



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110891584 B

(45) 授权公告日 2024.02.13

(21) 申请号 201880047292.0  
 (22) 申请日 2018.05.25  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 110891584 A  
 (43) 申请公布日 2020.03.17  
 (30) 优先权数据  
 62/511,010 2017.05.25 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2020.01.15  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2018/034655 2018.05.25  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02018/218151 EN 2018.11.29  
 (73) 专利权人 佛罗里达中央大学研究基金会  
 地址 美国佛罗里达州  
 (72) 发明人 格里夫·帕克 艾丽嘉·柯皮克  
 (74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
 专利代理师 封新琴  
 (51) Int. Cl.  
 C12N 7/01 (2006.01)

A61K 35/761 (2015.01)  
 C07K 14/705 (2006.01)  
 C12N 15/86 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2016339066 A1, 2016.11.24  
 WO 2008140621 A2, 2008.11.20  
 WO 2014041119 A1, 2014.03.20  
 US 2017056458 A1, 2017.03.02  
 US 2009214590 A1, 2009.08.27  
 US 2017067080 A1, 2017.03.09  
 US 2011318355 A1, 2011.12.29  
 US 2017007685 A1, 2017.01.12  
 US 2014134162 A1, 2014.05.15  
 WO 2014037124 A1, 2014.03.13  
 WO 2016069607 A1, 2016.05.06  
 WO 2016109668 A1, 2016.07.07  
 US 2016362472 A1, 2016.12.15  
 CA 2670790 A1, 2008.06.05  
 CN 104093422 A, 2014.10.08

审查员 黄艺蓉

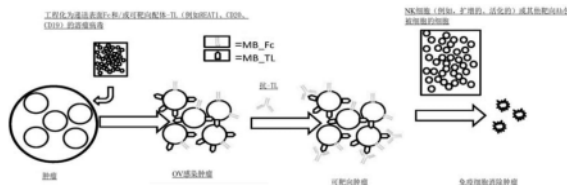
权利要求书2页 说明书20页 附图12页

(54) 发明名称

用于使肿瘤细胞对自然杀伤细胞的杀灭敏感的新型溶瘤病毒

(57) 摘要

公开了工程化溶瘤病毒、相关融合蛋白和编码它们的多核苷酸,以及使用工程化病毒治疗癌症的方法。在一个方面,本文公开了工程化的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒表达一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体,所述配体包含未切割的信号锚。



1. 一种用于将外源性膜结合NK细胞靶向配体递送至靶细胞的工程化溶瘤病毒,其中所述工程化溶瘤病毒包括多核苷酸序列,并且其中所述多核苷酸序列编码融合蛋白,所述融合蛋白包含可操作地连接到所述外源性膜结合NK细胞靶向配体的未切割的信号锚结构域,其中所述外源性膜结合NK细胞靶向配体包含工程化免疫球蛋白Fc结构域,其中所述工程化免疫球蛋白Fc结构域被修饰为具有反向取向,其中所述工程化免疫球蛋白Fc结构域的氨基末端面向细胞内。

2. 如权利要求1所述的工程化溶瘤病毒,其中所述未切割的信号锚结构域包括胞质尾区、跨膜区和胞外茎区。

3. 如权利要求2所述的工程化溶瘤病毒,其中所述工程化溶瘤病毒是包含修饰或工程化的5型副流感病毒的融合病毒。

4. 如权利要求2所述的工程化溶瘤病毒,其中所述未切割的信号锚结构域是神经氨酸酶信号锚结构域。

5. 如权利要求4所述的工程化溶瘤病毒,其中所述工程化免疫球蛋白Fc结构域的N-末端通过长度为2-20个氨基酸的肽接头与所述神经氨酸酶信号锚结构域融合。

6. 如权利要求5所述的工程化溶瘤病毒,其中所述肽接头是限制性酶切位点接头。

7. 如权利要求6所述的工程化溶瘤病毒,其中所述免疫球蛋白Fc结构域包含IgG1 Fc结构域,其被修饰以增加FcR结合或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。

8. 如权利要求1所述的工程化溶瘤病毒,其中所述免疫球蛋白Fc结构域还包含至少一种选自以下的氨基酸修饰:256A/K290A/S298A/E333A/K334A或L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L。

9. 如权利要求1所述的工程化溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒被工程化以表达IL-12、IL-21或IL-15中的一种或多种。

10. 一种药物组合物,其包含权利要求1所述的工程化溶瘤病毒和药学上可接受的载体。

11. 根据权利要求1所述的工程化溶瘤病毒在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述未切割的信号锚结构域包括胞质尾区、跨膜区和胞外茎区。

13. 如权利要求11所述的用途,其中所述药物进一步包含已用一种或多种NK细胞刺激剂刺激和扩增的NK细胞。

14. 如权利要求13所述的用途,其中所述一种或多种NK细胞刺激剂是细胞因子、生长因子、合成配体、NK细胞刺激颗粒、NK细胞刺激外来体或NK细胞刺激饲养细胞。

15. 如权利要求14所述的用途,其中所述一种或多种NK刺激剂是NK细胞刺激颗粒、NK细胞刺激外来体或NK细胞刺激饲养细胞;并且其中所述一种或多种药剂包含IL-21、4-1BBL或其片段。

16. 如权利要求15所述的用途,其中所述一种或多种NK细胞刺激剂包含选自由IL-2、IL-12、IL-18、IL-15或其组合组成的群组的至少一种细胞因子。

17. 如权利要求13所述的用途,其中所述NK细胞被工程化以表达靶向抗-CD19嵌合抗原受体的CD19或靶向抗-CD20嵌合抗原受体的CD20。

18. 如权利要求11所述的用途,其中所述癌症选自由以下组成的群组:白血病、淋巴瘤、

骨髓瘤、黑色素瘤、结肠直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肾细胞癌、恶性神经胶质瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌、皮肤癌、脑癌、胰腺癌、恶性间皮瘤、肺小细胞癌、间变性甲状腺癌或头颈鳞状细胞癌。

19. 如权利要求11所述的用途,其中所述癌症为恶性黑色素瘤。

20. 如权利要求11所述的用途,其中所述癌症为肺鳞状细胞癌。

21. 如权利要求11所述的用途,其中所述癌症为肺腺癌。

22. 如权利要求11所述的用途,其中所述癌症为梅克尔细胞癌。

23. 一种融合蛋白,其包含未切割的信号锚结构域,所述信号锚结构域包含:胞质尾区、跨膜区和胞外茎区;和NK细胞靶向配体,所述配体包含与胞外茎区的C-末端融合的N-末端,其中所述NK细胞靶向配体包含工程化免疫球蛋白Fc结构域,其中所述工程化免疫球蛋白Fc结构域被修饰成具有反向取向,其中所述工程化免疫球蛋白Fc结构域的氨基末端面向细胞内。

24. 如权利要求23所述的融合蛋白,其中所述NK细胞靶向配体包含选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的群组的免疫球蛋白Fc结构域。

25. 如权利要求24所述的融合蛋白,其中所述Fc结构域还包含至少一种选自以下组成的群组的氨基酸修饰:256A/K290A/S298A/E333A/K334A或L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L。

26. 如权利要求23所述的融合蛋白,其中所述未切割的信号锚结构域包含选自以下的信号锚结构域:神经氨酸酶、副流感病毒血凝素-神经氨酸酶、转铁蛋白受体、MHCII类恒定链、P糖蛋白、脱唾液酸糖蛋白受体和中性内肽酶的信号锚结构域。

27. 如权利要求26所述的融合蛋白,其中所述未切割的信号锚结构域包含神经氨酸酶信号锚结构域。

28. 如权利要求23所述的融合蛋白,其中所述NK细胞靶向配体是选自CD19和CD20的抗配体结构域。

29. 如权利要求23所述的融合蛋白,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性的氨基酸序列。

30. 一种编码权利要求29所述的融合蛋白的多核苷酸序列。

31. 一种溶瘤宿主病毒,其包含修饰的病毒基因组,所述基因组包含权利要求30所述的多核苷酸。

32. 如权利要求31所述的溶瘤宿主病毒,其中所述宿主病毒为5型副流感病毒。

33. 如权利要求31所述的溶瘤宿主病毒,其中所述宿主病毒是细胞融合的溶瘤病毒。

34. 包含权利要求30所述的多核苷酸的修饰的溶瘤病毒在制备用于癌症免疫疗法的药物中的用途。

35. 如权利要求34所述的用途,其中所述修饰的溶瘤病毒包括插入其病毒基因组中的权利要求30所述的多核苷酸。

## 用于使肿瘤细胞对自然杀伤细胞的杀灭敏感的新型溶瘤病毒

### 背景技术

[0001] 溶瘤病毒(OVs)作为癌症治疗措施具有很好的前景。OVs选择性地在癌细胞中扩散并引起大量细胞病变效应。这些病毒感染的、濒死的癌细胞进一步募集免疫细胞如NK细胞或细胞毒性T细胞以“清除”逃脱病毒杀灭的感染癌细胞。然而,癌症患者经常具有受损的免疫系统,其不能完成杀灭和/或去除受感染的靶癌细胞的工作。因此,需要的是新的溶瘤病毒和使用可以提供改善的结果的所述细胞的方法。

### 发明内容

[0002] 公开了涉及工程化或修饰的溶瘤病毒的方法和组合物。

[0003] 在一个方面,本文公开了工程化的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒表达一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体,所述配体包含未切割的信号锚。

[0004] 本文还公开了包含未切割的信号锚结构域的融合蛋白,所述信号锚定结构域包含:胞质尾区、跨膜区和胞外茎区;和免疫细胞靶向配体,所述免疫细胞靶向配体包含与胞外茎区的C末端融合的N末端。

[0005] 在一个方面,本文公开了任一前述方面的溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质;其中所述一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体包含工程化免疫球蛋白Fc结构域、NK细胞受体NKG2D的蛋白激动剂(如例如RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、MICB)、对抗-CD19具有反应性的蛋白质表位(如CD19)和/或对抗-CD20具有反应性的蛋白质表位(如CD20)。

[0006] 还公开了任一前述方面的溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质;其中所述外源性膜结合免疫细胞靶向配体是免疫球蛋白Fc结构域,并且所述免疫球蛋白Fc结构域(如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc结构域)被修饰成具有反向取向,其中氨基末端面向细胞内(即所述Fc在细胞表面的细胞外侧上表达,其N末端侧附着于细胞膜表面附近的膜锚肽,而不是N末端侧与细胞表面相距最大距离)。在一个方面,本文公开了任一前述方面的溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质;其中所述Fc结构域的N-末端与所述未切割的信号锚的胞外茎区的C-末端融合。

[0007] 在一个方面,本文公开了工程化的溶瘤病毒,其中所述工程化的溶瘤病毒是融合溶瘤病毒。在一些方面,所述融合溶瘤病毒可以是修饰的或工程化的5型副流感病毒。还公开了任一前述方面的融合溶瘤病毒,其中所述融合溶瘤病毒包含编码允许使肿瘤细胞融合的超融合特性的肽的基因。在一个方面,溶瘤病毒被修饰或工程化以包含任一前述方面的融合肽、多肽或蛋白质。

[0008] 还公开了任一前述方面的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒被工程化以表达IL-2、IL-12、IL-18、IL-21或IL-15中的一种或多种。

[0009] 在一个方面,本文公开了治疗癌症的方法,包括向受试者施用任一前述方面的工程化溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质。

[0010] 还公开了任一前述方面的治疗癌症的方法,其中所述方法还包括过继转移抗体或

免疫细胞(例如,NK细胞、遗传修饰的NK细胞和/或CAR T细胞)。

[0011] 在一个方面,本文公开了任一前述方面的治疗癌症的方法,其中所述NK细胞被一种或多种NK细胞刺激剂,如例如细胞因子、生长因子、合成配体、NK细胞刺激颗粒、NK细胞刺激外来体或NK细胞刺激饲养细胞刺激和扩增。

### 附图说明

[0012] 并入本说明书并构成本说明书一部分的附图示出了几个实施例,并与描述一起示出了所公开的组合物和方法。

[0013] 图1显示了用肿瘤靶向的溶瘤病毒处理和感染缺乏可靶向抗原的肿瘤的示意图,所述肿瘤靶向的溶瘤病毒被工程化以递送抗体的膜结合Fc区(MB\_Fc)或膜结合可靶向配体(MB\_TL);(例如RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、MICB、CD19和/或CD20)。如果使用不是NK细胞受体激动剂的MB\_TL,则可以用针对TL的治疗性抗体(例如抗-CD20-利妥昔单抗、奥法木单抗、奥丁珠单抗、维妥珠单抗或奥美珠单抗或抗-CD19 MDX1342、MEDI-551、AFM11、XmAb5871、MOR-208、SGN-19A、SAR3419、博纳吐单抗或帕他普莫单抗)处理肿瘤。然后,可以用能够进行抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的过继转移细胞如例如CD16+NK细胞处理被Fc或抗-TL抗体标记的肿瘤。

[0014] 图2A和2B显示了包含未切割的信号锚的膜结合免疫细胞靶向配体的构建。图2A显示了I型和II型整合膜蛋白的结构以及各自的信号锚。图2B显示了用于膜结合免疫细胞靶向配体的未切割的信号锚的结构。

[0015] 图3A显示了工程化的溶瘤病毒中的基因的示意图,包括膜结合免疫细胞靶向配体的插入点和任何融合突变的位点。

[0016] 图3B显示了用溶瘤病毒感染后的Vero细胞的显微照片。

[0017] 图3C显示了与模拟处理的肿瘤靶相比,当用工程化的溶瘤病毒处理时,PM21活化的NK细胞更有效地识别和杀灭肿瘤细胞。

[0018] 图3D显示了包含Fc结构域的膜结合免疫细胞靶向配体的替代性构建,所述Fc结构域包含神经氨酸酶信号锚和增加的神经氨酸酶茎长度。

[0019] 图4显示了膜结合免疫细胞靶向配体序列的实例。这里神经氨酸酶信号锚通过RS接头(即限制性酶切位点接头)融合到IgG Fc结构域。

[0020] 图5显示了当用携带NA-Fc构建体的质粒转染时,NA-Fc融合构建体在感染细胞表面上正确表达膜结合Fc靶向配体的能力的流式细胞术分析。

[0021] 图6显示了P/V/F病毒使A549细胞对NK细胞杀灭敏感。模拟感染或用P/V/F病毒感染A549肺癌细胞系。感染后,将NK细胞以指定的比例加入细胞中,并孵育4小时。使用Cytotox Glow测定法测量细胞死亡。包括仅NK和仅靶(模拟或P/V/F感染的)孔作为对照。

[0022] 图7显示了在Zeocin选择下用NA1-Fc构建体转染的A549肺癌细胞在细胞表面表达Fc。将A549肺癌细胞系用编码NA1-Fc表达的构建体转染,并在Zeocine存在下培养。将细胞用抗人Fc-APC抗体染色,并通过流式细胞术分析。亲代细胞用作对照。

[0023] 图8显示了Fc在肿瘤上的表达以及用P/V/F感染增加了NK细胞对A549细胞的杀灭。将A549细胞或在表面上稳定表达Fc的A549细胞(A549-Fc)用模拟或P/V/F感染,并以1:1或1:3的靶标与NK细胞的比率与NK细胞一起孵育。通过流式细胞术测量靶门中的活细胞事件,

参照仅含有各靶细胞的对照,确定细胞死亡。

[0024] 图9显示了FACS分选后,NA1-Fc-NA4-Fc构建体转染的SKOV-3卵巢癌细胞在细胞表面表达Fc。用编码NA1-Fc、NA2-Fc、NA3-Fc或NA4-Fc表达的构建体转染SKOV-3卵巢癌细胞系。几天后,将细胞用抗人Fc-APC抗体染色,并通过FACS分选以富集表达Fc的细胞群细胞计数。对于所有测试的构建体,分选的细胞具有稳定但可变的Fc表达水平。亲代细胞用作对照。

[0025] 图10显示了NA茎长度的增加通过识别表面表达的Fc结构域改善了NK细胞杀灭。将具有或不具有(NA1-NA4)-Fc的稳定表达的SKOV-3细胞与NK细胞以3:1的NK:靶标的比例混合。通过流式细胞术测量靶门中的活细胞事件,参照仅含有各靶细胞的对照,确定细胞死亡。杀灭与NA茎的长度相关,而不与SKOV-3细胞表面上的Fc的密度相关(图9)。

[0026] 图11显示了Fc在肿瘤上的表达以及P/V/F感染增加了NK细胞对SKOV-3细胞的杀灭。将SKOV-3细胞或在表面上稳定表达NA1-Fc的SKOV-3细胞(SKOV-3-Fc)用模拟或P/V/F感染,并与NK细胞以1:1或1:3的靶标与NK细胞的比例孵育。通过流式细胞术测量靶门中的活细胞事件,参照仅含有各靶细胞的对照,确定细胞死亡。Fc在表面上的表达以及P/V/F感染都导致NK细胞对SKOV-3细胞的杀灭增加,并且这种作用是加性的。

### 具体实施方式

[0027] 在公开和描述本发明的化合物、组合物、制品、装置和/或方法之前,应当理解,除非另有说明,否则它们不限于具体的合成方法或具体的重组生物技术方法,或者除非另有说明,否则它们不限于特定的试剂,同样地它们当然可以变化。还应理解,本文所用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不是旨在限制。

#### [0028] A. 定义

[0029] 如在本申请中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指明。因此,例如,提及“药物载体”包括两种或更多种此类载体的混合物等。

[0030] 范围在本文中可以表示为从“约”一个特定值和/或到“约”另一个特定值。当表达此类范围时,另一个实施例包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,应理解,特定值形成另一个实施例。还应理解,每个范围的末端点相对于另一个末端点和独立于另一个末端点都是有意义的。还应理解,本文公开了许多值,并且除了值本身之外,每个值在本文中也公开为“约”该特定值。例如,如果公开了值“10”,则也公开了“约10”。还应理解,当公开一个值时,还公开了“小于或等于”该值,“大于或等于该值”以及该值之间的可能范围,如本领域技术人员适当理解的。例如,如果公开了值“10”,则也公开了“小于或等于10”以及“大于或等于10”。还应理解,在整个申请中,数据以多种不同的格式提供,并且该数据表示终点和起始点,以及数据点的任何组合的范围。例如,如果公开了特定数据点“10”和特定数据点15,则应当理解认为公开了大于、大于或等于、小于、小于或等于以及等于10和15以及10至15。还应当理解,两个特定单元之间的每个单元也被公开。例如,如果公开了10和15,则还公开了11、12、13和14。

[0031] 在本申请中,将参考许多术语,其将被定义为具有以下含义:

[0032] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生,并且该描述包括所述事件或情况发生的例子和不发生的例子。

[0033] 如本文所用,“N末端侧”或“氨基末端”是指肽、多肽或蛋白质的方向性,并且可不意指N末端。在一些方面,当讨论嵌合或融合肽、多肽或蛋白质时,N末端侧可以仅指嵌合或融合肽、多肽或蛋白质的组分而不是整个结构。例如,当讨论包含未切割的信号锚的Fc结构域,并且Fc结构域被描述为具有反向取向,其氨基末端或N末端侧面向细胞内时,本文考虑的是其中信号锚位于嵌合或融合构建体的N末端并且实际上跨越细胞膜的嵌合或融合肽、多肽或蛋白质。因此,在此类嵌合体中,锚比Fc结构域更靠近氨基末端,但Fc结构域的方向性具有面向细胞的N末端侧,其相对于典型B细胞中Fc结构域的方向是反向的,典型B细胞通常具有跨越细胞膜的羧基末端和延伸至细胞外基质的氨基末端。

[0034] 本申请通篇参考了各种出版物。这些出版物的公开内容通过引用整体并入本申请,以便更全面地描述本申请所属领域的状态。所公开的参考文献也单独地和具体地通过引用并入本文,以用于在依赖于该参考文献的句子中讨论的包含在其中的材料。

[0035] B. 组合物

[0036] 公开了用于制备所公开的组合物的组分以及用于本文公开的方法中的组合物本身。本文公开了这些和其它材料,并且应当理解,当公开了这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,虽然可能没有明确公开这些化合物的每一个不同的单独和集合组合和排列的具体提及,但是本文具体考虑和描述了每一种。例如,如果公开和讨论了特定的溶瘤病毒或融合蛋白,并且讨论了可以对包括溶瘤病毒和/或融合蛋白的许多分子进行的许多修饰,则具体考虑的是溶瘤病毒和/或融合蛋白的每个组合和排列以及可能的修饰,除非特别指出相反情况。因此,如果公开了一类分子A、B和C以及一类分子D、E和F,并且公开了组合分子A-D的实例,则即使没有单独列举每种,也单独和共同考虑每种的意思是组合,A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F被认为是公开的。同样,还公开了这些的任何子集或组合。因此,例如,A-E、B-F和C-E的子组将被认为是公开的。这个概念适用于本申请的所有方面,包括但不限于制备和使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此,如果存在可以执行的多种附加步骤,则应当理解,这些附加步骤中的每一个可以与所公开的方法的任何具体实施例或实施例的组合一起执行。

[0037] 优先感染和杀灭癌细胞的溶瘤病毒(OVs)作为癌症治疗措施具有很好的前景。OVs选择性地癌细胞中扩散并引起大量细胞病变效应。这些病毒感染的、濒死的癌细胞进一步募集免疫细胞如NK细胞或细胞毒性T细胞以“清除”逃脱病毒杀灭的感染癌细胞。由于在癌症患者中,免疫系统经常受损并且不能完成这项工作,因此与过继性免疫细胞转移的组合可以提供改善的结果。

[0038] 免疫细胞如NK细胞,直接靶向破坏感染细胞。例如,NK细胞通过多种不同的方法有效地破坏肿瘤细胞、应激细胞和病毒感染的细胞。第一种方法是通过直接接合靶细胞,渗透它们的膜,然后注射切割和激活几种凋亡蛋白的蛋白,从而启动靶细胞的程序性细胞死亡(凋亡)。NK细胞的表面还含有蛋白质配体,其可以结合和激活靶细胞上的受体,如肿瘤坏死因子(TNF)相关凋亡诱导配体(TRAIL)的受体,所述受体开启用于凋亡性程序性细胞死亡的内部信号。当被刺激时,NK细胞也可分泌细胞因子如 $\text{INF } \gamma$  和 $\text{TNF}\alpha$ ,其不仅抑制病毒和肿瘤,而且还向其它免疫细胞发出侵入信号。

[0039] 通过使用重组核酸修饰,可以理解并且在本文中考虑溶瘤病毒和/或融合肽、多肽和蛋白质可以被工程化或以其他方式修饰,使得融合肽、多肽或蛋白质在癌细胞中的表达

改善NK细胞向靶癌细胞的募集。如本文可互换使用的,术语“融合肽”、“融合多肽”和“融合蛋白”是指已经工程化以包含来自两个或更多个不相关的肽、多肽或蛋白的结构域的任何肽、多肽或蛋白。在一些方面,融合肽、多肽或蛋白质包含连接形成融合物的组分两种或更多种肽、多肽或蛋白质中的每一种的全部或一部分。

[0040] 因此,本发明的一个方面涉及工程化的融合蛋白,即,由本文公开的工程化的溶瘤病毒表达的外源性膜结合靶向配体。如本文所用,术语“融合蛋白”与“嵌合蛋白”同义,并且是指第一未切割的信号锚多肽,其包含胞质尾区、跨膜区和胞外茎区,如下文进一步详细解释的,第一多肽可操作地连接至免疫细胞靶向配体多肽。术语“可操作地连接”是指两个多肽的融合,即每个区域与另一个区域的框内融合。融合可以在使用或不使用由2、3、4、5、6、7、8、9、20、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个或更多个氨基酸组成的短多肽接头的情况下完成。例如,靶向配体多肽可以在其N末端与第一多肽的C末端融合。

[0041] 在一个方面,融合肽、多肽或蛋白质是如本文所公开的外源性膜结合靶向配体。因此,融合肽、多肽或蛋白质可以包含未切割的信号锚结构域,所述信号锚结构域包含:胞质尾区、跨膜区和胞外茎区;和免疫细胞靶向配体,其中所述免疫细胞靶向配体的N末端融合至所述胞外茎区的C末端。(参见例如图2B)。换句话说,当融合蛋白在细胞中表达时,与天然存在的免疫细胞靶向配体的取向相比,免疫细胞靶向配体以相对于细胞的反向取向结合到细胞膜。

[0042] 在一个方面,未切割的信号锚结构域来源于II型整合膜蛋白,其在图2A的下图中示意性地描绘。II型整合膜蛋白通常包含细胞内的N-末端,即胞质尾区、跨膜区、胞外茎区和具有C-末端的球状头区。如本文所公开的,未切割的信号锚结构域包含胞质尾区、跨膜区和胞外茎区,但缺乏球状头区。未切割的信号锚结构域可以包含例如II型整合膜蛋白的相关部分,所述II型整合膜蛋白如神经氨酸酶、副流感病毒血凝素-神经氨酸酶、转铁蛋白受体、MHCII类恒定链、P糖蛋白、脱唾液酸糖蛋白受体或中性内肽酶。在一个示例性方面,未切割的信号锚结构域包含神经氨酸酶信号锚结构域,如图2B所示。

[0043] 免疫细胞靶向配体是例如能够结合(例如选择性结合)免疫细胞,并且包含氨基酸修饰的配体,其中配体的N-末端融合或融合(通过肽接头)至未切割的信号锚结构域的胞外茎结构域的C-末端。配体可以选自能够结合免疫细胞如NK细胞、B细胞、T细胞和/或CAR-T细胞的已知配体。此类配体包括,例如,免疫球蛋白Fc结构域,如IgG1(如图2B所示),或可替代地,IgG2、IgG3或IgG4。适于实现本文所述的反向取向的对Fc结构域的氨基酸修饰包括:256A/K290A/S298A/E333A/K334A或L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L。可替代地,所述靶向配体选自NK2GD配体,如例如RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA和MICB;或抗配体结构域,如CD19或CD20。

[0044] 作为非限制性实例,如本文所公开的融合蛋白包括包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列足够相同或衍生自该序列的氨基酸序列的多肽。如本文所公开的融合蛋白包括具有比SEQ ID NO:1的全长序列更少或更多的氨基酸的多肽,并表现出与靶向配体相同的膜锚定功能,由具有SEQ ID NO:1的序列的融合蛋白所证明。根据本公开的有用的融合蛋白的实例包括包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约45%,优选55%、65%、75%、85%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列的蛋白,并保留SEQ ID NO:1的融合蛋白的功能活性。更具体而言,根据本公开的融合蛋白可以包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约50%、

51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列。

[0045] 两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比可通过端对端比对两个序列来确定,以优化两个序列之间的氨基酸或核苷酸匹配的数目,其中例如可在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入缺口以获得与第二氨基酸或核酸序列的最佳比对。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则在该位置的分子是相同的。两个序列之间的序列同一性百分比是序列共有的相同位置的数目的函数(即,%序列同一性是相同位置的数目/位置的总数 $\times 100$ )。

[0046] 两个序列之间的序列同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。本领域已知的并且用于比较两个序列的数学算法的非限制性实例是Karlin和Altschul (1990)《美国国家科学院学报(Proc.Nat'l Acad.Sci.USA)》87:2264-2268的算法,并且该算法在Karlin和Altschul (1993)《美国国家科学院学报(Proc.Nat'l Acad.Sci.USA)》90:5873-5877中进行了改进。此类算法被并入Altschul等人(1990)《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》215:403-410的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸检索可用NBLAST程序(评分=100,字长=12)进行,以获得与本发明的粘附素核酸分子相似或同源的核苷酸序列。为了获得有缺口的比对以用于比较目的,可以如Altschul等人(1997)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》25:3389-3402中所述使用Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可使用各程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0047] 融合蛋白和编码它们的多核苷酸可以通过本领域已知的标准重组DNA技术来生产。例如,应用常规技术将编码不同多肽序列的DNA片段框内接合在一起。合适的技术包括通过使用用于接合的平末端或交错末端、提供合适末端的限制性内切酶消化、适当时填充粘性末端、避免不期望的连接的碱性磷酸酶处理和酶接合。可替代地,融合基因可以通过包括自动DNA合成仪的常规技术合成。可替代地,可以使用在两个连续基因片段之间产生互补突出端的锚引物进行基因片段的PCR扩增,随后可以将其退火并再扩增以产生嵌合基因序列。(参见,例如,《分子生物学的最新方案(Current Protocols in Molecular Biology)》,Ausubel等人编辑,John Wiley&Sons:1992)。

[0048] 可以通过从编码第一多肽的cDNA序列中去除终止密码子,然后通过接合或重叠延伸PCR框内添加编码第二多肽蛋白的cDNA,来产生编码如本文所公开的融合蛋白的融合基因。任选地,可以将短氨基酸序列(例如,约2至约20个氨基酸的序列)工程化为第一多肽和第二多肽之间的接头。然后将所得的包含编码融合蛋白的多核苷酸序列的融合基因引入宿主病毒的基因组,其包括例如本文公开的工程化溶瘤病毒。当宿主病毒接触宿主细胞并将其修饰的遗传包递送到细胞的细胞质中时,则融合基因将被宿主细胞表达为单个融合蛋白。

[0049] 如上所述,可以对公开的溶瘤病毒进行修饰或工程化,以使靶癌症部位处的免疫细胞(例如NK细胞、T细胞、CAR T细胞、先天淋巴细胞、巨噬细胞和B细胞(包括浆细胞))的数量最大化,并且因而增加免疫细胞在消除癌症中的活性(例如,NK细胞活性、T细胞活性、CAR

T细胞活性和/或B细胞活性(包括浆细胞和抗体活性)),使其超出未修饰的溶瘤病毒所能达到的活性。如本文所用,“溶瘤病毒”是指嗜癌细胞并杀灭癌细胞的病毒。可将溶瘤病毒工程化以选择性地攻击癌细胞,因此,在一个方面,本文公开了工程化的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒表达一种或多种包含未切割的信号锚的膜结合免疫细胞靶向配体。在某些方面,工程化溶瘤病毒表达本文公开的融合肽、多肽或蛋白质中的一种或多种。

[0050] 在一个方面,所公开的溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质被修饰以表达或包含一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体(如例如NK细胞靶向配体)以增加对NK细胞的亲和力。如本文所用,外源性膜结合免疫细胞靶向配体是指可用作免疫细胞活性靶标的任何外源性肽、多肽或蛋白质,包括但不限于NK细胞活性、B细胞活性、T细胞活性和CAR T细胞活性。因此,在一个方面,溶瘤病毒可包含一种或多种包含外源性膜结合免疫细胞靶向配体的肽、多肽或蛋白质,包括包含外源性膜结合免疫细胞靶向配体的融合蛋白。所公开的溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质的膜结合免疫细胞靶向配体可以与NK细胞、B细胞、T细胞或CAR T细胞结合。在一个方面,免疫细胞靶向配体是经由修饰以包括信号传导锚的膜结合配体。免疫细胞靶向配体可以例如包含免疫球蛋白Fc结构域,其是NK细胞上CD16的配体、NK细胞上NKG2D受体的配体或抗体或CAR T细胞的靶标。在一个方面,可以理解并且在本文中考虑外源性膜结合免疫细胞靶向配体可以直接与NK细胞受体如例如Fc结构域(例如IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4)、NK2GD配体(例如,RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA和/或MICB)结合,或者可以通过使用抗配体抗体(例如CD19或CD20,其可以与抗-CD19或抗-CD20抗体结合)间接与NK细胞结合,或者可以被抗配体CAR T细胞(如例如抗-CD19 CAR T细胞)直接靶向。因此,在一个方面,本文公开了包含免疫细胞靶向配体的融合蛋白和包含一种或多种免疫细胞靶向配体的溶瘤病毒,其中免疫细胞靶向配体是选自IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4组成的群组的Fc结构域。

[0051] Fc结构域是与在NK细胞表面发现的CD16(Fc  $\gamma$  RIII)结合的配体。CD16是NK细胞上的主要受体之一,并且当CD16与抗体的Fc部分(例如IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4 Fc结构域)结合时,这会激活NK细胞抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。然而,抗体的Fc部分通常仅在分泌时才可用。当发现于B细胞上的膜结合抗体受体存在时,Fc部分通常定向到细胞的细胞溶质。因此,在本文公开的修饰的溶瘤病毒中,当在感染的肿瘤靶标的膜上表达时,Fc结构域被修饰为具有反向取向,其中氨基末端面向细胞内,从而模仿结合至细胞表面的细胞外抗体的取向。在一个方面,本文公开了表达一种或多种包含未切割的信号锚的外源性膜结合免疫细胞靶向配体的修饰或工程化的溶瘤病毒;其中一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体是免疫球蛋白Fc结构域(例如IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4 Fc结构域),其被修饰为具有反向取向,其中氨基末端面向细胞内(即所述Fc在细胞表面的细胞外侧上表达,其N末端侧附着于细胞膜表面附近的膜锚肽,而不是N末端侧与细胞表面相距最大距离)。

[0052] 可以理解并且在本文中考虑Fc结构域可以作为单体、二聚或多聚构建体存在。在一个方面,可以进一步修饰Fc结构域,以增强抗体介导的杀灭、NK细胞识别和活化Fc  $\gamma$  受体的控制扩增。例如,可以对Fc结构域进行修饰以增加对CD16的亲和力。因此,例如,Fc结构域可包含一个或多个突变,如例如,T256A、K290A、S298A、E333A、K334A、L235V、F243L、R292P、Y300L和/或P396L。类似地,可以对Fc结构域进一步修饰以增加相对于抑制性Fc (IIb)受体与激活性(IIIa)受体的结合的选择性。因此,例如,Fc结构域可包含一个或多个突变,如例

如, S239D、I332E、A330L、F243L、R292P、V305I和/或P396L。

[0053] NKG2D是NK细胞上的活化受体,在靶细胞中触发肌动蛋白重组(细胞极化)和脱粒。NKG2D识别自诱导蛋白,这些蛋白通常在正常细胞表面上完全不存在或仅以低水平存在,但在感染、转化、衰老和应激细胞中过表达。NKG2D的配体来自MHC I类多肽相关序列(MIC)和视黄酸早期转录因子1(RAET1)/ULBP家族,其出现在应激、恶性转化和感染细胞的表面。MIC是表面糖蛋白。蛋白的MIC家族(MICA和MICB)在结构上与MHC类似,但不与 $\beta$ 2-微球蛋白或类似MHC的肽缔合。MIC家族蛋白由胞外结构域( $\alpha$ 1 $\alpha$ 2 $\alpha$ 3结构域)、跨膜结构域和C末端胞质尾构成。RAET1家族是表面糖蛋白,包括胞外结构域( $\alpha$ 1 $\alpha$ 2结构域)、跨膜结构域和C末端胞质尾。RAET1家族充当NKG2D的应激诱导配体,并且与MHC I类分子相关。在一个方面,本文公开了包含一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体的工程化溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质,所述外源性膜结合免疫细胞靶向配体包含未切割的信号锚;其中一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体是NKG2D配体(例如,RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA和/或MICB)。

[0054] 对外源性膜结合免疫细胞靶向配体(即,由如本文所公开的工程化溶瘤病毒编码的融合蛋白)进行修饰以使其存在于感染的癌细胞表面。在一个方面,这种膜结合呈现可以通过使用未切割的信号锚来实现。信号锚可以包含在细胞表面膜上保留编码的肽、多肽或蛋白质的任何信号传导序列。例如,信号锚可以是神经氨酸酶的跨膜结构域、来自副流感病毒血凝素神经氨酸酶的信号锚、来自转铁蛋白受体的信号锚、来自MHC II类恒定链的信号锚、来自P糖蛋白的信号锚、来自脱唾液酸糖蛋白受体的信号锚或来自中性内肽酶的信号锚。可替代地,可以修饰外源性膜结合免疫细胞靶向配体以编码在氨基末端上包含其他带正电荷的氨基酸的氨基酸替换。在一个方面,外源性膜结合免疫细胞靶向配体可以是融合蛋白,其中信号锚通过使用接头如RS接头与靶向配体连接或融合。因此,一个方面是包含一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体的溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质,其中所述膜结合免疫细胞靶向配体包含未切割的信号锚。在一个方面,免疫细胞靶向配体包含免疫球蛋白Fc结构域,其包含氨基酸修饰,其中Fc结构域的N末端融合至信号锚结构域的胞外茎结构域的C末端。在一个方面,本文公开了工程化溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质,其中溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质包含一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体和未切割的信号锚,其中未切割的信号锚是神经氨酸酶、副流感病毒血凝素神经氨酸酶、转铁蛋白受体、MHC II类恒定链、P糖蛋白、脱唾液酸糖蛋白受体或中性内肽酶。例如,工程化溶瘤病毒可包含编码融合蛋白的核苷酸序列,所述融合蛋白包含免疫球蛋白Fc结构域(例如IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4Fc结构域)和神经氨酸酶信号锚结构域,其中与天然存在的Fc结构域相对于细胞的取向相比所述Fc结构域被修饰成具有反向取向,其中氨基末端面向细胞内。换句话说,在本文所述的融合肽、多肽和蛋白质中,其中免疫细胞靶向配体包含免疫球蛋白Fc结构域,Fc结构域在细胞表面的细胞外侧表达,其N末端侧附着于细胞膜表面附近的膜锚肽,而不是N末端侧与细胞表面相距最大距离。可替代地,如本文所述并在工程化溶瘤病毒中编码的融合蛋白可包含NKG2D配体(例如,RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA和/或MICB)和神经氨酸酶信号锚结构域;或CD20和神经氨酸酶信号锚结构域;和/或CD19和神经氨酸酶信号锚结构域。

[0055] 包含膜结合免疫细胞靶向配体和未切割的信号锚的融合肽、多肽或蛋白质的一个

实施列于SEQ ID NO:1MNPNQKITTIGSICLVVGLISLILQIGNIISIWISHSIQTGSQNHTGICNRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK,并且如图4所示。

[0056] 如本文所讨论,存在已知并且本文考虑的融合肽、多肽和/或蛋白质;外源性膜结合免疫细胞靶向配体和/或信号锚结构域的许多变体。蛋白质变体和衍生物是本领域技术人员众所周知的,并且可以涉及氨基酸序列修饰。例如,氨基酸序列修饰通常属于三种类别中的一种或多种:替换、插入或缺失变体。插入包括氨基和/或羧基末端融合以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。插入通常是比氨基或羧基末端融合的插入小例如约一个至四个残基的插入。通过在体外交联或通过用编码融合物的DNA转化的重组细胞培养物融合足够大以赋予靶序列免疫原性的多肽来制备免疫原性融合蛋白衍生物,如在实例中描述的那些。缺失的特征在于从蛋白质序列中去除一个或多个氨基酸残基。通常,在蛋白质分子内的任一位点缺失不超过约2至6个残基。这些变体通常如下制备:对编码蛋白质的DNA中的核苷酸进行位点特异性诱变,从而产生编码该变体的DNA,然后在重组细胞培养物中表达该DNA。在具有已知序列的DNA中的预定位点进行替换突变的技术是众所周知的,例如M13引物诱变和PCR诱变。氨基酸替换通常是单个残基的替换,但可以一次出现在多个不同位置;插入通常约为约1至10个氨基酸残基;并且缺失范围约为1至30个残基。缺失或插入优选在相邻对中进行,即2个残基的缺失或2个残基的插入。替换、缺失、插入或其任何组合可以组合以获得最终的构建体。突变不得将序列置于阅读框之外,并且优选不会产生可能产生二级mRNA结构的互补区域。替换变体是其中至少一个残基已被去除并且在其位置插入了不同残基的那些。此类替换通常根据下表1和2进行,并且被称为保守替换。

[0057] 表1:氨基酸缩写

	氨基酸	缩写
	丙氨酸	Ala A
	别-异亮氨酸	Alle
	精氨酸	Arg R
	天冬酰胺	Asn N
	天冬氨酸	Asp D
	半胱氨酸	Cys C
	谷氨酸	Glu E
	谷氨酰胺	Gln Q
[0058]	甘氨酸	Gly G
	组氨酸	His H
	异亮氨酸	Ile I
	亮氨酸	Leu L
	赖氨酸	Lys K
	苯丙氨酸	Phe F
	脯氨酸	Pro P
	焦谷氨酸	pGlu
	丝氨酸	Ser S
	苏氨酸	Thr T
	酪氨酸	Tyr Y
[0059]	色氨酸	Trp W
	缬氨酸	Val V

[0060] 表2:氨基酸替换

[0061] 本领域已知的原始残基示例性的保守替换等。

Ala	Ser
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn、Lys
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
[0062] Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0063] 功能或免疫同一性的实质性改变通过选择比表2中的那些保守性低的替换来进行,即,选择其在维持以下的作用方面更加显著不同的残基:(a) 替换区域中多肽骨架的结构,例如为片状或螺旋状构型,(b) 靶位点上分子的电荷或疏水性;或(c) 侧链的主体。通常预期在蛋白质性质上产生最大变化的替换将是其中(a) 亲水性残基例如丝氨酰基或苏氨酰基替换(或被替换为)疏水性残基例如亮氨酰基、异亮氨酰基、苯丙氨酰基、缬氨酰基或丙氨酰基;(b) 半胱氨酸或脯氨酸替换(或被替换为)任何其他残基;(c) 具有正电侧链的残基例如赖氨酰基、精氨酰基或组氨酰基替换(或被替换为)负电残基例如谷氨酰基或天冬氨酰基;或(d) 具有庞大侧链的残基例如苯丙氨酸替换(或被替换为)不具有侧链的残基例如甘氨酸,在这种情况下,(e) 通过增加硫酸化和/或糖基化位点的数量进行替换。

[0064] 例如,一个氨基酸残基被在生物学和/或化学上相似的另一个氨基酸残基替代被本领域技术人员称为保守替换。例如,保守替换是将一个疏水残基替换为另一个,或将一个极性残基替换为另一个。所述替换包括组合,如例如,Gly、Ala;Val、Ile、Leu;Asp、Glu;Asn、Gln;Ser、Thr;Lys、Arg;和Phe、Tyr。每个明确公开的序列的此类保守替换的变体包括在本文提供的嵌合多肽内。

[0065] 可以采用替换或缺失诱变插入用于N-糖基化(Asn-X-Thr/Ser)或O-糖基化(Ser或Thr)的位点。半胱氨酸或其他不稳定残基的缺失也可能是期望的。潜在的蛋白水解位点例如Arg的缺失或替换,例如通过使碱性残基之一缺失或用谷氨酰胺酰或组氨酸残基替换来实现。

[0066] 某些翻译后衍生化是重组宿主细胞对表达的多肽起作用的结果。谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基经常被翻译后脱酰氨基化为相应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基。可替代地,这些残基在弱酸性条件下脱酰氨基。其他翻译后修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的邻氨基的甲基化(T.E.Creighton,《蛋白质:结构和分子性质(Proteins:Structure and Molecular Properties)》,W.H.Freeman&Co.,San Francisco pp 79-86[1983]),N-末端胺的乙酰化,以及在某些情况下的C-末端羧基的酰胺化。

[0067] 应当理解,定义本文公开的蛋白质的变体和衍生物的一种方法是根据与具体已知序列的同源性/同一性来定义变体和衍生物。例如,SEQ ID NO:1列出了融合蛋白的特定序列。具体公开的是本文公开的这些和其他蛋白质的变体,其与所述序列具有至少70%或75%或80%或85%或90%或95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。本领域技术人员容易理解如何确定两种蛋白质的序列同一性。例如,可以在比对两个序列之后计算序列同一性,使得同源性处于其最高水平。

[0068] 当本说明书讨论各种蛋白质和蛋白质序列时,应理解还公开了可编码那些蛋白质序列的核酸,即多核苷酸。这将包括与具体蛋白质序列有关的所有简并序列,即具有编码一个特定蛋白序列的序列的所有核酸以及编码所述蛋白序列的所公开的变体和衍生物的所有核酸,包括简并核酸。因此,尽管在本文中可能未写出每个特定的核酸序列,但应理解,实际上每个序列都是通过所公开的蛋白序列在本文中公开和描述的。因此,应理解并且在本文中考虑有所公开的融合肽、多肽或蛋白质的氨基酸序列的本领域技术人员可以设想并构建编码所述融合肽、多肽和蛋白质的多核苷酸。在一个方面,本文公开了编码本文公开的融合蛋白(例如,SEQ ID NO:1所列的融合蛋白)的多核苷酸序列。

[0069] 在一个方面,在本文中考虑由本文公开的工程化溶瘤细胞和/或融合肽、多肽或蛋白质诱导的任何NK细胞活性可通过使NK细胞与活化细胞因子如IL-2、IL-12、IL-18、IL-21或IL-15接触而活化NK细胞来增加。在一个方面,认识到活化细胞因子可以由溶瘤病毒表达。因此,一方面是工程化溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒表达包含未切割的信号锚结构域的一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体,其中所述溶瘤病毒被进一步工程化以表达IL-2、IL-12、IL-18、IL-21或IL-15中的一种或多种。

[0070] 本文公开的溶瘤病毒可以由任何病毒骨架构建。在一个方面,该病毒是修饰或工程化的腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒-1、单纯疱疹病毒-2、水痘带状疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、巨细胞病毒和/或人疱疹病毒-6)、痘病毒(例如天花病毒、牛痘病毒、传染性软疣病毒和/或口疮病毒)、呼肠孤病毒(例如轮状病毒)、小核糖核酸病毒(例如肠病毒、塞内卡病毒、脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、鼻病毒、甲型肝炎病毒和/或口蹄疫病毒)、囊膜病毒(例如甲病毒、塞姆利基森林病毒、东部马脑炎病毒、辛德毕斯病毒和/或风疹病毒)、冠状病毒、黄病毒(例如丙型肝炎病毒、乙型脑炎病毒、圣路易斯脑炎病毒、墨累河谷热病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、寨卡病毒和/或登革热病毒)、丝状病毒(例如埃博

拉病毒和/或马尔堡病毒)、沙粒病毒(例如拉沙热病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、Pichine病毒、胡宁病毒和/或马丘波病毒)、布尼亚病毒(例如汉坦病毒和/或裂谷热病毒)、副粘病毒(例如人副流感病毒、腮腺炎病毒、猿猴病毒5和/或麻疹病毒)、弹状病毒(例如水疱性口炎病毒和/或狂犬病毒)、肺炎病毒(例如呼吸道合胞病毒)、正粘病毒(例如甲型流感病毒、乙型流感病毒和/或丙型流感病毒)、 $\delta$ 病毒(例如丁型肝炎病毒)、逆转录病毒(例如猿猴免疫缺陷病毒、1型人类免疫缺陷病毒和2型人类免疫缺陷病毒、劳斯氏肉瘤病毒、1型人类T细胞白血病毒和/或猿猴泡沫病毒)、嗜肝DNA病毒(例如乙型肝炎病毒)、正戊肝病毒(例如戊型肝炎病毒)、人乳头瘤病毒或多瘤病毒。例如,溶瘤病毒可以是HSV-1溶瘤病毒HSV1716或Talimogene laherparepvec、修饰的腺病毒溶瘤病毒H101、脊髓灰质炎病毒溶瘤病毒PVSRIPO、呼肠孤病毒溶瘤病毒reosylin、塞内加谷病毒SVV-001、柯萨奇病毒溶瘤病毒柯萨奇病毒A21、肠病毒溶瘤病毒Riga病毒或牛痘病毒溶瘤病毒GL-ONC1或JX-594。在一个方面,本文公开了修饰或工程化的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒表达包含未切割的信号锚结构域的外源性膜结合免疫细胞靶向配体;其中所述修饰或工程化的溶瘤病毒是副流感病毒,如例如修饰或工程化的5型副流感病毒,例如CPI副流感病毒、野生型副流感病毒或编码来自CPI的P/V的CPI-WT副流感病毒嵌合病毒CPI,并且病毒骨架的其余部分为WT副流感病毒。

[0071] 在一个方面,认识到促进病毒与靶细胞如癌细胞的膜融合可以增加遗传物质从溶瘤病毒向靶细胞的递送速率和效率。一种可以促进溶瘤病毒与靶细胞融合的方法是通过使用融合肽、多肽和蛋白质。融合肽、多肽和蛋白质可包括但不限于病毒融合肽、多肽和蛋白质,如例如流感血凝素肽(HA)、登革热融合肽、HIV包膜(Env)、副粘病毒(例如副流感病毒和SV5)、融合蛋白(F)和副粘病毒血凝素-神经氨酸酶(HN)。因此,在一个方面,本文公开了溶瘤病毒,其包含一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体和未切割的信号锚结构域,其中工程化的溶瘤病毒是融合的溶瘤病毒。在一个方面,融合肽、多肽或蛋白质可以是溶瘤病毒内源的,或者病毒可以被工程化以表达外源融合肽、多肽或蛋白质。换句话说,溶瘤病毒可以是天然的或工程化/修饰成融合的。例如,骨架溶瘤病毒可以是呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒或腺病毒,其可以被修饰/工程化以包含融合肽、多肽或蛋白质,并且因此是融合的。因此,在一个方面,本文公开了经修饰的或工程化的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒表达包含未切割的信号锚结构域的外源性膜结合免疫细胞靶向配体;其中所述经修饰或工程化的溶瘤病毒是副流感病毒,如例如经修饰或工程化的5型副流感病毒;并且其中所述溶瘤病毒表达副粘病毒F和/或HN。在一个方面,天然融合的溶瘤病毒还可以被工程化以包含另外的融合肽、多肽或蛋白质。此类工程化的融合的溶瘤病毒是超融合的。因此,在一个方面,本文公开了融合的溶瘤病毒,其包含编码允许使肿瘤细胞融合的超融合特性的肽的基因。

[0072] 如上所述,所公开的融合肽、多肽或蛋白质和/或经修饰的溶瘤病毒被设计成使靶癌部位处的免疫细胞(例如NK细胞、T细胞、CAR T细胞、先天淋巴细胞、巨噬细胞和B细胞(包括浆细胞))的数目最大化,并因此增加免疫细胞活性(例如NK细胞活性、T细胞活性、CAR T细胞活性和/或B细胞活性(包括浆细胞和抗体活性))。因此,在一个方面,本文公开了使免疫细胞靶向癌细胞以进行癌症免疫疗法的方法,所述方法包括通过将本文公开的融合肽、多肽或蛋白质;外源性膜结合免疫细胞靶向配体和/或信号锚结构域插入溶瘤病毒基因组中来修饰溶瘤病毒,并使细胞与修饰的溶瘤病毒接触。

[0073] 1. 药物载体/药物产品的递送

[0074] 如上所述,组合物也可以在药学上可接受的载体中在体内施用。“药学上可接受的”意指不是生物学上或其它方面不期望的物质,即,该物质可以与核酸或载体一起施用于受试者,而不引起任何不期望的生物学效应或以有害的方式与包含它的药物组合物的任何其它组分相互作用。自然选择载体以使活性成分的任何降解最小化并使受试者中的任何不良副作用最小化,这是本领域技术人员众所周知的。

[0075] 所述组合物可以口服、肠胃外(例如静脉内)、通过肌肉注射、通过腹膜内注射、经皮、体外、局部等施用,包括局部鼻内施用或通过吸入剂施用。如本文所用,“局部鼻内施用”意指将组合物通过一个或两个鼻孔递送到鼻和鼻部通道中,并且可以包括通过喷雾机构或液滴机构递送,或通过核酸或载体的雾化递送。通过吸入剂施用组合物可以经由喷雾或液滴机构递送而通过鼻或口。也可通过插管直接递送至呼吸系统的任何区域(例如,肺)。所需组合物的确切量将根据受试者的物种、年龄、体重和一般状况、正在治疗的变应性病症的严重性、所使用的特定核酸或载体、其施用模式等而在受试者之间变化。因此,不可能为每种组合物规定确切的量。然而,本领域普通技术人员根据本文的教导仅使用常规实验就可以确定合适的量。

[0076] 如果使用的话,组合物的肠胃外施用通常以注射为特征。注射剂可以常规形式制备,或者作为液体溶液或悬浮液,适于在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式,或者作为乳液。肠胃外施用的最新修订方法涉及使用缓慢释放或持续释放系统,以便维持恒定剂量。参见,例如,通过引用并入本文的美国专利号3,610,795。

[0077] 该物质可以在溶液、悬浮液中(例如,掺入微粒、脂质体或细胞中)。这些可以通过抗体、受体或受体配体靶向特定细胞类型。以下参考文献是使用该技术使具体蛋白质靶向肿瘤组织的实例(Senter等人,《生物缀合物化学(Bioconjugate Chem.)》,2:447-451,(1991);Bagshawe,K.D.,《英国癌症杂志(Br.J.Cancer)》,60:275-281,(1989);Bagshawe等人,《英国癌症杂志(Br.J.Cancer)》,58:700-703,(1988);Senter等人,《生物缀合物化学(Bioconjugate Chem.)》,4:3-9,(1993);Battelli等人,《癌症免疫学免疫疗法(Cancer Immunol.Immunother.)》,35:421-425,(1992);Pietersz和McKenzie,《免疫学综述(Immunolog.Reviews)》,129:57-80,(1992);和Roffler等人,《生化药理学(Biochem.Pharmacol)》,42:2062-2065,(1991)。载体如“隐形”和其它抗体缀合的脂质体(包括靶向结肠癌的脂质介导的药物)、通过细胞特异性配体的受体介导的DNA靶向、淋巴细胞指导的肿瘤靶向和体内鼠神经胶质瘤细胞的高度特异性治疗性逆转录病毒靶向。以下参考文献是使用该技术使具体蛋白质靶向肿瘤组织的实例(Hughes等人,《癌症研究(Cancer Research)》,49:6214-6220,(1989);和Litzinger和Huang,《生物化学与生物物理学报(Biochimica et Biophysica Acta)》,1104:179-187,(1992))。通常,受体参与组成型或配体诱导的胞吞途径。这些受体聚集在网格蛋白包被的小窝中,通过网格蛋白包被的小泡进入细胞,穿过酸化的内体,受体在内体中被分选,然后再循环到细胞表面,贮存在细胞内,或在溶酶体中降解。内化途径提供多种功能,例如营养物摄取、活化蛋白的去除、大分子的清除、病毒和毒素的机会性进入、配体的解离和降解以及受体水平的调节。许多受体遵循多于一种的胞内途径,这取决于细胞类型、受体浓度、配体类型、配体价和配体浓度。受体介导的胞吞作用的分子和细胞机制已有综述(Brown和Greene,《DNA和细胞生物学(DNA and Cell

Biology)》10:6,399-409(1991))。

[0078] a) 药学上可接受的载体

[0079] 包含抗体的组合物可以与药学上可接受的载体组合治疗性地使用。因此,在一个方面,本文公开了包含一种或多种工程化溶瘤病毒和药学上可接受的载体的药物组合物;其中所述溶瘤病毒表达外源性膜结合免疫细胞靶向配体,所述配体选自例如经修饰而具有反向取向且氨基末端面向细胞内的免疫球蛋白Fc结构域(例如IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4 Fc结构域);NKG2D配体(例如RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA和/或MICB);和/或CD19,所述配体包含未切割的信号锚结构域(例如神经氨酸酶跨膜片段)。

[0080] 合适的载体及其制剂描述于《雷明顿:药学的科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》(第19版)A.R.Gennaro编辑,Mack Publishing Company,Easton,PA 1995。通常,在制剂中使用适当量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的载体的实例包括但不限于盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。溶液的pH优选为约5至约8,更优选为约7至约7.5。其它载体包括持续释放制剂,如含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成形制品的形式,例如膜、脂质体或微粒。对于本领域技术人员来说,根据例如溶瘤病毒载体的类型(即,溶瘤病毒的病毒骨架)、施用途径和所施用的组合物的浓度,某些载体可能是更优选的是显而易见的。

[0081] 药物载体是本领域技术人员已知的。这些最通常是用于将药物施用于人类的标准载体,包括溶液,如无菌水、盐水和生理pH下的缓冲溶液。组合物可以肌肉或皮下施用。其它化合物将根据本领域技术人员所用的标准程序施用。

[0082] 药物组合物除了选择的分子外,还可以包括载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂等。药物组合物还可以包括一种或多种活性成分,如抗微生物剂、抗炎剂、麻醉剂等。

[0083] 药物组合物可以以多种方式施用,这取决于期望局部还是全身治疗,以及待治疗的区域。施用可以是局部(包括眼、阴道、直肠、鼻内)、口服、通过吸入或肠胃外,例如通过静脉内滴注、皮下、腹膜内或肌肉注射。所公开的抗体可以静脉内、腹膜内、肌肉、皮下、腔内或经皮施用。

[0084] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发油。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。也可以存在防腐剂和/或其它添加剂,如例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0085] 用于局部施用的制剂可以包括软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体、水性、粉末或油性基质、增稠剂等可能是必需的或期望的。

[0086] 用于口服施用的组合物包括粉末或颗粒、在水或非水介质中的悬浮液或溶液、胶囊、小袋或片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可能是期望的。

[0087] 一些组合物可以潜在地作为药学上可接受的酸或碱加成盐施用,所述盐通过与无机酸和有机酸反应形成,所述无机酸例如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸,所述有机酸例如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和富

马酸,或通过与无机碱和有机碱反应形成,所述无机碱例如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾,所述有机碱例如单-、二-、三烷基和芳基胺和取代的乙醇胺。

[0088] b) 治疗用途

[0089] 施用组合物的有效剂量和方案可以凭经验确定,并且做出这样的确定是在本领域技术范围内的。在一个方面,本文公开的溶瘤病毒(或包含所述病毒的组合物)可以在施用任何过继转移的NK细胞之前施用。例如,可以在NK细胞过继转移之前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18小时、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30天施用溶瘤病毒,从而允许宿主免疫系统在施用NK细胞之前对本文公开的溶瘤病毒应答。在另一个方面,溶瘤病毒和过继转移的NK细胞可以同时施用于相同或不同的部位,或一起施用。在另一个方面,可以在施用本文公开的溶瘤病毒或包含所述病毒的任何组合物之前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18小时、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21、28或30天施用NK细胞。当在溶瘤病毒之前或之后施用时,NK细胞可以施用至相同或不同的部位。

[0090] 组合物施用的剂量范围是大到足以产生期望效果的那些范围,其中病症的症状受到影响。剂量不应大到引起不良副作用,如不希望的交叉反应、过敏反应等。通常,剂量将随患者的年龄、状况、性别和疾病程度、施用途径或方案中是否包括其它药物而变化,并且可由本领域技术人员确定。在任何禁忌症的情况下,个体医师可以调整剂量。剂量可以变化,并且可以每天一次或多次剂量施用,持续一天或几天。对于给定种类的药物产品,可在文献中找到适当剂量的指导。例如,选择抗体的合适剂量的指导可在关于抗体治疗用途的文献中找到,例如,《单克隆抗体手册(Handbook of Monoclonal Antibodies)》,Ferrone等人编辑,Noges Publications,Park Ridge,N.J.,(1985)ch.22和pp.303-357;Smith等人,《人类诊断和治疗中的抗体(Antibodies in Human Diagnosis and Therapy)》,Haber等人编辑,Raven Press,New York(1977)pp.365-389。单独使用的抗体的典型日剂量范围可以是每天约1 $\mu$ g/kg至100mg/kg体重或更多,这取决于上述因素。

[0091] C. 治疗癌症的方法

[0092] 溶瘤病毒在本领域中已经显示是用于治疗癌症的有效治疗剂。病毒在出口裂解感染的癌细胞,并且癌细胞的感染也刺激宿主免疫应答以杀灭感染细胞。应当理解并且在本文中考虑,所公开的工程化病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质类似地可用于治疗癌症并且改善此类溶瘤病毒将NK细胞募集至感染癌细胞的功效。因此,在一个方面,所公开的溶瘤病毒可用于治疗癌症,所述溶瘤病毒表达一种或多种肽、多肽或蛋白质,其包含膜结合免疫细胞靶向配体(例如,免疫球蛋白Fc结构域(例如,IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4 Fc结构域,其包含反向取向,其中氨基末端面向细胞内);NKG2D配体(例如,RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA和/或MICB);和/或CD19)和未切割的信号锚结构域,和/或融合肽、多肽或蛋白质,其包含膜结合免疫细胞靶向配体和未切割的信号锚结构域。在一个方面,工程化的溶瘤病毒可以被修饰以包含融合肽、多肽或蛋白质。当一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体是免疫球蛋白Fc结构域时,应当理解,Fc结构域可以被修饰以在细胞表面的胞外侧上表达,其N-末端侧附着至细胞膜表面附近的膜锚肽。

[0093] 可以通过向受试者施用本文公开的溶瘤病毒中的一种来治疗的不同类型的癌症的非限制性列表如下:淋巴瘤(霍奇金和非霍奇金)、白血病、癌、实体组织癌、鳞状细胞癌、腺癌、肉瘤、神经胶质瘤、高级神经胶质瘤、母细胞瘤、成神经细胞瘤、浆细胞瘤、组织细胞

瘤、黑素瘤、腺瘤、缺氧肿瘤、骨髓瘤、AIDS相关淋巴瘤或肉瘤、转移性癌症或一般癌症。所公开的溶瘤病毒和包含其的组合物可用于治疗的癌症的代表性但非限制性列表如下：淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、蕈样肉芽肿、霍奇金病、髓细胞性白血病、膀胱癌、脑癌、神经系统癌、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、肺癌如小细胞肺癌和非小细胞肺癌、成神经细胞瘤/成胶质细胞瘤、梅克尔细胞癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、肝癌、黑素瘤、口腔、咽喉、喉和肺的鳞状细胞癌、结肠癌、宫颈癌、乳腺癌和上皮癌、肾癌、泌尿生殖系统癌、肺癌、食道癌、头颈部癌、大肠癌、造血系统癌；睾丸癌；结肠癌和直肠癌、前列腺癌或胰腺癌。

[0094] 因此，在一个方面，本文公开了治疗癌症的方法，所述方法包括向受试者施用包含一种或多种工程化溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质（包括表达所公开的融合肽、多肽或蛋白质的溶瘤病毒）的组合物，其中所述一种或多种溶瘤病毒表达一种或多种融合肽、多肽或蛋白质，所述融合肽、多肽或蛋白质包含外源性膜结合免疫细胞靶向配体。在一个方面，如本文公开的包含外源性膜结合免疫细胞靶向配体的融合肽、多肽或蛋白质包括未切割的信号锚结构域，所述信号锚结构域包含：胞质尾区、跨膜区和胞外茎区；和免疫细胞靶向配体，其包含与胞外茎区的C末端融合的N末端。因此，融合肽、多肽或蛋白质提供了膜结合免疫细胞靶向配体（例如，免疫球蛋白Fc结构域（例如，IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4 Fc结构域）（其被修饰为与配体的天然存在的取向相比相对于细胞具有反向取向，其中氨基末端面向细胞内而不是细胞外），NKG2D配体（例如，RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA和/或MICB）；和/或另一种可靶向配体（例如，CD19或CD20））。

[0095] 应当理解并且在本文中考虑，治疗方法采用已经修饰的溶瘤病毒和/或已经合成以增加NK细胞对靶癌细胞的活性的融合肽、多肽或蛋白质。因此，在用本文公开的任何溶瘤病毒进行溶瘤病毒疗法期间，通过免疫细胞（例如，自然杀伤（NK）细胞，包括但不限于遗传修饰的NK细胞）或其任何组合向受试者的过继转移，可以增强本文公开的溶瘤病毒和/或融合肽、多肽或蛋白质的治疗活性。因此，在一个方面，本文公开了治疗癌症的方法，其还包括将免疫细胞，例如NK细胞（包括例如遗传修饰的NK细胞）和/或靶向抗-CD19 CAR T细胞的CD19过继转移至受试者。在一个方面，NK细胞可被修饰以表达靶向抗-CD19嵌合抗原受体的CD19。

[0096] 在一个方面，应当理解并且在本文考虑，在所公开的溶瘤病毒中使用的一些靶向配体不是NK细胞上的受体的直接配体。在一个方面，本文公开了治疗癌症的方法，其包括向受试者施用溶瘤病毒，所述溶瘤病毒包含一种或多种膜结合免疫细胞靶向配体，所述配体包含未切割的信号锚结构域，所述方法还包括向受试者施用一种或多种识别靶向配体的抗体（例如，抗-CD19抗体（例如，MDX1342、MEDI-551、AFM11、XmAb5871、MOR-208、SGN-19A、SAR3419、博纳吐单抗或帕他普莫单抗）或抗-CD-20抗体（例如，利妥昔单抗、奥法木单抗、奥丁珠单抗、维妥珠单抗或奥美珠单抗））。应当理解，所公开的治疗癌症的方法包括向受试者施用溶瘤病毒，所述溶瘤病毒包含一种或多种膜结合免疫细胞靶向配体，所述配体包含未切割的信号锚结构域和识别靶配体的抗体，所述方法还可以包括施用上文公开的任何免疫细胞。另外，所公开的方法可进一步包括施用本领域技术人员已知的任何抗癌治疗剂。

[0097] 在所公开的癌症治疗方法中，可能期望达到实现有效治疗剂量的NK细胞活化和/或扩增的程度。当刺激细胞因子（如IL-15或IL-21）和刺激细胞表面表达的激活受体的配体

(如4-1BBL)时,在体外培养物中的NK细胞指数地和优先地在外周血单核细胞(PBMC)的混合物中增殖。发现用膜结合的IL-21进行刺激来刺激NK细胞连续增殖,历经无数代,从而允许NK细胞连续扩增,条件是用新鲜的刺激细胞周期性地补充培养物。虽然这些方法允许有效的体外NK细胞扩增,但是对活饲养细胞的需要使得该方法难以转移到不具有大的GMP设施和能力的临床环境。此外,输注到患者中的NK细胞可能由于缺乏饲养者的持续刺激而停止分裂。通过使用质膜(PM)颗粒、外来体(EX)或包含一种或多种活化剂、刺激肽、细胞因子和/或粘附分子的饲养细胞来接触和活化和/或扩增NK细胞,这些障碍得以克服。NK细胞活化剂和刺激肽的实例包括,但不限于,41BBL、IL-2、IL-12、IL-21、IL-18、MICA、LFA-1、2B4、BCM/SLAMF2、CCR7和/或其它归巢受体。细胞因子的例子包括但不限于IL-2、IL-12、IL-21和IL-18。粘附分子的例子包括但不限于LFA-1、MICA、BCM/SLAMF2。例如,从表达膜结合IL-21的饲养细胞(分别为FC21饲养细胞、PM21颗粒和EX21外来体)制备饲养细胞或质膜颗粒(PM颗粒)或外来体(EX)。表达膜结合IL21的FC21细胞、PM21颗粒和EX21外来体可进一步包含另外的一种或多种活化剂、刺激肽、细胞因子和/或粘附分子,包括但不限于41BBL、IL-2、IL-12、IL-18、MICA、LFA-1、2B4、BCM/SLAMF2、CCR7(例如,表达41BBL和膜结合白介素21的PM21颗粒、EX21外来体或FC21饲养细胞)。因此,在一个方面,本文公开了治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用包含一种或多种工程化溶瘤病毒的组合物,其中所述一种或多种溶瘤病毒表达一种或多种外源性膜结合免疫细胞靶向配体(例如,免疫球蛋白Fc结构域(例如,IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4 Fc结构域),其被修饰以具有相对于细胞的反向取向,与所述配体的天然存在的取向相比,其氨基末端面向细胞内而不是细胞外, NKG2D配体(例如,RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA和/或MICB);和/或CD19),所述配体包含未切割的信号锚结构域;所述方法还包括将免疫细胞,如例如NK细胞(如例如遗传修饰的NK细胞)或靶向抗-CD19 CAR T细胞的CD19过继转移至所述受试者,其中所述免疫细胞是NK细胞,所述NK细胞被以下的一种或多种NK细胞刺激剂刺激和扩增:如细胞因子(如例如IL-12; IL-15; IL-18;及其任何组合,包括IL-12和IL-15; IL-12和IL-18; IL-15和IL-18;以及IL-12、IL-15和IL18)、生长因子、合成配体、NK细胞刺激颗粒、NK细胞刺激外来体和/或NK细胞刺激饲养细胞,包括包含IL-21、4-1BBL、IL-21和4-1BBL的NK细胞刺激颗粒、外来体和/或饲养细胞;或细胞因子或NK细胞刺激颗粒、外来体或其饲养细胞的任何组合。

[0098] 在一个方面,可以从NK细胞饲养细胞中纯化质膜颗粒或外来体。用于本发明和用于制备本文公开的质膜颗粒和外来体的NK细胞饲养细胞可以是经照射的自体或同种异体外周血单核细胞(PBMC)或未经照射的自体或同种异体PBMC、RPMI8866、HFWT、K562、用膜结合IL-15和41BBL转染的K562细胞、用膜结合IL-21和41BBL转染的K562细胞或EBV-LCL。在一些方面,NK细胞饲养细胞可以用膜结合的IL-21和41BBL转染的K562细胞或用膜结合的IL-15和41BBL转染的K562细胞。

#### [0099] D. 实例

[0100] 提出以下实例以便为本领域普通技术人员提供如何制备和评价本文要求保护的化合物、组合物、制品、装置和/或方法的完整公开和描述,并且旨在是单纯示例性的而不是旨在限制本公开。已经努力确保关于数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应当考虑一些误差和偏差。除非另外指明,否则份数为重量份数,温度是℃或处于环境温度,并且压力处于或接近大气压。

[0101] 在本文溶瘤病毒被进一步改进以增强免疫刺激,并用于递送免疫可靶向的配体,具体是外源性膜结合免疫细胞靶向配体,如例如抗体的膜结合Fc结构域(MB\_Fc),以增强过继转移的NK细胞的功效(图1)。抗体的Fc结构域由NK细胞上的CD16(Fc  $\gamma$  III受体)识别,其然后引发抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。NK细胞的经由ADCC的靶细胞杀灭对肿瘤所采用的免疫抑制机制较不敏感,因此用抗体衍生的Fc标记肿瘤表面导致更有效地经由ADCC的杀灭以有效消除肿瘤。为了构建膜结合免疫细胞靶向配体,可以将来自II型整合膜蛋白的未切割的信号锚融合到靶向配体上。有效地,典型存在于II型整合膜蛋白上的球状头部被靶向配体替代(图2)。

[0102] 在不存在可靶向的抗原或治疗性抗体的情况下,使用靶向肿瘤的溶瘤病毒来“标记”癌细胞,可以将人工的含Fc的蛋白质递送至肿瘤以进行ADCC。嵌合蛋白可以模拟表面结合的抗体:II型膜取向,其与C末端暴露于细胞外的Fc结构域融合,所述Fc结构域相对于配体天然存在的取向处于反向取向,使得Fc结构域的氨基末端以单体、二聚或多聚形式面向细胞膜(即细胞内)。可替代地,其它可靶向配体(例如CD19、RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、MICB和/或CD20)可以通过溶瘤病毒直接递送至表面膜,其中靶向配体(例如RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA和/或MICB)可以直接被NK细胞上的NKG2D受体识别,或与能够接合ADCC的针对可靶向配体(例如CD20或CD19)的治疗性抗体(例如抗-CD20-利妥昔单抗、奥法木单抗、奥丁珠单抗、维妥珠单抗、奥美珠单抗等或抗-CD19 MDX1342、MEDI-551、AFM11、XmAb 5871、MOR-208、SGN-19A、SAR3419、博纳吐单抗或帕他普莫单抗等)一起递送,和/或与靶向配体的CAR T细胞(例如抗-CD19 CAR T细胞)一起递送。使溶瘤病毒能够用于递送膜结合的(MB\_Fc)或膜结合的(MB\_TL)的合适实例是副流感病毒5的P/V/F突变体。这种工程化的P/V/F突变体具有以下突变:1)P/V基因,其编码参与聚合酶功能(P)和免疫应答抑制(V)的蛋白质(图3A),和2)病毒F基因,其编码参与病毒进入和合胞体产生的融合蛋白(图3B)。P/V突变限制了病毒在肿瘤细胞中的生长,并且病毒诱导细胞死亡和抗病毒应答(14-16)。F突变导致产生大量细胞-细胞融合(合胞体)的病毒,这是通过肿瘤扩散病毒并通过坏死杀灭的期望特性。这在图3B的显微照片中是明显的,其显示了P/V/F感染后Vero细胞中的大量合胞体。P/V/F感染的癌细胞也被人PM21-NK细胞更有效地识别和杀灭(图3C)。在该实验中,使人卵巢SKOV3-Luc细胞模拟感染或以MOI=10感染P/V/F病毒,20h后以各种比例与通过PM21-颗粒方法产生的人NK细胞一起孵育。24小时后,在没有NK细胞的情况下P/V/F细胞病变效应不明显(细胞活力>90%)时,一次测定活细胞的百分比。如图3C所示,PM21-NK细胞在杀灭PV/F感染的细胞方面比模拟感染有效得多,在PV/F感染中,杀灭50%的靶细胞需要至少5倍的NK细胞。因此,P/V/F是一种合适的使病毒能够用于过继性NK细胞处理的预期用途。作为递送载体,该病毒还具有许多强的可能特性,包括:(1)没有已知包装限制的小基因组,从而添加多个外源基因;(2)有效感染非分裂细胞,使得能够以高滴度( $>10^{10}$  pfu/ml)产生;(3)细胞质复制,没有整合到宿主DNA中且没有观察到重组;(4)感染人类,但感染与疾病或致病特征无关。为了在质膜上获得Fc结构域,可以使用来自充分表征的流感病毒神经氨酸酶蛋白(NA)的膜靶向结构域,其由N-末端胞质尾、充当跨膜结构域的未切割的信号锚和从质膜延伸的茎区组成。如图3D所示,构建体由NA-Fc嵌合体组成,其中Fc结构域与长度增加的NA茎区连接。NA-Fc可以插入重组P/V/F病毒中以产生新的溶瘤病毒(图3A),其相对于正常细胞对肿瘤具有特异性(由于P/V突变),并且

可以增强NK细胞的ADCC (A)。图4显示了NA-Fc构建体之一的氨基酸序列的一个实例,图5显示了其在转染的肿瘤细胞表面上呈递Fc的能力。在该实验中,用模拟对照、空载体或编码NA1\_Fc的载体转染A549肺癌细胞,然后第二天用抗人Fc抗体(APC抗人IgG Fc HP6017-Biolegend)染色表面表达以检测细胞表面上Fc的呈递。只有NA1\_Fc横切的细胞在APC通道中具有高平均荧光强度,反映结合到Fc表达细胞表面的抗Fc抗体。因此,NA是合适的在适当的取向上表达Fc的膜锚。具有NH<sub>2</sub>-末端胞质结构域和COOH-末端胞外域的合适跨膜结构域的其它实例(N<sub>cyt</sub>拓扑学)包括但不限于转铁蛋白受体、脱唾液酸糖蛋白、高尔基体驻留糖基转移酶家族和副粘病毒HN蛋白。

[0103] 使用两种NK细胞抗性细胞系-A549非小细胞肺癌和SKOV-3卵巢癌细胞系来收集概念验证研究,以显示溶瘤病毒可以使肿瘤靶标对NK细胞杀灭敏感(图6、8、11),因此还可以用作递送载体以将“通用的可靶向配体”递送至肿瘤细胞。已知许多病毒包括P/V/F能够将DNA递送至感染细胞,并导致在宿主细胞中表达病毒编码的蛋白质。与NK细胞上的CD16受体接合的抗体的Fc结构域是上述“通用可靶向配体”的一个实例。Fc结构域与神经酰胺酶(NA)茎的连接允许Fc在细胞表面上的表达(图7和9)。如预期的,NA1-Fc在SKOV-3细胞或A549细胞上的稳定表达导致NK细胞的杀灭增加,并且该作用与P/V/F感染叠加(图3和6)。此外,通过增加神经酰胺酶茎结构域的长度,进一步增强了经由Fc识别的杀灭(图10)。因此,联合使用OVs来增强杀灭以及递送“通用配体”可以使甚至最具NK细胞抗性的癌细胞系敏化成为NK细胞敏感的。

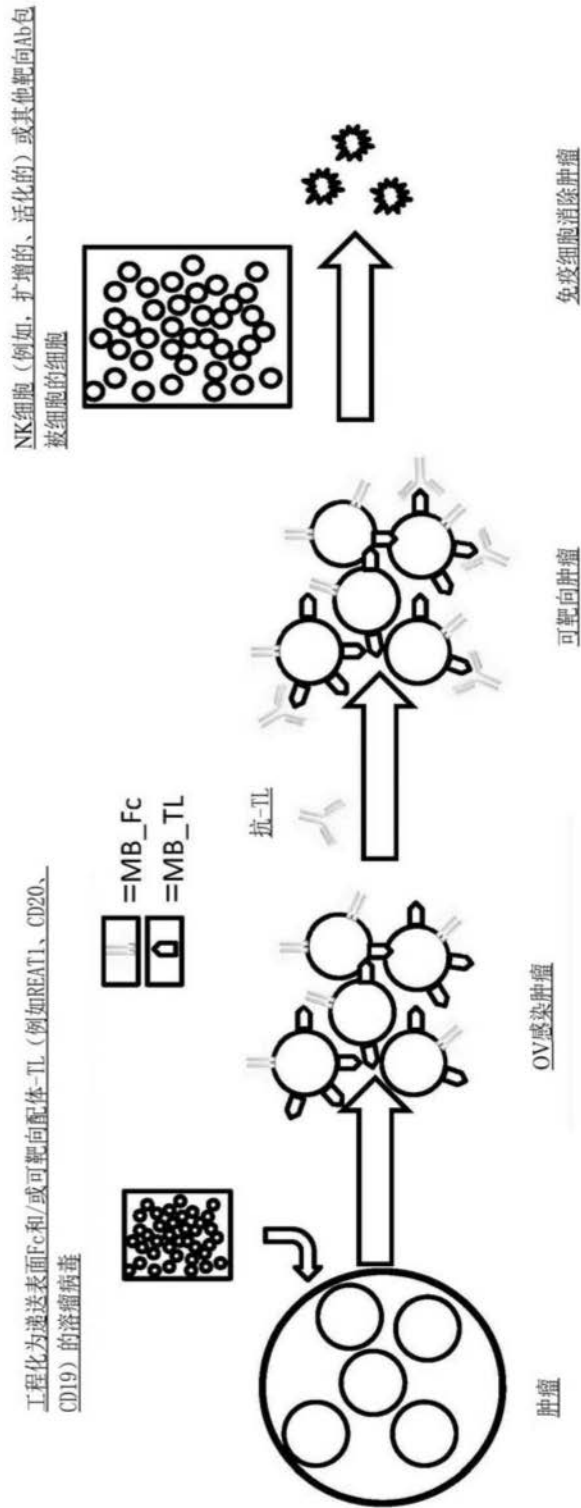
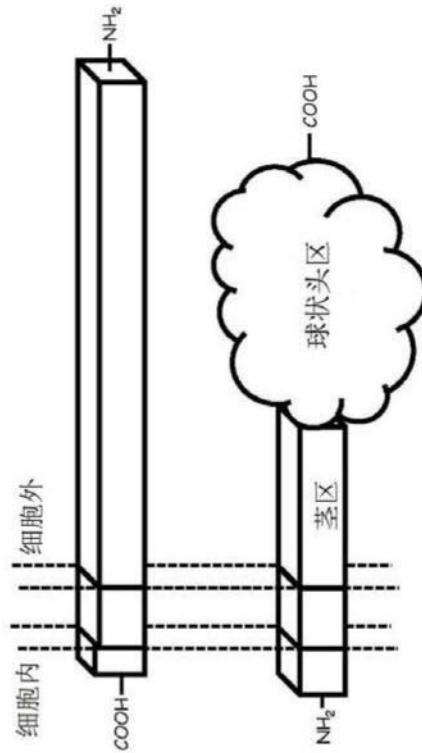


图1



I型整合膜蛋白  
切割的信号序列  
单独的C末端锚  
最常见类型

N-out, C-in拓扑学

II型整合膜蛋白  
也充当膜锚的未  
切割的信号序列  
不常见的蛋白质类型

N-in, C-out拓扑学

图2A

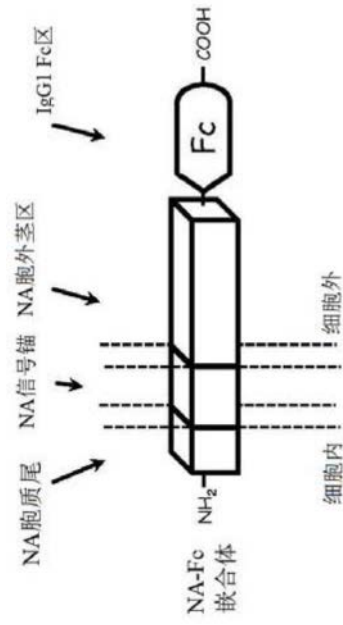


图2B

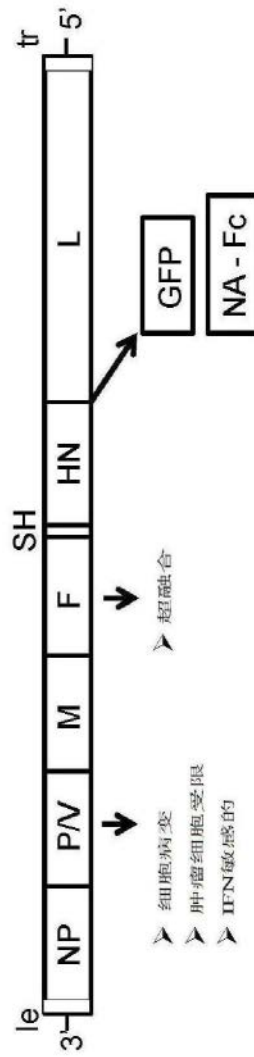


图3A

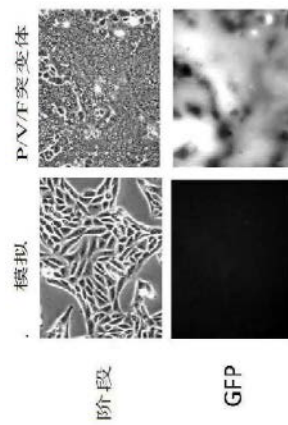


图3B

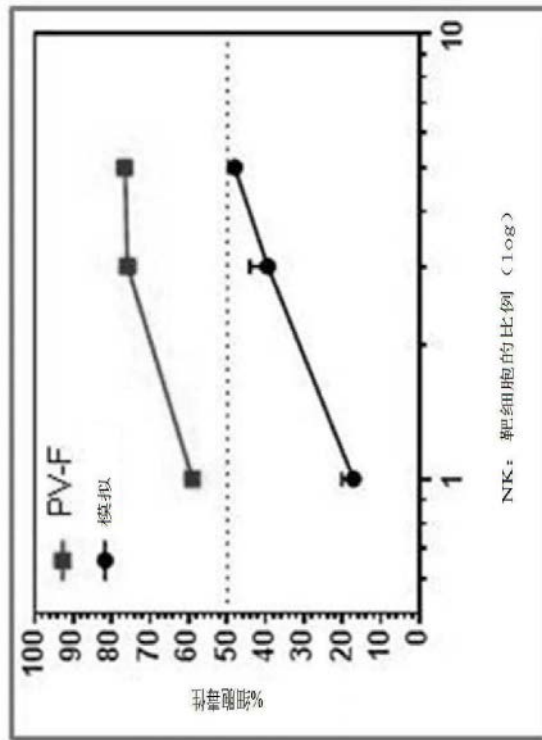


图3C

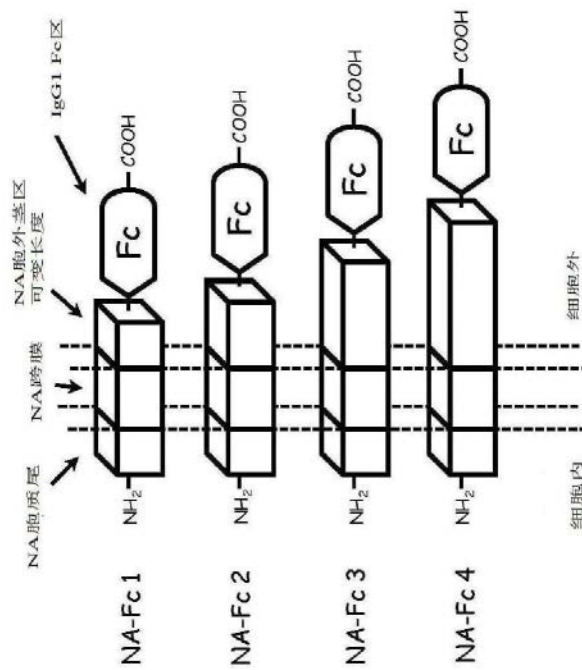


图3D

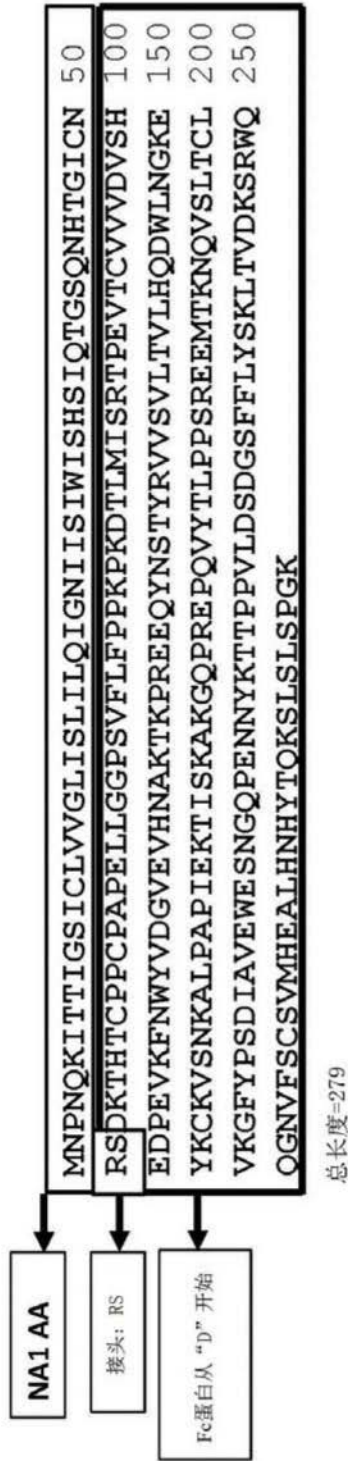


图4

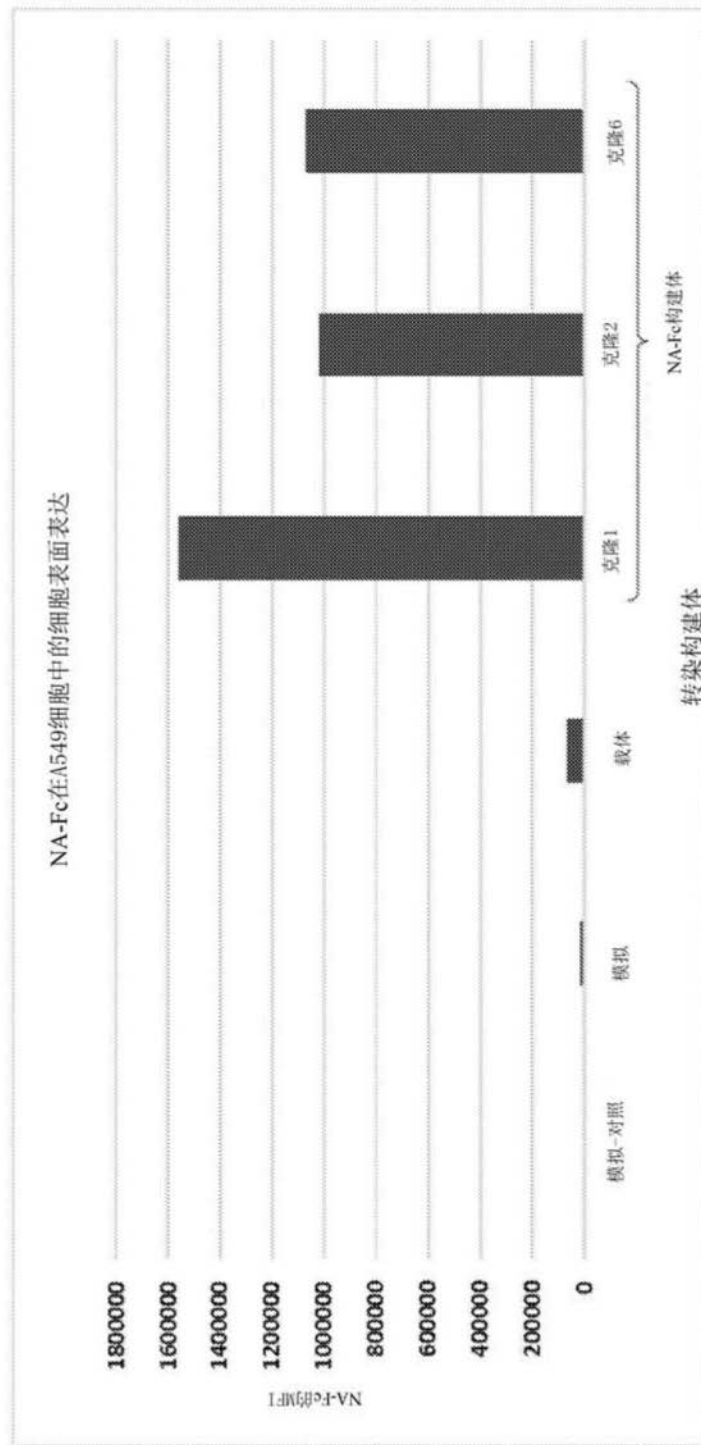


图5

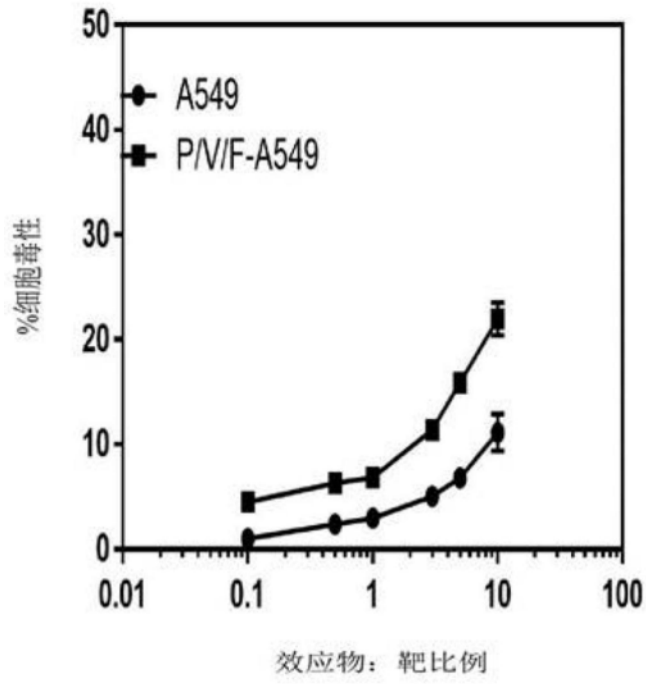


图6

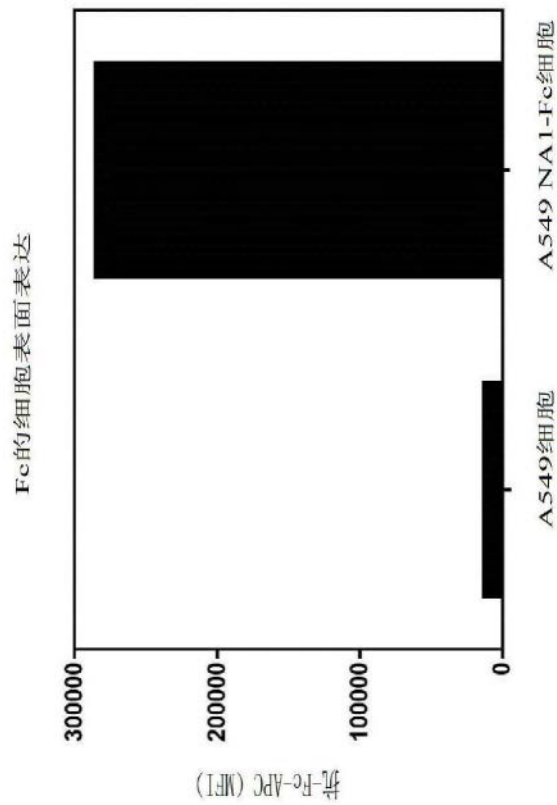


图7

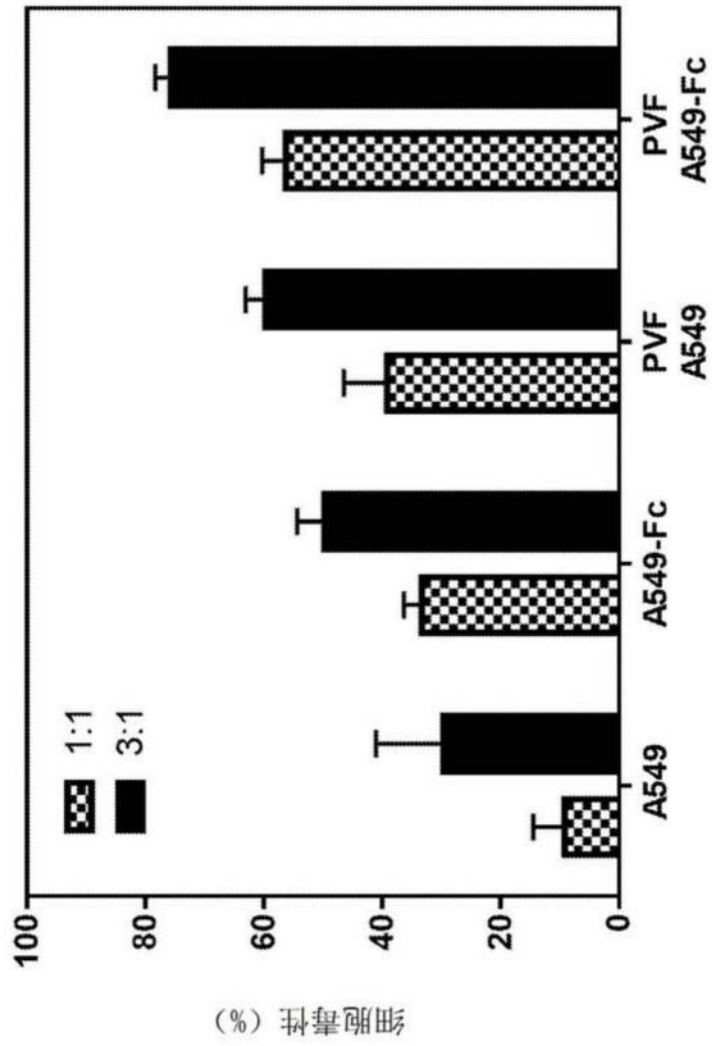


图8

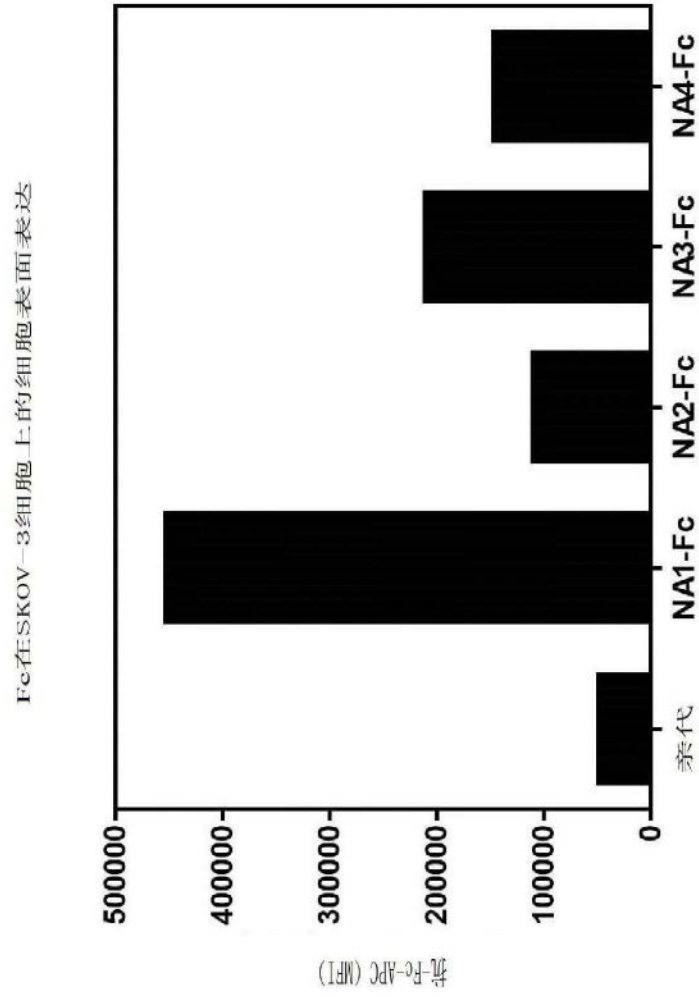


图9

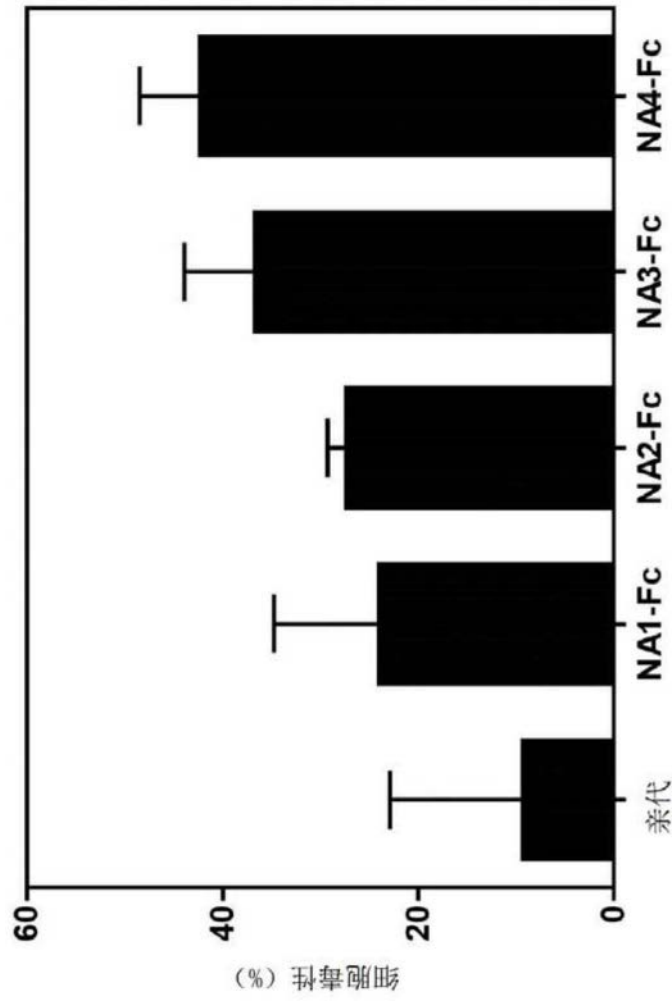


图10

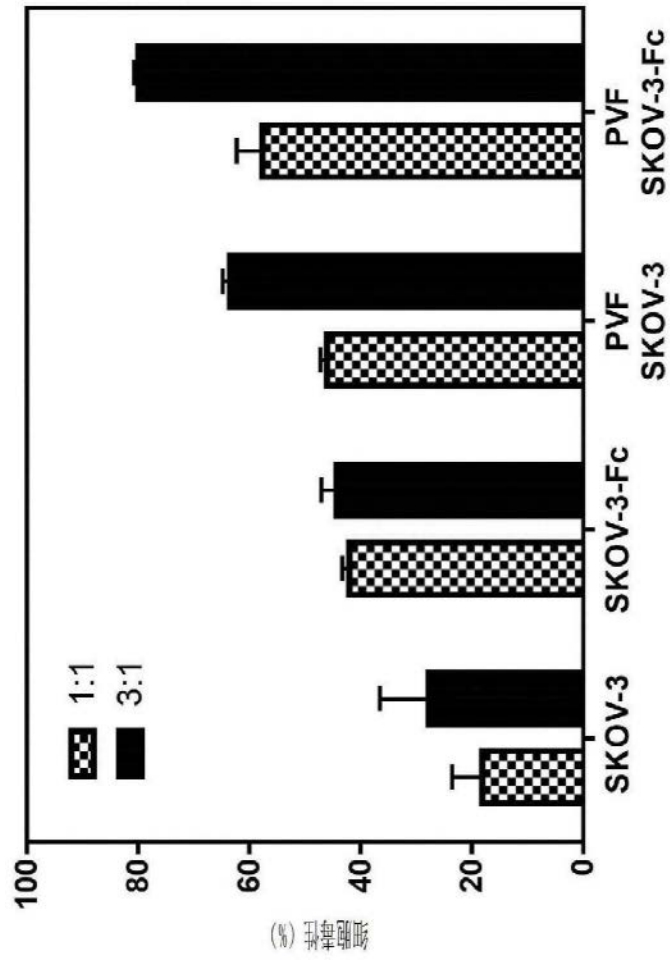


图11