(III)、Dy(III)、Fe(II)、Fe(III)、Mn(III)和Ho(III),和顺磁性Ni、Co和Eu种类。优选的重

金属包括Pb、Ba、Ag、Au、W、Cu、Bi和镧系元素，如Gd。

[0096] 使用的对比-增强剂的量应该足够允许检测栓塞物，如所希望的。优选地，栓塞剂组合物可包含约1至约50重量百分比的造影剂。不透射线物质的浓度的差异如下：例如，在优选的实施方式中，相反的热敏聚合物混合物含有约50vol%不透射线造影剂溶液，其中优选的造影剂，例如欧乃派克 (Omnipaque) 或威视派克 (Visipaque) 是非离子的。对于MRI检测，MR检测剂的浓度优选为约1重量%。

[0097] 用于本公开的合适的造影剂的实例包括，但不限于，甲泛葡胺、碘帕醇 (Isovue™ 或 Iopamiron™)、碘克沙醇 (Visipaque™)、碘海醇 (Omnipaque™)、碘普罗胺 (Ultravist™)、碘比醇、碘美普尔、碘喷托、碘必乐、碘昔仑、碘曲仑、钆双胺、钆特醇、伊索显、碘佛醇 (Optiray™) 或它们的组合。

[0098] 实施例

[0099] 以下是本公开的方法和组合物的实例。理解的是可以实践多种其他实施例，鉴于以上提供的一般描述。

[0100] 实施例1：评价JX-594痘苗病毒的稳定性和病毒复制

[0101] 在体内评价用于经动脉的化学栓塞 (TACE) 的JX-594溶瘤痘苗病毒与其他试剂组合的稳定性。JX-594是从Wyeth毒株痘苗病毒得到的有复制能力的、重组痘苗病毒。JX-594通过将人GM-CSF和大肠杆菌β-半乳糖苷酶的基因插入到病毒的胸苷激酶 (TK) 基因 (分别在合成早期-晚期和p7.5启动子的控制下) 中得到的，由此致使TK基因失活。显示出TK基因的失活减少痘苗病毒的毒力并增加肿瘤特异性复制。

[0102] 方法

[0103] 将JX-594痘苗病毒与碘油 (Lipiodol)、阿霉素 (Adriamycin) 和/或凝胶海绵 (Gelfoam) 混合，根据表1中汇总的治疗组。

[0104] 表1：JX-594治疗组和培养条件

	组	培养条件
[0105]	1. JX-594	在将它们添加到细胞之前在RT中的10分钟
	2. JX-594 + 碘油	在将它们添加到细胞之前在RT中的10分钟
	3. JX-594 + 碘油 + 阿霉素	在将它们添加到细胞之前在RT中的10分钟
[0106]	4. 碘油 + 阿霉素	预处理细胞1 h, 添加JX-594
	5. JX-594 + 凝胶海绵	在将它们添加到细胞之前在RT中的10分钟
	6. 碘油 + 阿霉素	预处理细胞1 h, 混合 JX-594 + 凝胶海绵 并且在将它们添加到细胞之前在RT培养10分钟

[0107] 将表1“组”栏中描述的混合物在添加到细胞 (HuH-7细胞系) 前培养指定的时间。为了制备病毒接种物，通过蔗糖垫纯化的JX-594以满功率剧烈地涡旋30秒。将指明的JX-594悬浮液的量在含有2.5%胎牛血清 (感染基质) 的DMEM中稀释。将阿霉素粉末 (盐酸多柔比星 (Doxorubicin hydrochloride), SIGMA-ALDRICH®)、碘油® (Guerbet) 和凝胶海

绵 (Alicon®), Hangzhou Alicon Pharm SCI&TEC Co., Ltd) 溶解于相同感染基质以制备现货阿霉素、碘油和凝胶海绵溶液。对于组2、3、5和6, JX-594与阿霉素、碘油和/或凝胶海绵混合, 并在感染前在室温培养10分钟。对于组号4和5, 细胞在室温使用碘油和阿霉素预处理1小时。然后, 将200µL的混合的接种物添加到24孔组织培养板的各孔中, 并且在增湿CO₂恒温箱中在37°C培养2小时进行病毒吸收。

[0108] 在感染后24和48小时收获细胞培养上清液, 并且测量病毒输出 (pfu/ml)。使用橡胶柱塞的1mL注射器通过刮擦收获感染的细胞。通过冷冻和解冻的三个循环裂解收获的细胞悬浮液。为了测量感染病毒颗粒的量, 使用裂解的细胞收获进行菌斑试验。对于菌斑试验, 扩大U-2 OS细胞并且接种在6孔组织培养板中。在病毒滴定前, 将板在湿化的CO₂恒温箱中在37°C培养16-20小时。在感染前, 将裂解的HuH-7细胞在无血清DMEM培养基中连续稀释。在抽吸全部生长培养基后, 将900µL的无DMEM血清培养基添加到各孔中, 并且添加100µL的每个连续稀释的接种物。对于病毒吸收, 将平板在湿化的CO₂恒温箱中在37°C培养2小时。在2小时后, 将接种物改变为3mL的含有1.5%的羧甲基纤维素的DMEM, 其补充有2%胎牛血清和1%青霉素-链霉素。将平板在湿化的CO₂恒温箱中在37°C再次培养3天 (72±6小时) 直到可见菌斑形成。在3天培养期的最后, 抽吸覆盖物并且将U-2 OS细胞使用1mL的0.1%结晶紫溶液染色1小时。在去除结晶紫溶液后计数菌斑数量, 并且计算每个裂解物的效价。用于菌斑试验的试剂汇总于表3。

[0109] 表2: 在JX-594病毒培养期间使用的试剂。

试剂	浓度	来源
JX-594 (PexaVec)	2.75x10 ⁹ pfu/ml	Sillajen Lot #: 20140420
阿霉素 (盐酸多柔比星)	10ug/ml	Sigma
碘化油 (罂粟籽油碘化脂肪酸乙酯)	2%和100%	Guerbet, France
凝胶海绵150mm – 350 mm (明胶 海绵颗粒栓塞剂)	1mg/ml	Alicon Pharm SCI & TEC CO., LTD
DMEM	NA	Hyclone Cat#SH30243.01
胎牛血清	2.5 %	Hyclone Cat#SH30919.03

[0111] 表3: 用于病毒菌斑试验的试剂。

	试剂 (用于菌斑试验)	最终浓度	来源
[0112]	DMEM (液体)	NA	Hyclone Cat#SH30243.01
	DMEM (粉末)	1 X	gibco Cat#12800-017
	胎牛血清	2 %	Hyclone Cat#SH30919.03
	羧甲基纤维素	1.5 %	Sigma Cat#C-5678
	青霉素-链霉素	1 %	Hyclone
[0113]			Cat#SV30010
	结晶紫	0.1 %	Sigma Cat#C-6158

[0114] 结果

[0115] 当JX-594在感染之前与凝胶海绵培养时,细胞病毒输出在24和48小时增加(图1A-D)。相反地,与碘油和/或阿霉素,与或不与凝胶海绵培养,减小在24小时的病毒输出(图1A和B)。在48小时,单独与2%碘油或与阿霉素和凝胶海绵培养减少在1的MOI的病毒输出,而单独与阿霉素培养减少在1和100的MOI的病毒输出(图1C和D)。这些结果指示凝胶海绵令人惊奇地增加体外的JX-594病毒复制接近3倍。相反地,阿霉素和碘油减少体外的JX-594病毒复制。先前的研究显示,当与栓塞剂一起培养或不与栓塞剂一起培养时,添加栓塞剂对具有基地外侧释放的小病毒的病毒输出如VSV没有影响,如类似病毒生长曲线所指示的(Altomonte et al. (2008) *Hepatology* 48:1864-1873)。因此,基本栓塞剂与较大溶瘤病毒和/或具有顶端释放的溶瘤病毒如痘苗病毒是相容的,并且甚至令人惊奇地增强病毒输出。在不被理论显示的情况下,病毒输出的增加可解释为什么本公开的栓塞方法即使使用大溶瘤病毒和从顶端表面芽殖的病毒如痘苗病毒仍然是有效的。

[0116] 实施例2:血清JX-594病毒检测

[0117] 评价在使用凝胶海绵配制的JX-594的兔子的栓塞后外周血中病毒的存在。

[0118] 方法

[0119] 三个正常新西兰白兔子(Biogenomics, Seoul, Korea; Samtako, Oh San, South Korea),没有VX2肿瘤移植,使用凝胶海绵配制的JX-594栓塞。栓塞治疗使用荧光透视导向进行。血管造影术通常使用经耳的方法进行,并且详细的方法遵循(Chang et al., (2011) *J Vasc Interv Radiol* 22:1181-1187)。将套管插入右和左中心耳动脉以确定哪一侧对进行肝动脉血管造影有优势。

[0120] 为了麻醉,在股后肌内注射1.5mL的赛拉嗪(xylazine)和替来他明(tiletamine)/唑拉西泮(zolazepam)的2:3混合物。在麻醉后,将兔子以仰卧位放置在荧光透视床上。对于

经耳动脉进入不需要剃毛。使用电推剪剃去穿刺部位的短毛。兔子的耳朵使用醇擦洗消毒。使用以逆行方向插入的18号血管造影针在兔子的耳朵的一只中经皮穿刺中心耳动脉。在向前推血管造影针的塑料鞘之后,去除内管心针,并且使用三通活塞的盖塞住塑料鞘的插孔。塑料鞘通过应用胶布固定。

[0121] 在将改良的钻头应用于塑料鞘的插孔后,2.0-F微导管 (Progreat, Terumo, Tokyo, Japan) 和0.016英寸导丝 (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japan) 由介入性放射学家引入中心耳动脉。输注大约1mL的造影剂以获得从颅外颈动脉至胸主动脉的路线图。将导丝小心地向前推进胸降主动脉中,然后通过操作导丝选择适当的肝动脉。在将为导管的尖端置于适当的肝动脉后,通过造影剂的手注射进行肝动脉血管造影。

[0122] 制备 1×10^8 PFU Pexa-Vec (SillaJen, Busan, Korea) 和 $150 \mu\text{m}$ - $350 \mu\text{m}$ 凝胶海绵颗粒 (Alicon, China) 的混合物。将半瓶凝胶海绵溶解于5mL的造影剂和5mL的生理盐水,并且将该混合物与1mL的Pexa-Vec混合。栓塞的终点是实现阻塞肿瘤供养的时候。在使用微导管选择血管后,栓塞使用1.5mL的制备的Pexa-Vec和凝胶海绵颗粒的混合物来进行。在从中心耳动脉去除微导管和塑料鞘后,穿刺部位用手压紧。

[0123] 外周血液样品在指定的时间点收集。血液样品从耳血管收集,并且以3,000rpm离心5分钟以分离血清。200 μL 的血清中的DNA遵循制造商的说明(血液和体液旋转方案)使用QIAamp DNA血液迷你试剂盒提取。简言之,将20 μL 的蛋白酶添加到1.5mL微量离心管中,并且添加200 μL 的血清。添加200 μL 的裂解缓冲液AL (QIAGEN, Cat#19075),并且将该管在56 $^{\circ}\text{C}$ 培养10分钟。将200 μL 的无水乙醇添加到样品中并且将混合物转移到QIAamp旋转柱。当以6,000x g离心样品1分钟时,使用提供的洗涤缓冲液AW1 (QIAGEN, Cat#19081) 和AW2 (QIAGEN, Cat#19072) 洗涤该柱两次。DNA在200 μL 的洗脱缓冲液AE (QIAGEN, Cat#10977) 中洗脱。使用7300实时PCR系统 (Applied Biosystems, 型号:PRI SM7300) 对痘苗DNA聚合酶基因E9L进行qPCR分析。qPCR示于下表4。测量平均病毒量。检测的极限是5。

[0124] 表4:qPCR条件

[0125]	试剂	来源的描述	单一反应的体积
--------	----	-------	---------

[0126]	引物 (F)	5'-GAA CAT TTT TGG CAG AGA GAG CC-3'	1.0 μ L
	引物 (R)	5'-CAA CTC TTA GCC GAA GCG TAT GAG-3'	1.0 μ L
	探针	6'FAM-CAG GCT ACC AGT TCA A-MGBNFQ-3'	1.0 μ L
	2X TaqMan Universal PCR Master Mix	Roche, Part#4304437	10.0 μ L
	ddH ₂ O	Invitrogen, Cat#10977-015	2.0 μ L
	模板	提取的DNA	5.0 μ L
	步骤	温度	时间
	变性	95 °C	15秒
	退火/ 延伸	60 °C	1分钟
	50个循环, 总共2小时10分钟		

[0127] 结果

[0128] 所有血清病毒检测值(表达为拷贝数)在检测的极限(表5)以下。在表5中,ND指没有检测的值(值=0),而<LOD指示检测的极限以下的值。这些结果指示经栓塞治疗递送的病毒仅位于肿瘤,并且不流出肿瘤进入其他组织或血流。相反地,先前研究证明了JX-594在直接注射到肿瘤中后,可在血流中检测。另外,使用VSV病毒的先前研究证明了,VSV在病毒栓塞后1天在血流中可检测,这指示较小的病毒没有被栓塞剂很好的保留,并且因此可到达肿瘤的组织外部(Shinozaki et al. (2004) Mol Therapy 9:368-376)。

[0129] 在系统循环中经由栓塞治疗递送的可检测JX-594病毒的缺乏相当令人惊奇。这些结果指示JX-594栓塞代表安全性超过将JX-594直接注射到肿瘤中或施用较小病毒如VSV栓塞的改善。JX-594通产被认为是安全的,但是其他溶瘤病毒可损坏或杀死体内别处的健康组织。经由病毒栓塞治疗递送的JX-594病毒不可能在肿瘤的外部输送,并且因此不能损坏或杀死健康组织。因此,JX-594病毒栓塞治疗是比直接注射到肿瘤中和使用较小病毒如VSV的病毒栓塞治疗更安全的替代。此外,在不受理论限制的情况下,小病毒如VSV不可能通过栓塞剂充分地保留。

[0130] 表5:血清病毒水平

[0131]		注射前	注射后	10分钟	30分	1小时	4小	D1	D2
	兔子1	<LOD	<LOD	0	0	0	0	0	0
	兔子2	0	0	0	0	0	0	0	0

兔子3	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	0	0	0
-----	---	------	------	---	------	---	---	---

[0132] 实施例3:使用Pexa-Vec和凝胶海绵的经导管动脉病毒栓塞

[0133] 在兔子VX2肝肿瘤模型中评价凝胶海绵对使用JX-594溶瘤痘苗病毒 (PexaVec) 经导管动脉病毒栓塞的影响。

[0134] 方法

[0135] 动物制备

[0136] 4个健康新西兰白兔子 (Biogenomics, Seoul, Korea; Samtako, Oh San, South Korea), 每个重2.5-3kg, 用于该研究。

[0137] VX2癌株通过成功移植进载体兔子的后肢维持。为了麻醉, 在股后肌内注射2.5-3mL的赛拉嗪 (Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea) 和替来他明/唑拉西洋 (Zoletil; Virbac, Carros, France) 的2:3混合物。通过中线剖腹术, 将0.1mL的切碎的VX2癌 (2-3mm³) 移植到肝脏的左内叶的被膜下实质中。肿瘤移植后14天, 当肿瘤直径为15-30mm时, 动物用于实验。

[0138] PexaVec栓塞治疗前一天, 使用动物以俯卧位或卧位进行 (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany) 计算机体层摄影术 (CT)。进行未增强的CT以覆盖整个肝脏 (1.5-mm准直、1.5间距和1-mm重建间隔)。对于造影物质-增强的CT, 将13mL的造影物质以0.5mL/秒的速率通过耳静脉注射。使用推注追踪技术, 在第5秒和第16秒间隔中获得肝动脉和门静脉相位扫描 (Yoon et al., (2003) Radiology 229:126-31)。

[0139] 在CT扫描时, 测量肿瘤的位置和大小。根据等式 $V=L \times S^2/2$ 计算肿瘤的体积 (V), 其中L是肿瘤的最长直径, 并且S是肿瘤的最短直径 (Okada et al., (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe et al., (1994) Oncology 52:76-81.31)。

[0140] PexaVec经导管动脉病毒栓塞

[0141] 在肝脏中移植VX2癌后2周, 栓塞治疗使用荧光透视导向进行。血管造影术通常使用经耳方法进行, 并且遵循详细的方法 (Chang et al., (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187)。将套管插入右和左中心耳动脉以确定哪一侧对进行肝动脉血管造影有优势。

[0142] 为了麻醉, 在股后肌内注射1.5mL的赛拉嗪和替来他明/唑拉西洋的2:3混合物。在麻醉后, 将兔子以仰卧位放置在荧光透视床上。对于经耳动脉进入不需要剃毛。使用电推剪剃去穿刺部位的短毛。兔子的耳朵使用醇擦洗消毒。使用以逆行方向插入的18号血管造影针在兔子的耳朵的一只中经皮穿刺中心耳动脉。在向前推血管造影针的塑料鞘之后, 去除内管心针, 并且使用三通活塞的盖塞住塑料鞘的插孔。塑料鞘通过应用胶布固定。

[0143] 在将改良的钻头应用于塑料鞘的插孔后, 2.0-F微导管 (Progreat, Terumo, Tokyo, Japan) 和0.016英寸导丝 (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japan) 由介入性放射学家引入中心耳动脉。输注大约1mL的造影剂以获得从颅外颈动脉至胸主动脉的路线图。将导丝小心地向前推进胸降主动脉中, 然后通过操作导丝选择适当的肝动脉。在将为导管的尖端置于适当的肝动脉后, 通过造影剂的手注射进行肝动脉血管造影。

[0144] 制备 1×10^8 PFU Pexa-Vec (SillaJen, Busan, Korea) 和150 μ m-350 μ m凝胶海绵颗粒 (Caligel, Alicon, China) 的混合物。将半瓶凝胶海绵溶解于5cc的造影剂和5cc的生理盐水, 并且将该混合物与1cc的Pexa-Vec混合。栓塞的终点是实现阻塞肿瘤供养的时候。在使用微导管选择VX2肿瘤后, 栓塞使用1.5cc的制备的Pexa-Vec和凝胶海绵颗粒的混合物来进

行。对照动物接受使用Tris缓冲液、Pexa-Vec或单独使用凝胶海绵的栓塞。在从中心耳动脉去除微导管和塑料鞘后，穿刺部位用手压紧。用于四个治疗组的组合物和剂量方案汇总于表6。

[0145] 表6. 经导管动脉病毒栓塞治疗组

组#	治疗	物质混合的时间	剂量	体积 (ul)	注射途径	动物的#
1	10mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	JX-594	NA	2×10^8 pfu	100 ul	HAI	1
[0146] 3	凝胶海绵 + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	JX-594 + 凝胶海绵	10 min	2×10^8 pfu/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

[0147] 动物监测

[0148] 根据表7观察动物的存活、肿瘤大小、体重和外貌。实验时间线的示意图示于图2A。CT扫描在栓塞之前不久(第0天)和在第7天进行。血液在第-1、3和9天收集。动物在第9天(肿瘤移植后32天)处死,并且收获组织进行分析(图2B)。

[0149] 表7:动物监测日程表

存活	每天
肿瘤大小	每隔一天和处死前不久
体重	每隔一天
[0150] 外貌	每隔一天: 粗糙的毛皮、脱水、困难地呼吸、昏睡。 如果发现异常, 拍照并报告
处死	肿瘤移植后32天
[0151] 数字记录	在程序日和程序后第7天的ST扫描

[0152] 组织成像

[0153] 用苏木精和曙红 (H&E) 染色从处理和对照动物收获的肝组织以显现肿瘤。CT扫描采用使用128节CT单元 (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) 进行, 具有以下

参数:120kVp的管电压,90mA的有效管电流,146mm的视场,以及2-mm间隔的2mm的重建厚度。在基线和血清治疗开始后23天对一部分动物进行CT扫描。CT方案包括在以2ml/s的速率经由耳静脉静脉推注8至9ml非离子碘化对照物质(每毫升碘海醇(Omnipaque;GE Healthcare AS) 300mg的碘,2ml/kg,2.4至2.7g的碘)后,获得未增强的图像,并随后获得动脉、静脉和延迟相图像系列。当使用推注追踪技术测量时,在将降主动脉增强至100个Hounsfield单位后10秒获得动脉相成像。完成动脉相10秒后获得静脉相成像,并且在完成静脉相后70秒获得延迟相成像。为了获得组织学样品,将具有VX2的兔子通过CO₂吸入安乐死。随后,手术切开腹部以分离整个肝组织,其在10%福尔马林溶液中处理2天。在对横跨VX2肿块的整个肝脏进行小心的切开后,将组织包埋在石蜡中。常规H&E染色后,在x100-200光学显微镜下进行组织学观察。

[0154] 结果

[0155] 在JX-594栓塞疗法之前,在CT扫描中观察到具有活性损伤的增强的VX2肿瘤块(图3A)。活组织VX2(图3A中的明亮区域)在组织学染色的组织中被正常肝实质包围。VX2组织显示了40-50%的坏死而没有任何治疗,这指示VX2肿块的自发性坏死。在经由左肝动脉注射JX-594凝胶海绵混合物之前,在血管造影图像(黑色圆圈)中观察肿瘤块(图3C)。

[0156] 然而,在动脉注射JX-594凝胶海绵混合物后,在CT和组织学图像中均观察到完全的肿瘤坏死(图3B和图3D)。JX-594栓塞治疗后观察到的高度坏死的肿瘤组织在组织学图像中由于缺少粉红色组织染色和缺少明显染色的细胞核而被鉴定(图3D)。这些结果指示单次剂量的JX-594栓塞治疗导致肿瘤的完全死亡。值得注意的是,组织学图像证明JX-594栓塞治疗后肿瘤外部的健康、完整的肝组织,如在面板左侧(图3D)和所有的图3E所示的坚固的粉红色染色和可见的染色的核所示。这指示,即使在肿瘤和健康组织之间的交界处,由于JX-594栓塞疗法,正常肝组织也没有发生损伤,因为在肿瘤和正常实质的交界区域观察到最小的炎症(图3D)。这些结果突出了JX-594栓塞疗法的精确特异性,因为病毒专门针对肿瘤,导致有效的肿瘤坏死,而不损害健康的肝组织。因此,本公开的栓塞方法代表了减少肿瘤负荷的安全还有效的方法。

[0157] 在不希望受理论的束缚的情况下,相信在栓塞治疗期间,凝胶海绵栓塞剂在将从极性细胞(如痘苗病毒)的顶端释放的较大病毒或病毒保持在适当位置是有效的。这种在肿瘤界面的持续定位继而有助于肿瘤组织的增加的递送和靶向感染。相反地,较小的病毒如VSV能够通过栓塞剂扩散并分散离开肿瘤,由此导致较少的靶向递送和肿瘤组织的较低感染。此外,在不受理论的限制的情况下,当用凝胶海绵配制时,病毒在靶组织处的增加的定位可以解释为什么本公开的栓塞方法不仅仅是有效的,而是令人惊奇地有效,甚至对于从顶端表面芽殖的大溶瘤病毒和病毒如痘苗病毒。

[0158] 此外,这些结果强调本公开的栓塞方法的强大功效,因为单一治疗导致完全肿瘤坏死,而先前利用的经动脉化学栓塞方法需要重复治疗以有效根除肿瘤。

[0159] 实施例4:在兔子中的经导管动脉病毒栓塞后溶瘤痘苗病毒的功效和PK调节

[0160] 在兔肿瘤模型中评价经导管动脉病毒栓塞(TAVE)比溶瘤病毒治疗和栓塞的功效。注射的病毒的药代动力学(PK)通过测量外周血样本中的病毒颗粒数来检查。

[0161] 方法

[0162] 4个健康新西兰白兔子(Biogenomics, Seoul, Korea; Samtako, Oh San, South

Korea), 每个重2.5-3kg, 用于该研究。麻醉通过在股后肌内注射2.5-3.0mL的甲苯噻嗪 (Rompun) 和舒泰 (Zoletil) 的2:3混合物来进行。将切碎的VX2癌肿瘤组织 (0.1mL) 通过中线剖腹术移植到肝脏的左内叶的被膜下实质中, 培养14-23天, 直至肿瘤直径达到15-30mm。痘苗病毒毒株vvDD-CDSR, 通过蔗糖垫纯化, 用于本研究。根据实施例3中所述的方法使用大小为150-350µm的凝胶海绵颗粒 (SCION, Alicon, Hangzhou, China) 进行栓塞治疗。在栓塞期间100mL的320mg/ml碘克沙醇 (VISIPAQUE, GE Healthcare, Cork, Ireland) 作为对照剂。治疗组、剂量和研究设计示于表8和图4。三个治疗组包括仅溶瘤病毒 (OV)、仅经动脉栓塞 (TAE) 和经动脉病毒栓塞 (TAVE)。在治疗之前1天和、治疗之前不久和治疗之后30分钟、4小时、1天、7天、14天、28天和56天收集血液。

[0163] 表8: 研究设计

组	兔子的#/性别	描述	物质	运载体	剂量, 体积	注射途径
1	3/雌性 (对于PK仅2)	TAVE	vvDD-CDSR + 凝胶海绵	生理盐水	10 mg 凝胶海绵 1cc 盐水 1cc OV 1cc 造影剂	AI
2	3/雌性 (对于PK仅2)	仅OV	vvDD-CDSR	生理盐水	1 x 10 ⁸ pfu/ml, 1ml	AI
3	3/雌性	仅TAE	凝胶海绵	生理盐水	50 mg 凝胶海绵 5cc 造影剂 5cc 盐水	AI

[0165] 对收集的的血样进行全血计数 (CBC) 和生化分析 (表9)。通过定量PCR (Q-PCR) 定量血样中的病毒颗粒。抗体测量在栓塞前和使用300µL血浆治疗后28天进行。CT扫描用于测量栓塞治疗前后的肿瘤大小。根据表10在研究期间进行动物监测。

[0166] 表9: 分析需要的血液的体积

评估项目	需要的样品体积	需要的全血
CBC	1mL, 全血	1mL
生物化学	1mL, 血浆	2mL
qPCR	500µL, 血清	1mL

[0168] 表10: 动物监测日程表

时间线	参数	记录
研究前	临床观察	可见异常
生命周期 (每隔一天)	临床观察	发病率、致死率、临床体征 (毛皮、脱水、呼吸等)
	体重	
	存活	
处死前	临床观察	临床体征, 体重

[0170] 实施例5: 使用vvDD-CDSR病毒和凝胶海绵的经导管动脉病毒栓塞

[0171] 在兔子VX2肝肿瘤模型中评价凝胶海绵对使用vvDD-CDSR溶瘤痘苗病毒的经导管栓塞治疗的影响。

[0172] 方法

[0173] 动物制备

[0174] 4个健康新西兰白兔子 (Biogenomics, Seoul, Korea; Samtako, Oh San, South Korea), 每个重2.5-3kg, 用于该研究。

[0175] VX2癌株通过成功移植进载体兔子的后肢维持。为了麻醉, 在股后肌内注射2.5-3mL的赛拉嗪 (Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea) 和替来他明/唑拉西洋 (Zoletil; Virbac, Carros, France) 的2:3混合物。通过中线剖腹术, 将0.1mL的切碎的VX2癌 (2-3mm³) 移植到肝脏的左内叶的被膜下实质中。肿瘤移植后14天, 当肿瘤直径为15-30mm时, 动物用于实验。

[0176] vvDD-CDSR栓塞治疗前一天, 使用动物以俯卧位或卧位进行 (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany) 计算机体层摄影术 (CT)。进行未增强的CT以覆盖整个肝脏 (1.5-mm准直、1.5间距和1-mm重建间隔)。对于造影物质-增强的CT, 将13mL的造影物质以0.5mL/秒的速率通过耳静脉注射。使用推注追踪技术, 在第5秒和第16秒间隔中获得肝动脉和门静脉相位扫描 (Yoon et al., (2003) Radiology 229:126-31)。

[0177] 在CT扫描时, 测量肿瘤的位置和大小。根据等式 $V=L \times S^2/2$ 计算肿瘤的体积 (V), 其中L是肿瘤的最长直径, 并且S是肿瘤的最短直径 (Okada et al., (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe et al., (1994) Oncology 52:76-81.31)。

[0178] vvDD-CDSR经导管动脉病毒栓塞

[0179] 在肝脏中移植VX2癌后2周, 栓塞治疗使用荧光透视导向进行。血管造影术通常使用经耳方法进行, 并且遵循详细的方法 (Chang et al., (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187)。将套管插入右和左中心耳动脉以确定哪一侧对进行肝动脉血管造影有优势。

[0180] 为了麻醉, 在股后肌内注射1.5mL的赛拉嗪和替来他明/唑拉西洋的2:3混合物。在麻醉后, 将兔子以仰卧位放置在荧光透视床上。对于经耳动脉进入不需要剃毛。使用电推剪剃去穿刺部位的短毛。兔子的耳朵使用醇擦洗消毒。使用以逆行方向插入的18号血管造影针在兔子的耳朵的一只中经皮穿刺中心耳动脉。在向前推血管造影针的塑料鞘之后, 去除内管心针, 并且使用三通活塞的盖塞住塑料鞘的插孔。塑料鞘通过应用胶布固定。

[0181] 在将改良的钻头应用于塑料鞘的插孔后, 2.0-F微导管 (Progreat, Terumo, Tokyo, Japan) 和0.016英寸导丝 (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japan) 由介入性放射学家引入中心耳动脉。输注大约1mL的造影剂以获得从颅外颈动脉至胸主动脉的路线图。将导丝小心地向前推进胸降主动脉中, 然后通过操作导丝选择适当的肝动脉。在将为导管的尖端置于适当的肝动脉后, 通过造影剂的手注射进行肝动脉血管造影。

[0182] 制备 1×10^8 PFU vvDD-CDSR (渥太华医院研究所 (OHRI)) 和150 μ m-350 μ m凝胶海绵颗粒 (Caligel, Alicon, China) 的混合物。将整瓶凝胶海绵用20mL注射器溶解于10ml的生理盐水中, 并且将该注射器插入到三通活塞的一侧。通过抽吸柱塞顺利地混合凝胶海绵和盐水混合物和造影剂。使用1mL注射器取0.3ml的凝胶海绵-盐水-造影剂混合物, 并且混合1cc的病毒。栓塞的终点是实现阻塞肿瘤供养的时候。在使用微导管选择VX2肿瘤后, 栓塞使用0.4ml的制备的病毒和凝胶海绵颗粒的混合物来进行。对照动物接受使用Tris缓冲液、病毒或单独使用凝胶海绵的栓塞。在从中心耳动脉去除微导管和塑料鞘后, 穿刺部位用手压紧。用于四个治疗组的组合和剂量方案汇总于表11。

[0183] 表11: 经导管动脉病毒栓塞治疗组。

[0184]	组#	治疗	物质混合的时	剂量	体 积	注射途	动物的
			间		(ul)	径	#
	1	10mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
	2	vvDD-CDSR	NA	5×10^7 pfu	100 ul	HAI	1
[0185]	3	凝胶海绵 + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
	4	vvDD-CDSR + 凝胶海绵	10 min	5×10^7 pfu/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

[0186] 动物监测

[0187] 根据表12观察动物的存活、肿瘤大小、体重和外貌。CT扫描在栓塞之前不久(第0天)和在第7天进行。血液在第-1、3和9天收集。动物在第9天(肿瘤移植后32天)处死,并且收获组织进行分析。

[0188] 表12:动物监测日程表

	存活	每天
	肿瘤大小	每隔一天和处死前不久
	体重	每隔一天
[0189]	外貌	每隔一天: 粗糙的毛皮、脱水、困难地呼吸、昏睡。 如果发现异常, 拍照并报告
	处死	肿瘤移植后32天
	数字记录	在程序日和程序后第7天的ST扫描

[0190] 组织成像

[0191] 用苏木精和曙红(H&E)染色从处理和对照动物收获的肝组织以显现肿瘤。CT扫描采用128节CT单元(Somatom Definition AS Plus;Siemens Healthcare)进行,具有以下参数:120kVp的管电压,90mA的有效管电流,146mm的视场,以及2-mm间隔的2mm的重建厚度。在基线和血清治疗开始后23天进行CT扫描。CT方案包括在以2ml/s的速率经由耳静脉静脉推注8至9ml非离子碘化对照物质(每毫升碘海醇(Omnipaque;GE Healthcare AS)300mg的碘,2ml/kg,2.4至2.7g的碘)后,获得未增强的图像,并随后获得动脉、静脉和延迟相图像系

列。当使用推注追踪技术测量时,在实现将降主动脉增强至100个Hounsfield单位后10秒获得动脉相成像。完成动脉相10秒后获得静脉相成像,并且在完成静脉相后70秒获得延迟相成像。为了获得组织学样品,将具有VX2的兔子通过CO₂吸入安乐死。随后,手术切开腹部以分离整个肝组织,其在10%福尔马林溶液中处理2天。在对横跨VX2肿块的整个肝脏进行小心的切开后,将组织包埋在石蜡中。常规H&E染色后,在x100-200光学显微镜下进行组织学观察。

[0192] 实施例6:使用SJ-102病毒和凝胶海绵的经导管动脉病毒栓塞

[0193] 在兔子VX2肝肿瘤模型中评价凝胶海绵对使用SJ-102溶瘤痘苗病毒的经导管栓塞治疗的影响。

[0194] 方法

[0195] 动物制备

[0196] 4个健康新西兰白兔子(Biogenomics,Seoul,Korea;Samtako,Oh San,South Korea),每个重2.5-3kg,用于该研究。

[0197] VX2癌株通过成功移植进载体兔子的后肢维持。为了麻醉,在股后肌内注射2.5-3mL的赛拉嗪(Rompun;Bayer Korea,Seoul,Korea)和替来他明/唑拉西洋(Zoletil;Virbac,Carros,France)的2:3混合物。通过中线剖腹术,将0.1mL的切碎的VX2癌(2-3mm³)移植到肝脏的左内叶的被膜下实质中。肿瘤移植后14天,当肿瘤直径为15-30mm时,动物用于实验。

[0198] SJ-102栓塞治疗前一天,使用动物以俯卧位或卧位进行(Somatom definition AS;Siemens Medical Systems,Erlangen,Germany)计算机体层摄影术(CT)。进行未增强的CT以覆盖整个肝脏(1.5-mm准直、1.5间距和1-mm重建间隔)。对于造影物质-增强的CT,将13mL的造影物质以0.5mL/秒的速率通过耳静脉注射。使用推注追踪技术,在第5秒和第16秒间隔中获得肝动脉和门静脉相位扫描(Yoon et al.,(2003)Radiology 229:126-31)。

[0199] 在CT扫描时,测量肿瘤的位置和大小。根据等式 $V=L \times S^2/2$ 计算肿瘤的体积(V),其中L是肿瘤的最长直径,并且S是肿瘤的最短直径(Okada et al.,(1995)Br J Cancer 71:518-524;Watanabe et al.,(1994)Oncology 52:76-81.31)。

[0200] SJ-102经导管动脉病毒栓塞

[0201] 在肝脏中移植VX2癌后2周,栓塞治疗使用荧光透视导向进行。血管造影术通常使用经耳方法进行,并且遵循详细的方法(Chang et al.,(2011)J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187)。将套管插入右和左中心耳动脉以确定哪一侧对进行肝动脉血管造影有优势。

[0202] 为了麻醉,在股后肌内注射1.5mL的赛拉嗪和替来他明/唑拉西洋的2:3混合物。在麻醉后,将兔子以仰卧位放置在荧光透视床上。对于经耳动脉进入不需要剃毛。使用电推剪剃去穿刺部位的短毛。兔子的耳朵使用醇擦洗消毒。使用以逆行方向插入的18号血管造影针在兔子的耳朵的一只中经皮穿刺中心耳动脉。在向前推血管造影针的塑料鞘之后,去除内管心针,并且使用三通活塞的盖塞住塑料鞘的插孔。塑料鞘通过应用胶布固定。

[0203] 在将改良的钻头应用于塑料鞘的插孔后,2.0-F微导管(Progreat,Terumo,Tokyo,Japan)和0.016英寸导丝(Meister,Asahi intec,Aichi,Co,Ltd,Japan)由介入性放射学家引入中心耳动脉。输注大约1mL的造影剂以获得从颅外颈动脉至胸主动脉的路线图。将导丝小心地向前推进胸降主动脉中,然后通过操作导丝选择适当的肝动脉。在将为导管的尖端

置于适当的肝动脉后,通过造影剂的手注射进行肝动脉血管造影。

[0204] 制备 1×10^8 PFU SJ-102 (由Wyeth毒株 (ATCC) 生成) 和 $150 \mu\text{m}$ - $350 \mu\text{m}$ 凝胶海绵颗粒 (Caligel, Alicon, China) 的混合物。将半瓶凝胶海绵溶解于5cc的造影剂和5cc的生理盐水,并且将该混合物与1cc的病毒混合。栓塞的终点是实现阻塞肿瘤供养的时候。在使用微导管选择VX2肿瘤后,栓塞使用1.5cc的制备的病毒和凝胶海绵颗粒的混合物来进行。对照动物接受使用Tris缓冲液、病毒或单独使用凝胶海绵的栓塞。在从中心耳动脉去除微导管和塑料鞘后,穿刺部位用手压紧。用于四个治疗组的组合和剂量方案汇总于表13。

[0205] 表13:经导管动脉病毒栓塞治疗组。

组#	治疗	物质混合的时间	剂量	体积 (ul)	注射途径	动物的#
1	10mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	SJ-102	NA	5×10^7 pfu	100 ul	HAI	1
[0206] 3	凝胶海绵 + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	SJ-102 + 凝胶海绵	10 min	5×10^7 pfu/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

[0207] 动物监测

[0208] 根据表14观察动物的存活、肿瘤大小、体重和外貌。CT扫描在栓塞之前不久(第0天) 和在第7天进行。血液在第-1、3和9天收集。动物在第9天(肿瘤移植后32天) 处死,并且收获组织进行分析。

[0209] 表14:动物监测日程表

存活	每天
肿瘤大小	每隔一天和处死前不久
体重	每隔一天
[0210] 外貌	每隔一天: 粗糙的毛皮、脱水、困难地呼吸、昏睡。 如果发现异常, 拍照并报告
处死	肿瘤移植后32天

[0211]	数字记录	在程序日和程序后第7天的ST扫描
--------	------	------------------

[0212] 组织成像

[0213] 用苏木精和曙红 (H&E) 染色从处理和对照动物收获的肝组织以显现肿瘤。CT扫描采用128节CT单元 (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) 进行, 具有以下参数: 120kVp的管电压, 90mA的有效管电流, 146mm的视场, 以及2-mm间隔的2mm的重建厚度。在基线和血清治疗开始后23天进行CT扫描。CT方案包括在以2ml/s的速率经由耳静脉静脉推注8至9ml非离子碘化对照物质 (每毫升碘海醇 (Omnipaque; GE Healthcare AS) 300mg的碘, 2ml/kg, 2.4至2.7g的碘) 后, 获得未增强的图像, 并随后获得动脉、静脉和延迟相图像系列。当使用推注追踪技术测量时, 在实现将降主动脉增强至100个Hounsfield单位后10秒获得动脉相成像。完成动脉相10秒后获得静脉相成像, 并且在完成静脉相后70秒获得延迟相成像。为了获得组织学样品, 将具有VX2的兔子通过CO₂吸入安乐死。随后, 手术切开腹部以分离整个肝组织, 其在10%福尔马林溶液中处理2天。在对横跨VX2肿块的整个肝脏进行小心的切开后, 将组织包埋在石蜡中。常规H&E染色后, 在x100-200光学显微镜下进行组织学观察。

[0214] 实施例7: 使用SJ-103病毒和凝胶海绵的经导管动脉病毒栓塞

[0215] 在兔子VX2肝肿瘤模型中评价凝胶海绵对使用SJ-103溶瘤痘苗病毒的经导管栓塞治疗的影响。

[0216] 方法

[0217] SJ-103病毒

[0218] 通过将两种选择标记基因插入到病毒的胸苷激酶 (TK) 基因中而从Western Reserve痘苗 (ATCC VR-1354, TC adaptor) 工程改造SJ-103减毒的痘苗病毒, 由此使TK基因失活。将赋予肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂抗性的gpt选择基因置于p7.5早期-晚期病毒启动子的控制下。将GFP荧光标记基因置于合成的早期-晚期启动子的控制下。作为TK破坏的结果, SJ-103病毒选择性靶向癌细胞。

[0219] 动物制备

[0220] 4个健康新西兰白兔子 (Biogenomics, Seoul, Korea; Samtako, Oh San, South Korea), 每个重2.5-3kg, 用于该研究。

[0221] VX2癌株通过成功移植进载体兔子的后肢维持。为了麻醉, 在股后肌内注射2.5-3mL的赛拉嗪 (Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea) 和替来他明/唑拉西泮 (Zoletil; Virbac, Carros, France) 的2:3混合物。通过中线剖腹术, 将0.1mL的切碎的VX2癌 (2-3mm³) 移植到肝脏的左内叶的被膜下实质中。肿瘤移植后14天, 当肿瘤直径为15-30mm时, 动物用于实验。

[0222] SJ-103栓塞治疗前一天, 使用动物以俯卧位或卧位进行 (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany) 计算机断层摄影术 (CT)。进行未增强的CT以覆盖整个肝脏 (1.5-mm准直、1.5间距和1-mm重建间隔)。对于造影物质-增强的CT, 将13mL的造影物质以0.5mL/秒的速率通过耳静脉注射。使用推注追踪技术, 在第5秒和第16秒间隔中获得肝动脉和门静脉相位扫描 (Yoon et al., (2003) Radiology 229:126-31)。

[0223] 在CT扫描时, 测量肿瘤的位置和大小。根据等式 $V=L \times S^2/2$ 计算肿瘤的体积 (V),

其中L是肿瘤的最长直径,并且S是肿瘤的最短直径(Okada et al., (1995) Br J Cancer 71:518-524;Watanabe et al., (1994) Oncology 52:76-81.31)。

[0224] SJ-103经导管动脉病毒栓塞

[0225] 在肝脏中移植VX2癌后2周,栓塞治疗使用荧光透视导向进行。血管造影术通常使用经耳方法进行,并且遵循详细的方法(Chang et al., (2011) J Vasc Interv Radiol 22: 1181-1187)。将套管插入右和左中心耳动脉以确定哪一侧对进行肝动脉血管造影有优势。

[0226] 为了麻醉,在股后肌内注射1.5mL的赛拉嗪和替来他明/唑拉西洋的2:3混合物。在麻醉后,将兔子以仰卧位放置在荧光透视床上。对于经耳动脉进入不需要剃毛。使用电推剪剃去穿刺部位的短毛。兔子的耳朵使用醇擦洗消毒。使用以逆行方向插入的18号血管造影针在兔子的耳朵的一只中经皮穿刺中心耳动脉。在向前推血管造影针的塑料鞘之后,去除内管心针,并且使用三通活塞的盖塞住塑料鞘的插孔。塑料鞘通过应用胶布固定。

[0227] 在将改良的钻头应用于塑料鞘的插孔后,2.0-F微导管(Progreat, Terumo, Tokyo, Japan)和0.016英寸导丝(Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japan)由介入性放射学家引入中心耳动脉。输注大约1mL的造影剂以获得从颅外颈动脉至胸主动脉的路线图。将导丝小心地向前推进胸降主动脉中,然后通过操作导丝选择适当的肝动脉。在将为导管的尖端置于适当的肝动脉后,通过造影剂的手注射进行肝动脉血管造影。

[0228] 制备 1×10^8 PFU SJ-102(由Wyeth毒株(ATCC)生成)和 $150 \mu\text{m}$ - $350 \mu\text{m}$ 凝胶海绵颗粒(Caligel, Alicon, China)的混合物。将半瓶凝胶海绵溶解于5cc的造影剂和5cc的生理盐水,并且将该混合物与1cc的病毒混合。栓塞的终点是实现阻塞肿瘤供养的时候。在使用微导管选择VX2肿瘤后,栓塞使用1.5cc的制备的病毒和凝胶海绵颗粒的混合物来进行。对照动物接受使用Tris缓冲液、病毒或单独使用凝胶海绵的栓塞。在从中心耳动脉去除微导管和塑料鞘后,穿刺部位用手压紧。用于四个治疗组的组合和剂量方案汇总于表15。

[0229] 表15:经导管动脉病毒栓塞治疗组。

组#	治疗	物质混合的时间	剂量	体积 (ul)	注射途径	动物的#
1	10mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	SJ-103	NA	5×10^7 pfu	100 ul	HAI	1
[0230] 3	凝胶海绵 + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	SJ-103 + 凝胶海绵	10 min	5×10^7 pfu/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

[0231] 动物监测

[0232] 根据表16观察动物的存活、肿瘤大小、体重和外貌。CT扫描在栓塞之前不久(第0天)和在第7天进行。血液在第-1、3和9天收集。动物在第9天(肿瘤移植后32天)处死,并且收获组织进行分析。

[0233] 表16:动物监测日程表

存活	每天
肿瘤大小	每隔一天和处死前不久
体重	每隔一天
[0234] 外貌	每隔一天: 粗糙的毛皮、脱水、困难地呼吸、昏睡。 如果发现异常, 拍照并报告
处死	肿瘤移植后32天
数字记录	在程序日和程序后第7天的ST扫描

[0235] 组织成像

[0236] 用苏木精和曙红(H&E)染色从处理和对照动物收获的肝组织以显现肿瘤。CT扫描采用128节CT单元(Somatom Definition AS Plus;Siemens Healthcare)进行,具有以下参数:120kVp的管电压,90mA的有效管电流,146mm的视场,以及2-mm间隔的2mm的重建厚度。在基线和血清治疗开始后23天进行CT扫描。CT方案包括在以2ml/s的速率经由耳静脉静脉推注8至9ml非离子碘化对照物质(每毫升碘海醇(Omnipaque;GE Healthcare AS)300mg的碘,2ml/kg,2.4至2.7g的碘)后,获得未增强的图像,并随后获得动脉、静脉和延迟相图像系

列。当使用推注追踪技术测量时,在实现将降主动脉增强至100个Hounsfield单位后10秒获得动脉相成像。完成动脉相10秒后获得静脉相成像,并且在完成静脉相后70秒获得延迟相成像。为了获得组织学样品,将具有VX2的兔子通过CO₂吸入安乐死。随后,手术切开腹部以分离整个肝组织,其在10%福尔马林溶液中处理2天。在对横跨VX2肿块的整个肝脏进行小心的切开后,将组织包埋在石蜡中。常规H&E染色后,在x100-200光学显微镜下进行组织学观察。

[0237] 实施例8:使用WR-TK(-)病毒和凝胶海绵的经导管动脉病毒栓塞

[0238] 在兔子VX2肝肿瘤模型中评价凝胶海绵对使用WR-TK(-)溶瘤痘苗病毒的经导管栓塞治疗的影响。

[0239] 方法

[0240] 动物制备

[0241] 4个健康新西兰白兔子(Biogenomics,Seoul,Korea;Samtako,Oh San,South Korea),每个重2.5-3kg,用于该研究。

[0242] VX2癌株通过成功移植进载体兔子的后肢维持。为了麻醉,在股后肌内注射2.5-3mL的赛拉嗪(Rompun;Bayer Korea,Seoul,Korea)和替来他明/唑拉西洋(Zoletil;Virbac,Carros,France)的2:3混合物。通过中线剖腹术,将0.1mL的切碎的VX2癌(2-3mm³)移植到肝脏的左内叶的被膜下实质中。肿瘤移植后14天,当肿瘤直径为15-30mm时,动物用于实验。

[0243] WR-TK(-)栓塞治疗前一天,使用动物以俯卧位或卧位进行(Somatom definition AS;Siemens Medical Systems,Erlangen,Germany)计算机体层摄影术(CT)。进行未增强的CT以覆盖整个肝脏(1.5-mm准直、1.5间距和1-mm重建间隔)。对于造影物质-增强的CT,将13mL的造影物质以0.5mL/秒的速率通过耳静脉注射。使用推注追踪技术,在第5秒和第16秒间隔中获得肝动脉和门静脉相位扫描(Yoon et al.,(2003)Radiology 229:126-31)。

[0244] 在CT扫描时,测量肿瘤的位置和大小。根据等式 $V=L \times S^2/2$ 计算肿瘤的体积(V),其中L是肿瘤的最长直径,并且S是肿瘤的最短直径(Okada et al.,(1995)Br J Cancer 71:518-524;Watanabe et al.,(1994)Oncology 52:76-81.31)。

[0245] WR-TK(-)经导管动脉病毒栓塞

[0246] 在肝脏中移植VX2癌后2周,栓塞治疗使用荧光透视导向进行。血管造影术通常使用经耳方法进行,并且遵循详细的方法(Chang et al.,(2011)J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187)。将套管插入右和左中心耳动脉以确定哪一侧对进行肝动脉血管造影有优势。

[0247] 为了麻醉,在股后肌内注射1.5mL的赛拉嗪和替来他明/唑拉西洋的2:3混合物。在麻醉后,将兔子以仰卧位放置在荧光透视床上。对于经耳动脉进入不需要剃毛。使用电推剪剃去穿刺部位的短毛。兔子的耳朵使用醇擦洗消毒。使用以逆行方向插入的18号血管造影针在兔子的耳朵的一只中经皮穿刺中心耳动脉。在向前推血管造影针的塑料鞘之后,去除内管心针,并且使用三通活塞的盖塞住塑料鞘的插孔。塑料鞘通过应用胶布固定。

[0248] 在将改良的钻头应用于塑料鞘的插孔后,2.0-F微导管(Progreat,Terumo,Tokyo,Japan)和0.016英寸导丝(Meister,Asahi intec,Aichi,Co,Ltd,Japan)由介入性放射学家引入中心耳动脉。输注大约1mL的造影剂以获得从颅外颈动脉至胸主动脉的路线图。将导丝小心地向前推进胸降主动脉中,然后通过操作导丝选择适当的肝动脉。在将为导管的尖端

置于适当的肝动脉后,通过造影剂的手注射进行肝动脉血管造影。

[0249] 制备 1×10^8 PFU WR-TK(-) 和 $150 \mu\text{m}$ - $350 \mu\text{m}$ 凝胶海绵颗粒(Caligel, Alicon, China)的混合物。将半瓶凝胶海绵溶解于5cc的造影剂和5cc的生理盐水,并且将该混合物与1cc的病毒混合。栓塞的终点是实现阻塞肿瘤供养的时候。在使用微导管选择VX2肿瘤后,栓塞使用1.5cc的制备的病毒和凝胶海绵颗粒的混合物来进行。对照动物接受使用Tris缓冲液、病毒或单独使用凝胶海绵的栓塞。在从中心耳动脉去除微导管和塑料鞘后,穿刺部位用手压紧。用于四个治疗组的组合和剂量方案汇总于表17。

[0250] 表17:经导管动脉病毒栓塞治疗组。

组#	治疗	物质混合的时间	剂量	体积 (ul)	注射途径	动物的#
1	10mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	WR-TK(-)	NA	5×10^7 pfu	100 ul	HAI	1
3	凝胶海绵 + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	WR-TK(-) + 凝胶海绵	10 min	5×10^7 pfu/ 2-3	100 ul	HAI	1
			mm ³			

[0253] 动物监测

[0254] 根据表18观察动物的存活、肿瘤大小、体重和外貌。CT扫描在栓塞之前不久(第0天) 和在第7天进行。血液在第-1、3和9天收集。动物在第9天(肿瘤移植后32天)处死,并且收获组织进行分析。

[0255] 表18:动物监测日程表

	存活	每天
	肿瘤大小	每隔一天和处死前不久
	体重	每隔一天
[0256]	外貌	每隔一天: 粗糙的毛皮、脱水、困难地呼吸、昏睡。 如果发现异常, 拍照并报告
	处死	肿瘤移植后32天
	数字记录	在程序日和程序后第7天的ST扫描

[0257] 组织成像

[0258] 用苏木精和曙红 (H&E) 染色从处理和对照动物收获的肝组织以显现肿瘤。CT扫描采用使用128节CT单元 (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) 进行, 具有以下参数: 120kVp的管电压, 90mA的有效管电流, 146mm的视场, 以及2-mm间隔的2mm的重建厚度。在基线和血清治疗开始后23天进行CT扫描。CT方案包括在以2ml/s的速率经由耳静脉静脉推注8至9ml非离子碘化对照物质 (每毫升碘海醇 (Omnipaque; GE Healthcare AS) 300mg的碘, 2ml/kg, 2.4至2.7g的碘) 后, 获得未增强的图像, 并随后获得动脉、静脉和延迟相图像系列。当使用推注追踪技术测量时, 在实现将降主动脉增强至100个Hounsfield单位后10秒获得动脉相成像。完成动脉相10秒后获得静脉相成像, 并且在完成静脉相后70秒获得延迟相成像。为了获得组织学样品, 将具有VX2的兔子通过CO₂吸入安乐死。随后, 手术切开腹部以分离整个肝组织, 其在10%福尔马林溶液中处理2天。在对横跨VX2肿块的整个肝脏进行小心的切开后, 将组织包埋在石蜡中。常规H&E染色后, 在x100-200光学显微镜下进行组织学观察。

[0259] 实施例9: 使用vvDD病毒和凝胶海绵的经导管动脉病毒栓塞

[0260] 在兔子VX2肝肿瘤模型中评价凝胶海绵对使用vvDD溶瘤痘苗病毒的经导管栓塞治疗的影响。

[0261] 方法

[0262] 动物制备

[0263] 4个健康新西兰白兔子 (Biogenomics, Seoul, Korea; Samtako, Oh San, South Korea), 每个重2.5-3kg, 用于该研究。

[0264] VX2癌株通过成功移植进载体兔子的后肢维持。为了麻醉, 在股后肌内注射2.5-3mL的赛拉嗪 (Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea) 和替来他明/唑拉西泮 (Zoletil; Virbac, Carros, France) 的2:3混合物。通过中线剖腹术, 将0.1mL的切碎的VX2癌 (2-3mm³) 移植到肝脏的左内叶的被膜下实质中。肿瘤移植后14天, 当肿瘤直径为15-30mm时, 动物用于实验。

[0265] vvDD栓塞治疗前一天, 使用动物以俯卧位或卧位进行 (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany) 计算机断层摄影术 (CT)。进行未增强的CT以覆盖整个肝脏 (1.5-mm准直、1.5间距和1-mm重建间隔)。对于造影物质-增强的CT, 将13mL的造影物质以0.5mL/秒的速率通过耳静脉注射。使用推注追踪技术, 在第5秒和第16秒间隔

中获得肝动脉和门静脉相位扫描(Yoon et al., (2003) Radiology 229:126-31)。

[0266] 在CT扫描时,测量肿瘤的位置和大小。根据等式 $V=L \times S^2/2$ 计算肿瘤的体积(V),其中L是肿瘤的最长直径,并且S是肿瘤的最短直径(Okada et al., (1995) Br J Cancer 71:518-524;Watanabe et al., (1994) Oncology 52:76-81.31)。

[0267] vvDD经导管动脉病毒栓塞

[0268] 在肝脏中移植VX2癌后2周,栓塞治疗使用荧光透视导向进行。血管造影术通常使用经耳方法进行,并且遵循详细的方法(Chang et al., (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187)。将套管插入右和左中心耳动脉以确定哪一侧对进行肝动脉血管造影有优势。

[0269] 为了麻醉,在股后肌内注射1.5mL的赛拉嗪和替来他明/唑拉西洋的2:3混合物。在麻醉后,将兔子以仰卧位放置在荧光透视床上。对于经耳动脉进入不需要剃毛。使用电推剪剃去穿刺部位的短毛。兔子的耳朵使用醇擦洗消毒。使用以逆行方向插入的18号血管造影针在兔子的耳朵的一只中经皮穿刺中心耳动脉。在向前推血管造影针的塑料鞘之后,去除内管心针,并且使用三通活塞的盖塞住塑料鞘的插孔。塑料鞘通过应用胶布固定。

[0270] 在将改良的钻头应用于塑料鞘的插孔后,2.0-F微导管(Progreat, Terumo, Tokyo, Japan)和0.016英寸导丝(Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japan)由介入性放射学家引入中心耳动脉。输注大约1mL的造影剂以获得从颅外颈动脉至胸主动脉的路线图。将导丝小心地向前推进胸降主动脉中,然后通过操作导丝选择适当的肝动脉。在将为导管的尖端置于适当的肝动脉后,通过造影剂的手注射进行肝动脉血管造影。

[0271] 制备 1×10^8 PFU vvDD (OHRI) 和150 μ m-350 μ m凝胶海绵颗粒(Caligel, Alicon, China)的混合物。将半瓶凝胶海绵溶解于5cc的造影剂和5cc的生理盐水,并且将该混合物与1cc的病毒混合。栓塞的终点是实现阻塞肿瘤供养的时候。在使用微导管选择VX2肿瘤后,栓塞使用1.5cc的制备的病毒和凝胶海绵颗粒的混合物来进行。对照动物接受使用Tris缓冲液、病毒或单独使用凝胶海绵的栓塞。在从中心耳动脉去除微导管和塑料鞘后,穿刺部位用手压紧。用于四个治疗组的组合物和剂量方案汇总于表19。

[0272] 表19:经导管动脉病毒栓塞治疗组。

组#	治疗	物质混合的时间	剂量	体积 (ul)	注射途径	动物的#
1	10mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
[0273] 2	vvDD	NA	5×10^7 pfu	100 ul	HAI	1
3	凝胶海绵 + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

[0274]	4	vvDD + 凝 胶海绵	10 min	5×10^7 pfu/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
--------	---	-----------------	--------	---	--------	-----	---

[0275] 动物监测

[0276] 根据表20观察动物的存活、肿瘤大小、体重和外貌。CT扫描在栓塞之前不久(第0天)和在第7天进行。血液在第-1、3和9天收集。动物在第9天(肿瘤移植后32天)处死,并且收获组织进行分析。

[0277] 表20:动物监测日程表

[0278]	存活	每天
	肿瘤大小	每隔一天和处死前不久
	体重	每隔一天
	外貌	每隔一天:粗糙的毛皮、脱水、困难地呼吸、昏睡。 如果发现异常,拍照并报告
	处死	肿瘤移植后32天
	数字记录	在程序日和程序后第7天的ST扫描

[0279] 组织成像

[0280] 用苏木精和曙红(H&E)染色从处理和对照动物收获的肝组织以显现肿瘤。CT扫描采用128节CT单元(Somatom Definition AS Plus;Siemens Healthcare)进行,具有以下参数:120kVp的管电压,90mA的有效管电流,146mm的视场,以及2-mm间隔的2mm的重建厚度。在基线和血清治疗开始后23天进行CT扫描。CT方案包括在以2ml/s的速率经由耳静脉静脉推注8至9ml非离子碘化对照物质(每毫升碘海醇(Omnipaque;GE Healthcare AS)300mg的碘,2ml/kg,2.4至2.7g的碘)后,获得未增强的图像,并随后获得动脉、静脉和延迟相图像系列。当使用推注追踪技术测量时,在实现将降主动脉增强至100个Hounsfield单位后10秒获得动脉相成像。完成动脉相10秒后获得静脉相成像,并且在完成静脉相后70秒获得延迟相成像。为了获得组织学样品,将具有VX2的兔子通过CO₂吸入安乐死。随后,手术切开腹部以分离整个肝组织,其在10%福尔马林溶液中处理2天。在对横跨VX2肿块的整个肝脏进行小心的切开后,将组织包埋在石蜡中。常规H&E染色后,在x100-200光学显微镜下进行组织学观察。

[0281] 实施例10:使用HSV-1病毒和凝胶海绵的经导管动脉病毒栓塞

[0282] 在兔子VX2肝肿瘤模型中评价凝胶海绵对使用HSV-1溶瘤痘苗病毒的经导管栓塞治疗的影响。

[0283] 方法

[0284] 动物制备

[0285] 4个健康新西兰白兔子 (Biogenomics, Seoul, Korea; Samtako, Oh San, South Korea), 每个重2.5-3kg, 用于该研究。

[0286] VX2癌株通过成功移植进载体兔子的后肢维持。为了麻醉, 在股后肌内注射2.5-3mL的赛拉嗪 (Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea) 和替来他明/唑拉西泮 (Zoletil; Virbac, Carros, France) 的2:3混合物。通过中线剖腹术, 将0.1mL的切碎的VX2癌 (2-3mm³) 移植到肝脏的左内叶的被膜下实质中。肿瘤移植后14天, 当肿瘤直径为15-30mm时, 动物用于实验。

[0287] HSV-1栓塞治疗前一天, 使用动物以俯卧位或卧位进行 (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany) 计算机体层摄影术 (CT)。进行未增强的CT以覆盖整个肝脏 (1.5-mm准直、1.5间距和1-mm重建间隔)。对于造影物质-增强的CT, 将13mL的造影物质以0.5mL/秒的速率通过耳静脉注射。使用推注追踪技术, 在第5秒和第16秒间隔中获得肝动脉和门静脉相位扫描 (Yoon et al., (2003) Radiology 229:126-31)。

[0288] 在CT扫描时, 测量肿瘤的位置和大小。根据等式 $V=L \times S^2/2$ 计算肿瘤的体积 (V), 其中L是肿瘤的最长直径, 并且S是肿瘤的最短直径 (Okada et al., (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe et al., (1994) Oncology 52:76-81.31)。

[0289] HSV-1经导管动脉病毒栓塞

[0290] 在肝脏中移植VX2癌后2周, 栓塞治疗使用荧光透视导向进行。血管造影术通常使用经耳方法进行, 并且遵循详细的方法 (Chang et al., (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187)。将套管插入右和左中心耳动脉以确定哪一侧对进行肝动脉血管造影有优势。

[0291] 为了麻醉, 在股后肌内注射1.5mL的赛拉嗪和替来他明/唑拉西泮的2:3混合物。在麻醉后, 将兔子以仰卧位放置在荧光透视床上。对于经耳动脉进入不需要剃毛。使用电推剪剃去穿刺部位的短毛。兔子的耳朵使用醇擦洗消毒。使用以逆行方向插入的18号血管造影针在兔子的耳朵的一只中经皮穿刺中心耳动脉。在向前推血管造影针的塑料鞘之后, 去除内管心针, 并且使用三通活塞的盖塞住塑料鞘的插孔。塑料鞘通过应用胶布固定。

[0292] 在将改良的钻头应用于塑料鞘的插孔后, 2.0-F微导管 (Progreat, Terumo, Tokyo, Japan) 和0.016英寸导丝 (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japan) 由介入性放射学家引入中心耳动脉。输注大约1mL的造影剂以获得从颅外颈动脉至胸主动脉的路线图。将导丝小心地向前推进胸降主动脉中, 然后通过操作导丝选择适当的肝动脉。在将为导管的尖端置于适当的肝动脉后, 通过造影剂的手注射进行肝动脉血管造影。

[0293] 制备 1×10^8 PFU HSV-1和150 μ m-350 μ m凝胶海绵颗粒 (Caligel, Alicon, China) 的混合物。将半瓶凝胶海绵溶解于5cc的造影剂和5cc的生理盐水, 并且将该混合物与1cc的病毒混合。栓塞的终点是实现阻塞肿瘤供养的时候。在使用微导管选择VX2肿瘤后, 栓塞使用1.5cc的制备的病毒和凝胶海绵颗粒的混合物来进行。对照动物接受使用Tris缓冲液、病毒或单独使用凝胶海绵的栓塞。在从中心耳动脉去除微导管和塑料鞘后, 穿刺部位用手压紧。用于四个治疗组的组合物和剂量方案汇总于表21。

[0294] 表21: 经导管动脉病毒栓塞治疗组。

组#	治疗	物质混合的时间	剂量	体积 (ul)	注射途径	动物的#	
[0295]	1	10mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
	2	HSV-1	NA	5×10^7 pfu	100 ul	HAI	1
	3	凝胶海绵 + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
[0296]	4	HSV-1 + 凝胶海绵	10 min	5×10^7 pfu/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

[0297] 动物监测

[0298] 根据表26观察动物的存活、肿瘤大小、体重和外貌。CT扫描在栓塞之前不久(第0天)和在第7天进行。血液在第-1、3和9天收集。动物在第9天(肿瘤移植后32天)处死,并且收获组织进行分析。

[0299] 表22:动物监测日程表

存活	每天
肿瘤大小	每隔一天和处死前不久
体重	每隔一天
[0300] 外貌	每隔一天: 粗糙的毛皮、脱水、困难地呼吸、昏睡。 如果发现异常, 拍照并报告
处死	肿瘤移植后32天
数字记录	在程序日和程序后第7天的ST扫描

[0301] 组织成像

[0302] 用苏木精和曙红 (H&E) 染色从处理和对照动物收获的肝组织以显现肿瘤。CT扫描采用使用128节CT单元 (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) 进行, 具有以下参数: 120kVp的管电压, 90mA的有效管电流, 146mm的视场, 以及2-mm间隔的2mm的重建厚度。在基线和血清治疗开始后23天进行CT扫描。CT方案包括在以2ml/s的速率经由耳静脉静脉推注8至9ml非离子碘化对照物质 (每毫升碘海醇 (Omnipaque; GE Healthcare AS) 300mg的碘, 2ml/kg, 2.4至2.7g的碘) 后, 获得未增强的图像, 并随后获得动脉、静脉和延迟相图像系

列。当使用推注追踪技术测量时,在实现将降主动脉增强至100个Hounsfield单位后10秒获得动脉相成像。完成动脉相10秒后获得静脉相成像,并且在完成静脉相后70秒获得延迟相成像。为了获得组织学样品,将具有VX2的兔子通过CO₂吸入安乐死。随后,手术切开腹部以分离整个肝组织,其在10%福尔马林溶液中处理2天。在对横跨VX2肿块的整个肝脏进行小心的切开后,将组织包埋在石蜡中。常规H&E染色后,在x100-200光学显微镜下进行组织学观察。该实施例证明了溶瘤HSV-1病毒(其包括,但不限于,通过使ICP34.5和ICP47基因失活和添加人GM-CSF基因而修饰的HSV-1的JS-1毒株)可经由本申请的栓塞方法用来治疗肝肿瘤(其包括,例如,已经转移到肝脏的黑素瘤癌)。

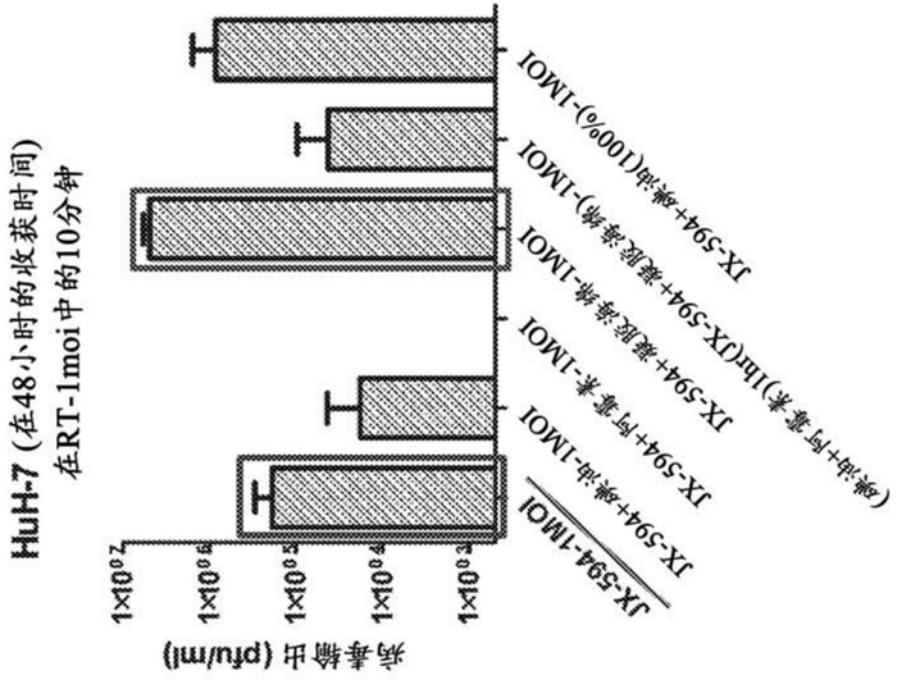


图1D

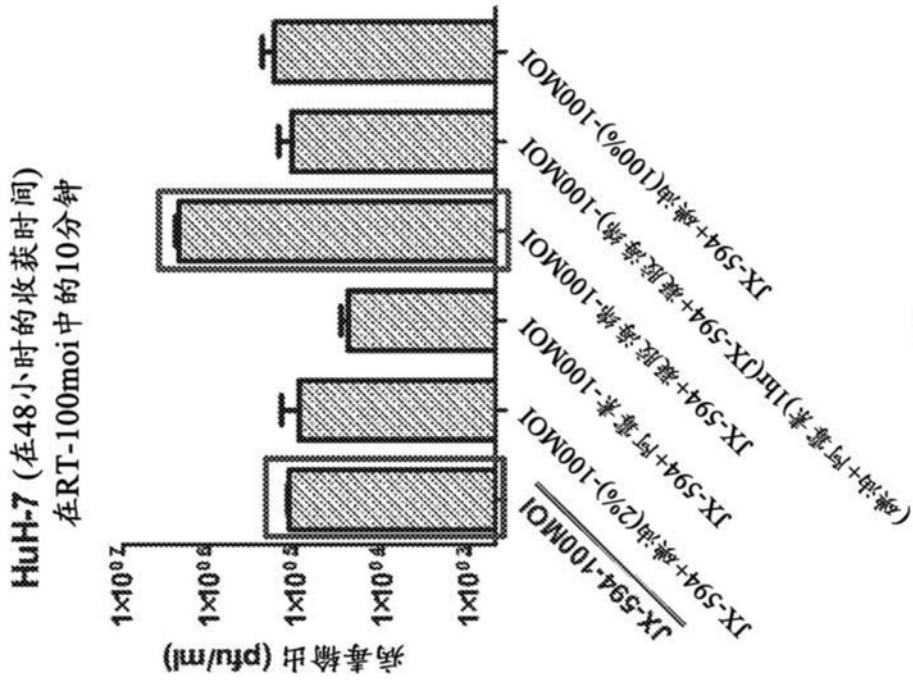


图1C

图1C和

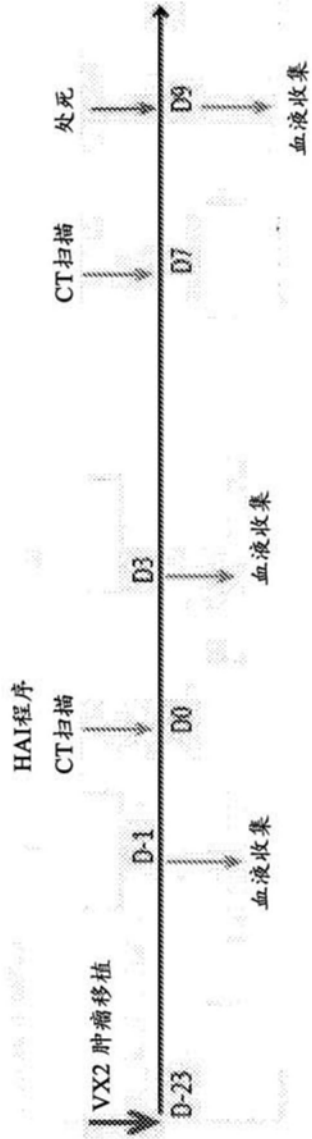


图2A

组别	血液分析		qPCR		大体		IHC		血液分析 (n=6/6)		CT扫描
	血清	全血	血浆	全血	血清	血清	健康	VX2	血清	全血	
治疗前	01		01	5.00uf	01						
	02										
	03										
	04										
治疗后5天	02										
	03										
	04										
治疗后9天	03										
	04										
总血液体积	2 ml	1 ml	1 ml	0.5 ml	2 ml	2 ml					

图2B

图2A和B

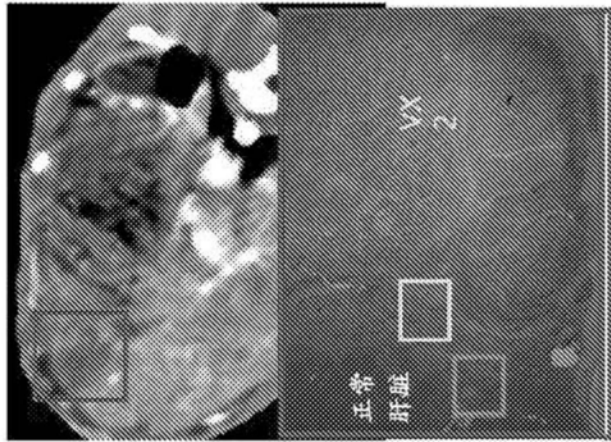


图3B

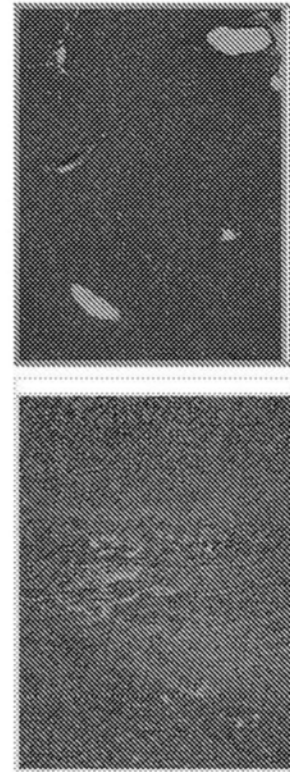


图3E

图3D

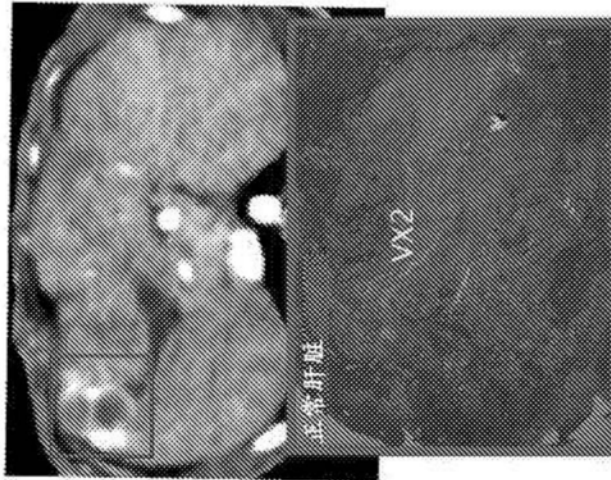


图3A

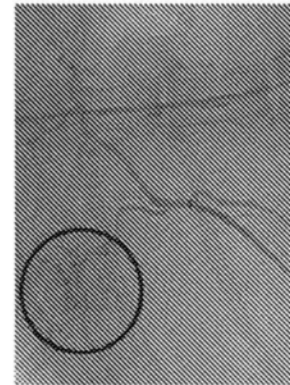


图3C

图3A-E

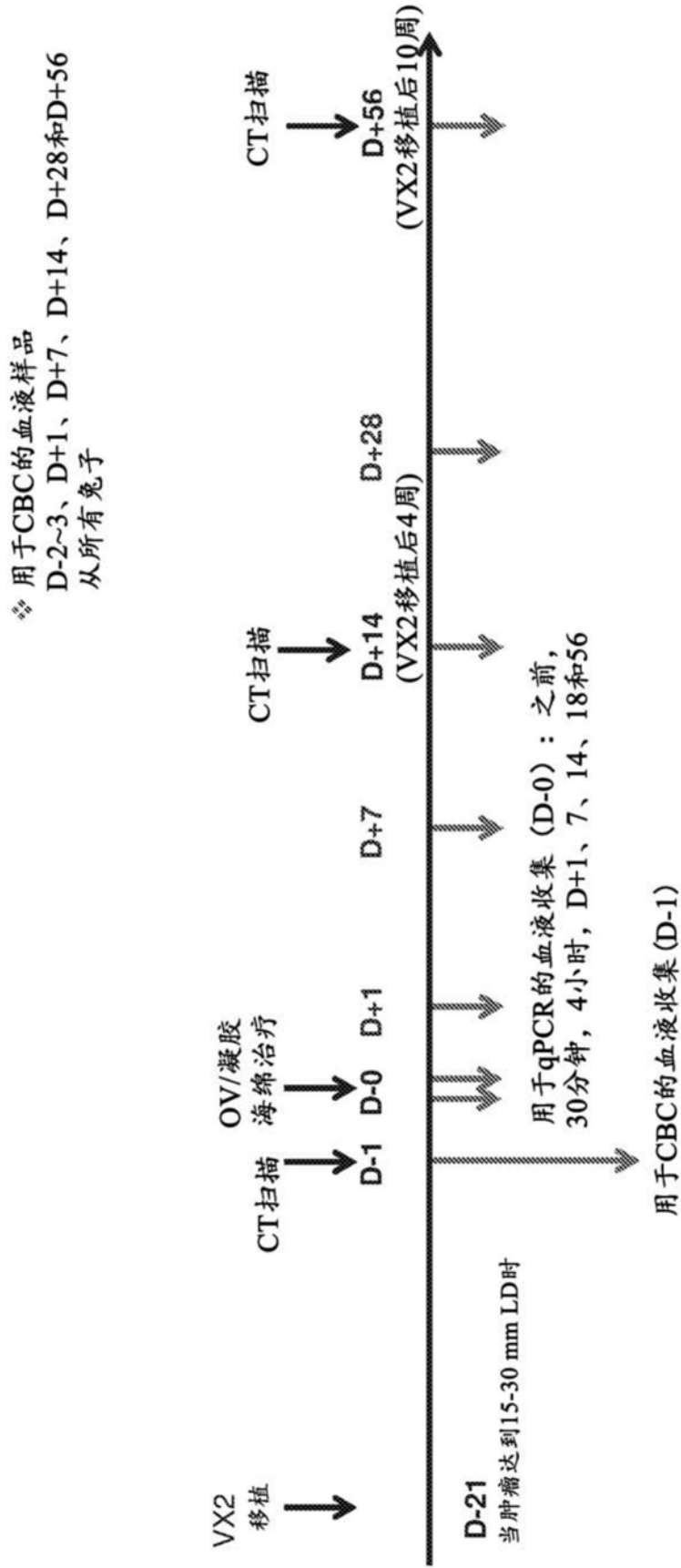


图4