



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107787364 A

(43)申请公布日 2018.03.09

(21)申请号 201680020049.0

(22)申请日 2016.04.07

(30)优先权数据

1505860.5 2015.04.07 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2016/050973 2016.04.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/162675 EN 2016.10.13

(71)申请人 艾佳尔免疫有限公司

地址 英国伦敦

(72)发明人 U.加利利 M.韦斯特比 S.肖

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 初明明 罗文锋

(51)Int.Cl.

C12N 7/01(2006.01)

A61K 35/768(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

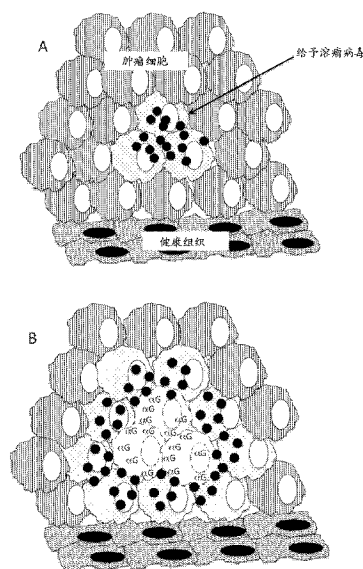
权利要求书2页 说明书24页
序列表1页 附图10页

(54)发明名称

用于治疗癌症的治疗组合物及使用方法

(57)摘要

本发明涉及用于治疗癌症的组合物和方法。更具体地,本发明涉及用于给予患有癌症的受试者的工程化溶瘤病毒的组合物,其特异性地溶解肿瘤细胞,并活性地将肿瘤细胞和细胞碎片靶向抗原递呈细胞,以产生抗肿瘤免疫。



1. 一种溶瘤病毒,所述溶瘤病毒包含编码己糖基转移酶的核酸。
2. 根据权利要求1所述的溶瘤病毒,其中所述酶是半乳糖基转移酶。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的溶瘤病毒,其中所述酶是 α 1,3-半乳糖基转移酶。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的溶瘤病毒,其包含肿瘤干细胞标记特异性的重组结合结构域。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的溶瘤病毒,其是复制受限的。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的溶瘤病毒,其是人源或非人源的基于RNA或DNA的病毒,例如腺病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、自主性细小病毒、水疱性口炎病毒(VSV)或呼肠孤病毒。
7. 根据权利要求6所述的溶瘤病毒,其是腺病毒。
8. 根据权利要求7所述的溶瘤病毒,其是有条件复制的腺病毒(CRAd)。
9. 根据权利要求8所述的溶瘤病毒,其是Ad5/3嵌合病毒。
10. 根据权利要求9所述的溶瘤病毒,其中所述Ad5/3嵌合病毒另外包含在病毒即时早期(E1a)基因的恒定区2(CR2)中的24-碱基对的缺失(Δ 24) (Ad5/3- Δ 24 CRAd)。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的溶瘤病毒,其包含编码 α 1,3-半乳糖基转移酶的核酸序列。
12. 根据权利要求11所述的溶瘤病毒,其是Ad5/3- Δ 24- α GT CRAd (CRAd- α GT)。
13. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至12中任一项所述的溶瘤病毒与药学上可接受的载体的组合。
14. 根据权利要求13所述的药物组合物,将其配制用于静脉内、肌内、腹膜内、瘤内、皮下、口服、直肠、阴道内、鼻内、经粘膜或透皮给予。
15. 一种治疗患有肿瘤的个体的方法,所述方法包括以下步骤:
 - i) 在至少一个癌细胞中表达通过根据权利要求1至12中任一项所述的溶瘤病毒递送的内源性酶,以改变细胞膜糖基化;并且
 - ii) 诱导自给予所述溶瘤病毒得到的所述至少一个癌细胞的溶解。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述溶瘤病毒以有效量给予以感染所述个体中的至少一个癌细胞。
17. 根据权利要求15或权利要求16所述的方法,其涉及治疗患有癌症的个体或患有肿瘤的个体。
18. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括将治疗有效量的根据权利要求1至12中任一项所述的溶瘤病毒给予需要治疗的患有癌症或具有瘤或肿瘤的患者。
19. 根据权利要求1至12中任一项所述的溶瘤病毒或根据权利要求13或权利要求14所述的药物组合物,用于治疗癌症。
20. 根据权利要求15至18中任一项所述的方法或根据权利要求19所述的溶瘤病毒或药物组合物,其中所述癌症选自白血病(例如,成髓细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、粒单核细胞白血病、单核细胞性白血病、红白血病、慢性粒细胞性白血病和慢性淋巴细胞性白血病)、淋巴瘤(例如霍奇金病和非霍奇金病)、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤因氏瘤、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、肾细胞癌、肝癌、维尔姆斯瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、发育异常和增生。

21. 一种制备根据权利要求1至12中任一项所述的溶瘤病毒的方法,所述方法包括将编码己糖基转移酶的核酸掺入所述溶瘤病毒的基因组的步骤。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述掺入步骤包括克隆。

用于治疗癌症的治疗组合物及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗癌症的组合物和方法。更具体地,本发明涉及用于给予患有癌症的受试者的工程化溶瘤病毒的组合物,其特异性地溶解肿瘤细胞并活性地将肿瘤细胞和细胞碎片靶向抗原递呈细胞,以产生抗肿瘤免疫。

[0002] 发明背景

因为免疫系统未能检出作为应被杀灭的细胞的肿瘤细胞,肿瘤可在癌症患者中发展。在很大比例的癌症患者中,肿瘤细胞表达自体肿瘤抗原。这些自体肿瘤抗原也称为“新抗原”,可引起保护性的抗肿瘤免疫应答。肿瘤细胞或肿瘤细胞膜必须被抗原递呈细胞内化以诱导抗肿瘤免疫应答的发展。然而,在许多癌症患者中的免疫系统表现出对肿瘤抗原的“无视”,这与肿瘤早期以一种“悄悄地”方式发展相关联,使得肿瘤有效地对于抗原递呈细胞为“不可见的”(Pardoll, 2000; Clin Immunol. 95:S44-49, 以及Dunn等人, 2002; Nat Immunol; 3:991-8)。

[0003] 此外,肿瘤微环境和局部细胞因子环境常抑制免疫功能并且能够有效地诱导免疫细胞无反应性及死亡(Malmberg, Cancer Immunol Immunother., 53:879-92; Lugade等人; J Immunol. 2005; 174:7516-23 (2004); Schreiber等人, Science (New York, N.Y.), 331 (6024), 1565-70 (2011))。肿瘤病灶的有效治疗需要两个组成部分:1. 破坏能够目测或通过成像技术检出的足够大的病灶,以及2. 诱导对肿瘤抗原的保护性系统抗肿瘤免疫应答。这种免疫应答将破坏任何未经治疗的病灶(例如,无法获得治疗,也不能通过手术去除的那些病灶)并导致对微小转移的免疫介导的检测、消退和/或破坏,所述微小转移不能被目测检出,并且不能通过成像检测。肿瘤的大小以及及时的方式妨碍循环抗肿瘤免疫应答的功效。除利用活性抗肿瘤免疫之外,外科切除或其它手段如瘤内注射组合物也常常是减小肿瘤大小所必需的。

[0004] 近来,已经开发出溶瘤病毒,其可用于通过溶解性复制选择性地杀伤肿瘤细胞,并且因此减小肿瘤大小(Liu等人, World J Gastroenterol., 2013年8月21日; 19(31):5138-43)。将可用的病毒失活,使得它们不再是病原性的,即,不在非肿瘤细胞中复制并杀伤非肿瘤细胞,而是使得它们仍能够进入肿瘤细胞并杀伤它们。一种示例性病毒,单纯疱疹病毒(HSV),已经表明对癌症的溶瘤治疗起作用。已经鉴定了HSV的多个突变,它们仍允许病毒在培养中或在体内(例如在肿瘤内)活性分裂的细胞内复制,但是阻止在正常组织内的显著复制。

[0005] 除HSV之外,已有多种其它病毒显示了用于癌症的溶瘤治疗的前景。溶瘤HSV与递送编码免疫调节蛋白(在失活病毒基因组中编码的粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF))的基因的组合使用已经表明对待治疗的肿瘤具有免疫刺激特性,尤其是在灭活病毒功能后,这通常减少对HSV的免疫应答。因此在这种用途中,溶瘤HSV突变体将被接种到原发瘤或继发瘤中,其中将发生肿瘤的复制和溶瘤破坏。这种方法的问题是GM-CSF用于募集抗原递呈细胞到病灶部位,但是这些细胞随后对肿瘤物质的摄取是随机的。抗原递呈细胞对于摄取小颗粒物质和可溶性抗原是相当有效的,但是对于内化细胞或较大的细胞碎片无

效。

[0006] 保护性抗肿瘤免疫应答的诱导需要抗原递呈细胞摄取肿瘤细胞和细胞组分,随后加工肿瘤抗原并通过抗原递呈细胞将它们运输到引流淋巴结。在淋巴结中,与I类或II类MHC分子相关的抗原递呈细胞呈递免疫原性肿瘤抗原肽,用于分别活化肿瘤特异性CD8⁺和CD4⁺ T细胞。仅在这些T细胞被加工并呈递的肿瘤抗原肽活化后,这些淋巴细胞才增殖,离开淋巴结并在体内循环以发现和破坏表达相关肿瘤抗原的转移性肿瘤细胞。因此,引发有效的抗肿瘤免疫应答需要将肿瘤细胞有效且活性地靶向抗原递呈细胞。

[0007] 因此所需的是,通过细胞溶解和肿瘤细胞、细胞碎片和膜片段的活性靶向用于抗原递呈细胞募集和随后的免疫应答,以非外科手术手段减小肿瘤大小的组合物和方法。还需要提高在肿瘤微环境中抗原递呈细胞对肿瘤细胞和细胞碎片的内化效率的方法。

发明内容

[0008] 根据本发明的第一方面,提供了一种溶瘤病毒,其包含编码己糖基转移酶的核酸。

[0009] 根据本发明的另一方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所定义的溶瘤病毒与药学上可接受的载体的组合。

[0010] 根据本发明的另一方面,提供了一种治疗患有肿瘤的个体的方法,所述方法包括以下步骤:

i) 在至少一个癌细胞中表达通过如本文所定义的溶瘤病毒递送的内源性酶以改变细胞膜糖基化;并且

ii) 诱导自给予溶瘤病毒产生的所述至少一个癌细胞的溶解。

[0011] 根据本发明的另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括将治疗有效量的如本文所定义的溶瘤病毒给予需要治疗的患有癌症或具有瘤或肿瘤的患者。

附图说明

[0012] 图1:提供了显示与本发明方法有关的一系列细胞事件的示意图。这些事件包括A) 给予工程化的病毒组合物,B) 感染、复制、表达 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶和 α -gal表位,以及C) 在肿瘤位置溶瘤并募集抗原递呈细胞。

[0013] 图2:提供了显示用溶瘤病毒感染的肿瘤细胞的示意图,该溶瘤病毒包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶并在溶解前在它的细胞表面上表达 α -gal表位。 α -gal-标记的膜片段被抗原递呈细胞内化。(1) 肿瘤细胞在细胞质中和细胞膜上包含肿瘤相关抗原(TAA),其是肿瘤和每个个体患者独特的。这些TAA在细胞膜上表示为(●,▲,■)和在细胞内表示为蛋白分子(螺旋和波形线)。引入肿瘤病灶的溶瘤病毒(带有11个外部刺突的实心圆)包含插入它的基因组的 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因。(2) 感染肿瘤细胞的溶瘤病毒将 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因引入肿瘤细胞。这个基因在感染的细胞内转录并翻译,导致产生 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶($\alpha 1,3$ GT)。这种酶在细胞表面糖蛋白、糖脂和蛋白聚糖上合成 α -gal表位。天然抗Gal抗体与这些 α -gal表位的结合激活补体系统并因此产生补体裂解肽形式的趋化因子,其募集抗原递呈细胞到所治疗的肿瘤病灶中。(3) 由于补体依赖性细胞毒性和抗体依赖性细胞毒性(ADCC),肿瘤细胞被溶瘤病毒和抗Gal与 α -gal表位在细胞膜上的结合溶解。包被有抗Gal抗体(其结合到 α -gal表位)的死亡细胞和破裂细胞膜被抗原递呈细胞(APC)经由包被细胞或

细胞膜的抗Gal抗体的Fc部分和在APC上的Fc γ 受体之间的相互作用内化。由这种摄取引起的内化的TAA经APC加工,并且TAA肽随后在与MHC分子相关的APC细胞膜上呈递。APC迁移至引流淋巴结,其中呈递的TAA肽结合肿瘤特异性T细胞的T细胞受体。作为这种相互作用的结果,这些T细胞被活化。活化的肿瘤特异性T细胞增殖并离开淋巴结以循环、检测并破坏转移性肿瘤细胞。

[0014] 图3:提供在由包含 $\alpha 1,3$ GT基因(Ad α GT)的腺病毒转导的HeLa细胞中出现 $\alpha-1,3$ 半乳糖基转移酶($\alpha 1,3$ GT)和 α -gal表位的示意性时间表。

[0015] 图4:提供示出 α -gal表位在小鼠B16黑素瘤细胞上表达的图,所述细胞用Ad α GT转导,这通过与*Bandeiraea simplicifolia* IB4 (BS)凝集素(A)和小鼠抗Gal IgG(B)的结合指示。A. α -gal表位在B16Ad α GT细胞(即通过Ad α GT[1×10^{10} 个感染单位(IU)/ml]转导的B16细胞)上的表达,这通过用BS凝集素染色的细胞的流式细胞术进行测量。凝集素偶联到荧光素(FITC)上。带有点区域的细线图- B16Adcont细胞(即,用不含插入基因的腺病毒转导的黑素瘤细胞);粗线图- B16Ad α GT细胞。B. 在 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶敲除小鼠血清中的抗Gal与BL6Ad α GT细胞(●)或B16Adcont细胞(○)上的 α -gal表位的结合,通过ELISA测定。6个小鼠中的3个代表性小鼠数据具有相似结果。

[0016] 图5:提供示出使用B16Ad α GT疫苗保护 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶敲除小鼠免受B16肿瘤攻击的图。产生抗Gal的 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶敲除小鼠接种有 2×10^6 个表达 α -gal表位的辐照过的B16细胞(B16Ad α GT)(●),或者接种有用对照腺病毒转导的辐照过的B16细胞(B16Adcont)(○)。一周后重复这一免疫。一周后用 0.2×10^6 个活B16细胞(A)或 0.5×10^6 个活B16细胞(B)攻击小鼠。每天监测小鼠的肿瘤生长,持续2个月。结果表示为在肿瘤攻击后的不同天时保持无肿瘤的小鼠的百分比。结果是在(A)中,实验组中有22只小鼠并且对照组中有21只小鼠,并且在(B)中,在独立的实验中,实验组中有21只小鼠并且对照组中有18只小鼠。

[0017] 图6:提供CRAd- α GT(A)和CRAd-GFP(B)的基因结构。修饰Ad5基因序列以表达Ad3的纤突结。通过分别缺失或替换 $\alpha 1,3$ GT或GFP基因的核苷酸序列来修饰E3或E1序列。

[0018] 图7:在感染CRAd- α GT后人癌细胞成活力的定量。将A549和A375细胞接种在96-孔板中,用从 1.2×10^{11} 病毒颗粒(VP)/ml CRAd- α GT或 9.7×10^{10} VP/ml CRAd-GFP对照病毒开始连续滴定的病毒感染并培养72小时。细胞成活力使用发光细胞成活力检测法Cell Titre Glo (Promega)进行定量。

[0019] 图8:在感染CRAd- α GT后人癌细胞成活力的可视化。将A549(肺癌)和A375(黑素瘤)细胞接种在24-孔板中,用 3.6×10^7 病毒颗粒(VP)/ml CRAd- α GT或 1.9×10^{10} VP/ml CRAd-GFP对照病毒感染并培养72小时。使用10x放大倍率的光学显微镜实施可视化。

[0020] 图9:分析在用CRAd- α GT感染后抗Gal与人癌细胞的结合。A549和A375细胞用 1.44×10^6 病毒颗粒(VP)/ml CRAd- α GT或 1.16×10^6 VP/ml CRAd-GFP对照病毒进行感染。通过流式细胞术分析细胞的抗Gal结合和GFP表达。

[0021] 发明详细描述

根据本发明的第一方面,提供了一种溶瘤病毒,其包含编码己糖基转移酶的核酸。

[0022] 本发明涉及组合物和方法,它们组合溶瘤病毒诱导的肿瘤细胞溶解与抗原递呈细胞(APC)向肿瘤部位的主动免疫介导的靶向和募集。表达己糖基转移酶如 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转

移酶的工程化溶瘤病毒将修饰感染细胞的糖基化,使得它们在病毒诱导的溶解前在细胞膜上表达 α -gal表位。当肿瘤细胞随后被病毒溶解时,细胞膜片段将被结合 α -gal表位以形成免疫复合物的天然抗Gal抗体调理。通过在抗Gal抗体的Fc区域与APC上的Fc γ 受体(Fc γ R)之间的相互作用,抗Gal抗体将增强通过APC对肿瘤细胞片段的吞噬。相似地,在病毒感染后表达 α -gal表位的完整肿瘤细胞也将被抗Gal调理并被APC经由Fc γ Rs摄取。经由Fc γ Rs摄取抗原导致APC的活化和成熟,其加工肿瘤抗原以递呈在MHC分子上并迁移至引流淋巴结,其中它们将肿瘤抗原递呈于T细胞。通过这种方法,对患者自身的肿瘤抗原产生保护性免疫应答。

[0023] 除以上之外, α -gal表位在细胞表面上的表达以及它们随后与抗Gal抗体的复合将导致补体活化。补体活化导致:释放募集APC至肿瘤的趋化肽;用补体C3b分子调理完整肿瘤细胞和肿瘤细胞膜片段;补体介导的完整肿瘤细胞溶解。用补体C3b分子调理的完整肿瘤细胞和肿瘤细胞片段经由C3b和APC上的补体受体之间的相互作用,被APC结合并内化。

[0024] 因此,除溶瘤病毒诱导的感染肿瘤细胞溶解之外,用抗Gal抗体调理肿瘤细胞和细胞片段以及随后的补体活化及形成被APC吞噬的免疫复合物,导致保护性抗肿瘤免疫应答。因此,通过分开给予单独的非复制性 α 1,3-半乳糖基转移酶表达病毒,或能够复制的非 α 1,3-半乳糖基转移酶表达溶瘤病毒,改善通过组合病毒诱导的溶瘤与免疫活化对肿瘤块的破坏。

[0025] 本发明因此提供对多种类型癌症的改善治疗,并且甚至仍被认为是无法治愈的这种类型的治疗是可能的。

[0026] 本发明涉及使用溶瘤病毒的组合物和方法,所述溶瘤病毒已经经修饰以递送编码糖基转移酶基因如 α 1,3-半乳糖基转移酶的异源核酸序列。前提是病毒特异性地感染肿瘤细胞,该肿瘤细胞随后产生并表达功能性 α 1,3-半乳糖基转移酶。 α 1,3-半乳糖基转移酶随后在肿瘤细胞表面上产生并整合 α -gal表位。 α -gal表位在肿瘤细胞膜上的整合发生在溶瘤病毒诱导的细胞溶解之前,使得随后的细胞膜碎片标记有 α -gal表位。不希望受任何具体机制的约束,据信通过天然抗Gal抗体结合 α -gal标记的肿瘤细胞片段活化补体系统(其形成大多数抗原/抗体相互作用)并生成补体裂解趋化因子,其将APC募集到受治疗的肿瘤。表达 α -gal表位的肿瘤细胞和肿瘤细胞膜片段通过抗Gal调理并活性靶向募集至肿瘤的APC的吞噬作用。据信本文期望的方法在机制上不同于以前表达GM-CSF的溶瘤病毒方法,在以前的溶瘤病毒方法中APC通过胞饮作用以及最低限度的颗粒物质吞噬作用随机内化在它们附近的可溶性分子。在本发明方法中,APC更有效地吞噬肿瘤细胞膜,因为肿瘤细胞片段或完整肿瘤细胞表达 α -gal表位,其随后结合抗Gal抗体。在包被肿瘤细胞片段/完整肿瘤细胞的抗Gal抗体的Fc部分和APC上的Fc γ Rs之间的相互作用刺激APC内化、加工并递呈抗原于T细胞。另外,补体活化和随后用补体蛋白C3b调理肿瘤细胞片段与完整肿瘤细胞使携带补体受体的APC能够有效地内化、加工并递呈肿瘤抗原于T细胞。

[0027] 本发明方法是反直觉的,因为人们不大可能寻求用能够复制的溶瘤病毒改变肿瘤细胞表面糖基化以将细胞膜片段和完整细胞靶向APC摄取。

[0028] 在病毒诱导的细胞溶解之前的 α -gal表位的表达和细胞膜整合提供一种标记肿瘤细胞膜片段用于APC募集和APC的活性摄取的方法,与之前描述的低效方法相比,该方法诱导保护性抗肿瘤免疫应答。虽然不受任何特定机制的限制,在图1和图2中提供了示意图,它

们示出一种可能的机制,由此据信要求保护的组合物和方法具有治疗作用。

[0029] 除非另外指明,本公开的实施方案将使用以下技术:医学、有机化学、生物化学、分子生物学、药理学等等,它们在本领域技术范围内。此类技术在文献中充分说明。

[0030] 必须注意的是,除非本文内容以其它方式明确指出,否则如在本说明书和所附权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代对象。在本说明书及随后的权利要求书中,将会提到多个术语,它们应当被定义为具有如下含义,除非相反的意向很明显。

[0031] 除非另外指明,在描述各种实施方案之前,提供并应使用以下定义。

[0032] 在一个实施方案中,酶是半乳糖基转移酶。在另一个实施方案中,酶是 α 1,3-半乳糖基转移酶。

[0033] I. 组合物

本文可用的组合物包含溶瘤病毒和编码半乳糖基转移酶的核酸序列以及用于给药的任选的药理学上可接受的载体。因此,根据本发明的另一方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所定义的溶瘤病毒与药理学上可接受的载体的组合。

[0034] A. 病毒

在一个实施方案中,病毒经工程化以成为溶瘤的。在一个另选的实施方案中,病毒是天然溶瘤的。

[0035] 在一个实施方案中,溶瘤病毒包含对肿瘤干细胞标记特异性的重组结合结构域。

[0036] 在一个实施方案中,病毒是复制受限的,并且仅溶解癌细胞,保留非癌细胞。

[0037] 复制限制性的溶瘤病毒尤其可用于本文所述的组合物和方法。此类病毒仅在癌细胞中复制并杀伤它们。它们可另外编码异源基因(或多个基因),所述基因编码具有另外的抗肿瘤特性的蛋白。术语溶瘤病毒是指包含感染/进入并溶解癌细胞的任何病毒。理想的溶瘤病毒通过直接的细胞溶解以及对非肿瘤组织的最小破坏,有效地杀伤患者癌细胞的临床相关的部分。

[0038] 如果溶瘤病毒是天然非病原性的(例如天然不感染人)或者仅引起人的温和型疾病(例如腺病毒引起流感样症状),则它们是优选的(从安全角度上)。出于这种原因,已经成功用于批准的疫苗并且已经给予数千或数百万的人的病毒(例如牛痘苗)也是优选的。如果病毒对人是病原性的并且与重大疾病(例如与一些疱疹病毒株相关联的神经毒性)相关联,则优选在病毒基因组中制造多个缺失或突变,从而使得它们对癌细胞特异性并减少内源性病毒的单个基因重组事件导致完全病原株的风险。靶向肿瘤细胞进入和复制特异性是理想的。此外,病毒当施用于患者时应为安全且无致病性的。来源于多种不同类型病毒的溶瘤病毒已被Liu等人描述(Liu等人,Nature Clinical Practice Oncology 4:(2)101-117,2007)。在这些有被膜病毒中,最著名的为例如但不限于单纯疱疹病毒(HSV)、牛痘病毒(VV)和副粘病毒如麻疹病毒(MeV)、新城疫病毒(NDV)或弹状病毒如水疱性口炎病毒(VSV)。除施用未经修饰的野生型病毒之外,基因工程能够进一步改善溶瘤病毒的安全性和功效。

[0039] 编码异源基因的复制限制性溶瘤病毒载体的一个关键特征是初始剂量的异源基因能够通过注射病灶内的癌细胞中的复制及从中释放,在体内扩增许多倍。这由例如Liu等人提出(Liu等人,2003),描述了编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的突变单纯疱疹病毒-1(HSV-1)载体的特征。这些癌症治疗剂已经被统称为“防护性治疗疫苗”

(Bauzon & Hermiston, 2014)。工程化被膜蛋白能够限制病毒感染肿瘤细胞,并且插入自杀基因能够增强治疗效果(Nakamura等人,Expert Opin.Bio.Ther.4:(10):1685-1692,2004);Liu等人,Nature Clinical Practice Oncology 4:(2)101-117,2007;Liu等人,Gene Therapy,10(4),292-303,2003)。

[0040] 病毒可来源于经充分表征的实验室适应的病毒株,其已经通过无限增殖化细胞系在组织培养中的多个连续传代得到保持。然而,在最佳培养条件下,患者内的人肿瘤比永生细胞系生长得更慢,并且可能具有限制代谢和细胞分裂速度的其它环境和发展因素(例如可能存在于大的肿瘤块中心的低氧环境,这由营养供应不足导致)。因此,优选地选择体内(原位)生长最佳的病毒,而不是基于它在组织培养中的生长特征进行选择。例如,来源于临床分离物JS1(获取自患者并已经在组织培养中仅进行了短时间的增殖)的HSV-1病毒株,已经用于产生溶瘤病毒以治疗癌症患者(Liu,2003)。选择临床分离物的一个重要的考虑是能够识别最佳条件,使得它能够体外增殖,这是临床材料的按比例放大及制造所必需的。设想进行基因组突变,其改善组织培养中的病毒复制,同时不损害它在体内肿瘤中的生长。

[0041] 除基于其在患者内的肿瘤组织中复制并溶解肿瘤组织的能力选择病毒载体之外,还设想基因组的其它突变,进一步改善它进行体内复制的能力。例如,从临床HSV-1株JS1中缺失两个基因(Liu,2003)。第一缺失ICP34.5限制癌细胞的病毒复制;第二缺失ICP47导致编码阻止宿主蛋白PKR的磷酸化的病毒蛋白的US11的早期表达。PKR是对病毒感染的固有免疫应答的关键组分 - 在磷酸化时它切断感染细胞中的蛋白翻译并限制病毒复制。因此,突变JS1 ICP34.5-/ICP47- 株的体内复制相对于野生型(非突变型)病毒株增强。

[0042] 在各种实施方案中,溶瘤病毒是有溶瘤复制能力的腺病毒、牛痘病毒、疱疹病毒、呼肠孤病毒、麻疹病毒或新城疫病毒。

[0043] 在另一个实施方案中,病毒是人源或非人源的基于RNA或DNA的病毒,例如腺病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、自主性细小病毒、水疱性口炎病毒(VSV)或呼肠孤病毒。

[0044] 如表1所示的示例性溶瘤病毒是当前用于临床试验的病毒,并且可如本文所述进行修饰以用于提供的治疗方法。在不同实施方案中,溶瘤病毒是来源于以下病毒科的有被膜病毒:疱疹病毒科、痘病毒科、弹状病毒科或副粘病毒科,优选地来源于副粘病毒科,麻疹病毒属。

[0045] 表1:临床评价的溶瘤病毒

病毒	名称	癌症类型
腺病毒	ONYX-015 H101	SCCHN
		胶质瘤
		卵巢
	CGTG-102	实体瘤
	CG0070	膀胱
牛痘病毒	ICOVIR-5	实体瘤
	ColoAd1	结肠直肠癌
	GLONC1	实体瘤
	JX-594	肝脏肿瘤
		实体瘤 IV
疱疹病毒	G207	胶质瘤
	NV1020	肝脏肿瘤 IA
	TVec	乳腺
		SCCHN
		黑色素瘤 IT
呼肠孤病毒		肝脏肿瘤
	Reohysin	SCCHN IT
		实体瘤 IV
麻疹病毒	MV-CEA	卵巢 IP
	MV-NIS	卵巢 IP
		胶质瘤 IT
		骨髓瘤 IV
		间皮瘤
NDV	PV701	实体瘤

来自Bauzon & Hermiston, 2014

一些溶瘤病毒经基因修饰以赋予肿瘤特异性的复制(腺病毒、疱疹病毒、牛痘病毒),而其它病毒是天然的肿瘤特异性病毒(呼肠孤病毒、新城疫病毒、自主性细小病毒、某些麻疹毒株和水疱性口炎病毒(VSV))。

[0046] i) 腺病毒

在一个实施方案中,溶瘤病毒是腺病毒。在本文实施例1-3和8和图4-9中提供数据,它们显示使用包含 $\alpha 1, 3$ -半乳糖基转移酶的腺病毒获得的阳性结果。人腺病毒是约30-38 kB的无被膜双链DNA病毒。腺病毒的关键特征是它们编码多种抑制关键宿主调节蛋白的病毒蛋白。这些宿主调节蛋白的一些(诸如p53)在多种癌症中是缺陷的。因此,缺失病毒基因致使突变病毒在缺陷调节宿主蛋白的癌症中选择性复制。

[0047] 因此,腺病毒E1B-55kD基因(p53-抑制蛋白)的突变(例如在病毒d11520中)是肿瘤选择性的,其具有有限的p53功能或无此功能。p53功能在大多数人类癌症中通过各种机制丢失,包括基因突变、p53-结合抑制剂(例如mdm2,人乳头瘤病毒E6)的过表达、和由p14^{ARF}调控的p53-抑制途径的丢失。

[0048] 相似地,在E1a保守区2中的缺失具有缺陷型视网膜母细胞瘤(RB)蛋白结合,并且评估这些突变对抗RB途径异常的肿瘤的作用(例如在病毒d1922/947中)。

[0049] 获得癌症-细胞选择性复制的腺病毒的另一方法是使用启动子控制病毒E1a基因产物的表达,该启动子是目的组织或癌症特异性的。例如,这已经应用于靶向前列腺癌的溶

瘤腺病毒(通过基因组的基因修饰在E1a基因上游引入前列腺特异性的抗原(PSA)启动子/增强子。

[0050] 在一个实施方案中,病毒是有条件复制的腺病毒(CRAd),其中复制受限于肿瘤细胞。CRAds已经显示在癌细胞中选择性复制,引起它们的溶解和死亡(Fueyo等人,2000; Kanno等人,2012; Bramante等人,2015)。已经使用腺病毒5(Ad5)生成CRAds,该病毒已经经基因修饰以表达腺病毒3(Ad3)的纤突结,形成Ad5/3嵌合病毒(Kanerva等人,2003; Kim等人,2013)。

[0051] 因此,在一个实施方案中,CRAd是一种Ad5/3嵌合病毒。嵌合Ad5/3病毒能够利用CD46(Ad3受体)而非由Ad5结合的柯萨奇-腺病毒受体(CAR)结合细胞并进入细胞。这是有利的,因为多种肿瘤具有可变的CAR表达,而所有有核细胞表达CD46(Ulasov等人,2006)。通过在病毒即时早期(E1a)基因的恒定区2(CR2)引入24-碱基对的缺失($\Delta 24$),致使病毒进行有条件复制(Kanerva等人,2003)。因此,在一个实施方案中,Ad5/3嵌合病毒另外在病毒即时早期(E1a)基因的恒定区2(CR2)中包含24-碱基对的缺失($\Delta 24$),本文称为Ad5/3- $\Delta 24$ CRAd。这个突变产生病毒E1a蛋白,它不能结合视网膜母细胞瘤(Rb)蛋白以诱导细胞内的S期(Fueyo等人,2000)。因此,病毒不能在不分裂的正常细胞内复制,但是在具有无活性Rb/p16途径的细胞内有效复制,该途径经指示是所有癌症共有的表型(Sherr, 1996)。嵌合的有条件复制的Ad5/3- $\Delta 24$ CRAd可通过用转基因取代腺病毒早期区(E3)基因进一步修饰,这产生Ad5/3- $\Delta 24$ CRAd,其在复制期间特异性地产生转基因(Koski等人,2010; Kanerva等人,2013; Bramante等人,2015)。嵌合的有条件复制的Ad5/3- $\Delta 24$ CRAd已经通过用 $\alpha 1, 3$ -半乳糖基转移酶转基因取代腺病毒早期区(E3)基因进一步修饰,这产生Ad5/3- $\Delta 24$ CRAd,其在复制期间特异性地产生 $\alpha 1, 3$ -半乳糖基转移酶。因此,在一个实施方案中,Ad5/3- $\Delta 24$ CRAd另外包含 $\alpha 1, 3$ -半乳糖基转移酶转基因,本文称为CRAd- α GT。在本文实施例8和图6-9中提供数据,它们显示用CRAd- α GT感染的人肺癌和黑素瘤细胞在细胞表面上表达 α -gal表位并且在病毒诱导的溶解前被抗Gal抗体结合。

[0052] ii) 疱疹病毒

在一个实施方案中,溶瘤病毒是疱疹病毒。在本文实施例4-7中提供方法,所述实施例显示使用包含 $\alpha 1, 3$ 半乳糖基转移酶的疱疹病毒如何可获得阳性结果。疱疹病毒(HSV)是约152 kbp的有被膜双链DNA病毒,并且具有对神经元细胞和粘膜细胞的天然向性。已经提出HSV在神经系统中和别处用作基因递送载体,并且用于癌症的溶瘤治疗。然而在两处应用中,病毒必须失活,使得它不再是病原性的,但是使得它仍能够进入细胞并行使期望的功能。因此为了利用HSV将非毒性基因递送至靶细胞,已经变得明显的是在大多数情况下,必须防止/最小化病毒的即时早期基因表达。对于癌症的溶瘤治疗(其也可包括递送增强治疗效果的基因),已经鉴定了HSV的多个突变,它们仍允许病毒在培养物中或在体内(例如在肿瘤内)活性分裂的细胞内复制,但是阻止在正常组织内的显著复制。此类突变包括破坏编码ICP34.5、ICP6和胸苷激酶的基因。其中,带有ICP34.5的突变、或ICP34.5的突变和例如ICP6的突变的病毒迄今已经显示出最有利的安全特征。仅缺失ICP34.5的病毒已经显示体外在多种肿瘤细胞类型中复制,并且在人工诱导的小鼠脑瘤中选择性复制,但在周围组织中很少复制。早期临床试验也已显示它们对人的安全性。此类病毒及使用的示例描述于PCT公开WO 2001/053506、WO 98/004726、WO 98/051809和WO 99/060145中。

[0053] 在一个实施方案中,溶瘤病毒是HSV1病毒。一个示例性溶瘤病毒株是HSV1病毒株JS 1,其在2001年1月2日以登录号01010209保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(European Collection of Cell Cultures,ECACC),CAMR,Sailsbury,Wiltshire SP4 0JG,United Kingdom。例如这个病毒株的溶瘤病毒株可如本文所述进行修饰以表达半乳糖基转移酶,用于提供的方法。

[0054] iii) 牛痘病毒

在一个实施方案中,溶瘤病毒是牛痘病毒。牛痘病毒是一种约200 kB的有被膜的双链DNA病毒。这种病毒在细胞质中复制,它的感染颗粒携带它的基因的DNA复制和转录所需的酶。牛痘病毒具有使其成为一种优异的溶瘤病毒的多种属性。它具有大的基因组,能够容纳多个外来基因,它具有广泛的宿主范围,复制迅速,并且能够容易地重组以制备病毒突变体。通过使用牛痘病毒作为天花疫苗,已经建立了良好的安全记录。

[0055] iv) 麻疹病毒

在一个实施方案中,病毒是麻疹病毒(MeV)或MeV的疫苗株如Edmonston病毒株(MeV_{Edm})。MeV利用两个被膜糖蛋白(融合蛋白(F)和血凝素蛋白(H))以进入靶细胞。蛋白F是I型跨膜蛋白,而蛋白H是II型跨膜结构域,即它的氨基末端直接暴露于细胞质区域。因此两种蛋白均包含跨膜区域和细胞质区域。F蛋白的一种已知功能是介导病毒膜与宿主细胞的细胞膜的融合。H蛋白的功能包括识别在目标膜上的受体并支持F蛋白的膜融合功能。在细胞表面膜处的直接且高效的膜融合是麻疹病毒和麻疹病毒属的特定属性,因此将它们自身与多种其它被膜病毒区分开来,所述其它被膜病毒发生内吞并且将仅在内吞时的pH降低时发生融合。两种蛋白在病毒表面上排列成紧密堆积的刺突的规则阵列,H四聚物和F三聚物(Russell等人,Virology 199:160-168,1994)。

[0056] MeV的Edmonston病毒株(MeV_{Edm})利用单个蛋白作为它的主要受体,即,已知为补体活化因子的调节子的蛋白,CD46 (Gerlier等人,Trends Microbiol.3:338-345,1995)。CD46在所有有核人细胞上表达。然而,麻疹病毒的大多数临床分离株不能有效地利用CD46作为受体。人SLAM(信号传导淋巴细胞激活分子;也称为CDw150)是一种近来发现的膜糖蛋白,它在一些T和B细胞上表达,并且也发现其用作MeV的细胞受体,包括Edmonston病毒株(Tatsuo等人,Nature 406(6798):893-7,2000)。MeV H和F蛋白的精确生物功能和相互作用很大程度上仍不清楚。

[0057] 对癌症的临床开发中有多个溶瘤病毒可被修饰以包括编码己糖基转移酶如 α 1,3-半乳糖基转移酶的核酸序列。此类溶瘤病毒的示例包括Ad-mda7(p53 Inc)、Ad-p53(p53 Inc)、CG-0070(Cold Genesys,Inc.)、DNX-2401(DNAtrix,Inc.)、DWP-418(Daewoong Pharmaceutical)、表达huIL-12的HSV(Univ.Alabama Birmingham)、G-47 δ (Univ.Tokyo Hospital)、更昔洛韦/ADV-TK(Shenzhen Tiandakang)、GLONC-1(Genelux Corp.)、GLONC-2(Genelux Corp.)、GLONC-3(Genelux Corp.)、HF-10(Takara Holdings)、HSV-1716(Virttu Biologics)、JX-929(Jennerex Bioterapeutics)、KH-901(Chengdu Kanghong Pharmaceuticals)、MV-NIS疫苗(Mayo Clinic)、NDV-HUJ溶瘤(Hadassah medical)、OBP-301(Oncolys BioPharma)、溶瘤AdV(Erasmus MC)、ONCOS-102(Oncos Therapeutics)、ORCA-010(Orca Therapeutics)、细小病毒H-1(Oryx GmbH)、pexastimogene devacirepvec(Jennerex Bioterapeutics)、PV-701(Wellstat Biologics)、talimogene laherparepvec

(Amgen)、TG-1042 (Ascend Biopharmaceuticals)、VCN-01 (VCN Biosciences) 和VirRx-007 (p53 Inc.)。

[0058] 本发明的病毒感染肿瘤细胞并在其中复制,随后杀伤肿瘤细胞。因此,此类病毒是能够复制的。优选地,它们能够在肿瘤细胞中选择性复制。这意味着它们在肿瘤细胞中复制并且在非肿瘤细胞中不复制,或者它们在肿瘤细胞中的复制比在非肿瘤细胞中的复制更有效。其中病毒能够复制的细胞是许可性细胞。

[0059] 可通过本文所述的测试进行选择复制能力的测量,用于测量复制和肿瘤细胞杀伤能力,并且如需要的话,还通过本文提及的统计技术进行分析。

[0060] 本发明的病毒优选地具有比未经修饰的亲本病毒株更大的感染或在肿瘤细胞中复制的能力,从而杀伤肿瘤细胞或在组织的细胞间扩散。优选地,这种能力是统计意义上显著更大的能力。例如,对于进行测试的特性,根据本发明的病毒可具有未经修饰的亲本病毒株多达1.1倍,1.2倍,1.5倍,2倍,5倍,10倍,20倍,50倍或100倍的能力。

[0061] 可通过本领域已知的任何方式测量关于肿瘤细胞的病毒株的特性。例如,病毒感染肿瘤细胞的能力可通过测量感染给定百分比的细胞(例如50%或80%的细胞)所需的病毒剂量进行定量。在肿瘤细胞中复制的能力可通过生长测量进行测量,诸如在实施例中进行的那些测量,例如测量细胞中经6、12、24、36、48或72小时或更长的时间的病毒生长。相似地,病毒溶解肿瘤细胞的能力可通过测量用给定剂量的病毒培养6、12、24、36、48或72小时或更长时间的培养物中存活(对比死亡)细胞的比例进行定量。

[0062] B) 异源核酸序列和启动子

本发明的病毒可经修饰以携带异源核酸序列。在一个实施方案中,异源核酸编码己糖基转移酶。在一个实施方案中,核酸序列编码半乳糖基转移酶。在一个具体实施方案中,核酸序列编码 α 1,3-半乳糖基转移酶。如本文所用,术语“ α 1,3-半乳糖基转移酶”、“ α -1,3-半乳糖基转移酶”、“ α 1,3GT”、“ α 1,3GT”、“糖蛋白 α -半乳糖基转移酶1”和“GGTA1”是指能够合成 α -gal表位的任何酶。该酶在大多数哺乳动物中产生,除了人类、猿类和旧世界猴(Old World monkey)。该酶产生的碳水化合物结构在人类中是免疫原性的,并且大多数健康的人具有高滴度的天然抗 α -gal抗体,也称为“抗Gal”抗体。在一些实施方案中,术语“ α 1,3GT”是指小鼠 α 1,3GT(例如,小家鼠(*Mus musculus*) - GenBank登录号NM_010283的核苷酸460至1680)及其基因产物、以及它的哺乳动物功能对应物(例如,其它新世界猴(New World monkey)、原猴和非灵长类哺乳动物,但是不是人类、猿类和旧世界猴(Old World monkey))。在一些实施方案中,术语“ α 1,3GT”是指常见的狨猴基因(例如,狨猴(*Callithrix jacchus*) - GenBank登录号S71333)、牛 α 1,3GT(例如,牛(*Bos taurus*) - GenBank登录号NM_177511)、猫 α 1,3GT(例如,猫(*Felis catus*) - GenBank登录号NM_001009308)、羊 α 1,3GT(例如,绵羊(*Ovis aries*) - GenBank登录号NM_001009764)、大鼠 α 1,3GT(例如,褐鼠(*Rattus norvegicus*) - GenBank登录号NM_145674)和猪 α 1,3GT(例如,野猪(*Sus scrofa*) - GenBank登录号NM_213810)。本发明的一些实施方案包括哺乳动物 α 1,3GT的功能突变体,其在例如少于1-5%的残基上不同于野生型哺乳动物 α 1,3GT序列。具体地, α 1,3GT突变体包括但不限于天然存在的哺乳动物 α 1,3GT功能突变体,以及通过重组或其它方式(例如,1、2、3、4或5个氨基酸的取代、缺失、或添加,优选地对应于来自哺乳动物 α 1,3GT功能同系物的残基)产生的非天然存在的突变体,考虑寻找它们在本发明的组合物和方法中的使用。在其它

实施方案中,使用保留催化活性的截短形式的哺乳动物 $\alpha 1,3$ GT(例如GGTA1,其缺失90个氨基酸的N-末端茎区)。然而,从这个酶的C-末端缺失3个氨基酸导致它完全失活(Henion, T.R.,B.A.Macher,F. Anaraki和U. Galili,Glycobiology 4:193-201,1994)。

[0063] $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶之前已经在腺病毒中经工程化并用于细胞转移(Deriy等人,Glycobiology,12(2),135-44 2002;Deriy等人,Cancer Gene Therapy,12(6),528-39,2005)。 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶尚未进行工程化以被溶瘤病毒表达,用于本文所述的组合溶解/免疫方法。

[0064] 在本文所述的实施方案中,异源核酸序列优选地可操作地连接控制序列,允许所述基因在体内细胞中表达。本发明的病毒因此可用于体内递送异源核酸序列至其中它将被表达的细胞。

[0065] 根据本发明的另一方面,提供了制备如本文所定义的溶瘤病毒的方法,其包括将编码己糖基转移酶的核酸掺入所述溶瘤病毒的基因组的步骤。

[0066] 可通过任何合适的技术将异源核酸序列插入病毒基因组,例如HSV病毒株与例如携带侧接HSV序列的基因的质粒载体的同源重组。

[0067] 可利用本领域熟知的克隆技术将异源核酸序列引入包含疱疹病毒序列的合适质粒载体。因此,在一个实施方案中,所述掺入步骤包括克隆。可在任何位置将异源核酸序列插入病毒基因组,只要仍保留有溶瘤特性。可将异源核酸序列在多个位点插入病毒基因组内。例如,可将2至5个基因插入基因组。

[0068] 异源核酸序列的转录序列优选地可操作地连接控制序列,允许基因在肿瘤细胞中表达。术语“可操作地连接”是指毗邻,其中所述组分间的关系允许它们以预期的方式起作用。控制序列与编码序列的“可操作地连接”的连接方式使得能够实现编码序列在与控制序列相容的条件下表达。

[0069] 控制序列包括允许异源核酸序列表达的启动子和用来终止转录的信号。启动子选自在哺乳动物中有功能的启动子,优选人类肿瘤细胞。启动子可以来自真核基因的启动子序列。例如,启动子可以来自其中表达异源基因的细胞(优选哺乳动物肿瘤细胞,优选人类肿瘤细胞)的基因组。对于真核启动子而言,它们可以是以普遍存在的方式(例如 β -肌动蛋白,微管蛋白的启动子),或者以肿瘤特异性方式起作用的启动子。还可以存在响应特异性刺激的启动子,例如结合类固醇激素受体的启动子。也可以使用病毒启动子,例如莫洛尼(Moloney)鼠白血病病毒长末端重复(MMLV LTR)启动子,或其它逆转录病毒启动子、人或小鼠巨细胞病毒(CMV) IE启动子、或疱疹病毒基因的启动子,包括驱动潜伏伴随的转录本表达的那些。

[0070] 应用本领域技术人员已知的常规克隆技术(参见,例如Sambrook等人,1989, Molecular Cloning--A laboratory manual;Cold Spring Harbor Press),可以构建包含异源核酸序列和控制序列的表达盒和其它合适的构建体。

[0071] 启动子可经诱导使得能够在肿瘤细胞的生存期内对异源核酸序列的表达水平进行调控也可能是有利的。可诱导是指使用该启动子所实现的表达水平能够被调控。例如,本发明的病毒可以进一步包含在强启动子控制下(例如CMV IE启动子)编码tet抑制子/VP16转录激活因子融合蛋白的异源核酸序列,并且异源核酸序列可以处于响应之前报道的tet抑制子VP 16转录激活因子融合蛋白的启动子控制之下(Gossen和Bujard,1992,Gossen等

人,1995)。因此,在该示例中,异源核酸序列的表达将取决于是否存在四环素。

[0072] 在疱疹病毒基因组中可包括多个异源基因。因此,本发明的病毒可以包括两个或更多个异源核酸序列,例如2至3、4或5个异源核酸序列。可在病毒基因组的单个位点或多个位点将超过一个基因和相关联的控制序列引入特定的溶瘤病毒株。另选地,可以使用彼此方向相反且各自驱动一个异源核酸序列表达的成对启动子(相同或不同的启动子)。

[0073] 在另一个实施方案中,免疫调节蛋白与半乳糖基转移酶一起共表达。优选地,免疫调节蛋白将增强病毒的抗肿瘤活性。更优选地,蛋白是GM-CSF或另一种细胞因子、趋化因子如RANTES、或另一种免疫调节分子如B7.1、B7.2或CD40L。最优选地,免疫调节分子是GM-CSF。因此,在一个实施方案中,溶瘤病毒包含编码GM-CSF的核酸序列。免疫调节基因可为野生型基因的任何等位变体,或者它可为突变基因。免疫调节基因将来源于哺乳动物,优选啮齿动物或灵长类动物,更优选人类。

[0074] C) 药物组合物

本发明的溶瘤病毒的药物组合物可利用一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂,以任何常规方式配制。可配制本发明的药物组合物用于多种给予方式,包括全身给予、局部或局部性给予。技术和制剂可见于例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa.

[0075] 在一个实施方案中,配制溶瘤病毒组合物用于静脉内给予、肌内给予、腹膜内给予、瘤内给予、皮下给予、口服给予、直肠给予、阴道内给予、鼻内给予、经粘膜给予或透皮给予。

[0076] 在另一个实施方案中,配制溶瘤病毒组合物用于静脉内给予、肌内给予、腹膜内给予、皮下给予、口服给予、直肠给予、阴道内给予、鼻内给予、经粘膜给予或透皮给予。

[0077] 合适的溶瘤病毒向待治疗的癌细胞的递送可使用裸病毒或包被在载体(例如,纳米粒子、脂质体或其它囊泡)中的病毒进行。

[0078] 优选地以“治疗有效量”给予,这足以显示对个体的有益效果。实际给予量和给予速率以及时程将取决于进行治疗的肿瘤的性质和严重程度。治疗处方如剂量决定等在普通从业者和其他医生的责任内,并且通常考虑待治疗的疾病、个体患者的情况、递送部位、给予方法和从业者已知的其它因素。上文提及的技术和方案的示例可见于Remington's Pharmaceutical Sciences, 第20版, 2000年出版, Lippincott, Williams & Wilkins。

[0079] 可以任何治疗有效剂量给予溶瘤病毒。治疗有效剂量可为,但不限于约 10^3 , 约 10^4 , 约 10^5 , 约 10^6 , 约 10^7 , 约 10^8 或约 10^9 个噬斑形成单位(pfu)。

[0080] 对于全身给予,注射是优选的,包括瘤内注射、肌内注射、静脉内注射、腹膜内注射、和皮下注射。为了进行注射,可将本发明的药物组合物配制成液体溶液,优选生理上相容的缓冲液,诸如Hank's溶液或Ringer's溶液。此外,可将药物组合物配制成固体形式并在紧接使用前重新溶解或悬浮。药物组合物的冻干形式也是合适的。

[0081] 也可通过经粘膜或透皮方式进行全身给予。对于经粘膜或透皮给予,适用于待透过屏障的渗透剂用于制剂中。此类渗透剂在本领域中是公知的,并且包括例如用于经粘膜给予的胆汁盐和夫西地酸衍生物。此外,洗涤剂也可用于促进渗透。经粘膜给予可利用鼻喷剂或栓剂实施。对于局部给予,可将本发明的载体颗粒配制成软膏剂、油膏、凝胶、或霜膏,它们在本领域中是公知的。也可局部使用洗涤溶液以治疗创伤或炎症,从而加速愈合。

[0082] 可配制药物组合物用于通过注射(例如推注或连续输注)的胃肠外给予。注射制剂可以单位剂型提供,例如在安瓿中或在多剂量容器中,它们带有任选添加的防腐剂。还可将药物组合物配制成在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液,并且可包含其它剂,包括助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0083] 本发明还包括包含本发明的药物组合物和用于将组合物递送至受试者的递送装置的试剂盒。以举例的方式,递送装置可为可挤压的喷雾瓶、定量喷雾瓶、气溶胶喷雾装置、雾化器、干粉递送装置、自推进溶剂/粉末分配装置、注射器、针、棉塞、或剂量测量容器。试剂盒还可包括如本文所述的说明材料。

[0084] II) 方法

本发明的病毒组合物可以用于人或动物体的癌症疗法的方法。具体地,本发明的病毒可以用在癌症的溶瘤治疗中,该治疗具有或不具有另外的前药治疗或抗肿瘤免疫应答刺激。本发明的病毒组合物可用于哺乳动物,优选人体内的任何实体瘤的治疗。

[0085] 因此,根据本发明的另一方面,提供了一种治疗患有肿瘤的个体的方法,所述方法包括以下步骤:

i) 在至少一个癌细胞中表达通过如本文所定义的溶瘤病毒递送的内源性酶以改变细胞膜糖基化;并且

ii) 诱导自给予溶瘤病毒产生的所述至少一个癌细胞的溶解。

[0086] 在一个实施方案中,该方法涉及通过给予有效量的溶瘤病毒组合物治疗患有癌症的个体,其中病毒感染在溶解前引起己糖基转移酶的表达。

[0087] 在一个实施方案中,给予有效量的溶瘤病毒以感染个体中的至少一个癌细胞。

[0088] 在另一个实施方案中,在感染10小时内将 α -gal表位插入感染的细胞膜。

[0089] 在另一个实施方案中,在溶解感染细胞前将 α -gal表位插入感染的细胞膜。

[0090] 在一个实施方案中,该方法涉及治疗患有癌症的个体。

[0091] 在另一个实施方案中,该方法涉及治疗患有肿瘤的个体。

[0092] 在另一个实施方案中,该方法涉及治疗患有癌症的个体。

[0093] 在一个实施方案中,改变的细胞膜活性地将膜片段靶向抗原递呈细胞募集。

[0094] 在另一个实施方案中,酶足以在溶解前,在感染细胞膜上表达 α -gal表位。

[0095] 在另一个实施方案中, α 1,3-半乳糖基转移酶表达足以在溶解后诱导对感染细胞的有效免疫应答。

[0096] 在另一个实施方案中, α -gal表位足以将抗原递呈细胞吸引到肿瘤位置。

[0097] 在另一个实施方案中,在感染4小时内表达所述酶。

[0098] 在另一个实施方案中, α -gal表位足以在肿瘤部位结合抗gal抗体。

[0099] 在这种方法中描述的抗Gal介导的肿瘤破坏可通过注射包含 α 1,3-半乳糖基转移酶基因的基因治疗载体来实现。在一个实施方案中,本发明设想一种治疗患有多个转移的黑素瘤患者的方法,该方法包括瘤内注射能够复制的溶瘤病毒,其包含 α 1,3-半乳糖基转移酶基因。在一个实施方案中,瘤内注射病毒组合物导致转导表达 α -gal表位的肿瘤细胞,其中这些肿瘤细胞在溶解前诱导瘤内炎症。瘤内炎症募集抗原递呈细胞如树突状细胞、巨噬细胞和某些B-细胞。感染的细胞可被本文所述的工程化可复制病毒组合物溶解,或者经由补体依赖的细胞溶解(CDC)或抗体依赖的细胞介导的细胞溶解(ADCC)机制,被结合到在转

导细胞上的 α -gal表位的天然抗Gal抗体破坏。虽然不必要理解本发明的机制,但据信抗Gal调理的肿瘤膜将把肿瘤细胞膜片段或完整的肿瘤细胞活性地靶向抗原递呈细胞,并因此促进保护性抗肿瘤免疫。

[0100] 在另一个实施方案中,本发明设想治疗在结肠和肝脏中具有多个转移的结肠直肠癌患者的方法,该方法包括瘤内注射包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因的溶瘤病毒。在一个实施方案中,注射包括作为递送病毒载体到肿瘤病灶中的方法的结肠镜检查或腹腔镜检查。

[0101] 在另一个实施方案中,本发明设想治疗在肺中具有多个转移的肺癌患者的方法,该方法包括瘤内注射包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因的溶瘤病毒。在一个实施方案中,注射包括支气管镜检查。

[0102] 在另一个实施方案中,本发明设想治疗患有膀胱癌的患者,该方法包括包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因病毒载体的溶瘤病毒。在一个实施方案中,所述载体通过膀胱镜检查给予。

[0103] 在另一个实施方案中,本发明设想治疗患有胰腺癌的患者,该方法包括包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因病毒载体的溶瘤病毒。在一个实施方案中,通过内窥镜检查或腹腔镜检查来给予载体。

[0104] 在另一个实施方案中,本发明设想治疗患有乳腺癌的患者,该方法包括包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因病毒载体的溶瘤病毒。在一个实施方案中,通过直接注入肿瘤来给予载体。

[0105] 包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因病毒载体的溶瘤病毒的给予可在可进行 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因的瘤内递送的任何实体瘤或淋巴瘤中进行。例如,瘤内递送描述于US 7,820,628中。

[0106] 用于递送 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因的另选的方法也可用能够递送基因的任何类型的病毒和非病毒载体进行。例如,这些方法包括但不限于腺病毒载体、腺病毒辅助病毒、逆转录病毒载体、慢病毒载体、裸DNA载体、疱疹病毒或裸RNA载体或DNA载体。

[0107] 在另一个实施方案中,本发明设想通过注入黑素瘤病灶或任何其它肿瘤病灶给予包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因的载体的方法,由此表位插入肿瘤细胞膜。在用包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因的溶瘤病毒转导的肿瘤细胞的情况下,抗Gal IgG将结合至表达 α -gal表位的肿瘤细胞膜,并且将使它们靶向抗原递呈细胞以引起还针对表达肿瘤抗原的未经治疗的肿瘤病灶的系统免疫应答。本领域的技术人员应认识到,本发明设想产生由通过引入肿瘤块的任何组合物,将抗Gal抗体靶向抗原递呈细胞(导致这种天然抗体与肿瘤细胞的原位结合)驱动的适应性抗肿瘤免疫。

[0108] A) 给药

本发明的病毒可以用于需要治疗的患者,优选人类患者。需要治疗的患者是患有癌症的个体,优选患有实体瘤的个体。治疗的目的是为了改善患者的病况。通常采用本发明病毒的治疗减轻癌症的症状。

[0109] 根据本发明的另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括将治疗有效量的本发明病毒给予需要治疗的患有癌症或具有瘤或肿瘤的患者。

[0110] 根据本发明的另一方面,提供了用于治疗癌症的如本文所定义的溶瘤病毒或如本文所定义的药物组合物。

[0111] 本发明溶瘤病毒对患有肿瘤的个体的给予将通常杀伤肿瘤细胞,因此减小肿瘤的体积和/或阻止恶性细胞从肿瘤的扩散,同时还募集抗原递呈细胞(APC)至肿瘤部位并诱导保护性抗肿瘤免疫应答。

[0112] 一种给予治疗的方法包括将所述病毒与药学上可接受的载体或稀释剂组合,从而产生药物组合物。

[0113] 合适的载体和稀释剂包括等渗盐水溶液,例如磷酸盐缓冲盐水。本文所述的组合物可使用常规的给予途径给予以促进肿瘤部位的病毒感染。

[0114] 在一个实施方案中,组合物经由注射(例如腹膜内注射、肌内注射、静脉内注射、皮下注射)、吸入或经鼻(例如通过口腔粘膜给予或鼻粘膜或鼻内给予)给予,或者通过口服、含服、胃肠外或直肠给予途径给予。

[0115] 在一个实施方案中,组合物通过直接注入目标组织给予,该目标组织可以是肿瘤或供应肿瘤的血管。在HSV的情况下,给予的病毒量的范围为 10^4 至 10^{10} 个噬斑形成单位(pfu),优选 10^5 至 10^8 pfu,更优选约 10^6 至 10^8 pfu。通常至多500 μ l,通常1至200 μ l,优选1至10 μ l的病毒药物组合物和药学上可接受的合适载体或稀释剂将用于注射。然而,对于某些溶瘤治疗应用而言,也可以采用至多但不限于10ml的较大剂量,这取决于肿瘤和接种的位置。

[0116] 所述给予途径和剂量仅作为指导目的,因为本领域技术人员将能够容易地确定最佳给予途径和剂量。剂量可以根据各种参数来确定,尤其是根据肿瘤的部位、肿瘤的体积和要治疗的患者的年龄、体重和病情以及给予途径。可通过研究组织培养物和合适动物模型中的病毒特性,首先在临床前优化剂量和给予频率。

[0117] 病毒可与药学上可接受的载体或稀释剂组合,从而产生药物组合物。大多数病毒的合适载体为缓冲盐水溶液,例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)。将理想地进行药物组合物的配制以能够在至多1ml的体积内给予合适剂量的病毒,但是可能存在以下情况:其中给予多达10ml的体积。在其中认为个体肿瘤病灶体积太小而不能用最佳剂量治疗的情况下,可能通过治疗多个病灶、每个病灶给予总最佳剂量的一部分的方式将最佳剂量给予。也设想可能需要多个剂量以引发有效的抗肿瘤应答。可基于在临床前模型中获得的功效数据或获取自类似病毒株的临床经验确定剂量间隔。

[0118] 优选地,通过直接注入肿瘤来给予病毒。病毒也可以全身给予或通过注射到供应肿瘤的血管给予。也可给予病毒作为膀胱内治疗;例如可用于治疗膀胱癌。给予的最佳途径取决于肿瘤的位置和体积。

[0119] 在一个实施方案中,所述方法是治疗患有肿瘤的个体的方法,该方法包括给予有效量的经修饰溶瘤病毒,其包含编码半乳糖基转移酶的核酸。

[0120] 因此,可配制本发明的溶瘤病毒以通过例如注射、吸入或经鼻(经口或鼻)或口服、含服、胃肠外或直肠给药给予。

[0121] B) 适应症

在具体的实施方案中,用于本发明方法的溶瘤病毒可给予患有前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、子宫内膜癌、膀胱癌、结肠癌或子宫颈癌;腺癌;黑素瘤;淋巴瘤;胶质瘤;或肉瘤如软组织肉瘤和骨肉瘤的受试者。

[0122] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于治疗或预防癌症的本发明的工程化溶瘤病

毒,所述癌症包括但不限于瘤、肿瘤、癌转移或特征在于不受控的细胞生长的任何疾病或病症,并且尤其是它们的多重耐药形式。癌症可为多灶性肿瘤。将本发明的疗法治疗的癌症和增生性疾病的类型的示例包括但不限于白血病(例如成髓细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、粒单核细胞白血病、单核细胞性白血病、红白血病、慢性粒细胞性白血病和慢性淋巴细胞性白血病)、淋巴瘤(例如霍奇金病和非霍奇金病)、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤因氏瘤、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、肾细胞癌、肝癌、维尔姆斯瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、发育异常和增生。在一个具体实施方案中,将本发明的治疗化合物给予患有前列腺癌的患者(例如,前列腺炎、良性前列腺肥大、良性前列腺增生(BPH)、前列腺副神经节瘤、前列腺腺癌、前列腺上皮内瘤、前列腺-直肠瘘、和非典型前列腺间质病变)。在一个尤其优选的实施方案中,本发明的药物用于治疗癌症、胶质瘤、肝癌和/或结肠癌。癌症的治疗和/或预防包括但不限于减轻与癌症相关联的症状、抑制癌症发展、促进癌症消退、以及增强免疫应答。

[0123] 如本文所用,术语肿瘤是指组织的异常生长。肿瘤可为良性的或恶性的。一般来讲,恶性肿瘤称为癌症。癌症不同于良性肿瘤之处在于恶性细胞侵袭其它组织的能力,其通过侵袭直接生长进入相邻组织,或通过转移植入远距离的部位(即,通过血液或淋巴系统传送)。

[0124] 本发明的方法适于治疗良性和恶性肿瘤(癌症)。

[0125] 如本文所定义,浅表肿瘤是位于身体外表面上的肿瘤,其自我约束并且不扩散到周围组织或身体的其它部位。体内肿瘤位于身体的内部器官上或其它内部部位上。侵袭性肿瘤是已经开始穿过正常组织屏障并入侵周围区域的肿瘤,例如已经扩散到乳腺管和小叶之外的侵袭性乳腺癌。

[0126] 设想通过本文公开的方法治疗的肿瘤类型的非排他性列表包括以下类别:(a) 腹部肿瘤,包括腹膜肿瘤和腹膜后肿瘤;(b) 骨肿瘤,包括股骨肿瘤、颅骨肿瘤、颌肿瘤、下颌骨肿瘤、上颌骨肿瘤、腭肿瘤、鼻肿瘤、眼眶肿瘤、颅底肿瘤、和脊柱肿瘤;(c) 乳腺肿瘤,包括男性乳腺肿瘤、乳腺导管癌、和叶状肿瘤;(d) 消化系统肿瘤,包括胆道肿瘤、胆管肿瘤、总胆管肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、食管肿瘤、肠肿瘤、盲肠肿瘤、阑尾肿瘤、结肠直肠肿瘤、结肠直肠腺瘤性息肉、结肠直肠加德纳综合征(Gardner Syndrome)、结肠肿瘤、结肠腺瘤性息肉、结肠加德纳综合征、乙状肿瘤、遗传性非息肉病性结肠直肠肿瘤、直肠肿瘤、肛门肿瘤、十二指肠肿瘤、回肠肿瘤、空肠肿瘤、胃肿瘤、肝脏肿瘤、肝细胞腺瘤、肝细胞癌、胰腺肿瘤、胰岛细胞腺瘤、胰岛瘤、胰岛细胞癌、胃泌素瘤、胰升糖素瘤、生长抑制素瘤、血管活性肠肽瘤、胰腺导管癌、和腹膜肿瘤;(e) 内分泌腺肿瘤,包括肾上腺肿瘤、肾上腺皮质肿瘤、肾上腺皮质腺瘤、肾上腺皮质癌、多发性内分泌肿瘤、多发性内分泌肿瘤1型、多发性内分泌肿瘤2a型、多发性内分泌肿瘤2b型、卵巢肿瘤、卵巢颗粒细胞肿瘤、黄体瘤、梅格斯综合征(Meigs' Syndrome)、卵巢Sertoli-Leydig细胞瘤、泡膜细胞瘤、胰腺肿瘤、副肿瘤性内分泌综合征、副甲状腺肿瘤、垂体肿瘤、尼尔森综合征(Nelson Syndrome)、睾丸肿瘤、睾丸Sertoli-Leydig细胞瘤、和甲状腺肿瘤;(f) 眼肿瘤,包括结膜肿瘤、眼眶肿瘤、视网膜肿瘤、视网膜母细胞瘤、葡萄膜肿瘤、脉络膜肿瘤、和虹膜肿瘤;(g) 脑、头部和颈部肿瘤,包括食管肿瘤、面

部肿瘤、眼睑肿瘤、口腔肿瘤、齿龈肿瘤、口腔白斑、毛状白斑、唇肿瘤、腭肿瘤、涎腺肿瘤、腮腺肿瘤、舌下腺肿瘤、上颌下腺肿瘤、舌肿瘤、耳鼻喉肿瘤、耳肿瘤、喉肿瘤、鼻肿瘤、鼻窦肿瘤、上颌窦肿瘤、咽肿瘤、下咽肿瘤、鼻咽肿瘤、鼻咽肿瘤、口咽肿瘤、扁桃体肿瘤、副甲状腺肿瘤、甲状腺肿瘤、和气管肿瘤；(h) 血液系统肿瘤，包括骨髓肿瘤；(i) 神经系统肿瘤，包括中枢神经系统肿瘤、脑肿瘤、脑室肿瘤、脉络丛肿瘤、脉络丛乳头状瘤、幕下肿瘤、脑干肿瘤、小脑肿瘤、神经细胞瘤、松果体瘤、幕上肿瘤、下丘脑肿瘤、垂体肿瘤、尼尔森综合征 (Nelson Syndrome)、颅神经肿瘤、视神经肿瘤、视神经胶质瘤、听神经瘤、神经纤维瘤病2、神经系统副肿瘤综合征、Lambert-Eaton肌无力综合征、边缘叶脑炎、横贯性脊髓炎、副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性多发性神经病、外周神经系统肿瘤、颅神经肿瘤、听神经瘤、和视神经肿瘤；(j) 盆腔肿瘤；(k) 皮肤肿瘤，包括棘皮瘤、皮脂腺肿瘤、汗腺肿瘤和基底细胞癌；(l) 软组织肿瘤，包括肌肉肿瘤和血管肿瘤；(m) 脾肿瘤；(n) 胸部肿瘤，包括心脏肿瘤、纵隔性肿瘤、呼吸道肿瘤、支气管肿瘤、肺肿瘤、支气管癌、非小细胞肺癌、肺钱币样病变、潘科斯特氏综合征 (Pancoasts's Syndrome)、肺母细胞瘤、肺硬化性血管瘤、胸膜肿瘤、恶性肿瘤性胸腔积液、气管肿瘤、胸腺肿瘤、和胸腺瘤；(o) 泌尿生殖系统肿瘤，包括女性生殖器肿瘤、输卵管肿瘤、子宫肿瘤、子宫颈肿瘤、子宫内膜肿瘤、子宫内膜样癌、子宫内膜间质肿瘤、子宫内膜间质肉瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤、男性生殖系统肿瘤、阴茎肿瘤、前列腺肿瘤、睾丸肿瘤、泌尿系统肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、肾细胞癌、肾母细胞瘤、Denys-Drash综合征、WAGR综合征、中胚叶肾瘤、输尿管肿瘤和尿道肿瘤；(p) 以及另外的癌症，包括肾癌、肺癌、黑素瘤、白血病、巴雷特食管 (Barrett's esophagus)、化生癌前细胞。

[0127] 本发明的药物组合物可单独给予或与其它类型的癌症治疗策略 (例如放射治疗、化学疗法、激素疗法、免疫疗法和抗肿瘤剂) 组合给予。抗肿瘤剂的示例包括但不限于顺铂、异环磷酰胺、紫杉醇、紫杉烷、拓扑异构酶I抑制剂 (例如CPT-11、托泊替康、9-AC、和GG-211)、吉西他滨、长春瑞滨、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、甲酰四氢叶酸、长春瑞滨、替莫唑胺 (temodal) 和taxo。

[0128] 提供了以下非限制性实施例以进一步说明本发明。

[0129] 实施例1：通过用包含 $\alpha 1, 3$ GT基因的腺病毒载体转导在肿瘤细胞上表达 α -gal表位的初步研究的描述

以前通过用包含 $\alpha 1, 3$ GT基因的复制缺陷型腺病毒载体的转导研究诱导 α -gal表位 (Gal- $\alpha 1$ -3Gal-beta1-4GlcNAc-R) 在人肿瘤细胞上的表达，详见 Deriy等人Glycobiology 2002, 12:135-144。为此目的，将小鼠 $\alpha 1, 3$ GT cDNA的开放阅读框 (ORF) 插入复制缺陷型腺病毒载体，其中缺失了早期基因E1和E3基因。这通过使用pAd穿梭质粒实现，该质粒包含 $\alpha 1, 3$ GT cDNA，其允许将cDNA同源重组到复制缺陷型腺病毒载体中。在这个质粒中，将 $\alpha 1, 3$ GT基因插入细胞巨化病毒 (CMV) 启动子下游，该启动子是哺乳动物细胞中非常有效的启动子。生成的腺病毒载体包含在CMV启动子下插入的小鼠 $\alpha 1, 3$ GT基因，该载体在包含E1互补病毒基因的人肾细胞系293 (ATCC) 中增殖。通过转导293细胞并在24小时后，在*Bandeiraea simplicifolia* IB4 (BS凝集素) 结合后通过流式细胞术分析 α -gal表位表达，检测分离的病毒克隆是否存在产生具有催化活性的酶的 $\alpha 1, 3$ GT cDNA。BS凝集素特异性结合 α -gal表位。

[0130] 接触 $\alpha 1, 3$ GT基因的复制缺陷型腺病毒称为AdaGT，并且在包含E1互补病毒基因的293细胞系中进一步增殖。AdaGT的浓度测定为多重性感染 (MOI) 单位并且定义为在感染后6

天,在293细胞中表现细胞病变效应的腺病毒载体的最高稀释度。用人宫颈癌HeLa细胞系研究AdaGT诱导 α -gal表位在人肿瘤细胞上合成和表达的能力,HeLa细胞系像其它恶性或正常人类细胞一样,缺少 α -gal表位。

[0131] HeLa细胞的转导导致~20个AdaGT拷贝立即渗透进入各个细胞。起源于AdaGT的 $\alpha 1,3GT$ mRNA的出现,通过逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR),利用小鼠 $\alpha 1,3GT$ 基因特异性的上游和下游引物(5'-ATGAATGTCAAGGGAAAAG-3'(SEQ ID NO:1)和3'-TCAGACATTATTTCTAACCA-5'(SEQ ID NO:2))测定。基于这一分析, $\alpha 1,3GT$ mRNA在转导后4小时存在于HeLa细胞的细胞质中。 $\alpha 1,3GT$ 酶确实出现在细胞质中通过这种酶的催化活性来测定。 $\alpha 1,3GT$ 将半乳糖从糖供体UDP-Gal转移到九个末端N-乙酰基乳糖胺残基上,所述残基在涂覆ELISA孔的蛋白质去唾液酸胎球蛋白的N-连接糖链上。从头合成的 α -gal表位通过ELISA鉴定,其利用单克隆抗Gal抗体M86(Galili 等人,Transplantation,65:1129-1132,1998)。使用这种测定法,在6小时后(参见图3的时间表), $\alpha 1,3GT$ 的催化活性首先在转导的HeLa细胞中检测。 α -gal表位的初始出现通过敏感单克隆抗Gal M86抗体结合测定法(称为ELISA抑制测定法)进行检测,该方法测量每个细胞的 α -gal表位数目(Galili等人,同上)。使用这种测定法, α -gal表位在HeLa细胞表面糖缀合物上的表达在转导后10小时检测为 6×10^4 /细胞的水平。在转导后48小时内,表达的 α -gal表位数目增加至 2×10^6 表位/细胞。(图3)。

[0132] 因为AdaGT是复制缺陷型的并且不能在分裂细胞中增殖,转导的HeLa细胞的每次细胞分裂导致 $\alpha 1,3GT$ 拷贝数目减少50%。因此, α -gal表位的表达在细胞表面上减少,使得在转导后2周内在细胞上检测不到 α -gal表位并且在细胞内检测不到 $\alpha 1,3GT$ 基因。

[0133] 实施例2:在用包含 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因的腺病毒载体转导的B16-BL6黑素瘤细胞上的 α -gal表位的表达

为了将 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因引入细胞,将这个基因插入不能复制的腺病毒载体,如之前所述(Deriy等人,Glycobiology 2002,12:135)。所得载体命名为AdaGT并且对诱导 α -gal表位在人肿瘤细胞上的表达非常有效(Deriy L等人,同上)。 α -gal表位的表达在AdaGT转导的B16-BL6黑素瘤细胞上测定。这些细胞是B16黑素瘤的亚克隆并且称作BL6细胞。用AdaGT进行的BL6细胞转导导致 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶在细胞内产生,该酶由在转导AdaGT内的 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因编码。在通过 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶合成 α -gal表位后,这个表位在细胞表面糖缀合物上的从头表达在转导后48小时进行评估。通过Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia IB4凝集素(BS凝集素,一种 α -gal表位特异性的凝集素)的结合检测 α -gal表位,所述结合通过流式细胞术并通过ELISA测量的抗Gal抗体与转导细胞的结合来测量。通过流式细胞术测量,与用缺失 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因插入的对照“空”腺病毒转导的B16细胞(称为BL6_{Adcont}细胞)相比,用AdaGT转导的BL6细胞(称为BL6_{AdaGT}细胞)在BS凝集素结合后,表现出显著变化(图4A)。此外,~15%的BL6_{AdaGT}细胞显示比剩余群体高得多的凝集素结合度,指示这些细胞以高表位数/细胞表达 α -gal表位。

[0134] 小鼠抗Gal IgG结合到BL6_{AdaGT}细胞上的 α -gal表位的能力通过ELISA证实(图4B)。BL6_{cont}细胞或BL6_{AdaGT}细胞通过干燥连接到ELISA孔上。随后,将连续两倍稀释的包含抗Gal IgG的血清加到孔中,并且通过辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗小鼠IgG抗体的结合测定抗Gal IgG结合。通过平行测量与涂覆有未转导BL6细胞的孔的IgG结合,减去非特异IgG

结合值。抗Gal易于结合到BL6_{AdaGT}细胞,甚至在1:128的血清稀释度下依然如此,而在涂覆有BL6_{Adcont}细胞的孔中,在任何血清稀释度下未观察到结合(图4B)。

[0135] 实施例3:BL6_{AdaGT}细胞对于引发保护性抗肿瘤免疫应答的功效

AdaGT转导的肿瘤细胞作为疫苗的功效在 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶敲除小鼠中进行研究,详见Deriy等人,Cancer Gene Therapy 12:528-539,2005)。B16-BL6细胞用作肿瘤模型。产生抗Gal的小鼠接种有 2×10^6 个辐照过的BL6_{AdaGT}细胞,或者接种有 2×10^6 个辐照过的BL6细胞,它们用缺失 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因的对照亲本腺病毒载体转导。后一种细胞称为BL6_{Adcont},不表达 α -gal表位并用于免疫对照小鼠。一周后重复该免疫。在第二次免疫后一周,用 0.2×10^6 或 0.5×10^6 个活BL6细胞皮下攻击小鼠。监测2个月的肿瘤发展。三分之二的用BL6_{AdaGT}细胞免疫并用 0.2×10^6 个未转导的亲本BL6细胞攻击的小鼠受到抗所述攻击的保护,而仅有20%的对照组未发展出肿瘤(图5A)。当小鼠用较高剂量的 0.5×10^6 个体BL6细胞攻击时,三分之一的用BL6_{AdaGT}细胞免疫的小鼠发展出抗肿瘤攻击的保护,而接种有用对照病毒Ad_{cont}转导的BL6细胞的所有对照小鼠在用BL6细胞攻击后25天内发展出肿瘤(图5B)。这些结果表明表达 α -gal表位的AdaGT转导的肿瘤细胞可用作肿瘤疫苗,它们有效地靶向抗原递呈细胞并因此能够诱导抗缺失 α -gal表位的相同肿瘤细胞的免疫应答。

[0136] 实施例4:在感染包含 $\alpha 1,3$ GT基因的疱疹病毒的肿瘤细胞(HSV_{act})中 α -gal表位表达对细胞溶解的动力学

这个实验的目的是为了体外测定在用包含 $\alpha 1,3$ GT基因的溶瘤疱疹病毒(HSV_{act})感染细胞后,人和小鼠肿瘤细胞上的 α -gal表位表达的时间表。需要这一分析以确认在感染细胞上的 α -gal表位表达在通过这种溶瘤病毒溶解细胞前发生。假设一旦 α -gal表位在细胞膜上表达,它们就将结合天然抗Gal抗体,甚至在细胞被溶瘤病毒HSV_{act}溶解后依然如此。在抗Gal和破裂的肿瘤细胞膜(因为细胞溶解)之间形成的免疫复合物将有效地靶向被APC如树突状细胞和巨噬细胞摄取,这是在免疫复合的抗Gal抗体的Fc部分和在APC上的Fc γ 受体(Fc γ R)的相互作用的结果(参见图1和2)。为了制备HSV_{act},在CMV启动子下的 $\alpha 1,3$ GT基因通过PCR从上述和(Deriy等人2002,同上)中所述的复制缺陷型病毒AdaGT中扩增。将在CMV启动子下的基因插入溶瘤HSV并根据本领域技术人员已知的方法,通过在HeLa细胞中增殖制备所得HSV_{act}的悬浮液。

[0137] α -gal表位的表达在HSV_{act}感染的B16F10(B16)小鼠黑素瘤细胞和人HeLa子宫颈癌细胞上测定。需要利用小鼠黑素瘤细胞的研究以确定用这些细胞在小鼠中进行体内研究的后续可行性。B16黑素瘤是仅有的已知小鼠肿瘤细胞系,其缺失 α -gal表位并因此刺激缺失这一碳水化合物表位的人肿瘤细胞。需要用HeLa细胞进行的研究以证实在HSV_{act}感染的人肿瘤细胞中的 α -gal表位表达发生在由这种病毒导致的细胞溶解之前的假设。该研究描述B16细胞,但是对HeLa细胞也是相同的。

[0138] 将HSV_{act}病毒的悬浮液加到B16细胞的单层中,浓度为 1×10^6 - 2×10^7 pfu(噬斑形成单位)/ml。每2小时解离感染细胞并且病毒的 $\alpha 1,3$ GT基因的表达通过 $\alpha 1,3$ GT mRNA的出现来确定。这种mRNA通过逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR),利用小鼠 $\alpha 1,3$ GT基因特异性的上游和下游引物(5'-ATGAATGTCAAGGGAAAAG-3'(SEQ ID NO:1)和3'-TCAGACATTATTTCTAACCA-5'(SEQ ID NO:2)),如上文对于AdaGT的描述进行检测。 $\alpha 1,3$ GT酶是否确实出现在感染细胞的细胞质中通过这种酶在ELISA中的催化活性来测定,所述ELISA利用去唾液酸胎球蛋白作

为酶受体并利用UDP-Gal作为糖供体。去唾液酸胎球蛋白还用作固相抗原,涂覆ELISA的孔。从头合成的 α -gal表位通过ELISA鉴定,其利用单克隆抗Gal抗体M86 (Galili,1998,同上)。是否随后出现 α -gal表位通过Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia IB4凝集素(BS凝集素,一种 α -gal表位特异性的凝集素)的结合进行检测,所述结合通过流式细胞术并通过抗Gal抗体与感染细胞的结合来测量,所述感染细胞通过在ELISA孔中干燥加工以涂覆ELISA。 α -gal表位表达进一步通过敏感单克隆抗Gal M86抗体结合测定法(称为ELISA抑制测定法)进行定量,该方法测量每个细胞的 α -gal表位数目(Galili 等人,1998,同上)。“空”HSV(即缺失 α 1,3GT基因的病毒)用作病毒感染的对照。

[0139] 通过显微镜继续监测细胞培养物的细胞溶解以确定其中细胞发生细胞溶解的感染后的时间。

[0140] 实施例5:HSV_{αGT}作为原位溶瘤病毒的功效

根据研究测定HSV_{αGT}作为溶瘤病毒以及作为产生抗多种肿瘤相关联抗原(TAA)的保护性抗肿瘤免疫的方法的功效(Galili等人,J Immunol.;178:4676-87,2007;Abdel-Motal等人,Cancer Immunol Immunother.;58:1545-55,2009)。这些研究在产生抗Gal抗体的 α 1,3-半乳糖基转移酶敲除小鼠中进行。B16细胞用作肿瘤模型。产生抗Gal的 α 1,3-半乳糖基转移酶敲除小鼠在右腹肋皮下注射 1×10^6 个B16细胞。这次注射引起B16细胞在5-6天内发展成黑色素瘤肿瘤病灶,直径4-5mm。将在 $10^3 - 10^6$ pfu范围内的量,0.1ml体积的HSV_{αGT}注入肿瘤。缺失插入的 α 1,3GT基因的溶瘤HSV(“空”HSV)用作对照病毒,其不能诱导 α -gal表位的表达。对于肿瘤病灶是否消失,监测小鼠2个月。将具有达到20mm直径的肿瘤的小鼠安乐死。测定两倍于显示完全消除肿瘤的量(即,100%溶瘤)的HSV_{αGT}量,并且用于评估由此治疗引发的保护性抗肿瘤免疫应答的进一步研究。与缺失 α 1,3GT基因的对照HSV比较,确定是否HSV_{αGT}比对照病毒在诱导溶瘤方面更高效或更低效。

[0141] 实施例6:HSV_{αGT}感染的病灶在引发抗远处转移的保护性抗肿瘤免疫应答中的功效

产生抗Gal的 α 1,3-半乳糖基转移酶敲除小鼠在右腹肋皮下注射 1×10^6 个B16细胞,并且在左腹肋皮下注射 1×10^4 、 1×10^5 或 1×10^6 个B16细胞。在左肋的肿瘤发展表示远处转移,如果将HSV_{αGT}注入右肋病灶将它转化成引发系统保护性抗肿瘤应答的疫苗,则其可能不发展成肿瘤病灶。当右肋肿瘤达到4-5mm(直径)的体积时(在5-6天内),向它注入0.1ml的HSV_{αGT}悬浮液,其量是诱导100%的黑素瘤病灶细胞溶解的量的两倍。缺失插入的 α 1,3GT基因的溶瘤HSV用作对照病毒,其不能诱导 α -gal表位的表达。监测在左肋的肿瘤生长2个月。当左肋注射 1×10^4 、 1×10^5 或 1×10^6 个B16细胞时,将注射有HSV_{αGT}的肿瘤转化成疫苗导致预防左肋中的远处转移生长成可检测到的病灶。当右肋中的肿瘤注射有HSV_{αGT}而非缺失 α 1,3GT基因的HSV时,认为对肿瘤生长的预防更有效(即,预防更多的肿瘤细胞在左肋中发展成病灶)。

[0142] 实施例7:HSV_{αGT}感染的病灶在引发针对攻击肿瘤细胞的保护性抗肿瘤免疫应答中的功效

产生抗Gal的 α 1,3-半乳糖基转移酶敲除小鼠在右腹肋皮下注射 1×10^6 个B16细胞。当肿瘤达到4-5mm(直径)的体积时(在5-6天内),向它注入0.1ml的HSV_{αGT}悬浮液,其量是诱导100%的黑素瘤病灶细胞溶解的量的两倍。缺失插入的 α 1,3GT基因的溶瘤HSV用作对照病毒,其不能诱导 α -gal表位的表达。在将溶瘤病毒注入右肋病灶后三周,左肋注射有 0.3×10^6 、 1×10^6 、 3×10^6 、或 10×10^6 个B16细胞作为肿瘤攻击。由将HSV_{αGT}注入右肋肿瘤引起的保护性抗

肿瘤免疫应答诱导(其将肿瘤转化成疫苗)预防在左肋中的攻击肿瘤细胞发展成肿瘤病灶。当右肋中的肿瘤注射有HSV_{αGT}而非缺失 $\alpha 1,3$ GT基因的HSV时,对肿瘤生长的预防更有效(即,预防更多的攻击肿瘤细胞发展成病灶)。

[0143] 实施例8:编码功能性 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶基因的能够复制的溶瘤腺病毒的制备和功效

本研究描述Ad5/3- Δ 24- α GT CRAd (CRAd- α GT)的制备,其中E3基因用鼠 $\alpha 1,3$ -半乳糖基转移酶($\alpha 1,3$ GT)基因取代。 $\alpha 1,3$ GT合成碳水化合物抗原半乳糖- α -1,3-半乳糖基- β -1,4-N-乙酰基-葡糖胺-R(α -gal)。当病毒复制时, $\alpha 1,3$ GT蛋白连同病毒蛋白一起产生, α GT蛋白随后催化 α -gal的产生。细胞表面 α -gal被抗Gal抗体复合,促进免疫活化和抗原递呈细胞的免疫复合物摄取。

[0144] 材料和方法

细胞系

A549(人肺癌)和A375(人黑素瘤)细胞系购自European Collection of Authenticated Cell Cultures(ECCAC)。A549细胞维持在F-12K + 10%胎牛血清(FBS)中。A375细胞维持在Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) + 10%胎牛血清中。两个细胞系在37°C和5% CO₂中培养。

[0145] 病毒产生

病毒按照与Imanix Life Sciences(Rochester,Minneapolis,US)的合同进行制备。使用已有的穿梭和大腺病毒质粒以及重组DNA方法进行病毒构造,其完全按(Danthinne和Werth, 2000;Danthinne,2001)详细描述。为了形成CRAd- α GT,通过Integrated DNA Technologies(IDT)合成1.1Kb的鼠 $\alpha 1,3$ GT基因(GenBank登录号M85153)并且将其克隆进Ad5 E3穿梭载体中,该载体带有 $\alpha 1,3$ GT序列的5'的CMV启动子。在纤突结序列用Ad3的纤突结序列取代的编码Ad5基因组的粘粒中,编码LTCHEAGF(SEQ ID NO:3)氨基酸序列的24-bp序列被从E1a区域中缺失。从Ad5/3粘粒中缺失E3序列并用从穿梭载体中亚克隆的CMV- α GT序列取代。为了形成对照CRAd,绿荧光蛋白(GFP)编码序列由IDT合成并克隆进Ad5 E1穿梭载体中,该载体带有GFP序列的5'的CMV启动子。从Ad5/3粘粒中缺失E1序列并用从穿梭载体中亚克隆的CMV-GFP序列取代。缺失E3区域。嵌合病毒结构在图6中示出。

[0146] HEK 293细胞用嵌合病毒粘粒转染并且在培养48小时后,制备粗裂解物。为了扩增病毒,将HEK 293细胞接种到15cm皿中并在37°C,5% CO₂条件下培养过夜。次日,细胞用来自病毒感染细胞的粗裂解物感染,并在37°C,5% CO₂条件下培养48小时,在此时间后收获细胞和上清液。

[0147] 通过三个冻-融循环从感染细胞中释放病毒颗粒,并且通过硫酸铵沉淀从细胞上清液中回收病毒颗粒(Schagen等人,2000)。病毒纯化通过氯化铯(CsCl)密度梯度离心法进行。简而言之,将粗病毒制备物加载到SW28 Beckman离心管中的两步CsCl梯度上并以20,000rpm离心2小时。收集病毒带并加载到连续CsCl梯度上,并且再次离心。收集最终的病毒带并在4°C下用4 x 0.5 L GTS缓冲液(2.5%甘油,25mM NaCl,20mM Tris-HCl,pH8.0)立即透析18小时。收集大约1ml透析的病毒悬浮液并通过0.22 μ m的Supor膜(Pall)过滤,随后在-70°C下冻存。

[0148] 使用OD260-SDS方法和在存在SDS的情况下,1.1 x 10¹²个病毒颗粒(VP)每吸光度

260单位的消光系数测定病毒浓度。发现病毒浓度对于CRAd- α GT为 3.6×10^{12} VP/ml,并且对于CRAd-GFP为 2.9×10^{12} VP/ml。病毒制备物的纯度通过A260/A280和A320/A260比率进行测定,并且发现对于两种病毒,纯度在与纯病毒相关联的范围内(分别为1.2至1.4和0.22至0.27)。

[0149] 病毒滴度通过终点稀释试验(TCID₅₀),利用公认的Reed-Muench方法进行测定(Reed和Muench,1938)。简而言之,将HEK293细胞接种到24-孔板中并在37°C下培养过夜。次日,将10-倍连续稀释的CsCl-纯化的病毒原液加到接种的HEK293细胞中,并且所述细胞在37°C,5% CO₂条件下培养14天。通过在显微镜下视觉评估以及利用Reed-Muench公式计算的TCID₅₀,记录存在细胞病变效应(CPE)的孔(Reed和Muench,1938)。测定病毒滴度,对于CRAd- α GT为 6.8×10^{11} TCID₅₀/mL,并且对于CRAd-GFP为 2.7×10^{11} TCID₅₀/mL。

[0150] 测定CRAd- α GT的细胞杀伤

利用细胞离解溶液(CDS,Sigma-Aldrich),从组织培养瓶中收获亚汇合的单层A549和A375细胞。使用血球计进行细胞计数,并且通过台盼蓝拒染法区分存活细胞和死亡细胞。细胞在培养基中稀释并加到无菌的96-孔白色组织培养板中,加入量为90 μ l/孔,提供 5×10^3 或 1×10^4 个细胞/孔。

[0151] 在磷酸盐缓冲盐水(PBS)+10% FBS中将每种病毒进行1:3稀释,用于提供对于CRAd- α GT为 1.2×10^{12} VP/ml和对于CRAd-GFP为 9.67×10^{11} VP/ml的工作原液。将工作原液在PBS+10% FBS进行1:5的连续稀释,产生对于CRAd- α GT为 1.2×10^{12} - 1.2×10^5 VP/ml和对于CRAd-GFP为 9.67×10^{11} - 9.9×10^4 的滴定系列。将滴定系列以1:10稀释到测定板(10 μ l/孔病毒对90 μ l接种细胞)中,并且将所述板在37°C/5% CO₂条件下培养72小时。利用Cell Titre Glo发光细胞成活力试剂(Promega),根据制造商的说明书测定细胞成活力,并且在EnVision 2102读板器(Perkin Elmer)上读板。原始发光单位(RLU)对病毒颗粒/ml的对数作图。

[0152] 为了可视化CRAd- α GT病毒的细胞溶解效应,如上文和下文详述接种到透明96-孔或24-孔板中并同样如上文和下文详述感染有不同稀释度的CRAd- α GT和CRAd-GFP的A549和A375细胞在光学显微镜下进行评估。细胞图像用YenCam 10(Yenway)和支持软件拍摄。

[0153] 测定Ad5/3- Δ 24- α GT CRAd感染的人癌细胞的抗Gal结合

如上文所述,从组织培养瓶中收获A549和A375细胞。在计数后,在培养基中稀释细胞并加到24-孔组织培养板中,加入体积为540 μ l/孔,其相当于 3×10^4 个细胞/孔。

[0154] 在PBS+10% FBS中将每种病毒稀释至1:10,000(1:100并随后1:100)以提供对于CRAd- α GT为 3.6×10^8 VP/ml和对于CRAd-GFP为 2.9×10^8 的溶液。在PBS+10% FBS中将这溶液稀释至1:25两次以提供对于CRAd- α GT为 1.44×10^7 和 5.8×10^5 VP/ml以及对于CRAd-GFP为 1.16×10^7 和 4.6×10^5 VP/ml的病毒浓度。将三种病毒稀释液进一步以1:10稀释到接种细胞上(60 μ l病毒对540 μ l细胞/孔)。将等体积的PBS+10% FBS单独加到孔中,用作无病毒对照。

[0155] 将所述板培养72小时。在培养结束时,通过流式细胞术测定在感染细胞表面上是否存在 α -gal抗原。利用CDS从24-孔板中收获感染的和未感染的(无病毒对照)细胞,在PBS+0.5% BSA中洗涤并与在PBS+0.5% BSA中稀释的40 μ g/ml单克隆M86人IgG1抗Gal抗体(Absolute Antibody)一起在4°C下培养1小时。细胞再次在PBS+0.5% BSA中洗涤,并且随后与在PBS+0.5% BSA中稀释的别藻蓝蛋白(APC)-缀合的抗人IgG(Biolegend)一起在4

℃下避光培养30分钟。细胞用PBS + 0.5% BSA洗涤并在Beckman Coulter FC500流式细胞仪上分析。未染色的细胞用于设置前向角散射、侧向角散射和荧光通道1和4的电压。记录测试样品的GFP (通道1) 和APC (通道4) 信号。单色对照用于设置补偿。

[0156] 结果

CRAd-αGT溶解人癌细胞

CRAd-αGT和对照CRAd-GFP对A549和A375细胞的细胞溶解作用使用基于板的细胞成活力测定法进行定量(图7)。在其中细胞感染CRAd-αGT或CRAd-GFP的孔中观察到的细胞成活力降低取决于病毒浓度。将细胞成活力减少50%所需的CRAd-αGT病毒颗粒的数目低于对照CRAd-GFP病毒。这符合通过TCID₅₀测定法测得的病毒滴度(参见上文的材料和方法部分)。

[0157] CRAd-αGT在A549和A375人癌细胞中的细胞溶解作用通过光学显微镜可视化并与CRAd-GFP比较(图8)。感染CRAd-αGT或CRAd-GFP并随后培养72小时的细胞被两种病毒杀死。未感染的细胞是健康的,无溶解的证据。

[0158] CRAd-αGT感染的细胞结合抗Gal抗体

为了研究感染CRAd-αGT的细胞是否导致催化活性的α1,3GT蛋白表达以及随后α-gal在细胞表面处的表达,使用流式细胞术测定α-gal-特异性抗Gal抗体与感染CRAd-αGT的细胞的结合并与抗Gal抗体与感染CRAd-GFP的细胞和未感染细胞的结合比较(图9)。感染CRAd-αGT的细胞与抗Gal发生强结合,但是对于GFP表达阴性。相反地,感染CRAd-GFP的细胞对于抗Gal结合阴性,但是对于GFP表达阳性。未感染的细胞对于抗Gal结合和GFP表达均为阴性。

[0159] 结论

用CRAd-αGT感染人非小细胞肺癌(A549)和黑素瘤(A375)细胞导致细胞溶解和死亡。细胞溶解作为CRAd-αGT复制的结果而发生,它对于癌细胞是选择性的,这是由于从病毒E1a基因中缺失了24-bp的区域(Fueyo等人,2000)。

[0160] 除细胞溶解之外,用CRAd-αGT感染癌细胞导致抗Gal抗体与细胞表面的特异性结合,而抗Gal不结合未感染细胞或感染CRAd-GFP的细胞。因为抗Gal特异性地结合α-gal表位,我们能够推断出CRAd-αGT在癌细胞中的复制导致催化活性的α1,3GT酶的表达,其继而催化α-gal的合成。

[0161] 抗Gal抗体与由病毒的溶瘤作用引起的表达α-gal的濒死肿瘤细胞和肿瘤细胞碎片的结合将促进肿瘤新抗原的适应性免疫应答。携带活化的Fcγ受体的抗原递呈细胞(APC)经由活化Fcγ受体内吞与抗Gal IgG复合的肿瘤细胞碎片和死亡细胞。在APC上的Fcγ受体的活化导致APC活化、成熟并促进抗原递呈于T细胞(Regnault等人,1999; Rafiq等人,2002; Platzner等人,2014)。

[0162] 参考文献

- Bramante等人 (2015). *Int. J. Cancer* 137: 1775-1783.
- Danthinne (2001). *Biotechniques* 30: 612-6, 618-9.
- Danthinne和Werth (2000). *Gene Ther.* 7: 80-7.
- Fueyo等人 (2000). *Oncogene* 19: 2-12.
- Kanerva等人 (2013). *Clin. Cancer Res.* 19: 2734-2744.
- Kanerva等人 (2003). *Mol. Ther.* 8: 449-458.
- Kanno等人 (2012). *Anticancer Res.* 32: 4891-5.

- Kim等人 (2013). *Gynecol. Oncol.* *130*: 518-24.
- Koski等人 (2010). *Mol. Ther.* *18*: 1874-84.
- Platzer (2014). *Front. Immunol.* *5*: 140.
- Rafiq等人 (2002). *J. Clin. Invest.* *110*: 71-9.
- Reed和Muench (1938). *Am. J. Epidemiol.* *27*: 493-497.
- Regnault等人 (1999). *J. Exp. Med.* *189*: 371-80.
- Schagen等人 (2000). *Gene Ther.* *7*: 1570-4.
- Sherr (1996). *Science* *274*: 1672-7.
- Ulasov等人 (2006). *Hum. Gene Ther.* *17*: 556-64.

序列表

<110> AGALIMMUNE LIMITED
<120> 用于治疗癌症的治疗组合物及使用方法
<130> AGA-C-P1835PCT
<150> 1505860.5
<151> 2015-04-07

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的引物

<400> 1

atgaatgtca agggaaaag

19

[0001]

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的引物

<400> 2

tcagacatta ttctaacca

20

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 3

Leu Thr Cys His Glu Ala Gly Phe

1

5

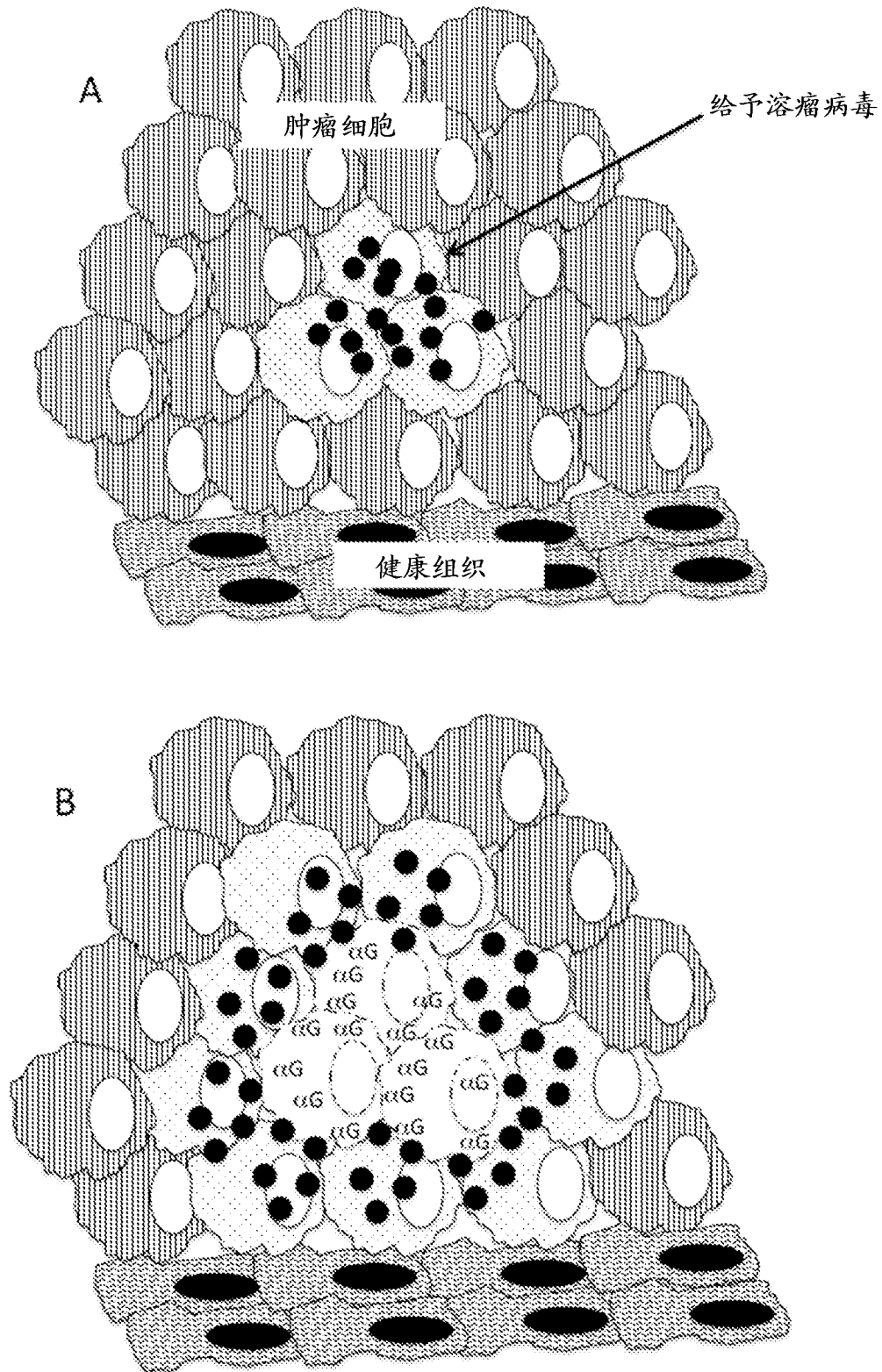


图 1

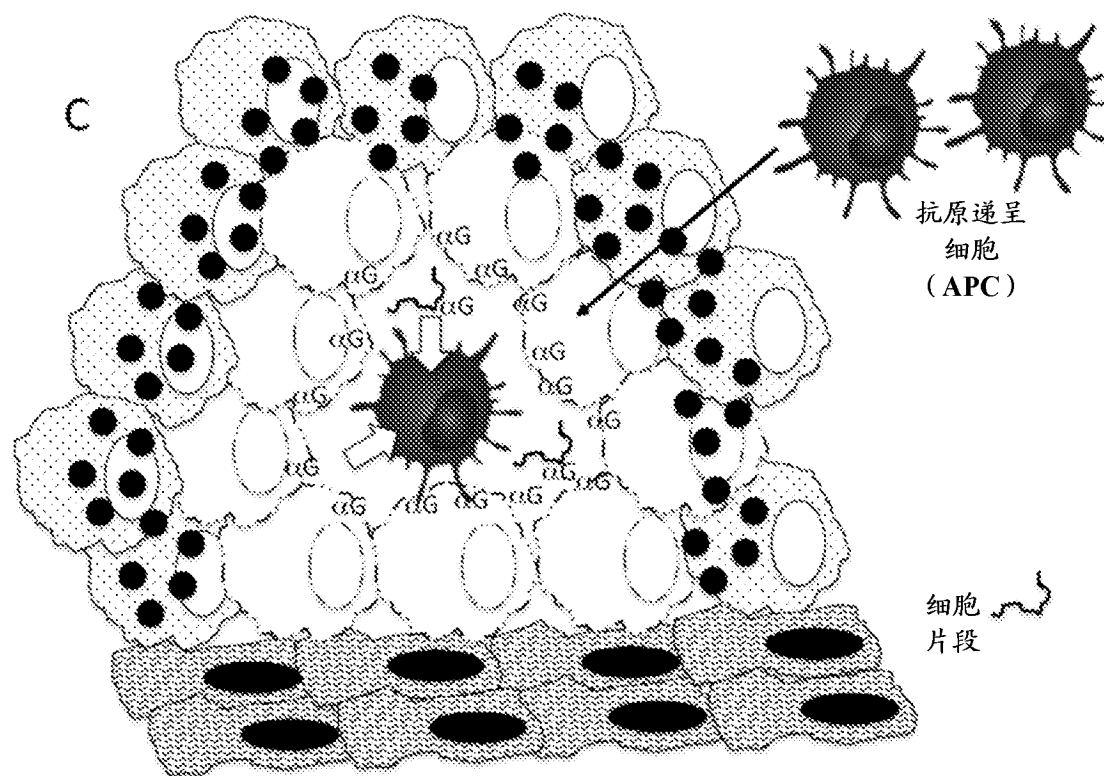


图 1 (续)

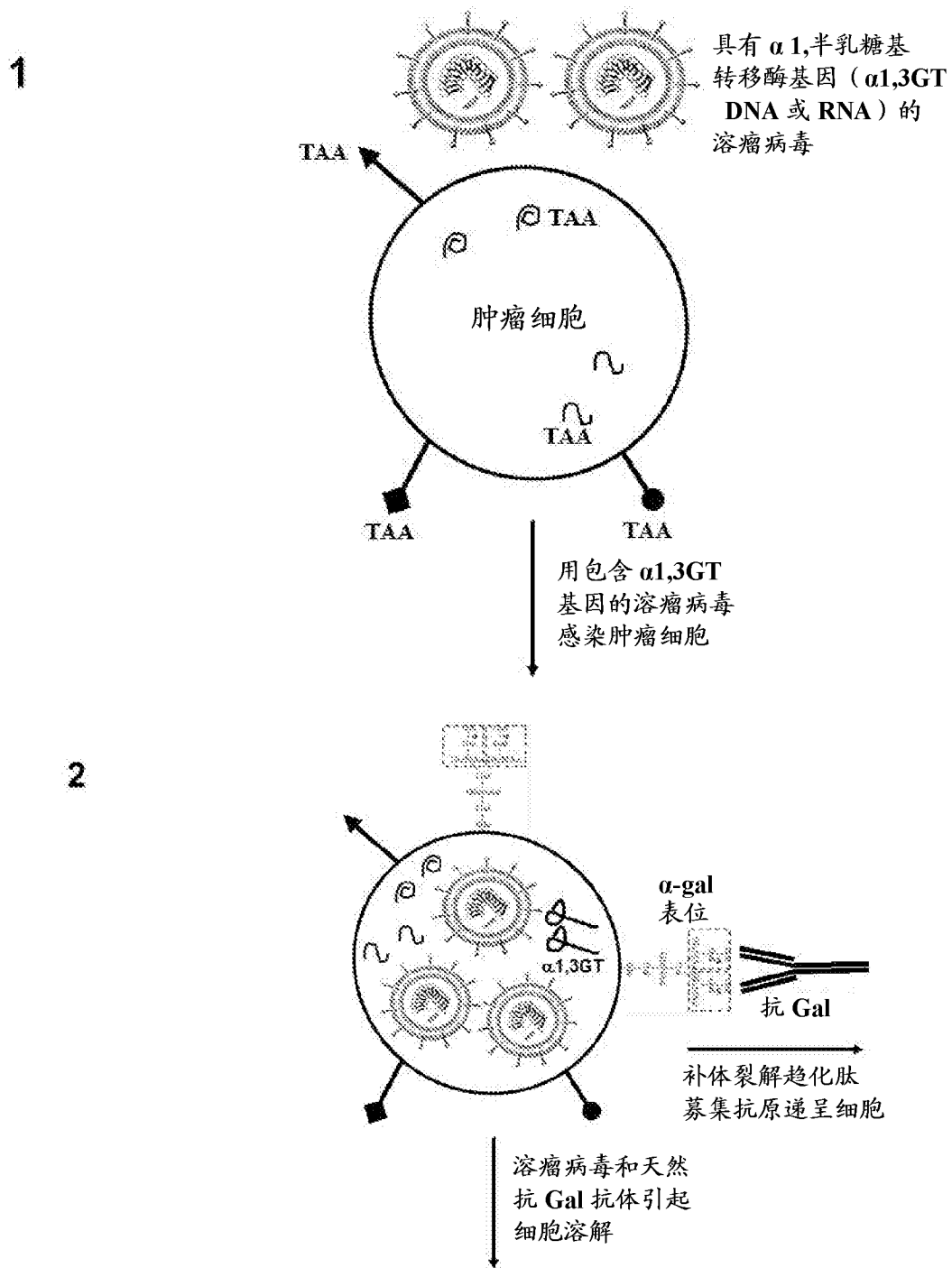


图 2

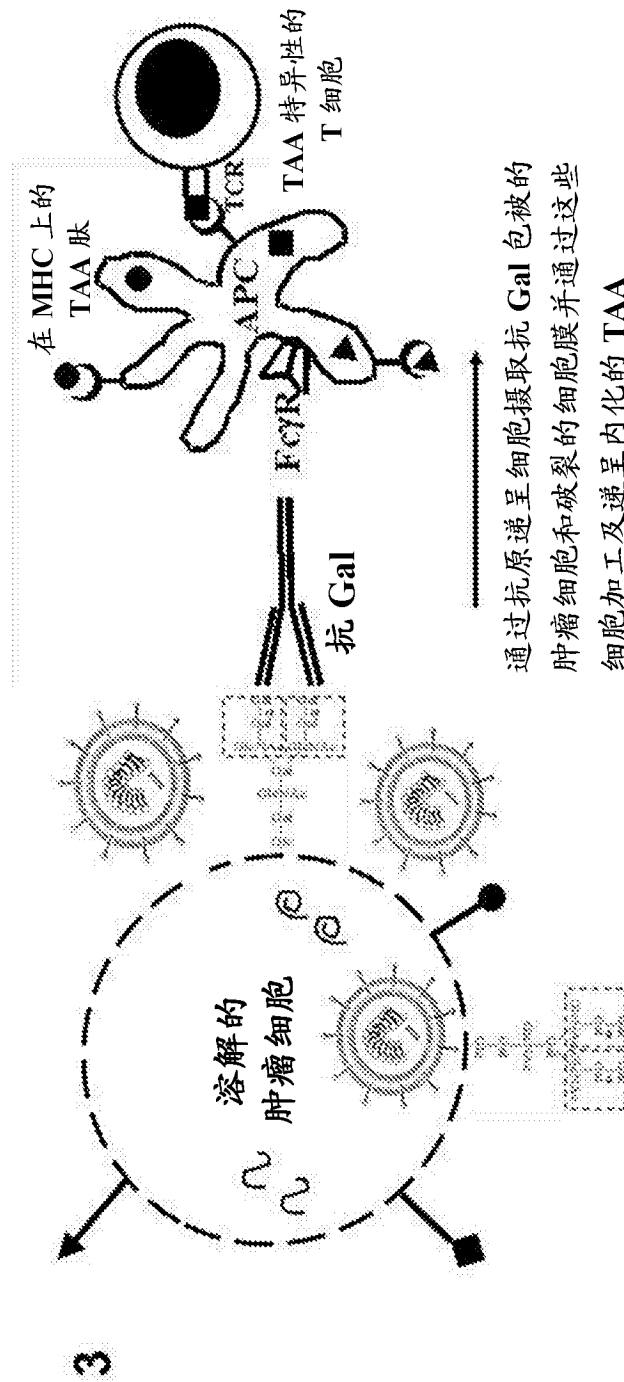


图 2 (续)

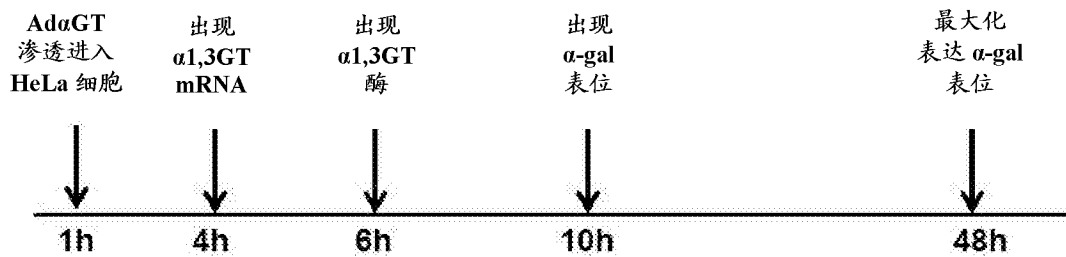


图 3

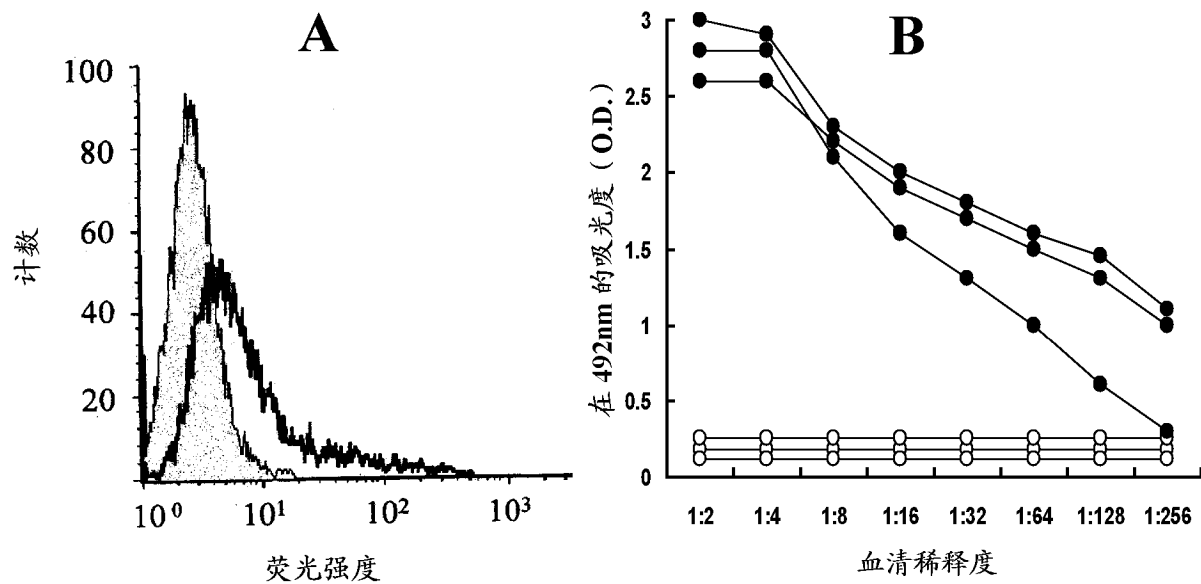


图 4

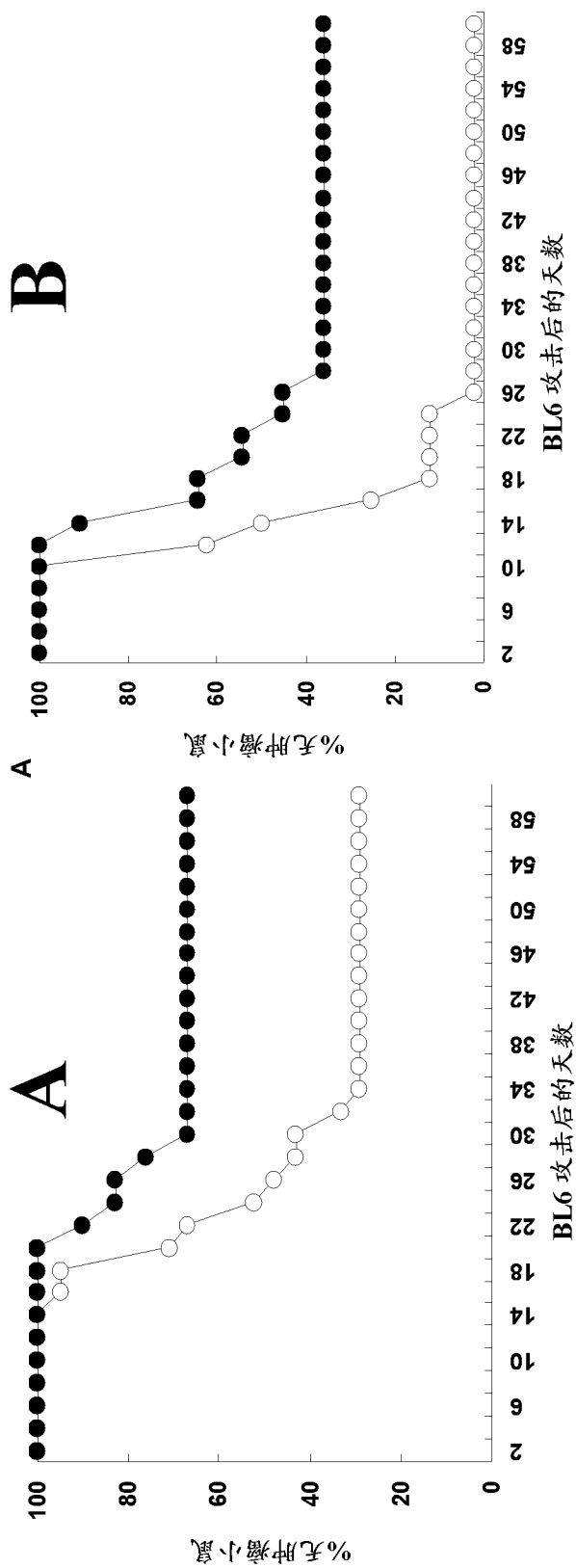


图 5

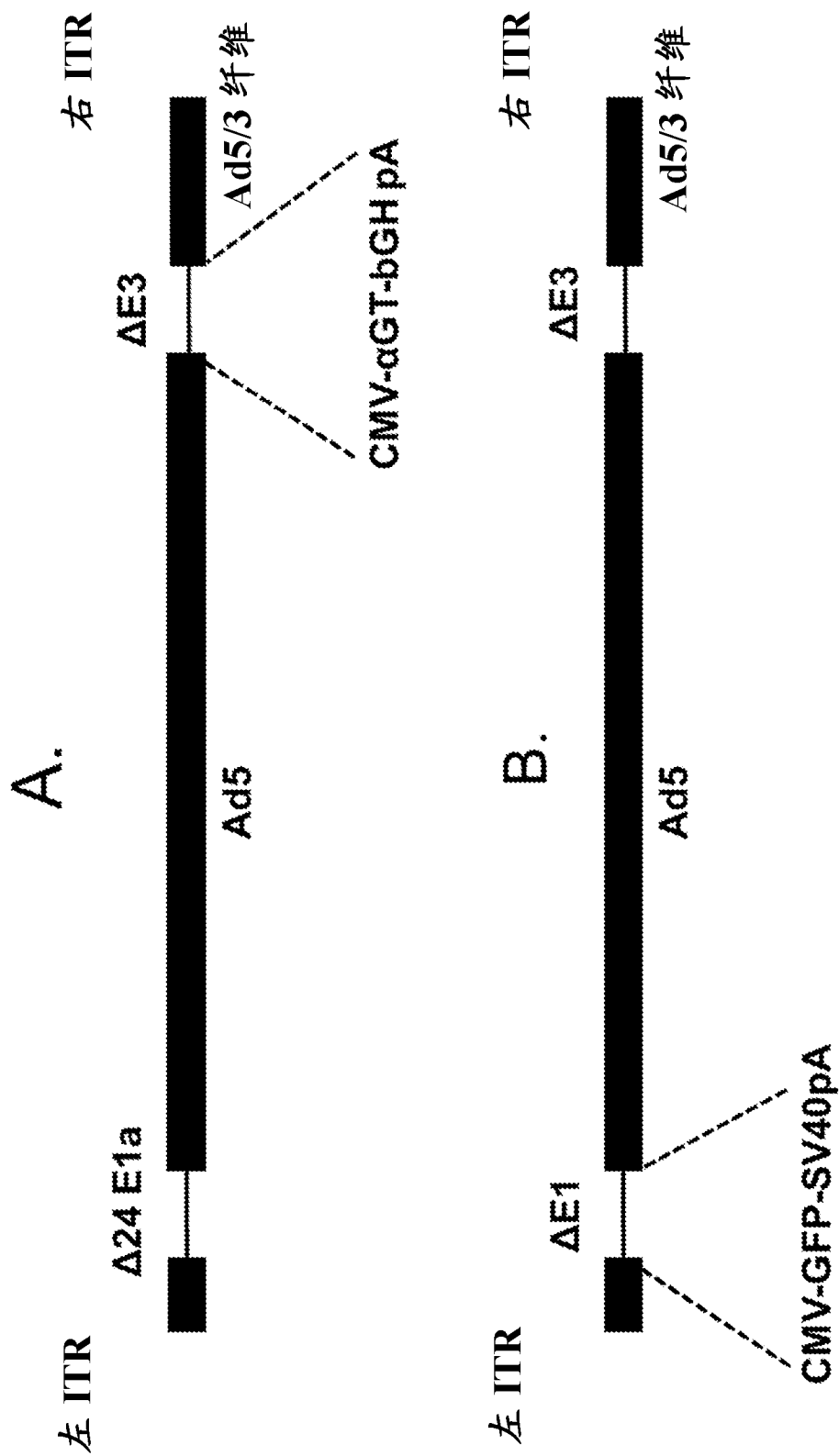


图 6

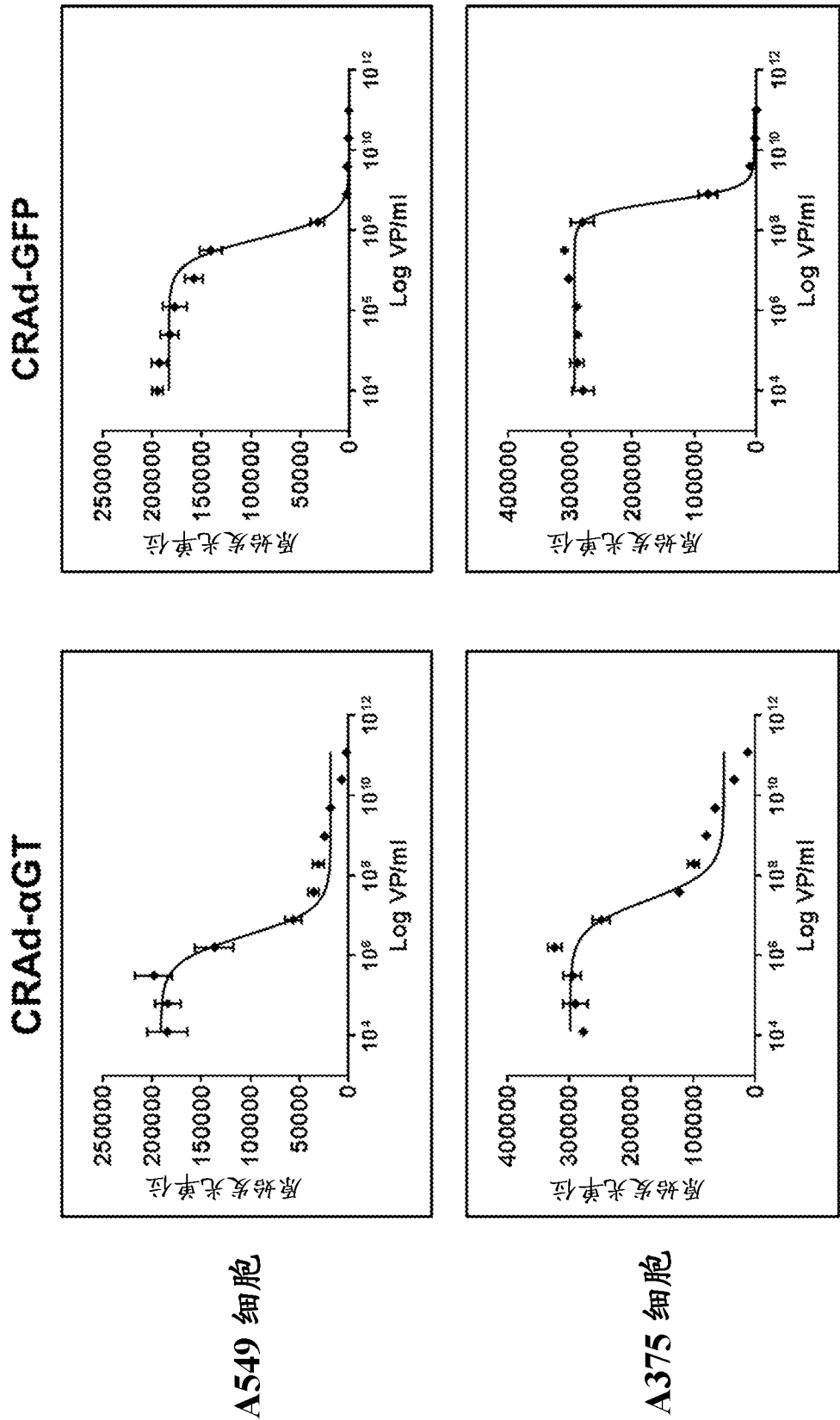


图 7

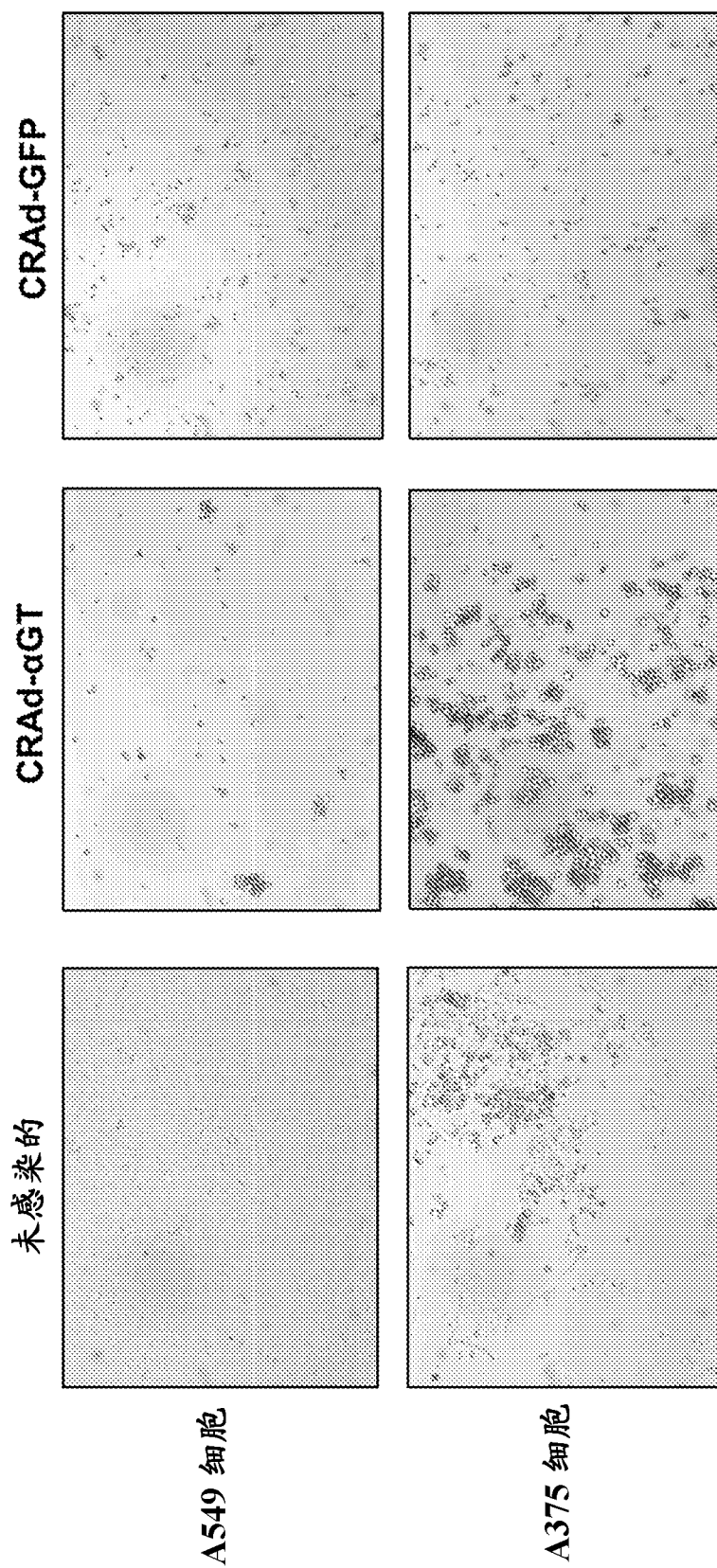


图 8

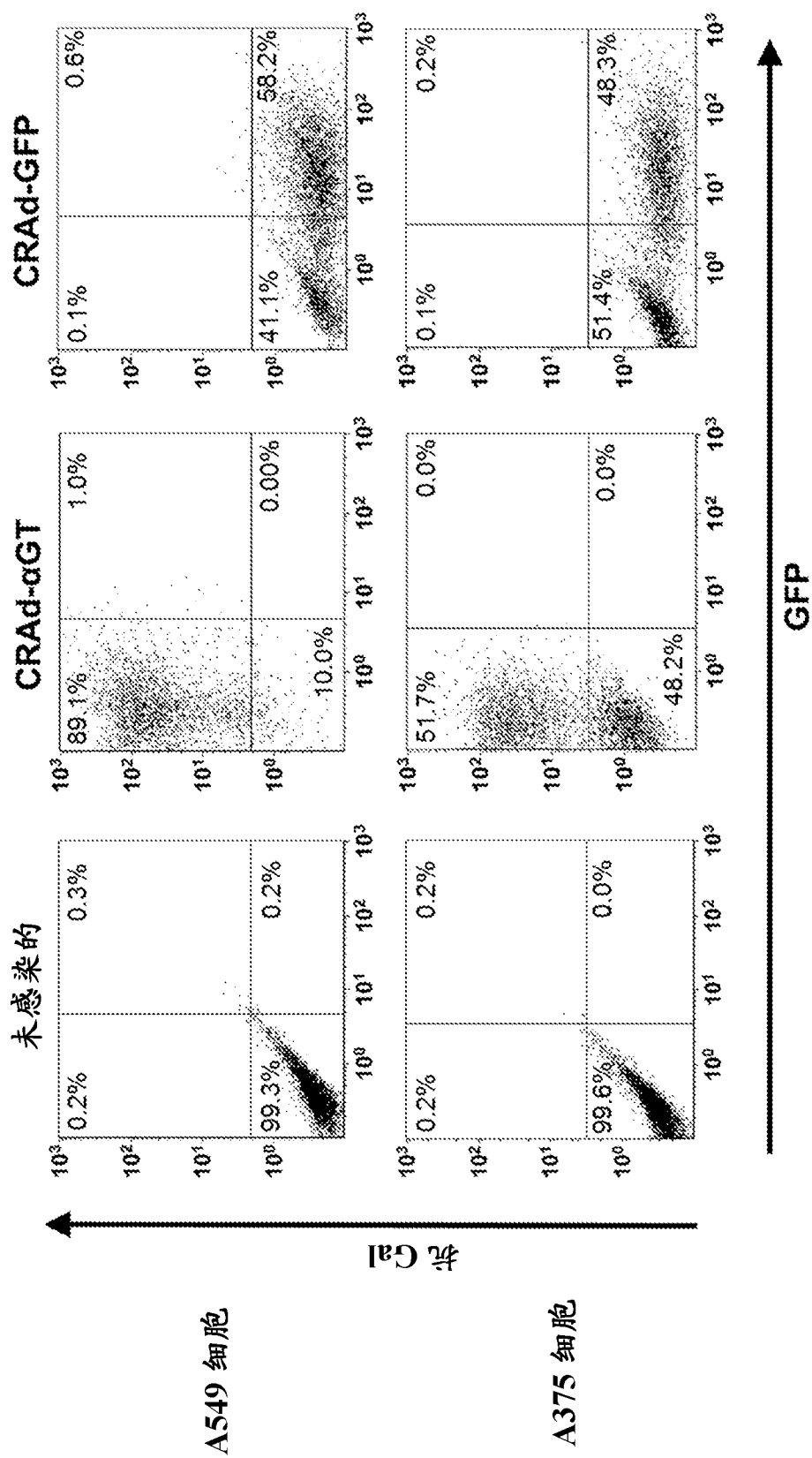


图 9