



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110461346 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201880017970.9

(22)申请日 2018.03.14

(30)优先权数据

62/471875 2017.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/022442 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/170133 EN 2018.09.20

(71)申请人 美国安进公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 P.J.贝尔特兰 C.比尔斯 K.库克

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 黄希贵

(51)Int.Cl.

A61K 35/763(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

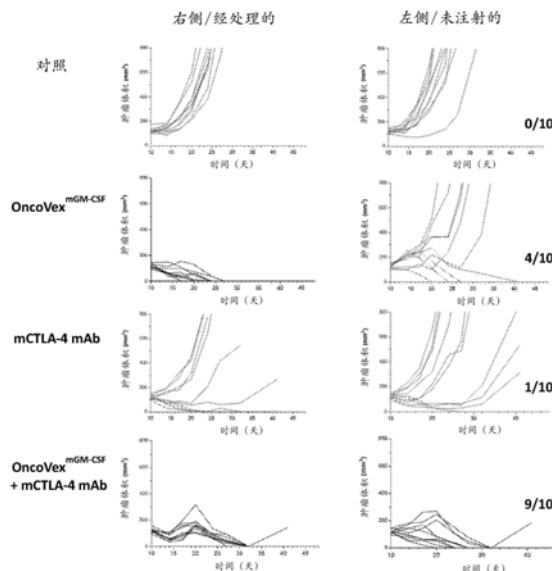
权利要求书1页 说明书37页 附图30页

(54)发明名称

溶瘤病毒单独或与检查点抑制剂组合用于治疗癌症的用途

(57)摘要

本发明涉及溶瘤病毒(例如,拉他莫金)单独或与免疫检查点抑制剂(例如,抗CTLA-4、抗PD-1和抗PD-L1化合物,如抗体)组合用于治疗各种类型的癌症的用途。另外,本发明涉及与溶瘤病毒单独或与免疫检查点抑制剂组合使用的此类用途相关的组合物和试剂盒。



1. 一种通过给予治疗有效量的溶瘤病毒治疗尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤的方法。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述溶瘤病毒是拉他莫金。

4. 一种通过给予以下项治疗B细胞淋巴瘤、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法:

(i) 治疗有效量的溶瘤病毒;和

(ii) 治疗有效量的检查点抑制剂。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述检查点抑制剂是CTLA-4、PD-L1或PD-L1阻断剂。

6. 如权利要求4或5所述的方法,其中所述溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述单纯疱疹病毒是拉他莫金。

8. 一种治疗有效量的溶瘤病毒,用于治疗尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。

9. 一种药物组合物,用于在治疗尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤的方法中使用,其中所述药物组合物包含溶瘤病毒。

10. 如权利要求8或9所述的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。

11. 如权利要求10所述的溶瘤病毒,其中所述单纯疱疹病毒是拉他莫金。

12. 一种治疗有效量的溶瘤病毒和检查点抑制剂,用于治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)。

13. 一种药物组合物,用于在治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法中使用,其中所述药物组合物包含治疗有效量的溶瘤病毒和检查点抑制剂。

14. 如权利要求12或13所述的检查点抑制剂,其中所述检查点抑制剂是CTLA-4、PD-1或PD-L1阻断剂。

15. 如权利要求13或14所述的溶瘤病毒,其中所述溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。

16. 如权利要求15所述的溶瘤病毒,其中所述单纯疱疹病毒是拉他莫金。

溶瘤病毒单独或与检查点抑制剂组合用于治疗癌症的用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请根据35U.S.C.119(e)要求2017年3月15日提交的美国临时专利申请号62/471,875的权益,将其通过引用并入本文。

背景技术

[0002] 鉴于过去几十年癌症疗法的进展,对于最常见的癌症类型如肺癌、结肠癌、乳腺癌和前列腺癌,癌症死亡率在男性和女性中持续下降。存活率的这种提高可能源于在早期诊断某些癌症方面的进步、治疗的改善、以及鼓励预防措施和筛查的公共健康举措的结果。

[0003] 尽管如此,癌症仍然是一个主要的公共健康问题,每年诊断出癌症的有超过160万人。另外,癌症诊断对患者及其家人和朋友都有深远的影响。事实上,癌症仍然是美国第二大常见死亡原因(仅被心脏病超过),并且几乎每四例死亡中就有一例死于癌症。参见progressreport.cancer.gov/introduction;2017年3月8日访问。

[0004] 癌症疗法的期望目标是优先杀死癌细胞而不对正常细胞产生有害作用。已经使用了几种方法来企图实现此目标,包括手术、放射疗法、化学疗法和采用溶瘤病毒的疗法。

[0005] 局部治疗(如放射疗法和手术)提供了一种减少身体部位中肿瘤块的方法,所述身体部位可通过手术技术或高剂量放射疗法进入。然而,癌症治疗的主要方法是化学疗法。但是化学治疗剂在其用于治疗许多癌症类型(包括许多常见的实体瘤)的有效性方面受到限制。这种失败部分是由于许多肿瘤细胞的耐药性(无论是获得的还是固有的)。使用化学治疗剂的严重缺点是其严重的副作用。这些副作用包括骨髓抑制、恶心、呕吐、脱发和口腔溃疡。

[0006] 提出的替代疗法包括溶瘤病毒的给予以及使用病毒载体递送具有抗癌活性的转基因。用作溶瘤剂的病毒的基因工程最初集中于不能复制的病毒的使用,以防止病毒诱导的对非肿瘤细胞的损害。这种方法的主要限制是这些不能复制的病毒需要辅助病毒以便能够在宿主细胞中整合和/或复制。这些病毒在其有效性方面受到限制,因为每个复制缺陷型逆转录病毒粒子只能进入单个细胞,并且此后不能有成效地感染其他细胞。因此,它们不能远离生产细胞而传播,并且不能完全渗透体内的许多肿瘤。最近,溶瘤病毒的基因工程已经集中于“复制条件”病毒的生成,以试图避免全身感染,同时允许病毒传播到其他肿瘤细胞。

[0007] 目前,在美国和欧洲唯一批准的基于溶瘤病毒的药物是拉他莫金(talimogene laherparepvec, **IMLYGIC**[®])。拉他莫金是衍生自临床毒株JS1的HSV-1(保藏于欧洲细胞培养物保藏中心(European collection of cell cultures, ECAAC),保藏号01010209)。在拉他莫金中,编码ICP34.5和ICP47的HSV-1病毒基因已在功能上缺失。ICP47的功能性缺失导致US11的较早表达,US11是促进肿瘤细胞中病毒生长而不降低肿瘤选择性的基因。另外,人GM-CSF的编码序列已插入病毒基因组中的前者ICP34.5基因位点处。参见Liu等人, Gene Ther. [基因疗法], 10:292-303, 2003。

[0008] 已经探索了溶瘤病毒和检查点抑制剂的治疗性组合。例如,目前正在黑色素瘤(NCT01740297和NCT02263508)和头颈部鳞状细胞癌(NCT02626000)的临床试验中研究拉他

莫金和免疫疗法(例如伊匹单抗和派姆单抗)的组合。检查点抑制剂如伊匹单抗(CTLA-4抗体)、派姆单抗和纳武单抗(抗PD-1抗体)和阿特殊单抗(抗PD-L1抗体)已经在多种肿瘤类型中显示出功效。参见Grosso等人,Cancer Immun.[癌症免疫],13:5(2013);Pardoll,Nat Rev Cancer[自然癌症评论],12:252-264(2012);和Chen等人,Immunity[免疫力],39:1-10(2013)。

[0009] 然而,仍然需要进一步开发具有减少的副作用(例如,与化学疗法相比)的有效癌症疗法。还需要进一步开发有效针对转移性癌症的有效癌症疗法。本发明解决这些和其他需求。

发明内容

[0010] 在一个实施例中,本发明涉及通过给予治疗有效量的溶瘤病毒治疗尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌(即,结肠癌)、黑色素瘤、鳞状细胞癌(例如,头颈部鳞状细胞癌)、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤的方法。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。在一些实施例中,该溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。该单纯疱疹病毒可以是单纯疱疹病毒1。在一些实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因。还可以修饰该单纯疱疹病毒1,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;和(ii)其不含有完整的ICP47基因。在又其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;(ii)其不含有完整的ICP47基因;和(iii)其含有编码GM-CSF(例如人GM-CSF)的基因。在特定实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0011] 本发明还涉及通过给予以下项治疗B细胞淋巴瘤、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法:(i)治疗有效量的溶瘤病毒;和(ii)治疗有效量的检查点抑制剂。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。在一些实施例中,该检查点抑制剂是CTLA-4阻断剂(例如,抗CTLA-4抗体)。在特定实施例中,该抗CTLA-4抗体是伊匹单抗。在一些实施例中,该检查点抑制剂是PD-L1阻断剂(例如,抗PD-L1抗体)。在特定实施例中,该抗PD-L1抗体是阿特殊单抗。在一些实施例中,该检查点抑制剂是PD-1阻断剂(例如,抗PD-1抗体)。在特定实施例中,该抗PD-1抗体是:纳武单抗或派姆单抗。在一些实施例中,该溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。该单纯疱疹病毒可以是单纯疱疹病毒1。在一些实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因。还可以修饰该单纯疱疹病毒1,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;和(ii)其不含有完整的ICP47基因。在又其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;(ii)其不含有完整的ICP47基因;和(iii)其含有编码GM-CSF(例如人GM-CSF)的基因。在特定实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0012] 在具体实施例中,本发明还涉及通过给予以下项治疗B细胞淋巴瘤、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法:(i)治疗有效量的溶瘤病毒(例如,拉他莫金);和(ii)治疗有效量的CTLA-4阻断剂(例如,抗CTLA-4抗体如伊匹单抗)。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。在另一个实施例中,本发明涉及通过给予以下项治疗B细胞淋巴瘤、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)

癌)的方法:(i)治疗有效量的溶瘤病毒(例如,拉他莫金);和(ii)治疗有效量的PD-L1阻断剂(例如,抗PD-L1抗体如阿特殊单抗)。在其他实施例中,本发明涉及通过给予以下项治疗B细胞淋巴瘤、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法:(i)治疗有效量的溶瘤病毒(例如,拉他莫金);和(ii)治疗有效量的PD-1阻断剂(例如,抗PD-1抗体如纳武单抗或派姆单抗)。

[0013] 本发明还涉及通过给予以下项治疗B细胞淋巴瘤的方法:(i)治疗有效量的溶瘤病毒;和(ii)治疗有效量的GITR激动剂。在一些实施例中,该癌症是转移性B细胞淋巴瘤。在特定实施例中,该GITR激动剂是:AMG 228(也称为9H6v3)、TRX518、MEDI1873或MK-4166。参见PCT公开号W0 2015031667和美国专利号US 9,464,139,这两篇文献都通过引用以其全文特此并入。在一些实施例中,该溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。该单纯疱疹病毒可以是单纯疱疹病毒1。在一些实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因。还可以修饰该单纯疱疹病毒1,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;和(ii)其不含有完整的ICP47基因。在又其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;(ii)其不含有完整的ICP47基因;和(iii)其含有编码GM-CSF(例如人GM-CSF)的基因。在特定实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0014] 本发明进一步涉及治疗有效量的溶瘤病毒,用于治疗尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。在又一个方面,本发明涉及药物组合物,用于在治疗尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤的方法中使用,其中该药物组合物包含溶瘤病毒。在此类实施例中,该溶瘤病毒可以是单纯疱疹病毒。该单纯疱疹病毒可以是单纯疱疹病毒1。在一些实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因。在其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;和(ii)其不含有完整的ICP47基因。在又其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;(ii)其不含有完整的ICP47基因;和(iii)其含有编码GM-CSF(例如人GM-CSF)的基因。在特定实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0015] 在其他方面,本发明涉及治疗有效量的溶瘤病毒和检查点抑制剂,用于治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。在另一个实施例中,本发明涉及药物组合物,用于在治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法中使用,其中该药物组合物包含治疗有效量的溶瘤病毒和检查点抑制剂。在此类实施例中,该检查点抑制剂是CTLA-4阻断剂(例如,抗CTLA-4抗体)。在特定实施例中,该抗CTLA-4抗体是伊匹单抗。在一些实施例中,该检查点抑制剂是PD-L1阻断剂(例如,抗PD-L1抗体)。在特定实施例中,该抗PD-L1抗体是阿特殊单抗。在一些实施例中,该检查点抑制剂是PD-1阻断剂(例如,抗PD-1抗体)。在特定实施例中,该抗PD-1抗体是纳武单抗或派姆单抗。在一些实施例中,该溶瘤病毒是单纯

疱疹病毒。该单纯疱疹病毒可以是单纯疱疹病毒1。在一些实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i) 其不含有完整的ICP34.5基因。在其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i) 其不含有完整的ICP34.5基因;和(ii) 其不含有完整的ICP47基因。在又其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i) 其不含有完整的ICP34.5基因;(ii) 其不含有完整的ICP47基因;和(iii) 其含有编码GM-CSF(例如人GM-CSF)的基因。在特定实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0016] 另外,本发明涉及治疗有效量的溶瘤病毒(例如,拉他莫金)和CTLA-4阻断剂(例如,抗CTLA-4抗体如伊匹单抗),用于治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。在另一个实施例中,本发明涉及治疗有效量的溶瘤病毒(例如,拉他莫金)和PD-L1阻断剂(例如,抗PD-L1抗体如阿特珠单抗),用于治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)。在另一个实施例中,本发明涉及治疗有效量的溶瘤病毒(例如,拉他莫金)和PD-1阻断剂(例如,抗PD-1抗体如纳武单抗、派姆单抗)。在一些实施例中,该溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。该单纯疱疹病毒可以是单纯疱疹病毒1。在一些实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i) 其不含有完整的ICP34.5基因。在其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i) 其不含有完整的ICP34.5基因;和(ii) 其不含有完整的ICP47基因。在又其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i) 其不含有完整的ICP34.5基因;(ii) 其不含有完整的ICP47基因;和(iii) 其含有编码GM-CSF(例如人GM-CSF)的基因。在特定实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0017] 在另一个实施例中,本发明涉及药物组合物,用于在治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法中使用,其中该药物组合物包含治疗有效量的溶瘤病毒(例如,拉他莫金)和CTLA-4阻断剂(例如,抗CTLA-4抗体如伊匹单抗)。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。在另一个实施例中,本发明涉及药物组合物,用于在治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法中使用,其中该药物组合物包含治疗有效量的溶瘤病毒(例如,拉他莫金)和PD-L1阻断剂(例如,抗PD-L1抗体如阿特珠单抗)。在另一个实施例中,本发明涉及药物组合物,用于在治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法中使用,其中该药物组合物包含治疗有效量的溶瘤病毒(例如,拉他莫金)和PD-1阻断剂(例如,抗PD-1抗体如纳武单抗或派姆单抗)。在一些实施例中,该溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。该单纯疱疹病毒可以是单纯疱疹病毒1。在一些实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i) 其不含有完整的ICP34.5基因。在其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i) 其不含有完整的ICP34.5基因;和(ii) 其不含有完整的ICP47基因。在又其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i) 其不含有完整的ICP34.5基因;(ii) 其不含有完整的ICP47基因;和(iii) 其含有编码GM-CSF(例如人GM-CSF)的基因。在特定实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

附图说明

[0018] 图1.图1显示了瘤内给予拉他莫金对Balb/c裸小鼠中A-673尤因肉瘤肿瘤体积的影响。

[0019] 图2.图2显示了瘤内给予拉他莫金对Balb/c裸小鼠中SK-N-AS神经母细胞瘤肿瘤体积的影响。

[0020] 图3.图3显示了瘤内给予拉他莫金对Balb/c裸小鼠中G-401横纹肌样瘤体积的影响。

[0021] 图4.图4显示了瘤内给予拉他莫金对Balb/c裸小鼠中SJSA-1骨肉瘤肿瘤体积的影响。

[0022] 图5.图5显示了瘤内给予拉他莫金对Balb/c裸小鼠中SJCRH30横纹肌肉瘤肿瘤体积的影响。

[0023] 图6.图6显示了通过增加WSU-NHL (GCB亚型) 和TMD8 (ABC亚型) DLBCL细胞系中的拉他莫金的浓度实现的细胞生长抑制程度。

[0024] 图7.图7显示了通过增加HCT-116 (结直肠癌) 和SK-MEL-5 (黑色素瘤) 细胞系中的拉他莫金的浓度实现的细胞生长抑制程度。

[0025] 图8.图8显示了通过增加HUT-78 (CTCL) 和RPMI8226 (多发性骨髓瘤) 细胞系中的拉他莫金的浓度实现的细胞生长抑制程度。

[0026] 图9.图9显示了通过增加CT-26和MC-38 (结直肠癌) 细胞系中的拉他莫金的浓度实现的细胞生长抑制程度。

[0027] 图10a至图10i.图10a显示了采用三种剂量 3×10^4 PFU、 3×10^5 PFU和 3×10^6 PFU的OncoVex^{mGM-CSF}对A20荷瘤动物中经注射的肿瘤的体积的影响。图10b显示了采用三种剂量 3×10^4 PFU、 3×10^5 PFU和 3×10^6 PFU的OncoVex^{mGM-CSF}对A20荷瘤动物中未注射(对侧)肿瘤的体积的影响。图10c显示了对采用三种剂量 3×10^4 PFU、 3×10^5 PFU和 3×10^6 PFU的OncoVex^{mGM-CSF}处理的A20荷瘤动物的中值存活期的影响。图10d和10e显示了OncoVex^{mGM-CSF}、抗CTLA-4mAb、以及OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4mAb的组给予对小鼠体重的影响。图10f显示了采用三种剂量 5×10^4 PFU、 5×10^5 PFU和 5×10^6 PFU的OncoVex^{mGM-CSF}对neuro2a神经母细胞瘤荷瘤小鼠中经注射的肿瘤的体积的影响。图10g显示了对采用三种剂量 5×10^4 PFU、 5×10^5 PFU和 5×10^6 PFU的OncoVex^{mGM-CSF}处理的neuro2a神经母细胞瘤荷瘤小鼠的中值存活期的影响。图10h显示了采用 5×10^6 PFU的OncoVex^{mGM-CSF}对neuro2a神经母细胞瘤荷瘤小鼠中经注射(处理)和未注射(对侧/未处理)的肿瘤的体积的影响。图10i显示了对采用 5×10^6 PFU的OncoVex^{mGM-CSF}处理的neuro2a神经母细胞瘤荷瘤小鼠的中值存活期的影响。

[0028] 图11a至图11d.图11a显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗CTLA-4mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}与抗CTLA-4mAb的组合处理A20荷瘤动物对经直接注射的肿瘤和未注射(对侧)的肿瘤的体积的影响。图11b显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗CTLA-4mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}与抗CTLA-4mAb的组合处理A20荷瘤动物对小鼠的中值存活期的影响。图11c显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗PD-L1mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}与抗PD-L1 mAb的组合处理A20荷瘤动物对经直接注射的肿瘤和未注射(对侧)的肿瘤的体积的影响。图11d显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗PD-L1 mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}与抗PD-L1 mAb的组合处理A20荷瘤动物对小鼠的中值存活期的影响。

[0029] 图12a至图12g.图12a显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗CTLA-4mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}和

抗CTLA-4mAb的组合处理CT-26荷瘤动物对经直接注射的肿瘤和未注射(对侧)的肿瘤的体积的影响。图12b显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗CTLA-4mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4mAb的组合处理CT-26荷瘤动物对小鼠的中值存活期的影响。图12c显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗PD-L1mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-L1 mAb的组合处理CT-26荷瘤动物对经直接注射的肿瘤和未注射(对侧)的肿瘤的体积的影响。图12d显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗PD-L1 mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-L1 mAb的组合处理CT-26荷瘤动物对小鼠的中值存活期的影响。图12e和图12f显示了使用采用OncoVex^{mGM-CSF}、CTLA-4阻断、或OncoVex^{mGM-CSF}和CTLA-4阻断的组合处理的CT-26荷瘤小鼠的FACS,通过ELISpot或通过dextramer染色进行全身性(脾)抗AH1CD8⁺T细胞的定量。图12g显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、CTLA-4阻断、或OncoVex^{mGM-CSF}和CTLA-4阻断的组合处理的CT-26荷瘤小鼠的局部(肿瘤)抗AH1 CD8⁺T细胞的定量。

[0030] 图13a至图13d.图13a显示了采用对照、OncoVex^{mGM-CSF}、CTLA-4阻断、或OncoVex^{mGM-CSF}和CTLA-4阻断的组合处理B16F10粘连蛋白1荷瘤小鼠对经注射的肿瘤的体积的影响。图13b显示了采用对照、OncoVex^{mGM-CSF}、CTLA-4阻断、或OncoVex^{mGM-CSF}和CTLA-4阻断的组合处理后对荷瘤小鼠的肺转移瘤负荷的评估(通过肺转移瘤的数量来展示)。图13c显示了采用对照、或OncoVex^{mGM-CSF}和CTLA-4阻断的组合处理对荷瘤小鼠的中值存活期的影响。图13d显示了采用对照、OncoVex^{mGM-CSF}、CTLA-4阻断、或OncoVex^{mGM-CSF}和CTLA-4阻断的组合处理后巨噬细胞在肿瘤中以及在肿瘤周围的致密细胞浸润物中均表现突出,而B细胞只存在于肿瘤周围。

[0031] 图14.图14显示了采用对照或OncoVex^{mGM-CSF}处理4T1荷瘤小鼠对经注射的肿瘤的体积的影响。

[0032] 图15a和图15b.图15a显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗GITRmAb、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗GITRmAb的组合处理A20荷瘤动物对经直接注射的肿瘤和未注射(对侧)的肿瘤的体积的影响。图15b显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗GITRmAb、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗GITR mAb的组合处理A20荷瘤动物对小鼠的中值存活期的影响。

[0033] 图16a和图16b.图16a显示了OncoVex^{mGM-CSF}、抗PD-1mAb、以及OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-1mAb的组的给予对小鼠体重的影响。图16b显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗PD-1mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-1mAb的组合处理MC-38荷瘤动物对经直接注射的肿瘤和未注射(对侧)的肿瘤的体积的影响。

[0034] 图17.图17显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗PD-L1 mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-L1 mAb的组合处理MC-38荷瘤动物对经直接注射的肿瘤和未注射(对侧)的肿瘤的体积的影响。

[0035] 图18.图18显示了采用OncoVex^{mGM-CSF}、抗PD-1mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-1mAb的组合处理B16F10荷瘤动物对经直接注射的肿瘤的体积的影响。

具体实施方式

[0036] 本文使用的章节标题只是出于组织的目的,而不应解释为限制所描述的主题内容。在本说明书正文中引用的所有参考文献都通过引用以其全文明确地并入。

[0037] 标准技术可以用于重组DNA、寡核苷酸合成、组织培养和转化、蛋白质纯化等。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书进行或按照本领域常规实现的或如本文所描述的进行。以下程序和技术可以总体上是根据本领域中众所周知的常规方法并且如本说明书

全篇所引用并且论述的不同通用和更特定的参考文献中所描述的来进行。参见例如 Sambrook等人,2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual [分子克隆:实验室手册,第3版],Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港实验室出版社],纽约,出于任何目的将其通过引用并入本文。除非提供具体定义,否则与在此所述的分析化学、有机化学以及医学和药物化学相关所使用的命名以及实验室过程和技术是本领域熟知的和通常使用的那些。标准技术可以用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

溶瘤病毒

[0038] 如本文所讨论的,本发明展示了溶瘤病毒能够单独或与检查点抑制剂组合在多种肿瘤类型中产生抗肿瘤作用。本发明的溶瘤病毒的显著益处是与例如化学疗法相比,抗肿瘤作用伴随着较少的严重/负面的副作用。例如,在一个实施例中,本发明涉及溶瘤病毒在癌症治疗中的用途。在另一个实施例中,本发明涉及溶瘤病毒用于治疗尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤的用途。在另一个实施例中,本发明涉及溶瘤病毒和检查点抑制剂的组合用于治疗B细胞淋巴瘤、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的用途。

[0039] 在一些实施例中,该溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。该单纯疱疹病毒可以是单纯疱疹病毒1。在一些实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因。在其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;和(ii)其不含有完整的ICP47基因。在又其他实施例中,将该单纯疱疹病毒1进行修饰,使得:(i)其不含有完整的ICP34.5基因;(ii)其不含有完整的ICP47基因;和(iii)其含有编码GM-CSF(例如人GM-CSF)的基因。在特定实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0040] 拉他莫金即HSV-1[毒株JS1]ICP34.5-/ICP47-/hGM-CSF(先前称为OncoVex^{GM-CSF})是瘤内递送的溶瘤免疫疗法,其包含在实体瘤中选择性地复制的免疫增强的HSV-1。(Lui等人,Gene Therapy [基因疗法],10:292-303,2003;美国专利号7,223,593和美国专利号7,537,924)。HSV-1源自保藏于欧洲细胞培养物保藏中心(ECAAC),保藏号为01010209的毒株JS1。在拉他莫金中,编码ICP34.5的HSV-1病毒基因已在功能上缺失。在HSV感染期间充当毒力因子的ICP34.5的功能性缺失限制了在非分裂细胞中的复制并使得病毒呈非致病性。ICP34.5功能上缺失的HSV的安全性已在多项临床研究中得到证明(MacKie等人,Lancet [柳叶刀]357:525-526,2001;Markert等人,Gene Ther [基因疗法]7:867-874,2000;Rampling等人,Gene Ther [基因疗法]7:859-866,2000;Sundaresan等人,J.Virol [病毒学杂志]74:3822-3841,2000;Hunter等人,J.Virol [病毒学杂志],八月;73(8):6319-6326,1999)。另外,ICP47(其阻断病毒抗原呈递给主要组织相容性复合体I和II类分子)已从拉他莫金在功能上缺失。ICP47的功能性缺失也导致US11的较早表达,US11是促进肿瘤细胞中病毒生长而不降低肿瘤选择性的基因。如本文所用,“缺乏功能性”病毒基因意指一个或多个基因在单纯疱疹基因组中部分或完全缺失、替代、重排或以其他方式改变,使得功能性病毒蛋白不能再由单纯疱疹病毒从该基因表达。人GM-CSF(参与刺激免疫应答的细胞因子)的编码序列已被插入拉他莫金的病毒基因组(在ICP34.5基因的两个前述位点)中。编码人GM-CSF的基因的插入使得它几乎替代了所有ICP34.5基因,从而确保拉他莫金与野生型病毒之间的任何

潜在的重组事件只能导致有缺陷的非致病性病毒并且不能导致携带人GM-CSF的基因的野生型病毒的生成。HSV胸苷激酶(TK)基因在拉他莫金中保持完整,这使得病毒对抗病毒剂如阿昔洛韦敏感。因此,如果需要的话,阿昔洛韦可以用于阻断拉他莫金复制。

[0041] 可以修饰的另外的HSV基因的实例包括参与非分裂细胞中而不是分裂细胞中的核苷酸代谢和病毒DNA合成的ICP6,即核糖核苷酸还原酶的大亚基。负责将阿昔洛韦磷酸化为阿昔洛韦一磷酸的胸苷激酶、病毒粒子反式激活蛋白vmw65、糖蛋白H、vhs、ICP43,以及编码ICP4、ICP27、ICP22和/或ICP0的立即早期基因也可以进行修饰。

[0042] 也可以进行修饰以改变单纯疱疹病毒基因的表达时间。例如,通过将US11基因置于Us12启动子下,可以将US11表达为早期基因,Mulvey等人(1999) *J Virology* [病毒学杂志], 73:4, 3375-3385, 美国专利号US 5824318, Mohr&Gluzman (1996) *EMBO* 15:4759-4766。

[0043] 如本领域技术人员所理解的,可以将异源基因(如编码人GM-CSF的基因)插入HSV病毒基因组中,并且使用与质粒DNA的同源重组可以使病毒基因(如ICP34.5和ICP47)在功能上缺失。

[0044] 拉他莫金通过病毒在肿瘤中的复制产生直接的溶瘤作用,并且通过GM-CSF的局部表达和经由裂解释放肿瘤衍生的抗原来增强抗肿瘤免疫应答的诱导。由于许多癌症以原发性和继发性(即转移的)肿瘤形式存在于患者中,因此这种双重活性作为治疗性处理是有益的。预期的临床效应包括经注射的肿瘤的破坏,局部、局部区域和远端未注射的肿瘤的破坏,新转移瘤发展的减少,最初出现的疾病的治疗后总进展率的降低以及复发率的降低,以及延长的总存活期。

[0045] 如本文所用,术语“患者”或“受试者”可互换使用并且意指哺乳动物,包括但不限于人或非人哺乳动物(如牛、马、犬、绵羊或猫)。优选地,该患者是人。

[0046] 已测试了拉他莫金和OncoVex^{mGM-CSF}(一种与拉他莫金具有相同的基因修饰的HSV-1病毒,不同之处在于人GM-CSF被鼠GM-CSF替代)在各种体外(细胞系)和体内鼠肿瘤模型中的功效,并且已显示拉他莫金和OncoVex^{mGM-CSF}在与临床研究中使用的剂量相当的剂量下根除肿瘤或基本上抑制它们的生长。非临床评价还证实,GM-CSF增强所产生的免疫应答,从而增强经注射和未注射的肿瘤反应;并且增加的MHC I类分子的表面水平是由ICP47的缺失引起的。已将拉他莫金注射至正常和荷瘤小鼠中以评估其安全性。总体上,该病毒耐受良好,并且高达 1×10^8 PFU/剂的剂量没有给出任何安全性问题的迹象。(参见例如Liu等人, *Gene Ther* [基因疗法] 10:292-303, 2003)

[0047] 已经或正在几种晚期肿瘤类型中进行临床研究,其中超过400名受试者用拉他莫金进行治疗(参见例如Hu等人, *Clin Can Res* [临床癌症研究] 12:6737-6747, 2006; Harrington等人, *J Clin Oncol.* [临床肿瘤学杂志] 27(15a):摘要6018, 2009; Kaufman等人, *Ann Surgic Oncol.* [外科肿瘤学年鉴] 17:718-730, 2010; Kaufman和Bines, *Future Oncol.* [未来肿瘤学] 6(6):941-949, 2010)。临床数据指示,拉他莫金有可能为晚期黑色素瘤患者提供整体临床益处。特别地,在IIIc至IV期黑色素瘤中实现了高的完全反应率(Scenzer等人, *J. Clin. Oncol.* [临床肿瘤学杂志] 27(12):907-913, 2009)。另外,在经注射和未注射的部位(包括内脏部位)均观察到反应。

[0048] 本发明的病毒还可以源自单纯疱疹2(HSV-2)毒株或源自其衍生物。衍生物包括含有来自HSV-1和HSV-2毒株的DNA的类型间重组体。在本领域中,例如在Thompson等人,

(1998) *Virus Genes* [病毒基因] 1 (3) :275286和Meignier等人, (1998) *J. Infect. Dis.* [传染病学杂志] 159;602614中描述了此类类型间重组体。

[0049] 单纯疱疹病毒株可以源自临床分离株。从感染的个体 (如患有复发性唇疱疹的个体) 分离此类毒株。可以针对所需的能力或特征筛选临床分离株, 该所需的能力或特征例如为与标准实验室毒株相比在体外和/或体内的肿瘤和/或其他细胞中增强的复制, 如美国专利号7,063,835和7,223,593中所述, 其中每一篇都通过引用以其全文并入。在一个实施例中, 该单纯疱疹病毒是来自复发性唇疱疹的临床分离株。

[0050] 单纯疱疹病毒1病毒株包括但不限于毒株JS1、毒株17+、毒株F和毒株KOS、毒株Patton。

[0051] 经修饰的单纯疱疹病毒的其他实例包括但不限于单纯疱疹病毒1型的Seprehvir™ (HSV1716) 毒株17+, 其具有位于HSV基因组的长重复区的BamHI 片段 (0至0-02和0-81至0.83个地图单位) 的每个拷贝内的759bp的缺失, 从而去除了 'a' 序列的18bp DR~元件的一个完整拷贝并在立即早期 (1E) 基因1的5' 端上游的1105 bp处终止, 参见MacLean等人, (1991) *Journal of General Virology* [普通病毒学杂志] 79:631-639。

[0052] G207是源自野生型HSV-1毒株F的溶瘤HSV-1, 其在HSV神经毒性的主要决定簇、ICP34.5基因二者拷贝中具有缺失, 并且在UL39中失活插入编码感染的细胞蛋白6 (ICP6) 的大肠杆菌lacZ基因, 参见Mineta等人 (1995) *Nat. Med.* [自然医学] 1:938-943。

[0053] OrienX010是一种单纯疱疹病毒, 其具有 γ 34.5和ICP47基因二者拷贝的缺失以及ICP6基因的中断和人GM-CSF基因的插入, 参见Liu等人, (2013) *World Journal of Gastroenterology* [世界胃肠病学杂志] 19 (31) :5138-5143。

[0054] NV1020是一种单纯疱疹病毒, 其中长 (L) 和短 (S) 区的接合区 (包括一个拷贝的ICP34.5、UL24和UL56.34,35) 缺失。该缺失区被HSV-2US DNA的片段 (US2、US3 (PK) 、gJ和gG) 替代, 参见Todo等人 (2001) *Proc Natl Acad Sci USA.* [美国国家科学院院刊] 98:6396-6401。

[0055] M032是一种单纯疱疹病毒, 其具有ICP34.5基因二者拷贝的缺失和白细胞介素12的插入, 参见Cassady和Ness Parker, (2010) *The Open Virology Journal* [开放病毒学杂志] 4:103-108。

[0056] ImmunoVEX HSV-2是一种单纯疱疹病毒 (HSV-2), 其具有编码vhs、ICP47、ICP34.5、UL43和US5的基因的功能性缺失。

[0057] OncoVex^{GALV/CD}也源自HSV-1毒株JS1, 其中编码ICP34.5和ICP47的基因已在功能上缺失并且编码胞嘧啶脱氨酶和长臂猿白血病毒病毒融膜糖蛋白的基因插入病毒基因组中以替代ICP34.5基因。

[0058] 经修饰的单纯疱疹病毒的另外的实例包括G47 δ 、G47 δ IL-12、ONCR-001、OrienX-010、NSC 733972、HF-10、BV-2711、JX-594、Myb34.5、AE-618、Brainwel™和Heapwel™。

[0059] 疱疹病毒株以及如何制备这些毒株也描述于美国专利号US 5824318; US 6764675; US 6,770,274; US 7,063,835; US 7,223,593; US 7749745; US 7744899; US 8273568; US 8420071; US 8470577; WIPO公开号: WO 199600007; WO 199639841; WO 199907394; WO 200054795; WO 2006002394; WO 201306795; 中国专利号: CN 128303、CN 10230334和CN 10230335; Varghese和Rabkin, (2002) *Cancer Gene Therapy* [癌症基因疗

法]9:967-97以及Cassady和Ness Parker, (2010) The Open Virology Journal[开放病毒学杂志]4:103-108中,其每一篇均通过引用并入本文。

检查点抑制剂

[0060] 免疫检查点是调节某些类型的免疫系统细胞(如T细胞(其在细胞介导的免疫中起核心作用))的蛋白质。虽然免疫检查点有助于在检查中控制免疫应答,但它们也可以防止T细胞杀死癌细胞。免疫检查点抑制剂(或简称“检查点抑制剂”)可以阻断免疫检查点蛋白活性,从而释放免疫系统上的“制动器”,并允许T细胞更好地杀死癌细胞。

[0061] 如本文所用,术语“免疫检查点抑制剂”或“检查点抑制剂”是指完全或部分地减少、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。检查点蛋白调节T细胞激活或功能。已知许多检查点蛋白,如CTLA-4及其配体CD80和CD86;和PD-1及其配体PD-L1和PD-L2(Pardoll, Nature Reviews Cancer[自然癌症综述]12:252-264,2012)。这些蛋白质负责T细胞应答的共刺激或抑制相互作用。免疫检查点蛋白调节和维持自身耐受性以及生理免疫应答的持续时间和幅度。免疫检查点抑制剂包括抗体或可以衍生自抗体。

[0062] 检查点抑制剂可以包括小分子抑制剂,或者可以包括结合并阻断或抑制免疫检查点受体的抗体或其抗原结合片段,或结合并阻断或抑制免疫检查点受体配体的抗体。可以被靶向以便阻断或抑制的示例性检查点分子包括但不限于CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、LAG3、TIM3、VISTA、KIR、2B4(属于CD2分子家族并且在所有NK、 $\gamma\delta$ 和记忆CD8⁺($\alpha\beta$) T细胞上表达)、CD160(也称为BY55)、CGEN-15049、CHK 1和CHK2激酶、A2aR和各种B-7家族配体。B7家族配体包括但不限于B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6和B7-H7。检查点抑制剂包括抗体或其抗原结合片段、其他结合蛋白、生物治疗剂或小分子,这些检查点抑制剂结合并阻断或抑制CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD 160和CGEN-15049中一种或多种的活性。

[0063] 细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)是一种免疫检查点分子,其下调T细胞激活的途径。CTLA-4是T细胞激活的负调节物。已显示CTLA-4的阻断增强了T细胞激活和增殖。单纯疱疹病毒和抗CTLA-4抗体的组合旨在通过两种不同机制增强T细胞激活,从而增强对肿瘤中病毒裂解性复制后释放的肿瘤抗原的抗肿瘤免疫应答。因此,单纯疱疹病毒和抗CTLA-4抗体的组合可以增强经注射和未注射/远端肿瘤的破坏,改善总体肿瘤反应以及延长总存活期,特别是总存活期与单独使用抗CTLA-4抗体所获得的总存活期相比延长。

[0064] 程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)是在T细胞和pro-B细胞上表达的288个氨基酸细胞表面蛋白分子,并且在它们的命运/分化中起作用。PD-1的两个配体PD-L1和PD-L2是B7家族的成员。当对感染有炎性反应时PD-1限制周围组织中T细胞的活性,并且在体内限制自身免疫PD-1阻断增强了混合的淋巴细胞反应中响应于通过特异性抗原靶标或同种异体细胞的激发的T细胞增殖和细胞因子产生。PD-1表达与反应之间的强相关性显示出PD-1的阻断(Pardoll, Nature Reviews Cancer[自然癌症综述], 12:252-264,2012)。PD-1阻断可以通过多种机制实现,包括结合PD-1或PD-L1的抗体。

[0065] 程序性死亡配体1(PD-L1)也称为分化簇274(CD274)或B7同源物1(B7-H1),该程序性死亡配体1是由CD274基因编码的蛋白质,参见Entrez Gene:CD274 CD274分子。PD-L1是一种在抑制免疫系统中起作用的40kDa的1型跨膜蛋白,其与激活的T细胞、B细胞和骨髓细

胞上的受体 (PD-1) 结合以调节细胞激活或抑制。参见 Chemnitz 等人, *Journal of Immunology* [免疫学杂志], 173 (2) : 945-54 (2004)。

[0066] 其他免疫检查点抑制剂包括淋巴细胞激活基因-3 (LAG-3) 抑制剂, 如 IMP321 即可溶性 Ig 融合蛋白 (Brignone 等人, 2007, *J. Immunol.* [免疫学杂志] 179: 4202-4211)。还包括 B7 抑制剂, 如 B7-H3 和 B7-H4 抑制剂 (例如, 抗 B7-H3 抗体 MGA271 (Loo 等人, 2012, *Clin. Cancer Res.* [临床癌症研究] 7 月 15 日 (18) 3834)。另一个检查点抑制剂是 TIM3 (T 细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域 3) (Fourcade 等人, 2010, *J. Exp. Med.* [实验医学杂志] 207: 2175-86 和 Sakuishi 等人, 2010, *J. Exp. Med.* [实验医学杂志] 207: 2187-94)。

[0067] 如本文进一步所述, 在一个方面, 本发明涉及溶瘤病毒和检查点抑制剂的组合用于治疗癌症的用途。在另一方面, 本发明涉及包含溶瘤病毒和检查点抑制剂的组合的药物组合物。

[0068] 因此, 在本发明的一个方面, 检查点抑制剂是 CTLA-4、PD-1、PD-L1 或 PD-L2 的阻断剂或抑制剂。在一些实施例中, 检查点抑制剂是 CTLA-4 的阻断剂或抑制剂, 如美国专利号 5, 811, 097、5, 811, 097、5, 855, 887、6, 051, 227、6, 207, 157、6, 682, 736、6, 984, 720 和 7, 605, 238 中所述的曲美利木单抗、伊匹单抗 (也称为 10D1、MDX-D010)、BMS-986249、AGEN-1884 和抗 CTLA-4 抗体), 其中每一篇都通过引用并入本文。在一些实施例中, 检查点抑制剂是 PD-L1 或 PD-1 的阻断剂或抑制剂 (例如, 抑制 PD-1 与 PD-L1 和/或 PD-L2 抑制剂相互作用的分子), 例如包括派姆单抗 (抗 PD-1 抗体)、纳武单抗 (抗 PD-1 抗体)、CT-011 (抗 PD-1 抗体)、CX-072 (抗 PD-L1 抗体)、IO-103 (抗 PD-L1)、BGB-A333 (抗 PD-L1)、WBP-3155 (抗 PD-L1)、MDX-1105 (抗 PD-L1)、LY-3300054 (抗 PD-L1)、KN-035 (抗 PD-L1)、FAZ-053 (抗 PD-L1)、CK-301 (抗 PD-L1)、AK-106 (抗 PD-L1)、M-7824 (抗 PD-L1)、CA-170 (抗 PD-L1)、CS-1001 (抗 PD-L1 抗体); SHR-1316 (抗 PD-L1 抗体); BMS 936558 (抗 PD-1 抗体)、BMS-936559 (抗 PD-1 抗体)、阿特殊单抗 (抗 PD-L1 抗体)、AMP 224 (PD-L2 的细胞外结构域和设计成阻断 PD-L2/PD-1 相互作用的 IgG1 抗体的融合蛋白)、MEDI4736 (度伐单抗; 抗 PD-L1 抗体)、MSB0010718C (抗 PD-L1 抗体), 以及美国专利号 7, 488, 802、7, 943, 743、8, 008, 449、8, 168, 757、8, 217, 149 和 PCT 公开专利申请号: W003042402、W0 2008156712、W02010089411、W02010036959、W0 2011066342、W0 2011159877、W0 2011082400 和 W0 2011161699 中所述的那些, 其中每一篇均通过引用并入本文。另外的抗 PD-1 抗体包括 PDR-001、SHR-1210、BGB-A317、BCD-100、JNJ-63723283、PF-06801591、BI-754091、JS-001、AGEN-2034、MGD-013、LZM-009、GLS-010、MGA-012、AK-103、杰诺单抗 (genolimzumab)、dostarlimab、cemiplimab、IBI-308、坎利珠单抗、AMP-514、TSR-042、Sym-021、HX-008 和 ABBV-368。

[0069] BMS 936558 是靶向 PD-1 的完全人 IgG4 单克隆抗体。在 I 期试验中, BMS-936558 的两周一次给予在患有治疗难治性晚期恶性肿瘤的受试者中显示出持久的部分或完全消退。在患有黑色素瘤 (28%) 和肾细胞癌 (27%) 的受试者中观察到最显著的反应率, 但在患有非小细胞肺癌 (NSCLC) 的受试者中也观察到显著的临床活性, 并且一些反应持续超过一年。

[0070] BMS 936559 是靶向 PD-1 配体 PD-L1 的完全人 IgG4 单克隆抗体。I 期结果显示此药物的两周一次给予导致持久的反应, 尤其是在患有黑色素瘤的受试者中这样。根据患有晚期 NSCLC、黑色素瘤、RCC 或卵巢癌的受试者中的癌症类型, 客观反应率的范围为 6% 至 17%, 其中一些受试者经历持续一年或更长时间的反应。

[0071] AMP 224是第二PD-1配体、PD-L2和IgG1的细胞外结构域的融合蛋白,其具有阻断PD-L2/PD-1相互作用的潜力。AMP-224目前作为单一疗法在患有晚期癌症的受试者中正在进行I期测试。

[0072] MEDI4736是一种抗PD-L1抗体,其在此剂量递增研究中已证明具有可接受的安全性特性和持久的临床活性。作为单一疗法和以组合的形式在多种癌症中的扩展和MEDI4736的开发正在进行中。

GITR激动剂

[0073] 糖皮质激素诱导的TNFR相关基因 (GITR:TNFRSF 18) 有时也称为激活诱导型TNFR家族成员 (AITR), 是属于TNF受体超家族 (TNFRSF) 的受体。它由其同源配体GITR配体 (GITRL, TNFSF18) 激活。GITR是含有富半胱氨酸细胞外结构域的I型跨膜蛋白, 富半胱氨酸细胞外结构域是TNFR家族成员的特征。例如, GITR的细胞质结构域与某些其他TNFR家族成员 (如4-1BB和CD27) 具有紧密的同源性 (Nocentini等人, Proc. Natl. Acad. Sci. [美国国家科学院院刊], 94:6216-6221 (1997))。目前正在探索GITR激动剂抗体作为一种扩增CD8+T效应记忆细胞群同时促进Treg的丧失或抑制的手段。

[0074] 应答T细胞的共刺激和调节性T细胞的抑制活性的消除意味着GITR激活导致增强的免疫应答。此类激活有可能使得对感染和肿瘤的免疫应答恢复。因此, 能够激活GITR的分子在需要触发增强的免疫应答的环境中具有作为免疫刺激剂的价值。

[0075] 如本文进一步所述, 在一个方面, 本发明涉及溶瘤病毒和GITR激动剂的组合用于治疗癌症的用途。在另一方面, 本发明涉及包含溶瘤病毒和GITR激动剂的组合的药物组合物。

[0076] 在一些实施例中, GITR激动剂是AMG 228 (也称为9H6v3)、TRX518、MEDI1873、MK-4166、BMS-986156、MK-1248、INCAGN01876或GWN323。

[0077] TRX518是一种人源化的、Fc失能的抗GITR单克隆抗体, 其阻断GITR的相互作用, 并已显示在癌症模型中与化学治疗药物协同作用。目前正在包括NCT01239134 (III期或IV期恶性黑色素瘤或其他实体瘤) 和NCT02628574 (晚期实体瘤) 的临床试验中研究TRX518。

[0078] MEDI1873是一种具有潜在的免疫调节和抗肿瘤活性的GITR激动剂 (GITR配体 (GITRL) IgG1融合蛋白)。目前正在包括NCT02583165 (晚期实体瘤) 的临床试验中研究MEDI1873。

[0079] MK-4166是一种已被证明在癌症模型中与化学治疗药物协同作用的抗GITR激动性单克隆抗体。目前正在包括NCT02132754的临床试验中研究MK-4166 (在晚期实体瘤中与派姆单抗组合)。

[0080] BMS-986156是一种抗GITR激动性单克隆抗体。目前正在包括NCT02598960的临床试验中研究BMS-986156 (在患有晚期实体瘤的受试者中作为单一疗法以及与纳武单抗组合)。

[0081] MK-1248是一种抗GITR激动性单克隆抗体。目前正在包括NCT02553499的临床试验中研究MK-1248 (在患有晚期实体瘤的受试者中作为单一疗法以及与派姆单抗组合)。

[0082] INCAGN01876是一种抗GITR激动性单克隆抗体。目前正在包括NCT02697591的临床试验中研究INCAGN01876 (在患有晚期或转移性实体瘤的受试者中)。

[0083] GWN323是一种抗GITR激动性单克隆抗体。目前正在包括NCT02697591的临床试验

中研究GWN323(在患有晚期癌症或淋巴瘤的受试者中作为单一疗法以及与PDR001组合)。

治疗疾病或障碍的方法

[0084] 本发明还涉及治疗疾病或障碍(如癌症)的方法。在一些实施例中,该癌症是尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。在其他实施例中,该癌症是B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。

[0085] 术语“转移性癌症”是指从其开始的身体部位(即,原发部位)扩散到身体的其他部位的癌症。当癌症扩散到一个新的区域(即转移的)时,它仍然以它开始的身体部位命名。例如,已经扩散到胰腺的结肠癌被称为“胰腺的转移性结肠癌”,而不是胰腺癌。治疗也基于癌症起源的地方。如果结肠癌扩散到骨骼,它仍然是结肠癌,并且相关医生将推荐已被证明可对抗转移性结肠癌的治疗。

[0086] 本发明还涉及溶瘤病毒和检查点抑制剂的组合用于治疗癌症的用途。在一些实施例中,该癌症是尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。在其他实施例中,该癌症是B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。

[0087] 本发明还涉及通过给予以下项治疗疾病或障碍(如癌症)的方法:(i) 治疗有效量的溶瘤病毒;和(ii) 治疗有效量的GITR激动剂。在特定实施例中,该癌症是:B细胞淋巴瘤。在其他实施例中,该GITR激动剂是:AMG 228、TRX518、MEDI1873或MK-4166。

[0088] 该溶瘤病毒可以是本文所述那些的任何一种。在一些实施例中,该溶瘤病毒是单纯疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒1)。在其他实施例中,将单纯疱疹病毒1修饰成使得其不含有完整的ICP34.5基因。在其他实施例中,将单纯疱疹病毒1修饰成使得其不含有完整的ICP34.5基因,并且其不含有完整的ICP47基因。在又一个实施例中,将单纯疱疹病毒1修饰成使得其不含有完整的ICP34.5基因,其不含有完整的ICP47基因,并且其含有编码GM-CSF(例如,人GM-CSF)的基因。在具体实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0089] 该检查点抑制剂可以是阻断或抑制免疫系统的抑制途径的任何分子。例如,可以靶向以下检查点分子以进行阻止或抑制:CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、LAG3、TIM3、VISTA、KIR、2B4(属于CD2分子家族并且在所有NK、 $\gamma\delta$ 和记忆CD8⁺($\alpha\beta$) T细胞上表达)、CD160(也称为BY55)、CGEN-15049、CHK 1和CHK2激酶、A2aR和各种B-7家族配体。B7家族配体包括但不限于B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6和B7-H7。检查点抑制剂的实例包括结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)、生物治疗剂或小分子,这些检查点抑制剂结合并阻断或抑制CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD 160和CGEN-15049中一种或多种的活性。

[0090] 在一些实施例中,该检查点抑制剂是CTLA-4、PD-1、PD-L1或PD-L2的阻断剂或抑制剂。CTLA-4抑制剂的实例包括如美国专利号5,811,097、5,811,097、5,855,887、6,051,227、6,207,157、6,682,736、6,984,720和7,605,238中所述的曲美利木单抗、伊匹单抗(也称为

10D1、MDX-D010)、BMS-986249、AGEN-1884和抗CTLA-4抗体,其中每一篇都通过引用并入本文。抑制PD-1与PD-L1和/或PD-L2抑制剂相互作用的分子的实例包括派姆单抗(抗PD-1抗体)、纳武单抗(BMS 936558;抗PD-1抗体)、CT-011(抗PD-1抗体)、BMS 936558(抗PD-1抗体)、BMS-936559(抗PD-L1抗体)、CX-072(抗PD-L1抗体)、IO-103(抗PD-L1)、BGB-A333(抗PD-L1)、WBP-3155(抗PD-L1)、MDX-1105(抗PD-L1)、LY-3300054(抗PD-L1)、KN-035(抗PD-L1)、FAZ-053(抗PD-L1)、CK-301(抗PD-L1)、AK-106(抗PD-L1)、M-7824(抗PD-L1)、CA-170(抗PD-L1)、CS-1001(抗PD-L1抗体)、SHR-1316(抗PD-L1抗体)、阿特殊单抗(抗PD-L1抗体)、AMP 224(PD-L2的细胞外结构域和被设计成阻断PD-L2/PD-1相互作用的IgG1抗体的融合蛋白)、MEDI4736(度伐单抗;抗PD-L1抗体)、MSB0010718C(阿维鲁单抗;抗PD-L1抗体),以及在美国专利号7,488,802、7,943,743、8,008,449、8,168,757、8,217,149和PCT公开专利申请号W003042402、WO 2008156712、W02010089411、W02010036959、WO 2011066342、WO 2011159877中所述的那些。另外的抗PD-1抗体包括PDR-001、SHR-1210、BGB-A317、BCD-100、JNJ-63723283、PF-06801591、BI-754091、JS-001、AGEN-2034、MGD-013、LZM-009、GLS-010、MGA-012、AK-103、杰诺单抗(genolimzumab)、dostarlimab、cemiplimab、IBI-308、坎利珠单抗、AMP-514、TSR-042、Sym-021、HX-008和ABBV-368。

[0091] 在特定实施例中,本发明涉及溶瘤病毒和抗PD-1抗体的组合、溶瘤病毒和抗PD-L1抗体,或者溶瘤病毒和抗CTLA-4抗体。在具体实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0092] 在许多情况下,癌症作为原发性肿瘤(即在肿瘤进展开始的解剖部位生长的肿瘤并且继续产生癌性肿块)和作为继发性肿瘤或转移瘤(即,肿瘤从其原发部位扩散到身体的其他部位)两种形式存在于患者中。本发明的溶瘤病毒可以经由裂解作用和全身免疫作用有效地治疗肿瘤。例如,在拉他莫金的背景下,病毒在物理上裂解肿瘤细胞,从而导致原发性肿瘤细胞死亡。另外,[1]肿瘤细胞的裂解释放肿瘤衍生的抗原,这些抗原随后被免疫系统识别;并且[2]GM-CSF的产生有助于诱导抗肿瘤免疫应答-这两种机制均被认为会导致全身免疫应答,从而免疫系统可以识别并攻击原发性和继发性肿瘤/转移瘤。在将溶瘤病毒与检查点抑制剂组合的实施例中,检查点抑制剂被认为通过增强引发和降低免疫检查点蛋白对免疫系统细胞(如T细胞)的抑制作用来进一步增强全身免疫应答。此外,在溶瘤病毒与GITR激动剂组合的实施例中,GITR激动剂被认为通过扩增CD8+T效应记忆细胞群来进一步增强全身免疫应答并促进Treg的丧失或抑制。因此,本发明考虑单独用溶瘤病毒(例如,拉他莫金)或与检查点抑制剂的组合来治疗原发性肿瘤、转移瘤(即继发性肿瘤)或两者。

[0093] 在一些实施例中,本文所述的治疗方法或用途不包括放射治疗或与放射的组合治疗。在其他实施例中,本文所述的治疗方法或用途不包括用化学治疗剂(即,对恶性细胞和组织具有选择性破坏性的化学药剂或药物-通常是小分子化合物)如顺铂的治疗,或与化学治疗剂(例如,顺铂)的组合治疗。在又一个实施例中,本文所述的治疗方法或用途不包括用放射和化学治疗剂(例如顺铂)的组合的治疗。

[0094] 本发明的方法可以用于治疗几种不同分期的癌症。大多数分期系统包括与以下有关的信息:癌症是否已扩散到附近淋巴结,肿瘤在体内的位置、细胞类型(例如,鳞状细胞癌),癌症是否已扩散到身体的不同部位、肿瘤的大小和肿瘤的等级(即,细胞异常的程度,肿瘤生长和扩散的可能性)。例如,0期是指存在尚未扩散到附近组织的异常细胞-即可能成为癌症的细胞。I期、II期和III期癌症是指癌症的存在。分期越高,癌症肿瘤越大,并且其扩

散到附近组织中的越多。IV期癌症是已经扩散到身体远端部位的癌症。在一些实施例中，本发明的方法可以用于治疗转移性癌症。

药物组合物

[0095] 本发明还涉及包含溶瘤病毒或包含溶瘤病毒和检查点抑制剂的组合的药物组合物。该药物组合物可以含有用于修饰、维持、或保持组合物的例如，pH、渗透压、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的配制品材料。药学活性剂可以通过各种途径给予至患者，包括例如口服或肠胃外，分别例如静脉内、肌肉内、皮下、眼内、囊内、腹膜内、直肠内、脑池内、肿瘤内、血管内、皮内或通过使用皮肤贴剂或透皮离子电渗疗法穿过皮肤的被动或促进式吸收。在一个实施例中，将溶瘤病毒（例如，拉他莫金）注射至肿瘤中（即，经由肿瘤内注射）。在另一个实施例中，全身性地（例如，静脉内）给予检查点抑制剂（例如，抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或抗CTLA-4抗体）。

[0096] 本领域普通技术人员将能够根据本披露的任何方面确定治疗的剂量和持续时间。例如，技术人员可以监测患者以确定是否应该开始、继续、中断或恢复治疗。对于特定患者的有效量可以根据因素（如正在治疗的病症、患者的总体健康状况以及给予的方法、途径和剂量）而变化。临床医生使用本领域已知的参数确定适当的剂量。治疗上待使用的药物组合物的有效量将取决于例如治疗背景和目的。本领域技术人员将理解，治疗的适当剂量水平将因此部分地根据递送的分子、使用结合剂分子的适应症、给予途径以及患者的体型（体重、体表面积或器官大小）和状况（年龄和一般健康状况）而变化。因此，临床医师可滴定剂量并修改给予途径以获得最佳治疗效应。

[0097] 临床研究已表明，可以将拉他莫金直接注射至皮肤、皮下或淋巴结病变中，这些病变是可见的、可触知的；或者可以用超声引导进行注射。因此，在一个方面，经由病灶内注射给予包含拉他莫金的药物组合物。拉他莫金目前以固定给药浓度提供于1mL一次性小瓶中：首次给药为 10^6 pfu/mL并且后续给药为 10^8 pfu/mL (Reske等人J Immunol [免疫学杂志], 2008.180 (11) : 第7525-36页)。注射的体积可以根据肿瘤类型而变化。例如，通过瘤内注射在第1周的第1天以高达4.0mL的 10^6 空斑形成单位/mL (PFU/mL) 的剂量，接着在第4周的第1天以高达4.0mL的 10^8 PFU/mL的剂量，并且此后每2周（±3天）将拉他莫金给予至可注射的皮肤、皮下和结节肿瘤中。在另一个实施例中，通过瘤内注射在第1周的第1天以高达4.0mL的 10^6 空斑形成单位/mL (PFU/mL) 的剂量，接着在第4周的第1天以4.0mL的 10^7 PFU/mL的剂量，并且此后每2周（±3天）将拉他莫金给予至可注射的皮肤、皮下和结节肿瘤中。待注射至一种或多种肿瘤中的拉他莫金的推荐体积取决于该一种或多种肿瘤的大小，并且可以根据表1中的注射体积指南来确定（并且如在专利申请PCT/US2013/057542中所示，其通过引用并入本文中）。

表1. 基于肿瘤大小的拉他莫金注射体积指南

肿瘤大小 (最长尺寸)	最大注射体积
≥5.0cm	4.0mL
>2.5cm至5.0cm	2.0mL
>1.5cm至2.5cm	1.0mL
>0.5cm至1.5cm	0.5mL
≤0.5cm	0.1mL

[0098] 通常,所有合理可注射的病变应被以在单个给药情况下可提供的最大给药体积注射。在每个治疗日,建议注射的优先次序如下:自上次注射后已出现的任何新的可注射肿瘤;按肿瘤大小,从最大的肿瘤开始;现在可注射的任何先前无法注射的一种或多种肿瘤。

[0099] 本发明的组合物可以包含一种或多种另外的组分,包括生理学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。例如,组合物可以包含缓冲液、抗氧化剂(如抗坏血酸)、低分子量多肽(例如,具有少于10个氨基酸)、蛋白质、氨基酸、碳水化合物(如葡萄糖、蔗糖或糊精)、螯合剂(如EDTA)、谷胱甘肽、稳定剂和赋形剂中的一种或多种。可接受的稀释剂包括例如中性缓冲盐水或与特定血清白蛋白混合的盐水。还可以添加防腐剂如苯甲醇。可以使用合适的赋形剂溶液(例如,蔗糖)作为稀释剂将该组合物配制成冻干物。

[0100] 在某些实施例中,将检查点抑制剂以0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.7mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg或其任何组合剂量给予。在某些实施例中,每周一次、每周两次、每周三次、每两周一次或每月一次给予该检查点抑制剂。在某些实施例中,将该检查点抑制剂以单个剂量、两个剂量、三个剂量、四个剂量、五个剂量或6个或更多个剂量给予。

[0101] 在某些实施例中,将抗PD-1抗体通过以约1至30mg/kg,例如约5至25mg/kg、约10至20mg/kg约1至5mg/kg或约3mg/kg的剂量注射(例如,皮下或静脉内)来给予。给药方案可以从例如每周一次到每2、3或4周一次变化。在一个实施例中,将抗PD-1抗体以约10至20mg/kg的剂量每隔一周给予。

[0102] 在一个实施例中,将抗PD-1抗体分子(例如,纳武单抗)以约1mg/kg至3mg/kg(例如约1mg/kg、2mg/kg或3mg/kg)的剂量每两周静脉内给予。在一个实施例中,将抗PD-1抗体分子(例如,纳武单抗)以约2mg/kg的剂量按3周间隔静脉内给予。在一个实施例中,将纳武单抗以约1mg/kg至5mg/kg(例如,3mg/kg)的量大约每周一次至每2、3或4周一次给予,并且可以经60分钟的时间段给予。

[0103] 在一个实施例中,将抗PD-1抗体分子(例如,派姆单抗)以约1mg/kg至3mg/kg(例如约1mg/kg、2mg/kg或3mg/kg)的剂量每三周静脉内给予。在一个实施例中,将抗PD-1抗体分子(例如,派姆单抗)以约2mg/kg的剂量按3周间隔静脉内给予。在另一个实施例中,将抗PD-1抗体分子(例如,派姆单抗)以约100mg/kg至300mg/kg(例如约100mg/kg、200mg/kg或300mg/kg)的剂量每三周静脉内给予。在一个实施例中,将抗PD-1抗体分子(例如,派姆单抗)以约200mg/kg的剂量按3周间隔静脉内给予。

[0104] 在某些实施例中,将抗CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗)通过注射(例如,皮下或静脉内)以如下剂量给予:约3mg/kg IV Q3W,最大4个剂量;约3mg/kg IV Q6W,最大4个剂量;约3mg/kg IV Q12W,最大4个剂量;约10mg/kg IV Q3W,最大4个剂量;或约10mg/kg IV Q12W,最大4个剂量。在某些实施例中,将抗CTLA-4抗体(例如,曲美利木单抗)通过注射(例如,皮下或静脉内)以约10mg/kg Q4W的剂量给予;或约15mg/kg的剂量每3个月给予。

[0105] 在某些实施例中,将抗PD-L1抗体(例如,阿特珠单抗)通过注射(例如,皮下或静脉内)以约1200mg IV Q3W的剂量来给予,直至疾病进展或不可接受的毒性。

[0106] 因此,在一个实施例中,本发明涉及药物组合物,用于在治疗尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性

乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤的方法中使用,其中该药物组合物包含溶瘤病毒。在另一个实施例中,本发明涉及药物组合物,用于在治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的方法中使用,其中该药物组合物包含治疗有效量的溶瘤病毒和检查点抑制剂。在另外的实施例中,本发明涉及用于在治疗B细胞淋巴瘤的方法中使用的药物组合物,其中该药物组合物包含治疗有效量的溶瘤病毒和GITR激动剂。

[0107] 在其他实施例中,本发明涉及治疗有效量的溶瘤病毒,用于治疗尤因肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌样瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、非小细胞肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、皮肤T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。在又其他实施例中,本发明涉及用于治疗B细胞淋巴瘤(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、结直肠癌、黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)的治疗有效量的溶瘤病毒和检查点抑制剂。在另外的实施例中,本发明涉及用于治疗B细胞淋巴瘤的治疗有效量的溶瘤病毒和GITR激动剂。

[0108] 在一些实施例中,该溶瘤病毒是单纯疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒1)。在其他实施例中,将单纯疱疹病毒1修饰成使得其不含有完整的ICP34.5基因。在其他实施例中,将单纯疱疹病毒1修饰成使得其不含有完整的ICP34.5基因,并且其不含有完整的ICP47基因。在又另一个实施例中,将单纯疱疹病毒1修饰成使得其不含有完整的ICP34.5基因,其不含有完整的ICP47基因,并且其含有编码GM-CSF(例如,人GM-CSF)的基因。在具体实施例中,该溶瘤病毒是拉他莫金。

[0109] 在药物组合物包含检查点抑制剂的实施例中,检查点抑制剂可以是本文所讨论的那些中的任何一种。例如,检查点抑制剂可以是CTLA-4阻断剂、PD-L1阻断剂或PD-1阻断剂。CTLA-4阻断剂可以是抗CTLA-4抗体,例如伊匹单抗。PD-L1阻断剂可以是抗PD-L1抗体,例如阿特珠单抗。PD-1阻断剂可以是抗PD-1抗体,例如纳武单抗或派姆单抗。

[0110] 在一些实施例中,GITR激动剂是AMG 228、TRX518、MEDI1873或MK-4166。

[0111] 在一些实施例中,本文所述的药物组合物不与放射结合使用或与放射治疗组合使用。在其他实施例中,本文所述的药物组合物不包含化学治疗剂(例如,顺铂)。在又另一个实施例中,本文所述的药物组合物不用于采用放射和化学治疗剂(例如,顺铂)的组的治疗。

试剂盒

[0112] 在另一方面,本发明涉及试剂盒,其包含[1]该溶瘤病毒,任选地与检查点抑制剂组合;和[2]向患者给予的说明书。例如,本发明的试剂盒可以包含溶瘤病毒(例如,拉他莫金)以及用于治疗患有癌症的患者的说明书(例如,在包装插页或标签中)。在一些实施例中,该癌症是转移性癌症。在另一个实施例中,本发明的试剂盒可以包含用于治疗患有癌症的患者的溶瘤病毒(例如,拉他莫金)、检查点抑制剂(例如,抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或抗CTLA-4抗体)和说明书(例如,在包装插页或标签中)。

[0113] 在另一方面,本发明涉及试剂盒,其包含[1]该溶瘤病毒,任选地与GITR激动剂组合;和[2]向患者给予的说明书。在其他实施例中,本发明的试剂盒可以包含用于治疗患有癌症的患者的溶瘤病毒(例如,拉他莫金)、GITR激动剂(例如,AMG 228(也称为9H6v3)、TRX518、MEDI1873或MK-4166)和说明书(例如,在包装插页或标签中)。

[0114] 在一些实施例中,包含拉他莫金的试剂盒包含针对通过瘤内注射在第1周的第1天以高达4.0ml的 10^6 PFU/mL的剂量,接着在第4周的第1天以高达4.0ml的 10^8 PFU/mL的剂量,并且此后每2周给予(例如,直至完全反应)的说明书(例如,在包装插页或标签中)。在一些实施例中,包含拉他莫金的试剂盒包含针对通过瘤内注射在第1周的第1天以高达4.0ml的 10^6 PFU/mL的剂量,接着在第4周的第1天以高达4.0ml的 10^7 PFU/mL的剂量,并且此后每2周给予(例如,直至完全反应)的说明书(例如,在包装插页或标签中)。

[0115] 在试剂盒包含抗PD-1抗体的实施例中,该试剂盒包含针对以本文所述剂量的静脉内给予的说明书(例如,在包装插页或标签中)。抗PD-1抗体的实例包括派姆单抗和纳武单抗。

[0116] 在该试剂盒包含抗PD-L1抗体的实施例中,该试剂盒包含针对以本文所述剂量的静脉内给予的说明书(例如,在包装插页或标签中)。抗PD-L1抗体的实例包括阿特殊单抗。

[0117] 在试剂盒包含抗CTLA-4抗体的实施例中,该试剂盒包含针对以本文所述剂量的静脉内给予的说明书(例如,在包装插页或标签中)。抗CTLA-4抗体的实例包括伊匹单抗。

[0118] 在该试剂盒包含GITR激动剂的实施例中,该试剂盒包含针对以本文所述剂量的静脉内给予的说明书(例如,在包装插页或标签中)。抗GITR抗体的实例包括AMG 228、TRX518、MEDI1873或MK-4166。

[0119] 在另一个实施例中提供了制造本发明的试剂盒的方法。

[0120] 在一些实施例中,本文所述的试剂盒不与放射结合使用或与放射治疗组合使用。在其他实施例中,本文所述的试剂盒不包含化学治疗剂(例如,顺铂)。在又一个实施例中,本文所述的试剂盒不用于采用放射和化学治疗剂(例如,顺铂)的组的治疗。

实例

[0121] 提供以下实例是为了说明本发明的具体实施例或特征,而不是为了限制其范围。

实例1:拉他莫金在体内小鼠模型中表现出针对一系列肿瘤类型的抗肿瘤活性

[0122] 此实例表明了向荷瘤小鼠给予拉他莫金导致肿瘤杀伤。

[0123] 在Balb/c裸小鼠的几项小鼠异种移植植物研究中评估了拉他莫金的抗肿瘤功效。通过皮下注射将肿瘤细胞(A-673人类小儿尤因肉瘤、SJCRH30人类小儿横纹肌肉瘤、G-401人类小儿横纹肌样瘤、SK-N-AS人类小儿神经母细胞瘤或SJSA-1人类小儿骨肉瘤)植入每只小鼠的右侧腹。在每种情况下,将100-200 μ L 50%基质胶/50%DMEM中的 5×10^6 至 1×10^7 个细胞植入小鼠中。

[0124] 每周两次获得肿瘤测量结果。当肿瘤直径达到平均4-6mm时,开始用拉他莫金治疗。通过瘤内注射间隔三天给予三种拉他莫金剂量(5×10^4 、 5×10^5 或 5×10^6 PFU/剂量,50 μ L剂量体积)。每周两次获得体重、总体临床观察结果和肿瘤测量结果。当肿瘤重量超过体重的10%时,对动物实施安乐死。

[0125] 在这些实验中,拉他莫金对所有测试的细胞系显示出抗肿瘤功效,其中肿瘤生长抑制为65%-112%,并且在跨越肿瘤类型的3%-30%的动物中具有完全消退的证据。

尤因肉瘤

[0126] 用拉他莫金以 5×10^4 、 5×10^5 或 5×10^6 PFU/剂量治疗性地处理A-673尤因肉瘤荷瘤小鼠。在研究第8、11和14天,通过瘤内注射每天一次给予拉他莫金(图1,红色箭头)。每周测量肿瘤2-3次。结果表示为:组平均肿瘤体积(mm^3) \pm 平均值的标准误差随时间(天)的变化,其

中第0天是肿瘤接种当天(每组n=10,除了对于第16、20和23天的媒介物对照组另有所述)。星号指示在研究第23天,相对于媒介物对照,所有的拉他莫金组的 $p < 0.0001$ 。

[0127] 结果示于图1中。

神经母细胞瘤

[0128] 用拉他莫金以 5×10^4 、 5×10^5 或 5×10^6 PFU/剂量治疗性地处理SK-N-AS神经母细胞瘤荷瘤小鼠。在研究第6、9和12天,通过瘤内注射每天一次给予拉他莫金(图2,红色箭头)。每周测量肿瘤2-3次。结果表示为:组平均肿瘤体积(mm^3) ± 平均值的标准误差随时间(天)的变化,其中第0天是肿瘤接种当天(每组n=10,除了对于第18、20和23天 5×10^4 PFU/剂量组另有所述)。星号指示在研究第23天,相对于配制品缓冲液对照,对于 5×10^6 和 5×10^5 PFU/剂量组的 $p < 0.0001$,并且对于 5×10^4 PFU/剂量组的 $p = 0.0001$ 。

[0129] 结果示于图2中。

横纹肌样瘤

[0130] 用拉他莫金以 5×10^4 、 5×10^5 或 5×10^6 PFU/剂量治疗性地处理G-401横纹肌样瘤荷瘤小鼠。在研究第14、17和20天,通过瘤内注射每天一次给予拉他莫金(图3,红色箭头)。每周测量肿瘤2-3次。结果表示为:组平均肿瘤体积(mm^3) ± 平均值的标准误差随时间(天)的变化,其中第0天是肿瘤接种当天(每组n=10,除非另有所述)。星号指示在研究第40天,相对于媒介物对照,所有的拉他莫金剂量组的 $p < 0.0001$ 。

[0131] 结果示于图3中。

骨肉瘤

[0132] 用拉他莫金以 5×10^4 、 5×10^5 或 5×10^6 PFU/剂量治疗性地处理SJSA-1骨肉瘤荷瘤小鼠。在研究第9、12和15天,通过瘤内注射每天一次给予拉他莫金(图4,红色箭头)。每周测量肿瘤2-3次。结果表示为:组平均肿瘤体积(mm^3) ± 平均值的标准误差随时间(天)的变化,其中第0天是肿瘤接种当天(每组n=10)。

[0133] 结果示于图4中。

横纹肌肉瘤

[0134] 用拉他莫金以 5×10^4 、 5×10^5 或 5×10^6 PFU/剂量治疗性地处理SJCRH30横纹肌肉瘤荷瘤小鼠。在研究第8、11和14天,通过瘤内注射每天一次给予拉他莫金(图5,红色箭头)。每周测量肿瘤2-3次。结果表示为:组平均肿瘤体积(mm^3) ± 平均值的标准误差随时间(天)的变化,其中第0天是肿瘤接种当天(每组n=10,除了对于第26、30和33天 5×10^4 PFU/剂量组以及对于第30和33天 5×10^6 PFU/剂量组另有所述)。星号指示在研究第26天(所有对照动物都处于研究中的情况下的最后一个研究日),相对于媒介物对照,对于所有拉他莫金剂量组的 $p < 0.0001$ 。

[0135] 结果示于图5中。

实例2:拉他莫金在基于细胞的测定中抑制一系列人肿瘤类型的生长弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL或DLBL)

[0136] 将几种DLBCL细胞系(SU-DHL-2、OCI-LY-3、TMD8、RI-1(ABC亚型)和WSU-NHL(GCB亚型))以每孔5,000个细胞铺板在96孔板中并且在 37°C 下孵育过夜。对于每种细胞系,从100MOI开始在九个孔中连续稀释(连续稀释度为1:4)拉他莫金。孵育72小时后,使用CellTiter-Glo发光细胞活力测定法(Promega,麦迪逊,威斯康星州)定量每个孔中留下的

细胞数。

[0137] 在低于100的MOI下拉他莫金在21种DLBCL细胞系中的14种中是有效的。五种细胞系(SU-DHL-2、OCI-LY-3、TMD8、RI-1 (ABC亚型) 和WSU-NHL (GCB亚型)) 展示出最大的敏感性, 其中MOI IC₅₀等于或低于1(表2)。相比之下, OCI-LY-1、KARPAS422、WSU-DLCL2、SU-DHL-4、SU-DHL-10和OCI-LY-7(所有GCB亚型) 显示出对拉他莫金的抗性, MOI高达100(表2)。在显示MOI IC₅₀低于1的大多数细胞系中细胞生长的抑制最大。图6显示了通过增加WSU-NHL (GCB亚型) 和TMD8 (ABC亚型) DLBCL细胞系中的拉他莫金的浓度实现的细胞生长抑制程度。这些结果表明用拉他莫金处理DLBCL细胞系导致DLBCL肿瘤细胞生长的强烈抑制。

表2:代表ABC和GCB亚型的21种DLBCL细胞系的MOI IC₅₀

细胞系	适应症	MOIIC ₅₀
DOHH2	DLBCL	>100
FARAGE	DLBCL	16.769
DB	DLBCL	11.746
SU-DHL-4	DLBCL	>100
VAL	DLBCL	3.582
RCK-8	DLBCL	6.058
RI-1	DLBCL	1.053
OCI-LY-7	DLBCL	>100
SU-DHL-10	DLBCL	>100
U2938	DLBCL	10.044
WSU-DLCL2	DLBCL	>100
WSU-NHL	DLBCL	0.520
KARPAS422	DLBCL	>100
SU-DHL-6	DLBCL	9.970
OCI-LY-10	DLBCL	15.012
TMD8	DLBCL	0.580
OCI-LY-1	DLBCL	>100
OCI-LY-3	DLBCL	0.300
OCI-LY-19	DLBCL	52.799
SC-1	DLBCL	6.766
SU-DHL-2	DLBCL	0.231

另外的实体瘤

[0138] 将各种实体瘤细胞系(黑色素瘤、非小细胞肺癌、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌和三阴性乳腺癌)以2,000-10,000个细胞/孔铺板在96孔板中,并在37°C下孵育过夜。对于每种细胞系,从100MOI开始在九个孔中连续稀释(连续稀释度为1:4)拉他莫金。孵育72小时后,使用ATP-Lite(珀金埃尔默(Perkin Elmer),沃尔瑟姆,马塞诸塞州)定量每个孔中留下的细胞数。

[0139] 拉他莫金对所有测试的13种黑色素瘤和癌细胞系均有效。测试的所有细胞系显示MOI IC₅₀低于1(表3)。图7显示了通过增加HCT-116(结直肠癌)和SK-MEL-5(黑色素瘤)细胞

系中的拉他莫金的浓度实现的细胞生长抑制程度。这些结果表明,用拉他莫金处理黑色素瘤、非小细胞肺癌、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、胃癌和三阴性乳腺癌细胞系导致对肿瘤细胞生长的强烈抑制。

表3:代表各种实体瘤适应症的13种细胞系的MOI IC₅₀

细胞系	适应症	MOIIC ₅₀
SK-MEL-5	黑色素瘤	0.051
M24met	黑色素瘤	0.225
A375	黑色素瘤	0.1
A549	NSCLC	0.218
SK-CO-1	结直肠癌	0.145
HT-29	结直肠癌	0.135
HCT-116	结直肠癌	0.072
FADU	HNSCC	0.0133
CAL27	HNSCC	0.004
SNU-182	肝细胞癌	0.03
SNU-620	胃癌	0.162
MDA-231	乳腺癌	0.19
Cal-51	乳腺癌	0.56

皮肤T细胞淋巴瘤 (CTCL) 和多发性骨髓瘤 (MM)

[0140] 将CTCL和MM细胞系以2,000-10,000个细胞/孔铺板在96孔板中,并在37°C下孵育过夜。对于每种细胞系,从100MOI开始在九个孔中连续稀释(连续稀释度为1:4)拉他莫金。孵育72小时后,使用ATP-Lite (珀金埃尔默 (Perkin Elmer), 沃尔瑟姆, 马塞诸塞州) 定量每个孔中留下的细胞数。

[0141] 拉他莫金对测试的所有5种细胞系有效(表4)。多发性骨髓瘤细胞系显示出比皮肤T细胞淋巴瘤细胞系更高的敏感性。图8显示了通过增加HUT-78 (CTCL) 和RPMI 8226 (多发性骨髓瘤) 细胞系中的拉他莫金的浓度实现的细胞生长抑制程度。这些结果表明用拉他莫金处理皮肤T细胞淋巴瘤 (CTCL) 和多发性骨髓瘤 (MM) 细胞系导致对肿瘤细胞生长的强烈抑制。

表4:2种皮肤T细胞淋巴瘤和三种多发性骨髓瘤细胞系的MOI IC₅₀。

细胞系	适应症	MOI IC ₅₀
HUT-78	CTCL	0.961
HUT-102	CTCL	19.22
KMS-12-BM	MM	0.56
RPMI8226	MM	0.037
NCI-H929	MM	0.03

实例3:拉他莫金在基于细胞的测定中抑制多种鼠肿瘤细胞系的生长

[0142] 将黑色素瘤、结直肠癌和B细胞淋巴瘤鼠细胞系以2,000-10,000个细胞/孔铺板在96孔板中,并在37°C下孵育过夜。对于每种细胞系,从100MOI开始在九个孔中连续稀释(连续稀释度为1:4)拉他莫金。孵育72小时后,使用ATP-Lite(珀金埃尔默(Perkin Elmer),沃尔瑟姆,马塞诸塞州)定量每个孔中留下的细胞数。

[0143] 拉他莫金对测试的5种细胞系中的4种有效(表5)。B16F10黑色素瘤细胞系展示出对拉他莫金的抗性。如Miller等人,Molecular Therapy[分子疗法],3(2):160-168(2001)先前所述,这种抗性是由单纯疱疹病毒1型的进入受体的缺乏介导的。Cloudman CL M3(黑色素瘤)、CT-26和MC-38(结直肠癌)细胞系显示出相似的敏感性,MOI IC₅₀为约0.2。图9显示了通过增加CT-26和MC-38(结直肠癌)细胞系中的拉他莫金的浓度实现的细胞生长抑制程度。这些结果表明用拉他莫金处理鼠肿瘤细胞系(黑色素瘤、结直肠癌和B细胞淋巴瘤)导致对肿瘤细胞生长的强烈抑制。

表5:5种鼠细胞系的MOI IC₅₀。

细胞系	适应症	MOI IC ₅₀
Cloudman CL M3	黑色素瘤	0.17
B16F10	黑色素瘤	> 100
A20	B 细胞淋巴瘤	2.00
CT-26	结直肠癌	0.22
MC-38	结直肠癌	0.12

实例4:OncoVex^{mGM-CSF}在小鼠模型中抑制B细胞淋巴瘤和神经母细胞瘤肿瘤的生长

[0144] 在第0天,将A20肿瘤细胞皮下注射到雌性BALB/c小鼠的右侧腹和左侧腹(2x10⁶个

细胞)。使用电子卡尺每周两次(Q2W)测量肿瘤体积(mm^3)。一旦肿瘤达到平均约 100mm^3 ,将小鼠随机分组(每组10只小鼠),使得在处理给予开始时平均肿瘤体积(在两侧腹中)和肿瘤体积的可变性在处理组之间一致。然后在第10、13和16天向小鼠给予三次Oncovex^{mGM-CSF}(3×10^4 – 3×10^6 PFU/剂量)或媒介物的瘤内注射。每周测量临床体征、体重变化和存活期(当肿瘤达到 800mm^3 时从研究中去除小鼠)2–3次直至研究终止。

[0145] 在所有三种剂量: 3×10^4 PFU、 3×10^5 PFU和 3×10^6 PFU下用Oncovex^{mGM-CSF}处理A20荷瘤动物导致所有经直接注射的肿瘤的100%完全消退(图10a)。对侧肿瘤显示出在 3×10^4 PFU剂量下没有反应、 3×10^5 PFU剂量下50%肿瘤生长抑制以及在 3×10^6 PFU剂量下100%肿瘤生长抑制(图10b)。与媒介物相比, 3×10^5 PFU($p=0.0054$)和 3×10^6 PFU剂量($p=0.0004$)组的中值存活期显著增加(分别为38天与21天–图10c)。没有观察到体重减轻,这指示所测试的处理是安全和可耐受的(图10d和图10e)。表6显示了每组中无肿瘤的受试者的百分比。

[0146] 另外,用 5×10^4 、 5×10^5 或 5×10^6 PFU/剂量的Oncovex^{mGM-CSF}处理neuro2a神经母细胞瘤荷瘤小鼠(每组 $n=10$)。在研究第10、13和16天,每天一次通过瘤内注射给予Oncovex^{mGM-CSF}(图10f)。每周测量经注射的肿瘤2次。结果表示为:单个肿瘤体积(mm^3)随时间(天)的变化,其中第0天是肿瘤接种当天。与媒介物相比, 5×10^4 PFU/剂量($p=0.0056$)、 5×10^5 PFU/剂量($p<0.0001$)和 5×10^6 PFU/剂量($p<0.0001$)组中的中值存活期显著增加(图10g)。

[0147] 还评价了Oncovex^{mGM-CSF}处理对neuro2a神经母细胞瘤荷瘤小鼠中未注射(“未处理”)的肿瘤的影响。在第0天,将Neuro2a肿瘤细胞皮下植入雌性A/J小鼠的右侧腹和左侧腹(1×10^6 个细胞)中。使用电子卡尺每周两次(Q2W)测量肿瘤体积(mm^3)。一旦肿瘤达到平均约 100mm^3 ,将小鼠随机分组(每组10只小鼠),使得在处理给予开始时平均肿瘤体积(在两侧腹中)和肿瘤体积的可变性在处理组之间一致。然后在第10、13和16天向小鼠的右侧(“处理”侧)给予三次OncovEX^{mGM-CSF}(5×10^6 PFU/剂量)或媒介物的瘤内注射。每周测量肿瘤体积和存活期(当任一侧肿瘤达到 800mm^3 时从研究中去除小鼠)2次直至研究终止(图10h)。用OncovEX^{mGM-CSF}处理Neuro2a荷瘤动物在8/10经直接注射的肿瘤中导致完全消退(图10h)。对侧未注射(“未处理”)的肿瘤显示出肿瘤生长的显著延迟(图10h)。与媒介物相比,OncovEX^{mGM-CSF}处理组中的中值存活期显著增加(32天与18天, $p<0.0001$,图10i)。

[0148] 这些结果表明,在体内小鼠模型中用Oncovex^{mGM-CSF}处理已建立的B细胞淋巴瘤和神经母细胞瘤肿瘤导致对肿瘤生长的强烈抑制。在经直接注射的肿瘤中(假定经由溶瘤和免疫应答)和在同一宿主中的未注射的对侧肿瘤(假定经由适应性免疫应答)中观察到抗肿瘤活性。

表6.

组	中值存活期	删失的受试者	无肿瘤受试者经注射的	无肿瘤受试者对侧的
媒介物	21	0	1/10	1/10
OncoVex ^{mGM-CSF} 3 x 10 ⁴ PFU	28	0	8/10	0/10
OncoVex ^{mGM-CSF} 3 x 10 ⁵ PFU	38	0	9/10	5/10
OncoVex ^{mGM-CSF} 3 x 10 ⁶ PFU	38	0	10/10	5/10

实例5: OncoVex^{mGM-CSF}和CTLA-4或PD-L1阻断的组合在小鼠模型中抑制B细胞淋巴瘤肿瘤生长

[0149] 在第0天,将A20肿瘤细胞皮下注射到雌性BALB/c小鼠的右侧腹和左侧腹(2x10⁶个细胞)。使用电子卡尺每周两次(Q2W)测量肿瘤体积(mm³)。一旦肿瘤达到平均约100mm³,将动物随机分组(每组10只小鼠),使得在处理给予开始时平均肿瘤体积(在两侧腹中)和肿瘤体积的可变性在处理组之间一致。然后向动物单独给予三次OncoVex^{mGM-CSF}(5x10⁶PFU/剂量)的瘤内注射或与抗PD-L1mAb或抗CTLA-4mAb的腹膜内注射的组合。每周测量临床体征、体重变化和存活期(当肿瘤达到800mm³时从研究中去除小鼠)2-3次直至研究终止。

[0150] 用OncoVex^{mGM-CSF}、抗CTLA-4mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}与抗CTLA-4mAb的组合处理A20荷瘤动物导致所有经直接注射的肿瘤的完全消退(图11a)。仅用腹膜内抗CTLA-4(两侧腹)处理的肿瘤显示出约50%的肿瘤生长抑制。对侧肿瘤单独使用OncoVex^{mGM-CSF}显示出某些一致的效果,而OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4mAb的组合使所有肿瘤消退并导致9/10小鼠完全治愈。与媒介物相比,在抗CTLA-4mAb组、OncoVex^{mGM-CSF}组、以及抗CTLA-4mAb和OncoVex^{mGM-CSF}的组合组中的中值存活期显著增加。另外,与任一种单独的单一药剂相比,在组合组中测量到中值存活期的显著增加(与OncoVex^{mGM-CSF}相比p=0.012,与抗CTLA-4mAb相比p=0.001)。对于媒介物,中值存活期为25.5天,对于OncoVex^{mGM-CSF}组为36.5天,并且对于抗CTLA-4mAb组为32天。过了第40天,组合组的中值存活期仍然未确定,此时10只小鼠中有9只没有显示出肿瘤体征。

(图11b和表7a)。

表7a.

组	中值存活期	无肿瘤受试者经注射的	无肿瘤受试者对侧的
对照	25.5	0/10	0/10
OncoVex ^{mGM-CSF} 5 x 10 ⁶ PFU	36.5	10/10	4/10
mCTLA-4 mAb 30 μg	32	4/10	1/10
OncoVex ^{mGM-CSF} + mCTLA-4 mAb	未确定	9/10	9/10

[0151] 用OncoVex^{mGM-CSF}、抗PD-L1 mAb、或OncoVex^{mGM-CSF}与抗PD-L1 mAb的组合处理A20荷瘤动物导致所有经直接注射的肿瘤的完全消退(图11c)。仅用腹膜内抗PD-L1 mAb(两侧腹)处理的肿瘤显示出对肿瘤生长没有影响。对侧肿瘤单独使用OncoVex^{mGM-CSF}显示出某些一致的效果,而OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-L1 mAb的组合使所有肿瘤消退并导致10/10小鼠完全治愈。OncoVex^{mGM-CSF}和组合组与媒介物相比,中值存活期显著增加。另外,与单独的抗PD-L1 mAb相比,测量到在组合组中的中值存活期的显著增加。当将组合与OncoVex^{mGM-CSF}进行比较时也观察到总存活期的强烈趋势,尽管未观察到统计显著性(与OncoVex^{mGM-CSF}相比p=0.067,与抗PD-L1 mAb相比p=0.0013)。对于媒介物,中值存活期为23天,对于OncoVex^{mGM-CSF}组为48天,并且对于抗PD-L1 mAb组为26天。过了第40天,组合组的中值存活期仍然未确定,此时10只小鼠中有10只没有显示出肿瘤体征。(图11d和表7b)。

表7b

组	中值存活期	删失的受试者	无肿瘤受试者经注射的	无肿瘤受试者非注射的
媒介物	22.5	0	1	2

OncoVex ^{mGM-CSF} 3 x 10 ⁵ PFU	46	0	6	3
PD-L1 (MIH5)	25	1*	1	1
组合	未确定	0	10	10

[0152] 这些结果表明,与单独使用任一种单一药剂相比,用OncoVex^{mGM-CSF}与PD-L1或CTLA-4阻断的组合在体内小鼠模型中处理已建立的B细胞淋巴瘤肿瘤导致更好的肿瘤生长抑制。在经直接注射的肿瘤中(假定经由溶瘤和免疫应答)和在同一宿主中的未注射的对侧肿瘤(假定经由适应性免疫应答)中观察到抗肿瘤活性。

实例6:OncoVex^{mGM-CSF}单独或与CTLA-4或PD-L1阻断组合抑制小鼠模型中结直肠肿瘤的生长

[0153] 在第0天,将CT-26肿瘤细胞皮下注射到雌性BALB/c小鼠的右侧腹和左侧腹(2x10⁶个细胞)。使用电子卡尺每周两次(Q2W)测量肿瘤体积(mm³)。一旦肿瘤达到平均约100mm³,将动物随机分成4组(每组10只小鼠),使得在处理给予开始时平均肿瘤体积(在两侧腹中)和肿瘤体积的可变性在处理组之间一致。然后向动物给予:a) PBS+IgG对照;b) OncoVex^{mGM-CSF}+IgG对照;c) PBS+抗CTLA-4mAb或PBS+抗PD-L1 mAb;或d) OncoVex^{mGM-CSF}+抗CTLA-4mAb或OncoVex^{mGM-CSF}+抗PD-L1mAb。每周测量临床体征、体重变化和存活期(当肿瘤达到800mm³时从研究中去除小鼠)2-3次直至研究终止。

[0154] 用OncoVex^{mGM-CSF}、抗CTLA-4mAb或其组合处理CT-26荷瘤动物在第20天导致所有经直接注射的肿瘤的约75%肿瘤生长抑制(数据未显示)。对侧肿瘤显示对单独OncoVex^{mGM-CSF}没有反应(约25%TGI),而在抗CTLA-4mAb和组合组中观察到约75%肿瘤生长抑制。抗CTLA-4mAb和组合组与媒介物相比,中值存活期显著增加(图12b)。对于媒介物,中值存活期为20天,OncoVEX^{mGM-CSF}为22天,并且抗CTLA-4组为41天。对于组合,中值存活期超过50天,并且在实验停止时仍然未确定。组合组中的中值存活期显著长于单独OncoVex^{mGM-CSF}(p=0.0001)或抗CTLA-4mAb(p=0.0031)组。(图12b和表8a)。

表8a.

组	中值存活期	无肿瘤受 试者 经注射的	无肿瘤受 试者 对侧的
对照	20	0/10	0/10
OncoVex ^{mGM-CSF} 5 x 10 ⁶ PFU	22	1/10	0/10
mCTLA-4 mAb 30 μg	41	2/9	2/9
OncoVex ^{mGM-CSF} + mCTLA-4 mAb	未确定	10/10	6/10

[0155] 用OncoVex^{mGM-CSF}、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-L1 mAb的组合处理CT-26荷瘤动物在第18天导致所有经直接注射的肿瘤的约75%肿瘤生长抑制(数据未显示)。腹膜内注射抗PD-L1 mAb对肿瘤生长(任一侧腹)几乎没有影响。对侧肿瘤显示对单独OncoVex^{mGM-CSF}或抗PD-L1 mAb没有反应,而在组合组中观察到约75%的肿瘤生长抑制(图12c)。组合组与任何一种单独的药剂相比,中值存活期显著增加(与OncoVex^{mGM-CSF}相比, $p=0.012$,与抗PD-L1mAb相比, $p=0.007$)。媒介物和抗PD-L1 mAb组的中值存活期为21天,OncoVex^{mGM-CSF}为23天,并且组合组为34天。(图12d和表8b)。

表8b.

组	中值存活期	无肿瘤受试者经注射的	无肿瘤受试者对侧的
对照	21	0	0
OncoVex ^{mGM-CSF} 5 x 10 ⁶ PFU	23	1	0
PD-L1 (MIH5) 300 μg	21	0	0
OncoVex ^{mGM-CSF} + PD-L1 (MIH5)	34	5	1

[0156] 这些结果表明,在体内小鼠模型中采用以下项处理已建立的结直肠癌肿瘤:1) OncoVex^{mGM-CSF};2) OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4阻断的组合;或3) OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-L1阻断的组合导致对肿瘤生长的强烈抑制。采用以下项在经直接注射的肿瘤中观察到抗肿瘤活性(假定经由溶瘤和免疫应答):1) OncoVex^{mGM-CSF};2) OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4阻断的组合;和3) OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-L1阻断的组合。采用以下项在同一宿主的未注射对侧肿瘤中观察到抗肿瘤活性(假定经由适应性免疫应答):1) OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4阻断的组合;和2) OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-L1阻断的组合。

[0157] 为了进一步了解OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4阻断的组的抗肿瘤活性,评价了:1) OncoVex^{mGM-CSF};2) 抗CTLA-4阻断;3) OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4阻断的组合释放肿瘤抗原和刺激抗肿瘤特异性T细胞应答的能力。用纯化的抗IFN- γ (2 μ g/ml) 抗体涂覆具有硝酸纤维素过滤器基部(MillititerHA;密理博(Millipore),特曼库拉,加利福尼亚州)的96孔ELISpot板。将来自第10天的OncoVex^{mGM-CSF}、抗CTLA-4mAb或组合处理的CT-26荷瘤小鼠的脾细胞(8x10⁵)与最终浓度为1 μ M的对照肽(GFP)或AH1肽(SPSYVYHQF)在37 $^{\circ}$ C下一起孵育20小时。AH1肽是免疫显性Ag,其衍生自由MHC I类L^d分子(25)呈递的内源性鼠白血病病毒的包膜蛋白(gp70)。使用CTL6 Fluorospot分析仪(CTL,夏克海茨,俄亥俄州)计数斑点。使用FACS通过ELISpot或通过dextramer染色对全身性(脾)抗AH1 CD8⁺T细胞的定量表明在用OncoVex^{mGM-CSF}、CTLA-4阻断、或OncoVex^{mGM-CSF}和CTLA-4阻断的组合处理的小鼠中AH1反应性T细胞的显著增加(图12e,图12f)。局部(肿瘤)抗AH1 CD8⁺T细胞的定量仅在组合组中显示出显著增加。在CT-26模型中也观察到Treg的显著降低。在与CTLA-4阻断的组合中这种作用更大(图12g)。此实验表明,OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4阻断的组合导致效应细胞的存在增加和调节性T细胞的存在减少,这反过来导致组合与任一种单独的化合物相比功效增加。

实例7:OncoVex^{mGM-CSF}单独或与CTLA-4阻断组合抑制小鼠模型中黑色素瘤肿瘤的生长

[0158] 在第0天静脉内注射B16F10细胞 (5×10^4 -由于缺乏HSV-1进入受体对OncoVex^{mGM-CSF}裂解具有抗性)。在第2天,将用小鼠粘连蛋白1(对OncoVex^{mGM-CSF}裂解敏感)转染的B16F10黑色素瘤细胞皮下注射至雌性BL6小鼠的右侧腹。使用电子卡尺每周两次(Q2W)测量肿瘤体积(mm^3)。一旦皮下肿瘤达到平均约 100mm^3 ,将动物随机分成四组(每组10只小鼠),使得在处理给予开始时平均肿瘤体积和肿瘤体积的可变性在处理组之间一致。然后向动物给予三次OncoVex^{mGM-CSF} (5×10^6 PFU/剂量)的瘤内注射、四次抗CTLA-4mAb的腹膜内注射、三次OncoVex^{mGM-CSF} (5×10^6 PFU/剂量)的瘤内注射与四次抗CTLA-4mAb的腹膜内注射的组合、或者单独的媒介物。每周测量临床体征、体重变化和存活期(当肿瘤达到 800mm^3 时从研究中去除小鼠)2-3次直至研究终止。

[0159] 用OncoVex^{mGM-CSF}、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4mAb的组合处理B16F10粘连蛋白1荷瘤小鼠分别导致约85%和99%肿瘤(皮下)生长抑制。单独用抗CTLA-4mAb未观察到抑制(图13a)。肺转移瘤负荷的评估显示OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4mAb的组合在抑制肺转移瘤方面比任一种单独的处理显著更有效(与OncoVex^{mGM-CSF}相比 $p=0.0008$,与抗CTLA-4mAb相比 $p=0.0007$) (图13b)。组合组与媒介物相比,中值存活期显著增加($p<0.0001$)。媒介物的中值存活期为30天,并且OncoVex^{mGM-CSF}加上抗CTLA-4mAb组为46天(图13c和表9)。

表9.

组 (n = 10)	处理	肿瘤	mOS (天)
1	IV 对照	仅肺	30
2	OncoVex ^{mGM-CSF} + CTLA-4	SC 和肺	46

[0160] 这些结果表明,用OncoVex^{mGM-CSF}、或OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4mAb的组合在体内小鼠模型中处理已建立的黑色素瘤肿瘤导致对肿瘤生长的强烈抑制。这些结果还显示,与任一种单独的处理相比,OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4mAb的组合展示出显著更强的全身性抗肿瘤作用,如该组合抑制肺转移瘤的能力所证明的。在经直接注射的肿瘤中(假定经由溶瘤和免疫应答)和在同一宿主中的未注射的对侧肿瘤(假定经由适应性免疫应答)中观察到抗肿瘤活性。

[0161] 还观察到在媒介物、OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4mAb组中肺肿瘤显示出在肿瘤周围罕见至分散的T和B细胞和轻度瘤内巨噬细胞。有趣的是,在OncoVex^{mGM-CSF}和抗CTLA-4mAb组合组中肿瘤显示出在肿瘤周围突出的T细胞以及T细胞以不同的数量浸润至肿瘤中。巨噬细胞在肿瘤中和肿瘤周围的致密细胞浸润物中都很突出。B细胞仅保留在肿瘤周围(图13d并且数据未显示)。

[0162] 这些肺肿瘤免疫浸润结果指示,OncoVex^{mGM-CSF}和CTLA-4阻断的组合可以将转化的浸润不良的B16F10转移瘤(即“冷”肿瘤)转化为浸润良好的B16F10转移(即“热”肿瘤)。

实例8:OncoVex^{mGM-CSF}在小鼠模型中抑制三阴性乳腺癌肿瘤的生长

[0163] 在第0天,将4T1肿瘤细胞皮下注射到雌性BALB/c小鼠的右侧腹(2×10^6 个细胞)。使

用电子卡尺每周两次 (Q2W) 测量肿瘤体积 (mm^3)。一旦肿瘤达到平均约 100mm^3 , 将动物随机分成四组 (每组10只小鼠), 使得在处理给予开始时平均肿瘤体积和肿瘤体积的可变性在处理组之间一致。然后向动物给予三个 OncoVex^{mGM-CSF} (5×10^4 、 5×10^5 或 5×10^6 PFU/剂量) 的瘤内注射或媒介物的瘤内注射。每周测量临床体征、体重变化和存活期 (当肿瘤达到 800mm^3 时从研究中去除小鼠) 2-3次直至研究终止。

[0164] 以 5×10^6 PFU/剂量组用 OncoVex^{mGM-CSF} 处理 4T1 荷瘤动物导致约 75% 肿瘤生长抑制 ($p < 0.0001$)。 5×10^4 和 5×10^5 剂量的 OncoVex^{mGM-CSF} 未导致任何可测量的肿瘤生长抑制 (图 14)。

[0165] 这些结果表明, 用 OncoVex^{mGM-CSF} 处理已建立的三阴性乳腺癌肿瘤导致对肿瘤生长的强烈抑制。仅在经直接注射的肿瘤中测量到抗肿瘤活性。

实例 9: OncoVex^{mGM-CSF} 单独或与 GITR 激动剂的组合在小鼠模型中抑制 B 细胞淋巴瘤肿瘤的生长

[0166] 在第 0 天, 将 A20 肿瘤细胞皮下注射到雌性 BALB/c 小鼠的右侧腹和左侧腹 (2×10^6 个细胞)。使用电子卡尺每周两次 (Q2W) 测量肿瘤体积 (mm^3)。一旦肿瘤达到平均约 100mm^3 , 将动物随机分成 4 组 (每组 10 只小鼠), 使得在处理给予开始时平均肿瘤体积 (在两侧腹中) 和肿瘤体积的可变性在处理组之间一致。然后向动物给予 OncoVex^{mGM-CSF}、或 OncoVex^{mGM-CSF} 和抗 GITRmAb 的组合。每周测量临床体征、体重变化和存活期 (当肿瘤达到 800mm^3 时从研究中去除小鼠) 2-3 次直至研究终止。

[0167] 用腹膜内抗 GITR mAb 处理的肿瘤治愈了 30% 的肿瘤 (经注射的和对侧的)。 OncoVex^{mGM-CSF} 治愈了 6/10 (60%) 经注射的肿瘤, 而对侧肿瘤显示出适度的反应, 但没有治愈。 OncoVex^{mGM-CSF} 和抗 GITR mAb 的组合使所有肿瘤 (注射和对侧) 消退并导致 7/10 小鼠完全治愈。参见图 15a。与媒介物相比, 在抗 GITR mAb 组、OncoVex^{mGM-CSF} 组、以及 OncoVex^{mGM-CSF} 组和抗 GITRmAb 的组合中的中值存活期显著增加。另外, 与任一种单独的单一药剂相比, 在 OncoVex^{mGM-CSF} 组和抗-GITRmAb 组合组中测量到中值存活期的显著增加 (与 OncoVex^{mGM-CSF} 相比 $p < 0.0001$, 与抗 GITR mAb 相比 $p = 0.039$)。对于媒介物, 中值存活期为 24 天, OncoVex^{mGM-CSF} 组为 26 天, 并且抗 GITRmAb 组为 43 天。过了第 49 天, 组合组的中值存活期仍然未确定, 此时 10 只小鼠中有 7 只没有显示出肿瘤体征。参见图 15b 和表 10。

表 10.

组	中值存活期	无肿瘤受试者经注射的	无肿瘤受试者对侧的
对照	24	0/10	0/10
OncoVex ^{mGM-CSF} 3×10^5 PFU	26	6/10	0/10

mGITR mAb 100 ug	43	4/10	3/10
OncoVex ^{mGM-CSF} + mGITR mAb	未确定	8/10	7/10

[0168] 这些结果表明,用OncoVex^{mGM-CSF}、以及OncoVex^{mGM-CSF}和抗GITRmAb的组合处理B细胞淋巴瘤肿瘤导致对肿瘤生长的强烈抑制。

实例10: 在小鼠结肠(结直肠)腺癌(MC-38)肿瘤模型中评价OncoVex^{muGM-CSF}与PD-1抑制的组的研究

[0169] 设计此研究以评价OncoVex^{muGM-CSF}、PD-1抑制、或OncoVex^{muGM-CSF}和PD-1抑制的组合在小鼠MC-38肿瘤模型中的耐受性和抗肿瘤活性。

[0170] 对C57BL/6小鼠在右侧腹和左侧腹均接种同基因MC-38肿瘤细胞。接种后十天,肿瘤平均直径为5mm(肿瘤体积为60mm³),并将动物分成6组(n=10/组)。将OncoVEX^{muGM-CSF}(5x10⁶PFU/剂量)或配制品缓冲液对照每天一次瘤内给药至右侧肿瘤中,每三天共三个剂量。左侧肿瘤未接受注射。

[0171] 从研究第10天开始,每周两次以1mg/剂量或300μg/剂量腹膜内给予抗小鼠PD-1(克隆RMP1-14,BioXCell)或同种型对照抗体(大鼠IgG2a,克隆2A3,BioXCell)并在研究第30天结束(给予7个剂量)。经注射(右侧)的肿瘤和未注射(左侧)的肿瘤的肿瘤体积、体重和总体临床观察结果每周收集2-3次。如果总肿瘤体积(右+左)达到IACUC规定的截断值>体重的10%或者如果动物表现出危难体征,则对动物实施安乐死。在研究的第14天和第20天(分别在开始给药后4天和10天)抽取外周血用于免疫表型分型分析。红细胞裂解后,针对以下标记物将白细胞染色:CD3、CD4、CD8、CD25、CD49b(NK标记物)、FoxP3、GITR、PD-1和PD-L1,并通过流式细胞术分析。

[0172] 所有动物在实验中均存活,并且未显示出与处理相关的不良健康影响的证据,如体重(图16a)或存活期所证明的,并且在日常健康监测检查中未发现值得注意的不良临床体征。与对照组相比处理组中体重略低,这归因于如下所述与经处理的动物相比对照动物的更强的肿瘤生长。

[0173] 观察到响应于采用抗mPD-1抗体(在两种测试剂量300μg和1mg/剂量下)或OncoVEX^{muGM-CSF}的单一疗法处理的肿瘤生长抑制(图16b)。表11总结了在实验结束时在右(注射侧)或左(未注射侧)侧腹无肿瘤(消退)的动物数量。尽管任一种药剂的单一药剂活性限于经注射肿瘤中10%-20%完全消退(并且在未注射的肿瘤中没有完全消退),但组合导致经注射的肿瘤的80%-90%消退(并且在未注射的肿瘤中10%-20%完全消退)。这些数据指示,采用OncoVEX^{muGM-CSF}和抗PD-1的组合疗法导致小鼠MC-38肿瘤模型中肿瘤清除率的显著改善。

表11. 表现出完全消退的动物数量

组	经注射的肿瘤	未注射的肿瘤
媒介物 + 同种型	0/10	0/10
OncoVEX ^{muGM-CSF} + 同种型	2/10	0/10
媒介物 + 抗PD-1 (1 mg)	1/10	0/10
媒介物 + 抗PD-1 (300 μg)	1/10	0/10
OncoVEX ^{muGM-CSF} + 抗PD-1 (1 mg)	8/10	2/10
OncoVEX ^{muGM-CSF} + 抗PD-1 (300 μg)	9/10	1/10

[0174] 这些结果表明, OncoVex^{mGM-CSF} 单独或与PD-1阻断组合抑制结直肠MC-38肿瘤的生长。

实例11: 在小鼠结肠(结直肠)腺癌(MC-38)肿瘤模型中评价OncoVEX^{muGM-CSF}与PD-L1抑制的组合的研究

[0175] 设计此研究以评价OncoVEX^{muGM-CSF}、PD-L1抑制、或OncoVEX^{muGM-CSF}和PD-L1抑制的组合在小鼠MC-38肿瘤模型中的耐受性和抗肿瘤活性。

[0176] 在第0天, 将MC-38肿瘤细胞皮下注射到雌性C57BL/6小鼠的右侧腹和左侧腹。使用电子卡尺每周两次(Q2W)测量肿瘤体积(mm³)。一旦肿瘤达到平均约100mm³, 将动物随机分成4组(每组10只小鼠), 使得在处理给予开始时平均肿瘤体积(在两侧腹中)和肿瘤体积的可变性在处理组之间一致。将OncoVex^{mGM-CSF} (5x10⁶PFU/剂量) 或配制品缓冲液对照单独或者与抗PD-L1 mAb(克隆MIH5, 小鼠IgG1) 或对照IgG1 (mAb总共给药四次)的腹膜内注射组合每三天进行瘤内给予(在动物的右侧), 共三次注射。未注射的肿瘤(对侧; 在动物的左侧)未接受注射。每周测量临床体征、体重变化和存活期(当肿瘤达到800mm³时从研究中去除小鼠) 2-3次直至研究终止。

[0177] 所有动物在实验中均存活, 并且未显示出与处理相关的不良健康影响的证据, 如体重所证明的, 并且在日常健康监测检查中未发现值得注意的不良临床体征。

[0178] 在经注射和对侧肿瘤中均观察到响应于采用OncoVex^{mGM-CSF}或抗PD-L1 mAb的单一疗法处理的肿瘤生长抑制(图17), 而OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-L1 mAb的组合消退了所有经注射的肿瘤和10个未注射的肿瘤中的7个(图17)。

实例12: 在小鼠黑色素瘤(B16F10)肿瘤模型中评价OncoVEX^{muGM-CSF}与PD-1抑制的组合的研究

[0179] 设计此研究以评价OncoVEX^{muGM-CSF}、PD-1抑制、或OncoVEX^{muGM-CSF}和PD-1抑制的组合在小鼠黑色素瘤B16F10肿瘤模型中的耐受性和抗肿瘤活性。

[0180] 在第0天, 将工程化为表达mNectin的B16F10肿瘤细胞皮下注射至雌性C57BL/6小鼠的右侧腹中。使用电子卡尺每周两次(Q2W)测量肿瘤体积(mm³)。一旦肿瘤达到平均约100mm³, 将动物随机分成4组(每组10只小鼠), 使得在处理给予开始时平均肿瘤体积和肿瘤

体积的可变性在处理组之间一致。将OncoVex^{mGM-CSF} (5x10⁶PFU/剂量) 或配制品缓冲液对照单独或者与抗PD-1mAb (克隆29F1A12, 小鼠IgG1) 或对照IgG1 (mAb总共给药四次) 的腹膜内注射组合每三天瘤内给药三次。每周测量临床体征、体重变化和存活期 (当肿瘤达到800mm³时从研究中去除小鼠) 2-3次直至研究终止。

[0181] 所有动物在实验中均存活, 并且未显示出与处理相关的不良健康影响的证据, 如体重所证明的, 并且在日常健康监测检查中未发现值得注意的不良临床体征。

[0182] 观察到响应于采用OncoVex^{mGM-CSF}单一疗法的单一疗法处理的肿瘤生长抑制 (10只小鼠中有3只显示肿瘤消退), 而抗PD-1mAb单一疗法对肿瘤生长没有任何抑制作用 (图18)。OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-1mAb的组合使10个经注射的肿瘤中的5个消退 (图18), 这表明与单一疗法相比, OncoVex^{mGM-CSF}和抗PD-1mAb组合具有优异的抗肿瘤活性。

实例13: 用于评价拉他莫金在患有适合直接注射的晚期非中枢神经系统肿瘤的小儿受试者中的安全性和有效性的1期多中心开放标签的剂量递减研究

[0183] 此实例描述了用于评价拉他莫金在患有适合直接注射的晚期非中枢神经系统肿瘤的小儿受试者中的安全性和有效性的1期多中心开放标签的剂量递减研究。参见美国国立卫生研究院网站 (clinicaltrials.gov), 研究标识码: NCT 02756845 (将其通过引用并入本文)。

[0184] 该研究的主要目的是确定拉他莫金在患有适合直接注射的晚期非中枢神经系统 (CNS) 肿瘤的小儿受试者中的安全性和耐受性, 如通过剂量限制性毒性 (DLT) 的发生率所评估的。

[0185] 将拉他莫金给予至患有适合直接注射的晚期非CNS肿瘤的18至36名小儿受试者。小儿受试者全部登记在按年龄和基线单纯疱疹病毒1型 (HSV-1) 血清状况 (3至6名受试者/群组) 分层的群组中。将根据此群组中3至6名DLT可评价受试者来评价DLT。

[0186] 主要结果衡量指标是确定拉他莫金在患有适合直接注射的晚期非中枢神经系统 (CNS) 肿瘤的小儿受试者中的安全性和耐受性, 如通过剂量限制性毒性 (DLT) 的发生率所评估的。

[0187] 次要结果衡量指标是 (1) 评价拉他莫金的抗肿瘤活性, 如通过总反应率 (ORR)、反应持续时间 (DOR)、达到反应的时间 (TTR)、进展时间 (TTP)、使用实体瘤中经修改的免疫有关反应标准模拟反应评价标准 (modified Immune-related Response Criteria Simulating Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, irRC-RECIST) 的无进展存活期 (PFS) 和总存活期 (OS) 所评估的, 以及 (2) 评价在归档肿瘤组织中粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 受体/亚基与临床结果 (安全性终点和功效终点如ORR、DOR、TTR、TTP、PFS和OS) 之间的关联。

[0188] 纳入标准:

- 当受试者在法律上太年轻而不能提供知情同意书/允许书时, 受试者的法律上可接受的代表已提供知情同意书/允许书, 并且受试者在开始任何特定于研究的活动/程序之前已根据当地法规和/或指南提供书面同意书。

- 在填写知情同意书/允许书时年龄为0至<18岁的男性或女性受试者
- 应愿意在登记前28天内提交当地的HSV-1血清状况
- 组织学或细胞学证实的非CNS实体瘤, 该非CNS实体瘤在标准疗法后复发, 或者对于

它没有可用的标准疗法

- 存在可测量的(按照irRC-RECIST确定的)或如通过经修改的irRC-RECIST所确定的不可测量的病变

- 受试者必须是病灶内注射的候选者,如以下中的一项或多项所确定的:

- 至少1个可注射病变的最长直径 $\geq 10\text{mm}$

- 以聚集体形式的多个可注射病变具有最长直径 $\geq 10\text{mm}$

注释:内脏病变不符合注射条件。另外,除非存在适合注射的软组织组分,否则骨病变不符合注射条件

- 体力状态:

- 对于12至 <18 岁,Karnofsky $\geq 70\%$

- 对于0至 <12 岁的儿童,兰斯基游戏量表 $\geq 70\%$

- 预期寿命 $>$ 自登记之日起4个月

- 如下所定义的充分的器官功能:

- 血液学(不需要造血生长因子)

- 绝对嗜中性粒细胞计数(ANC) $\geq 1.0 \times 10^9/\text{L}$

- 血小板计数 $\geq 75 \times 10^9/\text{L}$

- 血红蛋白 $\geq 8\text{g/dL}$ (无需输血支持)

- 肾

- 血清肌酐 $\leq 1.5\text{x}$ 对于年龄而言正常的上限(ULN),或针对肌酐水平 $>1.5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN的受试者,肌酐清除率 $\geq 60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 。(注意如果基线血清肌酐 $\leq 1.5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN,则无需确定肌酐清除率。肌酐清除率应根据机构标准确定)。

- 肝

- 血清胆红素 $\leq 1.5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN,或针对总胆红素水平 $>1.5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN的受试者,直接胆红素 \leq 对于年龄而言的ULN

- 天冬氨酸氨基转移酶(AST) $\leq 2.5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN,或针对患有肝转移瘤的受试者, $\leq 5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN

- 丙氨酸氨基转移酶(ALT) $\leq 2.5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN,或针对患有肝转移瘤的受试者, $\leq 5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN

- 凝血

- 国际标准化比率(INR)或凝血酶原时间(PT) $\leq 1.5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN

- 部分促凝血酶原激酶时间(PTT)或激活的部分促凝血酶原激酶时间(aPTT) $\leq 1.5\text{x}$ 对于年龄而言的ULN

- 在给药前72小时内,具有生育潜力的女性受试者应具有阴性的尿液或血清妊娠测试。如果尿检呈阳性或不能确认为阴性,则需要血清妊娠测试。

[0189] 排除标准

- 诊断为白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病或其他恶性血液病

- 在登记前6周内对骨髓进行了放射疗法,或者在登记前3个月内如果先前接受了对颅脊柱轴或至少60%骨盆的放射疗法;在登记前2周内如果接受了局部姑息放射疗法

- CNS肿瘤或临床活跃的脑转移瘤

- 原发性眼部或粘膜黑色素瘤
- 巨大先天性黑素细胞痣、发育不良痣综合征或着色性干皮病的病史或证据
- 过去5年内其他恶性肿瘤的病史,但有以下例外:
 - 以治愈目的治疗的并且没有已知的活性疾病存在的恶性肿瘤,并且在登记前>5年没有接受化学疗法,并且治疗医生认为复发的风险低
 - 需要全身性治疗(即使用疾病调节剂、皮质类固醇或免疫抑制药物)的活性自身免疫型疾病的病史或证据。替代疗法(例如,针对肾上腺或垂体功能不全的甲状腺素、胰岛素或生理性皮质类固醇替代疗法等)不被认为是全身性治疗的形式。
 - 临床上显著的免疫抑制的证据,如下:
 - 原发性免疫缺陷状态,如严重联合免疫缺陷病
 - 并行的机会性感染
 - 接受全身性免疫抑制疗法(登记前>2周),包括口服类固醇剂量(维持生理学替代除外)。需要间歇性使用类固醇进行吸入或局部类固醇注射的受试者不被排除在本研究之外。
 - 活性疱疹性皮肤病变或先前的疱疹感染并发症(如疱疹性角膜炎或脑炎)
 - 先前使用拉他莫金或任何其他溶瘤病毒进行治疗
 - 先前用肿瘤疫苗治疗
 - 除了间歇性局部使用外,需要使用抗疱疹药物(例如阿昔洛韦)进行间歇性或长期治疗
- 先前在登记前28天内进行化学疗法、放射疗法或生物癌症疗法,或由于在登记前28天以上给予的癌症疗法而尚未从不良事件恢复到不良事件通用术语标准(Common Terminology Criteria for Adverse Events,CTCAE)1级或更好
- 目前正在另一个研究设备或药物研究中接受治疗,或者在另一个研究设备或一个或多个药物研究结束治疗后不到28天。参与本研究的其他研究程序不包括在内。
 - 大型手术≤登记前28天
 - 除了局部姑息性放射治疗外,预计在研究期间需要其他癌症疗法
 - 患有急性或慢性活动性乙型肝炎病毒或丙型肝炎病毒感染或在开始研究治疗的12周内接受核苷酸类似物(如用于治疗乙型肝炎病毒的那些(如拉米夫定、阿德福韦、替诺福韦、替比夫定和恩替卡韦))、利巴韦林或干扰素α的治疗。
 - 已知或怀疑的人类免疫缺陷病毒(HIV)感染
 - 在登记前28天内接种活疫苗
 - 除了需要维持静脉导管通畅所需的低剂量肝素外,在拉他莫金注射前7天内不允许使用抗血小板或抗凝药物
 - 女性受试者怀孕或哺乳,或计划在研究治疗期间和最后一剂拉他莫金后3个月怀孕
 - 在研究治疗期间以及最后一剂拉他莫金后3个月内不愿使用一种或多种可接受的有效避孕方法的具有生育潜力的女性受试者。注释:可接受的有效避孕方法在知情同意书/允许书的形式定义。在当地法律法规要求的情况下,在协议的附录部分末尾,可以在国家特定的协议补充中概述另外的国家特定的避孕要求。
- 性活跃受试者及其伴侣不愿意使用男性或女性乳胶避孕套以避免在治疗期间和使用拉他莫金治疗后30天内性接触过程中潜在的病毒传播

- 受试者已经知道在给药期间对任何待给予的产品或组分的敏感性
- 根据受试者和研究者的最佳了解,受试者可能无法完成所有方案要求的研究访问或程序和/或遵守所有必需的研究程序
 - 研究者或安进 (Amgen) 医生认为 (如果被咨询的话) 会对受试者安全性构成风险或干扰研究评价、程序或完成的任何精神障碍、药物滥用或任何其他临床上显著的障碍、病症或疾病 (上述概述的除外) 的病史或证据
 - 在拉他莫金治疗过程中和最后一剂拉他莫金后28天内不愿意最小化他/她的血液或其他体液暴露于具有高风险的HSV-1诱导的并发症的个体 (免疫抑制的个体、HIV阳性个体、妊娠女性或1岁以下的儿童) 的受试者

[0190] 通过包含和排除标准的定义,通过仅病灶内注射将拉他莫金给予至可注射的皮肤、皮下、淋巴结和其他非内脏肿瘤中。因此,本研究的预期合格肿瘤类型如下:

- 骨肉瘤: 尤因和骨肉瘤
- 软组织肉瘤: 横纹肌肉瘤和非横纹肌肉瘤软组织肉瘤
- 神经母细胞瘤
- 黑色素瘤

[0191] 在第1天给予的第一剂量的拉他莫金将高达4.0mL的 10^6 PFU/mL。在初始注射后21 (+3) 天 (即,不早于第22天,但应在21天时间点不延迟超过3天),将给予高达4.0mL的 10^8 PFU/mL (或高达4.0mL的 10^6 PFU/mL,对于剂量递减群组) 的第二次注射。所有后续注射,每14 (\pm 3) 天将给予高达4.0mL的 10^8 PFU/mL (或高达4.0mL的 10^6 PFU/mL,对于剂量递减的群组)。由于毒性,治疗周期间隔可以增加。对于任何单个病变和在任何治疗中,以任何剂量给予的拉他莫金的最大体积为4.0mL。待注射至一种或多种肿瘤中的拉他莫金的推荐体积取决于该一种或多种肿瘤的大小,并且将根据表12中的注射体积指南来确定。建议每个病变应在每次就诊时接受根据肿瘤特性的可注射的最大量,然后使用下文的优先级模型和基于每个肿瘤大小的注射体积指南再转到下一个病变。

表12. 基于肿瘤大小的拉他莫金注射体积指南

肿瘤大小 (最长尺寸)	最大注射体积
> 5.0 cm	4.0 mL
> 2.5 cm 至 5.0 cm	2.0 mL
> 1.5 cm 至 2.5 cm	1.0 mL
> 0.5 cm 至 1.5 cm	0.5 mL
\leq 0.5 cm	0.1 mL

[0192] 在每个治疗日,建议注射的优先次序如下:

1. 自上次注射后出现的任何新的可注射肿瘤
2. 按肿瘤大小,从最大的肿瘤开始
3. 先前在肿瘤评估中看到的太小而无法注射,但现在已经大到可以注射的任何肿瘤

[0193] 受试者将用拉他莫金治疗,直至受试者已实现完全反应 (CR)、不存在可注射的肿

瘤、根据经修改的irRC-RECIST确认的进行性疾病(PD)、研究治疗的不耐受、从第一剂量的拉他莫金之日起24个月、需要替代的抗癌疗法或研究结束,先发生者为准。由于作用机制,受试者可能在拉他莫金的最大临床益处之前经历现有肿瘤的生长或新肿瘤的出现。因此,经修改的irRC-RECIST将用于反应评估。

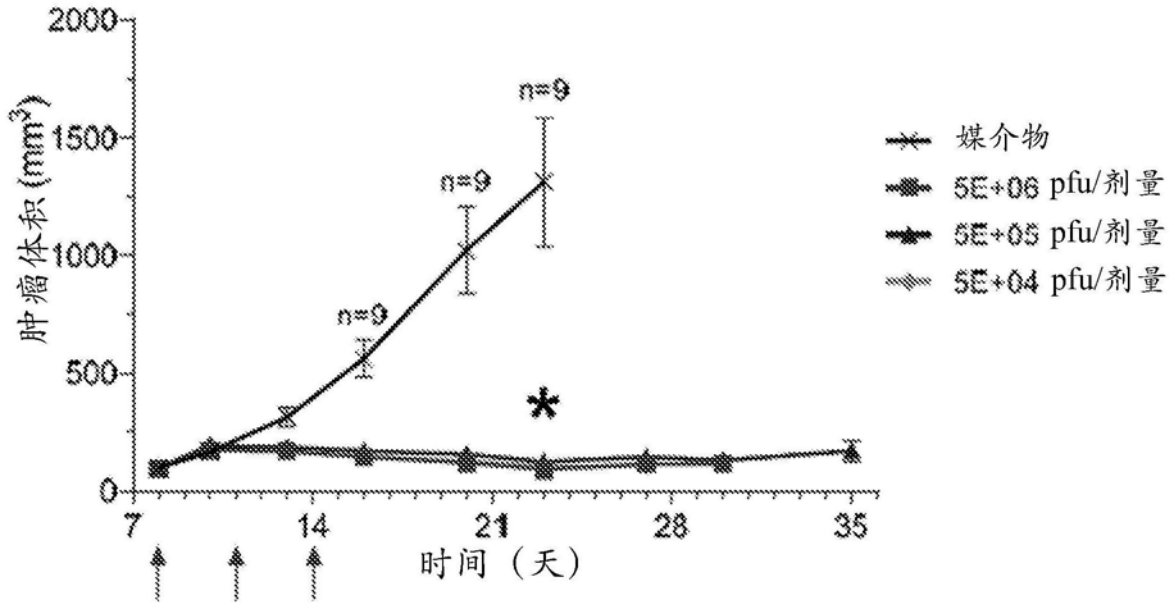


图1

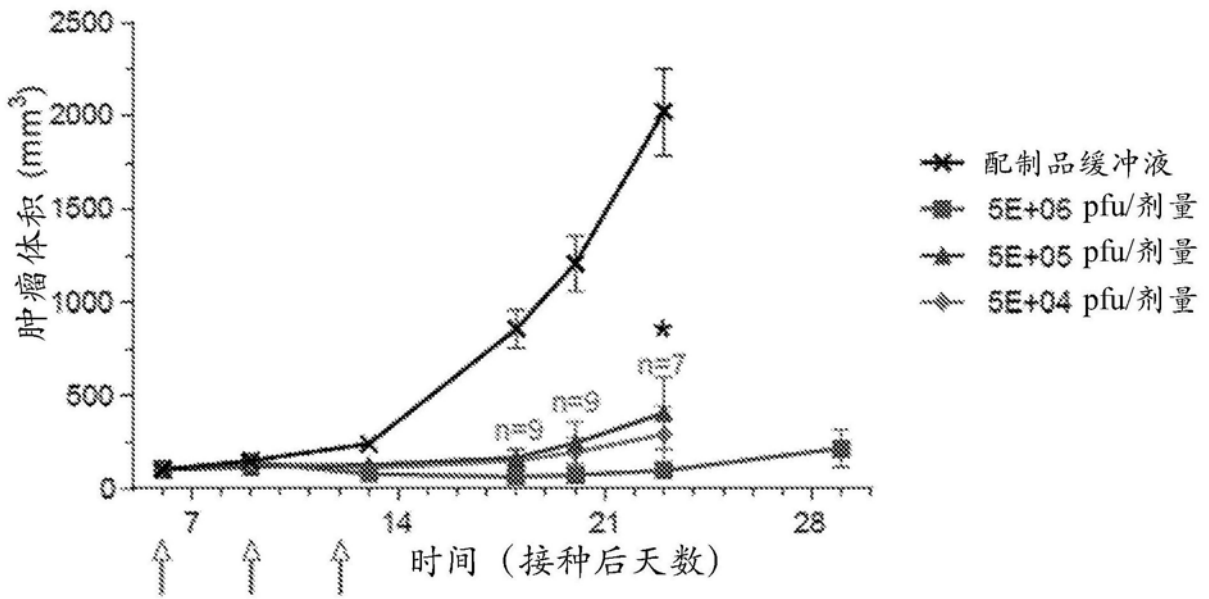


图2

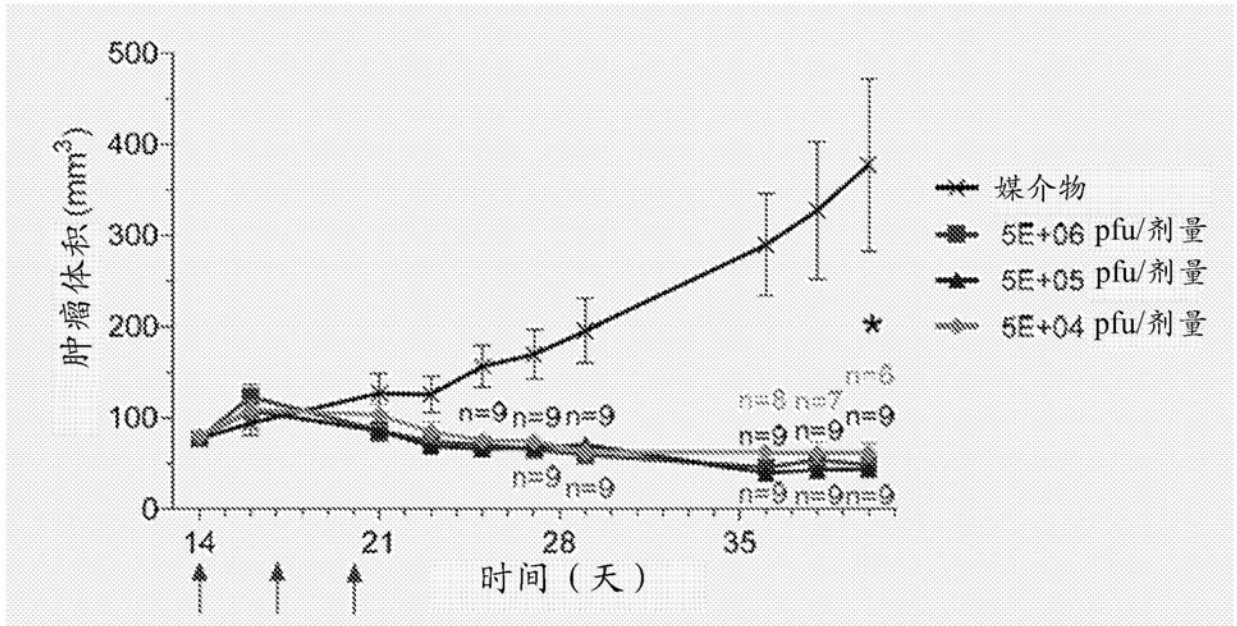


图3

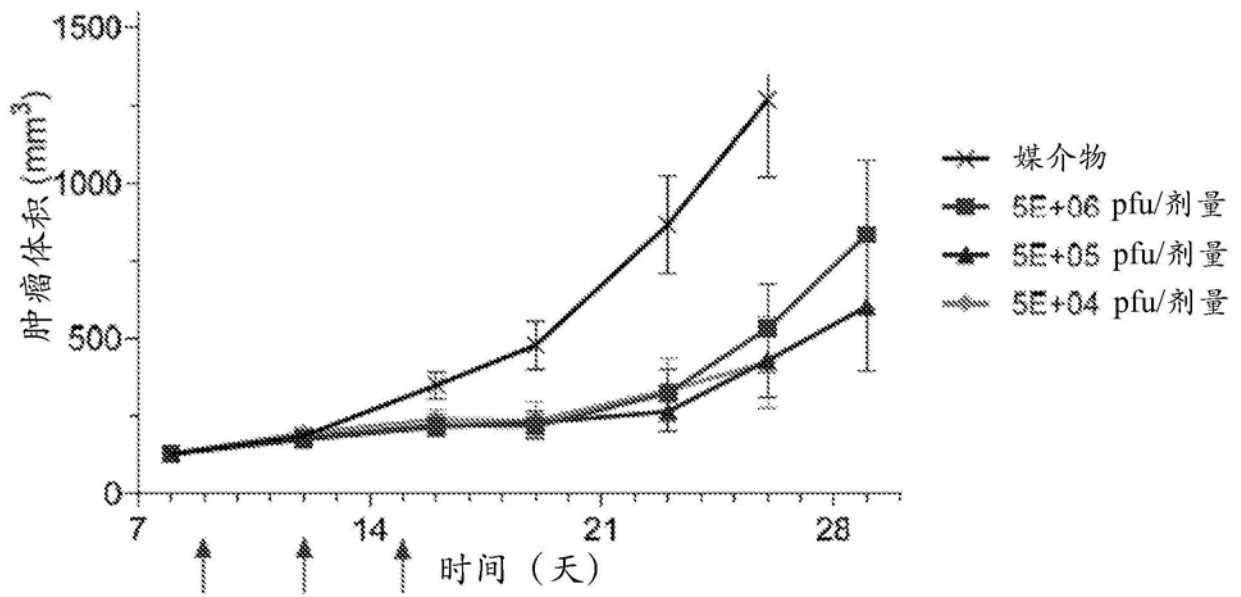


图4

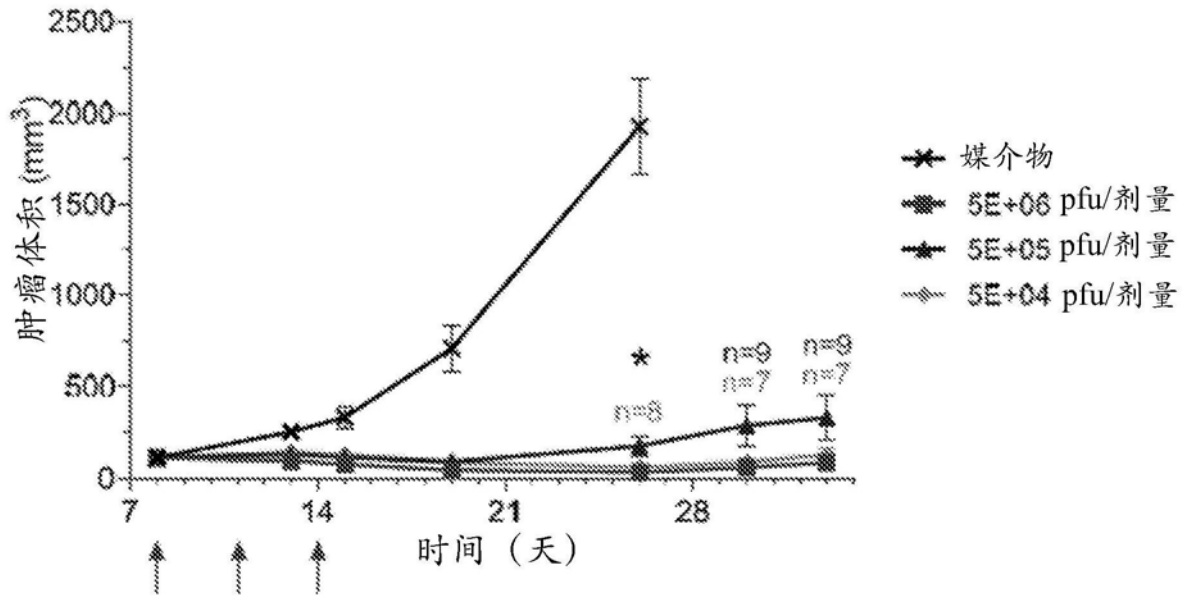


图5

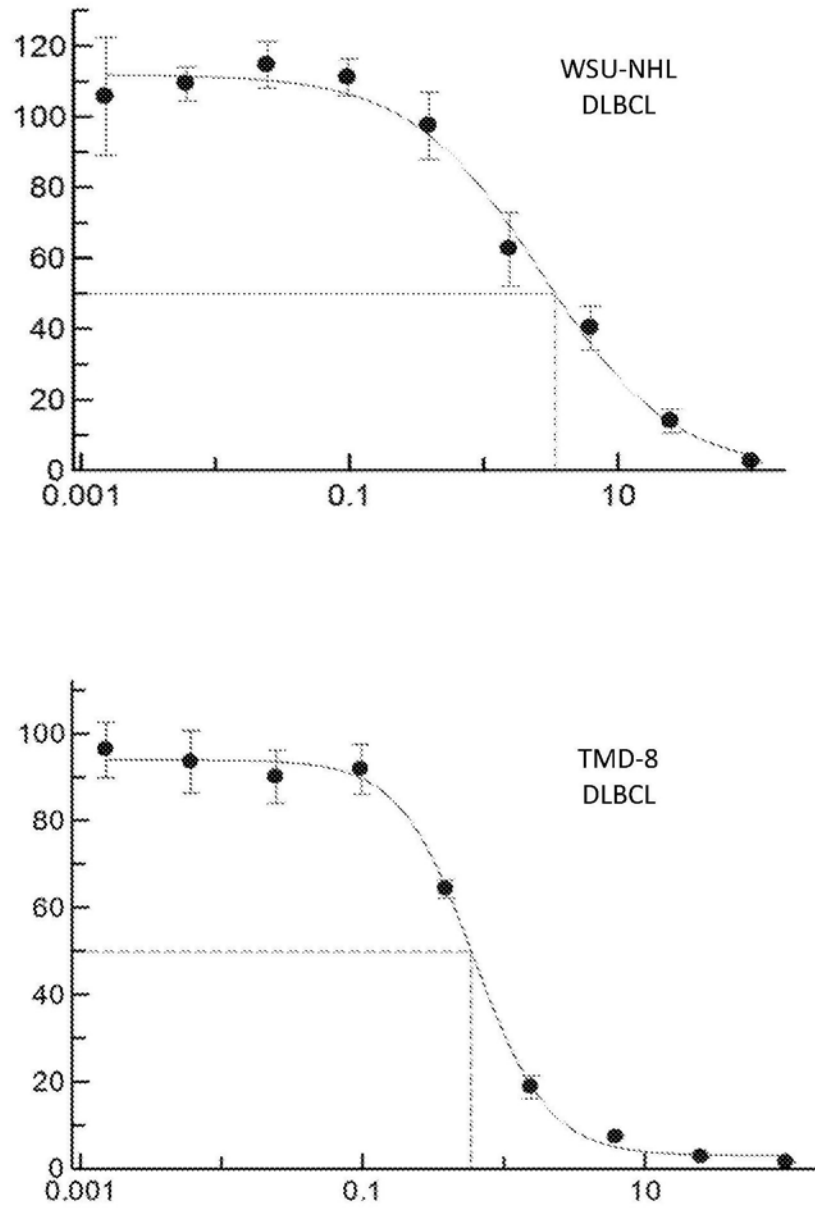


图6

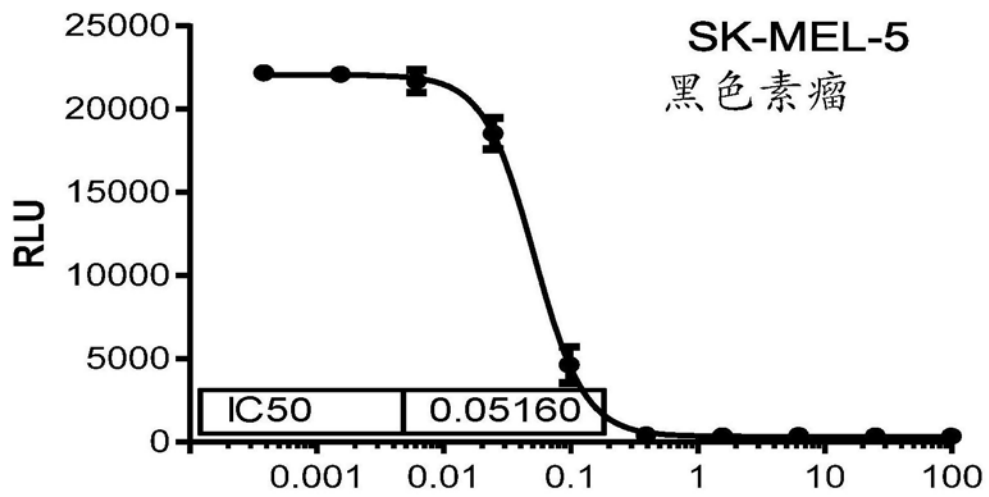
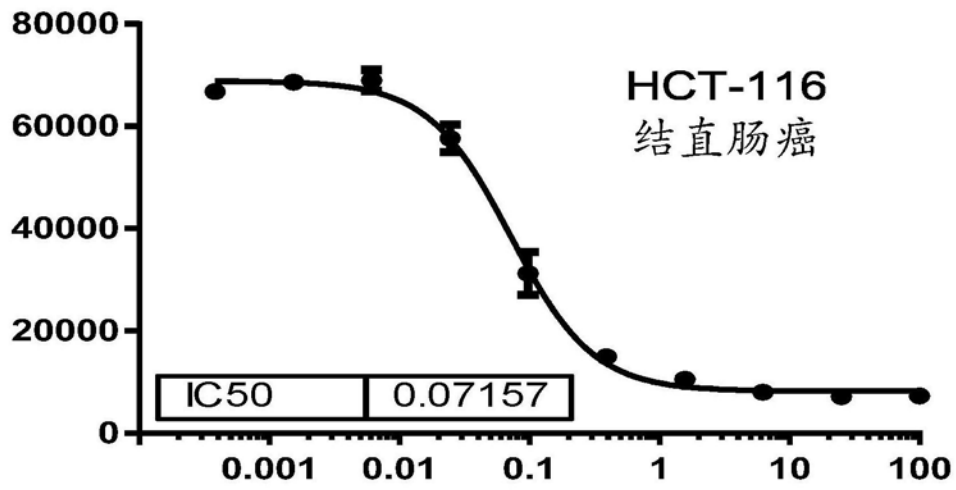


图7

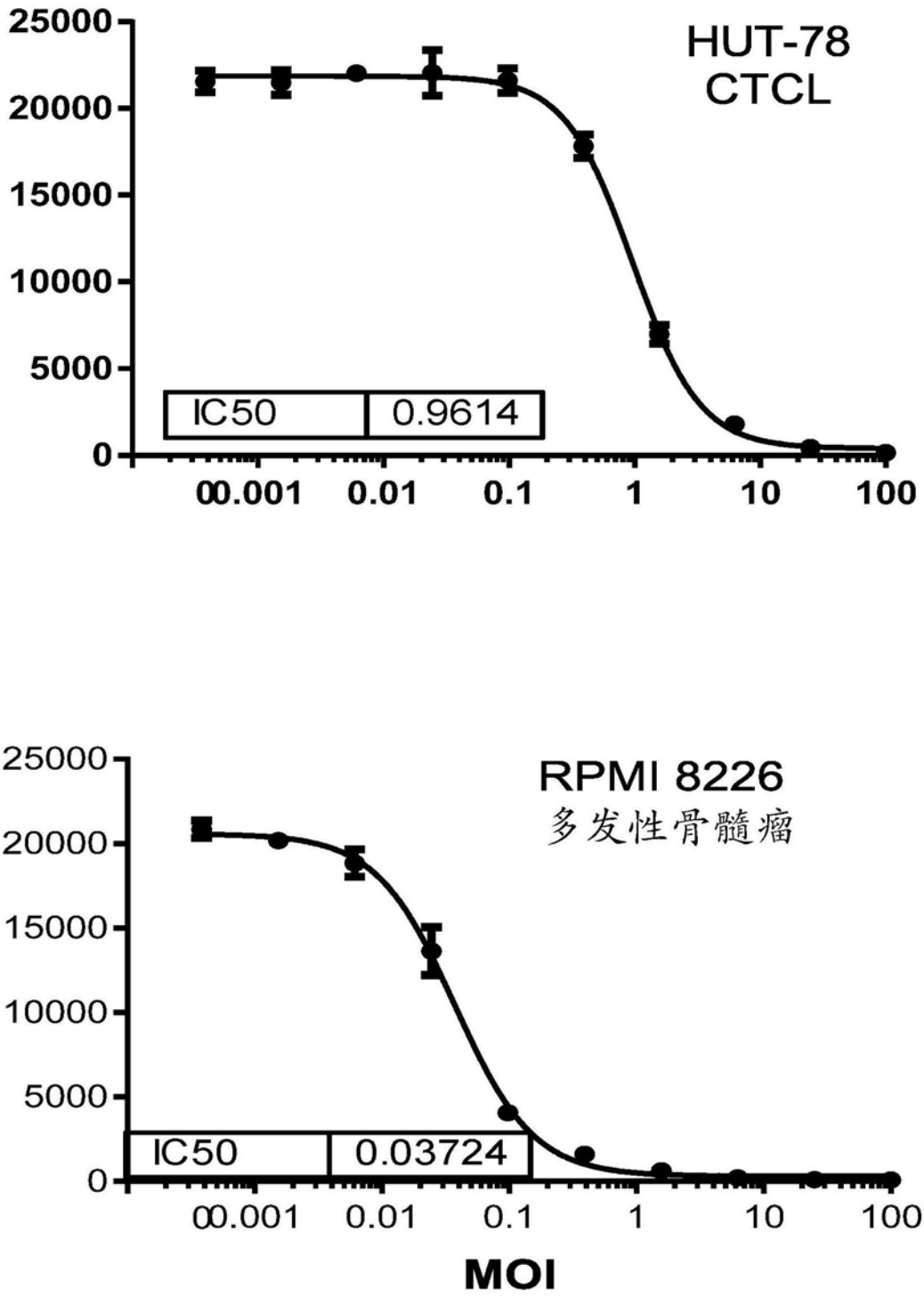


图8

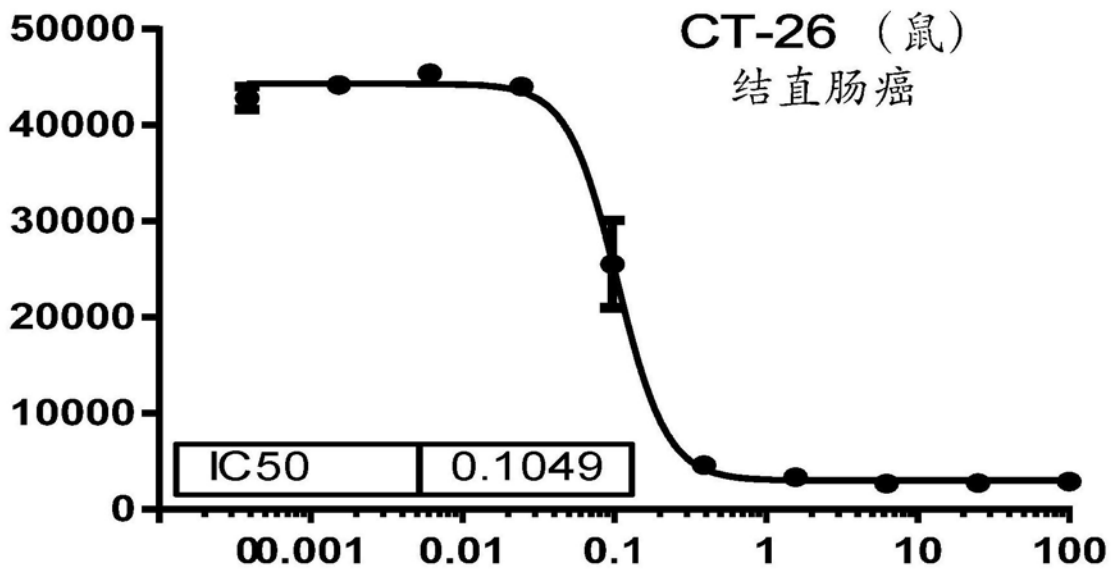
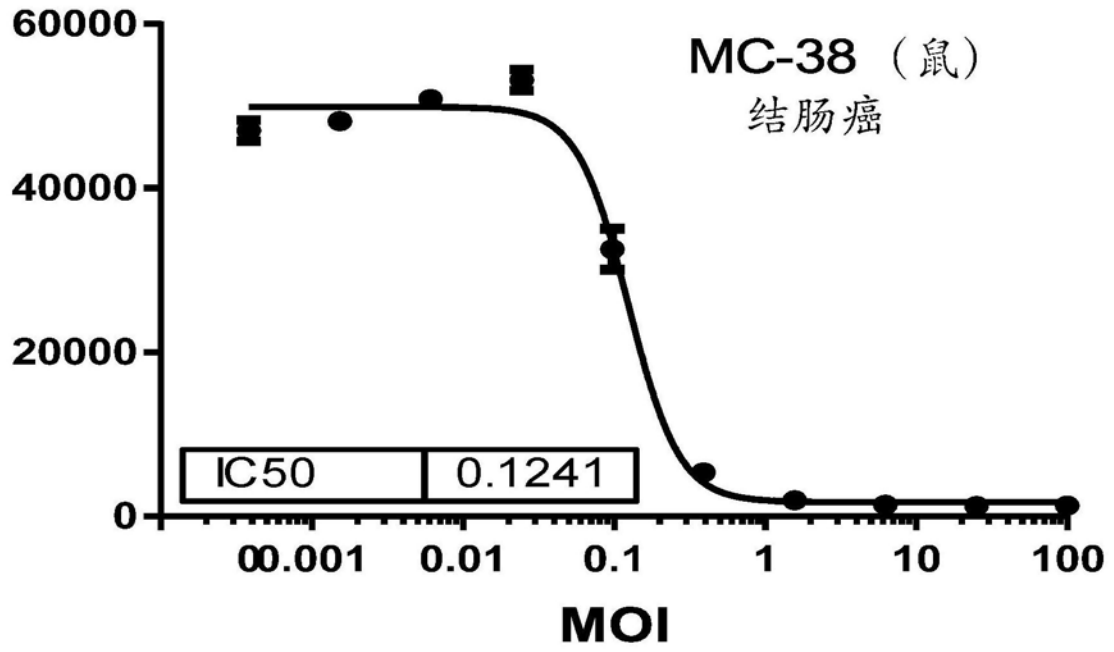


图9

右侧 (经注射的)

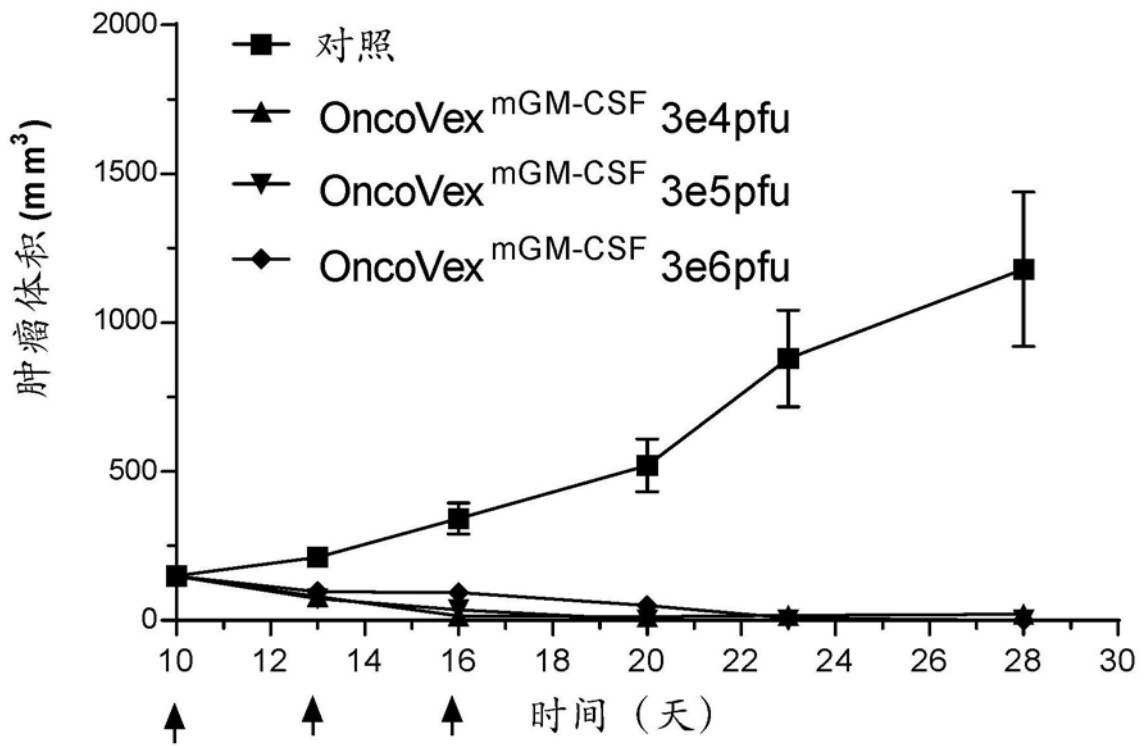


图10a

左侧 (未注射的)

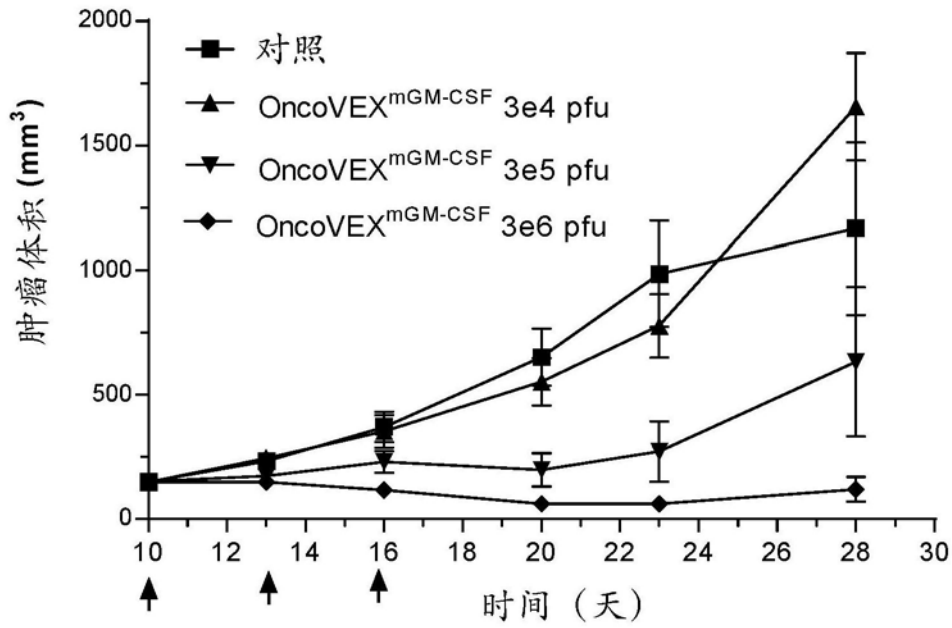


图10b

存活期总结
(左侧和右侧)

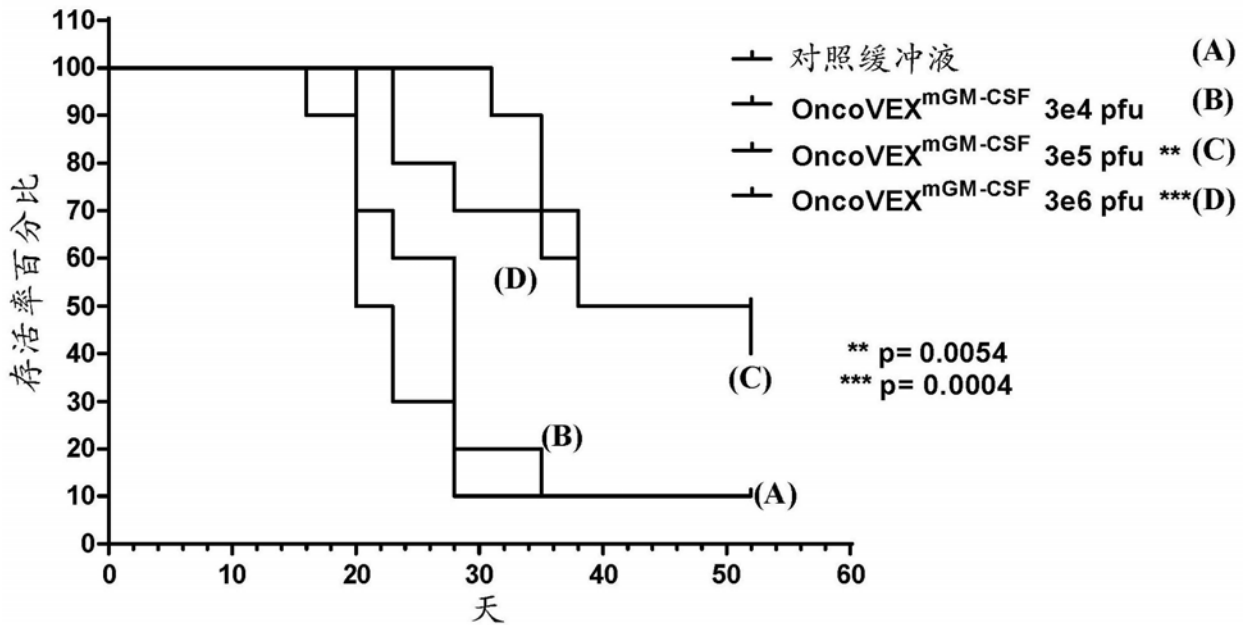


图10c

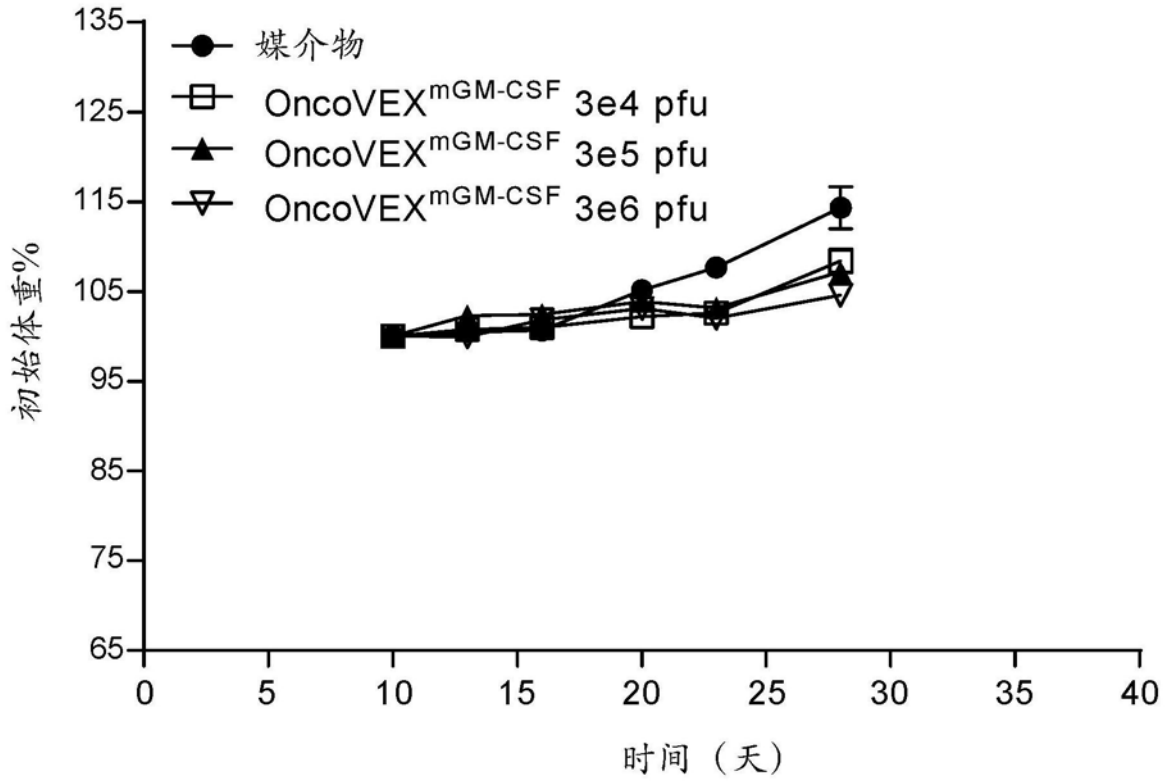


图10d

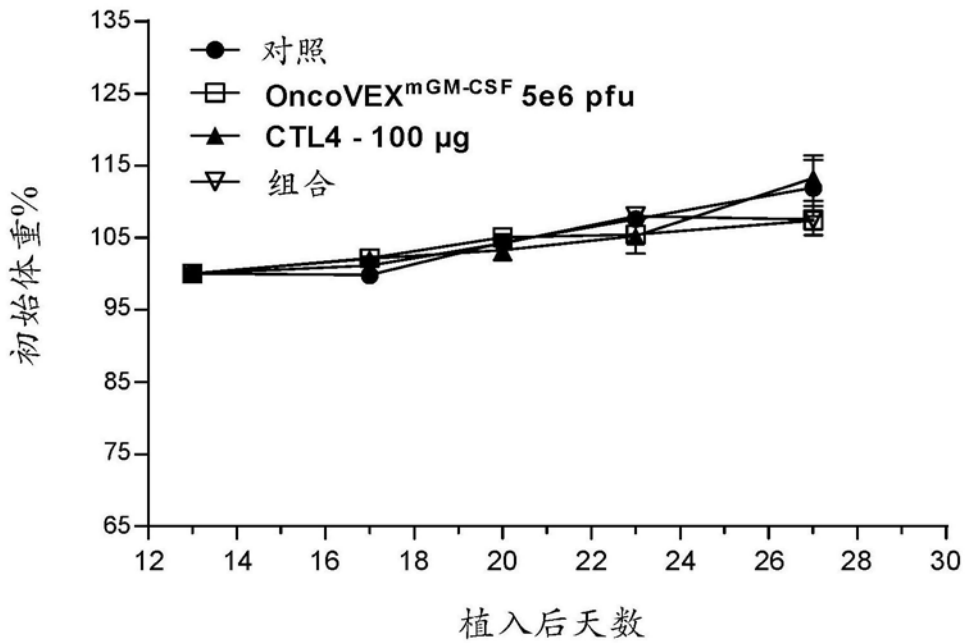


图10e

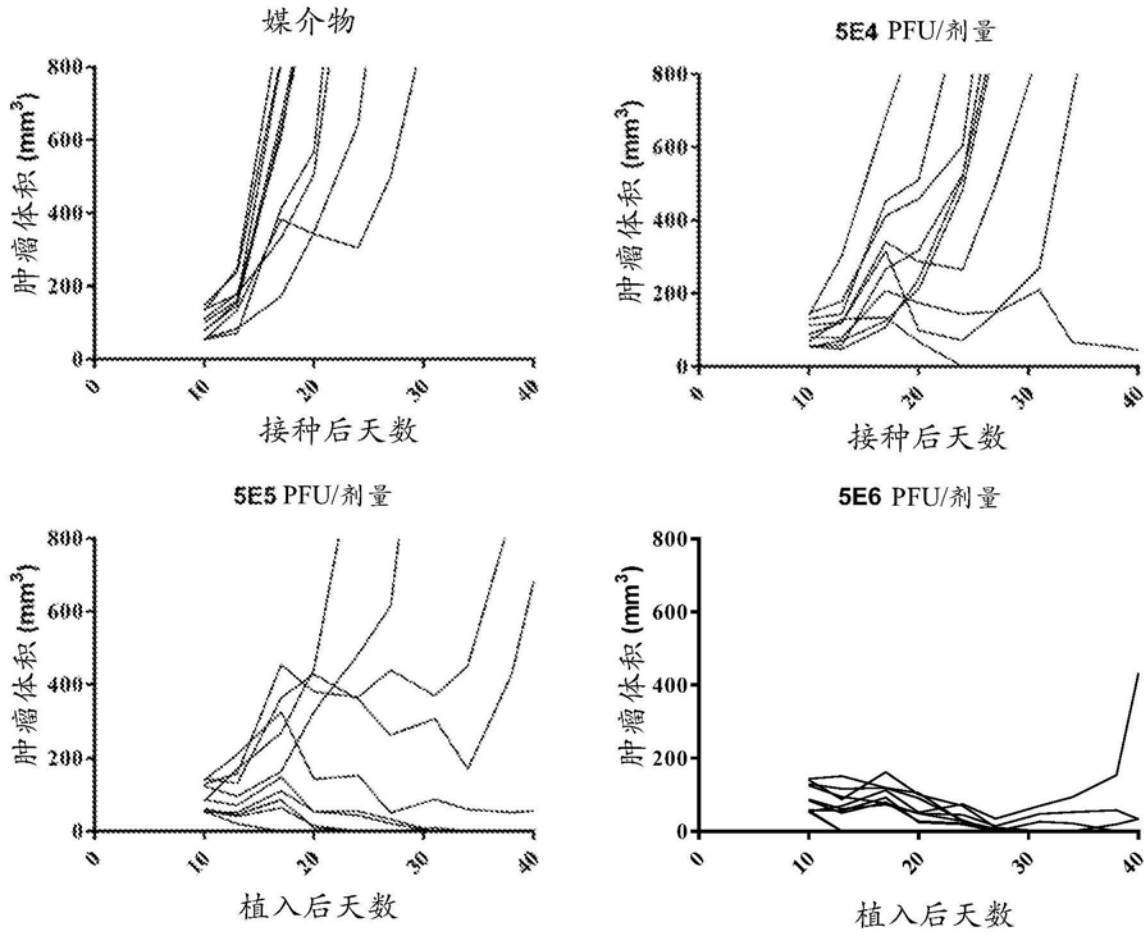


图10f

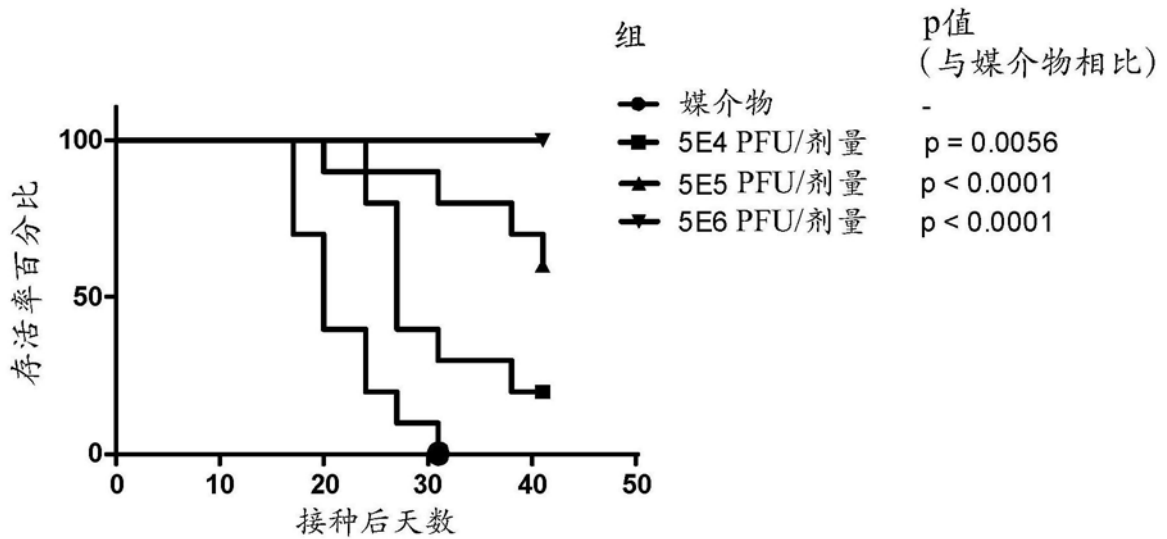


图10g

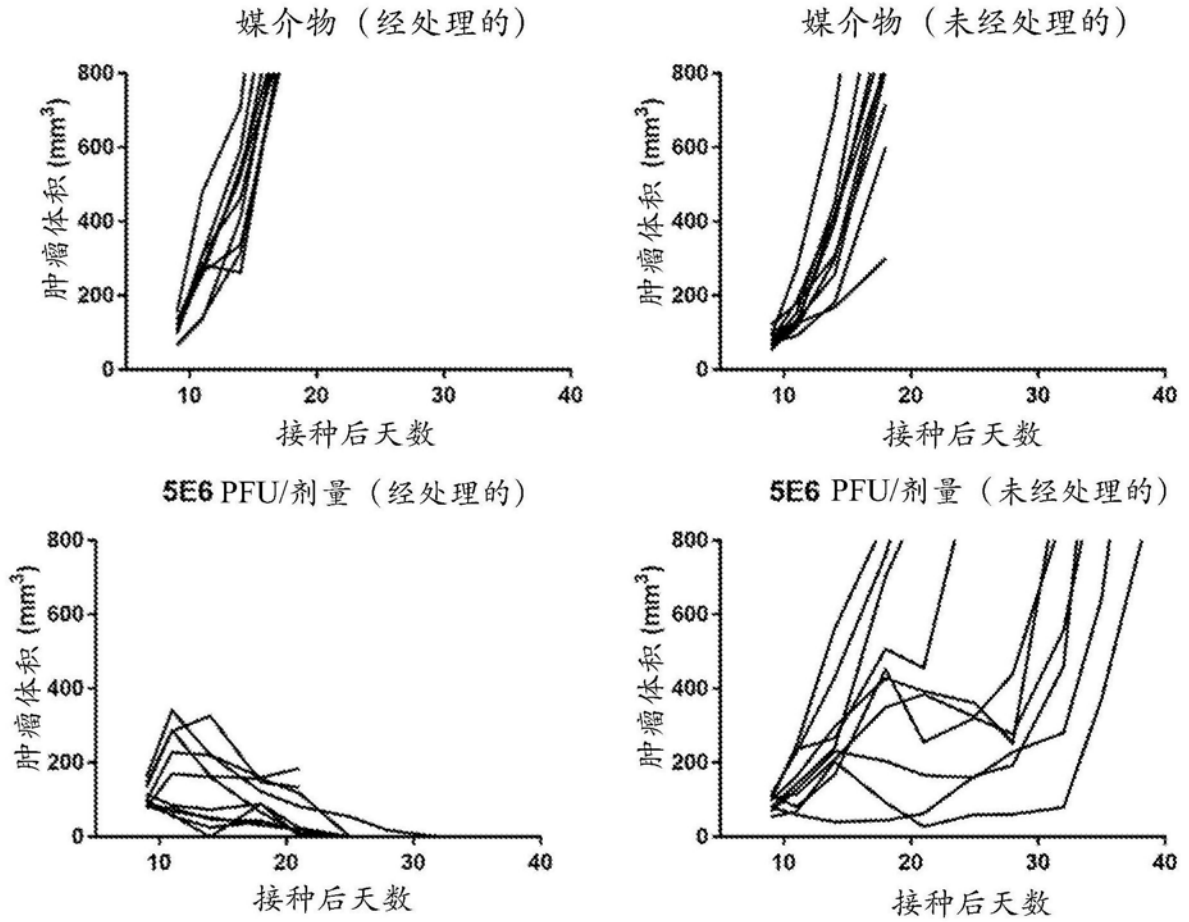


图10h

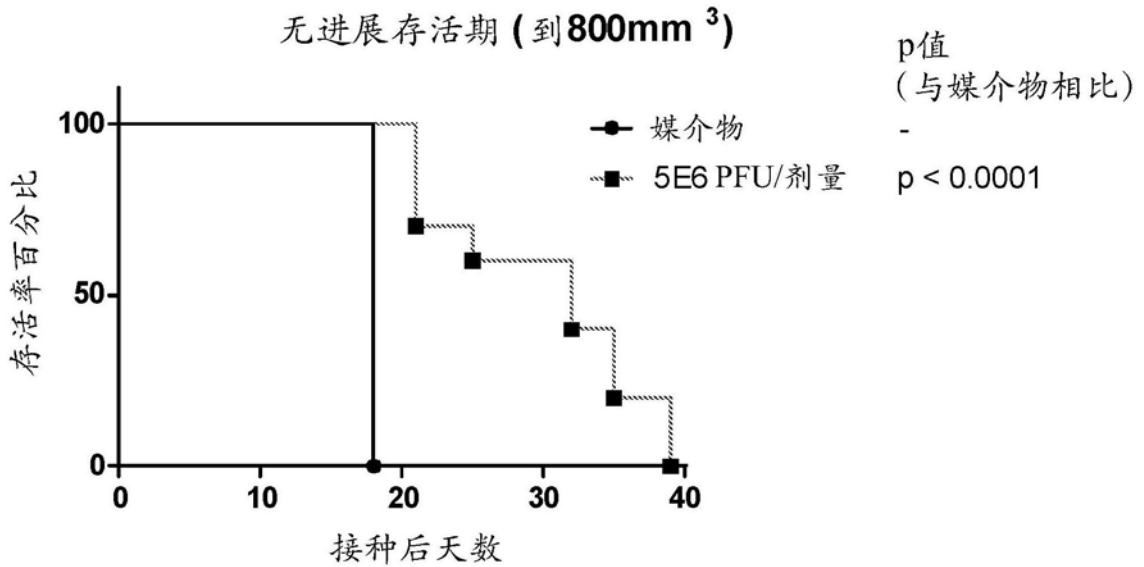


图10i

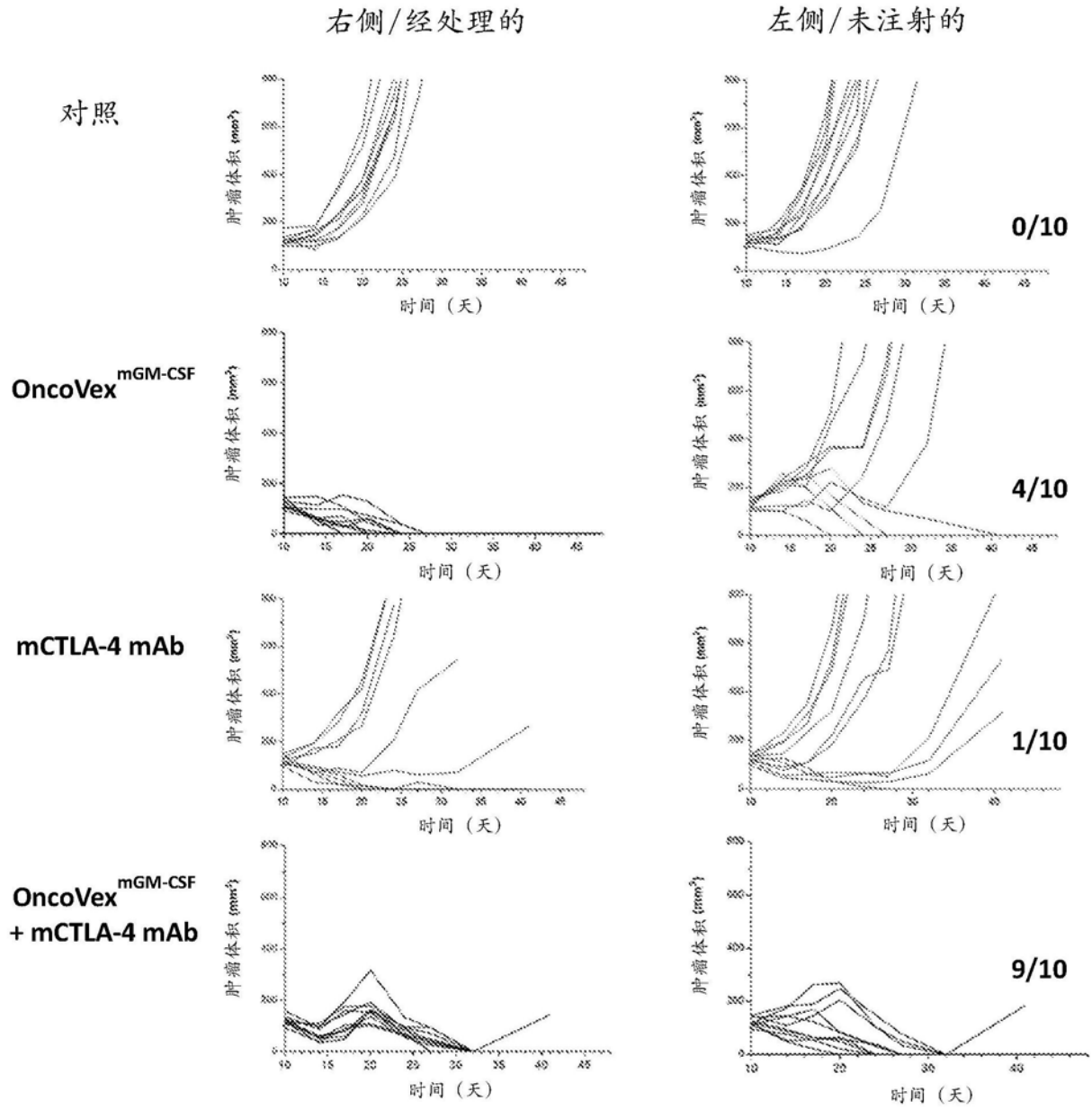
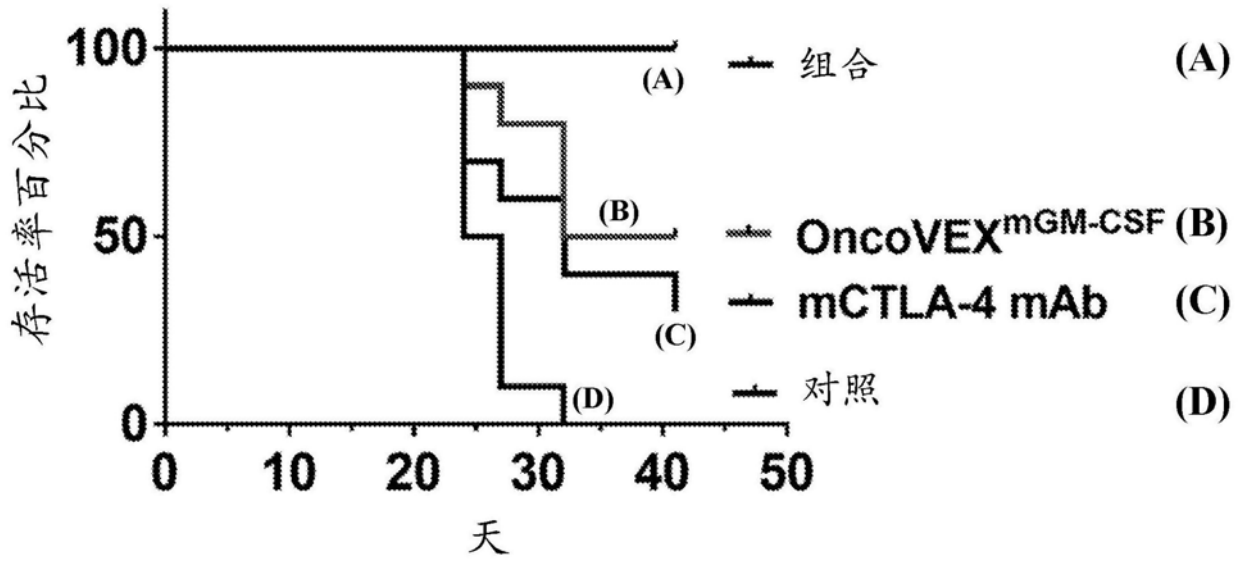


图11a

A20: 存活期总结



OncoVEX^{mGM-CSF} 相对于对照 (p=0.001)
 CTLA-4 相对于对照 (p=0.015)
 组合相对于对照 (p<0.0001)

OncoVEX^{mGM-CSF} 相对于 CTLA-4 (ns)
 组合相对于 OncoVEX^{mGM-CSF} (p=0.012)
 组合相对于 CTLA-4 (p=0.001)

图11b

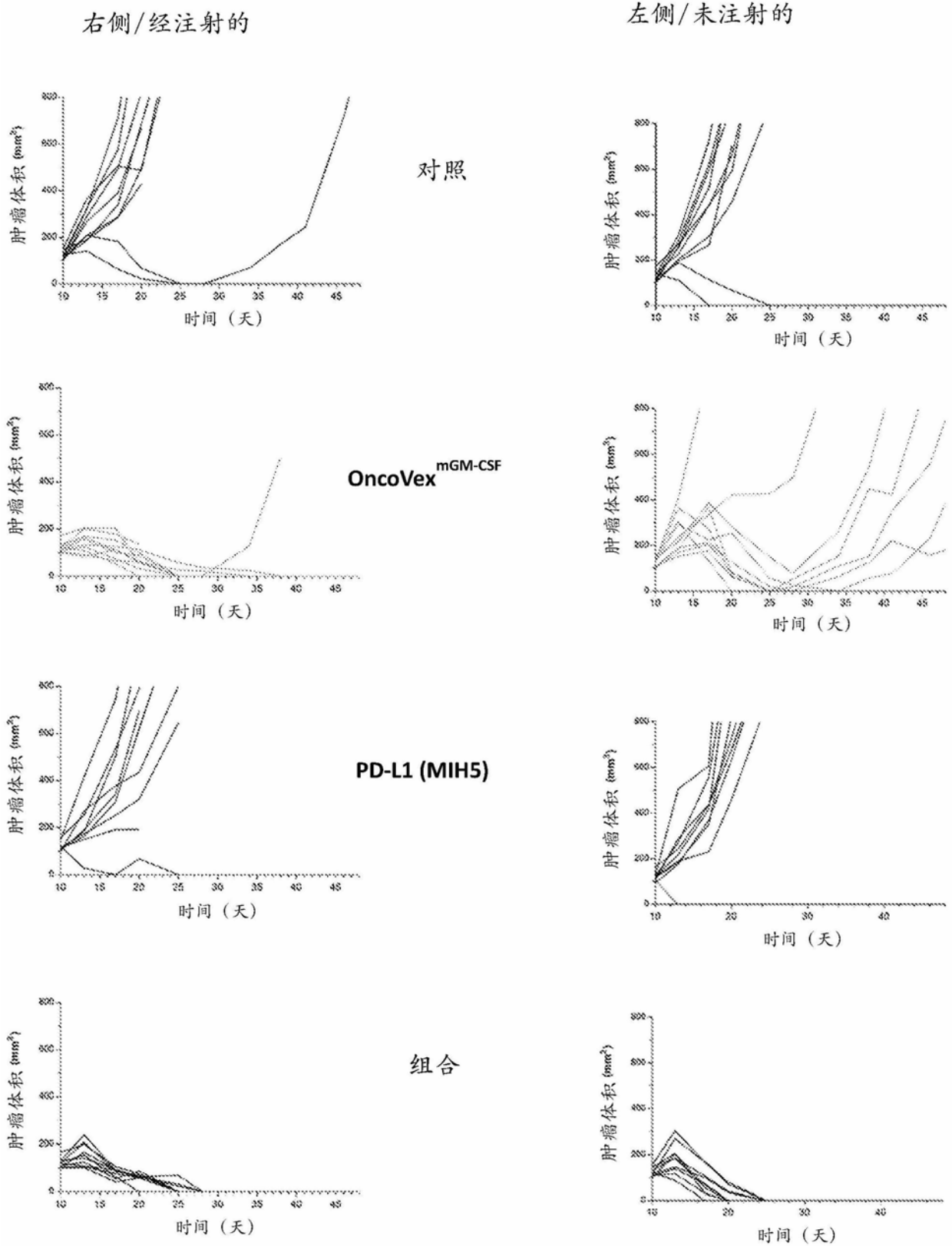


图11c

存活期总结

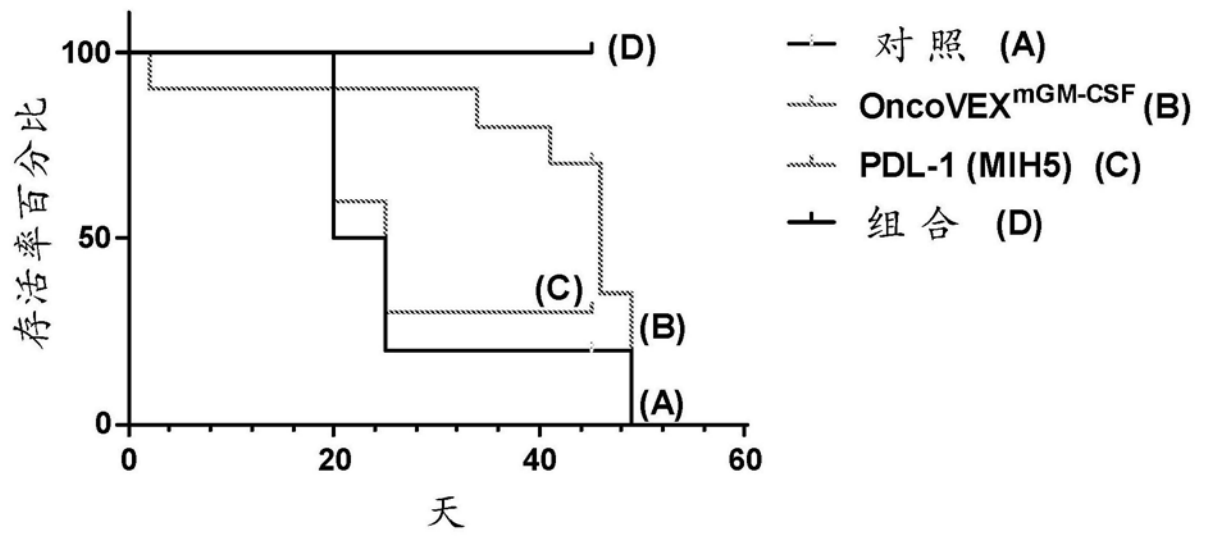


图11d

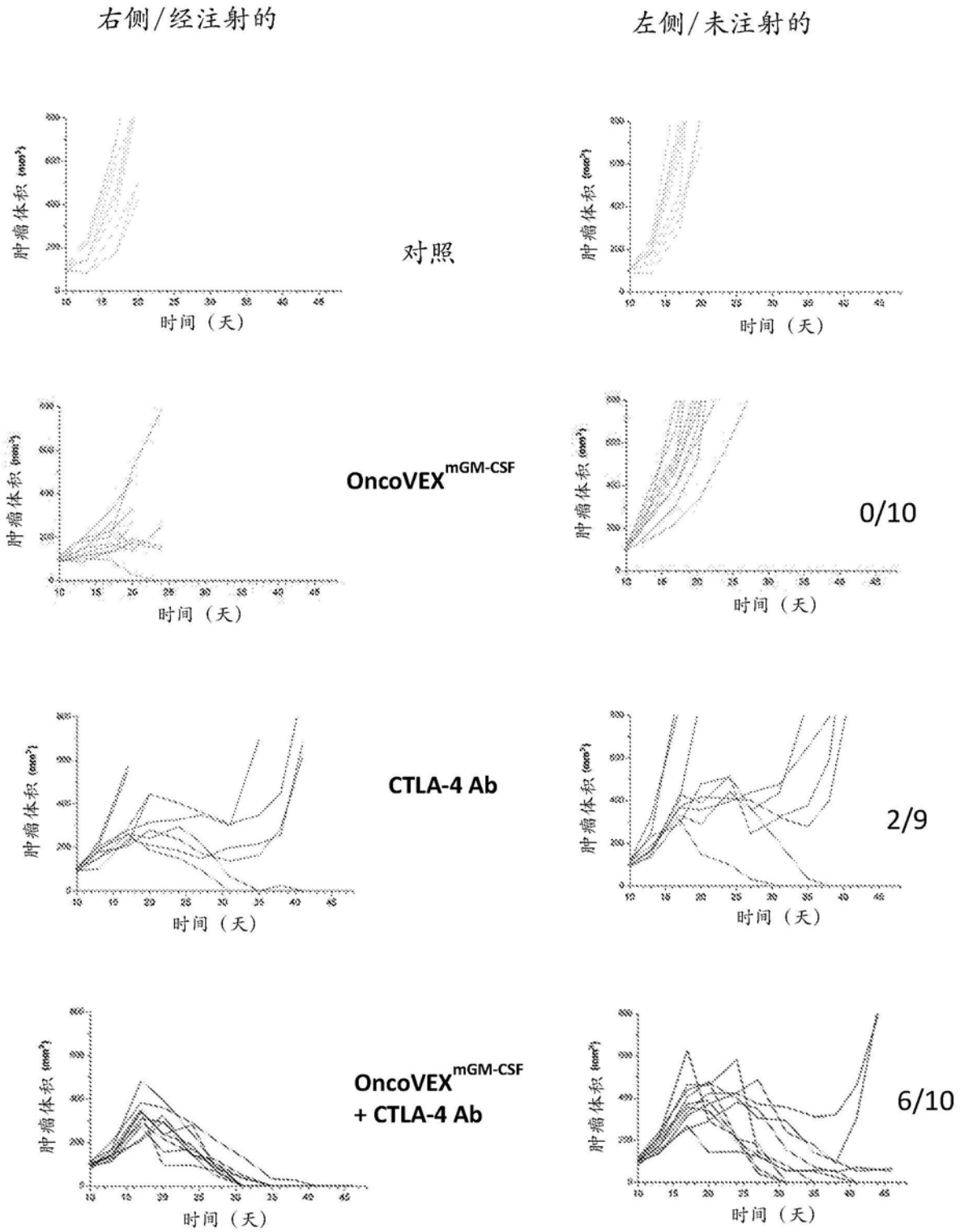


图12a

CT-26: 存活期总结

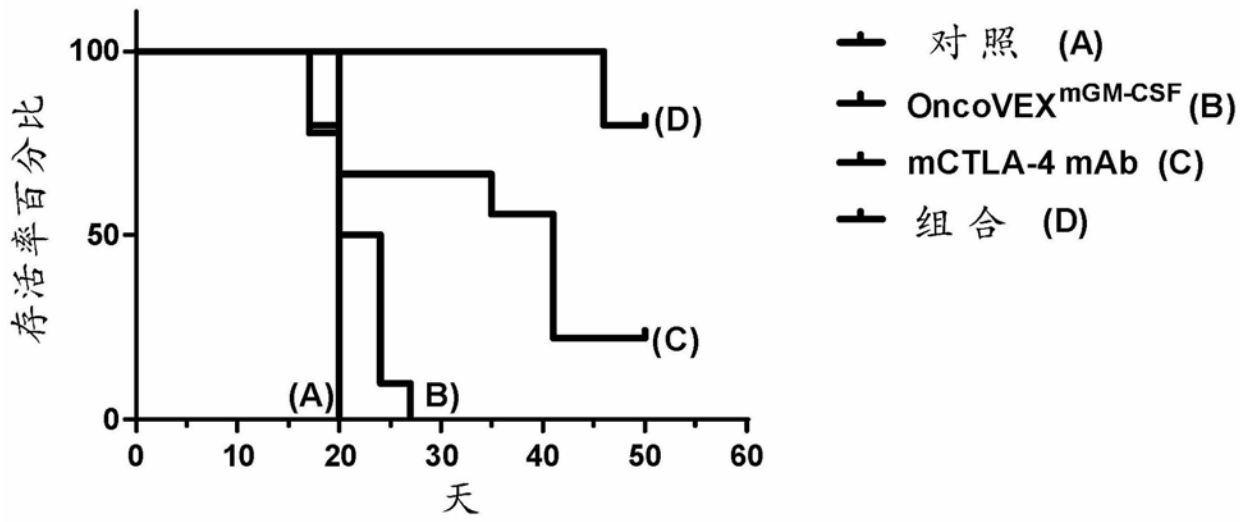


图12b

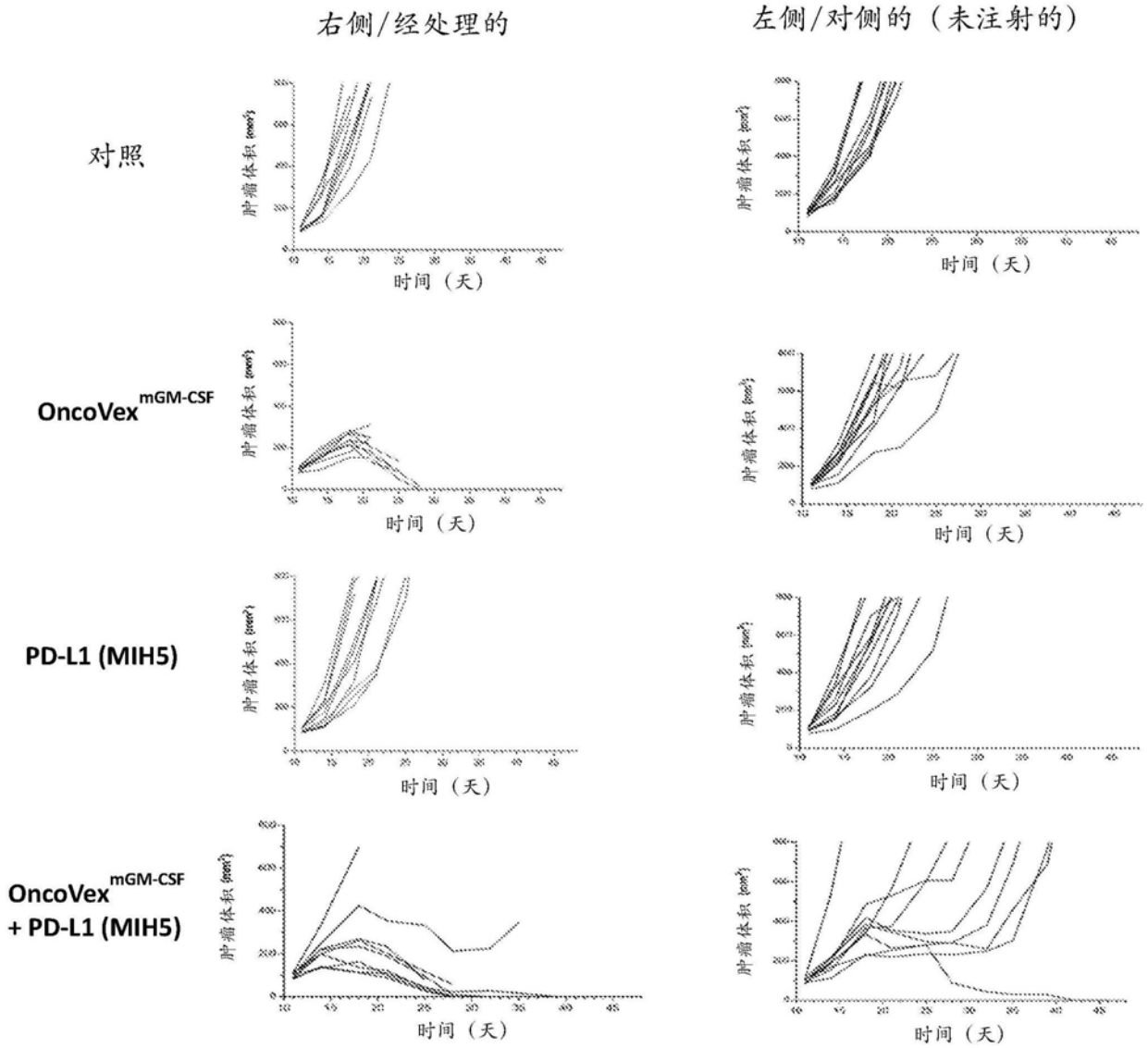


图12c

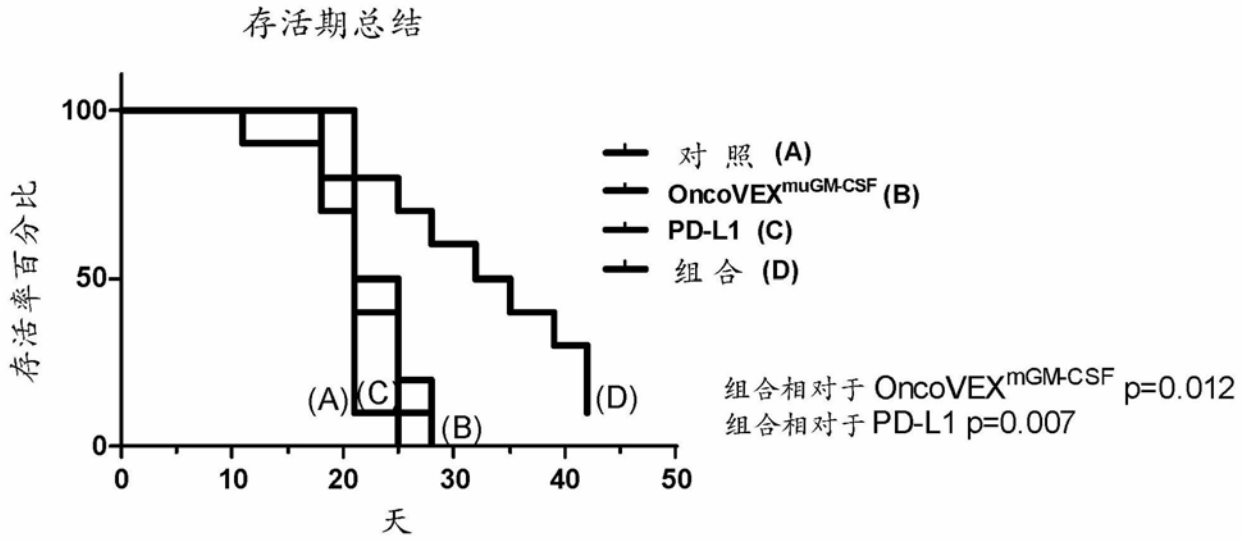


图12d

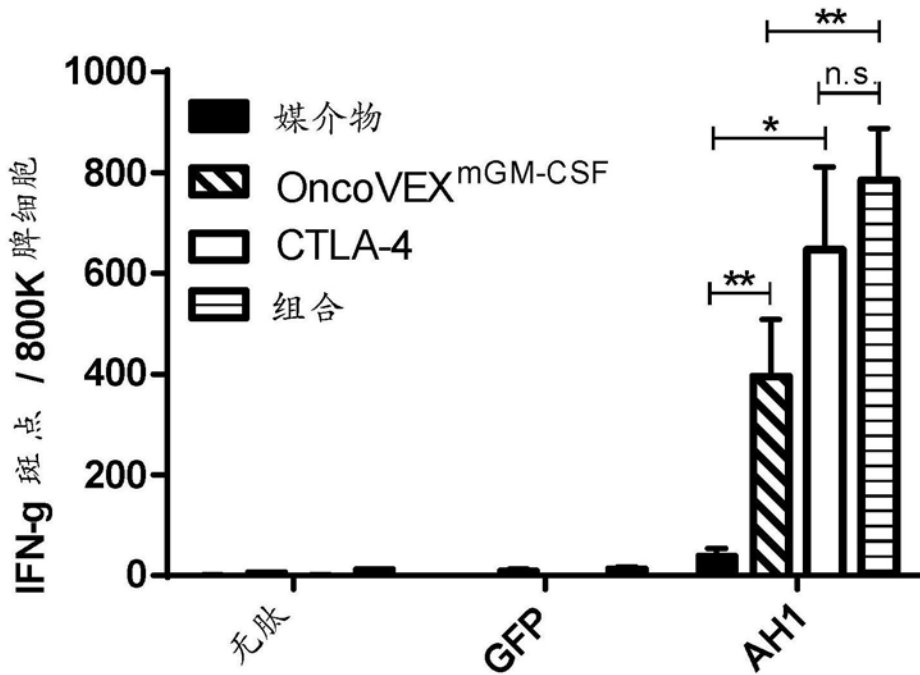


图12e

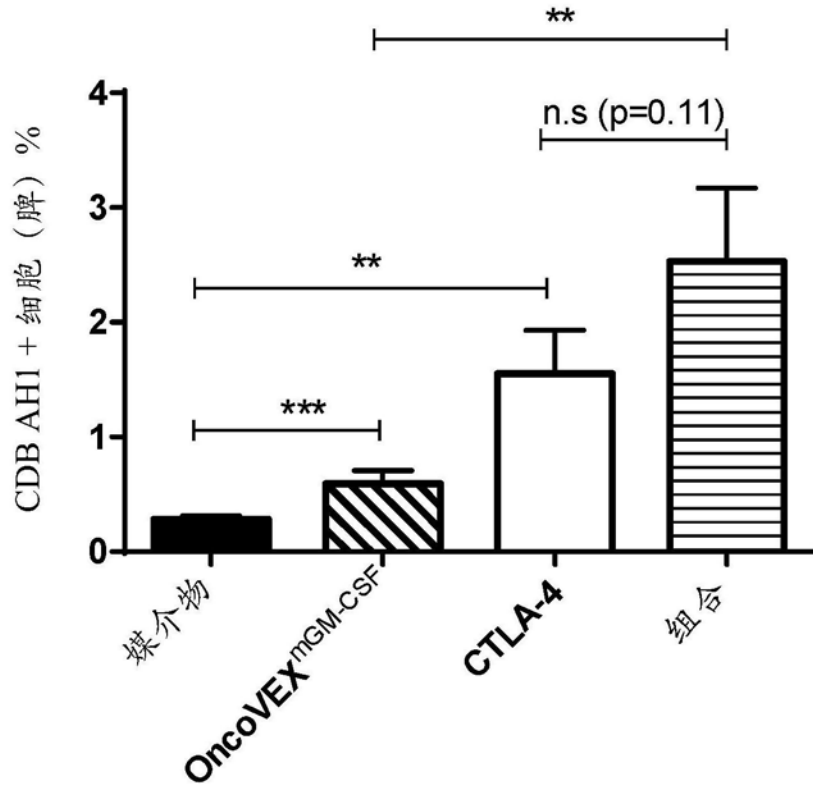


图12f

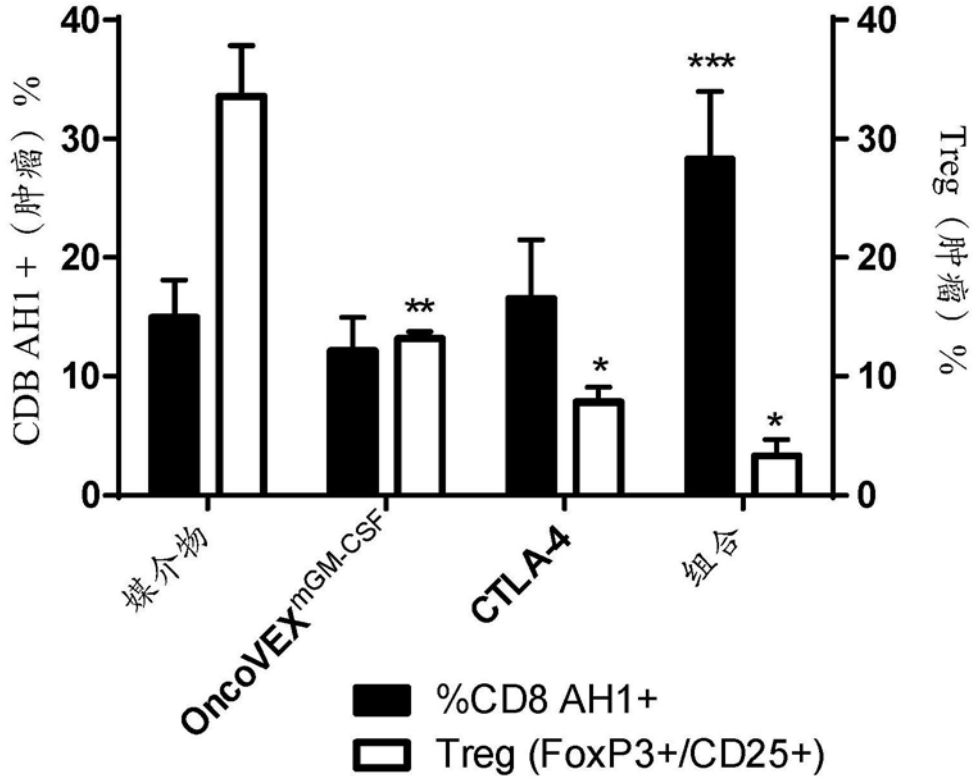


图12g

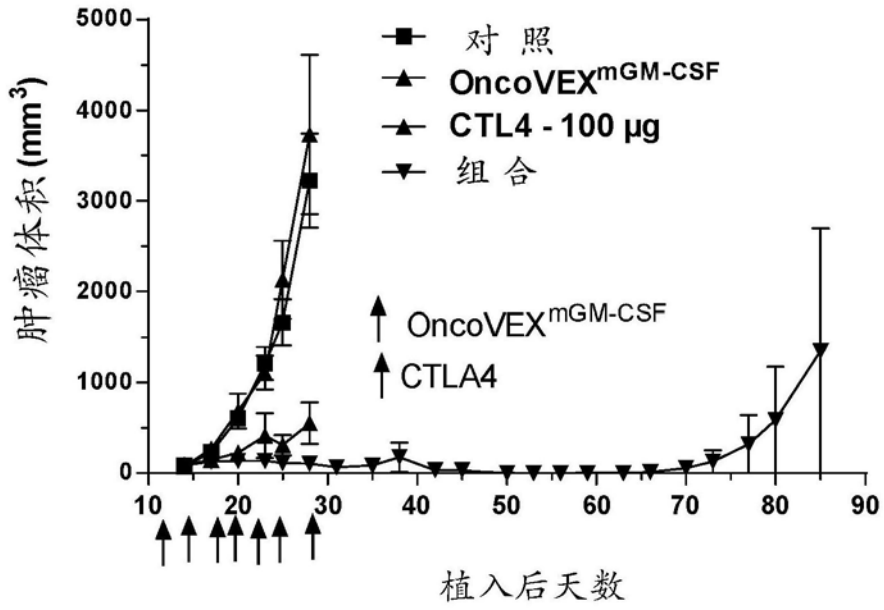


图13a

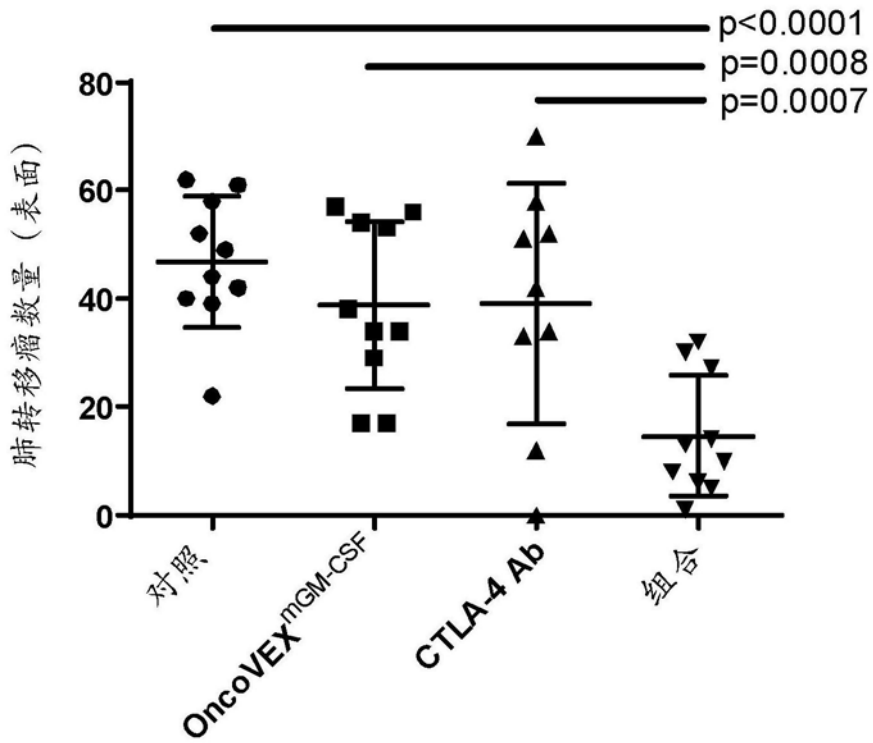


图13b

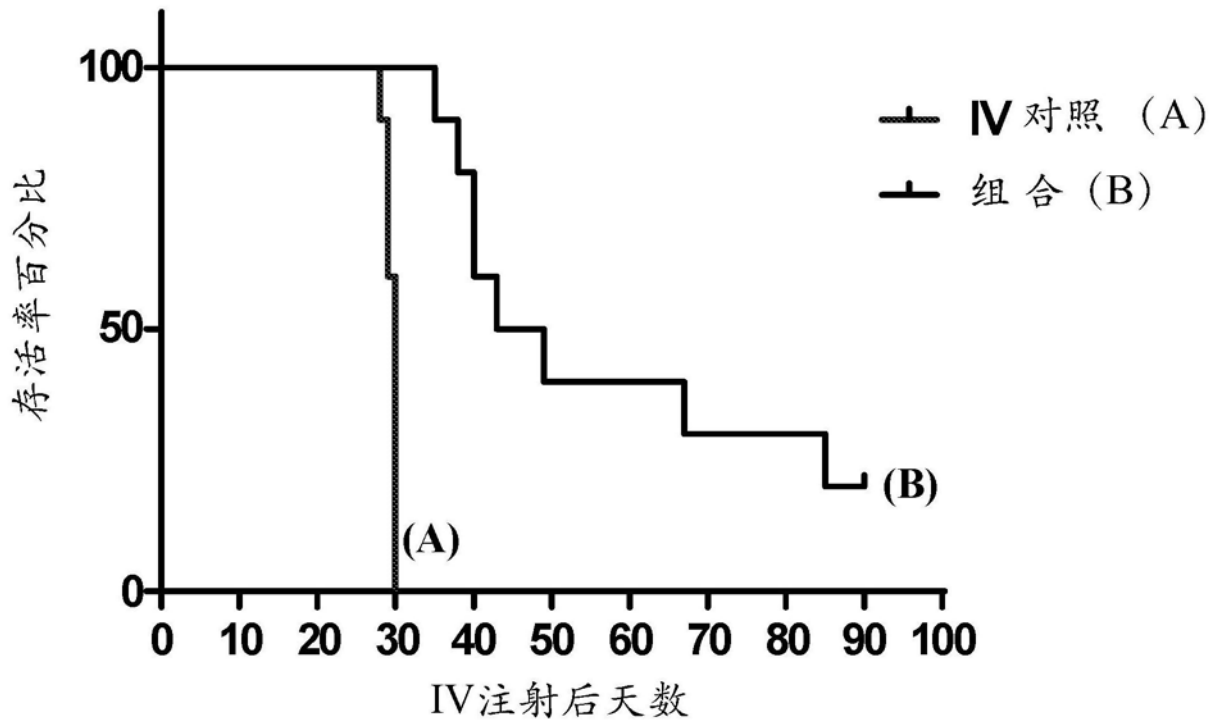


图13c

媒介物或
OncoVex^{mGM-CSF} 或
抗CTLA-4 mAb

第 4 组:
OncoVex^{mGM-CSF} 和抗
CTLA-4 mAb 的组合

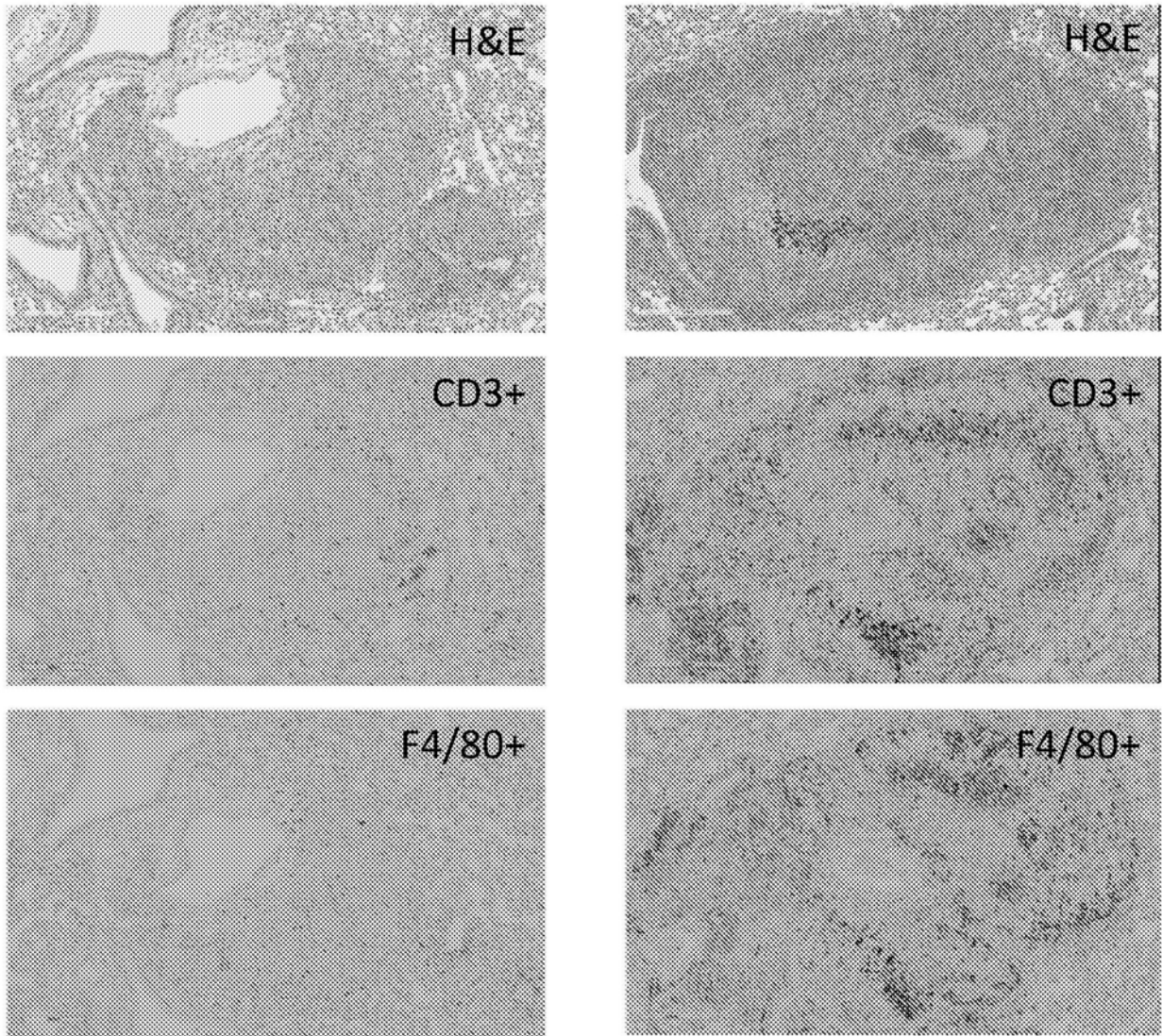


图13d

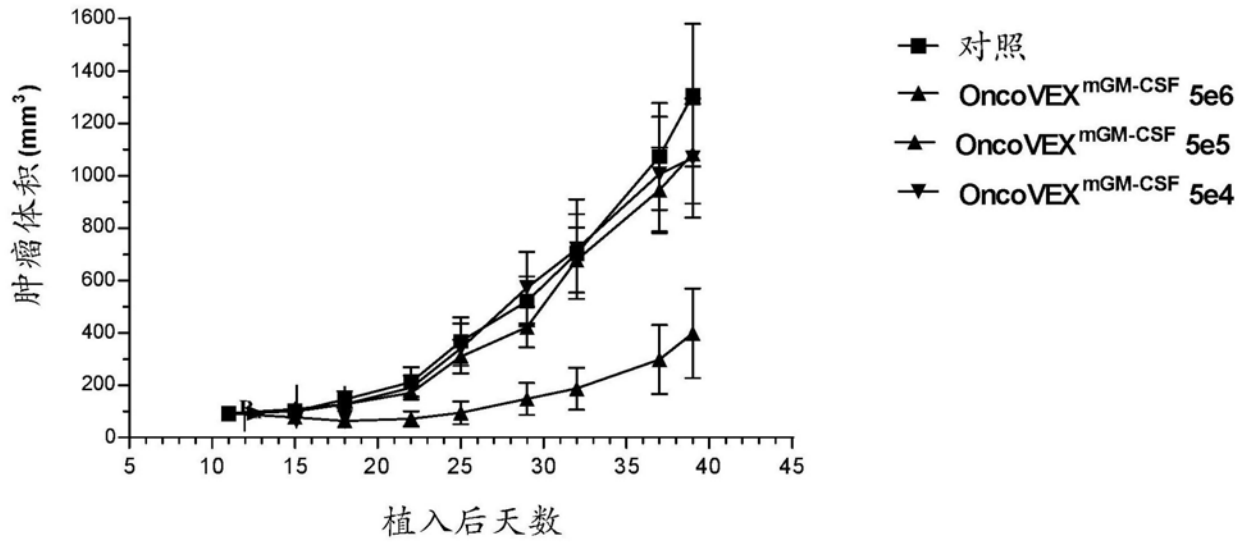


图14

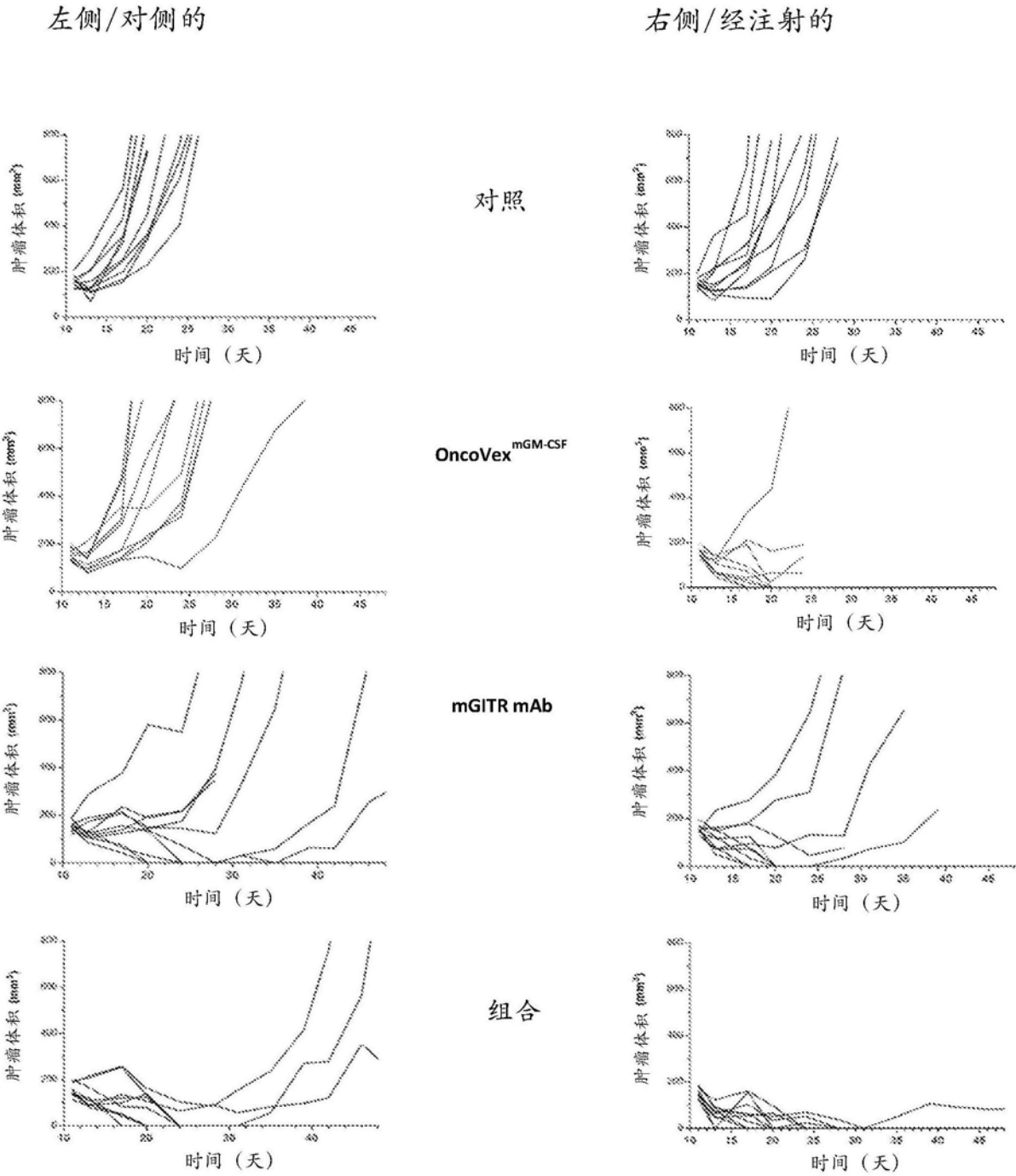


图15a

存活期总结

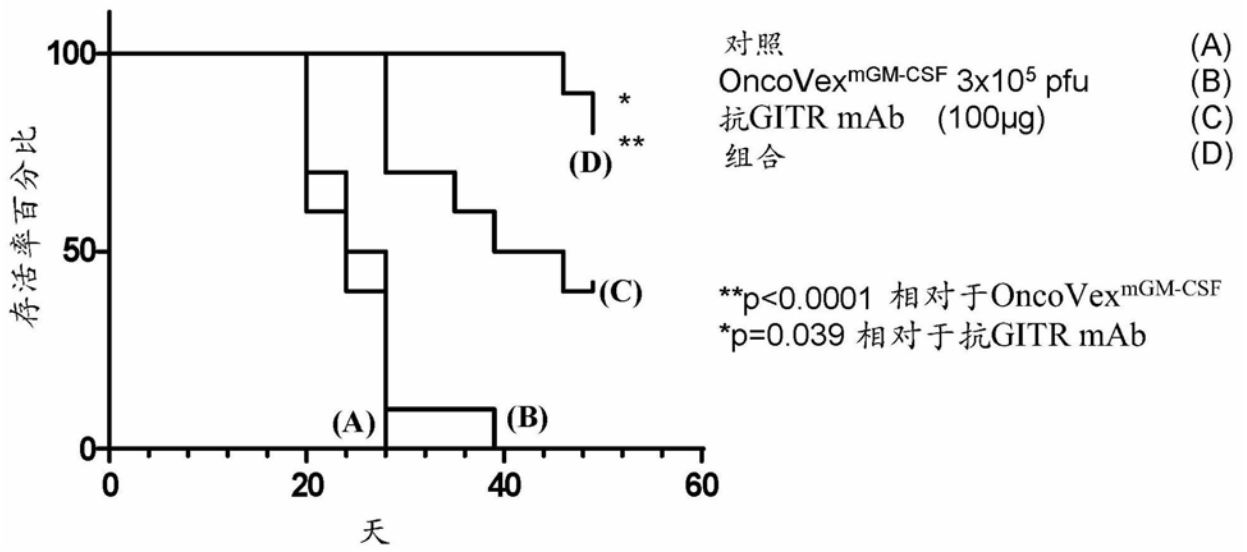
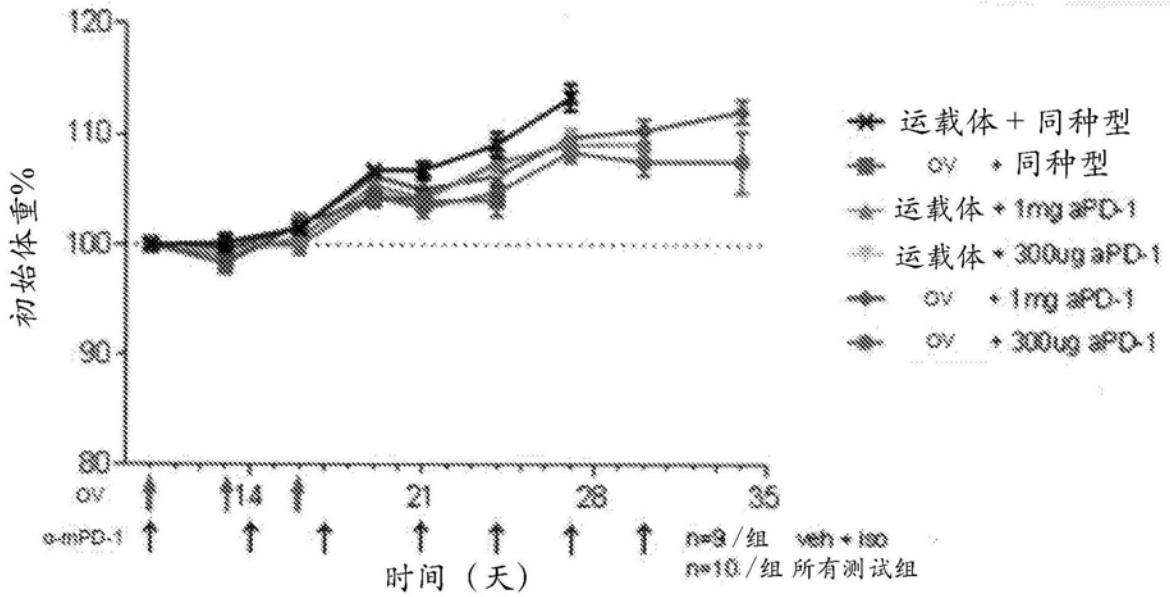
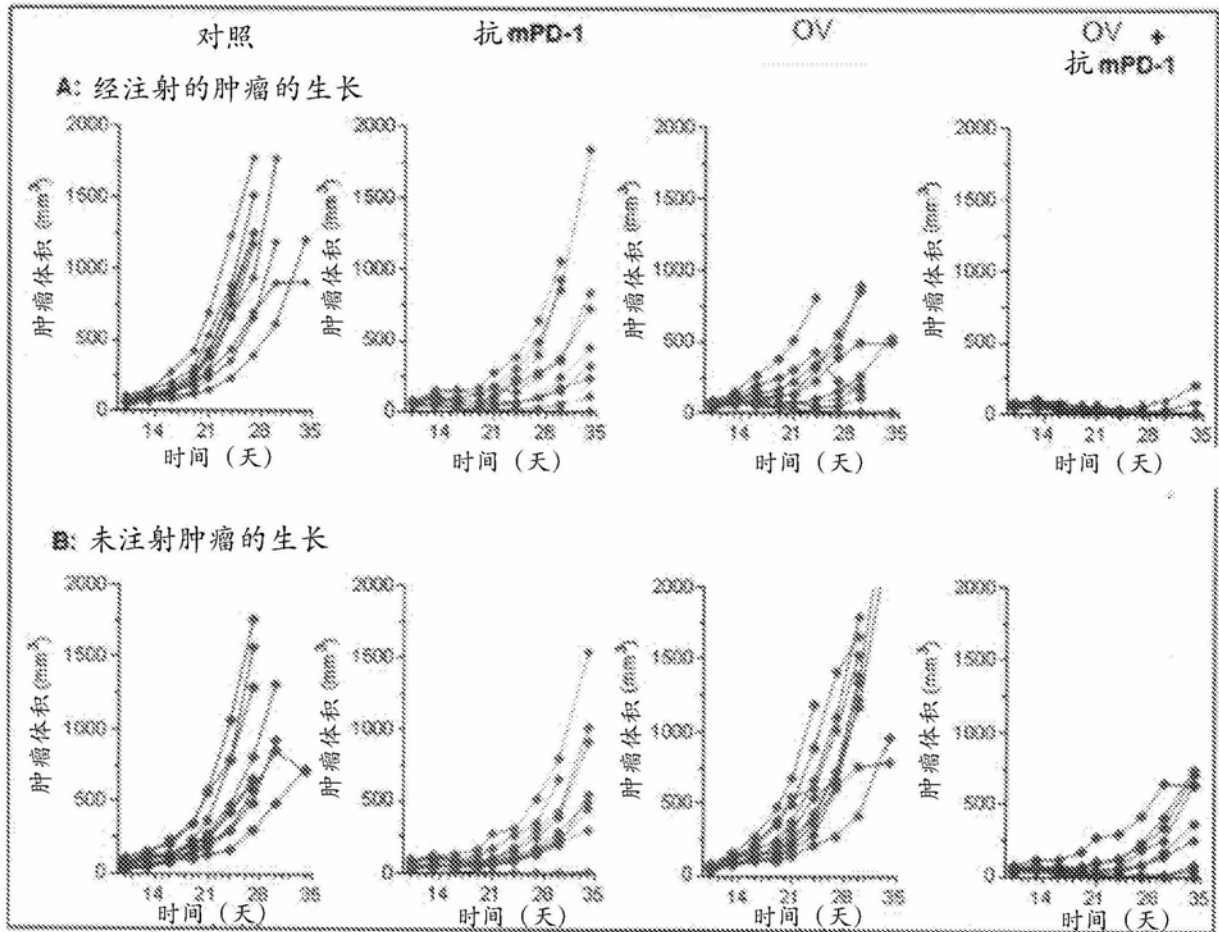


图15b



OV = OncoVEX^{mGM-CSF}

图16a



OV = OncoVEX^{muGM-CSF}

图16b

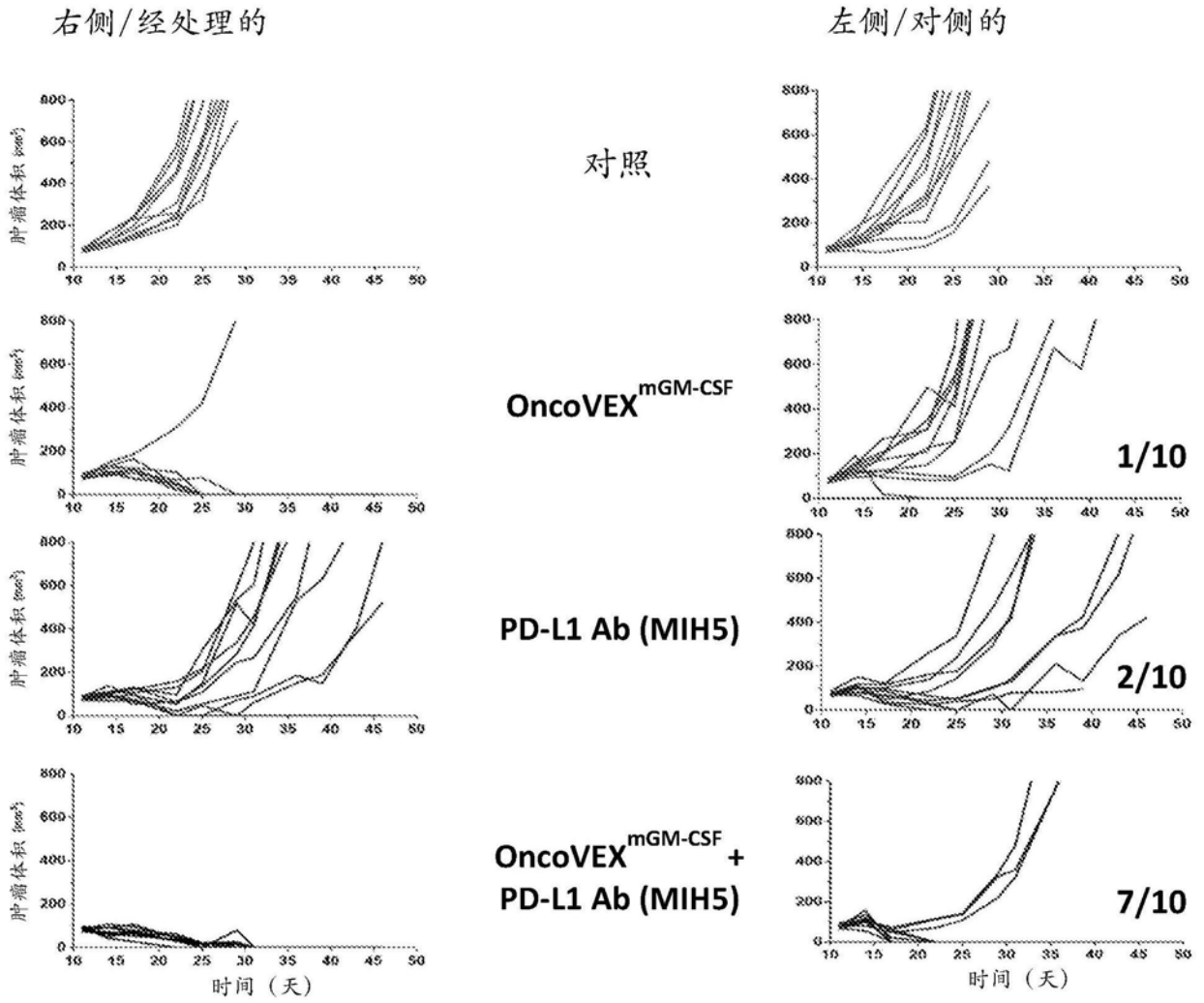


图17

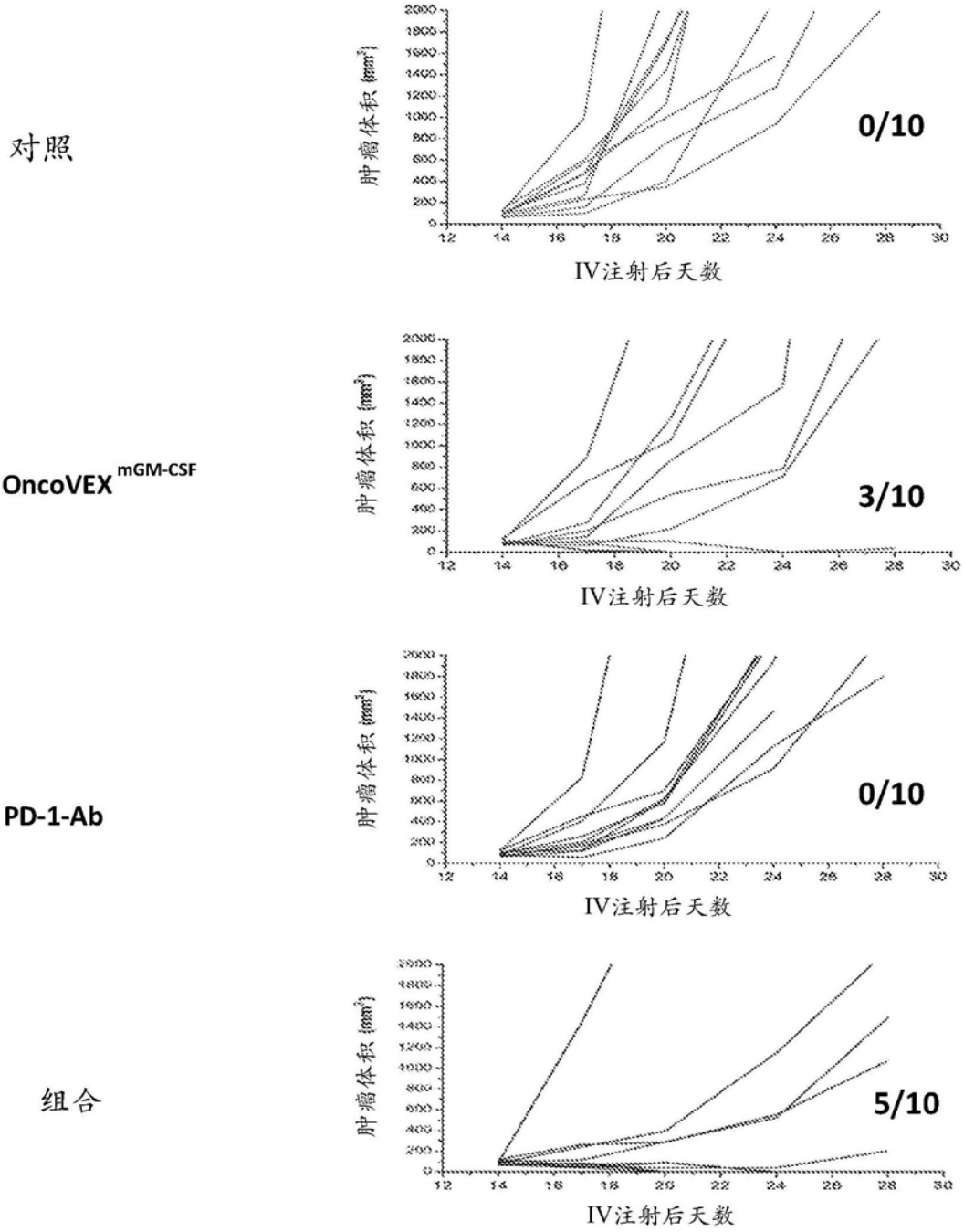


图18