



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109152815 B

(45) 授权公告日 2022.10.18

(21) 申请号 201780025759.7

王伟亿 戴培红 杨宁

(22) 申请日 2017.02.25

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理师 封新琴

申请公布号 CN 109152815 A

(51) Int.Cl.

(43) 申请公布日 2019.01.04

A61K 38/19 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 48/00 (2006.01)

62/300,066 2016.02.25 US

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2018.10.25

EP 2136633 B1, 2015.10.28

US 2008/0181870 A1, 2008.07.31

(86) PCT国际申请的申请数据

Teresa Brandt等. The N-terminal domain of the vaccinia virus E3L-protein is required for neurovirulence, but not induction of a protective immune response.《Virology》.2005,第333卷(第2期),第263-270页.

PCT/US2017/019548 2017.02.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/147553 EN 2017.08.31

(73) 专利权人 纪念斯隆凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

审查员 王慧

(72) 发明人 邓亮 斯图尔特·苏曼

杰德·沃尔卓克 塔拉·马拉胡

权利要求书2页 说明书31页

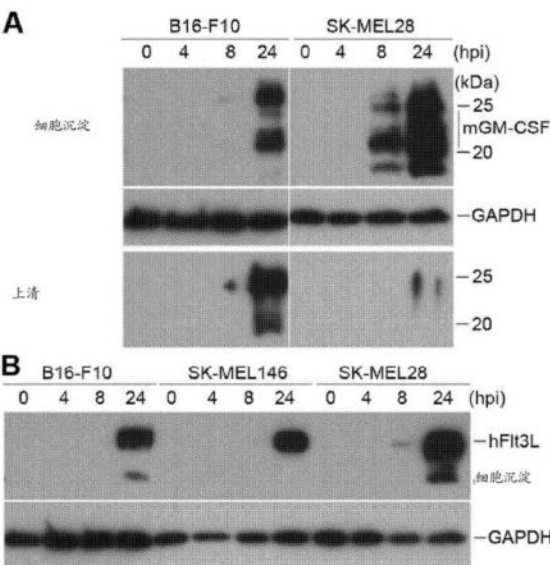
序列表3页 附图23页

(54) 发明名称

用于癌症免疫治疗的具有胸苷激酶缺失和具有或不具有人FLT3L或GM-CSF表达的复制型减毒痘苗病毒

(57) 摘要

本发明一般涉及肿瘤学,病毒学和免疫治疗领域。更具体来说特别是具有胸苷激酶(VC-TK)缺失以及具有和不具有人FLT3L或GM-CSF的表达的复制型减毒痘苗病毒,作为溶瘤和免疫治疗。上述痘病毒也可与免疫检查点阻断剂联合使用。上述痘病毒也可通过加热或UV处理灭活,灭活的病毒可单独或与免疫检查点封闭剂联合用作免疫治疗。



1. 一种治疗患有实体恶性肿瘤的受试者的组合物, 包含以复制或灭活形式的缺失E3L的N末端Z-DNA结合结构域、缺失胸苷激酶且表达人Flt3L的重组痘苗病毒E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L以及药学上可接受的赋形剂。

2. 根据权利要求1所述的组合物, 其还包含缺失E3L的N末端Z-DNA结合结构域且缺失胸苷激酶的重组痘苗病毒E3L Δ 83N-TK⁻和/或缺失E3L的N末端Z-DNA结合结构域、缺失胸苷激酶且表达GM-CSF的重组痘苗病毒E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物, 其中所述病毒是热灭活的。

4. 根据权利要求1或2所述的组合物, 其还包含免疫检查点阻断剂。

5. 根据权利要求4所述的组合物, 其中所述免疫检查点阻断剂包括CTLA-4、CD80、CD86、PD-1、PDL1、PDL2、LAG3、B7-H3、B7-H4、TIM3、ICOS、II DLBCL抑制剂、BTLA或其任何组合。

6. 根据权利要求4所述的组合物, 其中所述免疫检查点阻断剂包括ipilimumab、nivolumab、pembrolizumab、pidilizumab、AMP-224、MPDL3280A、BMS-936559、MEDI4736、MSB 00107180或其任何组合。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的组合物在制备用于治疗患有实体恶性肿瘤的受试者的药物中的用途。

8. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述组合物用于递送至肿瘤细胞。

9. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述组合物旨在通过肿瘤内、静脉内、腹膜内、颅内或通过局部注射和全身注射的组合施用。

10. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述肿瘤是原发性或转移性黑素瘤、乳腺癌或结肠癌。

11. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述病毒是热灭活的。

12. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述组合物旨在以有效实现以下一种或多种目的的量进行施用: 减小肿瘤的大小、根除肿瘤、抑制肿瘤的生长、抑制肿瘤的转移或转移性生长, 其中肿瘤包括位于给药部位的肿瘤和/或位于给药部位和受试者体内其它部位的肿瘤。

13. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述组合物旨在以局部递送至受试者的肿瘤细胞时以有效引发受试者针对肿瘤及其任何转移的免疫应答的量施用。

14. 根据权利要求13所述的用途, 其中所述免疫应答包括以下一种或多种:

肿瘤细胞的溶瘤作用和肿瘤抗原的释放;

肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中细胞毒性 CD8⁺ T 细胞的增加;

通过诱导I型IFN诱导浸润所述肿瘤或在患者体内的偏远位置循环的树突状细胞成熟;

在受试者中诱导效应CD4⁺T细胞识别肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中的肿瘤细胞; 以及在受试者的未注射肿瘤中CD103⁺树突细胞的增加。

15. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述组合物旨在与包括手术、化学疗法、靶向疗法或放射的其他治疗方式组合使用。

16. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述组合物还包含免疫检查点阻断剂。

17. 根据权利要求16所述的用途, 其中所述免疫检查点阻断剂包括CTLA-4、CD80、CD86、PD-1、PDL1、PDL2、LAG3、B7-H3、B7-H4、TIM3、ICOS、II DLBCL抑制剂、BTLA或其任何组合。

18. 根据权利要求16所述的用途, 其中所述免疫检查点阻断剂包括ipilimumab、nivolumab、pembrolizumab、pidilizumab、AMP-224、MPDL3280A、BMS-936559、MEDI4736、MSB

00107180或其任何组合。

19. 复制或灭活形式的缺失E3L的N末端Z-DNA结合结构域、缺失胸苷激酶且表达人Flt3L重组痘苗病毒E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L。

用于癌症免疫治疗的具有胸苷激酶缺失和具有或不具有人 FLT3L或GM-CSF表达的复制型减毒痘苗病毒

[0001] 政府支持

[0002] 本发明部分地通过国立卫生研究院授予的资助AI073736, AI095692, CA008748和CA56821获得政府支持而完成。美国政府在本发明拥有权利。

[0003] 相关申请

[0004] 本国际申请要求2016年2月25日提交的美国临时申请序列号62/ 300,066的优先权。前述临时申请的全部公开内容通过引用结合于此,出于所有目的如同在本文中一样实际存在。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含序列表,其已经以ASCII格式电子提交,并且其全部内容通过引用并入本文。2017年2月23日创建的所述ASCII拷贝命名为 11000_005154-W00_SL.txt,大小为2,658字节。

技术领域

[0007] 本发明一般涉及肿瘤学,病毒学和免疫治疗领域。更具体地,它涉及痘病毒的使用,特别是具有复制能力但减毒的痘苗病毒(与野生型痘苗相比减毒1000倍,因此是安全的),在缺失胸苷激酶(VC-TK)或GM-CSF以及具有和不具有人Flt3L表达的情况下作为溶瘤和免疫治疗。(VC-TK与野生型牛痘相比毒性低1000倍,因此是安全的)前述痘病毒也可以与免疫检查点阻断剂联合使用。上述痘病毒也可通过加热或UV处理灭活,灭活的病毒可单独或与免疫检查点封闭剂联合用作免疫治疗。

背景技术

[0008] 免疫系统和癌症

[0009] 恶性肿瘤固地对常规治疗具有抗性并且存在显著的治疗挑战。免疫治疗已成为一个不断发展的研究领域,也是治疗某些类型癌症的另一种选择。免疫治疗方法依赖于可以刺激免疫系统以识别肿瘤细胞并将其靶向破坏的基本原理。

[0010] 许多研究支持免疫系统组分在癌症进展中的差异存在的重要性(Jochems和Schlom,Exp Biol Med,236(5):567-579(2011))。临床数据表明,高密度的肿瘤浸润淋巴细胞与改善的临床结果相关(Mlecnik等,Cancer Metastasis Rev.;30:5-12,(2011))。据报道,各种类型的癌症,包括黑色素瘤,卵巢癌,头颈癌,乳腺癌,尿路上皮癌,结肠直肠癌,肺癌,肝细胞癌,胆囊癌和食道癌都存在强烈的淋巴细胞浸润与患者存活率之间的相关性。(Angell和Galon,Current Opinion in Immunology,25:1-7,(2013))。肿瘤免疫浸润包括巨噬细胞、树突细胞(DC)、肥大细胞、自然杀伤(NK)细胞、幼稚和记忆淋巴细胞、B细胞和效应T细胞(T淋巴细胞),主要负责识别肿瘤细胞表达的抗原和随后T细胞破坏肿瘤细胞。

[0011] 尽管癌细胞呈递抗原并且存在可能潜在地对抗肿瘤细胞的免疫细胞,但在许多情况下,免疫系统不会被激活或被肯定地抑制。这种现象的关键是肿瘤通过强迫免疫系统细

胞抑制免疫系统的其他细胞来保护自己免受免疫反应的能力。肿瘤发展出许多免疫调节机制以逃避抗肿瘤免疫反应。例如,肿瘤细胞分泌免疫抑制细胞因子(例如TGF- β)或诱导肿瘤病变中的免疫细胞,例如CD4⁺ T调节细胞和巨噬细胞,以分泌这些细胞因子。肿瘤还具有偏向CD4⁺ T细胞以表达调节表型的能力。总体结果是受损的T细胞应答和诱导CD8⁺细胞毒性T细胞的凋亡或降低的抗肿瘤免疫能力。另外,肿瘤相关的肿瘤细胞表面上MHC I类的改变表达使它们对免疫应答“不可见”(Garrido等人,Cancer Immunol.Immunother.59(10),1601-1606(2010)。另外抗原呈递功能和树突细胞(DC)也有助于逃避抗肿瘤免疫(Gerlini等,Am.J.Pathol.165(6),1853-1863(2004))。

[0012] 此外,肿瘤微环境的局部免疫抑制性质以及免疫编辑可导致不表达靶抗原的癌细胞亚群的逃逸。因此,找到一种能够促进免疫系统的抗肿瘤活性的保存和/或恢复的方法将具有相当大的治疗益处。

[0013] 免疫检查点与肿瘤介导的抗肿瘤免疫下调有关。已经证明T细胞功能障碍与抑制性受体CTLA-4和程序性死亡1多肽(PD-1)(CD28家族受体的成员)的诱导表达同时发生。然而,尽管近年来进行了广泛的研究,但在临床环境中免疫治疗的成功受到限制。监管机构已经批准了很少的治疗药物,其中仅在少数患者中观察到了益处。近年来,免疫检查点涉及抗肿瘤免疫的下调并用作治疗靶标。研究表明,T细胞功能障碍与抑制性受体,程序性死亡1多肽(PD-1)的诱导表达同时发生。PD-1是CD28受体家族的抑制成员,除PD-1外,还包括但不限于CD28,CTLA-4,ICOS和BTLA。然而,迄今为止,这些方法取得了有限的成功。虽然抗CTLA-4(ipilimumab)和抗PD-1药物(pembrolizumab和nivolumab)的临床应用甚至监管批准都强调了在治疗黑色素瘤中使用免疫治疗,但是患者对这些免疫治疗的反应有限。最近的临床试验集中于阻断T细胞中的这些抑制信号(例如,CTLA-4,PD-1和PD-1/PD-L1的配体),已经表明逆转T细胞抑制对于成功的免疫治疗是至关重要的(Sharma和Allison,Science 348(6230),56-61(2015);Topalian等,Curr Opin Immunol.24(2),202-217(2012))。这些观察结果强调了需要开发用于利用免疫系统抵抗癌症的新型治疗方法。

[0014] 黑色素瘤

[0015] 黑色素瘤是最致命的癌症之一,是美国和全世界发展最快的癌症。自1980年以来,年轻白人女性的发病率增加了50%,这主要是由于过度日晒和使用晒黑床导致的。根据美国癌症协会的统计,美国约有76,380人被诊断患有黑色素瘤,预计2016年将有10,130人(或每小时一人)死于黑色素瘤。在大多数情况下,晚期黑色素瘤对常规治疗有抵抗力,包括化学治疗和放射治疗。结果,患有转移性黑色素瘤的人预后非常差,预期寿命仅为6至10个月。发现大约50%的黑色素瘤具有BRAF突变(一种关键的肿瘤促进基因),为这种疾病的靶向治疗打开了大门。BRAF抑制剂的早期临床试验显示,对于患有BRAF突变的黑色素瘤患者,其反应非常明显,但不幸的是不可持续。因此,迫切需要针对这些患者以及具有无BRAF突变的黑色素瘤的其他患者的替代治疗策略。

[0016] 人体病理学数据表明,黑色素瘤病变内T细胞浸润的存在与较长的患者存活率正相关(Oble等,Cancer Immun.9,3(2009))。免疫治疗部分成功,例如免疫激活剂IFN- α 2b和IL-2,进一步支持免疫系统对黑色素瘤的保护作用(Lacy et al.Expert Rev Dermatol 7(1):51-68(2012))。以及转移性黑色素瘤患者对免疫检查点治疗的前所未有的临床反应,包括抗-CTLA-4和抗-PD-1/PD-L1单独或联合治疗(Sharma and Allison,Science 348

(6230), 56-61 (2015); Hodi et al., NEJM 363 (8), 711-723 (2010); Wolchok et al., Lancet Oncol. 11 (6), 155-164 (2010); Topalian et al., NEJM 366 (26), 2443-2454 (2012); Wolchok et al., NEJM 369 (2), 122-133 (2013); Hamid et al., NEJM 369 (2), 134-144 (2013); Tumei et al., Nature 515 (7528), 568-571 (2014)。然而,许多患者单独对免疫检查点阻断治疗无效。添加病毒治疗可以克服对免疫检查点阻断剂的抗性,其得到动物肿瘤模型支持(Zamarin等, Sci Transl Med 6 (226), 2014)。

[0017] 痘病毒

[0018] 痘病毒,例如基因工程痘苗病毒(vaccinia virus),处于作为转移性癌症的溶瘤治疗最前沿(Kirn等人,2009)。痘苗病毒是大型DNA病毒,具有快速的生命周期(Moss等,2007)。痘病毒非常适合作为在癌细胞中表达多种转基因的载体,从而提高治疗功效(Breitbach等,2012)。临床前研究和临床试验证明了使用溶瘤痘苗病毒和其他痘病毒治疗常规治疗难以治愈的晚期癌症的功效(Park等,2008;Kirn等,2007;Thorne等,2007)。基于痘病毒的溶瘤治疗具有通过细胞裂解,细胞凋亡和坏死的组合杀死癌细胞的优点。它还触发先天免疫传感途径,促进免疫细胞向肿瘤聚集和抗肿瘤适应性免疫应答的发展。目前临床试验中的溶瘤痘苗病毒株(例如JX-594)使用缺失胸苷激酶的野生型牛痘来增强肿瘤选择性,并且用转基因如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的表达来刺激免疫应答(Breitbach等,2012, Curr Pharm Biotechnol)。然而,许多研究表明野生型痘苗对抗原呈递细胞(APC)具有免疫抑制作用(Engelmayer等人,1999;Jenne等人,2000; Deng等人,2006;Li等人,2005;参考Deng等人,J VI 2006论文),从而增加了肿瘤本身的免疫抑制和免疫侵袭作用。

[0019] 然而,痘病毒非常擅长通过编码阻断这些途径的细胞外和细胞内组分的蛋白来逃避和拮抗多种先天免疫信号传导途径(Seet等, Annu. Rev. Immunol. 21:377-423 (2003))。细胞内先天免疫信号传导的痘病毒拮抗剂中最主要的是痘苗病毒决定Z-DNA和dsRNA结合蛋白E3,它们可以抑制PKR和NF- κ B途径。(Cheng等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4825-4829 (1992); Deng等人, J. Virol. 80:9977-9987 (2006)) 否则将被痘苗病毒感染激活。缺乏E3L基因(Δ E3L)的突变痘苗病毒具有受限的宿主范围,对IFN高度敏感,并且在致死性痘病毒感染的动物模型中毒力大大降低(Beattie等, Virus Genes. 12:89-94 (1996)); Brandt 等, Virology 332:263-270 (2004))。最近的研究表明,用 Δ E3L病毒感染培养的细胞系引发了在野生型痘苗病毒感染期间被掩盖的促炎反应(Deng et al. J. Virol. 80:9977-9987 (2006); Langland et al. J. Virol. 80:10083-10095)。发明人已经报道用野生型痘苗病毒感染小鼠表皮树突细胞系减弱了对TLR激动剂脂多糖(LPS)和聚(I:C)的促炎反应,这种作用通过缺失E3L而减少。此外,用 Δ E3L病毒感染树突细胞在不存在外源激动剂的情况下触发NF- κ B 活化(Deng等人, J. Virol. 80:9977-9987 (2006))。本公开的发明人还表明,尽管野生型痘苗病毒感染鼠角质形成细胞不会诱导促炎细胞因子和趋化因子的产生, Δ E3L病毒感染确实诱导小鼠角质形成细胞产生IFN- γ , IL-6, CCL4和CCL5,这依赖于线粒体抗病毒信号蛋白介导的胞质dsRNA感应途径(MAVS;细胞溶质RNA传感器RIG-I和MDA5的衔接子)和转录因子IRF3 (Deng等, J Virol. 2008年11月; 82 (21): 10735-10746。)还参见发明人及其同事于2016年2月25日提交的国际申请PCT/US2016/019663;2015年4月17日提交的美国临时申请No. 62149484及其相应的国际申请PCT/US2016/028184。这些申请通过引用整体并入。

[0020] 在鼻内感染模型中,具有Z-DNA结合结构域缺失的E3L Δ 83N病毒比野生型痘苗病毒减少1,000倍 (Brandt等,2001)。因此,与颅内接种模型中的野生型痘苗相比,E3L Δ 83N具有降低的神经毒力 (Brandt等,2005)。E3 (Y48A) 的Z-DNA结合结构域内的突变导致Z-DNA结合降低,导致神经毒力降低 (Kim等,2003)。尽管E3的N-末端Z-DNA结合结构域在病毒发病机理中是重要的,但是还不是很清楚。通过TLR9/MyD88/IRF5/ IRF7依赖性途径产生IFN (Dai等,2011)。通过TLR9/MyD88/IRF5/IRF7 依赖性途径产生IFN。粘液瘤病毒E3直向同源物M029保留E3的dsRNA 结合结构域,但缺少E3的Z-DNA结合结构域。发现E3的Z-DNA结合结构域在抑制鼠和人pDC中的痘病毒感知中起重要作用 (Dai et al.,2011;Cao et al.,2012)。

[0021] E3L的缺失使痘苗病毒复制对允许的RK13细胞中的IFN抑制敏感,并导致宿主范围表型,包括 Δ E3L不能在HeLa或BSC40细胞中复制 (Chang 等,1995)。E3的C末端dsRNA结合结构域负责宿主范围效应,而缺失N 末端Z-DNA结合结构域的E3L Δ 83N病毒在HeLa和BSC40细胞中具有复制能力 (Brandt等,2001)。因为E3L Δ 83N比野生型痘苗减毒1000倍,在本申请中,减毒复制型痘苗病毒载体用于进一步构建针对各种癌症的免疫刺激性免疫治疗剂。

[0022] 具有胸苷激酶缺失的痘苗病毒 (Western Reserve菌株,WR) 在非分裂细胞中高度减毒,但在转化细胞中是可复制的 (Buller等,1988)。TK 缺失的痘苗病毒在体内选择性在肿瘤细胞中复制 (Puhlmann等,2000)。Thorne等人表明与其他痘苗病毒株相比,WR菌株在肿瘤细胞系相对于正常细胞的爆发率最高 (Thorne等,2007)。本发明人选择该菌株的衍生物,牛痘E3L Δ 83N WR菌株作为其载体用于进一步修饰。

[0023] 人F1t3L (Fms样酪氨酸激酶3配体),一种刺激骨髓细胞增殖的I型跨膜蛋白,于1994年被克隆 (Lyman等,1994)。已经在各种临床前和临床环境中研究了hF1t3L的使用,包括准备骨髓移植的干细胞动员,癌症免疫治疗 (例如树突细胞的扩增) 以及疫苗佐剂。重组人F1t3L (rhuF1t3L) 已经在500多名人类受试者中进行了测试,具有生物活性,安全性和良好的耐受性 (Fong et al.,1998;Maraskovsky et al.,2000;Shackleton et al.,2004;He et al.,2014;Anandasabapathy et al.,2015)。最近在理解F1t3L在DC亚群发展中的关键作用方面取得了很大进展,包括CD8 α ⁺/CD103⁺ DCs和 pDC (McKenna et al.,2000;Waskow et al.,2008;Liu et al.,2007;2009;Naik et al.,2006;Ginhoux et al.,2009)。

发明内容

[0024] 在本公开中,发明人制备了重组E3L Δ 83N-TK⁻病毒并因此构建了表达人F1t3L的相同病毒的构建体,目的是将该生长因子递送至肿瘤微环境以促进免疫细胞包括CD103⁺/CD8 α 树突细胞 (DC) 的募集,分化和作用。用表达GM-CSF的E3L Δ 83N-TK⁻追求类似的目标。然而,用“裸”E3L Δ 83N-TK⁻和灭活 (特别是热灭活) 病毒和病毒构建体进行实验,结果也良好,特别是当与检查点阻断抑制疗法联合给药时。

[0025] 本公开涉及使用单独的复制型减毒疫苗病毒或与免疫检查点阻断剂联合来治疗实体瘤的方法和组合物。在一些实施方案中,方法和组合物涉及来自野生型牛痘 (Western Reserve菌,株WR) 的E3L的Z-DNA结合结构域和胸苷激酶 (TK) 基因的删除和牛痘启动子下GM-CSF或F1t3L的表达。

[0026] 本发明涉及发现E3L Δ 83N-TK⁻在体外和体内减毒,因此,与仅有TK 缺失的牛痘相比,它是更安全的溶瘤病毒。表达GM-CSF或F1t3L的重组 E3L Δ 83N-TK⁻病毒可以增加免疫

刺激的益处。这些病毒的感染诱导癌细胞死亡,导致肿瘤抗原释放。肿瘤内注射E3L Δ 83N-TK⁻ (VC-TK⁻), E3L Δ 83N-TK⁻-mGM-CSF (VC-TK⁻-mGM-CSF), E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L (VC-TK⁻-hFlt3L) 导致肿瘤消退和被注射肿瘤的根除,并导致抗肿瘤免疫的产生。此外,与用单独的病毒治疗相比,E3L Δ 83N-TK⁻-mGM-CSF或 E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L的瘤内递送与免疫检查点阻断剂的联合显著改善存活(存活数量和持续时间)。最后,与活病毒相比,在55°C加热病毒(热灭活 VC-TK⁻-mGM-CSF)后,进行灭活E3L Δ 83N-TK⁻-mGM-CSF的瘤内递送导致在对侧未注射的部位更有效的消除肿瘤。活病毒与灭活病毒的交替肿瘤内递送可能比单独使用任何一种药剂获得更好的效力。

[0027] 因此,复制型或灭活的E3L Δ 83N-TK⁻, E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF, E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒可用作用于治疗实体瘤的溶瘤治疗和免疫治疗。(可以理解,用于人类的构建体采用人GM-CSF。使用小鼠GM-CSF的小鼠的结果与本发明物质和组合物的人类应用相关,因为本文使用的动物模型被广泛接受。)另外,本公开的发明人已经表明,肿瘤内递送溶瘤病毒与免疫检查点阻断剂的联合导致比单独的任一种制剂更有效的肿瘤根除和更好的存活。

[0028] 重组痘苗病毒可以通过肿瘤内,静脉内,腹膜内或颅内给药,或通过局部(例如肿瘤内)注射和全身注射的联合或任何更多扩散注射的方式给药。局部(例如,瘤内)病毒注射可用于肿瘤的各个阶段。对于早期癌症,可以在手术切除肿瘤之前2-3周使用病毒治疗。在该时间范围内,宿主将产生全身性抗肿瘤适应性免疫。对于晚期癌症,病毒治疗可以与其他治疗方式联合使用,包括手术,化疗,靶向治疗,放射和免疫检查点治疗,这将在下面详述。

[0029] 本发明人假设通过对包括树突细胞和巨噬细胞的免疫细胞的激活改变肿瘤免疫抑制环境和促进肿瘤抗原呈现,瘤内注射E3L Δ 83N-TK⁻, E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF, and E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种将为PD-1或CTLA-4靶向方法提供额外的有益效果。确实,可见VC-TK⁻-GM-CSF和检查点阻断抑制剂联合治疗导致了针对随后的异源肿瘤攻击的免疫治疗的产生。用热灭活的病毒构建体联合观察到类似的结果,或者令人惊讶地,即使不与免疫检查点阻断治疗联合也观察到类似的结果。

[0030] 在进一步研究中,发现TK⁻病毒以及更大范围下病毒-hFlt3L构建体的抗肿瘤免疫涉及效应子CD8⁺和CD4⁺ T细胞的活化(构建体更有效),导致期望将GM-CSF的病毒构建体的注射后定性地观察到类似的结果。此外,病毒hFlt3L构建体的抗肿瘤免疫力也导致CD103⁺树突细胞的增加。

[0031] 上述抗肿瘤效果不限于黑色素瘤,但是扩展到其他实体瘤,例如乳腺癌和结肠癌。有趣的是,某些病毒在一种类型的癌症更有效的和其它病毒是在另一类型的癌症中更有效。因此,本治疗的使用需要优化。然而,这并没有偏离本发明治疗的应用范围,更因为癌症对大多数治疗方式的反应受到个案特异性的影响,不同疾病的差异、存在或不存在肿瘤浸润免疫细胞、遗传和表观遗传因素、以及使用或不使用先前治疗的情况。此外,GM-CSF和FLt3L病毒构建体已经显示,或根据根据上述研究,预期表现出针对已建立的肿瘤模型的功效,所述肿瘤模型模拟晚期肿瘤。

[0032] 在一个方面,本公开涉及用于治疗受试者中的实体恶性肿瘤的方法,包括向受试者的肿瘤细胞递送一定量的E3L Δ 83N-TK⁻, E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒和病毒构建体的一种或多种,包括其复制(活的)和灭活版本,有效诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答。例如,如本发明内容中所述,以便实现以下一个或多个目的

(不管顺序如何):减小肿瘤的大小、根除肿瘤、抑制肿瘤的生长或抑制肿瘤的转移或转移性生长,从而治疗肿瘤。

[0033] 在另一方面,本公开内容涉及选自E3L Δ 83N-TK⁻,E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L的活性物质,其为复制或灭活形式。这些物质各自可用作唯一的活性成分或与它们中的两种或更多种联合使用,并任选与其他治疗方式联合,为在局部给药肿瘤后有效治疗实体恶性肿瘤或在受治疗的受试者中引发针对肿瘤的免疫应答的量。免疫应答可包括一种或多种以下免疫作用:

[0034] • 肿瘤细胞的溶瘤和肿瘤抗原的释放;

[0035] • 肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中细胞毒性CD8⁺ T细胞的增加;

[0036] • 通过诱导I型IFN诱导浸润所述肿瘤或在患者体内的远端位置循环的树突细胞成熟;

[0037] • 在受试者中诱导效应CD4⁺ T细胞识别肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中的肿瘤细胞;

[0038] 在相关方面,本公开内容涉及包含有效量的活性成分的组合物,所述活性成分包含E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒和病毒构建体中的一种或多种,其有效治疗实体恶性肿瘤或用于在患者中引发针对肿瘤的免疫应答,包括其复制和灭活形式以及药学上可接受的赋形剂。

[0039] 另一方面,本发明涉及一种治疗恶性肿瘤的方法,包括:

[0040] 向受试者的肿瘤细胞递送一定量的活的或灭活的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的一种或多种,其有效诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答。

[0041] 在一些实施例中,还存在以下特定特征中的一个或多个:

[0042] • 伴随效应CD4⁺和CD8⁺ T细胞的募集和激活;

[0043] • 肿瘤是黑色素瘤或结肠癌或乳腺癌;

[0044] • 持续定期递送E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的一种或多种的方案,直至诱导肿瘤消退或根除;

[0045] • 只要福利持续存在,定期递送E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF 和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的一种或多种的方案将持续数周,数月或数年或无限期;

[0046] • 定期递送E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L 病毒的一种或多种的方案将无限期地持续,直至达到最大耐受剂量;

[0047] • 通过肠外注射递送E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的一种或多种;

[0048] • 通过肿瘤内注射递送E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的一种或多种;

[0049] • 通过静脉注射递送E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的一种或多种;

[0050] • 受试者是人;

[0051] • E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L 病毒以每次给药范围为约10⁵-10¹⁰斑块形成单位(PFU)的剂量递送;

[0052] • E3L Δ 83N-TK⁻, E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L 病毒以每次给药范围为约10⁶至约10⁹斑块形成单位(pfu)的剂量递送;

[0053] • 所递送的量足以感染所有肿瘤细胞;

[0054] • 重复递送,频率范围为每月一次至每周两次;

[0055] • 治疗持续数周,数月或数年;

[0056] • 重复递送,频率范围为每月一次至每周两次;

[0057] • 黑色素瘤是转移性黑色素瘤。

[0058] 在肿瘤部位递送E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒诱导受恶性实体瘤困扰的受试者的免疫系统以产生针对肿瘤的免疫应答。受试者免疫系统对肿瘤的刺激可以通过以下一种或多种免疫效应表现出来(并且可能确实可以测试)

[0059] • 肿瘤细胞的溶瘤和肿瘤抗原的释放;

[0060] • 肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中细胞毒性CD8⁺ T细胞的增加;

[0061] • 溶瘤和肿瘤抗原的释放;

[0062] • 诱导受试者中的效应T细胞识别肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中的肿瘤细胞。

[0063] 在某些实施方案中,本发明涉及分离和纯化的活性物质,其包含复制或灭活形式的E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L,其适合用作针对恶性实体瘤的免疫治疗剂。

[0064] 在更进一步的方面,本发明涉及治疗患有的一种或多种实体恶性肿瘤的受试者的方法,该方法包括向肿瘤细胞递送复制型或灭活的E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒,从而治疗肿瘤。

[0065] 在某些实施方案中,该量有效实现以下一种或多种:

[0066] a. 诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答;

[0067] b. 减小肿瘤的大小;

[0068] c. 根除肿瘤;

[0069] d. 抑制肿瘤的生长;

[0070] e. 抑制肿瘤转移;和

[0071] f. 减少或根除转移性肿瘤。

[0072] 在其他实施方案中,肿瘤包括位于递送部位的肿瘤,或位于受试者体内所述部位和其他部位的肿瘤。

[0073] 在更进一步的实施方案中,免疫应答包括以下一种或多种:

[0074] a. 肿瘤细胞的溶瘤作用和肿瘤抗原的释放;

[0075] b. 肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中细胞毒性CD8⁺ T细胞的增加;

[0076] c. 通过诱导I型IFN诱导浸润所述肿瘤的树突细胞的成熟;

[0077] d. 在受试者中诱导活化的CD4⁺效应T细胞识别肿瘤或全身内的肿瘤细胞。

[0078] 在另外的实施方案中,肿瘤是原发性或转移性黑色素瘤或乳腺癌或结肠癌。

[0079] 在另外的方面,本发明涉及治疗受试者的实体恶性肿瘤的方法,包括向受试者的肿瘤细胞递送有效诱导免疫系统的一定量的复制能力或失活的 E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒,使得受试者对肿瘤产生免疫反应。

[0080] 在某些实施方案中,免疫应答是全身性的。

[0081] 在另外的实施方案中,免疫应答影响或促成以下一种或多种:肿瘤尺寸的减小,肿

瘤的根除,肿瘤的抑制或转移性生长。

[0082] 在进一步的实施方案中,病毒有效实现以下一种或多种:

[0083] a. 诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答;

[0084] b. 减小肿瘤的大小;

[0085] c. 根除肿瘤;

[0086] d. 抑制肿瘤的生长;

[0087] e. 抑制肿瘤转移;和

[0088] f. 减少或根除转移性肿瘤。

[0089] 在另外的方面,本发明涉及治疗受试者的恶性肿瘤的方法。该方法包括向受试者的肿瘤细胞递送有效量的复制型或灭活的E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒,以诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答,并且联合给予受试者第二量的免疫检查点阻断剂,其有效阻断由肿瘤细胞,基质细胞或肿瘤浸润性免疫细胞引发的肿瘤内的免疫抑制机制。

[0090] 在另外的方面,本发明涉及治疗受试者的恶性肿瘤的方法。该方法包括递送或已经递送给受试者的肿瘤细胞一定量的复制型或灭活的E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒,其量有效诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答,并且联合给予或已经给予受试者第二量的免疫检查点阻断剂,其有效阻断由肿瘤细胞,基质细胞或肿瘤浸润性免疫细胞引发的肿瘤内的免疫抑制机制。

[0091] 在某些实施方案中,联合给药有效实现以下一种或多种:

[0092] a. 诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答;

[0093] b. 减小肿瘤的大小;

[0094] c. 根除肿瘤;

[0095] d. 抑制肿瘤的生长;

[0096] e. 抑制肿瘤转移;和

[0097] f. 减少或根除转移性肿瘤。

[0098] 在另外的方面,肿瘤是原发性或转移性恶性黑色素瘤或乳腺癌或结肠癌。在另外的方面,病毒是热灭活的。

[0099] 在另外的方面,本发明涉及一种组合物,其包含治疗患有实体恶性肿瘤的患者的包含复制或灭活形式或两者形式的E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L的活性成分,和药学上可接受的赋形剂。

[0100] 在另外的方面,该量有效地实现以下一种或多种:减小肿瘤的大小,根除肿瘤,抑制肿瘤的生长,或抑制肿瘤的转移或转移性生长,从而治疗肿瘤。

[0101] 在另外的方面,在局部递送至受试者的肿瘤细胞时,所述量有效引发经治疗的受试者针对肿瘤及其任何转移的免疫应答。

[0102] 在另外的方面,免疫应答包括以下一种或多种:

[0103] • 肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中细胞毒性CD8⁺ T细胞的增加;

[0104] • 通过诱导I型IFN诱导浸润所述肿瘤或在患者体内的远端位置循环的树突细胞成熟;

[0105] • 诱导受试者中的效应CD4⁺ T细胞识别肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中的肿瘤细胞。

[0106] 在另外的方面,本发明涉及分离的纯化活性物质,其选自复制或灭活形式的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L,适合用作针对恶性实体瘤的免疫治疗剂。

[0107] 在另外的方面,本发明涉及包含有效量的组合物,所述组合物用于治疗患有活性成分的实体恶性肿瘤的患者,所述活性成分包含E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒和病毒构建体的一种或多种,各自任选地以复制或灭活的形式,和药学上可接受的赋形剂。

[0108] 在另外的方面,组合物含有两种或更多种所述病毒和病毒构建体。

[0109] 在另外的方面,该量有效地实现以下一种或多种:减小肿瘤的大小,根除肿瘤,抑制肿瘤的生长,或抑制肿瘤的转移或转移性生长,从而治疗肿瘤。

[0110] 在另外的方面,当局部递送至受试者的肿瘤细胞时,所述量有效地在受治疗的受试者中引发针对肿瘤和受治疗的受试者体内的其他肿瘤的免疫应答。

[0111] 在另外的方面,免疫应答可包括以下一种或多种:

[0112] • 肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中细胞毒性CD8⁺ T细胞的增加;

[0113] • 通过诱导I型IFN诱导浸润所述肿瘤或在患者体内的远端位置循环的树突细胞成熟;

[0114] • 诱导受试者中的效应CD4⁺ T细胞识别肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中的肿瘤细胞。

[0115] 在另外的方面,本发明涉及治疗受试者的实体恶性肿瘤的方法,包括向受试者的肿瘤细胞递送一定量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒和病毒构建体的一种或多种,各自任选地以复制或灭活的形式,有效诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答。

[0116] 在另外的方面,本发明涉及治疗受试者的实体恶性肿瘤的方法,包括向受试者的肿瘤细胞递送一定量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒和病毒构建体的一种或多种,包括上述每一种的复制和灭活版本,有效实现以下一项或多项(无论顺序如何):

[0117] a. 诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答;

[0118] b. 减小肿瘤的大小;

[0119] c. 根除肿瘤;

[0120] d. 抑制肿瘤的生长;

[0121] e. 抑制肿瘤转移;和

[0122] f. 减少或根除转移性肿瘤。

[0123] 在另外的方面,免疫应答可包括一种或多种以下免疫学作用

[0124] • 肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中细胞毒性CD8⁺ T细胞的增加;

[0125] • 通过诱导I型IFN诱导浸润所述肿瘤或在患者体内的远端位置循环的树突细胞成熟;

[0126] • 诱导受试者中的效应T细胞识别肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中的肿瘤细胞。

[0127] 在另外的方面,本发明涉及治疗受试者的恶性肿瘤的方法,该方法包括以有效诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答的量,向受试者递送或递送受试者的复制型

或灭活的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒或病毒构建体的肿瘤细胞,每种任选地以复制或灭活的形式,并且联合给予或已经给予受试者第二量的免疫检查点阻断剂,其有效阻断由肿瘤细胞,基质细胞或肿瘤浸润性免疫细胞引发的肿瘤内的免疫抑制机制。

[0128] 在另外的方面,联合给予有效地实现以下一个或多个:

[0129] a) 诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答;

[0130] b) 减小肿瘤的大小;

[0131] c) 根除肿瘤;

[0132] d) 抑制肿瘤的生长;

[0133] e) 抑制肿瘤的转移;和

[0134] f) 减少或根除转移性肿瘤。

[0135] 在另外的方面,本发明涉及治疗受试者的恶性肿瘤的方法,其中所述受试者先前已经用复制型或灭活的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒或病毒构建体治疗或给药,每种病毒或病毒构建体任选地以复制或灭活的形式,以有效诱导受试者的免疫系统产生针对肿瘤的免疫应答的量给药。

[0136] 在另外的实施方案中,该方法包括向受试者的受试者肿瘤细胞递送一定量的免疫检查点阻断剂,其有效阻断由肿瘤细胞,基质细胞或肿瘤浸润性免疫细胞引发的肿瘤内的免疫抑制机制。

[0137] 在另外的方面,本发明涉及治疗受试者的恶性肿瘤的方法,其中所述受试者先前已经用一定量的免疫检查点阻断剂治疗或给药,所述免疫检查点阻断剂有效阻断肿瘤细胞、基质细胞或肿瘤浸润免疫细胞引起的肿瘤内的免疫抑制机制。

[0138] 在另外的实施方案中,该方法包括以有效诱导免疫系统的量递送或递送至受试者的肿瘤细胞复制型或灭活的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒或病毒构建体,各自任选地以复制或灭活的形式,以诱导受试者对肿瘤产生免疫应答。

[0139] 在另外的方面,免疫检查点阻断剂包括CTLA-4,CD80,CD86,PD-1, PDL1,PDL2,LAG3,B7-H3,B7-H4,TIM3,ICOS,II DLBCL抑制剂, BTLA或其任何组合。。

[0140] 在另外的方面,免疫检查点阻断剂包括ipilimumab,nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab,AMP-224,MPDL3280A,BMS-936559, MEDI4736,MSB 00107180或其任何组合。

附图说明

[0141] 图1A-D是显示E3L Δ 83N (VC) 和 Δ E3L (VI) 痘苗病毒在鼠和人黑色素瘤细胞系中一步生长的一系列图。小鼠B16-F10黑色素瘤细胞和人黑色素瘤细胞SK-MEL39,SK-MEL188和SK-MEL90用MOI为5的E3L Δ 83N (VC) 或 Δ E3L (VI) 感染。在感染后的不同时间收集细胞,测定病毒产量(log pfu)。

[0142] 图2是在胸苷激酶(TK)基因座处质粒DNA和病毒基因组DNA之间的同源重组的示意图。pCB质粒用于插入特异性目的基因(SG),在本例中,是在痘苗合成早期和晚期启动子(Pse/1)的控制下的小鼠GM-CSF (mGM-CSF) 和人类Flt3L (hFlt3L)。将在牛痘P7.5启动子控制下的大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(gpt)用作药物选择标记。这两个表达盒的两侧各有TK基因(TK-L和TK-R)的部分序列。缺乏SG的质粒DNA用作载体对照。在质粒

DNA和VC基因组DNA的TK基因座处发生的同源重组导致SG和gpt表达盒或gpt单独插入VC基因组DNA中以产生VC-TK⁻-mGM-CSF, VC-TK⁻-hFlt3L或VC-TK⁻。在包括MPA, 黄嘌呤和次黄嘌呤的gpt选择培养基的存在下富集重组病毒, 并在药物选择培养基存在下纯化噬菌斑4-5轮, 直至获得不污染VC的合适的重组病毒。

[0143] 图3是重组病毒的PCR分析图, 显示VC-TK⁻, VC-TK⁻-mGM-CSF 和VC-TK⁻-hFlt3L的成功产生。通过PCR分析VC重组病毒基因组DNA 以验证插入并确保没有污染的专利病毒颗粒(VC)。

[0144] 图4A-B显示蛋白质印迹结果。图4A显示了VC-TK⁻-mGM-CSF感染的鼠B16黑色素瘤细胞和人SK-MEL-28黑色素瘤细胞中mGM-CSF表达的蛋白质印迹分析。图4A显示了用VC-TK⁻-mGM-CSF感染或模拟感染的 B16-F10和SK-MEL-28细胞的数据。在感染后的不同时间收集细胞裂解物和上清液。使用抗mGM-CSF抗体和抗GAPDH作为上样对照进行蛋白质印迹分析。图4B显示了VC-TK⁻-hFlt3L感染的鼠和人黑色素瘤细胞中hFlt3L 表达的蛋白质印迹分析。用VC-TK⁻-hFlt3L感染或模拟感染B16-F10, SK-MEL-146和SK-MEL-28细胞。在感染后的不同时间收集细胞裂解物。使用抗hFlt3L抗体和抗GAPDH作为对照进行细胞裂解物的蛋白质印迹分析。

[0145] 图5A-B显示了B16-F10黑色素瘤细胞中VC, VC-TK⁻, VC-TK⁻-mGM-CSF和VC-TK⁻-hFlt3L的一步生长。用VC, VC-TK⁻, VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hFlt3L以0.1的MOI感染B16-F10黑色素瘤细胞。感染后不同时间收集细胞, 通过滴定BSC40细胞测定病毒产量。将病毒产量(log pfu) 相对感染后的小时作图(图5A)。将感染后1小时的 72小时内的病毒产量的倍数变化绘制在(图5B)中。

[0146] 图6是治疗计划的方案图, 其中在存在或不存在免疫检查点阻断的情况下用肿瘤内注射病毒治疗B16-F10黑色素瘤。简而言之, 将B16-F10黑色素瘤细胞皮内植入C57B/6小鼠的左侧和右侧(右侧腹侧 5×10^5 个细胞, 左侧腹侧 1×10^5 个细胞)。肿瘤植入后7天, 每周两次用瘤内注射病毒治疗小鼠, 有或没有腹膜内递送免疫检查点阻断抗体。我们在接下来的8周内测量肿瘤大小并监测存活率。

[0147] 图7A-L显示了在B16-F10黑色素瘤双侧植入模型中单独或与腹膜内递送抗-CTLA-4抗体的肿瘤内注射VC-TK⁻, VC-TK⁻-mGM-CSF或 VC-TK⁻-hFlt3L的一系列图示。将B16-F10黑色素瘤细胞(5×10^5) 皮内植入右侧皮肤的剃毛皮肤中, 并将(1×10^5) 个细胞植入左侧腹部。在植入后第7天, 每周两次用PBS, VC-TK⁻, VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hFlt3L (2×10^7 pfu) 注射右侧肿瘤(直径约3mm)。用肿瘤内递送 VC-TK⁻-mGM-CSF或者VC-TK⁻-hFlt3L (2×10^7 pfu) 和每周两次腹膜内递送抗-CTLA-4抗体(100 μ g/小鼠) 的联合治疗一些小鼠组。测量肿瘤大小并随时间监测小鼠存活。(图7A, B) 注射PBS (n=10) 后不同天数的注射肿瘤体积(图7A) 和未注射肿瘤(图7B) 的图。(图7C, D) 注射 VC-TK⁻ (n=10) 后不同天数的注射肿瘤体积(图7C) 和未注射肿瘤(图 7D) 的图。(图7E, F) 在注射VC-TK⁻-mGM-CSF (n=10) 后不同天数注射肿瘤体积(图7E) 和未注射肿瘤(图7F) 的图。(图7G, H) 注射 VC-TK⁻-hFlt3L后不同天数的注射肿瘤体积(图7G) 和未注射肿瘤(图7H) 的图。(图7I, J) 注射肿瘤(图7I) 和非注射肿瘤(图7J) 在注射VC-TK⁻ mGM-CSF后不同天数腹膜内递送抗-CTLA-4抗体的图(N=10)。(图7K, L) 在注射VC-TK⁻-hFlt3L并且腹膜内递送抗-CTLA-4抗体的不同天后注射肿瘤体积(图7K) 和未注射肿瘤(图7L) 的图。(图7M) 用PBS, VC-TK⁻, VC-TK⁻-mGM-CSF, VC-TK⁻-hFlt3L, VC-TK⁻-

mGM-CSF+anti-CTLA-4或 VC-TK⁻-hFlt3L+anti-CTLA-4治疗的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线。通过对数秩 (Mantel-Cox) 测试分析存活数据。*, P<0.05;****, P<0.0001。

[0148] 图8A-0显示了活体VC-TK⁻-mGM-CSF、热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF、活体加上热灭活的E3L Δ 83N-TK⁻-mGM-CSF瘤内递送的一系列图示,在 B16-F10黑色素瘤双侧植入模型中有或没有腹膜内递送抗PD-L1抗体。如上文图6中所述,双侧植入B16-F10黑色素瘤细胞。植入后7天,用PBS、活VC-TK⁻-mGM-CSF (2×10⁷ pfu)、热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF (相当于2 x 10⁷ pfu)、活体 (1x 10⁷ pfu) 加上热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF (相当于1x 10⁷ pfu) 注射右侧肿瘤 (直径约3mm),有或没有每周两次腹膜内递送抗PD-L1 抗体 (200μg/小鼠)。测量肿瘤大小并随时间监测小鼠存活。图8A-B是显示在注射PBS (n=5) 后不同天数注射的肿瘤 (图8A) 和未注射的肿瘤 (图 8B) 的体积的图。图8C,D是显示注射VC-TK⁻-mGM-CSF (n=9) 后不同天数的注射肿瘤体积 (图8C) 和未注射肿瘤 (图8D) 的图。(图8E, F) 是显示在注射热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF (n=9) 后不同天数注射的肿瘤 (图8E) 和未注射的肿瘤 (图8F) 的体积的图。图8G,H是显示在注射活+热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF (n=9) 后不同天数注射的肿瘤 (图8G) 和未注射的肿瘤 (图8H) 的体积的图。图8A,J是显示在注射 VC-TK⁻-mGM-CSF后不同天时注射的肿瘤体积 (图8I) 和未注射的肿瘤 (图 8J) 的图,其中存在全身递送的抗PD-L1抗体 (n=9)。图8K,L是显示在全身递送抗PD-L1抗体的情况下 (n=9),在注射热灭活的 VC-TK⁻-mGM-CSF后不同天数注射的肿瘤 (图8K) 和未注射的肿瘤 (图8L) 的体积的图。图8M,N是显示在全身递送抗PD-L1抗体的情况下 (n=9),在注射活+灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF后不同天数注射的肿瘤 (图8M) 和未注射的肿瘤 (图8N) 的体积的图。图8O 是用PBS、活VC-TK⁻-mGM-CSF、热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF、活+热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF、VC-TK⁻-mGM-CSF+抗PD-L1、热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF+抗PD-L1、或活的+热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF+抗PD-L1抗体治疗的小鼠的 Kaplan-Meier存活曲线。通过对数秩 (Mantel-Cox) 测试分析存活数据。*, P<0.05;****, P<0.0001。

[0149] 图9显示了用异源肿瘤MC38再次攻击肿瘤后小鼠的Kaplan-Meier 存活曲线。这些小鼠最初用以下方案治疗B16-F10黑色素瘤并存活。这些药物包括活VC-TK⁻-mGM-CSF、热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF、活+热灭活的 VC-TK⁻-mGM-CSF、VC-TK⁻-mGM-CSF+抗PD-L1、热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF+抗PD-L1或活+热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF+抗PD-L1 抗体。将一组从未暴露于病毒或肿瘤的空白小鼠用作对照。皮内植入 MC38 (1×10⁵个细胞)。密切监测肿瘤生长和小鼠存活。

[0150] 图10A-D是肿瘤内注射VC-TK⁻或VC-TK⁻-hFlt3L后收集的数据的一系列图形表示,其显示在双侧黑色素瘤模型中,VC-TK⁻-hFlt3L在激活注射和非注射肿瘤中的CD8⁺和CD4⁺ T细胞方面比VC-TK⁻病毒更有效。图10A 由用PBS,VC-TK⁻或VC-TK⁻-hFlt3L各种治疗的小鼠的注射 (右图) 和未注射 (左图) 肿瘤中的CD8⁺粒酶B⁺细胞的代表性流式细胞的点图组成。图10B由用PBS,VC-TK⁻或VC-TK⁻-hFlt3L不同治疗的小鼠的注射 (右图) 和未注射 (左图) 肿瘤中的CD4⁺粒酶B⁺细胞的点图组成。图10C由用PBS, VC-TK⁻或VC-TK⁻-hFlt3L各种治疗的小鼠的注射 (右) 和非注射 (左) 肿瘤中的CD8⁺粒酶B⁺细胞百分比的两个图组成。(*, p<0.05,***, p<0.001)。数据是平均值±SEM (n=3)。图10D由用PBS,VC-TK⁻或VC-TK⁻-hFlt3L。不同处理的小鼠的注射 (右) 和非注射 (左) 肿瘤中的CD4⁺粒酶B⁺细胞百分比的两个图组成 (**, p<0.01,***, p<0.001)。数据是平均值±SEM (n=3)。

[0151] 图11是在肿瘤浸润性CD45⁺MHCII⁺细胞中将CD11b⁺ DC与CD103⁺ DC分开的门控策

略。肿瘤相关的CD24⁺ DC可以通过它们的CD11b和 CD103的表达进一步分开。CD11b⁺ DC (DC1) 表达高水平的CD11b,而 CD103⁺ DC (DC2) 表达高水平的CD103。基于CD11c和CD11b的相对表达,F4/80⁺肿瘤相关巨噬细胞可以进一步分成TAM1和TAM2。

[0152] 图12A-B是一系列图示,显示瘤内注射VC-TK⁻-hFlt3L导致非注射肿瘤中CD103⁺ DC适度增加。图12A是显示用PBS、热灭活MVA、VC-TK⁻、VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hFlt3L(*,p<0.05) 治疗的小鼠的注射和未注射肿瘤中CD45⁺细胞中CD103⁺ DC的百分比的图。数据是平均值+/-SEM (n=3-4)。图12B是显示注射和未注射肿瘤中CD45⁺细胞中CD11b⁺ DC 百分比的图(*,p<0.05)。数据是平均值+/-SEM(n=3-4)。

[0153] 图13A-E显示了在4T1鼠三阴性乳腺癌(TNBC) 双侧植入模型中肿瘤内注射VC-TK⁻或热灭活的MVA的一系列图示。将4T1细胞(2.5×10^5) 皮内植入右侧皮肤的剃毛皮肤中,并将(5×10^4) 个细胞植入左侧腹部。在植入后5天,每周两次用PBS,VC-TK⁻(2×10^7 pfu) 或等量的热灭活的 MVA注射右侧肿瘤(直径约3mm)。图13A-B是第一次注射之前的初始相应肿瘤体积(注射和未注射)的图。(图13C,D是第一次注射后第18天各肿瘤体积(注射和未注射)的图表(*,P<0.05;****,P<0.0001)。(E) 用PBS,VC-TK⁻或热灭活iMVA治疗的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线。通过对数秩(Mantel-Cox) 测试分析存活数据。(***,P<0.001)。

[0154] 图14A-E显示了在已建立的大B16-F10黑色素瘤单侧植入模型中瘤内递送VC-TK⁻-hFlt3L,热灭活MVA(Heat-iMVA) 的一系列图示。将B16-F10 细胞(5×10^5) 皮内植入C57B/6小鼠的右肋腹。在植入后第9天,当平均初始肿瘤体积达到70mm³时,肿瘤每周两次注射VC-TK⁻-hFlt3L(2×10^7 pfu) 或等量的热灭活iMVA。PBS用作对照。(图14A,B,C) 是注射PBS (A;n=10),或用热灭活iMVA(B,n=10) 或用VC-TK⁻-hFlt3L(C;n=8) 注射后不同天数注射肿瘤体积的图。图14D是第一次注射时注射肿瘤的初始肿瘤体积的图。图14E是用PBS,热灭活iMVA或VC-TK⁻-hFlt3L治疗的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线。通过对数秩(Mantel-Cox) 测试分析存活数据。(***,p<0.001对应于VC-TK⁻-hFlt3L对PBS;****,P<0.0001对应于热灭活iMVA对PBS)。

[0155] 详细描述

[0156] 定义:

[0157] 如本文所用,除非上下文另有明确说明,否则以下术语应具有下文所赋予的含义:

[0158] “癌症”是指一类以不受控制的细胞生长为特征的人和动物疾病。除非另有明确说明,否则术语“癌症”在本文中可与术语“肿瘤”,“恶性肿瘤”,“过度增殖”和“肿瘤”互换使用。术语“癌细胞”可与术语“肿瘤细胞”,“恶性细胞”,“过度增殖细胞”和“肿瘤细胞”互换。

[0159] “黑色素瘤”是指源自能够产生黑色素的细胞的恶性肿瘤。术语黑色素瘤与“恶性黑色素瘤”同义。黑色素瘤广泛转移,涉及患者的淋巴结,皮肤,肝脏,肺和脑组织。

[0160] “实体瘤”是指所有肿瘤细胞的生长和增殖,以及所有癌前和癌细胞和组织,除了血液系统癌症如淋巴瘤,白血病和多发性骨髓瘤。实体瘤的实例包括但不限于:纤维肉瘤,粘液肉瘤,脂肪肉瘤,软骨肉瘤,成骨肉瘤,脊索瘤,血管肉瘤,内皮肉瘤,淋巴管肉瘤,淋巴管内皮细胞瘤,滑膜瘤,间皮瘤,尤文氏瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,结肠癌,胰腺癌,乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌,乳头状腺癌,囊腺癌,髓样癌,支气管癌,肾细胞癌,肝癌,胆管癌,绒毛膜癌,精原细胞瘤,胚胎癌,肾母细胞瘤,宫颈癌,睾丸肿瘤,肺癌,小细胞肺癌,膀胱癌,上皮癌,神经胶质瘤,星形细胞

瘤,成神经管细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体,血管母细胞瘤,听神经瘤,少突神经胶质瘤,脑膜瘤,黑色素瘤,神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。本公开的组合物和方法可用于的一些最常见的实体瘤包括:头颈癌,直肠腺癌,神经胶质瘤,成神经管细胞瘤,尿路上皮癌,胰腺癌,子宫内膜癌,卵巢癌,前列腺腺癌,非小细胞肺癌(鳞状和腺癌),小细胞肺癌,黑色素瘤,乳腺癌,肾细胞癌和肝细胞癌。

[0161] “转移”是指癌症从其原发部位扩散到邻近组织或体内远端位置。癌细胞可以脱离原发肿瘤,渗透到淋巴管和血管中,在血液中循环,并在体内其他部位的正常组织中生长。转移是一个连续的过程,取决于肿瘤细胞(或癌症干细胞)脱离原发肿瘤,穿过血流或淋巴管,并停在远端。一旦到达另一个部位,癌细胞就会重新穿透血管或淋巴管壁,继续繁殖,最终形成新的肿瘤(转移性肿瘤)。在一些实施方案中,该新肿瘤称为转移性(或继发性)肿瘤。

[0162] “免疫应答”是指由上述细胞或肝脏(包括抗体,细胞因子和补体)产生的淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和可溶性大分子中的一种或多种的作用,这导致选择性损伤、破坏癌细胞、转移性肿瘤细胞或从人体消除癌细胞、转移性肿瘤细胞。免疫应答可包括细胞应答。例如T细胞应答,其是作为T细胞功能的细胞功能的改变(调节,例如显著增强、刺激、激活、损伤或抑制)。T细胞应答可以包括特定类型的T细胞或T细胞亚群的产生、增殖或扩增、或刺激,例如CD4⁺辅助细胞、CD8⁺细胞毒性细胞或自然杀伤细胞(NK)。可以通过检测一种或多种细胞受体或细胞表面分子(例如CD或分化分子簇)来鉴定此类T细胞亚群。T细胞应答还可以包括细胞因子的改变的表达(统计学上显著的增加或减少),例如影响其他细胞的分化或增殖的可溶性介质(例如,细胞因子、淋巴因子、细胞因子结合蛋白或白细胞介素)。例如,I型干扰素(IFN- α/β)是先天免疫的关键调节剂(Huber等,Immunology 132(4):466-474(2011))。动物和人体研究表明IFN- α/β 在抗原识别抗肿瘤免疫应答的初始阶段直接影响CD4⁺和CD8⁺T细胞的命运。IFN I型响应于树突细胞的激活而被诱导,树突细胞又是先天免疫系统的前哨。

[0163] “肿瘤免疫”是指肿瘤逃避免疫系统识别和清除的一个或多个过程。因此,作为治疗概念,当这种逃避减弱或消除时,肿瘤免疫被“治疗”,并且肿瘤被免疫系统识别和攻击(后者在本文中称为“抗肿瘤免疫”)。肿瘤识别的一个例子是肿瘤结合,肿瘤攻击的例子是肿瘤减少(数量、大小或两者都减小)和肿瘤清除。

[0164] “T细胞”是指胸腺来源的淋巴细胞,参与多种细胞介导的适应性免疫反应。

[0165] “辅助T细胞”是指CD4⁺T细胞;辅助T细胞识别与MHC II类分子结合的抗原。存在至少两种类型的辅助性T细胞Th1和Th2,它们产生不同的细胞因子。

[0166] “细胞毒性T细胞”是指通常在其表面具有CD8分子标记(CD8⁺) (但也可能是CD4⁺)的T细胞,其通过破坏其表面上具有特定抗原分子的靶细胞而在细胞介导的免疫中起作用。。细胞毒性T细胞还释放粒酶,一种丝氨酸蛋白酶,可通过穿孔素形成的孔进入靶细胞并诱导细胞凋亡(细胞死亡)。颗粒酶用作细胞毒性表型的标记。细胞毒性T细胞的其他名称包括 CTL,溶细胞性T细胞,溶细胞性T淋巴细胞,杀伤性T细胞或杀伤性T 淋巴细胞。细胞毒性T细胞的靶标可包括病毒感染的细胞,被细菌或原生动物寄生虫感染的细胞或癌细胞。大多数细胞毒性T细胞在其细胞表面上存在蛋白质CD8。CD8被I类MHC分子的部分吸引。通常,细胞毒性T 细胞是CD8⁺细胞。

[0167] “肿瘤浸润淋巴细胞”是指患有癌症(例如黑色素瘤)的受试者的白细胞,其居住在

循环中或以其他方式离开循环(血液或淋巴液)并已迁移到肿瘤中。

[0168] “免疫检查点抑制剂”或“免疫检查点阻断剂”是指完全或部分减少、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白质活性的分子。检查点蛋白调节 T 细胞活化或功能。检查点蛋白质包括但不限于CTLA-4及其配体CD80 和CD86;PD-1及其配体PDL1和PDL2;LAG3、B7-H3、B7-H4、TIM3、ICOS 和BTLA(Pardoll等人,Nature Reviews Cancer 12:252-264(2012))。

[0169] 当在治疗物质的给药的情况下使用时,“肠胃外”包括除通过消化道给药之外的任何给药途径。与本文公开的方法特别相关的是静脉内(包括例如通过肝门静脉),瘤内或鞘内给药。

[0170] “抗体”是指免疫球蛋白分子,其特异性结合抗原或这种分子的抗原结合片段。因此,抗体可以是衍生自天然来源或来自重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是免疫反应性(抗原结合)片段或完整免疫球蛋白的部分。抗体可以以多种形式存在,包括:例如,多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab 和F(ab)2、以及单链抗体(scFv)人源化抗体、嵌合抗体、人重组抗体和双特异性抗体和三特异性抗体。

[0171] “溶瘤病毒”是指优先感染癌细胞,在这些细胞中复制并通过其复制过程诱导癌细胞裂解的病毒。天然存在的溶瘤病毒的非限制性实例包括水泡性口炎病毒、呼肠孤病毒、以及工程化为非选择性的病毒,例如腺病毒、新城疫病毒和单纯疱疹病毒。(参见,例如,Nemunaitis,J.Invest New Drugs.17(4):375-86(1999);Kirn,DH等人,Nat Rev Cancer.9(1):64-71(2009);Kirn等人Nat.Med.7:781(2001);Coffey等,Science 282:1332(1998))。痘苗病毒感染许多类型的细胞,但由于肿瘤细胞的如下事实,其优先在肿瘤细胞中复制:肿瘤细胞(i)具有有利于复制的新陈代谢;(ii)表现出也有利于复制的某些途径的激活和(iii)创造逃避先天免疫系统的环境,其也有利于病毒复制。

[0172] “热灭活的”特别是指痘苗病毒,包括携带异源基因的病毒构建体,例如GM-CSF和Flt3L,是指通过暴露于热环境下对病毒进一步处理,不破坏病毒的免疫原性或其进入靶细胞(肿瘤细胞)的能力,但除去病毒的残留复制能力以及抑制宿主免疫应答的因素(例如,抑制感染细胞中I型IFN 诱导的因子)。这种条件的一个例子是在约50℃至约60℃的温度范围内暴露约1小时的时间。其他时间和温度可以通过常规实验确定,并且感染的 cDC中的IFN I型诱导可以与本文所述实验中使用的热灭活病毒进行比较,并且应该高于痘苗病毒。

[0173] “UV灭活的”特别是指痘苗病毒,包括含有异源基因的病毒构建体,例如GM-CSF和Flt3L,是指暴露于UV而失活的病毒,不破坏病毒的免疫原性或其进入靶细胞(肿瘤细胞)的能力,但除去病毒残留复制能力。可用于本发明方法的此类条件的实例是使用例如365nm UV灯泡暴露于UV持续约30分钟至约1小时的时间段(Tsung等人,J Virol 70,165-171(1996); Drillien,R.等人,J Gen Virol 85:2167-2175(2004))。

[0174] “受试者”是指可能患有癌症的任何动物(哺乳动物,人或其他)患者。

[0175] “治疗有效量”或“有效量”是指对一种药剂足够的量,当给药一种或多种剂量并持续一段时间,足以提供减轻、治愈或缓解疾病所需的生物学结果。在本公开中,有效量的E3L Δ 83N-TK⁻,E3L Δ 83N-TK⁻-mGM-CSF 和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L和相应的灭活病毒是这样的一个量(以适当的时间段和以合适的频率给药)实现以下一种或多种目的:减少癌细胞的数量;或减少肿瘤大小或根除肿瘤;抑制(即减慢或停止)癌细胞浸润到外周器官中;抑制(即减慢或停止)转移性生长;抑制(即稳定或阻止)肿瘤生长;允许治疗肿瘤,并诱导针对肿瘤

的免疫应答。根据本公开内容,本领域普通技术人员可以使用常规实验确定任何个体病例中的适当治疗量。这种测定将从在体外发现的有效量和在动物中发现的有效量开始。治疗有效量最初将基于发现的赋予培养细胞益处的浓度来确定。有效量可以从细胞培养物内的数据外推,并且可以基于诸如本文详述的因素上调或下调。有效量范围的实例是每次给药 10^5 个病毒颗粒至约 10^{12} 个病毒颗粒。

[0176] 特别对于本文公开的基于病毒的免疫刺激剂,“治疗有效量”或“有效量”是指包含E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF、E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L和/或相应的灭活的足以减少、抑制或消除肿瘤细胞生长的病毒的组合物的量,从而减少或消除肿瘤、或足以在受试者体外或体内抑制、减少或消除转移性扩散或引发针对肿瘤的免疫应答,根据情况不同免疫应答将最终导致减少、抑制和/或消除肿瘤的一种或多种情况。肿瘤细胞生长的减少、抑制或根除可以是坏死,细胞凋亡或免疫应答或前述两种或更多种的组合的结果。治疗有效量可以根据诸如以下因素而变化:特定的E3L Δ 83N-TK⁻,E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF,E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L和/或组合物中使用的相应的灭活病毒、所治疗的受试者的年龄和状况、肿瘤形成的程度、其他治疗方式的存在或不存在等。类似地,待给药的组合物的剂量和给药频率取决于多种因素,例如活性成分的效力、一旦给药其活性的持续时间、给药途径、受试者的大小、年龄、性别和身体状况、不良反应的风险和医师的判断。组合物以多种剂型给药,例如可注射溶液。

[0177] 特别对于联合免疫检查点抑制剂的联合治疗,“免疫检查点阻断剂或阻断剂”的“治疗有效量”是指免疫检查点阻断剂的量足以阻止免疫检查点避免受治疗者肿瘤细胞中的细胞凋亡反应。有几种免疫检查点阻断剂已经批准,在临床试验中或仍在开发中,包括CD28抑制剂,例如CTL4抑制剂(例如ipilimumab)、PD-1抑制剂(例如,nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, lambrolizumab)、例如AMP-224这样的II DLBCL抑制剂、PD-L1 抑制剂(MPDL3280A、BMS-936559、MEDI4736、MSB 00107180) ICOS 和BTLA或它们的诱饵分子。前述的剂量范围在本领域技术人员已知或在本领域技术人员的范围内是已知的,因为已经完成了几个剂量临床试验,从而可能对其他药剂进行外推。

[0178] 优选地,肿瘤表达特定检查点。虽然这是所希望的,但并不是绝对必要的,因为免疫检查点阻断剂更普遍地阻断肿瘤内的由肿瘤细胞、基质细胞和肿瘤浸润免疫细胞引发的免疫抑制机制。

[0179] 例如,CTLA4抑制剂ipilimumab,当在黑色素瘤手术后作为辅助治疗给药时,在90分钟内以1-2mg/mL给药,每三周总输注量为3mg/kg,总共4个剂量。该治疗通常伴有严重的甚至威胁生命的免疫介导的不良反应,其限制了耐受剂量以及可给药的累积量。单独给药的这种和其他检查点阻断抑制剂通常以每剂量1至3mg/mL的量给予(如下所示)。预计当与E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种联合给药时,可以减少ipilimumab的剂量和/或累积量。特别地,根据下面给出的实验结果,预期如果将CTLA4抑制剂的剂量与E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种和/或相应的灭活病毒构建体同时或依次直接给予肿瘤,则可以进一步降低CTLA4抑制剂的剂量。因此,上述ipilimumab提供的量将是确定联合给药给予患者的特定剂量和累积量的起始点,但需要给药研究以确定最佳量。

[0180] Pembrolizumab用于给药作为黑色素瘤辅助治疗,稀释至25mg/mL 每3周以2mg/kg

的剂量给药30分钟。

[0181] Nivolumab以每2周60分钟静脉输注3mg/kg的剂量给药。对于治疗用途/应用,将使用人GM-CSF。在本文所述的实施例中,描述为 α -mGM-CSF的小鼠GM-CSF用于模型/实验系统中。另外,预期用本公开的任何一种或多种病毒的多次治疗可以多剂量给药,直到肿瘤消退或不再响应治疗。

[0182] 应当理解,一种或多种病毒与检查点阻断抑制剂的前述联合治疗可以由一个或多个执业医师在各自的指示下或作为团队运作给药。

[0183] “药学上可接受的载体和/或稀释剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。这些介质和试剂用于生物活性物质的用途是本领域熟知的。补充的活性成分,例如抗微生物剂,也可以掺入组合物中。

[0184] 在本文中所用的“递送”是指将E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF 和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种沉积在肿瘤微环境中,无论是通过局部给药于肿瘤还是通过例如静脉内途径来完成。该术语主要关注到达肿瘤本身的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒。“递送”与给药含义相同,但它特别用于特定的给药部位,例如:肿瘤内。

[0185] 在本公开中,本发明人制备了表达人Flt3L的重组E3L Δ 83N-TK⁻病毒,其目的是将该生长因子递送至肿瘤微环境以促进免疫细胞的募集、分化和作用,包括CD103⁺/CD8 α 树突细胞(DC)。已经使用了一种类似的策略,并证明其在Jennerex的JX-594的临床开发中是有效的,其中痘苗病毒经工程改造以表达编码粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的转基因,同时缺失痘苗胸苷激酶(TK)基因以增加肿瘤选择性。GM-CSF是外周非淋巴组织中DC稳态的另一个重要生长因子(King等,2010;Greter等,2012)。黑色素瘤疫苗(GVAX)包含致死性照射的同种异体黑色素瘤细胞,分泌 GM-CSF已显示出一些临床益处(Dranoff等,2003)。Curran和Allison显示B16-GMCSF (GVAX) 或B16-Flt3L (F13VAX) 与CTLA-4阻断剂的联合在约60%的小鼠中根除已建立的黑色素瘤,如果疫苗在肿瘤的远端部位给药的话(Curran和Allison,2009年)。然而,当疫苗与CTLA-4阻断剂一起给药于肿瘤时,GVAX在肿瘤根除中无效,而F13VAX治疗导致75%的无肿瘤小鼠。一种可能的解释是GM-CSF对肿瘤的给药可能在肿瘤内诱导骨髓抑制细胞的产生(Serafini等,2004)。担心GM-CSF对肿瘤的给药可能诱导免疫耐受。本公开的发明人进行了两种重组病毒的头对头比较,其中以 VC-TK⁻作为表达hFlt3L或GM-CSF的载体和单独的载体,用于根除已建立的B16黑色素瘤。发明人发现VC-TK⁻-hFlt3L比VC-TK⁻-mGM-CSF或单独的载体在根除或控制肿瘤生长方面更有效(实施例6)。如实施例6中所述。发明人显示,肿瘤内注射减毒复制型的VC-TK⁻,VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hFlt3L可以有效地根除注射的肿瘤,而肿瘤内递送VC-TK⁻-hFlt3L 比VC-TK⁻-mGM-CSF更有效延缓对侧肿瘤的生长并延长生存期。VC-TK⁻-hFlt3L的这种全身作用不仅对于非注射肿瘤的治疗很重要,而且对于治疗转移性疾病也很重要。

[0186] 另外,本公开的发明人已经显示病毒的肿瘤内递送克服了对免疫检查点阻断剂的抗性。如实施例7中所示,VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hFlt3L 的瘤内递送与抗-CTLA-4抗体的全身递送的联合导致根除10/10注射的肿瘤,对侧非注射肿瘤的生长显著延迟,40-60%的病例完全根除肿瘤。然而,在延迟对侧肿瘤的生长,延长治疗小鼠的存活率方面,VC-TK⁻-hFlt3L与抗 α -CTLA-4抗体的瘤内递送比VC-TK⁻-mGM-CSF与抗-CTLA-4抗体联合更有效。这

些结果首次表明,VC-TK⁻-hFlt3L可以单独或与免疫检查点阻断剂联合用于治疗黑色素瘤患者,提供成功且确实优越的选择。

[0187] 在本公开中,发明人进一步研究了灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF菌株是否可以用作癌症免疫治疗剂。事实上,他们观察到热灭活的 VC-TK⁻-mGM-CSF的肿瘤内递送在消除肿瘤和产生抗肿瘤适应性免疫方面比活VC-TK⁻-mGM-CSF更有效(实施例8)。因此,作为治疗选择,可以使用热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF治疗患者,以实现改善的治疗结果。预计如果不使用热灭活病毒,而是采用紫外线照射(UV)灭活,则会观察到类似的结果。

[0188] 此外,本公开的发明人已经显示,肿瘤内注射VC-TK⁻-mGM-CSF或热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF与腹膜内递送免疫检查点阻断剂的联合导致协同治疗效果。(例9)。

[0189] 在一个实施方案中,本公开涉及在患有肿瘤的受试者中引发抗肿瘤免疫应答的方法,所述方法包括向肿瘤递送有效量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种。免疫系统的刺激可能通过以下一种或多种免疫效应表现出来:

[0190] 肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中细胞毒性CD8⁺ T细胞的增加;

[0191] 通过诱导I型IFN诱导浸润所述肿瘤的树突细胞的成熟;

[0192] 在受试者中诱导活化的T辅助细胞识别肿瘤内和/或肿瘤引流淋巴结中的肿瘤细胞;

[0193] 在受试者的非注射肿瘤中增加CD103⁺树突细胞(特别是对于hFLT3L 构建体)。

[0194] 前述一种或多种免疫学作用可以作为受试者对治疗的反应的早期指标,并且可以用作对其持续有效性的监测。

[0195] 在一个实施方案中,本公开提供了治疗被诊断患有实体瘤的受试者的方法,包括向肿瘤递送治疗有效量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF 和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种。

[0196] 在一个实施方案中,本公开内容提供了在诊断患有癌症的受试者中诱导抗肿瘤免疫的方法,包括向受试者给药治疗有效量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种。本公开的方法包括诱导抗肿瘤免疫,这可以减小肿瘤的大小、根除肿瘤、抑制肿瘤的生长,抑制肿瘤的转移或转移性生长、诱导肿瘤细胞的凋亡或延长受试者的存活(与未治疗或常规治疗的受试者相比)。

[0197] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了用于在诊断患有实体恶性肿瘤的受试者中增强、刺激或引发抗肿瘤免疫应答的方法,其可以包括先天性免疫应答和/或适应性免疫应答例如T细胞应答,通过将肿瘤暴露于治疗有效量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种。

[0198] 在具体的实施方案中,本公开内容提供了引发免疫应答的方法,所述免疫应答在针对肿瘤细胞的T细胞细胞毒性和引发也针对肿瘤细胞的T辅助细胞方面介导适应性免疫应答。该方法包括给患有肿瘤的受试者肿瘤内或静脉内给药包含E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种的组合物,其中所述组合物的给药导致针对肿瘤的肿瘤特异性免疫应答,并最终导致肿瘤生长的减少、抑制或根除,抑制肿瘤细胞的转移性生长、凋亡和/或延长受试者的存活。实际上,本发明人已经表明癌细胞被杀死并且免疫应答可以迁移到远端位置,如转移的情况。

[0199] 在一些实施方案中,本公开内容提供了引发免疫应答的方法,所述免疫应答在针对肿瘤细胞的T细胞细胞毒性和引发也针对肿瘤细胞的T辅助细胞方面介导适应性免疫应答。该方法包括肠胃外给予受试者包含E3L Δ 83N-TK⁻,E3L Δ 83N-TK⁻-mGM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒中的一种或多种的组合物,其中所述组合物的给药导致针对肿瘤的肿瘤特异性免疫应答。最终,减少、抑制或根除肿瘤生长和/或抑制转移性生长,肿瘤细胞凋亡和/或延长受治疗者的存活。对于腹膜内转移,可以腹膜内注射病毒。对于脑转移,可以在立体定向引导下或鞘内注射病毒。

[0200] 实际上,本发明人已经表明癌细胞被杀死并且免疫应答可以迁移到远端位置,如转移的情况。

[0201] 因此,本公开提供了治疗实体恶性肿瘤的方法。向受试者的肿瘤递送一定量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒,有效地在被诊断患有实体瘤的受试者中诱导治疗性免疫应答。

[0202] 如本文所示,目前的文献,并且不希望受理论束缚,以下机制被认为有助于E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的抗肿瘤作用:(i) 肿瘤细胞的溶瘤作用和肿瘤抗原的释放;(ii) 在肿瘤和肿瘤引流淋巴结中诱导细胞毒性CD8⁺和效应CD4⁺ T细胞;(iii) 通过释放病毒DNA和RNA改变肿瘤免疫抑制环境;(iv) 诱导抗肿瘤抗体。

[0203] 免疫反应

[0204] 除了通过上调特定免疫系统活性(例如抗体和/或细胞因子产生,或细胞介导的免疫的激活)诱导免疫应答。免疫应答还可以包括抑制、减弱或任何其他可检测免疫的下调,以便重建体内平衡并防止对宿主自身器官和组织的过度损伤。在一些实施例中,根据本公开内容的方法诱导的免疫应答产生细胞毒性CD8⁺ T细胞或活化的T辅助细胞或两者,其可直接或间接导致肿瘤细胞的死亡或使其丧失繁殖能力。

[0205] 通过本发明的方法诱导免疫应答可以通过检测多种众所周知的免疫学参数中的任何一种来确定(Takaoka等,Cancer Sci.94:405-11(2003); Nagorsen等,Crit.Rev.Immunol.22:449-62(2002))。因此,可以通过许多众所周知的测定法(包括免疫学测定法)中的任何一种来建立免疫应答的诱导。此类测定法包括但不限于体内、离体或体外测定可溶性免疫球蛋白或抗体;细胞因子、趋化因子、激素、生长因子等可溶性介质以及其他可溶性小肽、碳水化合物、核苷酸和/或脂质介质;细胞活化状态的变化由免疫系统细胞的功能或结构特性的改变决定,例如细胞增殖,运动性改变,细胞内阳离子梯度或浓度改变(如钙);细胞多肽的磷酸化或去磷酸化;诱导特定基因表达或细胞溶解行为等特殊活动;免疫系统细胞的细胞分化,包括改变的表面抗原表达谱,或凋亡的发生(程序性细胞死亡);或者可以检测到存在免疫应答的任何其他标准。例如,区分免疫细胞类型的细胞表面标志物可以通过与CD4⁺,CD8⁺或NK细胞结合的特异性抗体检测。可以检测的其他标志物和细胞组分包括但不限于干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子(TNF)、IFN- α 、IFN- β 、IL-6和CCL5。用于检测免疫应答的常用方法包括但不限于流式细胞术、ELISA、免疫组织化学。进行这些和类似测定的方法是众所周知的,并且可以在例如Letkovits(Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques,Current Protocols in Immunology, 1998)中找到。

[0206] 药物组合物和制剂

[0207] 包含E3L Δ 83N-TK⁻, E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的药物组合物可含有载体或稀释剂,其可以是含有溶剂或分散介质的溶剂或分散介质,例如,水、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),其合适的混合物和植物油。例如,通过使用诸如卵磷脂的涂层,通过在分散的情况下保持所需的粒度和通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0208] 包含E3L Δ 83N-TK⁻, E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的药物组合物和制剂可以通过以下方法制备:常规混合、溶解、制粒、制糖衣、研磨、乳化、包封、包埋或冻干过程。药物病毒组合物可以使用一种或多种生理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂以常规方式配制,所述载体、稀释剂、赋形剂或助剂有助于配制适于体外、体内或离体使用的病毒制剂。该组合物可以与一种或多种另外的生物活性剂(例如平行给药GM-CSF)结合,并且可以用药理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂配制,以产生适于胃肠外或肿瘤内给药的本发明的药物(包括生物制剂)或兽医用组合物。合适的赋形剂载体包括,例如,水,盐水,右旋糖,甘油,乙醇,惰性蛋白质,亲水聚合物,氨基酸,脂肪酸,表面活性剂,非离子表面活性剂,碳水化合物,糊精,多元醇,螯合剂等,及其组合。此外,如果需要,载体可含有少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。制备这种剂型的实际方法对于本领域技术人员来说是已知的,或者是显而易见的。例如参见,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa, 17th edition, 1985; 雷明顿:药学的科学与实践, A.R. Gennaro, (2000) Lippincott, Williams & Wilkins。

[0209] 许多类型的配方都是可能的并且是众所周知的。选择的特定类型取决于所选择的给药途径,这是本领域公认的。例如,全身制剂通常设计用于通过注射给药,例如静脉内给药,以及设计用于肿瘤内给药的那些。优选地,全身或瘤内制剂是无菌的。

[0210] 通过将E3L Δ 83N-TK⁻, E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒掺入所需量的在此列举的各种其他成分的适当溶剂中制备无菌可注射溶液,随后根据需要采用合适的灭菌方法。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体含有基础分散介质和来自上面列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下。优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,产生无活性的E3L Δ 83N-TK⁻, E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的粉末,并且加上来自其先前无菌过滤溶液的任何其他所需成分。E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒的剂量

[0211] 通常,给受试者给药在约 10^5 至约 10^{10} 噬斑形成单位(pfu)的范围内单位剂量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒,但是可以给药更低或更高的剂量。在优选的实施方案中,剂量为约 10^6 - 10^9 pfu。通常,单位剂量以1至10ml的体积给药。pfu与病毒颗粒的等效性可根据所用的特定pfu滴定方法而不同。通常,pfu等于约5至100个病毒颗粒。治疗有效量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒可以以一个或多个分剂量给药一段规定的时间并以规定的给药频率给药。例如,根据本公开的治疗有效量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-

hFlt3L病毒可以根据诸如疾病状态、年龄、性别、体重和受试者的一般状况、以及和 E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒在特定受试者中引发所需免疫应答的能力等因素而变化。

[0212] 对于在癌症治疗领域工作的人来说显而易见的是,剂量的变化必然会发生,例如取决于所治疗的受试者的状况,给药途径和受试者对治疗的反应。在向受试者递送E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒时,剂量也将根据诸如一般医学状况、既往病史、疾病进展、肿瘤负荷、发生免疫应答的能力等的因素而变化。

[0213] 以剂量单位形式配制本公开的组合物可能是有利的,以便于给药和剂量的均匀性。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗的哺乳动物受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定量的活性物质,经计算可与所需的药学或兽医学上可接受的载体一起产生所需的治疗效果。E3L Δ 83N-TK⁻, E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的给药和治疗方案

[0214] 使用包括肠胃外、肿瘤内、鞘内或静脉内给药的途径的联合可以实现 E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种的给药。在一个实施方案中,在需要直接的局部反应的部位,将 E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种直接给药于肿瘤,例如通过肿瘤内注射实现。另外,E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的给药途径可以变化,例如,首次使用肿瘤内注射给药,随后通过静脉内注射给药,或其任何组合。治疗有效量的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种的注射可以在规定的时间内以规定的给药频率给药。在某些实施方案中,E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF 和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒可以与其他治疗性治疗联合使用。例如,对于患有大块原发性肿瘤的受试者,E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和/或E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒可以在新辅助剂中给药(术前)或者或辅助剂(术后)。预期这种优化的治疗方案将在初级治疗(例如手术)之前或之后诱导针对肿瘤的免疫应答,并降低受试者的肿瘤负荷。此外,E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒可与其他治疗方法(如化学治疗或放射治疗)联合使用。

[0215] 在某些实施方案中,E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和 E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒至少每周或每月给药一次,但是如果需要可以更频繁地给药,例如每周两次、数周、数月、数年或甚至无限期地给药,只要持续生效。如果耐受并且如果它们导致持续或增加的益处,则考虑更频繁的给药。本方法的益处包括但不限于以下内容:减少癌细胞数量、减小肿瘤大小、根除肿瘤、抑制癌细胞浸润到外周器官、抑制或稳定转移生长、抑制或稳定肿瘤生长、稳定或改善生活质量。此外,益处可包括诱导针对肿瘤的免疫应答、T辅助细胞的活化、细胞毒性CD8⁺ T细胞的增加或调节性CD4⁺细胞的减少。例如,在黑色素瘤或上下文中,益处可能是在黑色素瘤的初始诊断的一年、两年、三年、四年、五年或更多年内缺乏复发或转移。可以对结肠癌和其他实体瘤进行类似的评估。

[0216] 在某些其他实施方案中,肿瘤块或肿瘤细胞在体内,离体或体外用 E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hFlt3L病毒的一种或多种进行处理。

[0217] 试剂盒

[0218] 本公开考虑提供包含一种或多种组合物的试剂盒,所述组合物包含一种或多种本

文所述的E3L Δ 83N-TK⁻、E3L Δ 83N-TK⁻-GM-CSF或E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒。该试剂盒可包含一个或多个容器或病毒小瓶,以及将病毒给药于待治疗对象的说明书。说明书可以指示用于给药如下提供的组合物或组合物的剂量方案。

[0219] 在一些实施方案中,试剂盒还可以包含另外的组合物,其包含用于与本文所述的任何病毒组合物联合给药的检查点抑制剂。

具体实施方式

[0220] 实施例

[0221] 材料和方法

[0222] 病毒和细胞系

[0223] E3.L Δ 83N (VC) 和 Δ E3L (VI) 病毒由B.L. Jacobs (亚利桑那州立大学) 友情提供。它们在BSC40细胞中繁殖,并且通过使用BSC40细胞的噬斑测定来确定病毒滴度。VC-TK⁻、VC-TK⁻-mGM-CSF、VC-TK⁻-hF1t3L 病毒通过胸苷激酶(TK) 基因座处的同源重组产生(参见实施例2)。通过在gpt选择培养基中培养富集这些重组病毒,并在选择培养基存在下通过超过五轮纯化噬菌斑。在不存在选择培养基的情况下扩增纯重组克隆。验证后,通过36%蔗糖垫纯化病毒。

[0224] MVA病毒由Gerd Sutter (慕尼黑大学) 友情提供,在BHK-21 (幼仓鼠肾细胞, ATCC CCL-10) 细胞中繁殖。通过将纯化的各病毒在55°C温育 1小时,产生热灭活的MVA和热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF。热灭活导致感染性降低1,000倍。

[0225] BSC40细胞在补充有10%FBS、0.1mM非必需氨基酸(NEAA) 和 50mg/ml庆大霉素的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM) 中培养。在含有10%FBS、0.1mM非必需氨基酸和50 μ g/ml庆大霉素的改良Eagle培养基中培养RK13(兔肾) 细胞。鼠黑色素瘤细胞系B16-F10最初来自I.Fidler (MD Anderson Cancer Center)。将B16-F10细胞维持在补充有10%胎牛血清(FBS)、100单位/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素、0.1mM NEAA、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠和10mM HEPES缓冲液的RPMI 1640培养基中。将人黑色素瘤SK-MEL-39、SK-MEL-188、SK-MEL90、SK-MEL90和 SK-MEL-28细胞在补充有10%FBS和4mm L-谷氨酰胺的MEM培养基中培养。所有细胞均在37°C, 5%CO₂培养箱中培养。

[0226] 将鼠三阴性乳腺癌细胞系4T1在含有10%FBS的RPMI培养基中培养。

[0227] 细胞培养一步增长

[0228] 在用包括低MOI的 Δ E3L (VI), E3L Δ 83N (VC)、VC-TK⁻、VC-TK⁻-mGM-CSF、VC-TK⁻-hF1t3L) 病毒感染之前,将B16-F10细胞和人黑色素瘤细胞培养过夜。60分钟后除去接种物;用PBS洗涤细胞两次,然后用培养基覆盖。在初次感染后1、4、12、24、48小时以及在一些情况下在72小时后,通过将细胞刮入1ml培养基中,获取细胞。在冷冻和解冻三个循环后,对样品进行超声处理,并通过连续稀释和BSC40细胞单层的感染来确定病毒滴度(对于除 Δ E3L之外的所有病毒)。在RK13细胞上测定 Δ E3L病毒滴度。通过用20%乙醇中的0.1%结晶紫染色使斑块可视化。蛋白质印迹分析

[0229] 以10MOI (感染倍率) 的E3L Δ 83N-TK⁻-mGM-CSF或E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L病毒感染鼠黑色素瘤B16-F10细胞或人黑色素瘤细胞 SK-MEL-28、SK-MEL146 (1×10^6)。在感染后的不同时间,收集上清液和细胞裂解物。将等量的蛋白质进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝

胶电泳,并将多肽转移到硝酸纤维素膜上。通过使用抗mGM-CSF或抗hFlt3L抗体测定mGM-CSF和hFlt3L表达的水平。抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH) 抗体(Cell Signaling)用作上样对照。

[0230] 小鼠

[0231] 6至8周龄的雌性C57BL/6J和BALB/c小鼠购自Jackson Laboratory 并用于体内肿瘤植入和治疗实验。将这些小鼠保持在Sloan Kettering研究所的动物设施中。所有程序均严格按照国家卫生研究院实验动物护理和使用指南中的建议进行。该方案得到斯隆凯特琳癌症研究所动物实验伦理委员会的批准。

[0232] 在存在或不存在全身或肿瘤内免疫检查点阻断的情况下,肿瘤植入和瘤内注射病毒

[0233] 将B16-F10黑色素瘤细胞(5×10^5)皮内植入C57BL/6J小鼠右侧的剃毛皮肤中,而将较少的细胞(1×10^5)植入同一小鼠的左侧。植入后7至8天。测量肿瘤大小,并当小鼠处于麻醉状态时,在小鼠右侧腹部注射直径3mm或更大的肿瘤,注射VC-TK⁻、VC-TK⁻-mGM-CSF、VC-TK⁻-hFlt3L 病毒(2×10^7 pfu)或PBS。病毒每周注射两次。每天监测小鼠并且每周测量两次肿瘤大小。根据下式计算肿瘤体积: $l(\text{长度}) \times w(\text{宽度}) \times h(\text{高度}) / 2$ 。监测小鼠的存活。当小鼠表现出痛苦迹象或当肿瘤直径达到10mm时,对小鼠实施安乐死。在一些实验组中,每周两次腹膜内递送抗-CTLA-4(每只小鼠100μg)或抗-PD-L1抗体(每只小鼠250μg)治疗小鼠。

[0234] 在一些实验中,将4T1鼠三阴性乳腺癌(TNBC)细胞皮内植入BALB/c小鼠的左侧和右侧(右侧腹侧 2.5×10^5 ,左侧腹侧 5×10^4)。肿瘤植入后5天,右侧腹部较大的肿瘤每周两次注射热灭活iMVA或VC-TK⁻病毒(2×10^7 pfu)。每天监测小鼠并且每周测量两次肿瘤大小。监测小鼠的存活。单侧皮内肿瘤植入和瘤内注射病毒

[0235] 将B16-F10黑色素瘤(体积为50μl的 5×10^5 个细胞)皮内植入WT C57BL/6J小鼠右侧的剃毛皮肤中。植入后9天,测量肿瘤大小,当小鼠麻醉时每周两次,用热灭活iMVA(相当于 2×10^7 pfu的MVA,体积为50 μl)或VC-TK⁻-mGM-CSF或PBS注射直径5-6mm的肿瘤。每天监测小鼠并且每周测量两次肿瘤大小。根据下式计算肿瘤体积: $l(\text{长度}) \times w(\text{宽度}) \times h(\text{高度}) / 2$ 。当小鼠表现出痛苦迹象或当肿瘤直径达到15mm时,对小鼠实施安乐死。

[0236] 肿瘤攻击评估交叉保护性抗肿瘤免疫的发展

[0237] 通过皮内递送致死剂量的MC38(1×10^5 个细胞)来攻击存活的小鼠(肿瘤内病毒治疗开始后超过60天)和空白对照小鼠,以评估针对异源肿瘤的交叉保护性免疫。

[0238] 肿瘤细胞悬浮液的制备

[0239] 为了分析肿瘤中的免疫细胞表型和特征,我们根据以下方案在ZACS 分析之前产生细胞悬浮液(Zamarin等,Science Translational Medicine 6,226-232(2014))。首先,我们使用镊子和手术剪刀在用PBS或病毒第二次治疗后3天和首次治疗后7天分离注射和/或非注射的肿瘤。然后称重肿瘤。将肿瘤切碎,并用Liberase(1.67WünschU/ml)和DNase(0.2mg/ml)在37℃温育30分钟。通过重复移液产生细胞悬浮液,通过70-μm尼龙过滤器过滤,然后用完全RPMI洗涤。

[0240] 肿瘤浸润免疫细胞的流式细胞术分析

[0241] 在双侧肿瘤植入模型中,将 5×10^5 个B16-F10黑色素瘤细胞皮内植入右侧腹侧,并

将 2.5×10^5 个细胞植入C57B/6小鼠的左侧腹侧。植入后 7天,将VC-TK⁻或VC-TK⁻-hFlt3L(2×10^7 pfu)或PBS注射到右侧腹部的肿瘤中。三天后重复注射。在最后一次注射后3天收获肿瘤并产生细胞悬浮液。处理细胞用抗CD3,CD45,CD4和CD8抗体进行表面标记。通过使用可固定染料eFluor506(eBioscience)将活细胞与死细胞区分开来。使用透化试剂盒(eBioscience)进一步透化它们,并对颗粒酶B染色。对于骨髓细胞群的染色,荧光染料共轭抗体抗CD45.2(104)、CD11b(M1/70)、Ly-6C(HK1.4)、MHC II(M5/114.15.2)、CD24(M1/69)、F4/80(BM8),CD103(2E7)和CD11c(N418)购自eBioscience。用它们各自的同种型对照测试所有抗体。使用LSRII流式细胞仪(BD Biosciences)获取数据。用FlowJo软件(Treestar)分析数据。

[0242] 试剂

[0243] 试剂的商业来源如下:抗mGM-CSF和抗hFlt3L抗体购自R&D。治疗性抗CTLA4(克隆9H10和9D9),抗PD-L1(克隆10F-9G2)购自新西兰西黎巴嫩的BioXcell。hFlt3L和mGM-CSF表达质粒购自GE。用于流式细胞术的抗体购自eBioscience(CD45.2Alexa Fluor 700、CD3PE-Cy7、CD4APC-efluor780、CD8PerCP-efluor710)和Invitrogen(CD4QDot 605、颗粒酶B PE-Texas Red、颗粒酶B APC)。荧光染料共轭抗CD45.2(104)、CD11b(M1/70)、Ly-6C(HK1.4)、MHC II(M5/114.15.2)、CD24(M1/69)、F4/80(BM8),CD103(2E7)和CD11c(N418)购自eBioscience。统计

[0244] 双尾未配对Student's t检验用于研究中两组的比较。通过对数秩(Mantel-Cox)测试分析存活数据。认为显著的p值在图中表示如下:*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ 。每个图例中都讨论了研究中包含的动物数量。

[0245] 实施例1

[0246] E3L Δ 83N病毒(VC)在鼠和人黑色素瘤细胞中复制

[0247] 为了测试E3L Δ 83N(本实验的亲本VC病毒)或 Δ E3L是否在鼠或人黑色素瘤细胞中复制,用感染倍率(MOI)为5的E3L Δ 83N或 Δ E3L病毒感染小鼠B16黑色素瘤细胞、人黑色素瘤细胞SK-MEL39、SK-MEL188和SK-MEL90。在感染之后(最多感染后50小时)的不同时间收集细胞。通过在BSC40细胞单层上滴定测定病毒产量(log PFU)。如图1A-1D所示, E3L Δ 83N病毒(VC)可以在所有测试的鼠和人黑色素瘤细胞中有效复制,而 Δ E3L病毒(VI)不能在这些细胞系中复制。

[0248] 实施例2

[0249] 产生具有或不具有GM-CSF或Flt3L的重组E3L Δ 83N-TK⁻病毒

[0250] 先前已经表明,具有胸苷激酶(TK⁻)缺失的溶瘤痘苗病毒比TK⁺病毒更加减毒和更具肿瘤选择性(Buller等人,1988;Puhlmann等人,2000)。在本公开中,本发明人使用标准重组病毒技术,通过质粒DNA和病毒基因组DNA之间TK基因座的同源重组,制备包含TK-缺失和具有或不具有在痘苗合成早期/晚期启动子(Pse/1)控制下表达人Flt3L(hFlt3L)或鼠GM-CSF(mGM-CSF)的重组VC病毒。首先,发明人构建了含有在牛痘Pse/1控制下的特定目的基因(SG)以及在牛痘P7.5启动子的控制下的大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(gpt)的质粒,其被胸苷激酶(TK)基因在两侧包围(图2)。将BSC40细胞用VC病毒以0.05的MOI感染1小时。然后用上述质粒DNA转染。在48小时收集感染的细胞。通过在包括MPA、黄嘌呤和次黄嘌呤的gpt选择培养基中进一步培养选择重组病毒,并纯化噬菌斑(Lorenzo等,

2004)。进行PCR分析以鉴定具有部分TK基因缺失和含有和不含鼠GM-CSF或人Flt3L的重组病毒(图3)。

[0251] 设计寡核苷酸引物以扩增不同大小的DNA片段以鉴定具有不同插入的VC重组病毒(图3中的表)。例如,与VC基因组上的插入位点相邻的引物TK-F2和载体上的pCB-R3用于检查靶基因的同源插入。重组病毒中缺失的引物TK-R4和TK-F4用于区分重组病毒和亲本病毒。基因特异性引物用于检查鼠GM-CSF和人Flt3L基因的插入。位于牛痘TK基因(NCBI GenBank Reference NC_006998.1(80724..81257))侧翼区的引物TK-F5/ TK-R5用于扩增靶基因以进行序列验证。预期的片段显示在图3的表中。基因特异性引物mGMCSF-F1/R1将扩增来自VC-TK⁻-mGM-CSF病毒的 310bp DNA片段,而hFlt3L-F1/R1将从VC-TK⁻-hFlt3L病毒中产生316bp 的PCR片段。

[0252] 引物序列:TK-F2(SEQ ID NO:1):TGTGAAGACGATAAATTAATGATC;

[0253] TK-F4(SEQ ID NO:2):TTGTCATCATGAACGGCGGA;

[0254] TK-R4(SEQ ID NO:3):TCCTTCGTTTGCCATACGCT;

[0255] TK-F5(SEQ ID NO:4):GAACGGGACTATGGACGCAT;

[0256] TK-R5(SEQ ID NO:5):TCGGTTTCCTCACCCAATCG;

[0257] pCB-R3(SEQ ID NO:6):ACCTGATGGATAAAAAGGCG;

[0258] mGMCSF-F1(SEQ ID NO:7):GGCATTGTGGTCTACAGCCT;

[0259] mGMCSF-R1(SEQ ID NO:8):GTGTTTCACAGTCCGTTTCCG;

[0260] hFlt3L-F1(SEQ ID NO:9):AACGACCTATCTCCTCCTGC;

[0261] hFlt3L-R1(SEQ ID NO:10):GGGCTGAAAGGCACATTTGG。

[0262] 实施例3

[0263] 从重组VC-TK-mGM-CSF病毒感染的黑色素瘤细胞中表达mGM-CSF

[0264] 为了测试来自VC-TK⁻重组病毒的mGM-CSF的表达,本发明人用 VC-TK⁻-mGM-CSF感染B16鼠黑色素瘤细胞和人黑色素瘤细胞(SK-mel-28)。在感染后的不同时间(4、8和24小时)收集细胞裂解物和上清液。进行蛋白质印迹分析以确定转基因的表达水平。如图4A所示,发明人在细胞裂解物和上清液中观察到丰富水平的mGM-CSF。

[0265] 实施例4

[0266] 从重组VC-TK-hFlt3L病毒感染的黑色素瘤细胞中表达hFlt3L

[0267] 为了测试来自VC-TK⁻重组病毒的hFlt3L的表达,本发明人用 VC-TK⁻-hFlt3L感染B16鼠黑色素瘤细胞和人黑色素瘤细胞系。在感染后(4、8和24小时)的不同时间收集细胞裂解物和上清液。进行蛋白质印迹分析以确定转基因的表达水平。发明人在细胞裂解物中检测到丰富水平的 hFlt3L,但在上清液中没有检测到(图4B)。这与hFlt3L主要与膜相关而不分泌的观点一致。

[0268] 实施例5

[0269] VC-TK⁻,VC-TK⁻-mGM-CSF和VC-TK⁻-hFlt3L具有复制能力

[0270] VC,VC-TK⁻,VC-TK⁻-mGM-CSF和VC-TK⁻-hFlt3L在鼠B16-F10细胞中的复制能力通过以0.01的MOI感染来确定。在感染后(24,48和72 小时)的不同时间收集细胞,通过在BSC40细胞上滴定测定病毒产量(log pfu)。VC在B16-F10细胞中有效复制,感染后72小时病毒滴度增加20,000 倍。(图5A和5B)。与VC相比,TK基因的缺失导致B16黑色素瘤细胞中病毒复制

减少3倍。此外,E3L Δ 83N-TK⁻mGM-CSF和E3L Δ 83N-TK⁻-hF1t3L在小鼠B16细胞中也具有复制能力,感染后72小时病毒滴度分别增加2800倍和1000倍(图6A和6B)。因此,在该实施例中,发明人已经显示VC-TK⁻,VC-TK⁻-mGM-CSF和VC-TK⁻-hF1t3L在肿瘤细胞中都具有复制能力。

[0271] 实施例6

[0272] 肿瘤内注射VC-TK⁻,VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L可导致注射肿瘤的根除,并在对侧非注射肿瘤中延迟肿瘤生长

[0273] 为了测试重组病毒和载体对照的体内肿瘤杀伤活性,将鼠B16黑色素瘤细胞植入C57B/6小鼠,左侧为 1×10^5 个细胞,右侧为 5×10^5 个细胞。本发明人每周两次对右侧较大的肿瘤(直径约3-4mm)进行瘤内注射VC-TK⁻,VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L(2×10^7 pfu)。PBS模拟治疗对照包括在该研究中。每周测量两次双侧肿瘤大小并监测小鼠的存活。当肿瘤直径达到1cm时,对小鼠实施安乐死。实验方案显示在图6中。发明人观察到PBS模拟治疗的肿瘤生长非常快并且小鼠死亡,中等存活期为15天(图7A,B)。E3L Δ 83N-TK⁻-注射小鼠,10/10肿瘤消退(图7C)。然而,对侧肿瘤继续生长(图7D)并且所有小鼠死亡,中位存活期为18天(与PBS治疗组相比, $P < 0.05$) (图7M)。与VC-TK⁻载体相比,向VC-TK⁻载体中添加mGM-CSF不会导致延长的存活(图7M)。然而,肿瘤内注射VC-TK⁻-hF1t3L不仅根除了8/10注射的肿瘤,而且导致对侧肿瘤中肿瘤生长延迟,并将中期存活延长至22天(与PBS治疗组相比, $P < 0.01$;与VC-TK⁻-mGM-CSF治疗组相比, $P = 0.02$) (图7E,F,M)。这些结果表明肿瘤内注射减毒复制型VC-TK⁻,VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L可有效根除注射的肿瘤,而且肿瘤内递送VC-TK⁻-hF1t3L比VC-TK⁻-mGM-CSF更有效延缓对侧肿瘤的生长并延长生存期。

[0274] 实施例7

[0275] 将瘤内递送重组VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L与全身递送免疫检查点阻断剂相结合,可以比单独使用任何一种治疗方法更有效地消除肿瘤并延

[0276] 长生存期

[0277] 已经显示抗-CTLA-4抗体的全身递送不能控制B16黑色素瘤生长。为了测试肿瘤内病毒的肿瘤内递送是否会克服对免疫检查点阻断剂的抗性,本发明人使用鼠B16双侧肿瘤植入模型,其中每周两次用VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L注射小鼠右侧较大的肿瘤,以及进行或不进行腹膜内递送抗-CTLA-4抗体。每周两次测量肿瘤大小并监测小鼠的存活。发明人发现,VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L的瘤内递送与抗-CTLA-4抗体的全身递送的组合导致根除10/10注射的肿瘤,对侧非注射肿瘤的生长显著延迟,并且在40-60%的病例中完全根除肿瘤(图7I-M)。与实施例6中观察到的结果类似,肿瘤内递送VC-TK⁻-hF1t3L与抗-CTLA-4抗体相比,VC-TK⁻-mGM-CSF联合抗-CTLA-4抗体延缓对侧肿瘤生长,延长被治疗小鼠生存期。

[0278] 总之,这些结果表明,减毒复制型溶瘤病毒的瘤内递送可以诱导抗肿瘤免疫,其在抗-CTLA-4抗体的存在下被扩增。

[0279] 实施例8

[0280] 热活灭活VC-TK⁻-mGM-CSF的瘤内递送比活VC-TK⁻-mGM-CSF更有效地根除肿瘤和产生抗肿瘤适应性免疫

[0281] 发明人先前报道,在双侧B16-F10双侧肿瘤植入模型中,热灭活的MVA在根除注射

的肿瘤和抑制或延迟未注射的远端肿瘤的生长方面比MVA 更有效。(参见发明人和同事于2016年2月25日提交的国际申请PCT/ US2016/19663;和2015年4月17日提交的美国临时申请No.62149484及其相应的提交于2016年4月18日的国际申请PCT/US2016/028184,这些申请通过引用整体并入本文)。因为临床试验中的大多数溶瘤病毒,包括已被批准用于治疗转移性黑色素瘤的T-VEC,具有复制能力,本发明人在双侧 B16-F10植入模型中进行了VC-TK⁻-mGM-CSF与热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF 之间的头对头比较。VC-TK⁻-mGM-CSF与JX594相似,它具有TK缺失和 GM-CSF转基因。尽管VC-TK⁻-mGM-CSF在B16黑色素瘤细胞中有效复制,但由于E3的Z-DNA结合结构域的缺失,它在动物和人类中比WT牛痘更加减毒(Brandt和Jacobs,JVI,2001))。因此,预计VC-TK⁻-mGM-CSF 比人类使用的JX594更安全。发明人假设,类似于热灭活MVA,因为其在 DC和癌细胞中诱导I型IFN的能力,热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF将比活 VC-TK⁻-mGM-CSF更强的抗肿瘤免疫活化剂。为了证实这一点,发明人进行了以下实验。简言之,将B16-F10黑色素瘤细胞皮内植入C57B/6小鼠的左侧和右侧(左侧 5×10^5 ,左侧 1×10^5)。肿瘤植入后7天,将 2×10^7 pfu 的活VC-TK⁻-mGM-CSF或等量的热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF肿瘤内注射到右侧的较大肿瘤中。测量肿瘤大小并且每周注射两次肿瘤。监测小鼠存活。发现在用PBS治疗的小鼠中,肿瘤在右侧迅速生长,这导致早期死亡(图8A, B, O)。与PBS相比,肿瘤内注射热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF或活 VC-TK⁻-mGM-CSF导致肿瘤生长延迟和存活率提高(图8O,***,P<0.001, VC-TK⁻-mGM-CSF对PBS,****,P<0.0001,热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF对 PBS)。瘤内注射热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF比VC-TK⁻-mGM-CSF更有效地根除注射的肿瘤(热-VC-TK⁻-mGM-CSF的8/9无肿瘤对VC-TK⁻-mGM-CSF 的4/9无肿瘤),并延迟或抑制对侧非注射肿瘤的生长(热灭活 VC-TK⁻-mGM-CSF的7/9无肿瘤对VC-TK⁻-mGM-CSF的5/9无肿瘤)(图 8C-F)。发明人观察到与VC-TK⁻-mGM-CSF治疗的小鼠相比,热灭活 VC-TK⁻-mGM-CSF处理的小鼠的存活率提高(图8O,*,P=0.014)。这些结果表明病毒复制不是实现抗肿瘤效果所必需的。虽然在该具体实例中,发明人使用热灭活来灭活病毒,但是可以通过其他方法进行灭活。例如,另一种病毒灭活方法包括使用紫外线照射。

[0282] 如本公开的发明人已经对于热-MVA证明的那样,可能通过诱导 STING介导的I型IFN应答、激活Batf3依赖性树突细胞(DC)和募集和激活抗肿瘤CD8⁺和CD4⁺ T细胞以及增加CD8⁺/Treg和CD4⁺效应子/Treg 的比例,瘤内注射热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF可导致抗肿瘤免疫。

[0283] 与单独使用热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF相比,将活和热灭活 VC-TK⁻-mGM-CSF共同给药于肿瘤不会导致抗肿瘤反应的改善(图8G, H, O)。发明人推断,活病毒可能会阻断宿主的免疫反应,从而阻断热灭活 VC-TK⁻-mGM-CSF的活性,这可能会减轻GM-CSF的有益作用。正在进行研究以评估活和Heat-VC-TK⁻-hF1t3L的共同给药是否可能比单独使用热灭活VC-TK⁻-hF1t3L更有效。通过删除干扰细胞溶质DNA传感途径的候选基因,进一步减弱复制型VC-TK⁻-hF1t3L的研究正在进行中。

[0284] 实施例9

[0285] 肿瘤内注射VC-TK⁻-mGM-CSF或热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF与腹腔内免疫检查点阻断剂联合应用可产生协同治疗效果

[0286] 发明人接下来研究了瘤内注射活的或热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF是否增强了抗PD-L1抗体在双侧B16-F10黑色素瘤模型中的治疗效果,该模型模拟患有转移性疾病的个体。简

言之,将B16-F10黑色素瘤细胞皮内植入C57B/6小鼠的左侧和右侧(左侧 5×10^5 ,左侧 1×10^5)。在肿瘤植入后8天,发明人每周两次向右侧腹部较大的肿瘤肿瘤内注射 VC-TK⁻-mGM-CSF (2×10^7 pfu)、或等量的热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF或活的 (1×10^7 pfu) 和热-VC-TK⁻-mGM-CSF (相当于 1×10^7 pfu) 的组合,以及每周两次腹膜内递送同种型对照或抗PD-L1抗体(每只小鼠200 μ g)。

[0287] 瘤内注射活VC-TK⁻-mGM-CSF和全身递送抗PD-L1抗体的组合导致显著改善小鼠的存活情况(图80,*, $P=0.02$,VC-TK⁻-mGM-CSF+抗-PD-L1 对VC-TK⁻-mGM-CSF)。67%用活VC-TK⁻-mGM-CSF+抗PD-L1抗体治疗的小鼠(6/9)无肿瘤。而在实验结束时,只有22%的用活VC-TK⁻-mGM-CSF 治疗的小鼠(2/9)没有肿瘤(图80)。所有用热-VC-TK⁻-mGM-CSF+抗 -PD-L1治疗的小鼠(9/9),89%用活+热-VC-TK⁻-mGM-CSF+抗PD-L1治疗的小鼠(8/9)在实验结束时存活(病毒注射后第67天)(图80)。这些结果进一步证明,在联合治疗环境中,可以在抗PD-L1抗体的存在下进一步增强热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF或活VC-TK⁻-mGM-CSF诱导的抗肿瘤免疫。

[0288] 实施例10

[0289] 用热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF和有或没有抗-PD-L1治疗的存活小鼠,或用活VC-VC-TK⁻-mGM-CSF和抗PD-L1治疗的存活小鼠已经产生针对异源肿瘤的交叉保护性免疫

[0290] 发明人接下来测试了用病毒和采用或不采用抗PD-L1抗体处理初始 B16-F10肿瘤的成功治疗的存活小鼠是否具有针对异源肿瘤(在这种情况下为MC38结肠癌细胞)的发展交叉保护性免疫。该实验包括以下组的小鼠:(i)用活VC-TK⁻-mGM-CSF ($n=2$) 治疗的存活小鼠;(ii)用活 VC-TK⁻-mGM-CSF+抗PD-L1 ($n=6$) 治疗的存活小鼠;(iii)用热灭活 VC-TK⁻-mGM-CSF ($n=7$) 治疗的存活小鼠;(iv)用热灭活VC-TK⁻- mGM-CSF+抗PD-L1治疗的存活小鼠 ($n=9$);(v)用活 +Heat-VC-TK⁻-mGM-CSF+抗-PD-L1 ($n=6$) 治疗的存活小鼠;(vi)用活 + Heat-VC-TK⁻-mGM-CSF+抗-PD-L1 ($n=8$) 治疗的存活小鼠;(vii)从未暴露于肿瘤或病毒的空白对照小鼠 ($n=5$)。通过皮内植入致死剂量的 MC38 (1×10^5 个细胞)攻击所有小鼠,并且每周测量肿瘤大小两次,并且每天监测小鼠的存活。发明人观察到所有空白对照小鼠都发育出MC38并且在预期时间死亡,中位存活期为30天。用活VC-TK⁻-mGM-CSF治疗的存活小鼠中有2/2在稍后时间死亡,中位存活期为42天(图9, $p<0.05$; VC-TK⁻-mGM-CSF对空白对照小鼠)。令人惊讶的是,大多数其余存活小鼠在肿瘤植入后100天抵抗了MC38攻击(图9)。这些结果表明,采用或不采用抗PD-L1抗体的热灭活VC-TK⁻-mGM-CSF治疗的存活小鼠已经发展出针对异源肿瘤的全身免疫。在先前用活VC-TK⁻-mGM-CSF治疗的小鼠中,这种免疫力较弱,尽管在该组中仅有两只小鼠。未来的研究将扩大在单侧 B16-F10肿瘤植入模型中用活VC-TK⁻-mGM-CSF与热灭活 VC-TK⁻-mGM-CSF成功治疗的小鼠数量,然后评估针对MC38或其他异源肿瘤(如MB49膀胱癌)的交叉保护性免疫。

[0291] 实施例11

[0292] 肿瘤内注射VC-TK⁻-hF1t3L病毒比VC-TK⁻病毒在非注射肿瘤中增殖和激活 CD8⁺和CD4⁺ T细胞更有效。

[0293] 为了评估在B16-F10黑色素瘤中肿瘤内注射VC-TK⁻或VC-TK⁻-hF1t3L 是否导致CD8⁺和CD4⁺ T细胞的活化和增殖,将 2.5×10^5 个B16-F10黑色素瘤细胞皮内植入入6-8周龄C57B/6的左侧腹侧,并将 5×10^5 个B16-F10 黑色素瘤细胞植右侧腹侧。植入后7天,将VC-TK⁻或VC-TK⁻-hF1t3L (2×10^7 pfu) 或PBS注射到右侧的较大肿瘤中。三天后重复注射。在第一次

注射后第7天收获注射和未注射的肿瘤,并产生细胞悬浮液。通过FACS 分析注射和未注射肿瘤中的活免疫细胞浸润。注射肿瘤中表达颗粒酶B的 $CD8^+$ T细胞显著增加,从PBS治疗的肿瘤中的51%到VC-TK⁻治疗的肿瘤中的81%和VC-TK⁻-hF1t3L治疗的肿瘤中的83% (图10A, 10C, $p < 0.001$; VC-TK⁻或VC-TK⁻-hF1t3L对PBS)。在未注射的肿瘤中,表达颗粒酶B的 $CD8^+$ T细胞从PBS治疗的小鼠中的48%增加到VC-TK⁻治疗的54%和 VC-TK⁻-hF1t3L治疗的小鼠中的70% (图10A, 10C, $p < 0.05$; VC-TK⁻-hF1t3L 对PBS)。这些结果表明肿瘤内注射VC-TK⁻或VC-TK⁻-hF1t3L导致注射肿瘤中活化的 $CD8^+$ T细胞增加,以及肿瘤内注射VC-TK⁻-hF1t3L而不是VC-TK⁻导致非注射肿瘤中活化的 $CD8^+$ T细胞显著增加。

[0294] 对于用VC-TK⁻或VC-TK⁻-hF1t3L治疗的小鼠注射和未注射的肿瘤中的 $CD4^+$ T细胞,与用PBS治疗的小鼠相比,观察到类似的变化。粒酶B⁺ $CD4^+$ T细胞从PBS治疗的肿瘤中的9%上升到VC-TK⁻治疗的肿瘤中的74%和VC-TK⁻-hF1t3L治疗的肿瘤中的71% (图10B, 10D, $p < 0.001$; VC-TK⁻或VC-TK⁻-hF1t3L对PBS)。在未注射的肿瘤中,表达颗粒酶B的 $CD4^+$ T 细胞从PBS治疗的小鼠中的11%增加到VC-TK⁻治疗的13%和 VC-TK⁻-hF1t3L治疗的小鼠的32% (图10B, 10D, $p < 0.01$; VC-TK⁻-hF1t3L 对PBS)。这些结果表明肿瘤内注射VC-TK⁻或VC-TK⁻-hF1t3L导致注射肿瘤中活化的 $CD4^+$ T细胞增加,以及肿瘤内注射VC-TK⁻-hF1t3L而不是 VC-TK⁻导致非注射肿瘤中活化的 $CD4^+$ T细胞增加。

[0295] 实施例12

[0296] 瘤内注射VC-TK⁻-hF1t3L导致非注射肿瘤中 $CD103^+$ 树突状细胞增加

[0297] 发明人接下来分析了注射和非注射肿瘤中的树突细胞(DC)群体。肿瘤浸润性DC表征为 $CD45^+Ly6C-MHC-II^+CD24hiF4/80lo$ 细胞(Broz等, Cancer Cell, 2014)。在 $CD24hi$ DC中,存在两个DC群, $CD11b^+$ DC(也称为DC1)和 $CD103^+$ DC(也称为DC2)。图11显示了这些DC群体的门控分离策略。基于MHC-II的表达进一步分离 $CD45^+$ 活细胞。对MHC-IIhi 细胞染色DC标记物 $CD24$ 和肿瘤相关巨噬细胞标记物 $F4/80$ 。基于 $CD103$ 和 $CD11b$ 的表达,将 $CD24hiF4/80lo$ 细胞进一步分离成 $CD103^+$ DC和 $CD11b^+$ DC。

[0298] $CD103^+$ DC是外周DC的一个子集,专门用于交叉呈递抗原。*Batf3* 是一种转录因子,对 $CD103^+$ DC的分化很重要。 $CD103^+$ DC在宿主抗肿瘤免疫中起重要作用。本公开的发明人先前已经显示*Batf3*依赖性 $CD103^+$ DC 是灭活的MVA介导的抗肿瘤效果所需的(WO2016/168862)。这里,本发明人研究了注射和非注射肿瘤中 $CD45^+$ 细胞中 $CD103^+$ DC的百分比。

[0299] 将B16-F10黑色素瘤细胞(2.5×10^5)皮内植入6-8周龄C57B/6的左侧腹侧并将 5×10^5 个B16-F10黑色素瘤细胞植入右侧腹侧。植入后7天,将热灭活MVA,VC-TK⁻,VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L(2×10^7 pfu) 或PBS注射到右侧的较大肿瘤中。三天后重复注射。在第一次注射后第7 天收获注射和未注射的肿瘤,并产生细胞悬浮液。通过FACS分析注射和未注射肿瘤中的活髓细胞浸润。发明人观察到,瘤内注射热灭活MVA或 VC-TK⁻或VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L导致肿瘤中 $CD45^+$ 细胞中 $CD103^+$ DC的百分比降低,在PBS模拟治疗的肿瘤中 $CD45^+$ 细胞中 $CD103^+$ DC的百分比是0.2%,病毒处理后降低到热灭活MVA,VC-TK⁻、VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L治疗的肿瘤中的0.03%,0.03%,0.05%和0.12% (图12A; $P < 0.05$,热灭活MVA或VC-TK⁻或VC-TK⁻-mGM-CSF 对PBS)。在非注射的肿瘤中,在PBS-mock治疗的小鼠中 $CD45^+$ 细胞中 $CD10^+$ DC百分比是0.15%,瘤内注射热灭活MVA或VC-TK⁻或 VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hF1t3L导致 $CD45^+$ 细胞中 $CD10^+$ DC百分比增加到在热灭活MVA,VC-TK⁻,

VC-TK⁻-mGM-CSF或VC-TK⁻-hFlt3L治疗的小鼠中的0.32%,0.26%,0.21%和0.39%(图12A; $P<0.05$,VC-TK⁻-hFlt3L 对PBS)。这些结果表明CD103⁺ DC在肿瘤内注射病毒后发生动态变化,包括降低注射肿瘤中CD45⁺细胞中CD103⁺ DC百分比,并且肿瘤内注射 VC-TK⁻-hFlt3L导致对侧非注射肿瘤中CD45⁺细胞中CD103⁺ DC百分比的显著增加。这些结果与hFlt3L是CD103⁺ DC分化和增殖的重要生长因子的理解一致。

[0300] 还研究了注射和未注射肿瘤中CD45⁺细胞中CD11b⁺ DC的百分比。发现肿瘤内注射VC-TK⁻导致CD45⁺细胞中CD11b⁺ DC的百分比从PBS治疗的肿瘤中的0.5%增加到VC-TK⁻治疗的肿瘤中的0.8%(图12B, $P<0.05$, VC-TK⁻对比PBS)。瘤内注射病毒似乎不影响未注射肿瘤中的CD11b⁺ DC 群体(图12B)。总之,这些结果表明,瘤内注射VC-TK⁻-hFlt3L导致对侧非注射肿瘤中CD45⁺细胞中CD103⁺ DC百分比的显著增加,而不影响CD45⁺细胞中CD11b⁺ DC的百分比。

[0301] 实施例13

[0302] 瘤内注射VC-TK⁻在双侧三阴性乳腺癌4T1肿瘤植入模型中是有效的

[0303] 除了B16-F10鼠黑色素瘤模型之外,本发明人还研究了瘤内注射溶瘤病毒VC-TK⁻是否在治疗三阴性乳腺癌 (TNBC) 4T1双侧肿瘤植入模型中具有功效。简言之,将4T1鼠三阴性乳腺癌 (TNBC) 细胞皮内植入BALB/ c小鼠的左侧和右侧(右侧腹侧 2.5×10^5 ,左侧腹侧 5×10^4)。肿瘤植入后 5天,右侧腹部较大的肿瘤每周两次注射VC-TK⁻病毒(2×10^7 pfu)或等量的热灭活MVA。每天监测小鼠并且每周测量两次肿瘤大小。监测小鼠的存活。显示了注射和未注射肿瘤的初始肿瘤体积(图13A和B)。显示了治疗后18天注射和未注射肿瘤的肿瘤体积(图13C和D)。发现与PBS治疗的肿瘤相比,肿瘤内注射VC-TK⁻导致注射肿瘤的肿瘤体积显著减少(图 13C; $P<0.0001$,VC-TK⁻对PBS)并且与PBS治疗的小鼠相比,非注射的肿瘤体积减少(图13D; $P<0.05$,VC-TK⁻对PBS)。更重要的是,小鼠的平均存活期从PBS治疗的小鼠中的18天延长至VC-TK⁻治疗的小鼠中的21天(图 13E; $P=0.0001$,VC-TK⁻对PBS)。在该双侧4T1肿瘤植入模型中,VC-TK⁻的抗肿瘤作用类似于热灭活iMVA(图13,A-E)。这与我们在B16-F10双侧肿瘤植入模型(图8,C-F和O)中观察到的不同,其中VC-TK⁻-mGM-CSF 不如热灭活的VC-TK⁻-mGM-CSF有效。这些可能与肿瘤亚型和肿瘤微环境中免疫细胞群的差异有关。未来的研究将比较复制型溶瘤病毒与灭活病毒在包括前列腺癌和膀胱癌模型在内的其他肿瘤模型中的功效。因为实施例 6中显示VC-TK⁻-hFlt3L比VC-TK⁻-mGM-CSF更有效(图8E-H,M),预计肿瘤内注射溶瘤VC-TK⁻-hFlt3L也可有效治疗4T1小鼠乳腺癌。

[0304] 实施例14

[0305] 瘤内注射VC-TK⁻-mGM-CSF在大型B16-F10单侧肿瘤植入模型中有效

[0306] 本发明人在大规模建立B16-F10单侧肿瘤植入模型中比较了肿瘤内注射复制型的VC-TK⁻-mGM-CSF与热灭活的MVA(Heat-iMVA)的抗肿瘤功效。在该实验中,将B16-F10黑色素瘤(体积为50 μ l的 5×10^5 个细胞) 皮内植入WT C57BL/6J小鼠右侧的剃毛皮肤中。植入后9天,测量肿瘤大小,并且每周两次用热灭活iMVA(相当于50 μ l体积的 2×10^7 pfu MVA) 或使用VC-TK⁻-mGM-CSF(2×10^7 pfu)或使用PBS注射直径为5-6mm的肿瘤。每天监测小鼠并且每周两次测量肿瘤大小。肿瘤内注射 VC-TK⁻-mGM-CSF在延迟肿瘤生长甚至在少部分治疗小鼠中根除肿瘤方面是有效的。它还将中位存活期从PBS治疗小鼠的6天延长至 VC-TK⁻-mGM-CSF治疗小鼠的17天(图14,A,CE, $P<0.0001$, VC-TK⁻-mGM-CSF对PBS)。在大规模肿瘤中瘤内

注射Heat-iMVA也是有效的,并且热灭活iMVA治疗的小鼠的中位存活期延长至27天(图14, B, D和E)。这些结果表明肿瘤内注射溶瘤VC-TK⁻-mGM-CSF可有效治疗单侧植入模型中大量建立的B16-F10。因为实施例6中所示VC-TK⁻-hFlt3L比 VC-TK⁻-mGM-CSF更有效(图8E-H,M), 预计肿瘤内注射溶瘤 VC-TK⁻-hFlt3L也可有效治疗单侧植入模型中大量建立的B16-F10。

[0307] 本文引用的所有专利和文献文献出于所有目的通过引用整体并入。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 纪念斯隆凯特琳癌症中心
- [0003] <120> 用于癌症免疫治疗的具有胸苷激酶缺失和具有或不具有人FLT3L或GM-CSF表达的复制型减毒痘苗病毒
- [0004] <130> 11000/005154-W00
- [0005] <140>
- [0006] <141>
- [0007] <150> 62/300,066
- [0008] <151> 2016-02-25
- [0009] <160> 10
- [0010] <170> PatentIn version 3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 24
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <223> 人工序列描述: 合成引物
- [0017] <400> 1
- [0018] tgtgaagacg ataaattaat gatc 24
- [0019] <210> 2
- [0020] <211> 20
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <220>
- [0024] <223> 人工序列描述: 合成引物
- [0025] <400> 2
- [0026] ttgtcatcat gaacggcgga 20
- [0027] <210> 3
- [0028] <211> 20
- [0029] <212> DNA
- [0030] <213> 人工序列
- [0031] <220>
- [0032] <223> 人工序列描述: 合成引物
- [0033] <400> 3
- [0034] tccttcgttt gccatacgtc 20
- [0035] <210> 4
- [0036] <211> 20
- [0037] <212> DNA

[0038] <213> 人工序列
[0039] <220>
[0040] <223> 人工序列描述: 合成引物
[0041] <400> 4
[0042] gaacgggact atggacgcat 20
[0043] <210> 5
[0044] <211> 20
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 人工序列
[0047] <220>
[0048] <223> 人工序列描述: 合成引物
[0049] <400> 5
[0050] tcggtttcct cacccaatcg 20
[0051] <210> 6
[0052] <211> 20
[0053] <212> DNA
[0054] <213>人工序列
[0055] <220>
[0056] <223> 人工序列描述: 合成引物
[0057] <400> 6
[0058] acctgatgga taaaaaggcg 20
[0059] <210> 7
[0060] <211> 20
[0061] <212> DNA
[0062] <213> 人工序列
[0063] <220>
[0064] <223> 人工序列描述: 合成引物
[0065] <400> 7
[0066] ggcattgtgg tctacagcct 20
[0067] <210> 8
[0068] <211> 21
[0069] <212> DNA
[0070] <213> 人工序列
[0071] <220>
[0072] <223> 人工序列描述: 合成引物
[0073] <400> 8
[0074] gtgtttcaca gtccgtttcc g 21
[0075] <210> 9
[0076] <211> 20

[0077]	<212>	DNA
[0078]	<213>	人工序列
[0079]	<220>	
[0080]	<223>	人工序列描述：合成引物
[0081]	<400>	9
[0082]		aacgacctat ctcctcctgc 20
[0083]	<210>	10
[0084]	<211>	20
[0085]	<212>	DNA
[0086]	<213>	人工序列
[0087]	<220>	
[0088]	<223>	人工序列描述：合成引物
[0089]	<400>	10
[0090]		gggctgaaag gcacatttgg 20

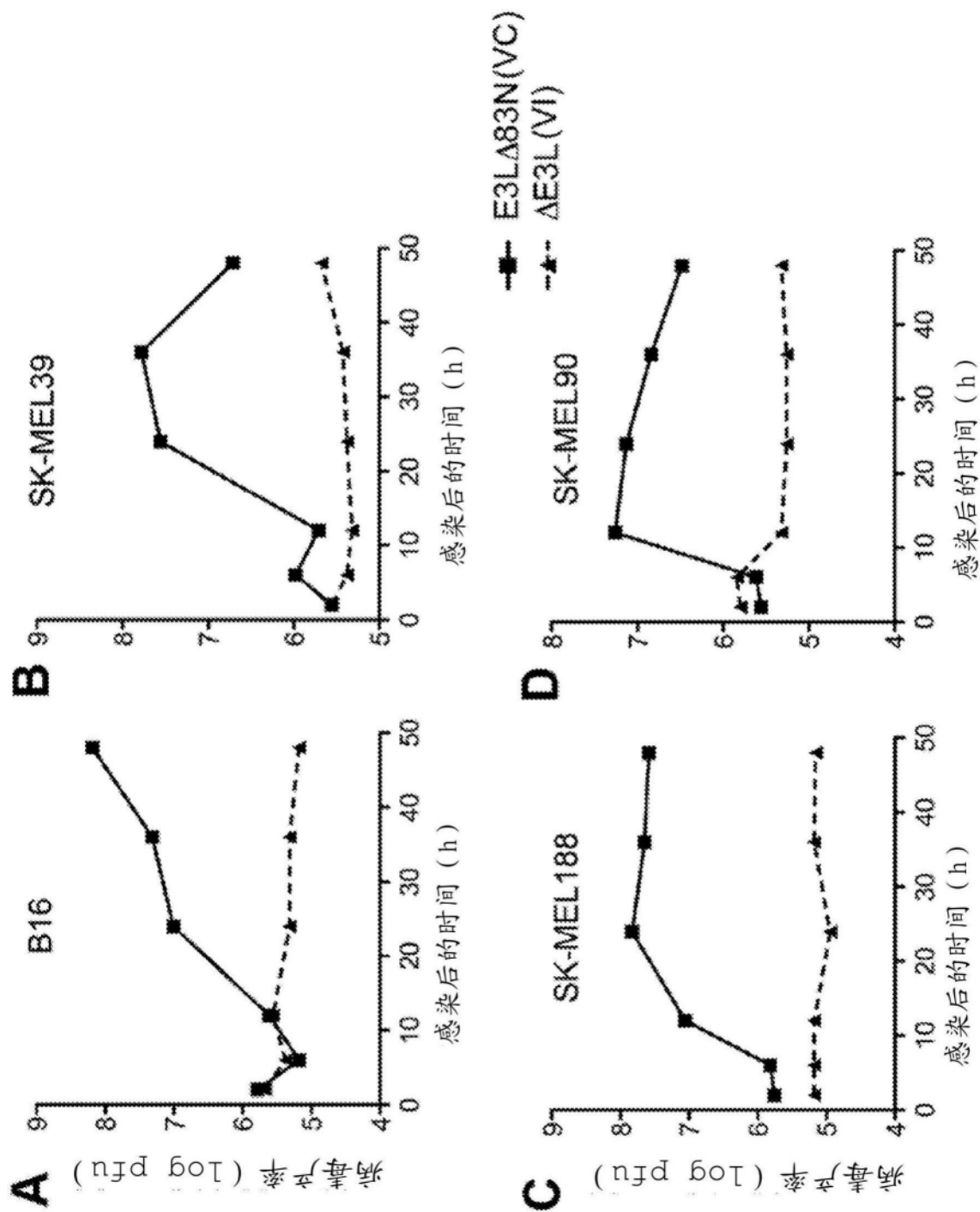


图1

TK区同源重组示意图

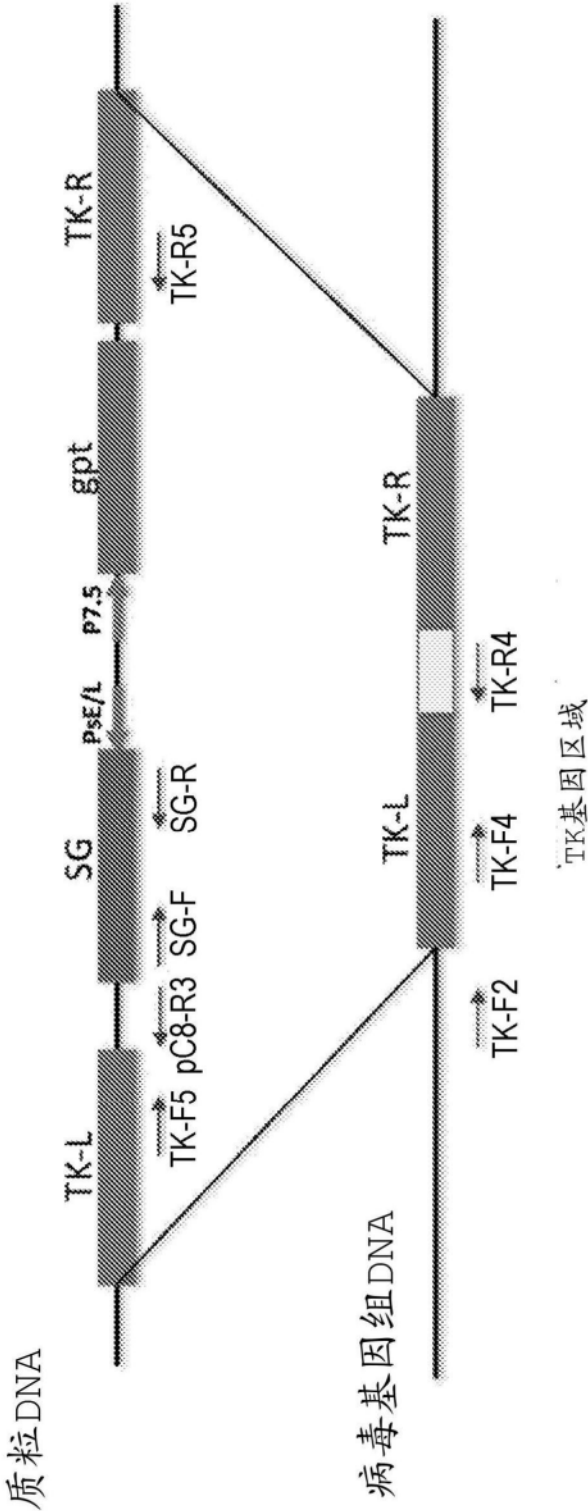


图2

PCR:(1) TK-F2/pCB-R3 同源重组 (HR)
(2) TK-F4/TK-R4 TK 删除 (TK)
(3) SG-F/R 特异基因 (SG)
(4) TK-F5/TK-R5 测序特异基因插入 (Seq)

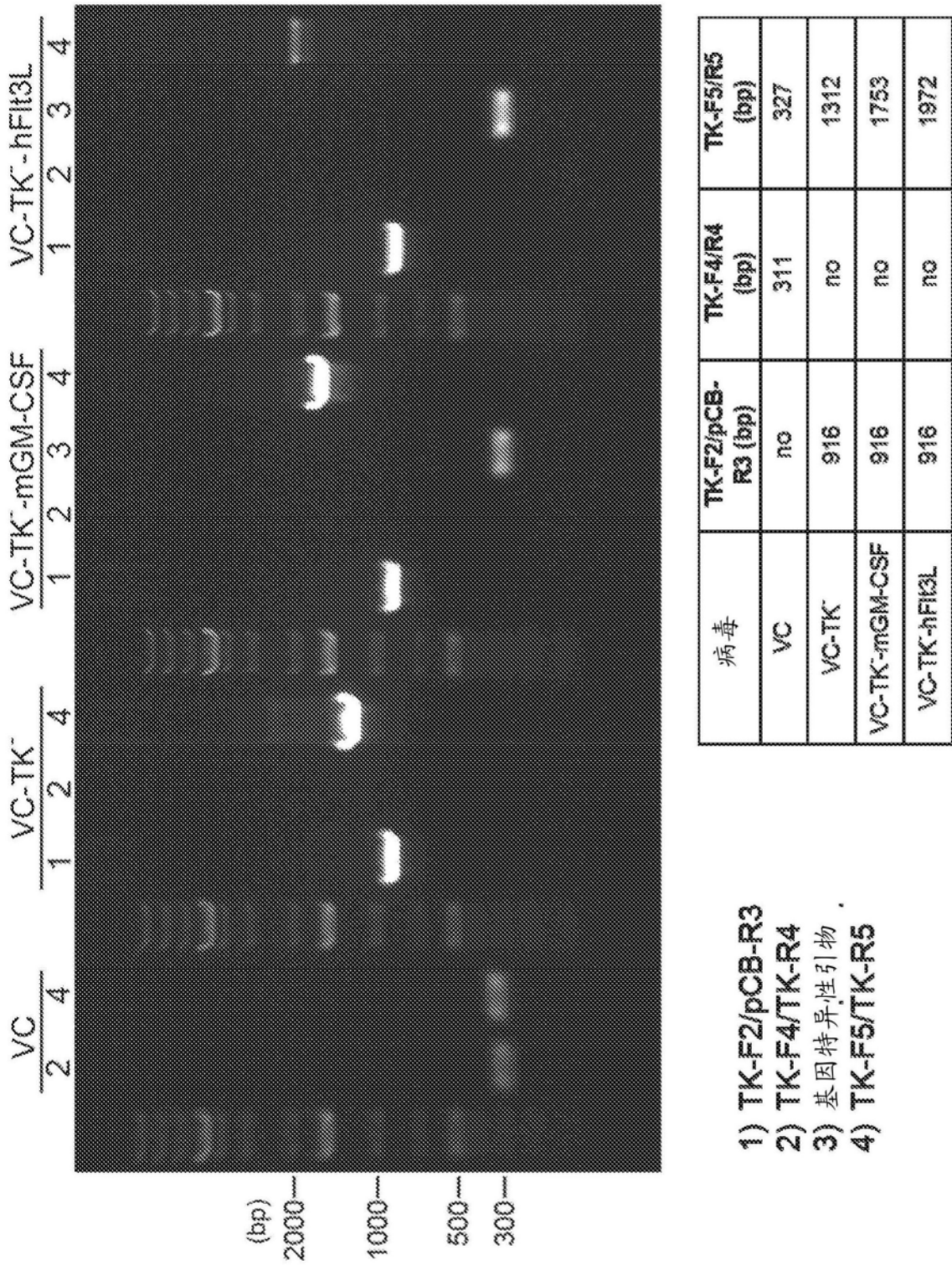


图3

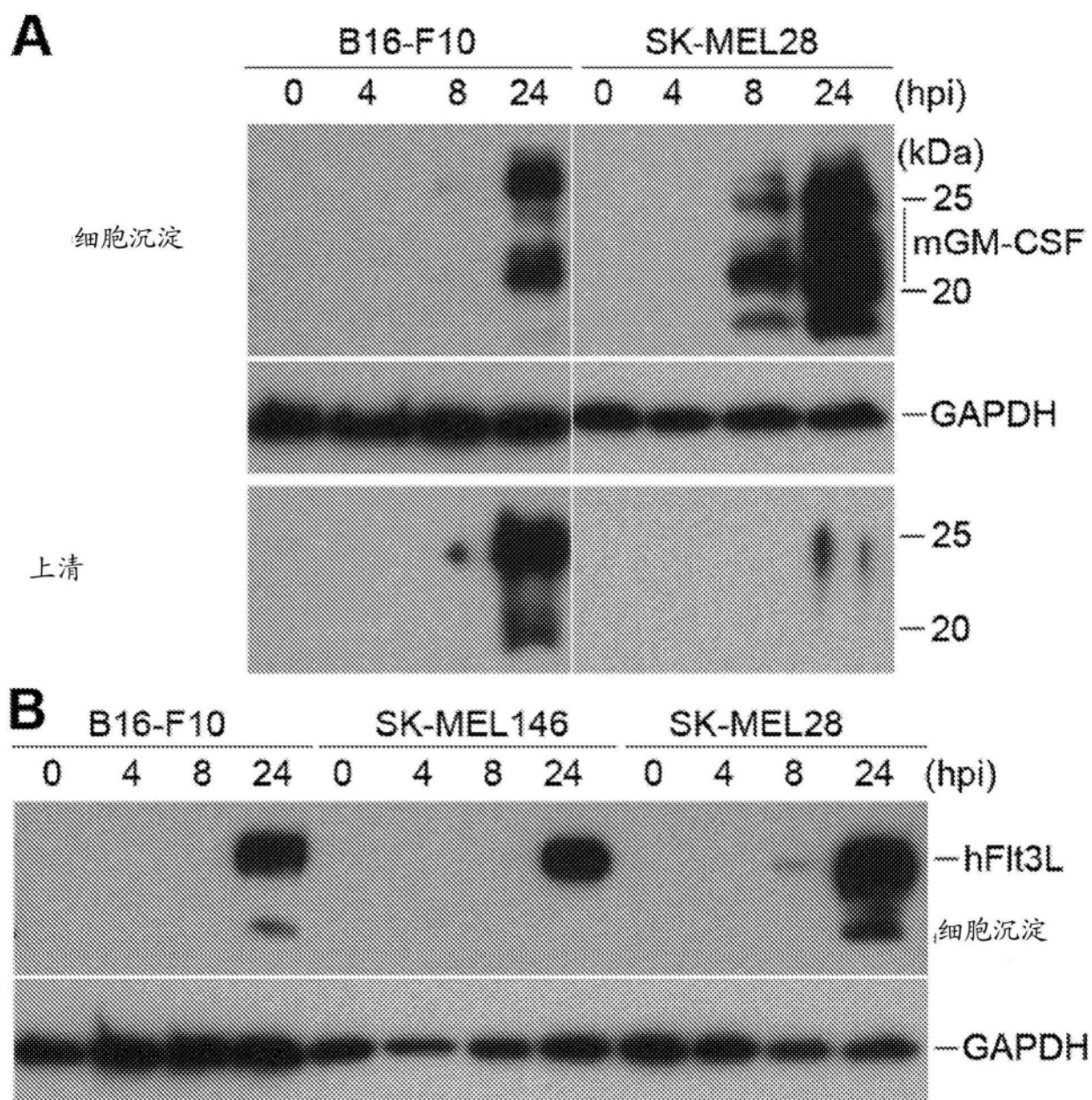


图4

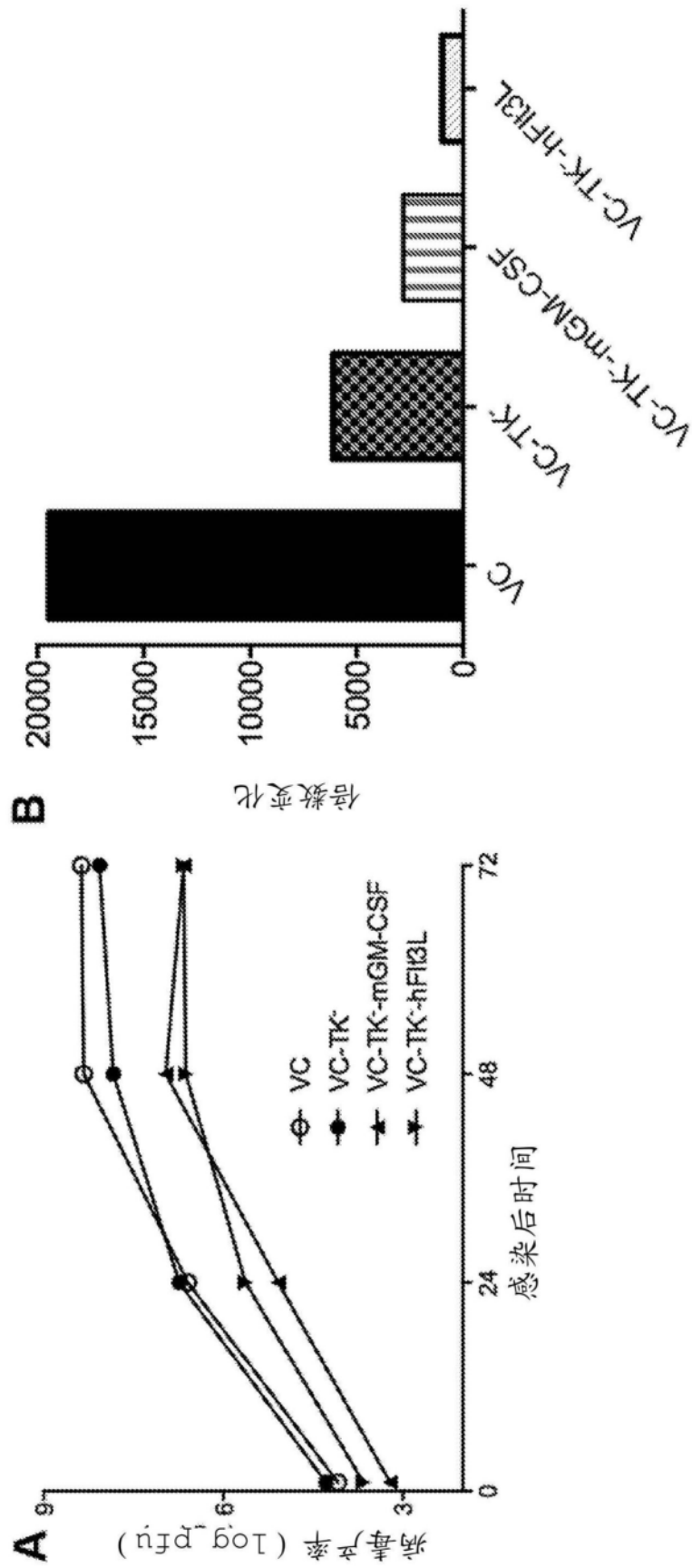


图5

B16-F10黑色素双侧肿瘤移植模型

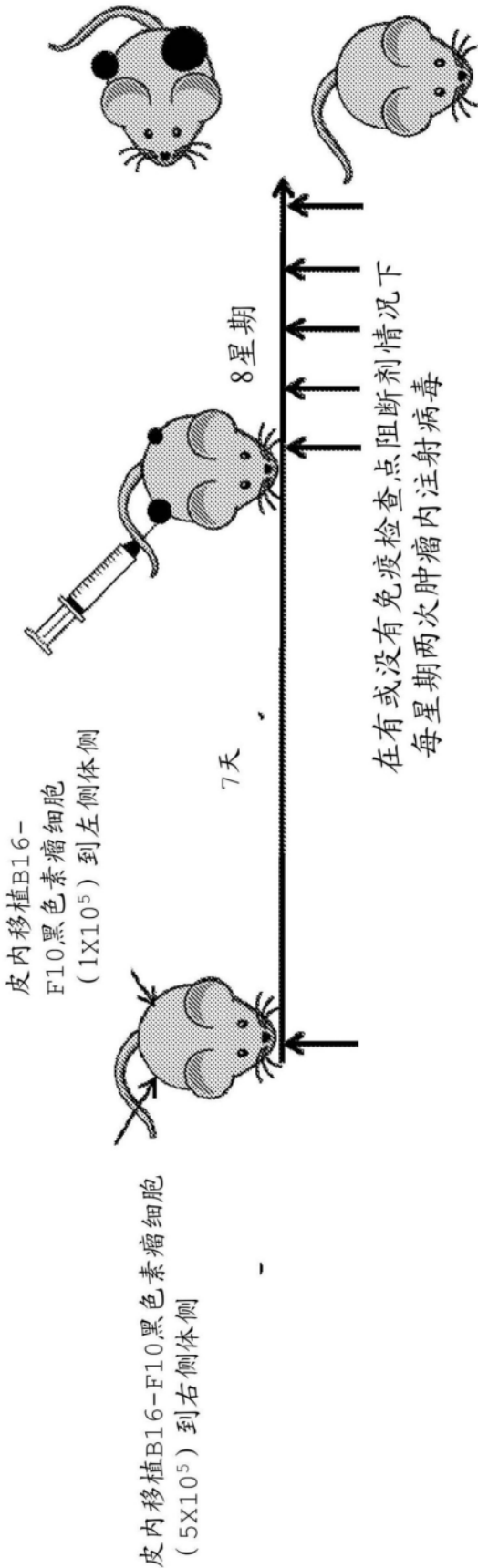
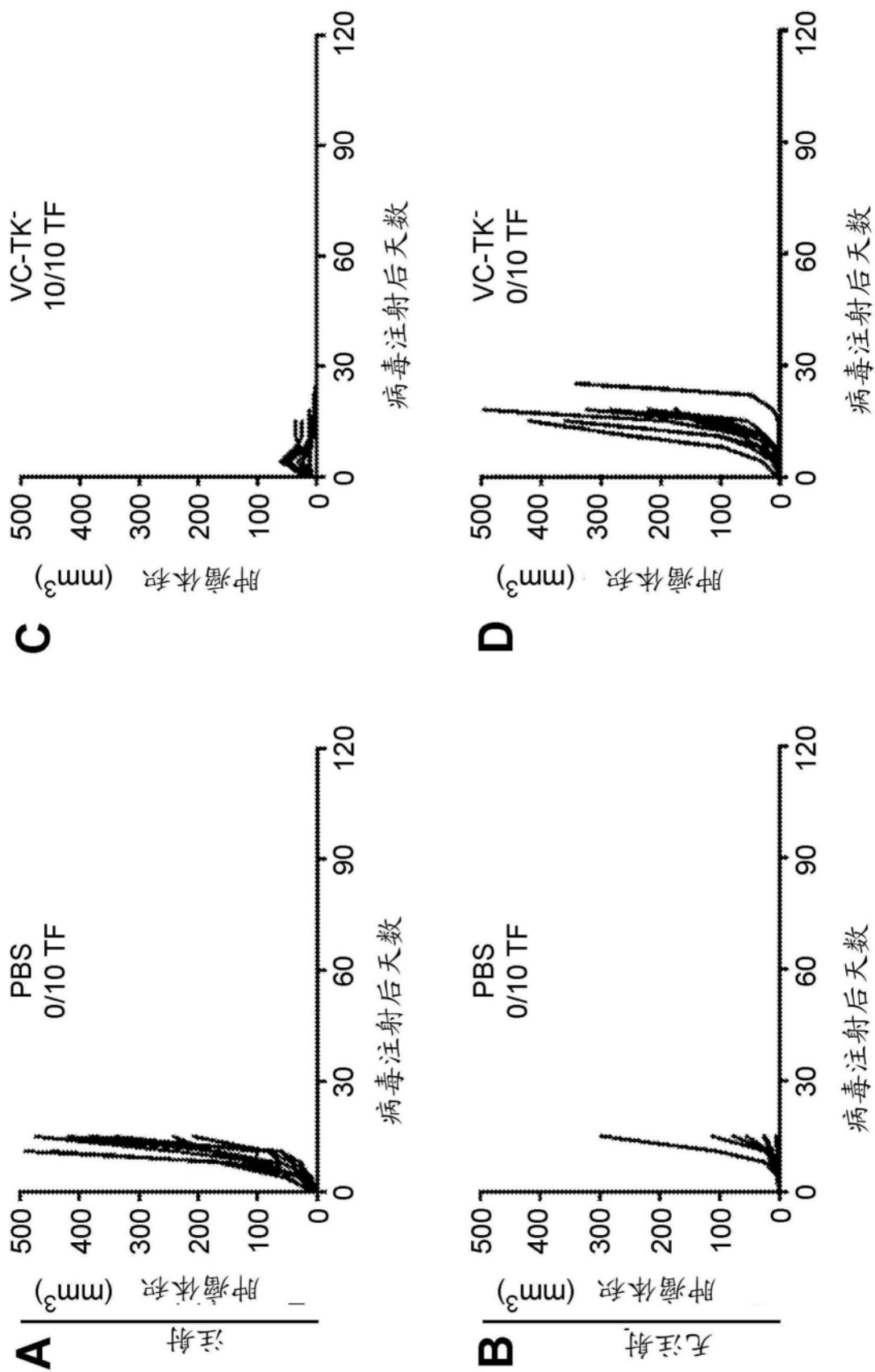
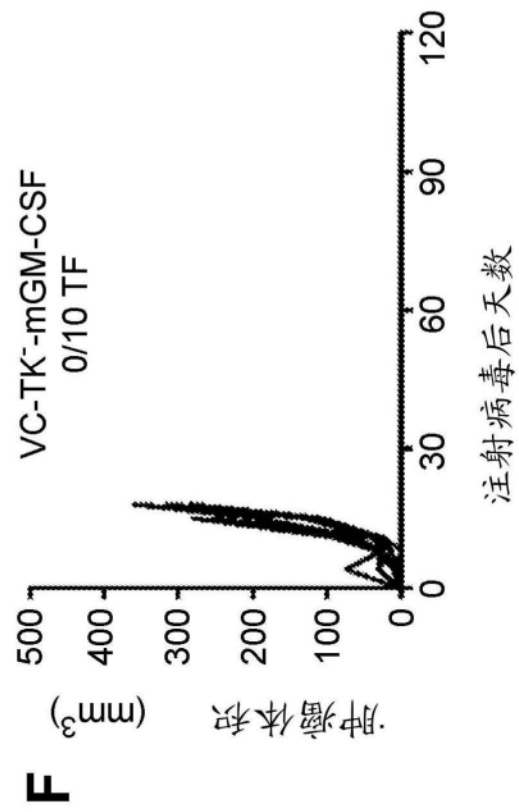
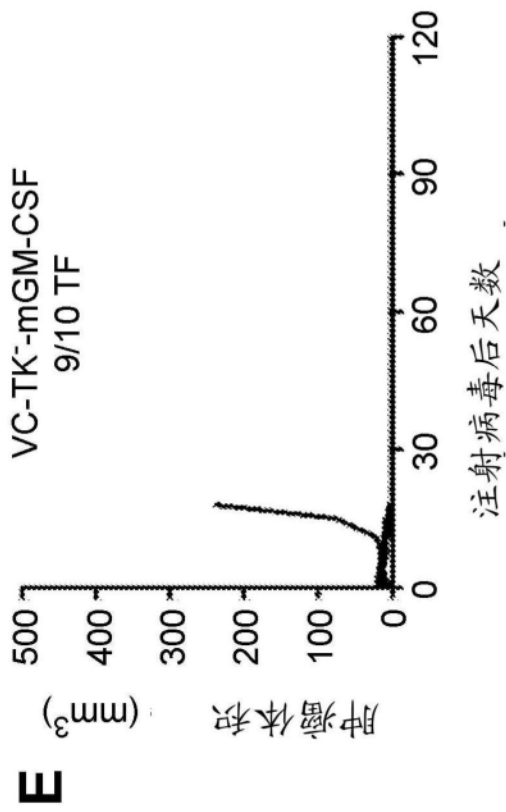
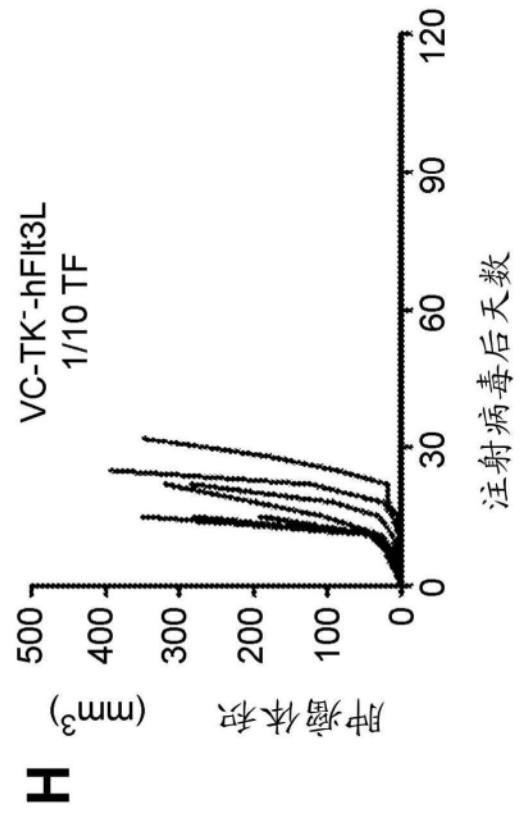
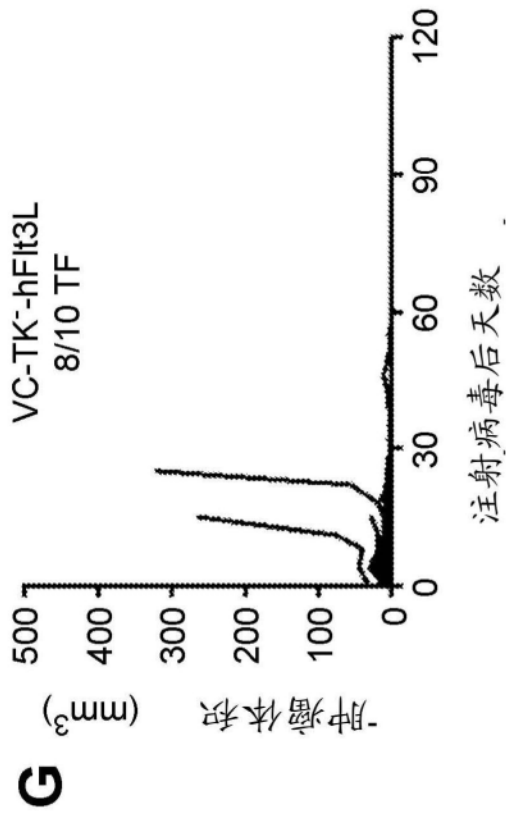
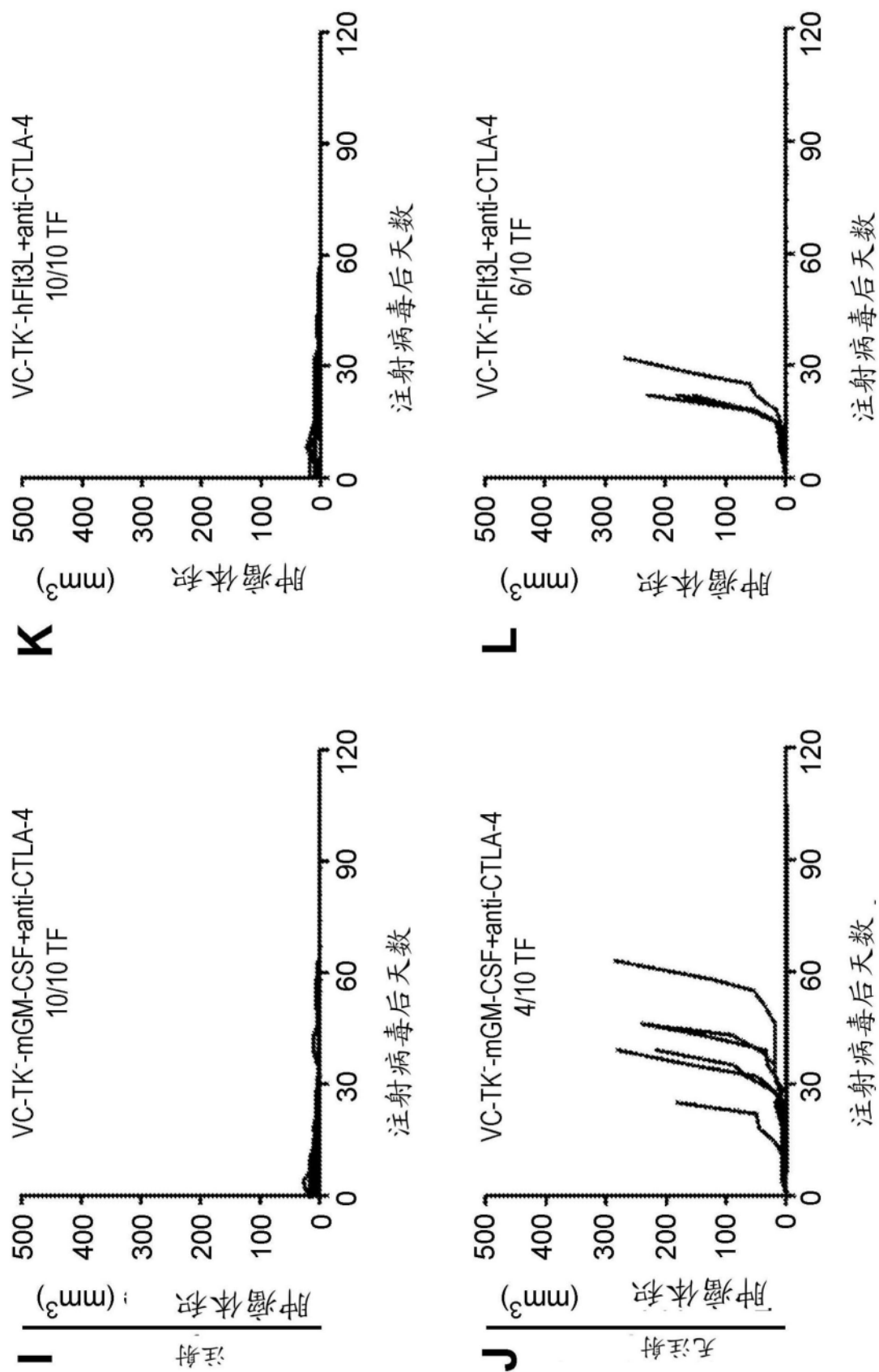


图6







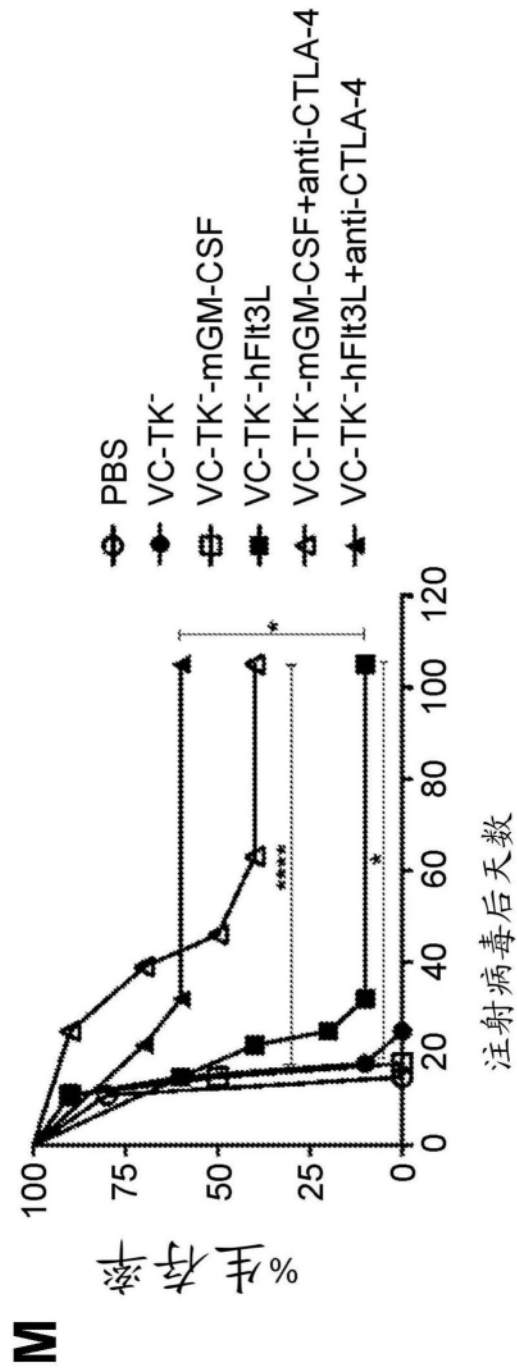
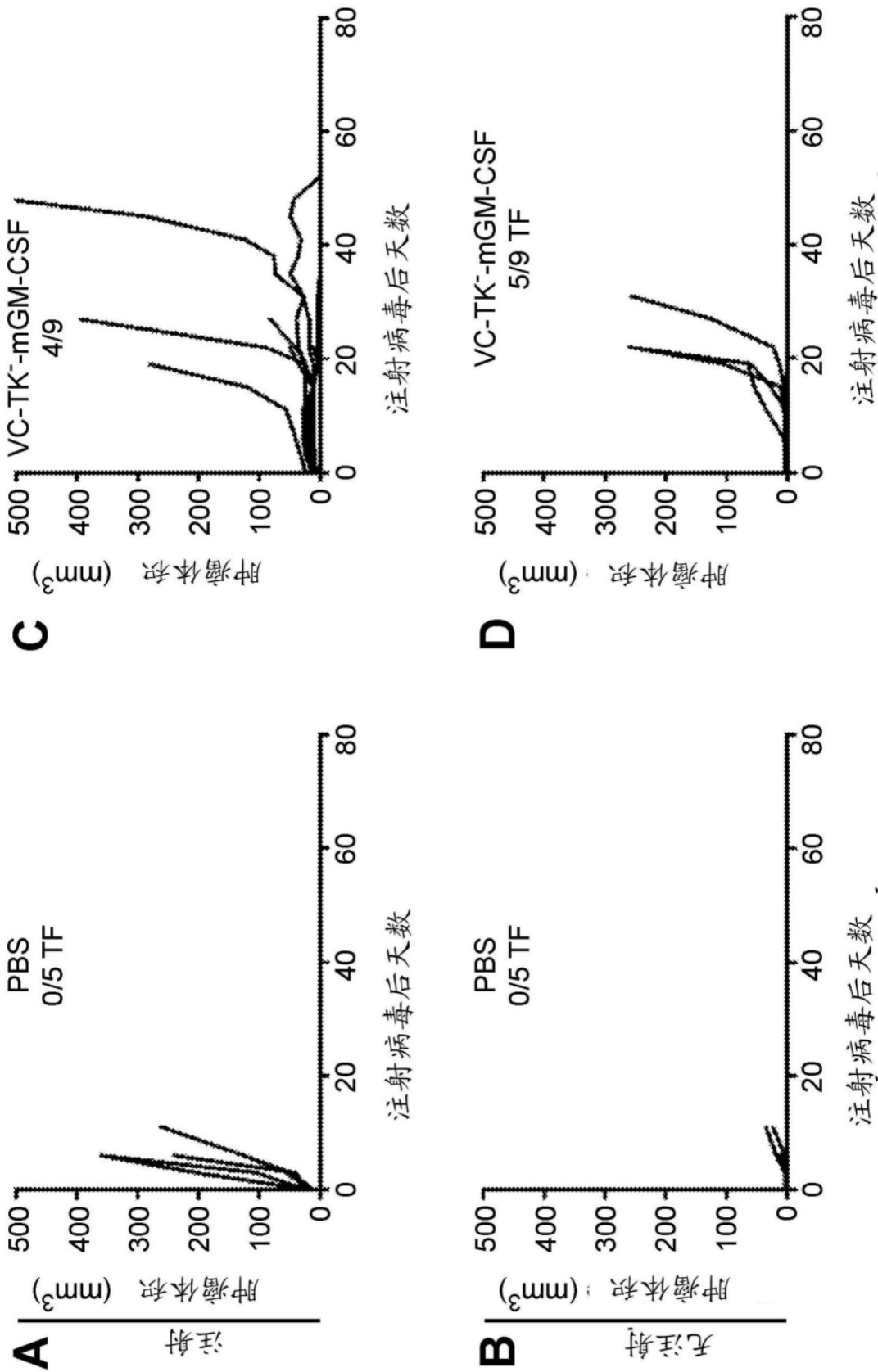
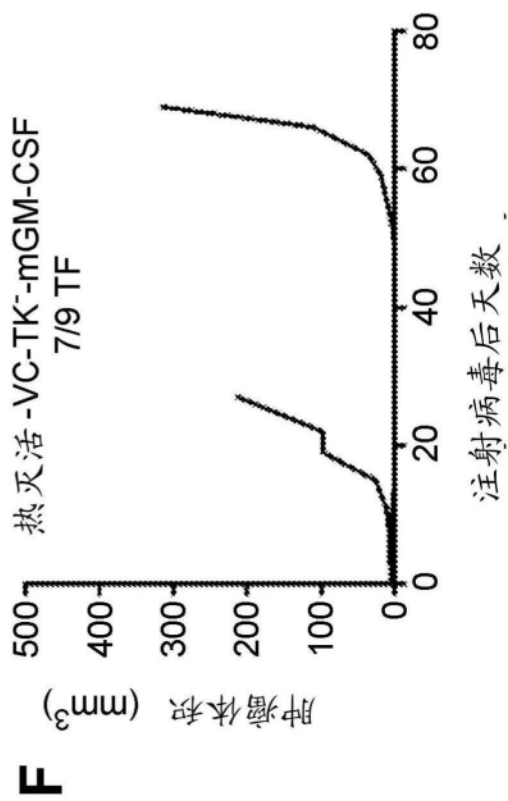
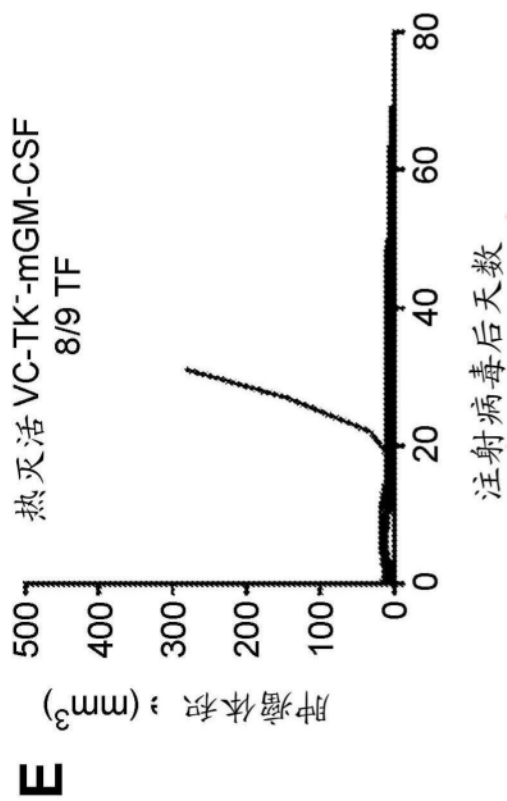
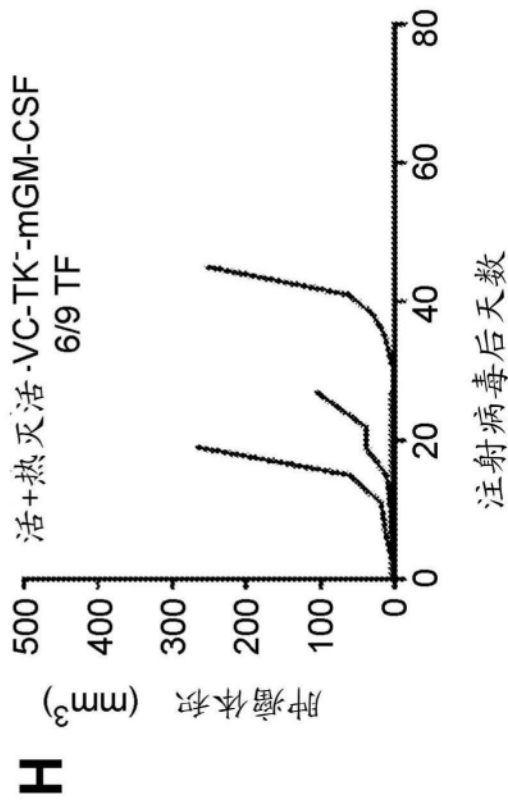
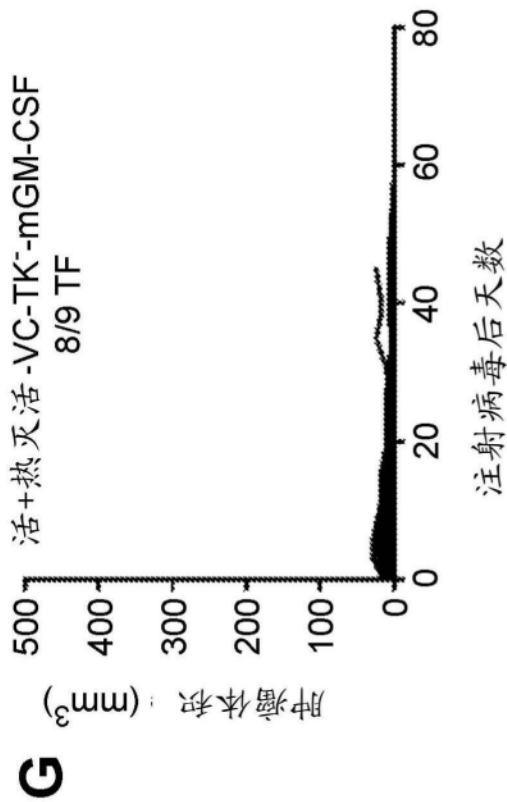
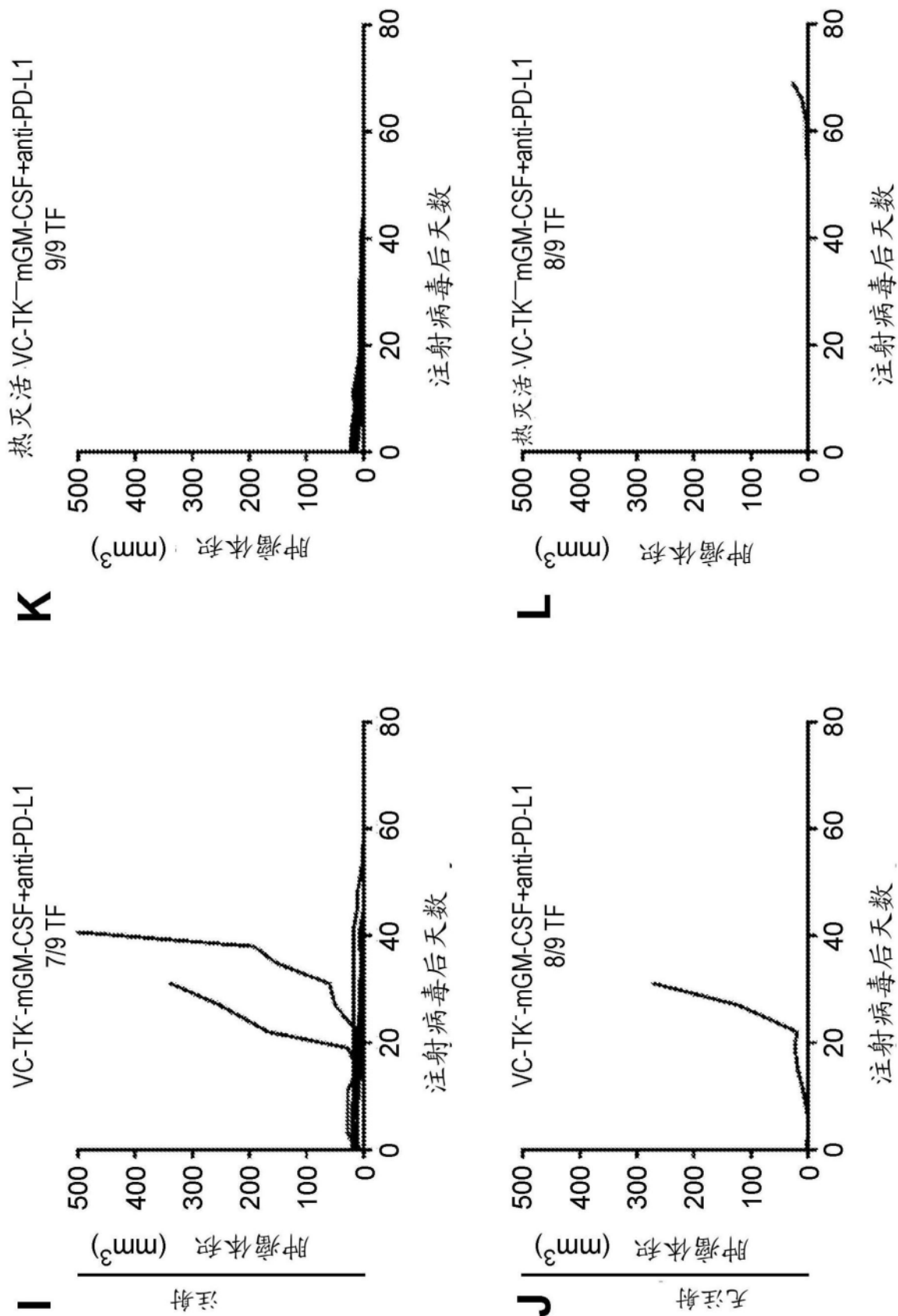


图7







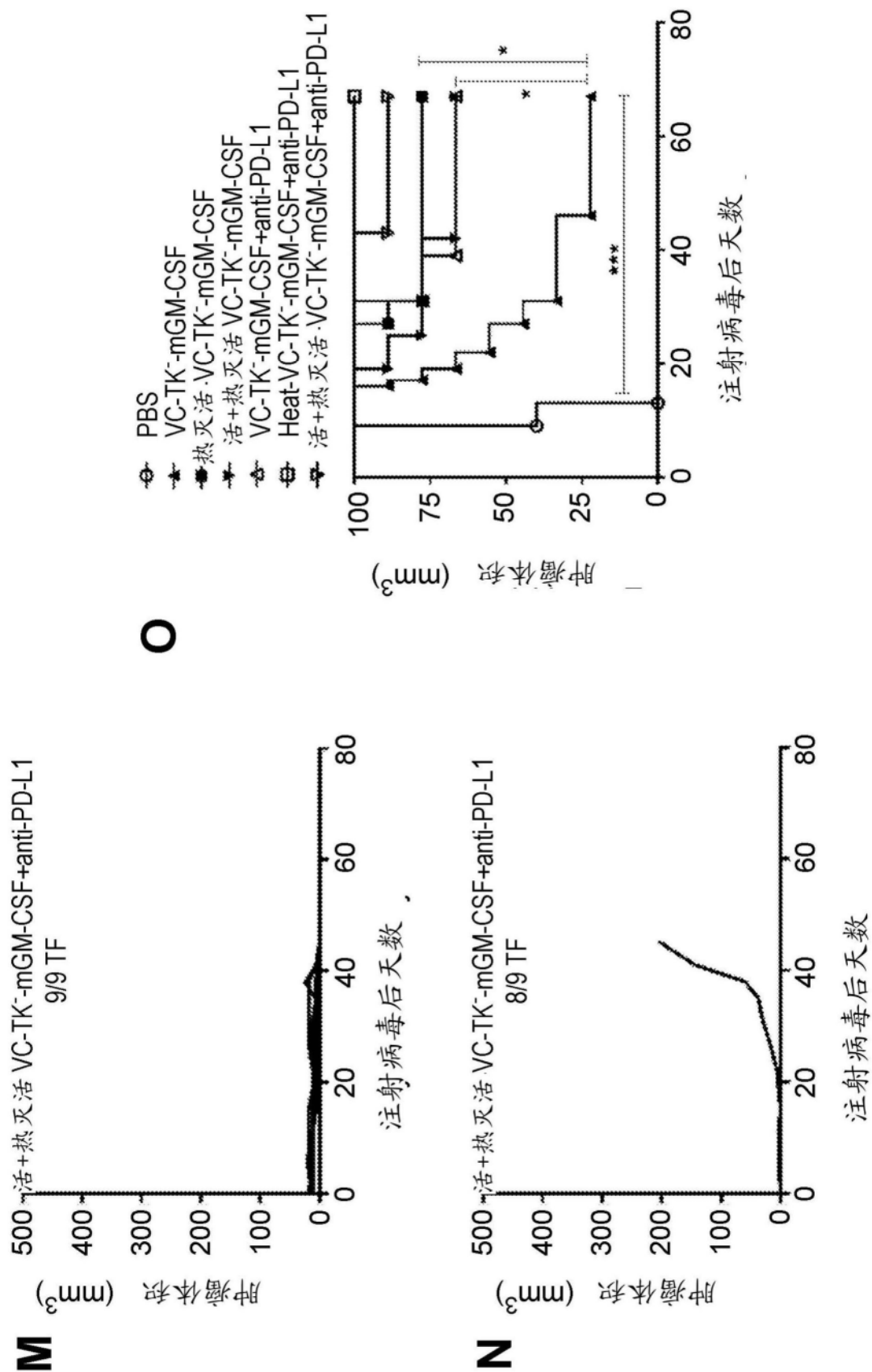


图8

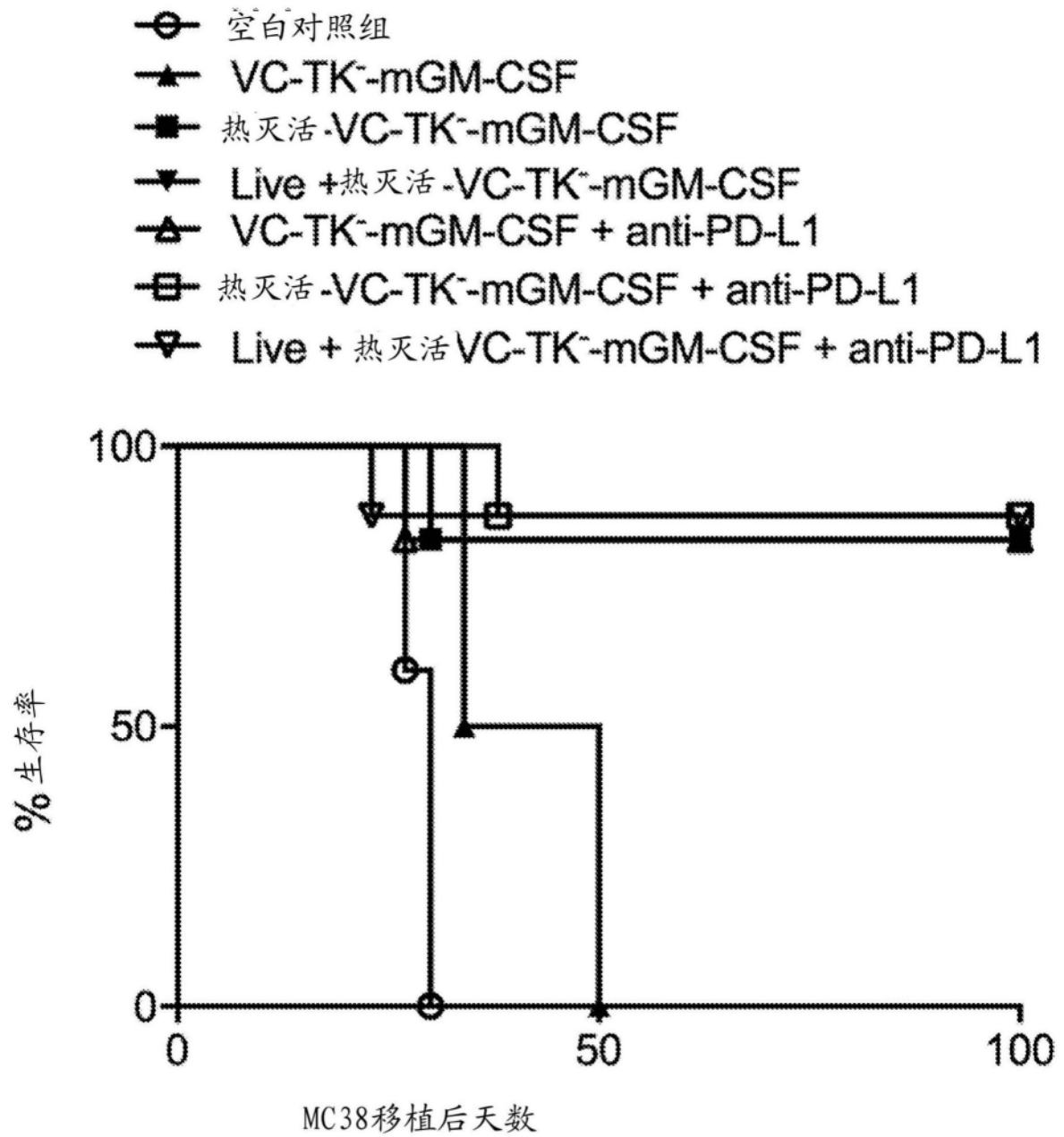
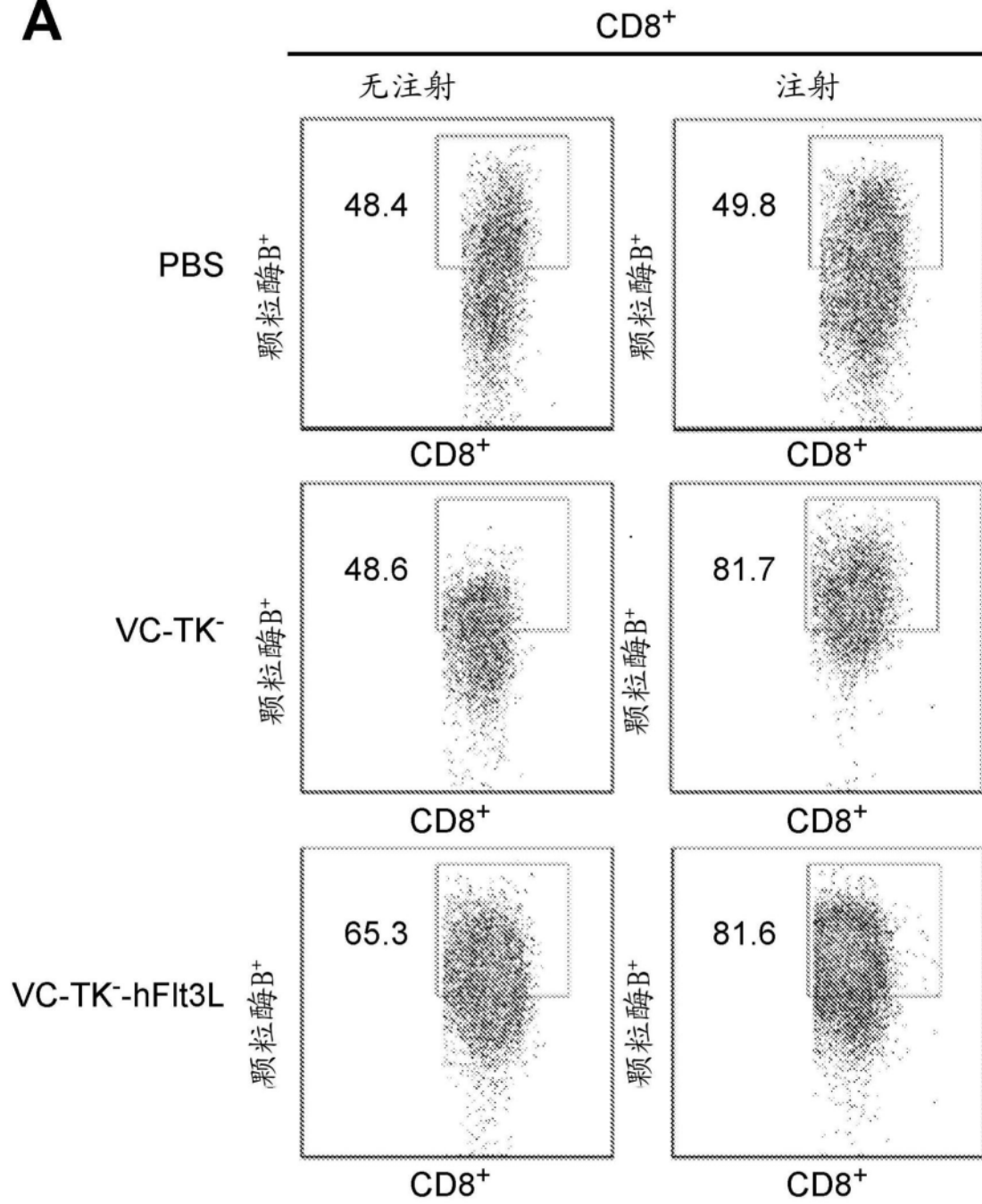
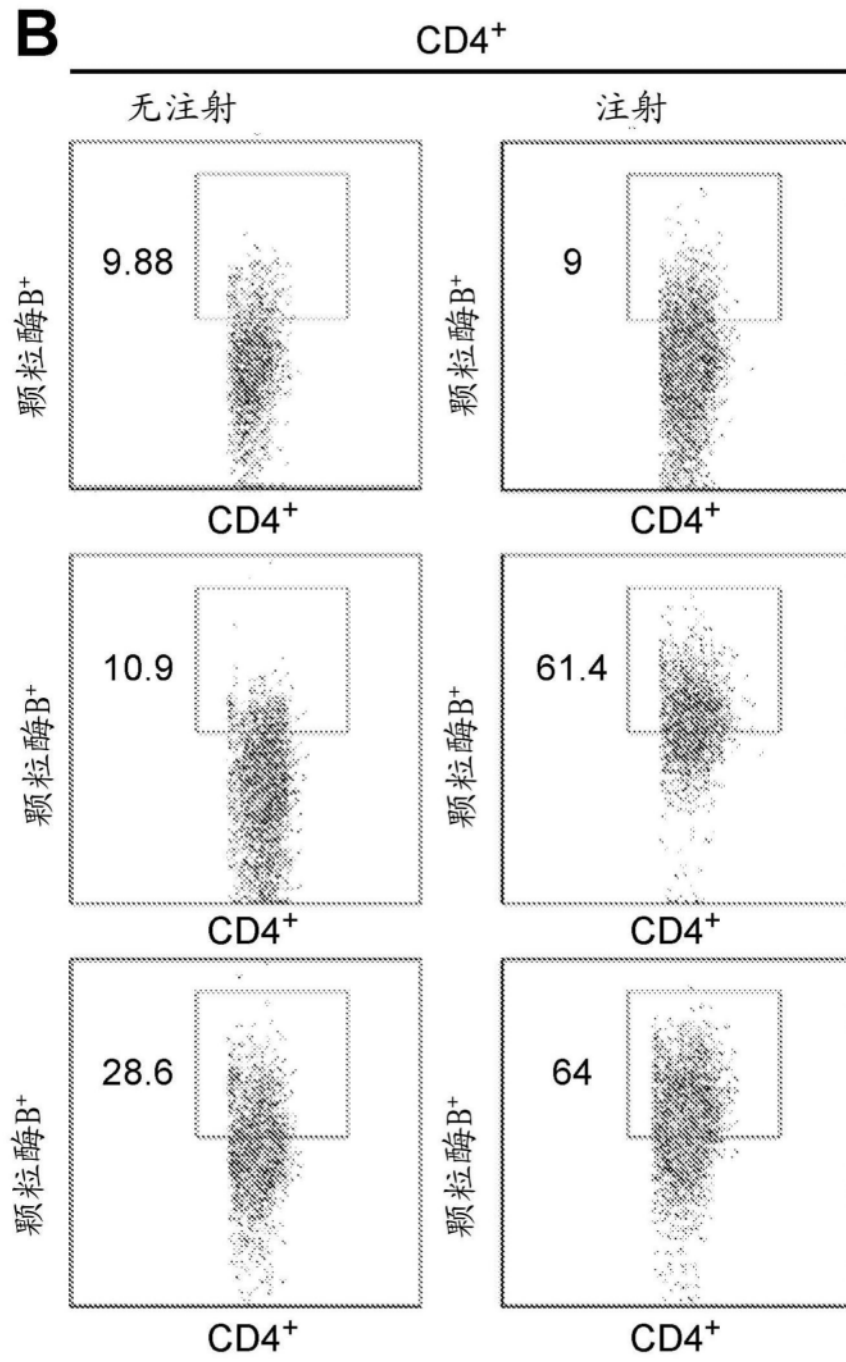


图9

A



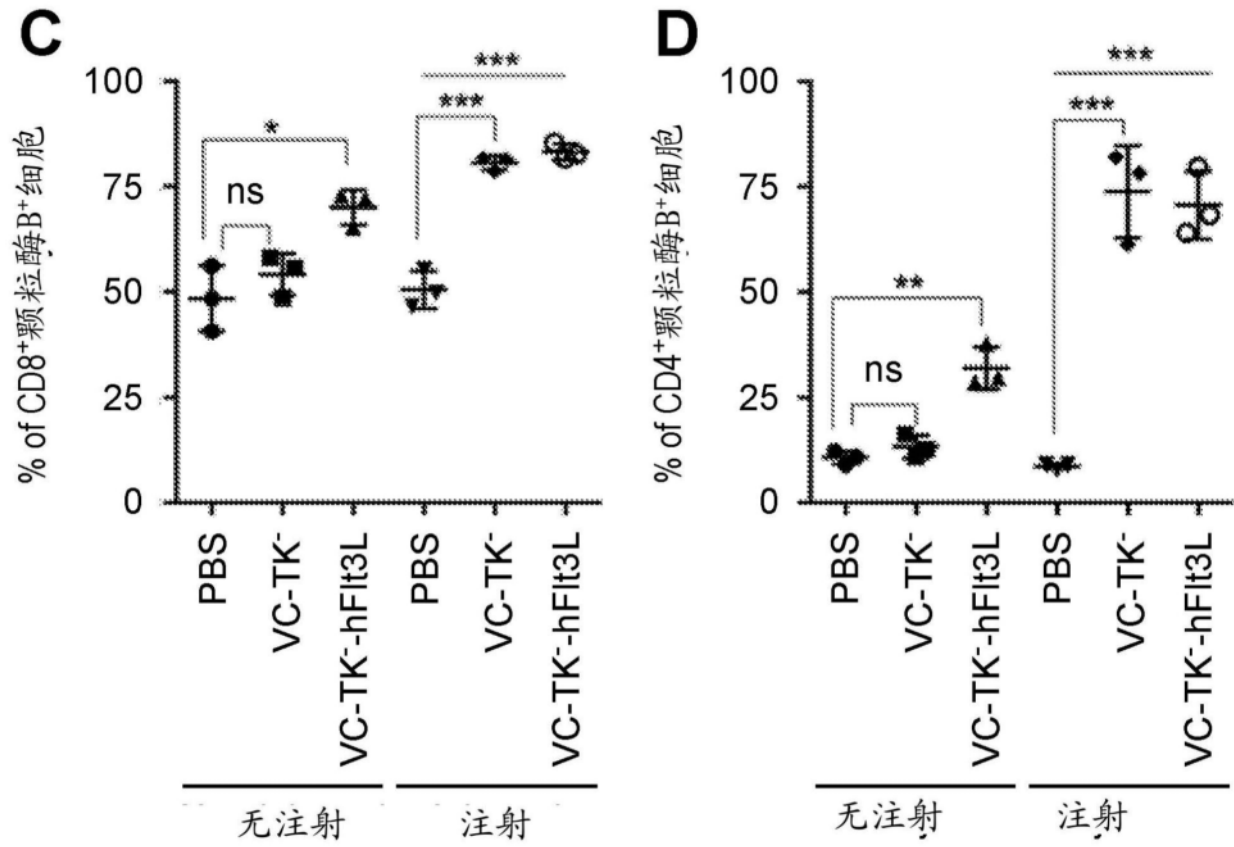


图10

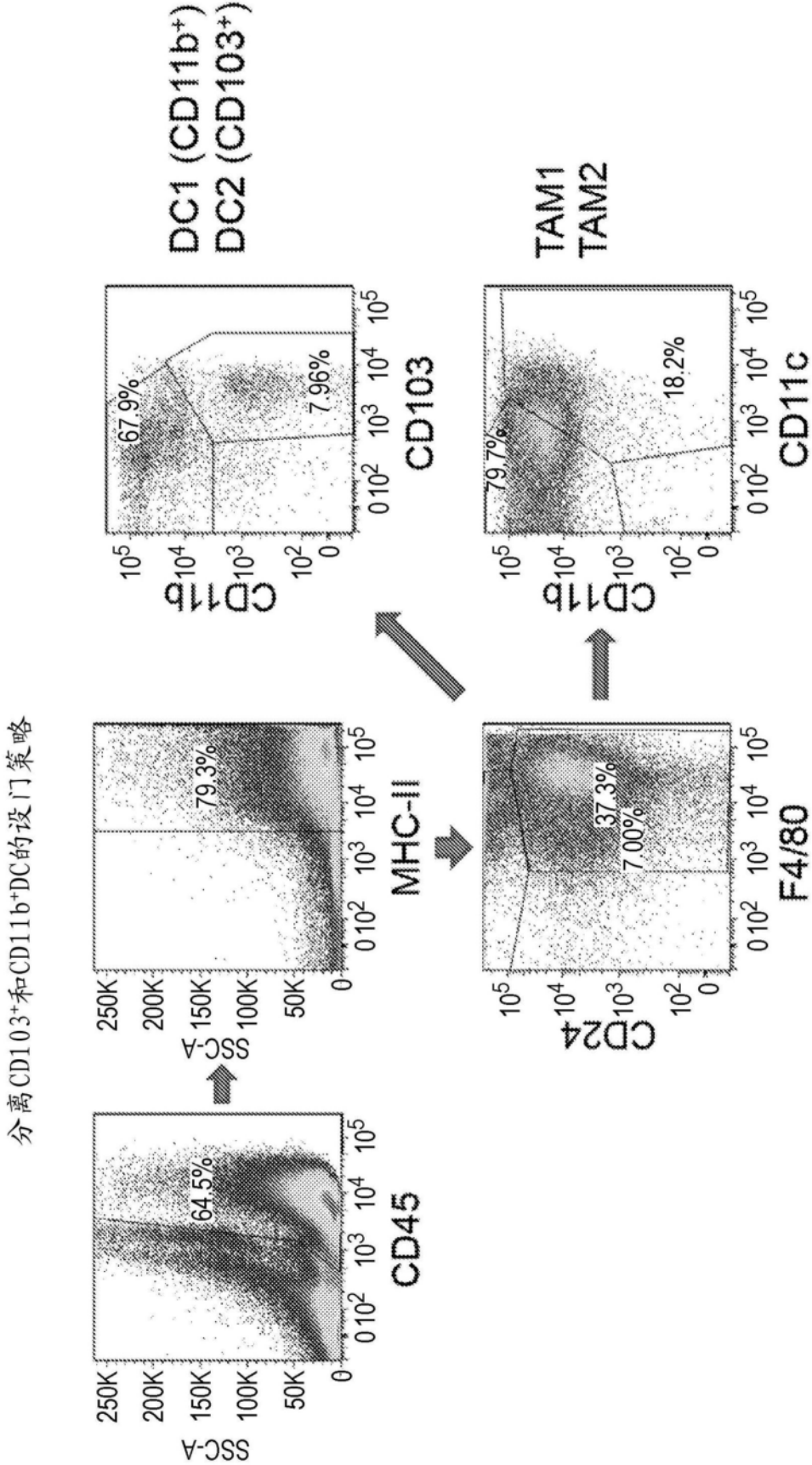


图11

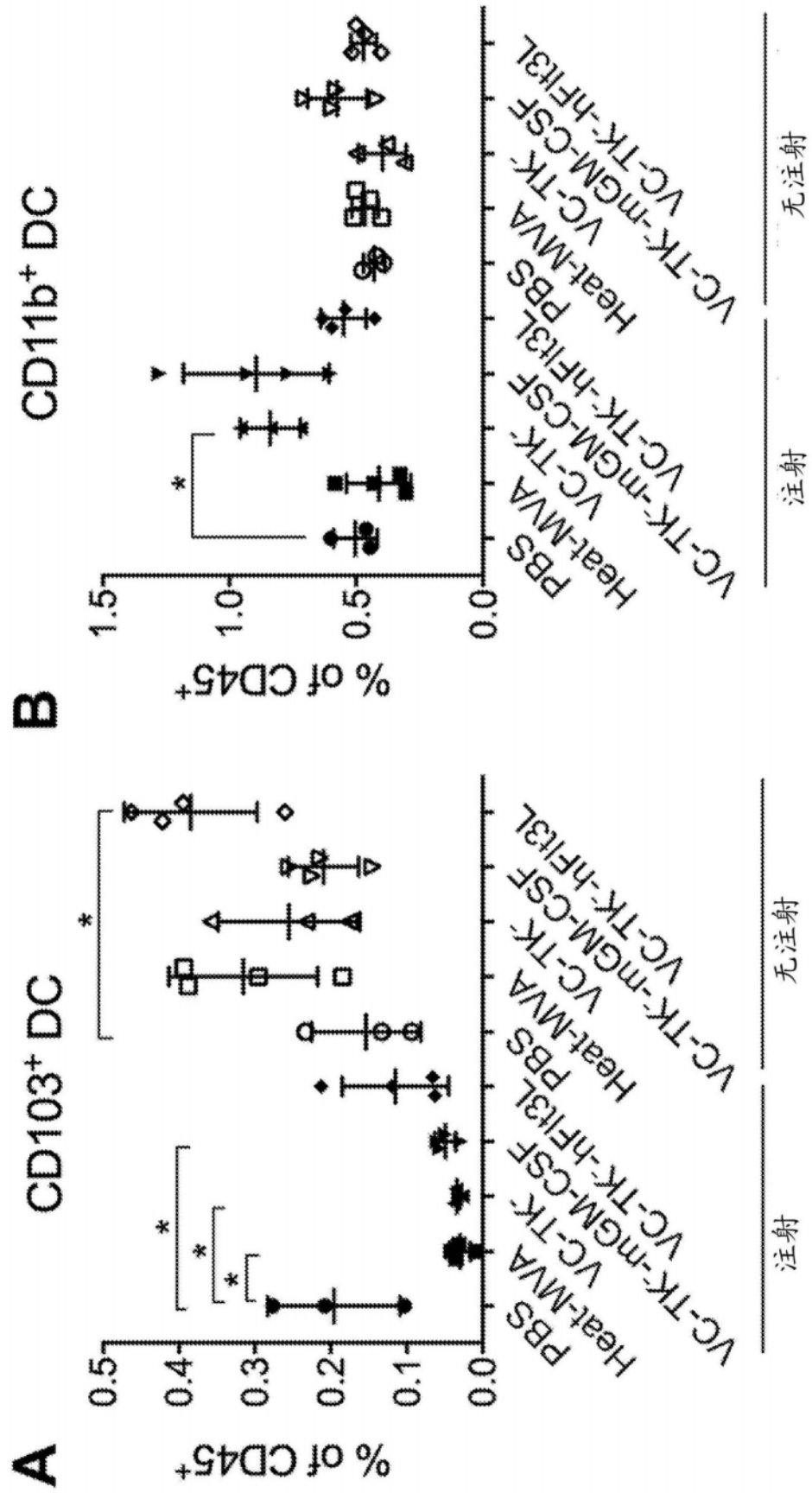


图12

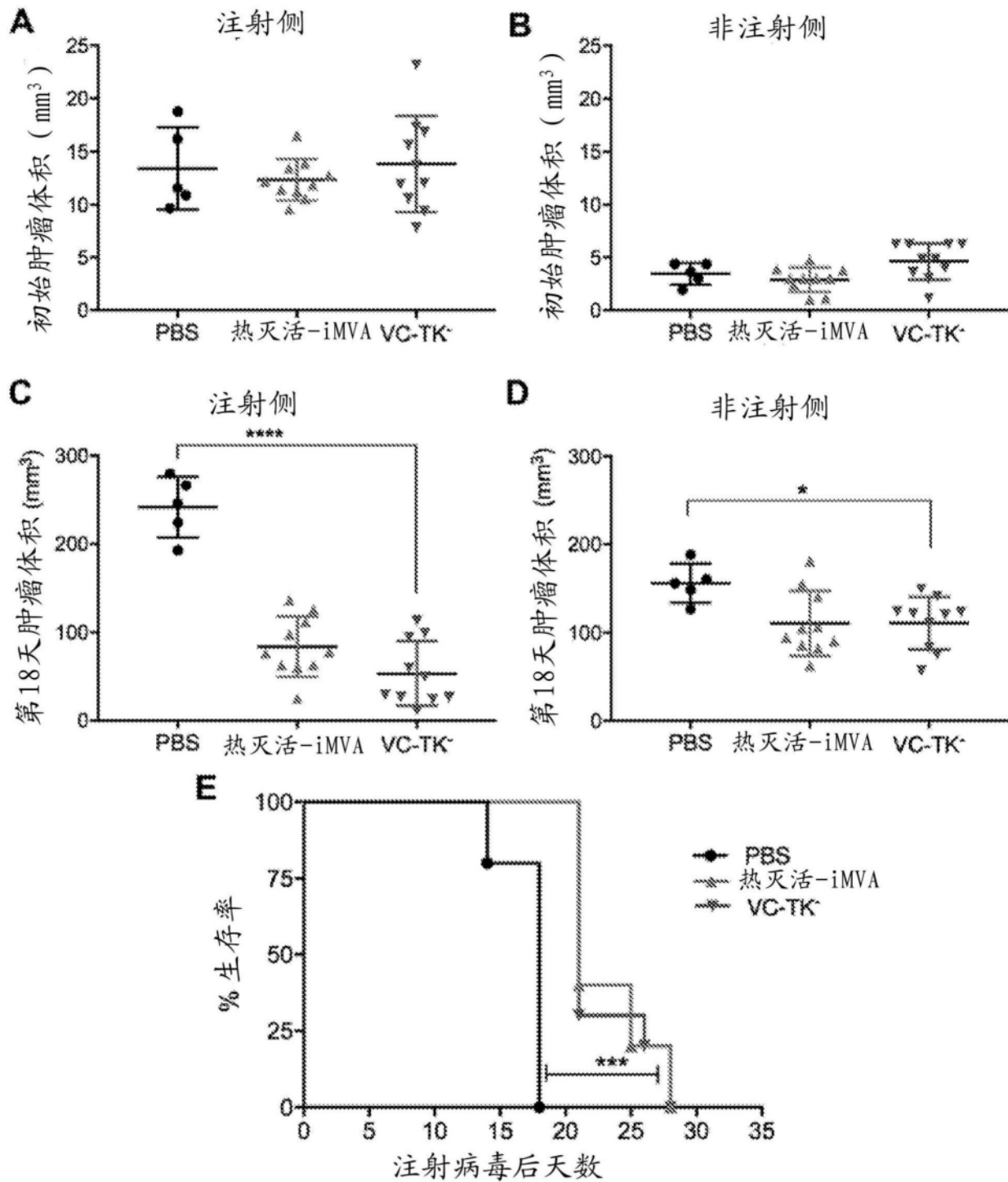
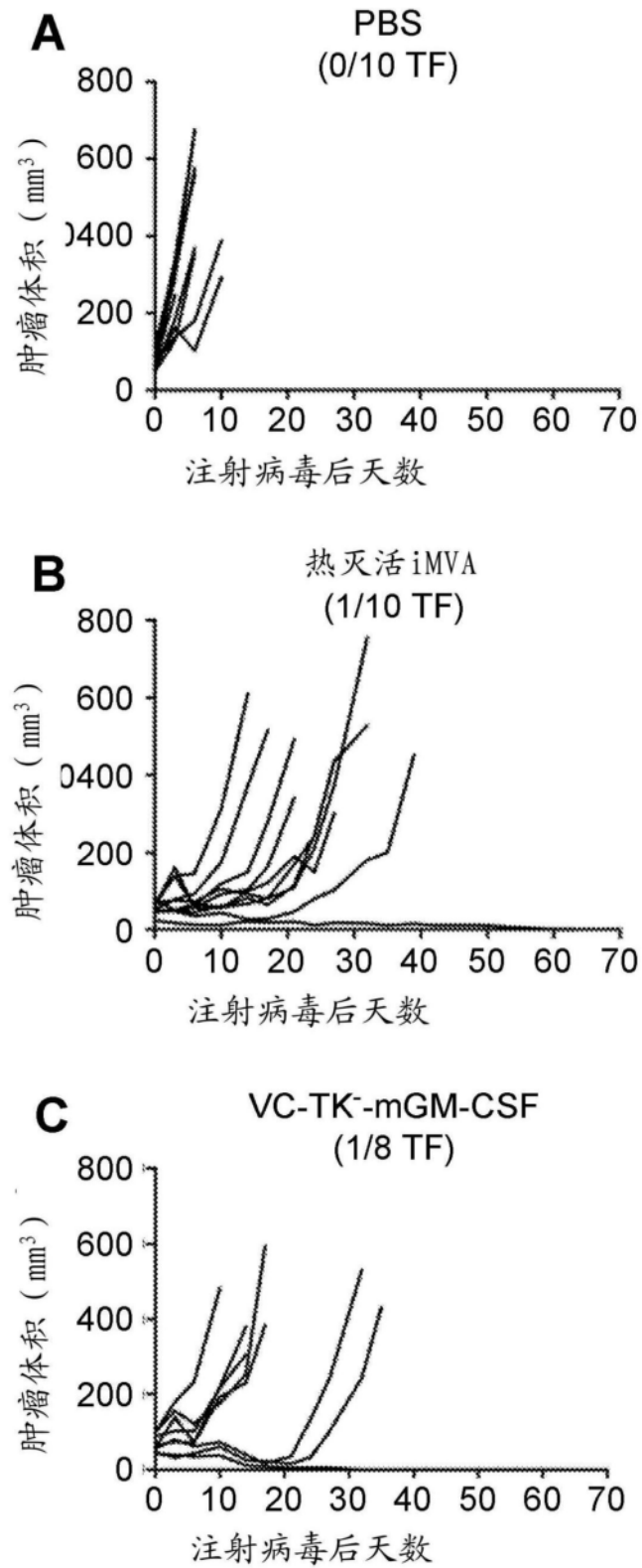
4T1乳腺癌双侧
肿瘤移植模型

图13

单侧建立大B16-F10
黑色素瘤肿瘤



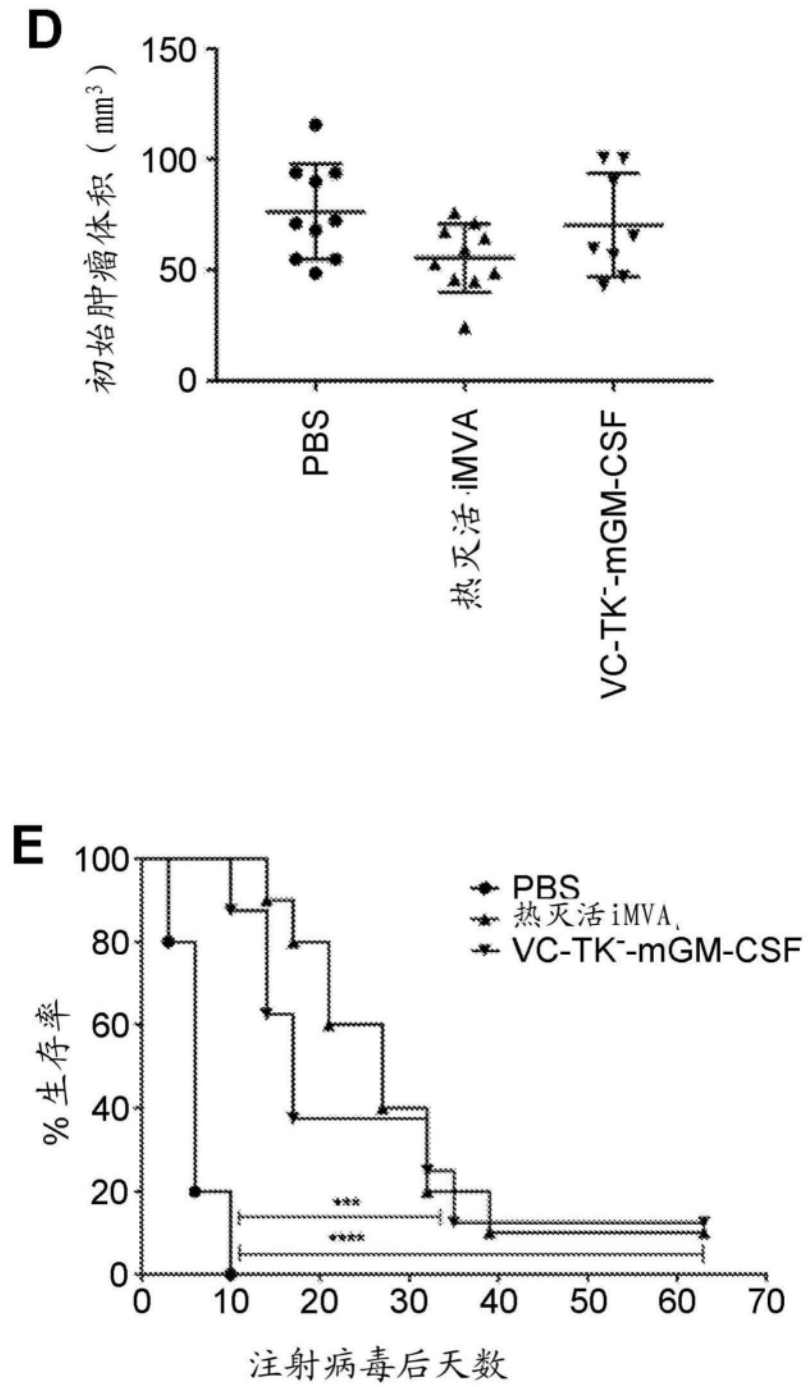


图14