(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112020510 B
(45)授权公告日 2024.10.11

(21)申请号 201980026649.1
(22)申请日 2019.03.19
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112020510 A
(43)申请公布日 2020.12.01
(30)优先权数据
62/645,022 2018.03.19 US
62/803,887 2019.02.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.10.19
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/022985 2019.03.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/036635 EN 2020.02.20
(73)专利权人 茂体外尔公司
地址 美国德克萨斯州
(72)发明人 罗伯特·E·索博尔
克斯廷·B·梅南德
多拉·维德霍尔德 苏尼尔·哈达
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 郑斌 韩晓帆
(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
C07K 14/54(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)
(56)对比文件
CN 106659757 A,2017.05.10
WO 2017079746 A2,2017.05.11
Gaston DC等.Production of bioactive soluble interleukin-15 in complex with interleukin-15 receptor alpha from a conditionally-replicating oncolytic HSV-1.PLoS One.2013,第08卷(第11期),第e81768页.
审查员 张华

权利要求书7页 说明书74页 附图11页

(54)发明名称

包含用于治疗癌症的肿瘤抑制基因疗法和CD122/CD132激动剂的方法及组合物

(57)摘要

本文提供了用于治疗个体的癌症的方法和组合物,所述方法和组合物包括向所述个体施用有效量的至少一种CD122/CD132激动剂、至少一种免疫检查点抑制剂和病毒组合物,所述病毒组合物包含一种或多种经工程改造以过表达肿瘤抑制基因和/或腺病毒死亡蛋白的病毒。本文还提供了用于治疗个体的癌症的方法和组合物,所述方法和组合物包括向所述个体施用有效量的至少一种溶瘤病毒组合物和至少一种CD122/CD132激动剂以及至少一种免疫检查点抑制剂。本文还提供了通过施用上述药剂与其他癌症疗法的组合来增强抗肿瘤功效的方法。在众所周知通常对免疫疗法具有抗性的高度侵袭形式的癌症中,这些治疗出乎意料地促成了完全的肿瘤消退和治愈结局。

CN 112020510 B

1.(1) 编码 p53 的核酸和/或编码 MDA-7 的核酸、(2) 至少一种CD122/CD132 激动剂以及(3) 至少一种PD-1或PD-L1的免疫检查点抑制剂在制备用于治疗受试者的黑素瘤的方法的药物中的用途,所述方法包括向所述受试者施用有效量的 (1) 编码 p53 的核酸和/或编码 MDA-7 的核酸、(2) 至少一种 CD122/CD132 激动剂以及(3) 至少一种免疫检查点抑制剂,其中所述至少一种 CD122/CD132 激动剂选自由以下项组成的组:IL-2/抗 IL-2 免疫复合物、IL-15/抗 IL-15 免疫复合物、IL-15/IL-15 受体 α-IgG1-Fc (IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc) 免疫复合物、聚乙二醇化的 IL-2、聚乙二醇化的 IL-15、IL-2 突变蛋白、IL-15 突变蛋白和/或与 IL-15 受体 α/IgG1 Fc 融合蛋白结合的 IL-15 突变体,并且所述至少一种 CD122/CD132 激动剂优先与 CD122/CD132 结合。

2.根据权利要求 1 所述的用途,其中向所述受试者施用编码 p53 的核酸。

3.根据权利要求 1 所述的用途,其中向所述受试者施用编码 MDA7 的核酸。

4. 根据权利要求 1 所述的用途,其中向所述受试者施用编码 p53 的核酸和编码 MDA7 的核酸。

5.根据权利要求 1 所述的用途,其中所述 IL-15 与 IL-15Rα 预复合以优先与 CD122/CD132 结合。

6.根据权利要求 1 所述的用途,其中向所述受试者施用 1 种、2 种、3 种或 4 种 CD122/CD132 激动剂。

7.根据权利要求 1 所述的用途,其中所述至少一种 CD122 激动剂和/或 CD132 激动剂不是 F42K。

8.根据权利要求 1 所述的用途,其中所述黑素瘤是转移性的。

9.根据权利要求 1 所述的用途,其中所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸在表达盒中。

10.根据权利要求9所述的用途,其中 p53 和 MDA-7 在单个启动子的控制下。

11.根据权利要求 10 所述的用途,其中所述启动子为巨细胞病毒 (CMV)、SV40 或 PGK。

12.根据权利要求 9 所述的用途,其中表达盒在病毒载体中。

13.根据权利要求 12 所述的用途,其中所述病毒载体为腺病毒载体、逆转录病毒载体、牛痘病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体、水疱性口炎病毒载体、多瘤病毒载体。

14.根据权利要求 12所述的用途,其中所述病毒载体为腺病毒载体或牛痘病毒载体。

15.根据权利要求 14 所述的用途,其中所述牛痘病毒载体进一步定义为缺失 NIL 的牛痘病毒载体。

16.根据权利要求 14 所述的用途,其中所述腺病毒载体进一步定义为具有增加的 ADP 表达的腺病毒载体。

17.根据权利要求 12 所述的用途,其中以介于 10^3 个与 10^{13} 个之间的病毒颗粒施用所述病毒载体。

18.根据权利要求 1 所述的用途,其中通过非病毒方法施用所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸。

19.根据权利要求 1 所述的用途,其中所述方法包括通过基因编辑来恢复和/或放大 p53 和/或 MDA-7 功能。

20.根据权利要求 19 所述的用途,其中基因编辑包括使用锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活子样效应核酸酶 (TALEN) 或成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 来表达 p53 和/或 MDA-7。

21.根据权利要求 1 所述的用途,其中通过病毒载体和基因编辑来施用所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸。

22. 根据权利要求 1 所述的用途,其中将所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸血管内、胸膜内、腹膜内、气管内、瘤内、鞘内、肌内、内窥镜下、病变内、经皮、皮下、局部、立体定向地或通过直接注射或输注而施用于所述受试者。

23.根据权利要求22 所述的用途,其中将所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸静脉内施用于所述受试者。

24.根据权利要求22 所述的用途,其中将所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸动脉内施用于所述受试者。

25.根据权利要求 1 所述的用途,其中将所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸瘤内地施用于所述受试者。

26. 根据权利要求 1 所述的用途,其中向所述受试者施用所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸多于一次。

27.根据权利要求 1 所述的用途,其中向所述受试者施用所述至少一种 CD122/CD132 激动剂多于一次。

28.根据权利要求 1 所述的用途,其中在所述至少一种 CD122/CD 132 激动剂之前、同时或之后,向所述受试者施用所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸。

29.根据权利要求 1 所述的用途,其中将所述编码 p53 的核酸和/或所述编码 MDA-7 的核酸以脂质体复合物形式施用于所述受试者。

30.根据权利要求 29 所述的用途,其中所述脂质体复合物包含 DOTAP 和至少一种胆固醇、胆固醇衍生物或胆固醇混合物。

31.根据权利要求 1 所述的用途,其中施用包括局部或区域性注射。

32.根据权利要求 1 所述的用途,其中经由连续输注、瘤内注射或静脉内注射来进行施用。

33.根据权利要求 1 所述的用途,其中所述受试者为人类。

34.根据权利要求 1 所述的用途,还包括施用至少一种附加抗癌治疗。

35.根据权利要求 34 所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为手术疗法、化学疗法、放射疗法、小分子疗法、冷冻疗法或生物疗法。

36.根据权利要求 34 所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为放射消融。

37.根据权利要求 34所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为激素疗法。

38.根据权利要求 34所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为免疫疗法。

39.根据权利要求 34所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为细胞因子疗法。

40.根据权利要求 34所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为受体激酶抑制剂疗法或抗血管生成疗法。

41.根据权利要求 1 所述的用途,其中所述至少一种检查点抑制剂为抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体。

42.根据权利要求 41所述的用途,其中所述抗 PD-1 抗体为纳武单抗、派姆单抗、匹利珠单抗、AMP-514、REGN2810、CT-011、BMS 936559、MPDL3280A 或 AMP-224。

43.根据权利要求 41所述的用途,其中所述抗 PD-L1 抗体为德瓦鲁单抗、阿特珠单抗或阿维单抗。

44.根据权利要求 41所述的用途,其中所述抗 PD-L2 抗体为 rHIgM12B7。

45.根据权利要求 1 所述的用途,其中施用多于一种检查点抑制剂。

46.根据权利要求 1 所述的用途,其中所述免疫检查点抑制剂是全身性施用的。

47.根据权利要求 34 所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂。

48.根据权利要求 47 所述的用途,其中所述 HDAC 抑制剂为 tractinostat。

49. 根据权利要求 1 所述的用途,还包括提供细胞外基质降解蛋白。

50. 根据权利要求49 所述的用途,其中所述细胞外基质降解蛋白为松弛素、透明质酸酶或核心蛋白聚糖。

51.根据权利要求 35 所述的用途,其中所述生物疗法为单克隆抗体、siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、核酶或基因疗法。

52.根据权利要求 34 所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为溶瘤病毒。

53.根据权利要求 52 所述的用途,其中所述溶瘤病毒经工程改造以表达 p53、MDA-7、IL-12、至少一种热激蛋白、TGF-β 抑制剂和/或 IL-10 抑制剂。

54.根据权利要求 52 所述的用途,其中所述溶瘤病毒为腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、痘病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒、艾巴氏病毒、流感病毒、呼肠孤病毒、粘液瘤病毒、马拉巴病毒、弹状病毒、enadenotucirev、柯萨奇病毒或 E1b 缺失的腺病毒。

55.根据权利要求 52 所述的用途,其中所述溶瘤病毒为单纯性疱疹病毒。

56.根据权利要求 52 所述的用途,其中所述溶瘤病毒为单链或双链 DNA 病毒、或RNA 病毒。

57.根据权利要求 52 所述的用途,其中所述溶瘤病毒为牛痘病毒。

58.根据权利要求 52 所述的用途,其中所述溶瘤病毒为腺病毒。

59.根据权利要求 52 所述的用途,其中所述溶瘤病毒经工程改造以表达细胞因子。

60. 根据权利要求 59 所述的用途,其中所述细胞因子为粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 或 IL12。

61.根据权利要求 52 所述的用途,其中所述溶瘤病毒进一步定义为 talimogene laherparepvec (T-VEC)。

62.根据权利要求 34 所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为蛋白激酶或生长因子信号传导途径抑制剂。

63.根据权利要求 62所述的用途,其中所述蛋白激酶或生长因子信号传导途径抑制剂为阿法替尼、阿昔替尼、贝伐单抗、博舒替尼、西妥昔单抗、克唑替尼、达沙替尼、厄洛替尼、福他替尼、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、乐伐替尼、木利替尼、尼洛替尼、帕尼单抗、帕唑帕尼、哌加他尼、兰尼单抗、鲁索替尼、塞卡替尼、索拉非尼、舒尼替尼、曲妥珠单抗、凡德他尼、AP23451、维莫非尼、CAL101、PX-866、LY294002、雷帕霉素、替西罗莫司、依维莫司、地磷

莫司、阿伏西地、金雀异黄素、司美替尼、AZD-6244、瓦他拉尼、P1446A-05、AG-024322、ZD1839、P276-00 或 GW572016。

64.根据权利要求 62 所述的用途,其中所述蛋白激酶抑制剂为 PI3K 抑制剂。

65.根据权利要求 64 所述的用途,其中所述 PI3K 抑制剂为 PI3K δ 抑制剂。

66.根据权利要求 38 所述的用途,其中所述免疫疗法包括细胞因子。

67.根据权利要求 66 所述的用途,其中所述细胞因子为粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 或 IL12。

68.根据权利要求 67 所述的用途,其中所述细胞因子为白介素和/或干扰素。

69.根据权利要求 68 所述的用途,其中所述白介素为 IL-2。

70.根据权利要求 68所述的用途,其中所述干扰素为 IFNα。

71.根据权利要求 38 所述的用途,其中所述免疫疗法包括共刺激受体激动剂、先天免疫细胞刺激剂或先天免疫激活剂。

72.根据权利要求 71 所述的用途,其中所述共刺激受体激动剂为抗 OX40 抗体、抗 GITR 抗体、抗 CD137 抗体、抗 CD40 抗体或抗 CD27 抗体。

73. 根据权利要求 71 所述的用途,其中所述免疫细胞刺激剂为细胞毒性抑制受体的抑制剂或免疫刺激 toll 样受体 (TLR) 的激动剂。

74.根据权利要求 73 所述的用途,其中所述细胞毒性抑制受体为 NKG2A/CD94 或 CD96 TACTILE 的抑制剂。

75.根据权利要求 73 所述的用途,其中所述 TLR 激动剂为 TLR7 激动剂、TLR8 激动剂或 TLR9 激动剂。

76.根据权利要求 38 所述的用途,其中所述免疫疗法包括 PD-L1 抑制剂、4-1BB 激动剂和 OX40 激动剂的组合。

77.根据权利要求 38 所述的用途,其中所述免疫疗法包括干扰素基因刺激因子 (STING) 激动剂。

78.根据权利要求 71 所述的用途,其中所述先天免疫激活剂为 IDO 抑制剂、TGFβ 抑制剂或 IL-10 抑制剂。

79. 根据权利要求 35 所述的用途,其中所述化学疗法包括 DNA 损伤剂。

80.根据权利要求 79 所述的用途,其中所述 DNA 损伤剂为 γ 辐射、X 射线、UV 辐射、微波、电子发射、阿霉素、5-氟尿嘧啶 (5FU)、卡培他滨、依托泊苷 (VP-16)、喜树碱、放线菌素-D、丝裂霉素 C、顺铂 (CDDP) 或过氧化氢。

81.至少一种溶瘤病毒、编码 p53 的核酸和/或编码 MDA-7 的核酸、至少一种 CD122/CD132 激动剂和至少一种PD-1或PD-L1的免疫检查点抑制剂在制备用于治疗受试者的黑素瘤的方法的药物中的用途,其中所述至少一种 CD122/CD132 激动剂选自由以下项组成的组:IL-2/抗 IL-2 免疫复合物、IL-15/抗 IL-15 免疫复合物、IL-15/IL-15 受体 α-IgG1-Fc (IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc) 免疫复合物、聚乙二醇化的 IL-2、聚乙二醇化的 IL-15、IL-2 突变蛋白、IL-15 突变蛋白和/或与 IL-15 受体 α/IgG1 Fc 融合蛋白结合的 IL-15 突变体。

82. 根据权利要求 81 所述的用途,其中所述至少一种溶瘤病毒经工程改造以表达 p53、MDA-7、细胞因子和/或免疫刺激基因。

83.根据权利要求 82 所述的用途,其中所述细胞因子为 GM-CSF 或 IL-12。

84.根据权利要求 82 所述的用途,其中所述免疫刺激基因为 TGFβ 抑制剂、IL-10 抑制剂或热激蛋白。

85.根据权利要求 81 所述的用途,其中所述至少一种溶瘤病毒选自由以下项组成的组:腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、痘病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒、艾巴氏病毒、流感病毒、呼肠孤病毒、粘液瘤病毒、马拉巴病毒、弹状病毒、enadenotucirev 和柯萨奇病毒。

86.根据权利要求 81 所述的用途,其中所述溶瘤病毒为单链或双链 DNA 病毒、或RNA病毒。

87.根据权利要求 81 所述的用途,其中所述溶瘤病毒为牛痘病毒。

88.根据权利要求 81 所述的用途,其中所述溶瘤病毒为腺病毒。

89.根据权利要求 81 所述的用途,其中所述至少一种溶瘤病毒为 Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12、CAVATAK™、CG0070、DNX-2401、G207、HF10、IMLYGIC™、JX-594、MG1-MA3、MV-NIS、OBP-301、REOLYSIN®、Toca 511、安柯瑞 (H101)、H102、H103、RIGVIR、过表达腺病毒死亡蛋白 (ADP) 的腺病毒、T-VEC、N1L 缺失的牛痘病毒、E1b 缺失的腺病毒、甲胎蛋白 (AFP) 启动子 Ad E1a 基因调控的腺病毒、经修饰的 TERT 启动子溶瘤腺病毒、HRE-E2F-TERT 杂交启动子溶瘤腺病毒,和/或具有 Pea3 结合位点 E1a 调控序列缺失和 E1b-19K 克隆插入位点的腺病毒。

90.根据权利要求 89 所述的用途,其中所述过表达 ADP 的腺病毒为 ViRx007。

91.根据权利要求 89 所述的用途,其中所述 N1L 缺失的牛痘病毒经工程改造以表达 IL-12。

92.根据权利要求 81 所述的用途,其中向所述受试者施用 1 种、2 种、3 种或 4 种 CD122/CD132 激动剂。

93.根据权利要求 81 所述的用途,其中所述至少一种 CD122/CD132 激动剂不是 F42K。

94.根据权利要求 81 所述的用途,其中向所述受试者施用所述至少一种 CD122/CD132 激动剂多于一次。

95.根据权利要求 81 所述的用途,其中在所述至少一种 CD122/CD132 激动剂之前、同时或之后向所述受试者施用所述溶瘤病毒。

96.根据权利要求 92、94和95中任一项所述的用途,其中施用包括局部或区域性注射。

97.根据权利要求 92、94和95中任一项所述的用途,其中经由连续输注、瘤内注射或静脉内注射来进行施用。

98.根据权利要求 92、94和95中任一项所述的用途,其中所述施用是通过瘤内注射进行的。

99.根据权利要求 81 所述的用途,其中所述受试者为人类。

100.根据权利要求 81 所述的用途,所述方法还包括施用至少一种附加抗癌治疗。

101.根据权利要求 100 所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为手术疗法、化学疗法、放射疗法、小分子疗法、冷冻疗法或生物疗法。

102.根据权利要求 100所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为激素疗法。

103.根据权利要求100所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为免疫疗法。

104.根据权利要求100所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为细胞因子疗法。

105.根据权利要求100所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为受体激酶抑制剂疗法或抗血管生成疗法。

106.根据权利要求 100 所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为树突状细胞疫苗。

107.根据权利要求 106所述的用途,其中所述树突状细胞疫苗经工程改造以表达 p53作为肿瘤相关抗原。

108.根据权利要求 81 所述的用途,其中所述至少一种检查点抑制剂选自 CTLA-4 抑制剂、PD-1 抑制剂、PD-L1 抑制剂、PD-L2 抑制剂、LAG3 抑制剂、BTLA 抑制剂、B7H3 抑制剂、B7H4 抑制剂、TIM3 抑制剂、KIR 抑制剂或 A2aR 抑制剂。

109.根据权利要求 108 所述的用途,其中所述至少一种检查点抑制剂为抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-L2 抗体、抗 CTLA4 抗体和/或抗 KIR 抗体。

110.根据权利要求 109所述的用途,其中所述抗 PD-1 抗体为纳武单抗、派姆单抗、匹利珠单抗、AMP-514、REGN2810、CT-011、BMS 936559、MPDL3280A 或 AMP-224。

111.根据权利要求 109 所述的用途,其中所述抗 PD-L1 抗体为德瓦鲁单抗、阿特珠单抗或阿维单抗。

112.根据权利要求 109 所述的用途,其中所述抗 PD-L2 抗体为 rHIgM12B7。

113.根据权利要求 108 所述的用途,其中所述 LAG3 抑制剂为 IMP321 或 BMS-986016。

114.根据权利要求 108 所述的用途,其中所述 A2aR 抑制剂为 PBF-509。

115.根据权利要求 109 所述的用途,其中所述抗 CTLA-4 抗体为曲美木单抗或伊匹木单抗。

116.根据权利要求 109 所述的用途,其中所述抗 KIR 抗体为利鲁单抗。

117.根据权利要求 81 所述的用途,其中施用多于一种检查点抑制剂。

118.根据权利要求 81 所述的用途,其中所述免疫检查点抑制剂是全身性施用的。

119.根据权利要求 100 所述的用途,其中所述至少一种附加抗癌治疗为组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂。

120.根据权利要求 119 所述的用途,其中所述 HDAC 抑制剂为 tractinostat。

121.根据权利要求 81 所述的用途,所述方法还包括提供细胞外基质降解蛋白。

122. 根据权利要求 121 所述的用途,其中所述细胞外基质降解蛋白为松弛素、透明质酸酶或核心蛋白聚糖。

123.一种药物组合物,所述药物组合物包含 (a) 编码 p53的核酸和/或编码 MDA-7的核酸; (b) 至少一种 CD122/CD132 激动剂;以及(c) 至少一种PD-1或PD-L1的免疫检查点抑制剂,其中所述至少一种 CD122/CD132 激动剂选自由以下项组成的组:IL-2/抗 IL-2免疫复合物、IL-15/抗 IL-15 免疫复合物、IL-15/IL-15 受体 α-IgG1-Fc (IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc) 免疫复合物、聚乙二醇化的 IL-2、聚乙二醇化的 IL-15、IL-2 突变蛋白、IL-15 突变蛋白和/或与 IL-15 受体 α/IgG1 Fc 融合蛋白结合的 IL-15 突变体。

124.一种药物组合物,所述药物组合物包含 (a) 溶瘤病毒; (b) 编码 p53的核酸和/

或编码 MDA-7 的核酸;(c) 至少一种 CD122/CD132 激动剂;以及(d) 至少一种PD-1或PD-L1的免疫检查点抑制剂,其中所述至少一种 CD122/CD132 激动剂选自由以下项组成的组:IL-2/抗 IL-2 免疫复合物、IL-15/抗 IL-15 免疫复合物、IL-15/IL-15 受体 α-IgG1-Fc (IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc) 免疫复合物、聚乙二醇化的 IL-2、聚乙二醇化的 IL-15、IL-2 突变蛋白、IL-15 突变蛋白和/或与 IL-15 受体 α/IgG1 Fc 融合蛋白结合的 IL-15 突变体。

包含用于治疗癌症的肿瘤抑制基因疗法和CD122/CD132激动剂的方法及组合物

[0001] 本申请要求于2018年3月19日提交的美国临时专利申请号62/645,022和于2019年2月11日提交的美国临时专利申请号62/803,887的权益,这两篇美国临时专利申请的全部内容均以引用方式合并于本文。

技术领域

[0002] 本发明总体上涉及生物学和医学领域。更具体地,本发明涉及将肿瘤抑制功能的恢复或放大与优先的CD122/CD132激动剂进行组合的方法和组合物。

背景技术

[0003] 恶性细胞往往对DNA损伤剂(诸如化学疗法和辐射诱导的程序性细胞死亡或凋亡)有抗性。这种抗性通常是某些致癌基因异常表达或细胞凋亡控制中肿瘤抑制基因表达丧失的结果。设计用来替换有缺陷的肿瘤抑制基因以及迫使凋亡诱导基因表达的策略为恢复肿瘤细胞中的这种细胞死亡模式提供了希望。

[0004] 可能研究最多的肿瘤抑制基因之一是p53,其在包括细胞周期调控和凋亡控制在内的多个过程中起着至关重要的作用(Hartwell等人,1994)。p53突变在肿瘤细胞中很常见,并且与癌症进展以及对化学疗法和放射疗法的抗性的发展有关(Spitz等人,1996)。体外和体内的临床前研究均表明,恢复野生型(wt)p53功能可诱导癌细胞凋亡。在逆转录病毒或腺病毒wt-p53构建体的动物模型中进行瘤内注射使得多种不同肿瘤组织学的肿瘤消退,所述多种不同肿瘤组织学包括非小细胞肺癌(NSCLC)、白血病、胶质母细胞瘤以及乳腺癌、肝癌、卵巢癌、结肠癌和肾癌(Fujiwara等人,1994)。有希望的临床前和临床数据使得开始进行用于对卵巢癌患者进行一线治疗的p53基因疗法试验的国际随机化II/III期试验(Buller等人,2002)。然而,由于未显示出足够的治疗益处,该研究在首次期中分析后结束(Zeimet和Marth,2003)。

[0005] 因此,尽管在肿瘤抑制基因疗法方面取得了重大进展,但仍然存在一些障碍限制了临床中的成功,所述障碍包括非特异性表达、低效递送和生物安全性。此外,癌症和表观遗传调节异常中有多种遗传变化导致基因的异常沉默;因此,单基因疗法可能不是用于治疗癌症的合适策略。因此,需要将多种肿瘤抑制因子与其他抗癌剂的组合进行靶向的方法,来实现增强的抗肿瘤活性和基因疗法的有效递送。

发明内容

[0006] 在一个实施例中,本公开提供了用于治疗受试者的癌症的方法和组合物,所述方法和组合物包括向受试者施用有效量的(1)编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸以及(2)至少一种CD122激动剂和CD132激动剂(例如,优先的CD122/CD132激动剂)。

[0007] 在一些方面,向受试者施用编码p53的核酸。在某些方面,向受试者施用编码MDA7的核酸。在一些方面,向受试者施用编码p53的核酸和编码MDA7的核酸。

[0008] 在具体方面,以有效恢复或放大肿瘤抑制功能的量递送编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸和/或CD122/CD132激动剂。在具体方面,将编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸递送至一个或多个肿瘤位点。在某些方面,施用多于一种CD122/CD132激动剂。在具体方面,受试者为人类。

[0009] 在某些方面,CD122/CD132激动剂优先与CD122/CD132受体复合物结合,并且相较于与CD122/CD132受体复合物的亲和结合,具有对CD25或IL15α受体的较低亲和结合。在特定方面,一种或多种CD122/CD132激动剂为IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Ra-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白。CD122/CD132激动剂可以是与IL-15受体α/IgG1 Fc融合蛋白(诸如ALT-803)结合的IL-15突变体(例如,IL-15N72D)。在某些方面,IL-15与IL-15Rα预复合以优先与CD122/CD132结合。在具体方面,IL-2受体激动剂不是F42K。

[0010] 在一些方面,通过病毒和/或非病毒方法递送编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸。在某些方面,编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸在表达盒中(诸如在病毒载体中)递送。在一些方面,p53和MDA-7处于单个启动子(诸如巨细胞病毒(CMV)、SV40或PGK)的控制下。在某些方面,病毒载体为腺病毒载体(例如,过表达ADP的腺病毒载体)、逆转录病毒载体、牛痘病毒载体(例如,缺失NIL的牛痘病毒载体)、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体、水疱性口炎病毒载体、多瘤病毒载体。在一些方面,通过基因编辑方法(诸如锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应核酸酶(TALEN)或成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR))来递送编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸,诸如以恢复或扩大肿瘤抑制基因的表达。在本公开中考虑了病毒基因和非病毒基因的递送与表达和/或基因编辑方法的组合。在某些方面,腺病毒p53(Ad-p53)注射剂量(mL)使得每个肿瘤病变接受的Ad-p53剂量为至少1×10^{11}个病毒颗粒(vp)/cm^3肿瘤体积。在一些方面,将编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸以脂质体复合物(lipoplex)的形式施用于受试者。在一些方面,所述脂质体复合物包含DOTAP和至少一种胆固醇、胆固醇衍生物或胆固醇混合物。

[0011] 在一些方面,将所述编码p53的核酸和/或所述编码MDA-7的核酸静脉内、动脉内、血管内、胸膜内、腹膜内、气管内、瘤内、鞘内、肌内、内窥镜下、病变内、经皮、皮下、区域性、立体定向地或通过直接注射或输注而施用于受试者。在具体方面,将编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸瘤内地施用于受试者。在一些方面,施用包括局部或区域性注射。在一些方面,施用是通过连续输注、瘤内注射或静脉内注射进行的。

[0012] 在一些方面,向受试者施用编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸多于一次。在某些方面,向受试者施用至少一种CD122/CD132激动剂多于一次。在一些方面,在至少一种CD122激动剂和CD132激动剂之前、同时或之后,向受试者施用编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸。

[0013] 在一些方面,所述癌症是黑素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺癌、肝癌、视网膜母细胞瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、白血病、神经母细胞瘤、头癌、颈癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、骨癌、睾丸癌、卵巢癌、间皮瘤、宫颈癌、胃肠道癌、泌尿生殖器癌、呼吸道癌、造血癌、肌肉骨骼癌、神经内分泌癌、恶性上皮肿瘤、肉瘤、中枢神经系统癌、外周神经系统癌、淋巴瘤、脑癌、结肠癌或膀胱癌。在具体方面,所述癌症是转移性的。

[0014] 在一些方面,所述方法还包括施用至少一种附加抗癌治疗。在某些方面,所述至少一种附加抗癌治疗为手术疗法、化学疗法、放射疗法、激素疗法、免疫疗法、小分子疗法、受体激酶抑制剂疗法、抗血管生成疗法、细胞因子疗法、冷冻疗法、放射消融或生物疗法。在某些方面,生物疗法为单克隆抗体、siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、核酶、基因编辑、细胞疗法或基因疗法。

[0015] 在一些方面,至少一种附加抗癌治疗为免疫检查点抑制剂。在某些方面,免疫检查点抑制剂为CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR或A2aR。在一些方面,至少一种免疫检查点抑制剂为抗CTLA-4抗体。在一些方面,抗CTLA-4抗体为曲美木单抗或伊匹木单抗。在某些方面,至少一种免疫检查点抑制剂为抗杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)抗体。在一些实施例中,抗KIR抗体为利鲁单抗(lirilumab)。在一些方面,PD-L1抑制剂为德瓦鲁单抗(durvalumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)或阿维单抗(avelumab)。在一些方面,PD-L2抑制剂为rHIgM12B7。在一些方面,LAG3抑制剂为IMP321或BMS-986016。在一些方面,A2aR抑制剂为PBF-509。在一些方面,至少一种免疫检查点抑制剂为人类程序性细胞死亡1(PD-1)轴结合拮抗剂。在某些方面,PD-1轴结合拮抗剂选自由PD-1结合拮抗剂、PDL1结合拮抗剂和PDL2结合拮抗剂组成的组。在一些方面,PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。在某些方面,PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PDL1和/或PDL2的结合。具体地,PD-1结合拮抗剂为单克隆抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、匹利珠单抗(pidilizumab)、AMP-514、REGN2810、CT-011、BMS 936559、MPDL3280A或AMP-224。

[0016] 在一些方面,至少一种附加疗法为组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂。在某些方面,所述HDAC抑制剂为tractinostat(CHR-3996或VRx-3996)。在某些方面,所述方法还包括提供细胞外基质降解蛋白,诸如松弛素、透明质酸酶或核心蛋白聚糖。

[0017] 在一些方面,至少一种附加抗癌治疗为溶瘤病毒。在一些方面,溶瘤病毒经工程改造以表达p53、MDA-7、IL-12、TGF-β抑制剂和/或IL-10抑制剂。在某些方面,所述溶瘤病毒为单链或双链DNA病毒、RNA病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、痘病毒、牛痘病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒(Newcastle's Disease virus)、艾巴氏病毒(Epstein-Barr virus)、流感病毒、呼肠孤病毒、粘液瘤病毒、马拉巴病毒、弹状病毒、enadenotucirev或柯萨奇病毒。在一些方面,溶瘤病毒经工程改造以表达细胞因子,诸如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或IL-12。在一些方面,溶瘤病毒进一步定义为talimogene laherparepvec(T-VEC)。在一些方面,溶瘤腺病毒载体来源于缺失E1b的腺病毒,以及其中Ad E1a基因由甲胎蛋白(AFP)启动子驱动的腺病毒、经修饰的TERT启动子溶瘤腺病毒、HRE-E2F-TERT杂合启动子溶瘤腺病毒和/或具有经修饰的E1a调控序列的腺病毒,其中至少一个Pea3结合位点或其功能部分被使用E1b-19K克隆插入位点缺失,这些腺病毒全部可经修饰以表达治疗基因。

[0018] 在某些方面,所述至少一种附加抗癌治疗为蛋白激酶或生长因子信号传导途径抑制剂。在某些方面,所述蛋白激酶或生长因子信号传导途径抑制剂为阿法替尼(Afatinib)、阿昔替尼(Axitinib)、贝伐单抗(Bevacizumab)、博舒替尼(Bosutinib)、西妥昔单抗(Cetuximab)、克唑替尼(Crizotinib)、达沙替尼(Dasatinib)、厄洛替尼(Erlotinib)、福他替尼(Fostamatinib)、吉非替尼(Gefitinib)、伊马替尼(Imatinib)、拉帕替尼

(Lapatinib)、乐伐替尼(Lenvatinib)、木利替尼(Mubritinib)、尼洛替尼(Nilotinib)、帕尼单抗(Panitumumab)、帕唑帕尼(Pazopanib)、哌加他尼(Pegaptanib)、兰尼单抗(Ranibizumab)、鲁索替尼(Ruxolitinib)、塞卡替尼(Saracatinib)、索拉非尼(Sorafenib)、舒尼替尼(Sunitinib)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、凡德他尼(Vandetanib)、AP23451、维莫非尼(Vemurafenib)、CAL101、PX-866、LY294002、雷帕霉素(rapamycin)、替西罗莫司(temsirolimus)、依维莫司(everolimus)、地磷莫司(ridaforolimus)、阿伏西地(Alvocidib)、金雀异黄素(Genistein)、司美替尼(Selumetinib)、AZD-6244、瓦他拉尼(Vatalanib)、P1446A-05、AG-024322、ZD1839、P276-00或GW572016。在一些方面,蛋白激酶抑制剂为PI3K抑制剂,诸如PI3Kδ抑制剂。

[0019] 在一些方面,免疫疗法包括细胞因子,诸如GM-CSF、白介素(例如,IL-2)和/或干扰素(例如,IFNα)或热激蛋白。在某些方面,免疫疗法包括共刺激受体激动剂、先天免疫细胞刺激剂或先天免疫激活剂。在某些方面,共刺激受体激动剂为抗OX40抗体、抗GITR抗体、抗CD137抗体、抗CD40抗体或抗CD27抗体。在一些方面,免疫细胞刺激剂为细胞毒性抑制受体的抑制剂或免疫刺激toll样受体(TLR)的激动剂。在一些方面,细胞毒性抑制受体为NKG2A/CD94或CD96 TACTILE的抑制剂。在一些方面,TLR激动剂为TLR7激动剂、TLR8激动剂或TLR9激动剂。在一些方面,免疫疗法包括PD-L1抑制剂、4-1BB激动剂和OX40激动剂的组合。在某些方面,免疫疗法包括干扰素基因刺激因子(STING)激动剂。在一些方面,先天免疫激活剂为IDO抑制剂、TGFβ抑制剂或IL-10抑制剂。在一些方面,当这些免疫疗法为蛋白质时,它们可以作为通过有复制能力的病毒和/或无复制能力的病毒和/或非病毒基因疗法施用的多肽或其对应的核酸来递送。在一些方面,化学疗法包括DNA损伤剂,诸如γ辐射、X射线、UV辐射、微波、电子发射、阿霉素、5-氟尿嘧啶(5FU)、卡培他滨、依托泊苷(VP-16)、喜树碱、放线菌素-D、丝裂霉素C、顺铂(CDDP)或过氧化氢。

[0020] 在另一个实施例中,提供了一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的至少一种溶瘤病毒和至少一种CD122/CD132激动剂以及至少一种免疫检查点抑制剂。在一些方面,至少一种溶瘤病毒为经工程改造以过度表达腺病毒死亡蛋白(ADP)的腺病毒,诸如VirRx007。在一些方面,至少一种溶瘤病毒经基因修饰以表达p53、MDA-7、细胞因子和/或免疫刺激基因。在具体方面,细胞因子为GM-CSF或IL-12。在一些方面,免疫刺激基因为TGFβ或IL-10的抑制剂。

[0021] 在一些方面,所述至少一种溶瘤病毒选自由以下项组成的组:单链或双链DNA病毒、RNA病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、痘病毒、牛痘病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒、艾巴氏病毒、流感病毒、呼肠孤病毒、粘液瘤病毒、马拉巴病毒、弹状病毒、enadenotucirev和柯萨奇病毒。

[0022] 在一些方面,以上实施例中采用的病毒包括具有复制能力的病毒和/或复制缺陷型病毒。在某些方面,有复制能力的病毒和无复制能力的病毒为单链或双链DNA病毒、RNA病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、痘病毒、牛痘病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒、粘液瘤病毒、艾巴氏病毒、流感病毒、呼肠孤病毒、马拉巴病毒、弹状病毒、enadenotucirev或柯萨奇病毒。在某些方面,利用一种或多种病毒。在某些方面,病毒组合物包含有复制能力的病毒和无复制能力的病毒的组合。

[0023] 在其他方面,以上实施例中的有复制能力的病毒可以是一种或多种溶瘤病毒。这

些溶瘤病毒可经工程改造以表达p53和/或IL24和/或表达除p53和/或IL24以外的其他基因,诸如细胞因子(例如IL12)和/或另一种免疫刺激基因(例如,TGF-β抑制剂或IL10抑制剂或热激蛋白)。在某些方面,溶瘤病毒可以代替或作为p53和/或IL24肿瘤抑制因子疗法的补充来使用。溶瘤病毒的示例包括单链或双链DNA病毒、RNA病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、痘病毒、牛痘病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒、艾巴氏病毒、流感病毒和呼肠孤病毒、粘液瘤病毒、马拉巴病毒、弹状病毒、enadenotucirev或柯萨奇病毒。示例性溶瘤病毒包括但不限于Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12、Cavatak™、CG0070、DNX-2401、G207、HF10、IMLYGIC™、JX-594、MG1-MA3、MV-NIS、OBP-301、Reolysin®、Toca 511、安柯瑞(H101)、Onyx-015、H102、H103、RIGVIR、过表达腺病毒死亡蛋白(ADP)的腺病毒(诸如VirRx007)、缺失N1L的牛痘病毒或表达IL12的缺失N1L的牛痘病毒。

[0024] 在一些方面,病毒和非病毒核酸及基因编辑组合物诱导局部和/或全身效应。在一些方面,这些组合物诱导局部和全身效应。

[0025] 在具体方面,所治疗的受试者为哺乳动物或人类。在某些方面,提供治疗以预防或治疗癌前(pre-malignant)或恶性过度增殖性病症。在预防的某些方面,所述受试者为健康受试者。在预防的其他方面,受试者包括癌前病变,例如粘膜白斑或发育异常病变。在预防的其他方面,受试者有发展成癌症的风险,例如由于吸烟或具有癌症家族史。在某些方面,治疗是针对初始或复发性过度增殖性病症。在一些方面,施用治疗以增强或逆转对另一种疗法的抗性。在某些方面,对治疗的抗性已知在历史上是针对过度增殖性病症患者的特定群体。在某些方面,在个体过度增殖性病症患者中观察到了对治疗的抗性。

[0026] 在上述实施例的某些方面,所述方法还包括提供细胞外基质降解蛋白。在一些方面,这包括施用编码细胞外基质降解蛋白的表达盒。在一些实施例中,细胞外基质降解蛋白为松弛素、透明质酸酶或核心蛋白聚糖。在具体方面,细胞外基质降解蛋白为松弛素。在一些方面,表达盒在病毒载体中。在某些方面,病毒载体为腺病毒载体、逆转录病毒载体、牛痘病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体、水疱性口炎病毒载体、或多瘤病毒载体、或另一种类型的病毒或非病毒基因疗法载体。

[0027] 在一些方面,将编码细胞外基质降解蛋白的表达盒瘤内、动脉内、静脉内、血管内、胸膜内、腹膜内、气管内、鞘内、肌内、内窥镜下、病变内、经皮、皮下、区域性、立体定向地或通过直接注射或输注进行施用。在某些方面,在至少一种CD122/CD132激动剂之后,向受试者施用编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸。在某些方面,在至少一种CD122/CD132激动剂之前,向受试者施用编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸。在某些方面,与至少一种CD122/CD132激动剂同时向受试者施用编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸。在具体方面,将腺病毒载体瘤内施用于受试者。在一些方面,编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸以及至少一种CD122/CD132激动剂诱导对未注射编码p53和/或编码MDA-7的核酸的远端肿瘤的远位(全身)效应。

[0028] 在某些方面,所述癌症为黑素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺癌、肝癌、视网膜母细胞瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、白血病、神经母细胞瘤、头癌、颈癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、骨癌、睾丸癌、卵巢癌、间皮瘤、宫颈癌、胃肠道癌、泌尿生殖器癌、呼吸道癌、造血癌、肌肉骨骼癌、神经内分泌癌、恶性上皮肿瘤、肉瘤、中枢神经系统癌、外周神经系

统癌、淋巴瘤、脑癌、结肠癌或膀胱癌。在一些方面,癌症是转移性的。

[0029] 在一些方面,编码p53的核酸和/或编码MDA-7的核酸在表达盒中。在某些方面,表达盒在病毒载体中。在一些实施例中,所述病毒载体为腺病毒载体、逆转录病毒载体、牛痘病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体、水疱性口炎病毒载体或多瘤病毒载体。在具体方面,病毒载体为腺病毒载体。

[0030] 在某些方面,将病毒载体以介于约10^3个与约10^{13}个之间的病毒颗粒进行施用。在一些方面,将腺病毒载体静脉内、动脉内、血管内、胸膜内、腹膜内、气管内、瘤内、鞘内、肌内、内窥镜下、病变内、经皮、皮下、区域性、立体定向地或通过直接注射或输注而施用于受试者。在某些方面,向受试者施用腺病毒载体多于一次。

[0031] 在一些方面,向受试者施用编码p53的核酸。在其他方面,向受试者施用编码MDA-7的核酸。在某些方面,向受试者施用编码p53的核酸和编码MDA-7的核酸。在一些方面,p53和MDA-7处于单个启动子的控制下。在一些实施例中,启动子为巨细胞病毒(CMV)、SV40或PGK。

[0032] 在一些方面,将核酸以脂质体复合物的形式施用于受试者。在某些方面,所述脂质体复合物包含DOTAP和至少一种胆固醇、胆固醇衍生物或胆固醇混合物。在某些方面,将核酸以纳米颗粒的形式施用。

[0033] 在某些方面,施用包括局部或区域性注射。在其他方面,施用是通过连续输注、瘤内注射或静脉内注射进行的。

[0034] 在一些方面,所述方法还包括施用至少一种附加抗癌治疗。在某些方面,至少一种附加抗癌治疗为手术疗法、化学疗法(例如,施用蛋白激酶抑制剂或EGFR靶向疗法)、栓塞疗法、化学栓塞疗法、放射疗法、冷冻疗法、热疗、光疗、放射消融疗法、激素疗法、免疫疗法、小分子疗法、受体激酶抑制剂疗法、抗血管生成疗法、细胞因子疗法或生物疗法(诸如单克隆抗体、siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、核酶或基因疗法)。

[0035] 在一些方面,免疫疗法包括细胞因子。在具体方面,细胞因子为粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素(诸如IL-2)和/或干扰素(诸如IFN-α)。增强靶向肿瘤的免疫应答的附加方法包括附加免疫检查点抑制。在一些方面,免疫检查点抑制包括抗CTLA4、抗PD-1、抗PD-L1、抗PD-L2、抗TIM-3、抗LAG-3、抗A2aR或抗KIR抗体。在一些方面,免疫疗法包括共刺激受体激动剂,诸如抗OX40抗体、抗GITR抗体、抗CD137抗体、抗CD40抗体和抗CD27抗体。在某些方面,免疫疗法包括抑制T调节细胞(Treg)、髓源性抑制细胞(MDSC)和癌症相关的纤维母细胞(CAF)。在其他方面,免疫疗法包括刺激先天免疫细胞,诸如天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和树突状细胞。其他免疫刺激治疗可包括IDO抑制剂、TGF-β抑制剂、IL-10抑制剂、干扰素基因刺激因子(STING)激动剂、toll样受体(TLR)激动剂(例如,TLR7、TLR8或TLR9)、肿瘤疫苗(例如,全肿瘤细胞疫苗、肽,以及重组肿瘤相关抗原疫苗)和过继性细胞疗法(ACT)(例如,T细胞、天然杀伤细胞、TIL和LAK细胞),以及使用经遗传工程改造的受体(例如,嵌合抗原受体(CAR)和T细胞受体(TCR))的ACT。在某些方面,可使用这些药剂的组合,诸如组合免疫检查点抑制剂、检查点抑制加上T细胞共刺激受体的激动作用,以及检查点抑制加上TIL ACT。在某些方面,附加抗癌治疗包括免疫检查点抑制剂(例如,阿维单抗)、4-1BB(CD-137)激动剂(例如,Utomilumab)和OX40(TNFRS4)激动剂的组合。

[0036] 在一些方面,化学疗法包括DNA损伤剂。在一些实施例中,DNA损伤剂为γ辐射、X射线、UV辐射、微波、电子发射、阿霉素、5-氟尿嘧啶(5FU)、卡培他滨、依托泊苷(VP-16)、喜树

碱、放线菌素-D、丝裂霉素C、顺铂(CDDP)或过氧化氢。在具体方面,DNA损伤剂为5FU或卡培他滨。在一些方面,化学疗法包括顺铂(CDDP)、卡铂、丙卡巴嗪、二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、它莫西芬、多西紫杉醇、紫杉醇、反铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱、甲氨蝶呤、HDAC抑制剂,或它们的任何类似物或衍生变体。

[0037] 在一些方面,至少一种附加癌症治疗为蛋白激酶抑制剂或抑制参与蛋白激酶或生长因子信号传导途径的受体的单克隆抗体。例如,蛋白激酶或受体抑制剂可以是EGFR、VEGFR、AKT、Erb1、Erb2、ErbB、Syk、Bcr-Abl、JAK、Src、GSK-3、PI3K、Ras、Raf、MAPK、MAPKK、mTOR、c-Kit、eph受体或BRAF抑制剂。在具体方面,蛋白激酶抑制剂为PI3K抑制剂。在一些实施例中,PI3K抑制剂为PI3Kδ抑制剂。例如,蛋白激酶或受体抑制剂可以是阿法替尼、阿昔替尼、贝伐单抗、博舒替尼、西妥昔单抗、克唑替尼、达沙替尼、厄洛替尼、福他替尼、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、乐伐替尼、木利替尼、尼洛替尼、帕尼单抗、帕唑帕尼、哌加他尼、兰尼单抗、鲁索替尼、塞卡替尼、索拉非尼、舒尼替尼、曲妥珠单抗、凡德他尼、AP23451、维莫非尼、CAL101、PX-866、LY294002、雷帕霉素、替西罗莫司、依维莫司、地磷莫司、阿伏西地、金雀异黄素、司美替尼、AZD-6244、瓦他拉尼、P1446A-05、AG-024322、ZD1839、P276-00、GW572016,或它们的混合物。在某些方面,蛋白激酶抑制剂为AKT抑制剂(例如,MK-2206、GSK690693、A-443654、VQD-002、米替福新(Miltefosine)或哌立福新(Perifosine))。在某些方面,用于根据实施例使用的靶向EGFR的疗法包括但不限于EGFR/ErbB1/HER、ErbB2/Neu/HER2、ErbB3/HER3和/或ErbB4/HER4的抑制剂。广泛的此类抑制剂是已知的,并且包括但不限于对一种或多种受体和EGFR结合抗体或适体具有活性的酪氨酸激酶抑制剂。例如,EGFR抑制剂可以是吉非替尼、厄洛替尼、西妥昔单抗、马妥珠单抗(matuzumab)、帕尼单抗、AEE788、CI-1033、HKI-272、HKI-357或EKB-569。蛋白激酶抑制剂可以是BRAF抑制剂,诸如达拉菲尼(dabrafenib),或MEK抑制剂,例如曲美替尼(trametinib)。

[0038] 根据以下详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应当理解,虽然指示了本发明的优选实施例,但是详细描述和具体实施例仅以说明的方式给出,因为通过此详细描述,在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0039] 以下附图形成了本说明书的一部分,并且被包括以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个附图,结合在此呈现的具体实施例的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0040] 图1:有效的Ad-p53投配和肿瘤应答。与Ad-p53剂量＜7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3(右小图)相比,用Ad-p53＞7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3(左小图)治疗的有利肿瘤p53生物标志物患者亚组的肿瘤应答的瀑布图。对Ad-p53应答者的详细检查显示,大部分应答者(7/9名患者)已接受接近或超过1×10^{11}vp/cm^3(范围7.81至333.2×10^{10}vp/cm^3)的Ad-p53剂量。因此,用于Ad-p53临床应用的剂量可能超过1×10^{11}vp/cm^3注射肿瘤体积。

[0041] 图2:Ad-p53生物标志物/剂量优化治疗的优越总生存期。与用甲氨蝶呤治疗的具

有良好的肿瘤p53生物标志物谱的患者相比,用Ad-p53剂量＞7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3治疗的具有良好的肿瘤p53生物标志物谱的患者的优越一年生存期和总生存期。结果表明,与甲氨蝶呤相比,有利的肿瘤p53生物标志物和Ad-p53剂量优化治疗的总生存期有统计学上显著的增加(Ad-p53治疗的中位生存期为11.5个月对比甲氨蝶呤的中位生存期为4.3个月;p＜0.016,HR 1.9767)。

[0042] 图3:QUADRA-FUSE™输注设备。QUADRA-FUSE™(从REXMEDICAL®获得的图像)是一种多头(multiple-tine)输注设备,其具有从套管针轴(右上插图)伸出的三个头,该三个头取决于肿瘤病变的较短宽度(W)直径而围绕中心针轴线以1-5cm的可调直径部署。这种横向延伸使得药物能够在整个病变中广泛分散。每个头具有两个递送通孔(四个流体出口);因此,每次输注产生12个递送点。

[0043] 图4:Ad-p53+CD122/132激动剂+抗PD-1功效:肿瘤体积。示出接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132、抗PD-1、Ad-p53、或组合CD122/132+抗PD-1、Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1或Ad-p53+CD122/132+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的原发性肿瘤体积的图式。在CD122/132、抗PD-1和CD122/132+抗PD-1疗法期间存在严重的肿瘤进展,所述严重的肿瘤进展通过与Ad-p53疗法组合而逆转。结果还显示,与所述疗法中的任何疗法相比,Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1和Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗的功效均得到提高。到第21天,用(PBS)、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1和Ad-p53治疗的组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。相比之下,与非Ad-p53疗法或单独的Ad-p53治疗相比,以下组合治疗中的每一者:与单独的非Ad-p53疗法或Ad-p53治疗中的任一者相比,Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1以及Ad-p53+CD122/132+抗PD-1均诱导肿瘤体积大幅减小。在第21天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1和Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(p值＜0.0001)。然而,到第30天,Ad-p53+CD122/132和Ad-p53+抗PD-1治疗组的平均肿瘤体积也超过了2,000mm^3。重要的是,在第30天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了抗肿瘤效应的协同仅在Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组合中保持(总体p值＜0.0001,并且与每个其他治疗组相比,单独p值＜0.0001)。

[0044] 图5:完全肿瘤应答率。一般认为,对疗法的完全肿瘤应答与重要的治疗益处相关,并且是治愈结局所必需的。如图5所示,对于p53治疗组及其对照,仅Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗促成原发性肿瘤和对侧肿瘤两者的完全肿瘤消退。在Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组的60％(10只动物中的6只)中观察到了原发性肿瘤和对侧肿瘤两者的完全肿瘤应答,并且在其他治疗组中的70只动物中均没有完全肿瘤应答(通过比较Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组与所有其他治疗组中的动物的双侧费希尔精确检验(two-sided Fisher's Exact Test)所得的p值＜0.0001;通过比较Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的双侧费希尔精确检验所得的p值≤0.011)。出乎意料的是,完全肿瘤应答是持久的,并在40天后在Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组的50％中得以维持,从而据推测治愈了这些动物的这些肿瘤。

[0045] 图6A和图6B:对于对侧肿瘤生长的全身/远位治疗效应。在啮齿动物中评定原发性肿瘤治疗对于对侧植入肿瘤的全身/远位效应,所述啮齿动物的原发性肿瘤已经接受了Ad-p53肿瘤内疗法中的一种。与Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗对原发性肿瘤生长和完全消退率的出乎意料的、显著增强的协同效应相一致,我们还观察到Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治

疗与其他Ad-p53治疗组相比惊人地强大并且有统计学上显著的远位效应。如图6A所示,对侧肿瘤生长在接受Ad-p53+CD122/132+抗PD-1原发性肿瘤治疗的动物中的90％(10只动物中的9只)中被消除。相比之下,在其他Ad-p53治疗组中的动物的62.5％至100％中观察到了对侧肿瘤生长。对侧肿瘤生长的差异是统计学上显著的(通过对所有治疗组的卡方分析所得的p值＝0.0004;通过比较Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的双侧费希尔精确检验所得的p值≤0.0430)。图6B描绘了示出接受使用组合Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1或Ad-p53+CD122/132+抗PD-1的三种最有效原发性肿瘤治疗的啮齿动物随时间推移的对侧肿瘤体积的图式。在第22天对这些对侧肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(总体p值＝0.0435)。与Ad-p53+抗PD-1组相比,仅Ad-p53+CD122/132+抗PD-1组显示出对侧肿瘤生长的统计学上显著的降低(p值＝0.0360)。综上所述,这些发现表明,在所有Ad-p53疗法中,只有三联组合Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗通过诱导介导实质性远位效应的强大局部和全身性抗肿瘤免疫力而产生了治愈功效。

[0046] 图7:Ad-p53+CD122/132+抗PD-1功效:延长的生存期。用PBS、CD122/132+抗PD-1、Ad-p53、或组合Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1和Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗的小鼠的卡普兰-梅尔生存曲线(Kaplan-Meier survival curve)。通过对数秩检验(log rank test),这些生存曲线存在统计学上显著的差异(总体p＜0.0001;比较Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的p值≤0.0003)。这些结果还证明了Ad-p53+CD122/132+抗PD-1疗法的出乎意料的实质性协同。在40天后尚未达到Ad-p53+CD122/132+抗PD-1疗法组的中位生存期,并且该治疗组中的80％仍然存活,没有任何残留肿瘤的迹象。与之形成鲜明对比的是,其他治疗组中的动物的98％(49/50)均在第30天时死亡,并且具有在10天至28天之间的范围内的中位生存期。

[0047] 图8:VirRx007+CD122/132激动剂+抗PD-1功效:肿瘤体积。示出接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、VirRx007、或组合VirRx007+CD122/132、VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的原发性肿瘤体积的图式。在用CD122/132、抗PD-1和CD122/132+抗PD-1疗法治疗的组中存在严重的肿瘤进展,所述严重的肿瘤进展通过与VirRx007疗法组合而逆转。结果还显示,与所述疗法中的任何单独疗法相比,VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的功效得到增强。与使用Ad-p53的发现相反,VirRx007没有证明与CD122/CD132治疗的协同。到第30天,用(PBS)、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、VirRx007和VirRx007+CD122/CD132治疗的组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。相比之下,与单独的非VirRx007疗法或VirRx007治疗中的任一者相比,使用VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1的组合治疗中的每一者均诱导肿瘤体积的大幅减小。在第30天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(这些治疗的总体或每一者对比VirRx007的p值＜0.0001)。VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗优于VirRx007+抗PD-1(p值＝0.0002)。惊人的是,尽管与VirRx007单一疗法相比,组合治疗VirRx007+CD122/132没有明显益处,但是证明了组合VirRx007+CD122/132+抗PD-1的三联疗法的协同。

[0048] 图9:完全肿瘤应答率。一般认为,对疗法的完全肿瘤应答与重要的治疗益处相关,

并且是治愈结局所必需的。如图9所示,对于VirRx007治疗组及其对照,仅VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗促成原发性肿瘤和对侧肿瘤两者的完全肿瘤消退。在VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组的60％中观察到了原发性肿瘤和对侧肿瘤两者的完全肿瘤应答,并且在其他治疗组中的70只动物中均没有完全肿瘤应答(通过比较VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组与所有其他治疗组中的动物的双侧费希尔精确检验所得的p值＜0.0001;通过比较VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的双侧费希尔精确检验所得的p值＜0.011)。出乎意料的是,完全肿瘤应答是持久的,并在40天后在VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的动物的50％中得以维持,从而据推测治愈了这些动物的这些肿瘤。

[0049] 图10A和图10B:对于对侧肿瘤生长的全身/远位治疗效应。在啮齿动物中评定原发性肿瘤治疗对于对侧植入肿瘤的全身/远位效应,所述啮齿动物的原发性肿瘤已经接受了VirRx007肿瘤内疗法中的一种。与VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗对原发性肿瘤生长和完全消退率的出乎意料的、显著增强的协同效应相一致,我们还观察到VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗与其他VirRx007治疗组相比惊人地强大并且有统计学上高度显著的远位效应。如图10A所示,对侧肿瘤生长在原发性肿瘤接受了VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的动物中的80％中被消除。相比之下,在其他VirRx007治疗组中的动物的80％至100％中观察到了对侧肿瘤生长。对侧肿瘤生长的差异是统计学上显著的(通过比较所有治疗组的卡方分析所得的p值＝0.0002;通过比较VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的双侧费希尔精确检验所得的p值≤0.0230)。这些发现暗示,组合VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗诱导强大的全身抗肿瘤免疫力,并且以潜在的治愈功效介导实质性远位效应。图10B描绘了示出接受使用VirRx007+CD122/132、VirRx007+抗PD-1或VirRx007+CD122/132+抗PD-1的三种最有效原发性肿瘤组合治疗的啮齿动物随时间推移的对侧肿瘤体积的图式。在第22天对这些对侧肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(总体p值＝0.0171)。与VirRx007+抗PD-1组相比,仅VirRx007+CD122/132+抗PD-1组显示出对侧肿瘤生长的统计学上显著的降低(p值＝0.0115)。综上所述,这些发现表明,在所有VirRx007疗法中,只有三联组合VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗通过诱导介导实质性远位效应的强大局部和全身性抗肿瘤免疫力而产生了治愈功效。

[0050] 图11:VirRx007+CD122/132+抗PD-1功效:延长的生存期。用PBS、CD122/132+抗PD-1、VirRx007、或组合VirRx007+CD122/132、VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的小鼠的卡普兰-梅尔生存曲线。通过对数秩检验,这些生存曲线存在统计学上显著的差异(总体p＜0.0001;比较VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的p值≤0.0005)。结果还证明了VirRx007+CD122/132+抗PD-1疗法的出乎意料的实质性协同。在40天后尚未达到VirRx007+CD122/132+抗PD-1疗法组的中位生存期,并且该治疗组中的90％仍然存活。与之形成鲜明对比的是,其他治疗组中的动物的98％(49/50)均在第40天时死亡,并且具有在10天至33天之间的范围内的中位生存期。惊人的是,尽管与VirRx007单一疗法相比,组合治疗VirRx007+CD122/132没有明显生存益处,但是证明了组合VirRx007+CD122/132+抗PD-1的三联疗法的协同。

[0051] 图12:Ad-IL24+CD122/132激动剂+抗PD-1功效:肿瘤体积。示出接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、Ad-IL24、或组合Ad-IL24+CD122/132

和组合Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的原发性肿瘤体积的图式。在CD122/132、抗PD-1和CD122/132+抗PD-1疗法期间存在严重的肿瘤进展,所述严重的肿瘤进展通过与Ad-IL24疗法组合而逆转。与所述疗法中的任何单独疗法相比,Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1疗法的功效得到增强。到第16天,用(PBS)、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1和Ad-IL24治疗的组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。相比之下,与单独的非Ad-IL24疗法或Ad-IL24治疗中的任一者相比,使用Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1的组合治疗诱导肿瘤体积的显著减小。在第16天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(p值＜0.0001)。与Ad-IL24(p＝0.0025)或CD122/132+抗PD-1治疗(p值＜0.0001)相比,Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治疗的肿瘤体积存在统计学上显著的减小。

[0052] 图13:Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1功效:延长的生存期。用PBS、CD122/132+抗PD-1、Ad-IL24或组合Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治疗的小鼠的卡普兰-梅尔生存曲线。通过对数秩检验,这些生存曲线存在统计学上显著的差异(p＜0.0001)。结果证明了Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1疗法的出乎意料的实质性协同。Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1疗法组的中位生存期得到了协同地提高。PBS、CD122/132+抗PD-1和IL24治疗组中的所有动物均在第16天死亡,而Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1疗法组中的动物中的50％在第19天存活着。与单独的Ad-IL24(p＝0.0003)或CD122/132+抗PD-1治疗组(p＜0.0001)相比,Ad-IL24+CD122/132+抗PD1疗法组显示出统计学上显著延长的生存期。有趣的是,与CD122/132+抗PD-1双联体相比,Ad-IL24+CD122/132双联体具有惊人的优越功效(通过对数秩检验所得的p＝0.0002,数据未示出)。

[0053] 图14:Ad-荧光素酶(Ad-Luc)阴性对照+CD122/132激动剂+抗PD-1功效:肿瘤体积。示出接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、Ad-Luc对照、或组合Ad-Luc对照+CD122/132、Ad-Luc对照+抗PD-1和Ad-Luc对照+CD122/132+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的原发性肿瘤体积的图式。与使用Ad-p53、VirRx007和Ad-IL24的治疗相比,当Ad-Luc与抗PD-1、CD122/132或CD122/132+抗PD-1治疗组合时,治疗功效没有显著的增加。到第16天,所有组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。在第16天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较不是统计学上显著的(p值＝0.1212;任何治疗组之间的平均肿瘤体积均不是统计学上显著的)。

[0054] 图15:与Ad-Luc对照+CD122/132+抗PD-1相比,Ad-p53、VirRx007和Ad-IL24分别与CD122/132+抗PD-1组合的“三联疗法”延长了生存期。用CD122/132+抗PD-1与Ad-p53、VirRx007、Ad-IL24或Ad-Luc对照组合治疗的小鼠的卡普兰-梅尔生存曲线。通过对数秩检验,这些生存曲线存在统计学上显著的差异(p＜0.0001)。与Ad-Luc+CD122/132+抗PD-1三联疗法对照(通过对数秩检验,Ad-p53和VirRx007与CD122/132+抗PD-1三联疗法的组合两者的p值均＜0.0001;Ad-IL24与CD122/132+抗PD-1的组合的p＜0.015)相比,Ad-p53、VirRx007和Ad-IL24中的每一者与CD122/132+抗PD-1组合的三联疗法均显示出统计学上显著延长的生存期。

[0055] 图16:Ad-p53+CD122/132(IL15)激动剂+抗PD-1功效:肿瘤体积。与肿瘤抑制因子疗法结合的优先CD122/CD132激动剂为由重组IL15和IL-15-Rα-Fc组成的免疫复合物。示出接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132+抗PD-1、单独Ad-p53或组合Ad-p53+CD122/132

(IL15)+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的原发性肿瘤体积的图式。在PBS、CD122/132+抗PD-1和Ad-p53疗法期间存在严重的肿瘤进展。与上述较早的Ad-p53组合治疗结果相一致,与所述疗法中的任一疗法相比,Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗的功效显著提高。到第30天,用PBS、CD122/132+抗PD-1和Ad-p53治疗的组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。相比之下,使用Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1的组合治疗诱导肿瘤体积的大幅减小。对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(总体p值＜0.0001,并且与每个其他治疗组相比,单独p值＜0.0001)。

[0056] 图17:Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1对于对侧肿瘤生长的全身/远位治疗效应。与肿瘤抑制因子疗法结合的优先CD122/CD132激动剂为由重组IL15和IL-15-Rα-Fc组成的免疫复合物。在啮齿动物中评定原发性肿瘤治疗对于对侧植入肿瘤的全身/远位效应,所述啮齿动物的原发性肿瘤已经接受了Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1。与图16所示的Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗对原发性肿瘤生长的出乎意料的、显著增强的协同效应相一致,我们还观察到Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗与其他Ad-p53治疗组相比惊人地强大并且有统计学上显著的远位效应。图17描绘了示出接受使用组合Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1或Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1的原发性肿瘤治疗的啮齿动物随时间推移的对侧肿瘤体积的图式。在第22天对这些对侧肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(总体p值＝0.0433)。与Ad-p53+抗PD-1组相比,仅Ad-p53+CD122/132+抗PD-1组显示出对侧肿瘤生长的统计学上显著的降低(p值＝0.0359)。综上所述,这些发现表明,在所有Ad-p53疗法中,只有三联组合Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗通过诱导介导实质性远位效应的强大局部和全身性抗肿瘤免疫力而产生了治愈功效。

[0057] 图18:Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1功效:延长的生存期。与肿瘤抑制因子疗法结合的优先CD122/CD132激动剂为由重组IL15和IL-15-Rα-Fc组成的免疫复合物。用PBS、CD122/132+抗PD-1、Ad-Luc+CD122/132+抗PD-1对照、Ad-p53或组合Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗的小鼠的卡普兰-梅尔生存曲线在图18中示出。通过对数秩检验,这些生存曲线存在统计学上显著的差异(总体p＜0.0001;比较Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的p值＜0.0001)。结果还证明了Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1疗法的出乎意料的实质性协同。在Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1疗法组中,动物中的50％在第36天存活着。与之形成鲜明对比的是,其他治疗组中的所有动物均在第22天时死亡,并且具有在10天至18天之间的范围内的中位生存期。

具体实施方式

[0058] 众所周知的是,肿瘤在其起始和进展期间进化,以逃避免疫系统的破坏。尽管最近使用免疫检查点抑制剂来逆转这种抗药性已显示出一定的成功,但是大多数患者对这些治疗无应答。因此,在某些实施例中,本公开的方法和组合物用于改变肿瘤的微环境以克服抗药性并增强抗肿瘤免疫应答。在一个实施例中,提供了一种通过表达p53和/或MDA-7与至少一种CD122和CD132激动剂的组合来治疗癌症的方法。具体地,将肿瘤抑制基因作为无复制能力的腺病毒施用。在一种方法中,将p53和/或MDA7基因疗法与CD122/CD132激动剂组合施用。CD122/CD132激动剂可以是IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-

15/IL-15受体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化IL-2、聚乙二醇化IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白。CD122/CD132激动剂可以是与IL-15受体α/IgG1 Fc融合蛋白(诸如ALT-803)结合的IL-15突变体(例如,IL-15N72D)(Rhode等人,2016)。

[0059] 另外,发明人已经确定,在施用p53和/或MDA-7基因疗法与优先的CD122/CD132激动剂的组合之前、期间或之后,施用附加疗法(诸如免疫检查点抑制剂,如抗PD1抗体)增强了抗肿瘤免疫力。

[0060] 此外,发明人还已确定,施用附加疗法以降解肿瘤细胞的细胞外基质可增强组合疗法的肿瘤渗透性。具体地,在组合疗法之前施用细胞外基质降解疗法。在一种方法中,细胞外基质降解疗法为松弛素基因疗法,诸如腺病毒松弛素。具体地,瘤内地或动脉内地施用腺病毒松弛素。

[0061] 此外,治疗方法可包括附加抗癌疗法,诸如细胞因子或化学疗法,以增强本文所提供的组合疗法的抗肿瘤效应。例如,细胞因子可以是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),并且化学疗法可以是5-氟尿嘧啶(5FU)或卡培他滨或环磷酰胺或PI3K抑制剂。

[0062] I.定义

[0063] 如本文所用,就特定组分而言,“基本上不含”在本文中用于指没有将特定组分故意配制到组合物中和/或特定组分仅作为污染物或以痕量存在。因此,由组合物的任何意外污染而产生的特定组分的总量远低于0.05%,优选地低于0.01%。最优选的是使用标准分析方法无法在其中检测出特定组分的量的组合物。

[0064] 如本说明书中所使用的,“一”或“一个(种)”可以表示一个(种)或多个(种)。如本文在权利要求中所使用的,当与字词“包括”结合使用时,字词“一”或“一个(种)”可以表示一个(种)或多于一个(种)。

[0065] 除非明确指出仅指代替代方案或替代方案是互斥的,否则权利要求中的术语“或”的使用是指“和/或”,尽管本公开内容支持仅涉及替代方案及“和/或”的定义。如本文所用,“另一”可以表示至少第二或更多者。

[0066] 在整个本申请中,术语“约”用于表示值包括用于确定该值的设备、方法的固有误差变化或研究对象之间存在的变化。

[0067] 如本文所用,“野生型”是指在生物的基因组中的遗传基因座处的核酸的天然存在的序列,以及从这种核酸转录或翻译的序列。因此,术语“野生型”也可以指由所述核酸编码的氨基酸序列。由于遗传基因座在个体群体中可能具有多于一个序列或等位基因,因此术语“野生型”涵盖所有此类天然存在的等位基因。如本文所用,术语“多态性”是指在群体的个体的遗传基因座处存在变异(即,存在两个或更多个等位基因)。如本文所用,“突变体”是指由于重组DNA技术而导致的核酸或其编码的蛋白质、多肽或肽的序列变化。

[0068] 当与细胞或生物体中的蛋白质、基因、核酸或多核苷酸相关而使用时,术语“外源”是指已经通过人工或自然手段引入细胞或生物体中的蛋白质、基因、核酸或多核苷酸;或当与细胞相关而使用时,该术语是指被分离并随后通过人工或自然手段引至其他细胞或生物体的细胞。外源核酸可以来自不同的生物体或细胞,或者其可以是生物体或细胞中天然存在的核酸的一个或多个附加拷贝。外源细胞可来自不同生物,或者其可来自同一生物。作为非限制性示例,外源核酸是处于与其在天然细胞中的染色体位置不同的染色体位置的核

酸,或是侧接有不同于自然中发现的核酸序列的核酸。

[0069] “表达构建体”或“表达盒”是指能够指导转录的核酸分子。表达构建体至少包括指导一种或多种所需细胞类型、组织或器官中的基因表达的一个或多个转录控制元件(诸如启动子、增强子或其功能等同物)。也可以包括附加元件,诸如转录终止信号。

[0070] “载体”或“构建体”(有时称为基因递送系统或基因转移“媒介物”)是指包含要体外或体内递送至宿主细胞的多核苷酸的大分子或分子复合物。

[0071] 载体的常见类型“质粒”是与染色体DNA分离的染色体外DNA分子,其能够独立于染色体DNA复制。在某些情况下,它是圆形和双链的。

[0072] “复制的起点”(“ori”)或“复制起点”是例如在嗜淋巴疱疹病毒中的DNA序列,该DNA序列当存在于细胞中的质粒中时能够保持连接的序列在质粒中和/或DNA合成起始处或附近的位点。例如,EBV的ori包括FR序列(30bp重复序列的20个不完美拷贝),优选地DS序列;然而,EBV中的其他位点结合EBNA-1,例如,Rep*序列可以代替DS作为复制的起点(Kirshmaier和Sugden,1998)。因此,EBV的复制起点包括FR、DS或Rep*序列,或通过核酸修饰获得的任何功能上等同的序列,或从它们衍生的合成组合。例如,本发明还可以使用EBV的经遗传工程改造(例如通过单个元件的插入或突变)的复制起点,如在Lindner等人,2008中所特别描述的。

[0073] “编码”具体蛋白质的“基因”、“多核苷酸”、“编码区”、“序列”、“区段”、“片段”或“转基因”是当置于适当调控序列的控制下时被体外或体内地转录并可选地还翻译成基因产物(例如,多肽)的核酸分子。编码区可以以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时,核酸分子可以是单链的(即,有义链)或双链的。编码区的边界由5’(氨基)末端处的起始密码子和3′(羧基)末端处的翻译终止密码子确定。基因可包括但不限于来自原核或真核mRNA的cDNA,来自原核或真核DNA的基因组DNA序列,以及合成DNA序列。转录终止序列将通常位于所述基因序列的3’端。

[0074] 术语“控制元件”共同地指共同提供用于编码序列在受体细胞中的复制、转录、转录后加工和翻译的启动子区域、聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调控结构域、复制的起点、内部核糖体进入位点(IRES)、增强子、剪接点等。只要选定的编码序列能够在适当的宿主细胞中复制、转录和翻译,就不需要存在全部这些控制元件。

[0075] 术语“启动子”在本文中以其普通含义使用以指代包含DNA调控序列的核苷酸区域,其中所述调控序列源自能够结合RNA聚合酶并启动下游(3’方向)编码序列的转录的基因。它可含有调控蛋白和分子可在该处结合的遗传元件,诸如RNA聚合酶和其他转录因子,以启动核酸序列的特异性转录。短语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“在...控制下”和“在转录控制之下”是指启动子处于与核酸序列有关的正确功能位置和/或取向,以控制转录起始和/或该序列的表达。

[0076] “增强子”是指这样的核酸序列,该核酸序列当位于启动子附近时,相对于在不存在增强子结构域的情况下由启动子产生的转录活性,赋予增加的转录活性。

[0077] 关于核酸分子的“可操作地连接”或“共表达”是指两个或更多个核酸分子(例如,待转录的核酸分子、启动子和增强子元件)以允许所述核酸分子转录的方式连接。关于肽和/或多肽分子的“可操作地连接”或“共表达”是指两种或更多种肽和/或多肽分子以产生具有融合的每种肽和/或多肽部件的至少一种特性的单一多肽链(即,融合多肽)的方式连

接。融合多肽优选地为嵌合的,即由异源分子组成。

[0078] “同源性”是指两个多核苷酸或两个多肽之间的同一性百分比。一个序列与另一序列之间的对应可以通过本领域已知的技术来确定。例如,可以通过以下方式来确定同源性:通过比对序列信息并使用容易获得的计算机程序,直接比较两个多肽分子之间的序列信息。或者,可以通过以下方式来确定同源性:在促进同源区域之间形成稳定双链体的条件下使多核苷酸杂交,然后用一种或多种单链特异性核酸酶进行消化,并确定经消化的片段的大小。当如使用上述方法所确定的,至少约80%,优选地至少约90%,最优选地至少约95%的核苷酸或氨基酸分别在限定长度的分子上匹配时,两个DNA或两个多肽的序列是彼此“基本上同源的”。

[0079] 术语“核酸”通常是指DNA、RNA或其衍生物或模拟物的至少一个分子或链,所述至少一个分子或链包含至少一个核碱基,诸如DNA中发现的天然存在的嘌呤或嘧啶碱基(例如,腺嘌呤“A”、鸟嘌呤“G”、胸腺嘧啶“T”和胞嘧啶“C”)或RNA中发现的天然存在的嘌呤或嘧啶碱基(例如A、G、尿嘧啶“U”和C)。术语“核酸”涵盖术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”。术语“寡核苷酸”是指至少一种长度介于约3个核碱基与约100个核碱基之间的分子。术语“多核苷酸”是指至少一种长度大于约100个核碱基的分子。这些定义通常是指至少一个单链分子,但是在特定的实施例中,还将涵盖与该至少一个单链分子部分、基本上或完全互补的至少一条附加链。因此,核酸可涵盖至少一个双链分子或至少一个三链分子,该至少一个双链分子或至少一个三链分子包含构成该分子的链的特定序列的一条或多条互补链或“补体”。

[0080] 贯穿本申请使用的术语“治疗益处”是指就癌症医学治疗而言促进或增强患者的健康的任何事物。治疗益处的非穷举性示例的列表包括在任何时间段内延长患者的寿命;减少或延迟疾病的肿瘤发展;减少过度增殖;减少肿瘤生长;延迟转移;降低癌细胞或肿瘤细胞的增殖率;在任何经治疗的细胞或受经治疗的细胞影响的任何细胞中诱导凋亡;以及减轻患者的可归因于该患者的病症的疼痛。

[0081] “有效量”至少是实现特定疾患的可测量改善或预防所需的最小量。本文的有效量可以根据诸如患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引起所需应答的能力的因素而变化。有效量也是治疗有益效应超过治疗的任何毒性或有害效应的量。对于预防性用途,有益或期望的结果包括诸如以下的结果:消除或降低风险、减轻严重程度,或延迟疾病发作,所述疾病发作包括所述疾病的生化、组织学和/或行为症状、其并发症和在所述疾病发展期间呈递的中间病理表型。对于治疗用途,有益或期望的结果包括诸如以下的临床结果:减少由疾病引起的一种或多种症状、提高罹患疾病者的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药物的剂量、增强另一种药物的效应(诸如通过靶向)、延迟疾病进展,和/或延长生存期。在癌症或肿瘤的情况下,有效量的药物可具有以下效应:减少癌细胞数量;减小肿瘤大小;抑制(即,在一定程度上减慢或理想地停止)癌细胞浸润到周围器官中;抑制(即,在一定程度上减慢并理想地停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减轻与疾患相关的症状中的一种或多种症状。可按一次或多次施用来施用有效量。出于本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接或间接完成预防或治疗性治疗的量。如在临床情境中所理解的,药物、化合物或药物组合物的有效量可以与或可以不与另一种药物、化合物或药物组合物结合实现。因此,“有效量”可以考虑处于施用一种或多种治疗剂的情境下,并且如果单一药剂与一种或多种其他药剂结合时可以得到或实现期望

的结果,则可以认为所述单一药剂被以有效量给予。

[0082] 如本文所用,“载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶体等。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域中众所周知的。除非任何常规介质或药剂与活性成分不相容,否则考虑将其用于治疗组合物中。也可以将补充活性成分掺入组合物中。

[0083] 术语“药物制剂”是指这样的制备物,该制备物所处的形式使得允许活性成分的生物活性有效,并且其不含对所述制剂将施用于的受试者有不可接受的毒性的附加组分。此类制剂是无菌的。“药学上可接受的”辅料(媒介物、添加剂)是可以合理地施用于受试哺乳动物以提供有效剂量的所用活性成分的那些辅料。

[0084] 如本文所用,术语“治疗”是指经设计用于在临床病理过程期间改变被治疗的个体或细胞的自然过程的临床干预。期望的治疗效应包括降低疾病进展速率、改善或减轻疾病状态,以及消退或改善预后。例如,如果减轻或消除了与癌症有关的一种或多种症状,包括但不限于减少癌细胞的增殖(或破坏癌细胞)、减少由该疾病引起的症状、提高罹患该疾病者的生活质量、减少治疗该疾病所需的其他药物的剂量和/或延长个体的生存期,则个体被成功地“治疗”。

[0085] “抗癌”剂能够例如通过以下方式来负面影响受试者体内的癌细胞/肿瘤:促进对癌细胞的杀伤、诱导癌细胞的凋亡、降低癌细胞的生长速率、降低发病率或转移数量、减小肿瘤大小、抑制肿瘤生长、减少对肿瘤或癌细胞的血液供应、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫应答、预防或抑制癌症的进展,或延长患有癌症的受试者的寿命。

[0086] 本文中术语“抗体”以最广义的意义使用,并且特别地涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的生物活性即可。

[0087] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体的群体中获得的抗体,例如,构成该群体的各个抗体除了可能少量存在的可能突变(例如,天然存在的突变)之外是相同的。因此,修饰语“单克隆”表明抗体的特性不是分立抗体的混合物。在某些实施例中,此类单克隆抗体通常包括包含结合靶标的多肽序列的抗体,其中结合靶标的多肽序列是通过包括从多个多肽序列中选择单个结合靶标的多肽序列的方法获得的。例如,选择方法可以是从多个克隆(例如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的池)中选择独特的克隆。应当理解的是,所选择的结合靶标的序列可经进一步改变,例如以提高对靶标的亲和力、以人源化结合靶标的序列、以提高其在细胞培养物中的生产、以降低其体内免疫原性、以创建多特异性抗体等,并且包含所述经改变的结合靶标的序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除其特异性外,单克隆抗体制备物的优势还在于它们通常不受其他免疫球蛋白的污染。

[0088] 术语“CD122/CD132激动剂”或“优选的CD122/CD132激动剂”是指优先与CD122/CD132受体复合物结合并且对IL-2α受体(CD25)或IL-15α受体具有较低亲和力结合的药剂。已知的优先的CD122/CD132激动剂包括IL2/抗IL2单克隆抗体免疫复合物(参见例如美国专利公布号US20170183403A1;该美国专利公布以引用方式整体合并于本文);与野生型IL-2相比具有经修饰的氨基酸序列的经遗传工程改造的IL-2突变蛋白(参见例如美国专利公布

号US 2017/0044229 A1;该美国专利公布以引用方式整体合并于本文);与野生型IL-2与抗IL2单克隆抗体免疫复合物的组合相比具有经修饰的氨基酸序列的经遗传工程改造的IL-2突变蛋白(参见例如国际专利公布号WO2014100014A1;该国际专利公布以引用方式整体合并于本文);IL-2的聚乙二醇化形式,诸如NKTR-214(参见例如Charych等人,2016;该文献的全部内容以引用方式合并于本文);IL-15/抗IL-15单克隆抗体免疫复合物;IL15/IL15受体α-IgG1-Fc(IL15/IL15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物(参见例如美国专利公布号US20060257361A1、EP2724728A1和Dubois等人,2008;这些文献均以引用方式合并于本文);与野生型IL-15与IL15Rα-IgG1-Fc免疫复合物的组合相比具有经修饰的氨基酸序列的经遗传工程改造的IL-15突变蛋白(参见例如美国专利公布号US20070160578;该美国专利公布以引用方式整体合并于本文);或者具有优先的与CD122/CD132的结合的IL-15的聚乙二醇化形式。

[0089] 术语"免疫检查点"是指免疫系统中的分子(诸如蛋白质),所述分子向免疫系统的部件提供抑制信号以平衡免疫反应。已知的免疫检查点蛋白包括CTLA-4、PD-1及其配体PD-L1和PD-L2,以及LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR。在本领域中,涉及LAG3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3和KIR的途径被认为构成类似于CTLA-4和PD-1依赖性途径的免疫检查点途径(参见例如Pardoll,2012.Nature Rev Cancer 12:252-264;Mellman等人,2011.Nature 480:480-489)。

[0090] 术语"PD-1轴结合拮抗剂"是指这样的分子,所述分子抑制PD-1轴结合配偶体与其结合配偶体中的一种或多种结合配偶体的相互作用,从而去除由PD-1信号传导轴上的信号传导引起的T细胞功能障碍-结果是恢复或增强T细胞功能(例如,增殖、细胞因子产生、靶细胞杀伤)。如本文所用,PD-1轴结合拮抗剂可包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂或PD-L2结合拮抗剂。

[0091] 术语"PD-1结合拮抗剂"是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与其结合配偶体中的一种或多种结合配偶体(诸如PD-L1和/或PD-L2)的相互作用导致的信号转导的分子。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其结合配偶体中的一种或多种结合配偶体结合的分子。在一个具体方面,PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。例如,PD-1结合拮抗剂包括抗PD-1抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽,以及其他减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2的相互作用导致的信号转导的分子。在一个实施例中,PD-1结合拮抗剂减少了由或通过经由PD-1在T淋巴细胞介导的信号传导时表达的细胞表面蛋白介导的负性共刺激信号,从而使功能障碍的T细胞的功能障碍较少(例如,增强对抗原识别的效应子应答)。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为抗PD-1抗体。在一个特定方面,PD-1结合拮抗剂为MDX-1106(纳武单抗)。在另一个特定方面,PD-1结合拮抗剂为MK-3475(派姆单抗)。在另一个特定方面,PD-1结合拮抗剂为CT-011(匹利珠单抗)。在另一个特定方面,PD-1结合拮抗剂为AMP-224。

[0092] 术语"PD-L1结合拮抗剂"是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其结合配偶体中的一种或多种结合配偶体(诸如PD-1或B7-1)的相互作用导致的信号转导的分子。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂是抑制PD-L1与其结合配偶体结合的分子。在一个特定方面,PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和/或B7-1的结合。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂包括抗PD-L1抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽,以及其他减少、阻断、抑

制、消除或干扰由PD-L1与其结合配偶体中的一种或多种结合配偶体(诸如PD-1或B7-1)的相互作用导致的信号转导的分子。在一个实施例中,PD-L1结合拮抗剂减少了由或通过经由PD-L1在T淋巴细胞介导的信号传导时表达的细胞表面蛋白介导的负性共刺激信号,从而使功能障碍的T细胞的功能障碍较少(例如,增强对抗原识别的效应子应答)。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂为抗PD-L1抗体。在一个特定方面,抗PD-L1抗体为YW243.55.S70。在另一个特定方面,抗PD-L1抗体为MDX-1105。在另一个特定方面,抗PD-L1抗体为MPDL3280A。在另一个特定方面,抗PD-L1抗体为MEDI4736。

[0093] 术语“PD-L2结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其结合配偶体中的一种或多种结合配偶体(诸如PD-1)的相互作用导致的信号转导的分子。在一些实施例中,PD-L2结合拮抗剂是抑制PD-L2与其结合配偶体中的一个或多个结合配偶体结合的分子。在一个特定方面,PD-L2结合拮抗剂抑制PD-L2与PD-1的结合。在一些实施例中,PD-L2拮抗剂包括抗PD-L2抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽,以及其他减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其结合配偶体中的一种或多种结合配偶体(诸如PD-1)的相互作用导致的信号转导的分子。在一个实施例中,PD-L2结合拮抗剂减少了由或通过经由PD-L2在T淋巴细胞介导的信号传导时表达的细胞表面蛋白介导的负性共刺激信号,从而使功能障碍的T细胞的功能障碍较少(例如,增强对抗原识别的效应子应答)。在一些实施例中,PD-L2结合拮抗剂为免疫粘附素。

[0094] “免疫检查点抑制剂”是指抑制免疫检查点蛋白的功能的任何化合物。抑制包括功能降低和完全阻断。具体地,免疫检查点蛋白为人免疫检查点蛋白。因此,免疫检查点蛋白抑制剂特别地为人免疫检查点蛋白的抑制剂。

[0095] “细胞外基质降解性蛋白”或“细胞外基质降解蛋白”是指任何作用于细胞基质完整性,特别是对所述基质的成分中的至少一种成分或对结合这些各种成分的键施加全部或部分降解或去稳定作用的蛋白质。

[0096] “远位效应”在本文中是指在肿瘤的局部治疗范围之外的肿瘤缩小。例如,使用p53和/或IL-24的局部治疗与使用免疫检查点疗法的全身治疗的组合可引起在远端未治疗肿瘤处的远位效应。

[0097] II.肿瘤抑制因子

[0098] 在一些实施例中,向受试者施用肿瘤抑制因子疗法,诸如p53和/或MDA-7疗法。可以通过本领域已知的各种方法提供编码p53和/或MDA-7的核酸。

[0099] 在一些方面,p53和MDA-7肿瘤抑制因子疗法结合了核酸变体以增加其活性。在某些方面,变异肿瘤抑制核酸为抗负性调控的p53变体(Yun等人,2012;该文献以引用方式整体合并于本文)。

[0100] A.p53

[0101] 在某些实施例中,本公开提供了用于治疗癌症的组合疗法。本文所提供的组合疗法中的一些组合疗法包括p53基因疗法,其包括向受试者施用野生型p53基因。在许多细胞类型中,野生型p53被认为是重要的生长调节剂。p53基因编码375个氨基酸的磷蛋白,所述磷蛋白可以与宿主蛋白(诸如大T抗原和E1B)形成复合物。该蛋白质存在于正常组织和细胞中,但处于与转化细胞或肿瘤组织相比很小的浓度下。

[0102] 错义突变是p53基因的常见突变,并且对于致癌基因的转化能力至关重要。由点突

变引起的单一遗传变化可产生致癌的p53。然而,与其他致癌基因不同,已知p53点突变在至少30个不同的密码子中发生,从而通常产生显性等位基因,所述显性等位基因在不降低纯合性的情况下产生细胞表型偏移。另外,这些显性阴性等位基因中的许多似乎是在生物体中被耐受并且在种系中传递的。各种突变等位基因似乎是在从最小功能障碍至强烈外显的显性阴性等位基因的范围中(Weinberg,1991)。已经在许多通过化学致癌、紫外辐射和几种病毒转化的细胞中发现了高水平的突变p53。

[0103] 在一些方面,采用p53生物标志物来选择患者进行p53治疗。在具体方面,通过免疫组织化学法,通过野生型p53基因配置或＜20％的p53阳性细胞来定义有利的肿瘤p53生物标志物谱(美国专利号9,746,471和Nemunaitis等人,2009;两者均以引用方式整体并入)。

[0104] R.MDA-7

[0105] 本文所提供的组合疗法还可另外包括MDA-7基因疗法,所述MDA-7基因疗法包括施用全长或截短的MDA-7基因。mda-7基因的蛋白质产物白介素(IL)-24是属于IL-10细胞因子家族的细胞因子并且也是肿瘤抑制因子。Jiang等人,1995(WO1995011986)已描述了编码MDA-7蛋白的cDNA。MDA-7 cDNA编码预测大小为23.8kDa的具有206个氨基酸的进化保守蛋白。

[0106] 本文所提供的编码MDA-7的核酸可编码全长或截短的人IL-24蛋白或多肽。MDA-7的截短版本将包含全长序列的连续氨基酸区域的一个或多个部分,而将不含有整个序列。截短版本可以在多肽中的任何位点处被任何数量的连续氨基酸截短。例如,MDA-7的截短版本可编码人野生型MDA-7的约49至约206位;约75至约206位;约100至约206位;约125至约206位;约150至约206位;约175至约206位;或约182至约206位的氨基酸。还设想含有人野生型MDA-7的至少约85％、90％和95％的MDA-7多肽在本发明的范围内。

[0107] C.其他肿瘤抑制因子

[0108] 在本公开中可以利用附加肿瘤抑制因子。掺入了其他肿瘤抑制基因的用于本公开的基因疗法载体包括但不限于表1中列出的那些。

[0109] 表1:肿瘤抑制基因

[0110]

肿瘤抑制因子	功能	癌症	参考文献
APC	控制参与包括上皮细胞和淋巴样细胞在内的一些细胞类型的肿瘤发生、发育和内稳态的特定转录因子的功能。 APC 还涉及细胞增殖和其他细胞活动（诸如迁移和粘附）。	家族性腺瘤和非遗传的结直肠癌	Aoki 等人，2007
BRCA1、BRCA2	DNA 损伤修复	遗传性乳腺癌；卵巢癌	Greenburg 等人，2008

[0111]

CDKN2A	编码肿瘤抑制因子 p16 和 p14ARF 的基因座。	脑肿瘤	Hashemi 等人，2002
DCC	Netrin-1 受体。调控肠上皮细胞的细胞增殖和凋亡。	结直肠癌	Pierceall 等人，1994
DPC4 (SMAD4)	发育所涉及的转录因子；涉及转移和肿瘤侵袭性。	结直肠肿瘤、胰腺肿瘤	Yachida 等人，2009
MADR2/JV18 (SMAD2)	介导来自生长因子受体的信号传导。协助将 SMAD4 转运进入细胞核。	结直肠癌	Heldin 等人，2009
MEN1	与转录因子、DNA 修复蛋白、细胞骨架蛋白等相互作用的 menin 蛋白的编码。功能未明确限定。	1 型多发性内分泌腺瘤	Starker 等人，2009
MTS1	细胞周期蛋白依赖性激酶的抑制剂；调控细胞周期从 G1 期传代进入 S 期。	黑素瘤	Rocco 等人，2001
NF1	RAS GTP 酶激活蛋白 (RAS-GAP)	1 型神经纤维瘤病	Johannessen 等人，2005
NF2	ERM 蛋白；通过装配蛋白质复合物并将它们与肌动蛋白连接来组织质膜。	2 型神经纤维瘤病	Gladden 等人，2010

[0112]

p53、p63、p73	编码 p21 的转录因子，p21 是一种可使细胞周期 G1 期停滞的蛋白质。p53 整合了与细胞大小、DNA 完整性和染色体复制有关的信号。	膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、肝癌、肺癌、前列腺癌和卵巢癌；脑肿瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病	Giono 等人，2006
PTEN	脂质磷酸酶。调控细胞存活	考登综合征；增加了乳腺癌和甲状腺癌的风险	Backman 等人，2002
Rb	结合并抑制 E2F 转录因子。使细胞周期进程停止	视网膜母细胞瘤、肉瘤；膀胱癌、乳腺癌、食道癌、前列腺癌和肺癌	Yamasaki，2003
VHL	细胞周期调控。可能增加 p53 的稳定性和活性	肾细胞癌	Kaelin 等人，2002
WRN	DNA 解旋酶和核酸外切酶。参与 DNA 断裂的修复。	沃纳综合征	Bernstein 等人，2002
WT1	转录因子。在发育中起重要作用。	威尔姆斯肿瘤（小儿肾癌）	

[0113] III.细胞外基质降解

[0114] 本文还提供了增强肿瘤抑制基因疗法和/或免疫检查点抑制剂的抗肿瘤效应的方法。在一个方面,通过降解肿瘤细胞的细胞外基质(ECM)或其组分的蛋白质或药剂来增强基因疗法的递送(例如,病毒分布)和肿瘤渗透。

[0115] 细胞外基质(ECM)为细胞分泌的细胞外分子的集合,其为周围细胞提供结构和生化支持。由于多细胞性在不同的多细胞谱系中独立进化,因此ECM的组成在多细胞结构之间有所不同;然而,细胞粘附、细胞与细胞通信和分化是ECM的常见功能。细胞外基质降解性蛋白可能靶向的ECM组分包括胶原蛋白、弹性蛋白、透明质酸、纤连蛋白和层粘连蛋白。

[0116] A.松弛素

[0117] 可以在本文提供的方法中使用的一种细胞外基质降解蛋白为松弛素。松弛素是6kDa的肽激素,其在结构上与胰岛素和类胰岛素生长因子有关。它主要在黄体和子宫内膜中产生,并且在怀孕期间其血清水平大大增加(Sherwood等人,1984)。松弛素是当胶原蛋白过表达时的有效胶原蛋白表达抑制剂,但是与其他胶原蛋白相比,其不会显著地改变胶原蛋白表达的基础水平。它促进各种MMP(诸如MMP2、MMP3和MMP9)的表达以降解胶原蛋白,以便结缔组织和基底膜被降解而引起产道的细胞外基质的破坏。除此之外,在肺、心脏、皮肤、

肠、乳腺、血管和精管中还观察到松弛素促进MMP 1和MMP 3表达,其中松弛素起着防止胶原蛋白过表达的抑制剂的作用(Qin,X.等人,1997a;Qin,X.等人,1997b)。

[0118] 施用松弛素蛋白或编码所述松弛素蛋白的核酸可诱导肿瘤细胞周围的细胞外基质的主要组分胶原蛋白的降解,以破坏结缔组织和基底膜,从而引起细胞外基质的降解。具体地,当施用于被结缔组织紧密封闭的肿瘤组织时,肿瘤抑制基因疗法与松弛素的组合施用显示出改善的抗肿瘤功效。

[0119] 松弛素蛋白可以是全长松弛素或松弛素分子的保留生物活性的部分,如在美国专利号5,023,321中所述。具体地,松弛素为重组人松弛素(H2)或具有松弛素样活性的其他活性剂,诸如竞争性地从受体上置换结合的松弛素的药剂。松弛素可以通过本领域技术人员已知的任何方法,优选地如美国专利号4,835,251中所述进行制备。松弛素类似物或其衍生物描述于US5811395中,并且肽合成描述于美国专利公布号US20110039778中。

[0120] Kim等人(2006)描述了可用于本文所提供的方法中的示例性腺病毒松弛素。简而言之,通过将松弛素基因插入E3腺病毒区域来产生表达松弛素的、有复制能力的(Ad-ΔE1B-RLX)腺病毒。

[0121] B.透明质酸酶

[0122] 在一些实施例中,可以施用能够水解通常存在于细胞外基质中的多糖(诸如透明质酸)的任何物质。具体地,本发明中所使用的细胞外基质降解蛋白可以是透明质酸酶。透明质酸(Hyaluronan/hyaluronic acid)是脊椎动物细胞外基质的普遍成分。这种基于葡糖醛酸和葡糖胺的直链多糖[D-葡糖醛酸1-β-3)N-乙酰基-D-葡糖胺(1-b-4)]能够借助于其形成非常粘稠的溶液的特性来对基质的理化特性发挥影响。透明质酸还与位于细胞表面上的各种受体和结合蛋白相互作用。所述相互作用涉及大量生物过程,诸如受精、胚胎发育、细胞迁移和分化、创伤愈合、炎症、肿瘤生长和转移灶的形成。

[0123] 透明质酸被透明质酸酶水解,并且其水解使得细胞外基质解体。因此,设想具有透明质酸酶活性的任何物质都适合用于本发明的方法中,诸如如在Kreil(Protein Sci.,1995,4:1666-1669)中所述的透明质酸酶。透明质酸酶可以是来源于哺乳动物、爬虫类或膜翅目粘肮酶的透明质酸酶;来源于来自水蛭唾液腺的粘肮酶的透明质酸酶;或来源于细菌,特别是链球菌、肺炎球菌和梭菌的透明质酸裂解酶的透明质酸酶。透明质酸酶的酶活性可以通过常规技术,诸如在Hynes和Ferretti(Methods Enzymol.,1994,235:606-616)或Bailey和Levine(J.Pharm.Biomed.Anal.,1993,11:285-292)中描述的那些常规技术来评定。

[0124] C.核心蛋白聚糖

[0125] 核心蛋白聚糖(Decorin)是一种富含亮氨酸的小蛋白聚糖,是细胞外基质的普遍成分,并且被优先发现与胶原蛋白原纤维缔合。核心蛋白聚糖与胶原原纤维结合并延迟各个三螺旋胶原蛋白分子的侧向装配,从而使得原纤维直径减小。此外,核心蛋白聚糖可调控细胞外基质组分(诸如纤连蛋白和血小板反应蛋白)与细胞的相互作用。此外,核心蛋白聚糖能够通过诱导基质金属蛋白酶胶原酶来影响细胞外基质重塑。这些观察结果表明,核心蛋白聚糖在几个水平上调控细胞外基质的产生和装配,因此在重构结缔组织中具有重要作用,如由Choi等人(Gene Therapy,17:190-201,2010)和通过Xu等人(Gene Therapy,22(3):31-40,2015)所描述。

[0126] 可用于本文提供的方法中的示例性腺病毒核心蛋白聚糖由Choi等人(Gene Therapy,17:190-201,2010)描述。简而言之,通过将核心蛋白聚糖基因插入E3腺病毒区域来产生表达核心蛋白聚糖的、有复制能力的(Ad-ΔE1B-DCNG)腺病毒。可用于本文提供的方法中的另一示例性腺病毒核心蛋白聚糖由Xu等人(Gene Therapy,22(3):31-40,2015)所描述。类似地,通过将核心蛋白聚糖基因插入E3腺病毒区域来产生表达核心蛋白聚糖的、有复制能力的(Ad.dcn)腺病毒。

[0127] IV.核酸

[0128] 核酸可以通过本领域普通技术人员已知的任何技术来制备。合成核酸,特别是合成寡核苷酸的非限制性示例包括使用诸如EP 266,032中所述的磷酸三酯、亚磷酸酯或亚磷酰胺化学物质和固相技术或经由如由Froehler等人,1986和美国专利序列号5,705,629所述的脱氧核苷H-膦酸酯中间体通过体外化学合成制备的核酸。酶促产生的核酸的非限制性示例包括通过酶在扩增反应诸如PCR™(参见例如美国专利4,683,202和美国专利4,682,195)或美国专利号5,645,897中所述的寡核苷酸的合成中产生的核酸。生物产生的核酸的非限制性示例包括在活细胞中进行的重组核酸产生,诸如在细菌中进行的重组DNA载体产生(参见例如Sambrook等人,1989)。

[0129] 该一种或多种核酸可以与其序列长度无关地与包括但不限于启动子、增强子、聚腺苷酸化信号、限制性酶切位点、多个克隆位点、编码区段等在内的其他核酸序列组合,以创建一种或多种核酸构建体。核酸构建体之间可有很大的总长度差异。因此,可以采用几乎任何长度的核酸区段,其中总长度优选地受易于在预期重组核酸方案中制备或使用所限制。

[0130] A.通过表达载体进行核酸递送

[0131] 本文提供的载体主要经设计用于在受调控的真核启动子(即,组成型、诱导型、可抑制型、组织特异性启动子)的控制下表达治疗性肿瘤抑制基因(例如,p53和/或MDA-7)和/或细胞外基质降解性基因(例如,松弛素)。在一些方面,p53和MDA-7可以在载体中共表达。在另一方面,p53和/或MDA-7可以与细胞外基质降解性基因共表达。同样,如果没有其他原因,则载体可含有选择性标记来促进其体外操纵。

[0132] 本领域技术人员应被良好装备来通过标准重组技术构建载体(参见例如Sambrook等人,2001和Ausubel等人,1996,这两篇文献均以引用方式合并于本文)。载体包括但不限于质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如,YAC),诸如逆转录病毒载体(例如,来源于莫洛尼氏鼠白血病病毒载体(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNV等)、慢病毒载体(例如来源于HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIV等)、腺病毒(Ad)载体(包括其有复制能力的形式、复制缺陷型形式和无病毒基因形式)、腺相关病毒(AAV)载体、猿猴病毒40(SV-40)载体、牛乳头瘤病毒载体、艾巴氏病毒载体、疱疹病毒载体、牛痘病毒载体、哈维鼠肉瘤病毒载体、鼠乳腺肿瘤病毒载体、劳斯肉瘤病毒载体。

[0133] 1.病毒载体

[0134] 在本发明的某些方面可以提供编码肿瘤抑制因子和/或细胞外基质降解性基因的病毒载体。在重组病毒载体生成中,通常将非必需基因用异源(或非天然)蛋白质的基因或编码序列替换。病毒载体是一种表达构建体,其利用病毒序列来将核酸和可能的蛋白质引入细胞中。某些病毒通过受体介导的内吞感染细胞或进入细胞,并整合进宿主细胞基因组

并且稳定且有效地表达病毒基因的能力,使它们成为将外来核酸转移到细胞(例如,哺乳动物细胞)中的有吸引力的候选物。下文描述了可用于递送本发明某些方面的核酸的病毒载体的非限制性示例。

[0135] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外,其还含有其他具有调控或结构功能的基因。慢病毒载体是本领域中众所周知的(参见例如,Naldini等人,1996;Zufferey等人,1997;Blomer等人,1997;美国专利6,013,516和5,994,136)。

[0136] 重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞,并且可用于体内和离体基因转移和核酸序列表达。例如,在美国专利5,994,136中描述了能够感染非分裂细胞的重组慢病毒,其中合适的宿主细胞被用两种或更多种携带包装功能的载体(即gag、pol和env以及rev和tat)转染,该专利以引用方式合并于本文。

[0137] a.腺病毒载体

[0138] 一种用于递送肿瘤抑制因子和/或细胞外基质降解性基因的方法涉及使用腺病毒表达载体。尽管已知腺病毒载体具有较低的整合入基因组DNA的能力,但是由这些载体提供的基因转移高效率抵消了该特征。腺病毒表达载体包括含有腺病毒序列的构建体,所述腺病毒序列足以(a)支持该构建体的包装和(b)最终表达已在其中克隆的重组基因构建体。

[0139] 腺病毒的生长和操纵是本领域技术人员已知的,并且表现出体外和体内的宽宿主范围。这组病毒可以高滴度,例如每ml 109-1011个噬菌斑形成单位而获得,并且它们具有很高的感染力。腺病毒的生命周期不需要整合到宿主细胞基因组中。腺病毒载体递送的外源基因是游离型的,因此具有对宿主细胞的低遗传毒性。在用野生型腺病毒进行疫苗接种的研究中尚未报道有任何副作用(Couch等人,1963;Top等人,1971),证明了它们作为体内基因转移载体的安全性和治疗潜力。

[0140] 对腺病毒的遗传组织,即一种36kb的线性双链DNA病毒的了解,允许用高达7kb的外源序列取代腺病毒DNA的大片段(Grunhaus和Horwitz,1992)。与逆转录病毒不同,宿主细胞的腺病毒感染不会导致染色体整合,因为腺病毒DNA可以在没有潜在的遗传毒性的情况下以游离方式复制。而且,腺病毒在结构上是稳定的,并且在广泛扩增后未检测到基因组重排。

[0141] 腺病毒由于其中等大小的基因组、易于操作、高滴度、宽靶细胞范围和高感染性而特别适合用作基因转移载体。病毒基因组的两端均含有100-200个碱基对的反向重复序列(ITR),所述ITR是病毒DNA复制和包装所必需的顺式元件。基因组的早期(E)和晚期(L)区域含有通过病毒DNA复制开始所分开的不同转录单位。E1区(E1A和E1B)编码负责调控病毒基因组和一些细胞基因的转录的蛋白质。E2区(E2A和E2B)的表达导致用于病毒DNA复制的蛋白质的合成。这些蛋白质参与DNA复制、晚期基因表达和宿主细胞关闭(Renan,1990)。晚期基因的产物,包括大多数病毒衣壳蛋白,仅在由主要晚期启动子(MLP)发出的单个初级转录物经过大量加工后才表达。MLP(位于16.8m.u.处)在感染后期期间特别有效,并且从此启动子发出的所有mRNA均具有5′-三联前导(TPL)序列,该序列使所述mRNA成为用于翻译的特定mRNA。

[0142] 本文提供的重组腺病毒可以通过穿梭载体与前病毒载体之间的同源重组产生。由于两种前病毒载体之间的可能重组,因此可以从该过程产生野生型腺病毒。因此,从单个噬

菌斑中分离出病毒的单个克隆,并检查所述克隆的基因组结构。

[0143] 腺病毒载体可以是有复制能力的、复制缺陷型的或条件缺陷型的,腺病毒载体的性质不被认为是对本发明的成功实践至关重要的。腺病毒可以是42种不同的已知血清型或亚组A-F中的任何一者。亚组C的5型腺病毒是特定的起始材料,以便获得用于本发明的条件复制缺陷型腺病毒载体。这是因为5型腺病毒是这样的人腺病毒,关于所述人腺病毒的大量生化和遗传信息是已知的,并且所述人腺病毒已经在历史上用于大多数采用腺病毒作为载体的构造中。

[0144] 可以将核酸作为已经去除了编码序列的位置引入腺病毒载体。例如,可以去除复制缺陷型腺病毒载体的E1编码序列。编码所关注基因的多核苷酸也可以如Karlsson等人(1986)所述代替缺失的E3区插入E3置换型载体中,或者插入E4区中,在所述E4区中辅助细胞系或辅助病毒补充E4缺陷。

[0145] 复制缺陷型腺病毒载体的产生和增殖可以用辅助细胞系执行。一种被命名为293的独特辅助细胞系是通过Ad5 DNA片段从人胚肾细胞转化的,并且组成性地表达E1蛋白(Graham等人,1977)。由于E3区是可从腺病毒基因组中分离出的(Jones和Shenk,1978),因此腺病毒载体在293细胞的帮助下在E1区、E3区或这两个区域中携带外源DNA(Graham和Prevec,1991)。

[0146] 辅助细胞系可以源自人类细胞,诸如人类胚肾细胞、肌细胞、造血细胞或其他人类胚胎间充质或上皮细胞。另选地,辅助细胞可以源自容许人类腺病毒的其他哺乳动物物种的细胞。此类细胞包括例如猴肾细胞或其他猴胚胎间充质或上皮细胞。如上所述,特定的辅助细胞系为293。

[0147] 用于生产重组腺病毒的方法是本领域中已知的,诸如美国专利号6740320,该美国专利以引用方式合并于本文。此外,Racher等人(1995)已经公开了用于培养293细胞和使腺病毒繁殖的改进方法。在一种形式中,通过将单个细胞接种到装有100-200ml培养基的1升硅化转瓶(Techne,Cambridge,UK)中来使天然细胞聚集物生长。在以40rpm进行搅拌后,用台盼蓝估计细胞活力。在另一种形式中,如下采用Fibra-Cel微载体(Bibby Sterlin,Stone,UK)(5g/l)。将重悬于5ml培养基中的细胞接种物添加到250ml锥形瓶中的载体(50ml)中,并在偶尔搅动下静置1-4小时。然后将培养基替换为50ml新鲜培养基,并开始振荡。为了进行病毒生产,使细胞生长至约80%汇合,在此之后更换培养基(至25%的最终体积),并以0.05的MOI添加腺病毒。将培养物静置过夜,然后将其体积增加至100%,并开始再振荡72小时。

[0148] b.逆转录病毒载体

[0149] 另外,肿瘤抑制因子和/或细胞外基质降解性基因可以由逆转录病毒载体编码。逆转录病毒是一组单链RNA病毒,其特征在于能够通过逆转录过程将其RNA转化为被感染细胞中的双链DNA(Coffin,1990)。然后,所得的DNA作为前病毒稳定地整合到细胞染色体中,并指导病毒蛋白的合成。所述整合导致病毒基因序列保留在受体细胞及其后代中。逆转录病毒基因组含有三种基因gag、pol和env,这三种基因分别编码衣壳蛋白、聚合酶和包膜组分。在gag基因上游发现的序列含有用于将基因组包装到病毒体中的信号。病毒基因组的5'和3'末端处存在两个长末端重复序列(LTR)。这些序列含有强启动子和增强子序列,并且也是整合到宿主细胞基因组中所必需的(Coffin,1990)。

[0150] 为了构建逆转录病毒载体,将编码所关注的基因的核酸插入病毒基因组中代替某些病毒序列,以产生复制缺陷型病毒。为了产生病毒体,构建含有gag、pol和env基因但不含LTR和包装组分的包装细胞系(Mann等人,1983)。当(通过例如磷酸钙沉淀)将含有cDNA以及逆转录病毒LTR和包装序列的重组质粒引入到该细胞系中时,该包装序列允许将重组质粒的RNA转录物包装到病毒颗粒中,然后将所述病毒颗粒分泌到培养基中(Nicolas和Rubenstein,1988;Temin,1986;Mann等人,1983)。然后收集含有重组逆转录病毒的培养基,可选地进行浓缩,并用于基因转移。逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型。然而,整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂(Paskind等人,1975)。

[0151] 与缺陷型逆转录病毒载体的使用有关的问题是有复制能力的野生型病毒在包装细胞中的潜在出现。这可能是由于重组事件造成的,在所述重组事件中来自重组病毒的完整序列插入整合在宿主细胞基因组中的gag、pol、env序列的上游。然而,可用的包装细胞系应大大降低重组的可能性(Markowitz等人,1988;Hersdorffer等人,1990)。

[0152] c.腺相关病毒载体

[0153] 腺相关病毒(AAV)是用于在本公开中使用的有吸引力的载体系统,因为其具有很高的整合频率,并且其可以感染未分裂的细胞,由此使其可用于将基因递送到哺乳动物细胞中(Muzyczka,1992)。AAV具有广泛的感染宿主范围(Tratschin等人,1984;Laughlin等人,1986;Lebkowski等人,1988;McLaughlin等人,1988),这意味着其可用于本发明。关于rAAV载体的产生和使用的细节在美国专利号5,139,941和美国专利号4,797,368中描述。

[0154] AAV是一种依赖性细小病毒,因为它需要与另一种病毒(腺病毒或疱疹病毒家族的成员)共感染才能在培养的细胞中进行生产性感染(Muzyczka,1992)。在没有与辅助病毒共感染的情况下,野生型AAV基因组通过其末端整合到人类19号染色体中,在所述染色体处其作为前病毒以潜伏状态常驻(Kotin等人,1990;Samulski等人,1991)。然而,除非还表达了AAV Rep蛋白,否则rAAV并不局限于19号染色体进行整合(Shelling和Smith,1994)。当携带AAV前病毒的细胞被辅助病毒重复感染时,AAV基因组被从染色体或重组质粒中“拯救出”,并建立了正常的生产性感染(Samulski等人,1989;McLaughlin等人,1988;Kotin等人,1990;Muzyczka,1992)。

[0155] 通常,重组AAV(rAAV)病毒是通过共转染含有侧接有两个AAV末端重复序列的所关注基因的质粒(McLaughlin等人,1988;Samulski等人,1989;这些文献均以引用方式合并于本文)和含有野生型AAV编码序列而不含末端重复序列的表达质粒例如pIM45(McCarty等人,1991)而制成的。还用腺病毒或携带AAV辅助功能所需的腺病毒基因的质粒感染或转染细胞。以这种方式制备的rAAV病毒原种被腺病毒污染,所述腺病毒必须与rAAV颗粒物理地分离(例如,通过氯化铯密度离心)。另选地,可以使用含有AAV编码区的腺病毒载体或含有AAV编码区和一些或全部腺病毒辅助基因的细胞系(Yang等人,1994;Clark等人,1995)。也可以使用携带rAAV DNA作为整合前病毒的细胞系(Flotte等人,1995)。

[0156] d.其他病毒载体

[0157] 其他病毒载体可以用作本公开中的构建体。可以采用衍生自病毒诸如牛痘病毒(Ridgeway,1988;Baichwal和Sugden,1986;Coupar等人,1988)和疱疹病毒的载体。它们为各种哺乳动物细胞提供了各种吸引人的特征(Friedmann,1989;Ridgeway,1988;Baichwal和Sugden,1986;Coupar等人,1988;Horwich等人,1990)。

[0158] 委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的分子克隆菌株已被遗传改良为有复制能力的疫苗载体,以用于表达异源病毒蛋白(Davis等人,1996)。研究已表明,VEE感染刺激有效的CTL应答,并且已表明VEE可能是用于免疫接种的极为有用的载体(Caley等人,1997)。

[0159] 在其他实施例中,编码嵌合CD154的核酸容纳在已经工程改造以表达特异性结合配体的感染性病毒内。因此,病毒颗粒将与靶细胞的同源受体特异性结合,并将内含物递送至细胞。最近基于通过将乳糖残基化学添加到病毒包膜中对逆转录病毒进行化学修饰,而开发了一种被设计为允许特异性靶向逆转录病毒载体的新颖方法。这种修饰可以允许经由唾液糖蛋白受体来特异性感染肝细胞。

[0160] 例如,设计了重组逆转录病毒的靶向,其中使用了针对逆转录病毒包膜蛋白和针对特异性细胞受体的生物素化抗体。通过使用链霉亲和素,经由生物素组分来偶联抗体(Roux等人,1989)。使用针对主要组织相容性复合体I类和II类抗原的抗体,它们证明了专宿病毒(ecotropic virus)对带有这些表面抗原的各种人类细胞的体外感染(Roux等人,1989)。

[0161] 2.调控元件

[0162] 包含在可用于本公开的载体中的表达盒特别地含有(沿5'至3'方向)可操作地连接至蛋白质编码序列的真核转录启动子、包含间插序列的剪接信号,以及转录终止/聚腺苷酸化序列。控制真核细胞中蛋白质编码基因的转录的启动子和增强子由多种遗传元件构成。细胞机制能够收集和整合每个元件所传达的调控信息,从而允许不同的基因进化出独特的,通常是复杂的转录调控模式。在本发明的上下文中使用的启动子包括组成型、诱导型和组织特异性启动子。

[0163] a.启动子/增强子

[0164] 本文所提供的表达构建体包含启动子,以驱动肿瘤抑制因子和/或细胞外基质降解性基因的表达。启动子通常包含用于定位RNA合成起始位点的序列。这种序列的最众所周知的示例是TATA盒,但是在一些缺乏TATA盒的启动子中,诸如在哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和SV40晚期基因的启动子中,覆盖起始位点的分立元件本身有助于固定起始位置。附加的启动子元件调控转录起始的频率。通常,这些启动子位于起始位点上游30-110bp的区域中,但是已显示许多启动子还含有起始位点下游的功能元件。为了使编码序列"处于启动子的控制下",将转录阅读框的转录起始位点的5′末端放置在选定启动子的"下游"(即,3′末端)。"上游"启动子刺激DNA的转录并促进所编码的RNA的表达。

[0165] 启动子元件之间的间隔往往是灵活的,因此当元件相对于彼此反转或移动时,启动子功能得以保留。在tk启动子中,在活性开始下降之前,启动子元件之间的间隔可以增加到间隔开50bp。取决于启动子,似乎单个元件可以协同或独立地起作用以激活转录。启动子可以与或可以不与"增强子"结合使用,"增强子"是指参与核酸序列的转录激活的顺式作用调控序列。

[0166] 启动子可以是与核酸序列天然缔合的启动子,如可通过分离位于编码区段和/或外显子上游的5′非编码序列获得的。此类启动子可以称为"内源的"。类似地,增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子,位于该序列的下游或上游。另选地,通过将编码核酸区段置于重组或异源启动子的控制下将获得某些优点,重组或异源启动子是指在其天然环境中通常不与核酸序列缔合的启动子。重组或异源增强子还指在其天然环境中通常不与核酸序列

缔合的增强子。此类启动子或增强子可包括其他基因的启动子或增强子,以及从任何其他病毒、或原核或真核细胞中分离的启动子或增强子,以及不是“天然存在”(即,含有不同转录调控区的不同元件和/或改变表达的突变)的启动子或增强子。例如,最常用于重组DNA构建的启动子包括β-内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖和色氨酸(trp)启动子系统。除了合成地产生启动子和增强子的核酸序列外,还可以使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括PCR™)结合本文所公开的组合物来产生序列(参见美国专利号4,683,202和5,928,906,这两篇美国专利均以引用方式合并于本文)。此外,可以设想的是,也可以采用指导序列在非核细胞器(诸如线粒体、叶绿体等)内的转录和/或表达的控制序列。

[0167] 自然地,将重要的是采用有效地指导DNA区段在被选择用于表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物体中表达的启动子和/或增强子。分子生物学领域的技术人员通常知道使用启动子、增强子和细胞类型组合来进行蛋白质表达(参见例如Sambrook等人,1989,该文献以引用方式合并于本文)。所采用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的,和/或在适当的条件下可用于指导导入的DNA区段的高水平表达,诸如在重组蛋白和/或肽的大规模生产中是有利的。启动子可以是异源的或内源的。

[0168] 此外,任何启动子/增强子组合(例如,通过epd.isb-sib.ch/处的万维网按照真核启动子数据库EPDB)也可用于驱动表达。T3、T7或SP6细胞质表达系统的使用是另一个可能的实施例。如果提供适当的细菌聚合酶,无论是作为递送复合体的一部分还是作为附加基因表达构建体,则真核细胞都可以支持从某些细菌启动子的细胞质转录。

[0169] 启动子的非限制性示例包括早期或晚期病毒启动子,诸如SV40早期或晚期启动子、巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)早期启动子;真核细胞启动子,诸如β肌动蛋白启动子(Ng,1989;Quitsche等人,1989)、GADPH启动子(Alexander等人,1988,Ercolani等人,1988)、金属硫蛋白启动子(Karin等人,1989;Richards等人,1984);以及级联应答元件启动子,诸如环状AMP应答元件启动子(cre)、血清应答元件启动子(sre)、佛波酯启动子(TPA)以及最小TATA盒附近的应答元件启动子(tre)。也可以使用人类生长激素启动子序列(例如,以Genbank登录号X05244,核苷酸283-341描述的人类生长激素最小启动子)或小鼠乳腺肿瘤启动子(可得自ATCC,产品目录号ATCC 45007)。在某些实施例中,启动子为CMV IE、dectin-1、dectin-2、人CD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad MLP、β-肌动蛋白、MHC I类或MHC II类启动子,然而可用于驱动p53、MDA-7和/或松弛素基因表达的任何其他启动子可用于本发明的实践。

[0170] 在某些方面,本公开的方法还涉及增强子序列,即,这样的核酸序列,所述核酸序列增加启动子的活性并且即使在相对较长的距离(距靶标启动子至多几千个碱基)上也具有顺式作用的潜力,而不论其取向如何。然而,增强子功能不一定限于如此长的距离,因为它们也可以在非常接近给定启动子的情况下起作用。

[0171] b.起始信号和连接表达

[0172] 特异性起始信号也可用于本公开中提供的表达构建体中以有效翻译编码序列。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域的普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必要的信号。众所周知的是,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框“符合读框”,以确保整个插入物的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可为天然的或合成的。可以通过包含适当的转录增强子元件来提

高表达效率。

[0173] 在某些实施例中,使用内部核糖体进入位点(IRES)元件来创建多基因或多顺反子信息。IRES元件能够绕过5′甲基化Cap依赖性翻译的核糖体扫描模型,并在内部位点处开始翻译(Pelletier和Sonenberg,1988)。已经描述了来自细小核糖核酸病毒家族的两个成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎细小核糖核酸病毒)的IRES元件(Pelletier和Sonenberg,1988),以及来自哺乳动物信息的IRES元件(Macejak和Sarnow,1991)。IRES元件可以连接至异源开放阅读框。可以将多个开放阅读框一起转录,每个阅读框由IRES分隔,从而创建多顺反子信息。借助于IRES元件,核糖体可接近每个开放阅读框以进行有效翻译。可以使用单个启动子/增强子转录单个信息以有效地表达多个基因(参见美国专利号5,925,565和5,935,819,这两个美国专利均以引用方式合并于本文)。

[0174] 另外,某些2A序列元件可用于在本公开提供的构建体中创建基因的连锁表达或共表达。例如,通过连接开放阅读框以形成单个顺反子,切割序列可用于共表达基因。示例性切割序列是F2A(口蹄疫病毒2A)或“2A样”序列(例如,明脉扁刺蛾(Thosea asigna)病毒2A;T2A)(Minskaia和Ryan,2013)。

[0175] c.复制的起点

[0176] 为了使载体在宿主细胞中增殖,所述载体可含有一个或多个复制的起始位点(通常称为“ori”),例如,与如上所述的EBV的oriP或在编程方面具有相似或增强的功能的经遗传改造的oriP对应的核酸序列,所述核酸序列是开始复制的特异性核酸序列。另选地,可以使用如上所述的其他染色体外复制病毒的复制起点或自主复制序列(ARS)。

[0177] 3.选择和筛选标记

[0178] 在一些实施例中,可以通过在表达载体中包含标记以在体外或体内鉴定含有本公开的构建体的细胞。此类标记将赋予细胞可识别的改变,从而允许容易地鉴定出含有表达载体的细胞。通常,选择标记是赋予允许进行选择的特性的标记。阳性选择标记是其中标记的存在允许对其进行选择的标记,而阴性选择标记是其中标记的存在阻止对其进行选择的标记。阳性选择标记的示例是抗药性标记。

[0179] 通常,包含药物选择标记有助于克隆和鉴定转化体,例如,赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博莱霉素(zeocin)和组氨醇的抗性的基因是有用的选择标记。除了赋予允许基于条件的实施来区分转化体的表型的标记之外,还设想了其他类型的标记,包括筛选标记,诸如GFP,所述标记的基础是比色分析。另选地,可以利用可筛选酶作为阴性选择标记,诸如单纯性疱疹病毒胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。本领域技术人员还将知道如何使用免疫学标记,可能与FACS分析结合使用免疫学标记。所使用的标记被认为是不重要的,只要所述标记能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。选择和筛选标记的其他示例是本领域技术人员众所周知的。

[0180] B.其他核酸递送方法

[0181] 除了病毒递送编码肿瘤抑制因子和/或细胞外基质降解性基因的核酸外,以下是将重组基因递送至给定宿主细胞的其他方法,因此在本公开中予以考虑。

[0182] 如本文所述或如本领域的普通技术人员将已知的,核酸(诸如DNA或RNA)的导入可使用用于进行核酸递送以转化细胞的任何合适方法。此类方法包括但不限于诸如通过以下方式进行DNA的直接递送:通过离体转染(Wilson等人,1989;Nabel等人,1989)、通过注射

(美国专利号5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、5,589,466和5,580,859,这些美国专利均以引用方式合并于本文),所述注射包括显微注射(Harland和Weintraub,1985;美国专利号5,789,215,该美国专利以引用方式合并于本文);通过电穿孔(美国专利号5,384,253,该美国专利以引用方式合并于本文;Tur-Kaspa等人,1986;Potter等人,1984);通过磷酸钙沉淀(Graham和Van Der Eb,1973;Chen和Okayama,1987;Rippe等人,1990);通过使用DEAE-葡聚糖之后是聚乙二醇(Gopal,1985);通过直接声波加载(Fechheimer等人,1987);通过脂质体介导的转染(Nicolau和Sene,1982;Fraley等人,1979;Nicolau等人,1987;Wong等人,1980;Kaneda等人,1989;Kato等人,1991)和受体介导的转染(Wu和Wu,1987;Wu和Wu,1988);通过微粒轰击(PCT申请号WO 94/09699和95/06128;美国专利号5,610,042;5,322,783、5,563,055、5,550,318、5,538,877和5,538,880,这些专利均以引用方式合并于本文);通过与碳化硅纤维一起搅动(Kaeppler等人,1990;美国专利号5,302,523和5,464,765,这些文献均以引用方式合并于本文);通过由农杆菌(Agrobacterium)介导的转化(美国专利号5,591,616和5,563,055,这些专利均以引用方式合并于本文);通过干燥/抑制介导的DNA摄取(Potrykus等人,1985),以及此类方法的任意组合。通过应用诸如这些的技术,可以稳定地或瞬时地转化一个或多个细胞器、一个或多个细胞、一个或多个组织或一个或多个生物体。

[0183] 1.电穿孔

[0184] 在本公开的某些特定实施例中,通过电穿孔将基因构建体引入靶标过度增殖细胞中。电穿孔涉及将细胞(或组织)和DNA(或DNA复合物)暴露于高压放电。

[0185] 使用电穿孔转染真核细胞已经非常成功。以此方式,小鼠前B淋巴细胞已用人κ-免疫球蛋白基因转染(Potter等人,1984),并且大鼠肝细胞已用氯霉素乙酰转移酶基因转染(Tur-Kaspa等人,1986)。

[0186] 预期可以优化来自不同来源的过度增殖细胞的电穿孔条件。人们可能特别希望优化诸如电压、电容、时间和电穿孔介质组成等参数。其他常规调整的执行将对于本领域技术人员而言是已知的。参见例如Hoffman,1999;Heller等人,1996。

[0187] 2.脂质介导的转化

[0188] 在另一个实施例中,可以将肿瘤抑制因子和/或细胞外基质降解性基因包埋在脂质体或脂质制剂中。脂质体是以磷脂双层膜和内部水性介质为特征的囊泡结构。多层脂质体具有由水性介质隔开的多个脂质层。所述多个脂质层当磷脂悬浮在过量的水溶液中时自发地形成。脂质组分在形成封闭结构之前经历自我重排,并且在脂质双层之间夹带水和溶解的溶质(Ghosh和Bachhawat,1991)。还设想了与Lipofectamine(Gibco BRL)复合的基因构建体。

[0189] 脂质介导的外源DNA的体外核酸递送和表达已经非常成功(Nicolau和Sene,1982;Fraley等人,1979;Nicolau等人,1987)。Wong等人(1980)证明了在所培养的鸡胚细胞、HeLa细胞和肝癌细胞中进行脂质介导的外源DNA的递送和表达的可行性。

[0190] 基于脂质的非病毒制剂提供了腺病毒基因疗法的替代方案。尽管许多细胞培养研究已经记录了基于脂质的非病毒基因转移,但是通过基于脂质的制剂进行的全身性基因递送受到限制。基于非病毒脂质的基因递送的主要限制是构成非病毒递送媒介物的阳离子脂质的毒性。脂质体的体内毒性部分解释了体外和体内基因转移结果之间的差异。导致此矛

盾数据的另一个因素是在存在和不存在血清蛋白的情况下脂质媒介物稳定性的差异。脂质媒介物与血清蛋白之间的相互作用对脂质媒介物的稳定性特征具有显著影响(Yang和Huang,1997)。阳离子脂质吸引并结合带负电荷的血清蛋白。与血清蛋白相关的脂质媒介物被巨噬细胞溶解或吸收,从而使得从循环中去除所述脂质媒介物。当前体内脂质递送方法使用皮下、皮内、瘤内或颅内注射,以避免循环中与阳离子脂质相关的毒性和稳定性问题。脂质媒介物与血浆蛋白的相互作用是体外(Felgner等人,1987)和体内基因转移效率之间差异的原因(Zhu等人,1993;Philip等人,1993;Solodin等人,1995;Liu等人,1995;Thierry等人,1995;Tsukamoto等人,1995;Aksentijevich等人,1996)。

[0191] 脂质制剂的进步已经提高了体内基因转移的效率(Templeton等人,1997;WO 98/07408)。由等摩尔比的1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基胺)丙烷(DOTAP)和胆固醇构成的新颖脂质制剂显著地增强了全身性体内基因转移,为约150倍。DOTAP:胆固醇脂质制剂形成了被称为“夹心脂质体”的独特结构。据报道,这种制剂将DNA夹在凹入的双层或“花瓶”结构之间。这些脂质结构的有益特征包括阳性ρ、通过胆固醇进行的胶体稳定化、二维DNA堆积和增加的血清稳定性。专利申请号60/135,818和60/133,116讨论了可以与本发明一起使用的制剂。

[0192] 脂质制剂的生产通常通过在(I)反相蒸发;(II)脱水-复水;(III)去污剂透析和(IV)薄膜水合之后进行脂质体混合物的超声处理或连续挤出来完成。脂质结构一旦制成就可用于包囊当在循环中时有毒的化合物(化学治疗物)或不稳定的化合物(核酸)。脂质包囊已促成了此类化合物的较低毒性和较长血清半衰期(Gabizon等人,1990)。许多疾病治疗正在使用基于脂质的基因转移策略来增强常规疗法或建立新颖疗法,特别是用于治疗过度增殖性疾病的疗法。

[0193] V.优先的CD123/CD132激动剂

[0194] 在某些方面,向受试者施用至少一种CD122/CD132激动剂,诸如优先结合CD122/CD132受体复合物并且对CD25或IL15α受体具有较低亲和力结合的CD122/CD132激动剂。CD122/CD132可以选自与野生型IL2相比具有经修饰的氨基酸序列的经遗传工程改造的IL-22突变蛋白(US 2017/0044229;该专利以引用方式整体并入)。在某些方面,优先的CD122/CD132激动剂为IL-2/抗IL-2单克隆抗体免疫复合物(US20170183403A1;该专利以引用方式整体并入);或与野生型IL-2与抗IL2单克隆抗体免疫复合物的组合相比具有经修饰的氨基酸的经遗传工程改造的IL-2突变蛋白(WO2014100014A1;该专利以引用方式整体并入);IL2的聚乙二醇化形式,如NKTR-214(Charych等人,2016);IL15/抗IL15单克隆抗体免疫复合物;IL15/IL15受体α-IgG1-Fc(IL15/IL15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物(US2006025736IA1、EP2724728A1和Dubois等人,2008);与野生型IL-15与IL15Rα-IgG1-Fc免疫复合物的组合相比具有经修饰的氨基酸序列的经遗传工程改造的IL-15突变蛋白(US20070160578;该专利以引用方式整体合并于本文);或者IL15的聚乙二醇化形式,其与CD122/CD132优先结合。在一些实施例中,使用了多于一种CD122/CD132激动剂。

[0195] VI.溶瘤病毒

[0196] 在一些方面,本公开包括施用至少一种溶瘤病毒。在一些方面,溶瘤病毒经工程改造以表达p53、MDA-7、IL-12、TGF-β抑制剂、ADP和/或IL-10抑制剂。在某些方面,所述溶瘤病毒为单链或双链DNA病毒、RNA病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、痘

病毒、牛痘病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒、艾巴氏病毒、流感病毒、呼肠孤病毒、粘液瘤病毒、马拉巴病毒、弹状病毒、enadenotucirev或柯萨奇病毒。在一些方面,溶瘤病毒经工程改造以表达细胞因子,诸如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或IL-12。在一些方面,溶瘤病毒进一步定义为talimogene laherparepvec(T-VEC)。在一些方面,溶瘤腺病毒载体源自经修饰的TERT启动子溶瘤腺病毒(美国专利号8,067,567;该美国专利以引用方式整体合并于本文)和/或HRE-E2F-TERT杂交启动子溶瘤腺病毒(PCT/KR2011/004693;该专利以引用方式整体合并于本文)和/或具有经修饰的E1a调控序列的腺病毒,其中至少一个Pea3结合位点或其功能部分被用E1b-19K克隆插入位点缺失(EP2403951A2;该专利以引用方式整体合并于本文),所述溶瘤腺病毒可以全部经修饰以表达治疗性基因。在一些方面,溶瘤腺病毒载体源自E1b缺失的溶瘤腺病毒(Yu和Fang,2007;Li,2009;这两篇文献均以引用方式整体并入)。

[0197] 示例性溶瘤病毒包括但不限于Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12、Cavatak™、CG0070、DNX-2401、G207、HF10、IMLYGIC™、JX-594、MG1-MA3、MV-NIS、OBP-301、Reolysin®、Toca 511、安柯瑞、RIGVIR、如以引用方式整体并入的US 7589069 B1中所述的过表达腺病毒死亡蛋白(ADP)的腺病毒,诸如VirRx007,如以引用方式整体并入的PCT/GB2015/051023中所述的表达IL12的缺失N1L的牛痘病毒。其他示例性溶瘤病毒描述于例如国际专利公开号WO2015/027163、WO2014/138314、WO2014/047350和WO2016/009017中;这些国际专利公开均以引用方式合并于本文。

[0198] 在一个特定方面,溶瘤病毒剂为talimogene laherparepvec(T-VEC),其是经遗传工程改造以表达GM-CSF的溶瘤单纯性疱疹病毒。Talimogene laherparepvec,HSV-1[菌株JS1]ICP34.5-/ICP47-/hGM-CSF(先前称为OncoVEX$^{GM\ CSF}$),是一种瘤内递送的溶瘤免疫疗法,其包含在实体瘤中选择性复制的免疫增强的HSV-1。(Lui等人,2003;美国专利号7,223,593和美国专利号7,537,924;这些文献以引用方式合并于本文)。在2015年10月,美国FDA批准将商标名为IMLYGIC™的T-VEC用于治疗患有无法手术的肿瘤的患者的黑素瘤。在例如IMLYGIC™包装插页(Amgen,2015)和美国专利公布号US2015/0202290中描述了T-VEC的特征和施用方法,这两篇文献均以引用方式合并于本文。例如,talimogene laherparepvec通常通过以下方式来施用:在第1周的第1天以高达4.0ml的10^6个噬菌斑形成单位/mL(PFU/mL)的剂量,之后在第4周的第1天然后每2周(±3天)以至多4.0ml的10^8PFU/mL的剂量瘤内注射到可注射的皮肤、皮下和淋巴结肿瘤中。要注射到一个或多个肿瘤中的talimogene laherparepvec的推荐体积取决于该一个或多个肿瘤的大小,并且应根据注射体积指南确定。尽管T-VEC已显示出在黑素瘤患者中的临床活性,但是许多癌症患者对T-VEC治疗无应答或停止应答。在一个实施例中,可以在T-VEC疗法之后、期间或之前施用p53和/或MDA-7核酸以及至少一种CD122/CD132激动剂,诸如以逆转治疗抗性。

[0199] 在一些实施例中,将缺失E1b的溶瘤腺病毒与至少一种优先的CD122/CD132激动剂和至少一种免疫检查点抑制剂组合。示例性缺失E1b的溶瘤腺病毒为H101(安柯瑞);表达热激蛋白70(HSP70)的Onyx 015或H103;或溶瘤腺病毒H102,其中Ad E1a基因的表达由甲胎蛋白(AFP)启动子驱动,从而导致与正常细胞相比,在肝细胞癌和其他过表达AFP的癌症中优先复制(Yu和Fang,2007;Li,2009;这两篇文献均以引用方式整体并入)。

[0200] 用于在本发明中使用的其他代表性CD122/CD132激动剂包括但不限于下表2中列

出的药剂：

[0201]

CD122/CD132 激动剂	公司	描述
NKTR-214	内克塔治疗公司 (Nektar Therapeutics)	CD122 (IL-2Rβ)-偏聚乙二醇化 IL-2
ALT-803	Altor Bioscience	突变 IL-15/IL-15Rα 融合蛋白；稳定的异二聚体，旨在延长 IL-15 的半衰期
RG7461	罗氏公司 (Roche)	成纤维细胞活化蛋白-α/IL-2 变异融合蛋白；减弱的 CD25 (IL-2Rα) 结合；

[0202]

XmAb24306	Xencor-罗氏公司 (Xencor-Roche)/ 基因泰克公司 (Genentech)	用 Xencor 的双特异性 Fc 结构域工程改造的 IL-15/IL-15Rα 细胞因子复合物
特鲁金 (Teleukin)	Philogen	F16 抗体/IL-2 融合蛋白
ALKS 4230	阿尔凯默斯公司 (Alkermes)	IL-2/CD25 (IL-2Rα) 融合蛋白；由于位阻而减弱的 CD25 (IL-2Rα) 结合
Cergutuzumab amunaleukin (RG7813)	罗氏公司 (Roche)	CEA MAb/IL-2v 融合蛋白；减少的 CD25 (IL-2Rα) 结合；
NHS-IL2-LT/EMD 521873	Merck KGaA	IL-2/Ab 融合蛋白；Ab 部分旨在将药剂引导至肿瘤坏死和凋亡的区域
NIZ985	诺华公司 (Novartis)	IL15/可溶性 IL-15Rα 二聚体
Thor 707	Synthorx	IL-2 突变蛋白；通过位点特异性聚乙二醇化减少的 CD25 (IL-2Rα) 结合
IL-15 Synthorins	Synthorx	IL-15 Synthorins 通过位点特异性聚乙二醇化而具有差异化的特性。
MDNA109	Medicenna Therapeutics	IL-2 突变蛋白；IL-2 的增强形式
MultiPharm	Nascent Therapeutics	IL-2/MAb 复合物；减少的 CD25 (IL-2Rα) 结合；
PB101	Pivotal Biosciences	低毒性 IL-2 类似物；旨在规避阿地白介素的血管渗漏综合征毒性
抗 IL-2 程序	Xoma	IL-2/MAb 复合物；MAb 指导 IL-2 来增强效应；
CT101-IL2	Courier Therapeutics	使用牛痘 OMCP 蛋白质将 IL-2（突变蛋白）重新靶向至 NKGD2 受体；指导 IL-2 来增强效应
Neo-2/15	Neoluekin Therapeutics	IL-2 的增强形式；减少的 CD25 (IL-2Rα) 结合；

[0203]

NKTR-255	内克塔治疗公司 (Nektar Therapeutics)	IL-15Rα 特异性激动剂；旨在与 IL-15Rα (CD215)/IL-2Rγ (CD132) 复合物结合
P22339	上海恒瑞公司 (Shanghai Hengrui)	IL-15Rα 特异性激动剂；旨在与 IL-15Rα (CD215)/IL-2Rγ (CD132) 复合物结合
CYP 0150	Cytunepharma	IL-15 连接至 IL-15Rα 的 Sushi+ 结构域；旨在规避 IL-15Rα (CD215) 切割
AM0015	Armo Biosciences	rhIL-15

[0204] 缩略语:MAb＝单克隆抗体;Ab＝抗体;r＝重组;h＝人类;Rα＝受体α;

[0205] VII.免疫检查点抑制剂

[0206] 在某些实施例中,本公开提供了将免疫检查点阻断与肿瘤抑制基因疗法(诸如p53和/或MDA-7基因疗法)组合的方法。免疫检查点是免疫系统中的打开信号(例如,共刺激分子)或关闭信号的分子。可被免疫检查点阻断靶向的抑制性检查点分子包括腺苷A2A受体(A2AR)、B7-H3(也称为CD276)、B和T淋巴细胞弱化因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4,也称为CD152)、吲哚胺2,3-二加氧酶(IDO)、杀伤细胞免疫球蛋白(KIR)、淋巴细胞激活基因-3(LAG3)、程序性死亡1(PD-1)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3(TIM-3)和T细胞活化V结构域Ig抑制因子(VISTA)。具体地,免疫检查点抑制剂靶向PD-1轴和/或CTLA-4。

[0207] 免疫检查点抑制剂可以是药物,诸如小分子、配体或受体的重组形式,或者特别是抗体,诸如人抗体(例如,国际专利公布WO2015016718;Pardoll,Nat Rev Cancer,12(4):252-64,2012;这两篇文献均以引用方式合并于本文)。可以使用免疫检查点蛋白或其类似物的已知抑制剂,具体地可以使用抗体的嵌合、人源化或人形式。如本领域技术人员应知道的,替代和/或等效名称可以用于本公开中提及的某些抗体。在本发明的上下文中,此类替代和/或等效名称是可互换的。例如,已知lambrolizumab也以替代和等效名称MK-3475和派姆单抗为人所知。

[0208] 设想可以使用本领域已知的任何刺激免疫应答的免疫检查点抑制剂。这种免疫检查点抑制剂包括直接或间接地刺激或增强抗原特异性T淋巴细胞的抑制剂。这些免疫检查点抑制剂包括但不限于靶向免疫检查点蛋白的药剂和涉及PD-L2、LAG3、BTLA、B7H4和TIM3的途径。例如,本领域中已知的LAG3抑制剂包括可溶性LAG3(WO2009044273中公开的IMP321或LAG3-Ig)以及阻断人LAG3的小鼠或人源化抗体(例如,WO2008132601中公开的IMP701),或阻断人LAG3的全人抗体(诸如EP 2320940中所公开的)。通过使用针对BTLA的阻断剂提供了另一个示例,所述阻断剂包括但不限于阻断人BTLA与其配体相互作用的抗体(诸如WO2011014438中所公开的4C7)。通过使用中和B7H4的药剂提供了又一个示例,所述药剂包括但不限于针对人B7H4的抗体(在WO 2013025779和WO2013067492中公开)或针对B7H4的可溶性重组形式的抗体(诸如在US20120177645中公开)。通过中和B7-H3的药剂提供了又一个

示例,所述药剂包括但不限于中和人B7-H3的抗体(例如,在US 20120294796中作为BRCA84D及其衍生物公开的MGA271)。通过靶向TIM3的药剂提供了又一个示例,所述药剂包括但不限于靶向人TIM3的抗体(例如,如在WO 2013006490 A2中所公开的,或者由Jones等人,J Exp Med.2008;205(12):2763-79所公开的抗人TIM3、阻断抗体F38-2E2)。

[0209] 另外,可以将多于一种免疫检查点抑制剂(例如,抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体)与肿瘤抑制基因疗法组合使用。例如,可以施用p53基因疗法和免疫检查点抑制剂(例如,抗KIR抗体和/或抗PD-1抗体),以增强先天性抗肿瘤免疫,之后施用IL24基因疗法和免疫检查点抑制剂(例如,抗PD-1抗体)以诱导适应性抗肿瘤免疫应答。

[0210] A.PD-1轴拮抗剂

[0211] T细胞功能障碍或无反应性与抑制性受体程序性死亡1多肽(PD-1)的诱导和持续表达同时发生。因此,本文提供了对PD-1的治疗性靶向和通过与PD-1相互作用而发信号的其他分子,诸如程序性死亡配体1(PD-L1)和程序性死亡配体2(PD-L2)。PD-L1在许多癌症中过表达,并且通常与不良预后有关(Okazaki T等人,Intern.Immun.2007 19(7):813)。因此,本文提供了对PD-L1/PD-1相互作用的抑制与p53、ADP和/或MDA-7基因疗法的组合,诸如以增强$CD8^+$ T细胞介导的肿瘤杀伤。

[0212] 本文提供了一种用于治疗或延迟个体的癌症进展的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂与p53、ADP(VirRx007)和/或MDA-7基因疗法的组合。本文还提供了一种增强有需要的个体的免疫功能的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和p53、ADP(VirRx007)和/或MDA-7基因疗法。

[0213] 例如,PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PDL1结合拮抗剂和PDL2结合拮抗剂。“PD-1”的替代名称包括CD279和SLEB2。“PDL1”的替代名称包括B7-H1、B7-4、CD274和B7-H。“PDL2”的替代名称包括B7-DC、Btdc和CD273。在一些实施例中,PD-1、PDL1和PDL2为人PD-1、PDL1和PDL2。

[0214] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为抑制PD-1与其配体结合配偶体的结合的分子。在一个特定方面,PD-1配体结合配偶体为PDL1和/或PDL2。在另一个实施例中,PDL1结合拮抗剂为抑制PDL1与其结合配偶体结合的分子。在一个特定方面,PDL1结合配偶体为PD-1和/或B7-1。在另一个实施例中,PDL2结合拮抗剂为抑制PDL2与其结合配偶体结合的分子。在一个特定方面,PDL2结合配偶体为PD-1。拮抗剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。示例性抗体描述于美国专利号US8735553、US8354509和US8008449,这些美国专利全部以引用方式合并于本文。用于本文提供的方法中的其他PD-1轴拮抗剂是本领域已知的,诸如在美国专利申请号US20140294898、US2014022021和US20110008369中所述,这些美国专利申请全部以引用方式合并于本文。

[0215] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施例中,抗PD-1抗体选自由纳武单抗、派姆单抗和CT-011组成的组。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为免疫粘附素(例如,包含PDL1或PDL2的与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为AMP-224。纳武单抗,也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和OPDIVO®,是在WO2006/121168中描述的抗PD-1抗体。派姆单抗,也称为MK-3475、Merck

3475、lambrolizumab、KEYTRUDA® 和SCH-900475,是在WO2009/114335中描述的抗PD-1抗体。CT-011,也称为hBAT或hBAT-1,是WO2009/101611中所述的抗PD-1抗体。AMP-224,也称为B7-DCIg,是WO2010/027827和WO2011/066342中所述的PDL2-Fc融合可溶性受体。附加PD-1结合拮抗剂包括匹利珠单抗(也称为CT-011)、MEDI0680(也称为AMP-514)和REGN2810。

[0216] 在一些方面,免疫检查点抑制剂为PD-L1拮抗剂,诸如德瓦鲁单抗,也称为MEDI4736;阿特珠单抗,也称为MPDL3280A;或阿维单抗,也称为MSB00010118C。在某些方面,免疫检查点抑制剂为PD-L2拮抗剂,诸如rHIgM12B7。在一些方面,免疫检查点抑制剂为LAG-3拮抗剂,诸如但不限于IMP321和BMS-986016。免疫检查点抑制剂可以是腺苷A2a受体(A2aR)拮抗剂,诸如PBF-509。

[0217] 在一些方面,本文所述的抗体(诸如抗PD-1抗体、抗PDL1抗体或抗PDL2抗体)还包含人或鼠恒定区。在再一个方面,人恒定区选自由IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4组成的组。在再一个具体方面,人恒定区为IgG1。在再一个方面,鼠恒定区选自由IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3组成的组。在再一个具体方面,抗体具有降低的或最小的效应子功能。在再一个具体方面,最小的效应子功能是由原核细胞中的生产导致的。在再一个具体方面,最小的效应子功能是由“少效应子Fc突变(effector-less Fc mutation)”或去糖基化(aglycosylation)导致的。

[0218] 因此,本文所使用的抗体可以被去糖基化。抗体的糖基化通常是N-连接或O-连接的。N-连接的是指碳水化合物部分附接至天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是将碳水化合物部分酶促附接至天冬酰胺侧链的识别序列,其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸。因此,多肽中这些三肽序列中任一者的存在都会创建潜在的糖基化位点。O-连接糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一者附接至羟基氨基酸(最通常为丝氨酸或苏氨酸),但是也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。通过改变氨基酸序列以便去除上述三肽序列中的一者,方便地完成了糖基化位点从抗体上的去除(对于N-连接糖基化位点)。可以通过另一个氨基酸残基(例如,甘氨酸、丙氨酸或保守取代)取代糖基化位点内的天冬酰胺、丝氨酸或苏氨酸残基来进行改变。

[0219] 抗体或其抗原结合片段可以使用本领域已知的方法来制备,例如通过包括以下的过程:在适于生产此类抗体或片段的条件下培养含有以适于表达的形式编码先前所述的抗PDL1、抗PD-1或抗PDL2抗体或抗原结合片段中的任一者的核酸的宿主细胞,并回收所述抗体或片段。

[0220] B.CTLA-4

[0221] 在本文提供的方法中可以靶向的另一个免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),也称为CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列的Genbank登录号为L15006。CTLA-4被发现在T细胞表面上,并且当与抗原呈递细胞表面上的CD80或CD86结合时充当“关闭”开关。CTLA4是在辅助T细胞的表面上表达并向T细胞传递抑制信号的免疫球蛋白超家族的成员。CTLA4与T细胞共刺激蛋白CD28相似,并且两种分子均与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(分别也称为B7-1和B7-2)结合。CTLA4将抑制信号传递给T细胞,而CD28则传递刺激信号。细胞内CTLA4也存在于调节性T细胞中,并且可能是对调节性T细胞的功能重要的。通过T细胞受体和CD28进行T细胞活化使得B7分子的抑制受体CTLA-4的表达增加。

[0222] 在一些实施例中,免疫检查点抑制剂为抗CTLA-4抗体(例如,人抗体、人源化抗体

或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0223] 适用于本发明方法的抗人CTLA-4抗体(或来源于其的VH和/或VL结构域)可以使用本领域众所周知的方法产生。或者,可以使用本领域公认的抗CTLA-4抗体。例如,公开于以下文献中的抗CTLA-4抗体可用于本文公开的方法中:US 8,119,129、WO 01/14424、WO 98/42752;WO 00/37504(CP675,206,也称为曲美木单抗(tremelimumab);以前称为替西木单抗(ticilimumab))、美国专利号6,207,156;Hurwitz等人(1998)Proc Natl Acad Sci USA 95(17):10067-10071;Camacho等人(2004)J Clin Oncology 22(145):摘要号2505(抗体CP-675206);和Mokyr等人,(1998)Cancer Res 58:5301-5304。前述出版物中的每一者的教导据此以引用方式并入。也可以使用与这些本领域公认的抗体中的任一者竞争与CTLA-4结合的抗体。例如,在国际专利申请号WO2001014424、WO2000037504和美国专利号US8017114中描述了人源化CTLA-4抗体,这些专利全部以引用方式合并于本文。

[0224] 示例性的抗CTLA-4抗体为伊匹木单抗(也称为10D1、MDX-010、MDX-101和Yervoy®)或其抗原结合片段和变体(参见例如,WO0 1/14424)。在其他实施例中,抗体包含伊匹木单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施例中,该抗体包含伊匹木单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及伊匹木单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施例中,该抗体与上述抗体竞争与CTLA-4上的相同表位的结合和/或与该相同表位结合。在另一个实施例中,该抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性(例如,与伊匹木单抗具有至少约90%、95%或99%的可变区同一性)。

[0225] 用于调节CTLA-4的其他分子包括CTLA-4配体和受体,诸如在美国专利号US5844905、US5885796和国际专利申请号WO1995001994和WO1998042752中所述,这些专利全部以引用方式合并于本文;以及免疫粘附性,诸如在美国专利号US8329867中所述,该美国专利以引用方式合并于本文。

[0226] C.杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)

[0227] 用于在本发明中使用的另一种免疫检查点抑制剂为抗KIR抗体。适合用于在本发明中使用的抗人KIR抗体(或来源于其的VH/VL结构域)可以使用本领域众所周知的方法产生。

[0228] 另选地,可以使用本领域公认的抗KIR抗体。抗KIR抗体可以与多种抑制性KIR受体交叉反应,并增强带有这些受体中的一种或多种受体的NK细胞的细胞毒性。例如,抗KIR抗体可以结合至KIR2D2DL1、KIR2DL2和KIR2DL3中的每一者,并且通过减少、中和和/或逆转由任何或所有这些KIR介导的对NK细胞的细胞毒性的抑制来增强NK细胞活性。在一些方面,抗KIR抗体不结合KIR2DS4和/或KIR2DS3。例如,可以使用在WO 2006/003179中描述的单克隆抗体1-7F9(也称为IPH2101)、14F1、1-6F1和1-6F5,该专利的教导据此以引用方式并入。也可以使用与这些本领域公认的抗体中的任一者竞争与KIR结合的抗体。可以使用的附加的本领域公认的抗KIR抗体包括例如在WO 2005/003168、WO 2005/009465、WO 2006/072625、WO 2006/072626、WO 2007/042573、WO 2008/084106、WO 2010/065939、WO 2012/071411和WO/2012/160448中所公开的那些。

[0229] 示例性的抗KIR抗体为利鲁单抗(也称为BMS-986015或IPH2102)。在其他实施例中,抗KIR抗体包含利鲁单抗的重链和轻链互补决定区(CDR)或可变区(VR)。因此,在一个实施例中,抗体包含利鲁单抗的重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及利鲁单抗的

轻链可变(VL)区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施例中,该抗体与利鲁单抗具有至少约90％的可变区氨基酸序列同一性。

[0230] VIII.治疗方法

[0231] 本文提供了用于治疗或延缓个体的癌症进展的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的至少一种CD122/CD132激动剂和至少一种肿瘤抑制基因疗法(例如,p53和/或MDA-7基因疗法,或病毒溶瘤疗法-VirRx007)。该疗法还可包括至少一种免疫检查点抑制剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂和/或CTLA-4抗体)。

[0232] 在一些实施例中,治疗促成在停止治疗后个体的持续应答。本文所述的方法可用于治疗需要增强免疫原性(诸如增加用于治疗癌症的肿瘤免疫原性)的病症。本文还提供了增强诸如患有癌症的个体的免疫功能的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的CD122/CD132激动剂(例如,IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白)以及p53和/或MDA-7肿瘤抑制基因疗法,或病毒溶瘤疗法VirRx007。CD122/CD132激动剂可以是与IL-15受体α/IgG1 Fc融合蛋白(诸如ALT-803)结合的IL-15突变体(例如,IL-15N72D)。在一些实施例中,所述个体为人。

[0233] 在一些方面,进一步向受试者施用肿瘤抑制免疫基因疗法(参见PCT/US2016/060833,该专利以引用方式整体合并于本文)。在一些方面,进一步向受试者施用附加病毒和非病毒基因疗法(PCT/US2017/065861;该专利以引用方式整体合并于本文)。在一些方面,有复制能力和/或无复制能力的病毒和/或非病毒基因疗法可以递送一种或多种治疗基因,该一种或多种治疗基因可以是肿瘤抑制基因或免疫刺激基因。

[0234] 预期进行治疗的癌症的示例包括肺癌、头颈癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、骨癌、睾丸癌、宫颈癌、胃肠癌、淋巴瘤、肺部癌前病变、结肠癌、黑素瘤和膀胱癌。

[0235] 在一些实施例中,个体患有对一种或多种抗癌疗法具有抗性(已经证明是有抗性)的癌症。在一些实施例中,对抗癌疗法的抗性包括癌症复发或难治性癌症。复发可指治疗后在原始部位或新部位再次出现癌症。在一些实施例中,对抗癌疗法的抗性包括在用抗癌疗法治疗期间癌症的进展。在一些实施例中,癌症处于早期或晚期。

[0236] 在一些实施例中,还用免疫检查点抑制剂(诸如PD-1轴结合拮抗剂和/或抗CTLA-4抗体)来治疗受试者。个体可能患有表达(例如已在诊断测试中显示为表达)PD-L1生物标志物或具有高肿瘤突变负担的癌症。在一些实施例中,患者的癌症表达低PD-L1生物标志物。在一些实施例中,患者的癌症表达高PD-L1生物标志物。可以使用选自由以下项组成的组的方法来检测PD-L1生物标志物:FACS、蛋白质印迹、ELISA、免疫沉淀、免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫分析、斑点印迹、免疫检测方法、HPLC、表面等离子体共振、光谱学、质谱、HPLC、qPCR、RT-qPCR、多重qPCR或RT-qPCR、RNA测序、微阵列分析、SAGE、MassARRAY技术和FISH,以及它们的组合。可以通过基因组测序(例如,Foundation One CDx测定)来确定高突变肿瘤负担的测量。

[0237] 在一些实施例中,还用组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂(例如,tractinostat,以前称为CHR-3996或VRx-3996,口服给药的1类组蛋白脱乙酰酶选择性抑制剂)治疗受试者。

[0238] 本文所述任何方法(例如,包括施用有效量的至少一种CD122/CD132激动剂;p53、ADP和/或MDA-7基因疗法;至少一种免疫检查点抑制剂和/或至少一种HDAC抑制剂的组合的

组合治疗)的功效可以在本领域已知的各种模型(诸如临床或临床前模型)中进行测试。合适的临床前模型在本文中例示,并且还可包括但不限于ID8卵巢癌、GEM模型、B16黑素瘤、RENCA肾细胞癌、CT26结直肠癌、MC38结直肠癌和Cloudman黑素瘤癌症模型。

[0239] 在本公开的方法的一些实施例中,癌症具有低水平的T细胞浸润。在一些实施例中,癌症没有可检测的T细胞浸润。在一些实施例中,癌症是非免疫原性癌症(例如,非免疫原性结直肠癌和/或卵巢癌)。不受理论的束缚,相对于施用所述组合之前,组合治疗可以增加T细胞(例如,$CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞、记忆T细胞)的启动、活化和/或增殖。

[0240] 在本公开的方法的一些实施例中,所述个体中活化的CD4和/或CD8 T细胞的特征在于相对于施用所述组合之前,产生γ-IFN的CD4和/或CD8 T细胞和/或增强的细胞溶解活性。γ-IFN可以通过本领域已知的任何手段来测量,所述手段包括例如涉及细胞固定、通透化和用抗γ-IFN的抗体染色的细胞内细胞因子染色(ICS)。细胞溶解活性可以通过本领域已知的任何手段来测量,例如使用利用混合效应细胞和靶细胞的细胞杀伤来测量。

[0241] 本公开可用于任何参与免疫反应的人细胞,作为免疫系统的靶标或作为免疫系统对外来靶标的应答的一部分。所述方法包括离体方法、体内方法,以及涉及将多核苷酸或载体注射到宿主细胞中的各种其他方法。所述方法还包括直接注射到肿瘤或肿瘤床中以及局部或区域性注射到肿瘤中。

[0242] A.施用

[0243] 本文所提供的组合疗法包括施用优先的CD122/CD132激动剂(例如,IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白)以及p53、ADP和/或MDA-7基因疗法。可以以本领域中已知的任何合适方式施用组合疗法。例如,CD122/CD132激动剂(例如,IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受体α-IgG1-Fc (IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白)以及p53和/或MDA-7基因疗法可以顺序地(在不同时间)或同时(在相同时间)施用。在一些实施例中,一种或多种CD122/CD132激动剂在与p53、ADP和/或MDA-7基因疗法或其表达构建体不同的组合物中。在一些实施例中,CD122/CD132激动剂在与p53和/或MDA-7基因疗法相同的组合物中。在某些方面,在至少一种CD122/CD132激动剂之前、同时或之后,向受试者施用编码p53、ADP的核酸和/或编码MDA-7的核酸。

[0244] 一种或多种CD122/CD132激动剂和p53、ADP和/或MDA-7基因疗法可以通过相同的施用途径或通过不同的施用途径来施用。在一些实施例中,静脉内地、肌内地、皮下地、局部地、口服地、经皮地、腹膜内地、眼眶内地、通过植入、通过吸入、鞘内地、心室内地或鼻内地施用CD122/CD132激动剂。在一些实施例中,静脉内地、肌内地、皮下地、局部地、口服地、经皮地、腹膜内地、眼眶内地、通过植入、通过吸入、鞘内地、心室内地或鼻内地施用p53、ADP和/或MDA-7基因疗法。可以施用有效量的CD122/CD132激动剂以及p53、ADP和/或MDA-7基因疗法来预防或治疗疾病。CD122/CD132激动剂及/或p53、ADP和/或MDA-7基因疗法的适当剂量可以基于要治疗的疾病类型、疾病的严重程度和病程、个体的临床病症、个体的临床病史和对治疗的应答,以及主治医生的判定来确定。在一些实施例中,使用至少一种CD122/CD132激动剂(例如,IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受

体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白)以及p53、ADP和/或MDA-7基因疗法进行的组合治疗是协同的,由此与作为单一药剂的治疗相比,单独剂量的p53、ADP和/或MDA-7基因疗法与至少一种CD122/CD132激动剂(例如,IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白)的组合存在超出累加效应。

[0245] 例如,治疗有效量的CD122/CD132激动剂(诸如IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白)是以每周一次至每2-4周一次范围内的间隔通过皮下注射(SQ)或静脉内注射(IV)给予的介于5-100ug/kg之间范围内的剂量施用的。

[0246] 例如,当将治疗有效量的一种或多种CD122/CD132激动剂以及p53、ADP和/或MDA-7基因疗法与免疫检查点抑制剂(诸如抗体)进一步组合施用时,无论是通过一次还是多次施用,都将在约0.01mg/kg患者体重至约50mg/kg患者体重的范围内。在一些实施例中,所使用的抗体为例如每日施用约0.01至约45mg/kg、约0.01至约40mg/kg、约0.01至约35mg/kg、约0.01至约30mg/kg、约0.01至约25mg/kg、约0.01至约20mg/kg、约0.01至约15mg/kg、约0.01至约10mg/kg、约0.01至约5mg/kg,或约0.01至约1mg/kg。在一些实施例中,将抗体以15mg/kg施用。然而,其他剂量方案可为有用的。在一个实施例中,在21天周期的第1天以约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg或约1400mg的剂量向人类施用本文所述的抗PD-L1抗体。该剂量可以作为单个剂量或作为多个剂量(例如,2或3个剂量),诸如多次输注来施用。通过常规技术可以容易地监测该疗法的进展。

[0247] 对于组合疗法的p53、ADP和/或MDA-7基因疗法组分,特别设想了瘤内注射或注射到肿瘤脉管系统中。局部、区域性或全身性施用也可能是适当的。对于>4cm的肿瘤,要施用的体积将为约4-10ml(特别地为10ml),而对于<4cm的肿瘤,将使用约1-3ml(特别地为3ml)的体积。作为单剂量递送的多次注射包括约0.1ml至约0.5ml的体积。例如,可以通过对肿瘤施用多次注射来有利地接触腺病毒颗粒。

[0248] 治疗方案也可能变化,并且往往取决于肿瘤类型、肿瘤位置、疾病进展以及患者的健康和年龄。显然,某些类型的肿瘤将需要更积极的治疗,而与此同时,某些患者无法忍受负担更重的方案。临床医生将最适合基于治疗制剂的已知功效和毒性(如果有的话)做出此类决定。

[0249] 在某些实施例中,所治疗的肿瘤可能至少在最初不可被切除。组合治疗可由于边缘处的收缩或通过消除某些特别有侵入性的部分而增加肿瘤的可切除性。在组合治疗后,执行切除。切除后的附加治疗将用于消除残留疾病。

[0250] 治疗可包括各种“单位剂量”。单位剂量被定义为含有预定量的治疗组合物。待施用的量以及具体的途径和制剂在临床领域技术人员的能力范围内。单位剂量不必作为单次注射施用,而可以包括在设定的时间段内的连续输注。本发明的单位剂量可以方便地用病毒构建体的噬菌斑形成单位(pfu)来描述。单位剂量在10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}pfu及更高的范围中。或者,根据病毒的种类和可达到的滴度,将向患者或患

者细胞递送1至100、10至50、100-1000或高达约1×10^{4}、1×10^{5}、1×10^{6}、1×10^{7}、1×10^{8}、1×10^{9}、1×10^{10}、1×10^{11}、1×10^{12}、1×10^{13}、1×10^{14}或1×10^{15}个或更高数量的感染性病毒颗粒(vp)。

[0251] B.可注射组合物和制剂

[0252] 本发明中一种用于将一种或多种编码人p53、ADP和MDA-7蛋白的表达构建体递送至过度增殖细胞的方法是通过瘤内注射,而CD122/CD132激动剂、免疫检查点抑制剂和HDAC抑制剂是全身性施用的。然而,如美国专利5,543,158、美国专利5,641,515和美国专利5,399,363中所述,本文公开的药物组合物可以另选地瘤内地、肠胃外地、静脉内地、皮内地、动脉内地、肌内地、经皮地或甚至腹膜内地施用,这些美国专利均以引用方式合并于本文。

[0253] 可以通过注射器或用于注射溶液的任何其他方法来递送核酸构建体的注射,只要表达构建体可以穿过注射所需的特定规格的针即可。已经描述了新颖的无针注射系统(美国专利5,846,233),该无针注射系统具有限定用于保持溶液的安瓿室的喷嘴和用于将溶液从喷嘴推出到递送部位的能量设备。还已经描述了用于基因疗法的注射器系统,其允许精确地在任何深度处多次注射预定量的溶液(美国专利5,846,225)。可以使用的另一种注射系统是QuadraFuse设备,其包括可使用附接的注射器调节到不同深度的多方向展开型针(multipronged needle)。

[0254] 作为游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液可以在水中适当地与表面活性剂(诸如羟丙基纤维素)混合而制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇以及它们的混合物中和在油中制备。在常规的存储和使用条件下,这些制备物含有防腐剂以防止微生物的生长。适用于注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末(美国专利5,466,468)。在所有情况下,该形式都必须是无菌的,并且必须是易于注射的程度存在的流体。其在制造和储存条件下必须稳定并且必须抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而保存。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。可例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过在分散液的情况下维持所需粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。防止微生物的作用可以通过各种抗细菌以及抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶),可以使可注射组合物的吸收延长。

[0255] 例如,对于在水溶液中的肠胃外施用,溶液应该适当地缓冲(如果需要的话),并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液特别适合于静脉内、肌内、皮下、瘤内和腹膜内施用。就此而言,根据本公开,本领域技术人员将知道可以采用的无菌水性介质。例如,可以将一个剂量溶解在1ml等渗NaCl溶液中,或者添加到1000ml皮下输液流体中,或者在建议的输注部位注射(参见例如,“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第22版)。取决于所治疗受试者的状况,必然会发生剂量的一些变化。在任何情况下,负责施用的人员将确定用于个体受试者的适当剂量。此外,对于人类施用,制备物应符合FDA生物制剂标准办公室(FDA Office of Biologics standards)所要求的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0256] 无菌可注射溶液是通过将活性化合物以所需量与所需的上述各种其他成分一起

掺入适当的溶剂中,之后进行过滤灭菌而制备的。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物含有基础分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这些方法由先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何附加所需成分的粉末。

[0257] 本文所公开的组合物可以配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括使用无机酸(诸如盐酸或磷酸)或有机酸(诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成的酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成的)。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)和有机碱(诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。在配制后,将溶液以与剂型相容的方式和治疗有效量施用。可以容易地以各种剂型(诸如可注射溶液、药物释放胶囊等)来施用制剂。

[0258] C.附加抗癌疗法

[0259] 为了提高p53、ADP和/或MDA-7核酸以及至少一种CD122/CD132激动剂的有效性,可以将它们与至少一种对癌症治疗有效的附加药剂组合。更一般地,将以有效杀伤或抑制细胞增殖的组合量来提供这些其他组合物。该过程可涉及使细胞与表达构建体和一种或多种药剂或多种因子同时接触。这可以通过以下方式来实现:通过使细胞与包含两种药剂的单一组合物或药理制剂接触,或通过使细胞同时与两种不同的组合物或制剂接触,其中一种组合物包含表达构建体,另一种组合物包含一种或多种第二药剂。另选地,表达构建体可以接触增殖细胞,并且附加疗法可以影响免疫系统或肿瘤微环境的其他细胞以增强抗肿瘤免疫应答和治疗功效。所述至少一种附加抗癌疗法可以是但不限于手术疗法、化学疗法(例如,施用蛋白激酶抑制剂或EGFR靶向疗法)、放射疗法、冷冻疗法、热疗、光疗、放射消融疗法、激素疗法、免疫疗法(包括但不限于免疫检查点抑制剂)、小分子疗法、受体激酶抑制剂疗法、抗血管生成疗法、细胞因子疗法或生物疗法(诸如单克隆抗体、siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、核酶或基因疗法)。不受限制地,生物疗法可以是基因疗法,诸如肿瘤抑制基因疗法、细胞死亡蛋白基因疗法、细胞周期调节基因疗法、细胞因子基因疗法、毒素基因疗法、免疫基因疗法、自杀基因疗法、前药基因疗法、抗细胞增殖基因疗法、酶基因疗法或抗血管生成因子基因疗法。

[0260] 基因疗法可以在其他药剂治疗之前或之后有几分钟到几周范围内的间隔。在将另一种药剂和表达构建体单独施加至细胞的实施例中,通常应确保在每次递送时间之间没有明显的时间段间隔,使得该药剂和表达构建体仍将能够对细胞发挥有利的组合效应。在此类情况下,可以设想的是,可以使细胞在约12-24小时内,并且更优选地在约6-12小时内以两种方式彼此接触。在一些情况下,可能需要将治疗时段显著延长,然而,在相应施用之间会有几天(例如,2、3、4、5、6或7天)至几周(例如,1、2、3、4、5、6、7或8周)的时间流逝。在某些实施例中,可以在有或没有其他疗法作为维持疗法的情况下继续疗法中的一种或多种疗法。

[0261] 可以采用以下各种组合,基因疗法和CD122/CD132激动剂是“A”,并且辅助药剂,即免疫检查点抑制剂是“B”:

[0262] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0263] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0264] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0265] 1.化学疗法

[0266] 癌症疗法通常还包括与基于化学的治疗和基于放射的治疗的各种组合疗法。组合化学疗法包括例如顺铂(CDDP)、卡铂、丙卡巴嗪、二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、它莫西芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫杉醇、吉西他滨、长春瑞滨、法尼基蛋白转移酶抑制剂、反铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱和甲氨蝶呤、替莫唑胺(DTIC的水性形式),或前述的任何类似物或衍生变体。化学疗法与生物疗法的组合被称为生化疗法。化学疗法也可以以连续的低剂量施用,这被称为节律化学疗法。

[0267] 进一步的组合化学疗法包括例如烷基化药剂,诸如噻替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐,诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,诸如苯佐替派、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺类和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺(triethiylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(特别是布拉它辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素;海绵多聚乙酰(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻素(尤其是念珠藻素1和念珠藻素8);尾海兔素;倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);五加素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥,诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、盐酸二氯甲基二乙胺氧化物、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲洛磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀;亚硝基脲,诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司丁、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如,卡里奇霉素(calicheamicin),尤其是卡里奇霉γlI和卡里奇霉素ωI1;达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;双膦酸盐,诸如氯膦酸盐;拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素、氨茴霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡拉比辛(carabicin)、洋红霉素、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯代-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、依达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素(诸如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素(nogalarnycin)、橄榄霉素、培来霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星、链黑菌素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物,诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨,6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素类,诸如卡鲁睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺类,诸如米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如亚叶酸;醋葡醛内酯;羟醛磷酰胺糖苷;

氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吖啶;贝曲布索(bestrabucil);比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛;地吖醌(diaziquone);艾甲新(elformithine);依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱,诸如美登素和安丝菌素;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇(mopidanmol);二胺硝吖啶(nitraerine);喷司他丁;蛋胺氮芥(phenamet);吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙酰肼;丙卡巴肼;PSK多糖复合物;雷佐生;根霉素(rhizoxin);西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2′,2”-三氯三乙胺;单端孢霉烯毒素类(trichothecenes)(特别是T-2毒素、疣孢菌素A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;嘉胞苷(gacytosine);阿糖胞苷(“Ara-C”);环磷酰胺;紫杉烷类,例如紫杉醇和多西他赛吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;铂配位复合物,诸如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺安托(novantrone);替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达(xeloda);伊班膦酸盐;伊立替康(例如,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类维生素A,诸如视黄酸;卡培他滨(capecitabine);卡铂、丙卡巴肼、普卡霉素(plicomycin)、吉西他滨(gemcitabien)、诺维本(navelbine);法呢基蛋白转移酶抑制剂、反铂;以及任何上述的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施例中,本文所提供的组合物可以与组蛋白脱乙酰酶抑制剂组合使用。在某些实施例中,本文所提供的组合物可以与吉非替尼组合使用。在其他实施例中,本发明的实施例可以与格列卫组合实践(例如,可以向患者施用约400至约800mg/天的格列卫)。在某些实施例中,一种或多种化学治疗剂可以与本文提供的组合物组合使用。

[0268] 2.放射疗法

[0269] 引起DNA损伤并已被广泛使用的其他因素包括通常称为γ射线、X射线的射线和/或放射性同位素至肿瘤细胞的定向递送。还已知其他形式的DNA破坏因子,诸如微波和UV辐射。所有这些因素很可能对DNA、DNA前体、DNA的复制和修复以及染色体的装配和维护造成广泛损伤。X射线的剂量在长时间段(3至4周)的50至200伦琴的日剂量到2000至6000伦琴的单剂量的范围内。放射性同位素的剂量范围广泛地变化,并且取决于同位素的半衰期、所发出辐射的强度和类型以及被肿瘤细胞的吸收。

[0270] 3.免疫疗法

[0271] 免疫疗法通常依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。免疫效应子可以是例如特异于肿瘤细胞表面上的一些标记的抗体。单独的抗体可以充当疗法的效应子,或者其可以募集其他细胞来实际实现细胞杀伤。抗体也可以与药物或毒素(化疗剂、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合,并且仅用作靶向剂。或者,效应子可以是携带表面分子的淋巴细胞,该表面分子与肿瘤细胞靶标直接或间接地相互作用。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞,以及经修饰以表达嵌合抗原受体的这些细胞类型的经遗传工程改造的变体。Mda-7基因转移到肿瘤细胞中使得肿瘤细胞死亡和凋亡。凋亡的肿瘤细胞被包括树突状细胞和巨噬细胞在内的网状内皮细胞清除,并呈递给免疫系统以产生抗肿瘤免疫力(Rovere等人,1999;Steinman等人,1999)。

[0272] 癌症免疫疗法领域的技术人员将认识到,可以将其他补充免疫疗法添加到上述方

案中以进一步增强它们的功效,包括但不限于添加GM-CSF以增加髓源性先天免疫系统细胞的数量,添加低剂量的环磷酰胺或PI3K抑制剂(例如,PI3Kδ抑制剂)以消除抑制先天性和获得性免疫的T调节细胞,以及添加5FU(例如,卡培他滨)、PI3K抑制剂或组蛋白脱乙酰酶抑制剂以去除抑制性髓源性抑制细胞。例如,PI3K抑制剂包括但不限于LY294002、哌立福新、BKM120、杜韦利西布(Duvelisib)、PX-866、BAY 80-6946、BEZ235、SF1126、GDC-0941、XL147、XL765、Palomid 529、GSK1059615、PWT33597、IC87114、TG100-15、CAL263、PI-103、GNE-477、CUDC-907和AEZS-136。在一些方面,PI3K抑制剂为PI3K δ抑制剂,诸如但不限于艾代拉里斯(Idelalisib)、RP6530、TGR1202和RP6503。在美国专利申请号US20150291595、US20110190319和国际专利申请号WO2012146667、WO2014164942、WO2012062748和WO2015082376中公开了附加PI3K抑制剂。免疫疗法还可以包括白介素(诸如IL-2)或干扰素(诸如INFα)的施用。

[0273] 可以与p53、ADP和/或MDA-7基因疗法以及CD122/CD132激动剂组合使用的免疫疗法的示例为免疫佐剂(例如,牛结核分枝杆菌、恶性疟原虫、二硝基氯苯和芳香族化合物)(美国专利5,801,005;美国专利5,739,169;Hui和Hashimoto,1998;Christodoulides等人,1998)、细胞因子疗法(例如,干扰素α、β和γ;白介素(IL-1、IL-2)、GM-CSF和TNF)(Bukowski等人,1998;Davidson等人,1998;Hellstrand等人,1998)、基因疗法(例如,TNF、IL-1、IL-2、p53)(Qin等人,1998;Austin-Ward和Villaseca,1998;美国专利5,830,880和美国专利5,846,945)和单克隆抗体(例如,抗神经节苷脂GM2、抗HER-2、抗p185)(Pietras等人,1998;Hanibuchi等人,1998;美国专利5,824,311)。赫赛汀(曲妥珠单抗)为嵌合的(小鼠-人)单克隆抗体,其阻断HER2-neu受体。它具有抗肿瘤活性,并且已被批准用于治疗恶性肿瘤(Dillman,1999)。已证明使用赫赛汀和化学疗法的组合癌症疗法比单独疗法更有效。因此,设想可以将一种或多种抗癌疗法与本文所述的p53、ADP和/或MDA-7基因疗法一起使用。

[0274] 可以与p53、ADP和/或MDA-7基因疗法以及CD122/CD132激动剂组合的附加免疫疗法包括免疫检查点抑制剂、共刺激受体激动剂、先天免疫细胞刺激剂或先天免疫激活剂。在某些方面,免疫检查点抑制剂为CTLA-4抑制剂、PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、PD-L2抑制剂、LAG-3抑制剂、BTLA抑制剂、B7H3抑制剂、B7H4抑制剂、TIM3抑制剂、KIR抑制剂或A2aR抑制剂。在一些方面,至少一种免疫检查点抑制剂为抗CTLA-4抗体。在一些方面,抗CTLA-4抗体为曲美木单抗或伊匹木单抗。在某些方面,至少一种免疫检查点抑制剂为抗杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)抗体。在一些实施例中,抗KIR抗体为利鲁单抗。在一些方面,PD-L1抑制剂为德瓦鲁单抗、阿特珠单抗或阿维单抗。在一些方面,PD-L2抑制剂为rHIgM12B7。在一些方面,LAG3抑制剂为IMP321或BMS-986016。在一些方面,A2aR抑制剂为PBF-509。

[0275] 在一些方面,至少一种免疫检查点抑制剂为人类程序性细胞死亡1(PD-1)轴结合拮抗剂。在某些方面,PD-1轴结合拮抗剂选自由PD-1结合拮抗剂、PDL1结合拮抗剂和PDL2结合拮抗剂组成的组。在一些方面,PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。在某些方面,PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PDL1和/或PDL2的结合。具体地,PD-1结合拮抗剂为单克隆抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为纳武单抗、派姆单抗、匹利珠单抗、AMP-514、REGN2810、CT-011、BMS 936559、MPDL3280A或AMP-224。

[0276] 在某些方面,至少一种检查点抑制剂选自CTLA-4抑制剂、PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、PD-L2抑制剂、LAG-3抑制剂、BTLA抑制剂、B7H3抑制剂、B7H4抑制剂、TIM3抑制剂、KIR抑

制剂或A2aR抑制剂。在一些方面,至少一种免疫检查点抑制剂为抗CTLA-4抗体。在一些方面,抗CTLA-4抗体为曲美木单抗或伊匹木单抗。在某些方面,至少一种免疫检查点抑制剂为抗杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)抗体。在一些实施例中,抗KIR抗体为利鲁单抗。在一些方面,PD-L1抑制剂为德瓦鲁单抗、阿特珠单抗或阿维单抗。在一些方面,PD-L2抑制剂为rHIgM12B7。在一些方面,LAG3抑制剂为IMP321或BMS-986016。在一些方面,A2aR抑制剂为PBF-509。

[0277] 共刺激受体激动剂可以是抗OX40抗体(例如,MEDI6469、MEDI6383、MEDI0562和MOXR0916)、抗GITR抗体(例如,TRX518和MK-4166)、抗CD137抗体(例如,Urelumab和PF-05082566)、抗CD40抗体(例如,CP-870,893和Chi Lob 7/4),或抗CD27抗体(例如,Varlilumab,也称为CDX-1127)。先天免疫细胞的刺激剂包括但不限于KIR单克隆抗体(例如,利鲁单抗)、细胞毒性抑制受体的抑制剂(例如,NKG2A,也称为KLRC和CD94,诸如单克隆抗体莫纳利珠单抗(monalizumab)和抗CD96,也称为TACTILE),以及toll样受体(TLR)激动剂。TLR激动剂可以是BCG、TLR7激动剂(例如,聚OICLC和咪喹莫特)、TLR8激动剂(例如,瑞喹莫德)或TLR9激动剂(例如,CPG7909)。先天性免疫细胞(诸如自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和树突状细胞)的激活剂包括IDO抑制剂、TGFβ抑制剂、IL-10抑制剂。先天性免疫的示例性活化剂为吲哚莫德(Indoximod)。在一些方面,免疫疗法为干扰素基因(STING)激动剂的刺激剂(Corrales等人,2015)。

[0278] 预期用于本公开的方法的其他免疫疗法包括由Tchekmedyian等人,2015描述的那些免疫疗法,该文献以引用方式合并于本文。免疫疗法可包括抑制T调节细胞(Treg)、髓源性抑制细胞(MDSC)和癌症相关的纤维母细胞(CAF)。在一些实施例中,免疫疗法为肿瘤疫苗(例如,全肿瘤细胞疫苗、树突状细胞疫苗、DNA和/或RNA表达疫苗、肽和重组肿瘤相关抗原疫苗),或过继细胞疗法(ACT)(例如,T细胞、自然杀伤细胞、TIL和LAK细胞)。可以用嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)将T细胞和/或自然杀伤细胞工程改造为特异性肿瘤抗原。如本文所用,嵌合抗原受体(或CAR)可指特异于所关注抗原的任何经工程改造的受体,所述嵌合抗原受体当在T细胞或自然杀伤细胞中表达时,将CAR的特异性赋予到T细胞或自然杀伤细胞上。一旦使用标准分子技术创建了表达嵌合抗原受体的T细胞或自然杀伤细胞,就可以将其导入患者体内,如采用诸如过继细胞转移的技术。在一些方面,T细胞是个体中活化的CD4和/或CD8 T细胞,其特征在于产生γ-IFN″的CD4和/或CD8 T细胞和/或相对于施用组合之前增强的细胞溶解活性。CD4和/或CD8 T细胞可表现出选自由IFN-γ、TNF-α和白介素组成的组的细胞因子的增加释放。CD4和/或CD8 T细胞可以是效应记忆T细胞。在某些实施例中,CD4和/或CD8效应记忆T细胞的特征在于具有$CD44^{高}CD62L^{低}$表达。

[0279] 在某些方面,可以将两种或更多种免疫疗法与p53、ADP和/或MDA-7基因疗法以及CD122/CD132激动剂组合,包括附加免疫检查点抑制剂与T细胞共刺激受体激动剂的组合,或与TIL ACT的组合。其他组合包括T细胞检查点阻断加上共刺激受体激动剂、用于改善先天免疫细胞功能的T细胞检查点阻断、检查点阻断加上IDO抑制,或检查点阻断加上过继性T细胞转移。在某些方面,免疫疗法包括抗PD-L1免疫检查点抑制剂(例如,阿维单抗)、4-1BB(CD-137)激动剂(例如,Utomilumab)和OX40(TNFRS4)激动剂的组合。免疫疗法可以与组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂(诸如5-氮杂胞苷和恩替诺特(entinostat))组合。

[0280] 免疫疗法可以是癌症疫苗,所述癌症疫苗包含一种或多种癌症抗原,特别是蛋白

质或其免疫原性片段;编码所述癌症抗原,特别是蛋白质或其免疫原性片段的DNA或RNA;癌细胞裂解物;和/或来自肿瘤细胞的蛋白质制备物。如本文所用,癌症抗原是存在于癌细胞中的抗原性物质。原则上,在癌细胞中产生的与正常细胞相比在癌细胞中上调的任何蛋白质或由于突变而具有异常结构的蛋白质都可以充当癌症抗原。原则上,癌症抗原可以是突变的或过表达的致癌基因和肿瘤抑制基因的产物、其他突变的基因的产物、过表达或异常表达的细胞蛋白、由致癌病毒产生的癌症抗原、癌胚胎抗原(oncofetal antigen)、改变的细胞表面糖脂和糖蛋白,或细胞类型特异性分化抗原。癌症抗原的示例包括ras和p53基因的异常或过表达产物。其他示例包括组织分化抗原、突变蛋白抗原、致癌病毒抗原、癌症-睾丸抗原和血管或基质特异性抗原。组织分化抗原是特异于某种类型的组织的那些抗原。突变蛋白抗原可能更加特异于癌细胞,因为正常细胞不应含有这些蛋白质。正常细胞将在其MHC分子上显示正常蛋白质抗原,而癌细胞将显示突变形式。一些病毒蛋白参与形成癌症,并且一些病毒抗原也是癌症抗原。癌症-睾丸抗原是主要在睾丸生殖细胞中表达,但也在胚胎卵巢和滋养细胞中表达的抗原。一些癌细胞异常地表达这些蛋白质并因此呈递这些抗原,从而允许通过特异于这些抗原的T细胞进行攻击。这种类型的示例性抗原是CTAG1 B和MAGEA1,以及Rindopepimut,一种靶向表皮生长因子受体(EGFR)vlll变体的14聚体皮内可注射肽疫苗。当与本文所述的CD95/CD95L信号传导系统的抑制剂组合使用时,Rindopepimut特别适合用于治疗胶质母细胞瘤。同样,通常以非常低的量产生但在癌细胞中产量急剧增加的蛋白质可能触发免疫应答。此类蛋白质的示例为酪氨酸酶,其是黑色素生产所必需的。正常地,酪氨酸酶以极小的量产生,但是其在黑素瘤细胞中的水平却非常高。癌胚胎抗原是另一类重要的癌症抗原。示例是甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)。这些蛋白质通常在胚胎发育早期产生,并在免疫系统完全发育时消失。因此,不会发展出对这些抗原的自体耐受。感染了致癌病毒(例如EBV和HPV)的细胞也产生异常蛋白质。被这些病毒感染的细胞含有潜伏性病毒DNA,该病毒DNA被转录并且所得蛋白质产生免疫应答。癌症疫苗可以包括肽癌疫苗,其在一些实施例中是个性化的肽疫苗。在一些实施例中,肽癌疫苗是多价长肽疫苗、多肽疫苗、肽混合物疫苗、杂合肽疫苗或肽脉冲树突状细胞疫苗。

[0281] 免疫疗法可以是抗体,诸如多克隆抗体制备物的一部分,或者可以是单克隆抗体。该抗体可以是人源化抗体、嵌合抗体、抗体片段、双特异性抗体或单链抗体。本文所公开的抗体包括抗体片段,诸如但不限于Fab、Fab′和F(ab′)2、Fd、单链Fvs(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fvs(sdfv)和包含VL或VH结构域的片段。在一些方面,抗体或其片段特异性地结合表皮生长因子受体(EGFR1、Erb-B1)、HER2/neu(Erb-B2)、CD20、血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子受体(IGF-1R)、TRAIL受体、上皮细胞粘附分子、癌胚抗原、前列腺特异性膜抗原、粘蛋白-1、CD30、CD33或CD40。

[0282] 可与本文提供的组合物组合使用的单克隆抗体的示例包括但不限于曲妥珠单抗(抗HER2/neu抗体);帕妥珠单抗(抗HER2 mAb);西妥昔单抗(表皮生长因子受体EGFR的嵌合单克隆抗体);帕尼单抗(抗EGFR抗体);尼妥珠单抗(抗EGFR抗体);扎鲁木单抗(Zalutumumab)(抗EGFR mAb);耐昔妥珠单抗(抗EGFR mAb);MDX-210(人源化抗HER-2双特异性抗体);MDX-210(人源化抗HER-2双特异性抗体);MDX-447(人源化抗EGF受体双特异性抗体);利妥昔单抗(嵌合鼠/人抗CD20 mAb);奥滨尤妥珠单抗(Obinutuzumab)(抗CD20

mAb);奥法木单抗(抗CD20 mAb);托西莫单抗I131(抗CD20 mAb);替坦异贝莫替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan)(抗CD20 mAb);贝伐单抗(抗VEGF mAb);雷莫卢单抗(抗VEGFR2 mAb);兰尼单抗(抗VEGF mAb);阿柏西普(与IgG1 Fc融合的VEGFR1和VEGFR2的细胞外结构域);AMG386(与IgG1 Fc融合的血管生成素-1和血管生成素-2结合肽);戴妥珠单抗(Dalotuzumab)(抗IGF-1R mAb);吉妥珠单抗奥唑米星(Gemtuzumab ozogamicin)(抗CD33 mAb);阿仑单抗(抗Campath-1/CD52 mAb);本妥昔单抗(Brentuximab vedotin)(抗CD30mAb);卡妥索单抗(Catumaxomab)(靶向上皮细胞粘附分子和CD3的双特异性mAb);他那莫单抗(Naptumomab)(抗5T4 mAb);吉利妥昔单抗(Girentuximab)(抗碳酸酐酶ix);或法勒珠单抗(Farletuzumab)(抗叶酸受体)。其他示例包括诸如以下抗体:Panorex™(17-1A)(鼠单克隆抗体);Panorex(@(17-1A)(嵌合鼠单克隆抗体);BEC2(抗独特型mAb,模仿GD表位)(使用BCG);Oncolym(Lym-1单克隆抗体);SMART M195 Ab、人源化13′1 LYM-1(Oncolym)、Ovarex(B43.13、抗独特型小鼠mAb);与腺癌上的EGP40(17-1A)泛癌抗原结合的3622W94 mAb;Zenapax(SMART抗Tac(IL-2受体);SMART M195 Ab、人源化Ab、人源化的);NovoMAb-G2(泛癌特异性Ab);TNT(针对组蛋白抗原的嵌合mAb);Gliomab-H(单克隆-人源化Ab);GNI-250Mab;EMD-72000(嵌合EGF拮抗剂);LymphoCide(人源化IL.L.2抗体);以及MDX-260双特异性的、靶向GD-2的ANA Ab、SMART IDIO Ab、SMART ABL 364Ab或ImmuRAIT-CEA。抗体的示例包括在美国专利号5,736,167、美国专利号7,060,808和美国专利号5,821,337中所述的那些。

[0283] 抗体的其他示例包括扎木单抗(Zanulimumab)(抗CD4 mAb)、克立昔单抗(Keliximab)(抗CD4 mAb);伊匹木单抗(MDX-101;抗CTLA-4 mAb);曲美木单抗(Tremilimumab)(抗CTLA-4mAb);(达利珠单抗(Daclizumab)(抗CD25/IL-2R mAb);巴利昔单抗(Basiliximab)(抗CD25/IL-2R mAb);MDX-1106(抗PD1 mAb);针对GITR的抗体;GC1008(抗TGF-β抗体);美替木单抗(metelimumab)/CAT-192(抗TGF-β抗体);乐地单抗(lerdelimumab)/CAT-152(抗TGF-β抗体);ID11(抗TGF-β抗体);地诺单抗(Denosumab)(抗RANKL mAb);BMS-663513(人源化抗4-1BB mAb);SGN-40(人源化抗CD40 mAb);CP870,893(人抗CD40 mAb);英利昔单抗(Infliximab)(嵌合抗TNF mAb);阿达木单抗(Adalimumab)(人抗TNF mAb);赛妥珠单抗(Certolizumab)(人源化Fab抗TNF);戈利木单抗(Golimumab)(抗TNF);依那西普(Etanercept)(与IgG1 Fc融合的TNFR的细胞外结构域);贝拉西普(Belatacept)(与Fc融合的CTLA-4的细胞外结构域);阿巴西普(Abatacept)(与Fc融合的CTLA-4的细胞外结构域);贝利木单抗(Belimumab)(抗B淋巴细胞刺激剂);莫罗单抗-CD3(Muromonab-CD3)(抗CD3 mAb);奥昔珠单抗(Otelixizumab)(抗CD3 mAb);替利珠单抗(Teplizumab)(抗CD3 mAb);托珠单抗(Tocilizumab)(抗IL6R mAb);REGN88(抗IL6R mAb);优特克单抗(Ustekinumab)(抗IL-12/23mAb);布雷奴单抗(Briakinumab)(抗IL-12/23mAb);那他珠单抗(Natalizumab)(抗α4整联蛋白);维多珠单抗(Vedolizumab)(抗α4β7整联蛋白mAb);T1h(抗CD6 mAb);依帕珠单抗(Epratuzumab)(抗CD22 mAb);依法利珠单抗(Efalizumab)(抗CD11a mAb);和阿塞西普(Atacicept)(跨膜激活剂的细胞外结构域和与Fc融合的钙调节配体相互作用物)。

[0284] a.被动免疫疗法

[0285] 存在多种用于癌症的被动免疫疗法的不同途径。它们可以大致分为以下几类:单

独注射抗体;注射与毒素或化学治疗剂偶联的抗体;注射与放射性同位素偶联的抗体;注射抗独特型抗体;以及最后,清除骨髓中的肿瘤细胞。

[0286] 优选地,人单克隆抗体用于被动免疫疗法中,因为它们在患者中产生很少的副作用或不产生副作用。已经向患有复发性皮肤黑素瘤的患者病变内地施用了针对神经节苷脂抗原的人单克隆抗体(Irie和Morton,1986)。在每天或每周进行病变内注射后,在十分之六的患者中观察到了消退。在另一项研究中,通过病变内注射两种人单克隆抗体实现了适度的成功(Irie等人,1989)。

[0287] 可能有利的是施用多于一种针对两种不同抗原的单克隆抗体或甚至具有多重抗原特异性的抗体。治疗方案还可包括如由Bajorin等人(1988)所述的施用淋巴因子或其他免疫增强剂。人单克隆抗体的开发在说明书的其他地方进一步详细描述。

[0288] b.主动免疫疗法

[0289] 在主动免疫疗法中,通常将抗原肽、多肽或蛋白质、或自体或同种异体肿瘤细胞组合物或"疫苗"与独特的细菌佐剂一起施用(Ravindranath和Morton,1991;Morton和Ravindranath,1996;Morton等人,1992;Mitchell等人,1990;Mitchell等人,1993)。在黑素瘤免疫疗法中,那些引发高IgM应答的患者通常比不引发或引发低IgM抗体的患者生存得更好(Morton等人,1992)。IgM抗体往往是瞬时抗体,但是规则的例外似乎是抗神经节苷脂或抗碳水化合物抗体。

[0290] c.过继免疫疗法

[0291] 在过继免疫疗法中,将患者的循环淋巴细胞或肿瘤浸润的淋巴细胞在体外分离,通过淋巴因子诸如IL-2活化或以用于肿瘤坏死的基因转导,然后重新施用(Rosenberg等人,1988;1989)。为了实现这一点,将向动物或人类患者施用免疫学有效量的活化淋巴细胞与本文所述的掺入了佐剂的抗原肽组合物的组合。活化淋巴细胞将最优选是患者自身的细胞,所述细胞早前从血液或肿瘤样品中分离出,并在体外被活化(或"扩增")。这种形式的免疫疗法已产生了若干例黑素瘤和肾肿瘤消退的病例,但与未应答者相比,应答者的百分比很少。最近,当此类过继免疫细胞疗法已经掺入了表达嵌合抗原受体(CAR)的经遗传工程改造的T细胞(称为CAR T细胞疗法)时,观察到了更高的应答率。类似地,将自体和同种异体的自然杀伤细胞分离、扩增并且经遗传修饰以表达受体或配体,以促进它们与肿瘤细胞的结合和对肿瘤细胞的杀伤。

[0292] 4.其他药剂

[0293] 设想可以将其他药剂与本文提供的组合物组合使用,以改善治疗的治疗功效。这些附加药剂包括免疫调节剂、影响细胞表面受体上调和GAP接合的药剂、细胞生长抑制和分化剂、细胞粘附抑制剂,或增加过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂。免疫调节剂包括肿瘤坏死因子;干扰素α、β和γ;IL-2和其他细胞因子;或MIP-1、MIP-1β、MCP-1、RANTES和其他趋化因子。还设想到细胞表面受体或其配体(诸如Fas/Fas配体,DR4或DR5/TRAIL)的上调将通过建立对过度增殖细胞的自分泌或旁分泌效应来增强本文提供的组合物的凋亡诱导能力。通过增加GAP接合数来增加细胞间信号传导,将增加对邻近的过度增殖细胞群的抗过度增殖效应。在其他实施例中,细胞生长抑制或分化剂可以与本文提供的组合物组合使用,以改善治疗的抗过度增生功效。预期细胞粘附抑制剂改善本发明的功效。细胞粘附抑制剂的示例为粘着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。还设想可以将增加过度增殖细胞对凋亡

的敏感性的其他药剂(诸如抗体c225)与本文提供的组合物组合使用,以改善治疗功效。

[0294] 在进一步的实施例中,其他药剂可以是一种或多种溶瘤病毒。这些溶瘤病毒可经工程改造以表达p53和/或IL24,和/或表达除p53和/或IL24以外的基因,诸如细胞因子、ADP或热激蛋白。溶瘤病毒的示例包括单链或双链DNA病毒、RNA病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、痘病毒、牛痘病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒、艾巴氏病毒、流感病毒和呼肠孤病毒、粘液瘤病毒、马拉巴病毒、弹状病毒、enadenotucirev或柯萨奇病毒。在一个特定实施例中,其他药剂为talimogene laherparepvec(T-VEC),其是经遗传工程改造以表达GM-CSF的溶瘤单纯性疱疹病毒。Talimogene laherparepvec,HSV-1[菌株JS1]ICP34.5-/ICP47-/hGM-CSF(先前称为OncoVEX$^{GM\ CSF}$),是一种瘤内递送的溶瘤免疫疗法,其包含在实体瘤中选择性复制的免疫增强的HSV-1。(Lui等人,Gene Therapy,10:292-303,2003;美国专利号7,223,593和美国专利号7,537,924;这些文献以引用方式合并于本文)。在2015年10月,美国FDA批准将商标名为IMLYGIC^{TM}的T-VEC用于治疗患有无法手术的肿瘤的患者的黑素瘤。在例如IMLYGIC^{TM}包装插页(Amgen,2015)和美国专利公布号US2015/0202290中描述了T-VEC的特征和施用方法,这两篇文献均以引用方式合并于本文。例如,talimogene laherparepvec通常通过以下方式来施用:在第1周的第1天以高达4.0ml的10^6个噬菌斑形成单位/mL(PFU/mL)的剂量,之后在第4周的第1天然后每2周(±3天)以至多4.0ml的10^8PFU/mL的剂量瘤内注射到可注射的皮肤、皮下和淋巴结肿瘤中。要注射到一个或多个肿瘤中的talimogene laherparepvec的推荐体积取决于该一个或多个肿瘤的大小,并且应根据注射体积指南确定。尽管T-VEC已显示出在黑素瘤患者中的临床活性,但是许多癌症患者对T-VEC治疗无应答或停止应答。在一个实施例中,可以在T-VEC疗法之后、期间或之前施用p53、ADP和/或MDA-7核酸以及至少一种CD122/CD132激动剂,诸如以逆转治疗抗性。示例性溶瘤病毒包括但不限于Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12、Cavatak^{TM}、CG0070、DNX-2401、G207、HF10、IMLYGIC^{TM}、JX-594、MG1-MA3、MV-NIS、OBP-301、Reolysin®、Toca 511、安柯瑞(H101)、Onyx-015、H102、H103和RIGVIR。其他示例性溶瘤病毒描述于例如国际专利公开号WO2015/027163、WO2014/138314、WO2014/047350和WO2016/009017中;这些国际专利公开均以引用方式合并于本文。

[0295] 在某些实施例中,激素疗法也可以与本发明的实施例结合使用,或者与先前描述的任何其他癌症疗法组合使用。激素的使用可用于治疗某些癌症(诸如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌或宫颈癌),以降低某些激素(诸如睾丸激素或雌激素)的水平或阻断其效应。这种治疗通常与至少一种其他癌症疗法组合使用,以作为治疗选项或降低转移风险。

[0296] 在一些方面,附加抗癌剂是抑制参与蛋白激酶或生长因子信号传导途径的受体的蛋白激酶抑制剂或单克隆抗体,诸如EGFR、VEGFR、AKT、Erb1、Erb2、ErbB、Syk、Bcr-Abl、JAK、Src、GSK-3、PI3K、Ras、Raf、MAPK、MAPKK、mTOR、c-Kit、eph受体或BRAF抑制剂。蛋白激酶或生长因子信号传导途径抑制剂的非限制性示例包括阿法替尼、阿昔替尼、贝伐单抗、博舒替尼、西妥昔单抗、克唑替尼、达沙替尼、厄洛替尼、福他替尼、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、乐伐替尼、木利替尼、尼洛替尼、帕尼单抗、帕唑帕尼、哌加他尼、兰尼单抗、鲁索替尼、塞卡替尼、索拉非尼、舒尼替尼、曲妥珠单抗、凡德他尼、AP23451、维莫非尼、MK-2206、GSK690693、A-443654、VQD-002、米替福新、哌立福新、CAL101、PX-866、LY294002、雷帕霉素、替西罗莫司、依维莫司、地磷莫司、阿伏西地、金雀异黄素、司美替尼、AZD-6244、瓦他拉尼、

P1446A-05、AG-024322、ZD1839、P276-00、GW572016,或它们的混合物。

[0297] 在一些方面,PI3K抑制剂选自由以下项组成的PI3K抑制剂的组:布帕尼西(buparlisib)、艾代拉里斯(idelalisib)、BYL-719、达托里昔布(dactolisib)、PF-05212384、匹替利司(pictilisib)、库潘尼西(copanlisib)、库潘尼西盐酸(copanlisib dihydrochloride)、ZSTK-474、GSK-2636771、杜韦利昔布(duvelisib)、GS-9820、PF-04691502、SAR-245408、SAR-245409、松里昔布(sonolisib)、Archexin、GDC-0032、GDC-0980、阿哌利塞(apitolisib)、匹拉利塞(pilaralisib)、DLBS 1425、PX-866、voxtalisib、AZD-8186、BGT-226、DS-7423、GDC-0084、GSK-2126458、INK-1117、SAR-260301、SF-1126、AMG-319、BAY-1082439、CH-5132799、GSK-2269557、P-7170、PWT-33597、CAL-263、RG-7603、LY-3023414、RP-5264、RV-1729、他塞利昔布(taselisib)、TGR-1202、GSK-418、INCB-040093、帕奴利塞(Panulisib)、GSK-1059615、CNX-1351、AMG-511、PQR-309、17β-羟基渥曼青霉素、AEZS-129、AEZS-136、HM-5016699、IPI-443、ONC-201、PF-4989216、RP-6503、SF-2626、X-339、XL-499、PQR-401、AEZS-132、CZC-24832、KAR-4141、PQR-311、PQR-316、RP-5090、VS-5584、X-480、AEZS-126、AS-604850、BAG-956、CAL-130、CZC-24758、ETP-46321、ETP-47187、GNE-317、GS-548202、HM-032、KAR-1139、LY-294002、PF-04979064、PI-620、PKI-402、PWT-143、RP-6530、3-HOI-BA-01、AEZS-134、AS-041164、AS-252424、AS-605240、AS-605858、AS-606839、BCCA-621C、CAY-10505、CH-5033855、CH-5108134、CUDC-908、CZC-19945、D-106669、D-87503、DPT-NX7、ETP-46444、ETP-46992、GE-21、GNE-123、GNE-151、GNE-293、GNE-380、GNE-390、GNE-477、GNE-490、GNE-493、GNE-614、HMPL-518、HS-104、HS-106、HS一116、HS-173、HS-196、IC-486068、INK-055、KAR 1 141、KY-1 2420、渥曼青霉素、Lin-05、NPT-520-34、PF-04691503、PF-06465603、PGNX-01、PGNX-02、PI 620、PI-103、PI-509、PI-516、PI-540、PIK-75、PWT-458、RO-2492、RP-5152、RP-5237、SB-2015、SB-2312、SB-2343、SHBM-1009、SN 32976、SR-13179、SRX-2523、SRX-2558、SRX-2626、SRX-3636、SRX-5000、TGR-5237、TGX-221、U乙B-5857、WAY-266175、WAY-266176、EI-201、AEZS-131、AQX-MN100、KCC-TGX、OXY-111A、PI-708、PX-2000,以及WJD-008。

[0298] 设想附加的癌症疗法可包括靶向例如以下项的抗体、肽、多肽、小分子抑制剂、siRNA、miRNA或基因疗法:表皮生长因子受体(EGFR、EGFR1、ErbB-1、HER1)、ErbB-2(HER2/neu)、ErbB-3/HER3、ErbB-4/HER4、EGFR配体家族;胰岛素样生长因子受体(IGFR)家族、IGF结合蛋白(IGFBP)、IGFR配体家族(IGF-1R);血小板源生长因子受体(PDGFR)家族、PDGFR配体家族;纤维母细胞生长因子受体(FGFR)家族、FGFR配体家族、血管内皮生长因子受体(VEGFR)家族、VEGF家族;HGF受体家族:TRK受体家族;肝配蛋白(EPH)受体家族;AXL受体家族;白细胞酪氨酸激酶(LTK)受体家族;TIE受体家族、血管生成素1、2;受体酪氨酸激酶样孤儿受体(ROR)受体家族;网柄菌凝素结构域受体(DDR)家族;RET受体家族;KLG受体家族;RYK受体家族;MuSK受体家族;转化生长因子α(TGF-α)、TGF-α受体;转化生长因子-β(TGF-β)、TGF-β受体;白介素13受体α2链(1L13Rα2)、白介素-6(IL-6)、1L-6受体、白介素-4、IL-4受体、细胞因子受体、I类(血细胞生成素家族)和II类(干扰素/1L-10家族)受体、肿瘤坏死因子(TNF)家族、TNF-α、肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族(TNTRSF)、死亡受体家族、TRAIL受体;癌症-睾丸(CT)抗原、谱系特异性抗原、分化抗原、α-辅肌动蛋白-4、ARTC1、断裂点簇集区-埃希尔森(Bcr-abl)融合产物、B-RAF、半胱天冬酶-5(CASP-5)、半胱天冬酶-8(CASP-8)、β-

连环蛋白(CTNNB1)、细胞分裂周期27(CDC27)、周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)、CDKN2A、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD-2、延长因子2(ELF2)、Ets变体基因6/急性髓性白血病1基因ETS(ETC6-AML1)融合蛋白、纤连蛋白(FN)、GPNMB、低密度脂质受体/GDP-L岩藻糖:β-半乳糖2-α-岩藻糖基转移酶(LDLR/FUT)融合蛋白、HLA-A2、在HLA-A2基因中的α2-结构域的α-螺旋的残基170处的精氨酸至异亮氨酸交换(HLA-A*201-R170I)、MLA-A11、热激蛋白70-2突变体(HSP70-2M)、KIAA0205、MART2、黑素瘤遍在突变体1、2、3(MUM-1、MUM-2、MUM-3)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、neo-PAP、肌球蛋白1类、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARα融合蛋白、PRDX5、PTPRK、K-ras(KRAS2)、N-ras(NRAS)、HRAS、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、磷酸丙糖异构酶、BAGE、BAGE-1、BAGE-2,3,4,5、GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8、GnT-V(异常的N-乙酰基葡糖胺基转移酶V、MGAT5)、HERV-K-MEL、KK-LC、KM-HN-1、LAGE、LAGE-1、CTL识别的黑素瘤上抗原(CAMEL)、MAGE-A1(MAGE-1)、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-AS、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-3、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C1、MAGE-C2、粘蛋白1(MUC1)、MART-1/Melan-A(MLANA)、gp100、gp100/Pme117(S1LV)、酪氨酸酶(TYR)、TRP-1、HAGE、NA-88、NY-ESO-1、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-1,2,3,4、TRP2-1NT2、癌胚抗原(CEA)、激肽释放酶4、乳腺球蛋白-A、OA1、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺特异性膜抗原、TRP-1/gp75、TRP-2、adipophilin、黑素瘤缺乏干扰素诱导蛋白2(AIM-2)、BING-4、CPSF、细胞周期蛋白D1、上皮细胞粘附分子(Ep-CAM)、EpbA3、纤维母细胞生长因子-5(FGF-5)、糖蛋白250(gp 250肠羧酸酯酶(iCE)、α-胎蛋白(AFP)、M-CSF、mdm-2(例如,HDM2(也称为MDM2)和/或HDM4的小分子抑制剂,诸如用于逆转其对p53活性的抑制,诸如HDM201、顺式咪唑啉(例如,Nutlins)、苯二氮卓类(BDP)、螺-羟吲哚)、MUCI、p53(TP53)、PBF、FRAME、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU2AS、SOX10、STEAP1、生存素(BIRCS)、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、端粒酶、维尔姆斯瘤基因(WT1)、SYCP1、BRDT、SPANX、XAGE、ADAM2、PAGE-5、LIP1、CTAGE-1、CSAGE、MMA1、CAGE、BORIS、HOM-TES-85、AF15q14、HCA66I、LDHC、MORC、SGY-1、SPO11、TPX1、NY-SAR-35、FTHLI7、NXF2 TDRD1、TEX 15、FATE、TPTE、独特型免疫球蛋白、本琼氏蛋白、雌激素受体(ER)、雄激素受体(AR)、CD40、CD30、CD20、CD19、CD33、CD4、CD25、CD3、癌症抗原72-4(CA 72-4)、癌症抗原15-3(CA 15-3)、癌症抗原27-29(CA 27-29)、癌症抗原125(CA 125)、癌症抗原19-9(CA 19-9)、β-人绒毛膜促性腺激素、1-2微球蛋白、鳞状细胞癌抗原、神经元特异性烯醇化酶、热激蛋白gp96、GM2、沙格司亭(sargramostim)、CTLA-4、707丙氨酸脯氨酸(707-AP)、被T细胞4识别的腺癌抗原(ART-4)、癌胚抗原肽-1(CAP-1)、钙激活的氯离子通道2(CLCA2)、亲环蛋白B(Cyp-B)、人印戒肿瘤-2(HST-2)、人乳头瘤病毒(HPV)蛋白(HPV-E6、HPV-E7、主要或次要衣壳抗原等)、艾巴氏病毒(EBV)蛋白(EBV潜伏膜蛋白-LMP1、LMP2;等等)、乙型或丙型肝炎病毒蛋白,以及HIV蛋白。

[0299] IX.制品或试剂盒

[0300] 提供了一种制品或试剂盒,所述制品或试剂盒包含至少一种CD122/CD132激动剂(例如,IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白),并且本文还提供了编码p53、ADP的核酸和/或编码MDA-7的核酸(例如,ad-p53和/或ad-MDA-7)。所述制品或试剂盒还可包括包装插页,该包装插页包括关于将至少一种CD122/CD132激动剂与肿瘤抑制基因疗法结合使用以治疗或延缓个体中的癌

症进展或增强患有癌症的个体的免疫功能的使用说明书。本文所述的任何CD122/CD132激动剂以及编码p53、ADP的核酸和/或编码MDA-7的核酸都可包含在制品或试剂盒中。试剂盒可另外包括细胞外基质降解蛋白或编码细胞外基质降解蛋白的表达构建体。

[0301] 在一些实施例中,至少一种优先的CD122/CD132激动剂(例如,IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白)以及编码p53、ADP的核酸和/或编码MDA-7的核酸在同一容器或分开的容器中。合适的容器包括例如瓶、小瓶、袋和注射器。容器可以由多种材料形成,所述多种材料为诸如玻璃、塑料(诸如聚氯乙烯或聚烯烃)或金属合金(诸如不锈钢或哈氏合金)。在一些实施例中,容器装盛制剂,并且在容器上或与容器相关的标签可指示使用说明书。制品或试剂盒还可包含从商业和用户立场出发期望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和带有使用说明书的包装插页。在一些实施例中,制品还包含一种或多种其他药剂(例如,化学治疗剂和抗肿瘤剂)。用于一种或多种药剂的合适容器包括例如瓶、小瓶、袋子和注射器。

[0302] X.实例

[0303] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施例。本领域技术人员应该理解,以下实例中所公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,因此可以认为构成其实践的优选方式。然而,根据本公开,本领域的技术人员应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的特定实施例进行许多改变并且仍获得相同或相似的结果。

[0304] 实例1-用于增强局部和全身功效并逆转对先前免疫疗法的抗性的Ad-p53和Ad-IL24肿瘤抑制因子和溶瘤病毒(VirRx007)免疫基因疗法与一种或多种优先的CD122/132激动剂和免疫检查点抑制剂的组合

[0305] 在具有免疫能力的动物肿瘤模型中证明了将CD122/CD132激动剂与肿瘤抑制因子和病毒溶瘤免疫基因疗法相组合以增强局部和全身性抗肿瘤效应(包括对先前免疫疗法有抗性的肿瘤)的功效。利用以下治疗方法、剂量和时间表:

[0306] 动物、肿瘤接种和测量:利用不含病原体的C57BL/6(B6)雄性小鼠(6-8周龄,获自Charles River Labs)。用B16F10黑素瘤细胞(ATCC,5×10^5个细胞/小鼠,悬浮在无血清培养基中)皮下注射到动物的右侧腹部,以形成“原发性肿瘤”。当肿瘤大小达到约50mm^{3}时(这称为治疗第1天)开始治疗。通过测量肿瘤的长度(L)和宽度(w)来监测肿瘤生长,并且使用以下公式计算肿瘤体积:体积=0.523L(w)^2。监测动物长达40天,并在肿瘤达到约2000mm^{3}时处死动物。

[0307] 病毒载体:将编码p53或IL24肿瘤抑制基因表达的复制缺陷型人5型腺病毒(Ad5)和经工程改造以过表达ADP(VirRx007)的有复制能力的溶瘤腺病毒用于这些实验。已经在别处报道了关于Ad5/CMV p53、IL24和VirRx007载体的载体的构建、特性和纯化(Zhang 1994;Mhashilkar等人,2001;US 7589069 B1)。瘤内地施用三至四剂病毒载体。对于Ad-p53和/或ADP(VRX-007),在第2天、第5天和第8天施用病毒载体。对于Ad-IL24,在第3天、第5天、第7天和第9天(以48小时的间隔)施用载体。在第21天,在评估病毒治疗与CD122/CD132激动剂和免疫检查点抑制剂的组合的组中施用附加瘤内病毒注射。每个病毒剂量含有在50μl体积中的5×10^9个病毒颗粒。

[0308] CD122/CD132激动剂治疗:对于B16F10模型,将鼠IL-2(eBioscience或R&D Systems Minneapolis,MN)与S4B6-1抗小鼠IL2抗体(Bioxcell,West Lebanon,NH或BD Biosciences)以2:1的摩尔比混合以产生所述优先的CD122/CD132激动剂免疫复合物。对于涉及人T细胞的研究,将人IL-2与MAB602抗人IL-2抗体(R&D Systems)混合。在第2天、第6天和第10天以2.5μg IL2/剂量腹膜内地(IP)施用IL-2/S4B6或IL-2/MAB602mAb免疫复合物。另选地,在第2天至第6天注射IL-2/S4B6 mAb免疫复合物(1.0μg IL2/剂量)。通过在室温下将抗IL-2单克隆与IL-2一起孵育15分钟来制备免疫复合物。

[0309] 在一些鼠类实验中,CD122/CD132激动剂由重组小鼠IL-15(eBiosciences)和IL-15-Rα-Fc(R&D Systems)构成。通过将这些物质一起在37℃下孵育30分钟来制备免疫复合物,并且一旦肿瘤变得可触知,就连续两天静脉内(i.v.)注射这种优先的CD122/CD132激动剂免疫复合物。替代时间表是在肿瘤变得可触知后的第3天、第5天和第7天施用腹膜内(IP)注射的IL-15免疫复合物。对于IL-15免疫复合物研究,在体内研究中通过静脉内注射每周一次以每次注射2μg重组鼠IL-15的剂量使用重组鼠IL-15(Peprotech,Rocky Hill,CT,USA)。从R&D Systems(Minneapolis,MN)获得重组小鼠IL-15RαFc嵌合蛋白,并将其以与IL-15细胞因子等摩尔的剂量使用(对于免疫复合物中每2ug的IL-15蛋白质,每次注射为12μg的IL-15-Ra-Fc)。

[0310] 免疫检查点抑制剂:为了模拟免疫检查点抑制剂疗法期间肿瘤进展的常见临床状况,在第1天开始腹膜内地以200μg/小鼠的剂量施用抗PD1治疗,并且每3天施用一次直至第30天。在一些实验中,为了评估肿瘤抑制因子和溶瘤病毒VirRx007疗法与优先的CD122/132激动剂和免疫检查点抑制剂的组合对抗先前免疫疗法的肿瘤的效应,肿瘤抑制因子治疗是在抗PD-1疗法时出现肿瘤进展之后开始的,其中第一肿瘤抑制因子疗法剂量是在抗PD-1治疗开始后1至2天给予的。已知B16F10和B16黑素瘤模型对免疫疗法具有高抗性。在这些模型中,免疫检查点抑制剂和优先的CD122/132治疗疗法时的肿瘤进展类似于使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)时的对照治疗。专门为在体内使用而生产的抗小鼠PD-1抗体(CD279)购自BioXcell(产品目录号BE0146)。

[0311] 对先前免疫疗法的抗性的逆转:还证明了肿瘤抑制因子或病毒溶瘤疗法与优先的CD122/CD132激动剂和免疫检查点抑制剂治疗的组合的逆转对先前免疫疗法的抗性的能力。为了模拟免疫检查点抑制剂疗法期间肿瘤进展的常见临床状况,在第1天开始腹膜内地以10mg/kg的剂量施用抗PD1治疗,并且每3天施用一次直至第30天。在一些实验中,为了评估肿瘤抑制因子或病毒溶瘤治疗与CD122/CD132疗法的组合对抗先前免疫疗法的肿瘤的效应,组合治疗是在抗PD-1疗法时出现肿瘤进展之后开始的,其中第一肿瘤抑制因子和CD122/CD132疗法剂量是在抗PD-1治疗开始后1至2天给予的。这些研究是在B16F10和B16黑素瘤模型中执行的,已知所述模型对免疫疗法具有高抗性。在这些模型中,免疫检查点抑制剂疗法时的肿瘤进展类似于使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)时的对照治疗。专门为在体内使用而生产的抗小鼠PD-1抗体(CD279)购自BioXcell(产品目录号BE0146),针对抗PD-L1和免疫调节剂抗LAG-3的抗体也购自BioXcell。每周两次以每次注射100μg腹膜内(IP)注射地施用抗小鼠PD-LI抗体(克隆9G2;Biolegend)和/或抗CTLA-4抗体(克隆UC10-4F10-11;Altor)持续2周。

[0312] 通过测量原发性肿瘤和对侧肿瘤的肿瘤体积并通过T检验、方差分析(ANOVA)、

Kruskal-Wallis ANOVA对它们进行统计分析;以及通过使用卡普兰-梅尔检验和对数秩检验比较生存期,证明了治疗效果及其协同相互作用。

[0313] 出乎意料的是,这些发现证明Ad-p53+CD122/132+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1疗法的出乎意料的实质性协同作用,其促成了与原发性肿瘤和对侧肿瘤的完全肿瘤消退相关的潜在治愈性治疗,对未注射肿瘤抑制因子疗法的远端肿瘤的明显优越远位效应。这些影响促成了格外长的总体生存期。对于Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1疗法,还观察到了肿瘤生长减少和生存期延长的统计学上显著的改善。

[0314] Ad-p53加CD122/132激动剂和检查点抑制剂免疫疗法:通过评定肿瘤体积(在原发性肿瘤和对侧肿瘤中)、完整的肿瘤应答率和生存期,来评估Ad-p53与CD122/132激动剂和抗PD-1治疗的组合的治疗疗效。关于原发性肿瘤体积,图4中的图式示出了接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、Ad-p53、或组合Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1和Ad-p53+CD122/132+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的肿瘤体积。在CD122/132、抗PD-1和CD122/132+抗PD-1疗法期间存在严重的肿瘤进展,所述严重的肿瘤进展通过与Ad-p53疗法组合而逆转。与所述疗法中的任何单独疗法相比,Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1和Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗的功效得到增强。到第21天,用(PBS)、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1和Ad-p53治疗的组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。相比之下,与单独的非Ad-p53疗法或Ad-p53治疗中的任一者相比,使用Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1和Ad-p53+CD122/132+抗PD-1的组合治疗中的每一者均诱导肿瘤体积大幅减小。在第21天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1和Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(p值＜0.0001)。然而,到第30天,Ad-p53+CD122/132和Ad-p53+抗PD-1治疗组的平均肿瘤体积也已经超过了2,000mm^3。重要的是,在第30天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了抗肿瘤效应的协同仅在Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组合中保持(总体p值＜0.0001,并且与每个其他治疗组相比,单独p值＜0.0001)。

[0315] Ad-p53治疗组:完全肿瘤应答率的评估。一般认为,对疗法的完全肿瘤应答与重要的治疗益处相关,并且是治愈结局所必需的。如图5所示,对于p53治疗组及其对照,仅Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗促成原发性肿瘤和对侧肿瘤两者的完全肿瘤消退。在Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组的60%中观察到了原发性肿瘤和对侧肿瘤两者的完全肿瘤应答,并且在其他治疗组中的70只动物对原发性肿瘤和对侧肿瘤没有完全肿瘤应答(通过比较Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组与所有其他治疗组中的动物的双侧费希尔精确检验所得的p值＜0.0001;通过比较Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的双侧费希尔精确检验所得的p值＜0.011)。出乎意料的是,完全肿瘤应答是持久的,并在40天后在Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组的50%中得以维持,从而据推测治愈了这些动物的这些肿瘤。

[0316] Ad-p53治疗组:对于对侧肿瘤生长的全身/远位治疗效应。在啮齿动物中评定原发性肿瘤治疗对于对侧植入肿瘤的全身/远位效应,所述啮齿动物的原发性肿瘤已经接受了Ad-p53疗法中的一种,并且结果在图6中示出。与Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗对原发性肿瘤生长和完全消退率的出乎意料的、显著增强的协同效应相一致,我们还观察到Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗与其他Ad-p53治疗组相比惊人地强大并且有统计学上显著的远位

效应。如图6A所示,对侧肿瘤生长在接受Ad-p53+CD122/132+抗PD-1原发性肿瘤治疗的动物中的90％(10只动物中的9只)中被消除。相比之下,在其他Ad-p53治疗组中的动物的62.5％至100％中观察到了对侧肿瘤生长。对侧肿瘤生长的差异是统计学上显著的(通过对所有治疗组的卡方分析所得的p值＝0.0004;通过比较Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的双侧费希尔精确检验所得的p值＜0.0430)。图6B描绘了示出接受使用组合Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1或Ad-p53+CD122/132+抗PD-1的三种最有效原发性肿瘤治疗的啮齿动物随时间推移的对侧肿瘤体积的图式。在第22天对这些对侧肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(总体p值＝0.0435)。与Ad-p53+抗PD-1组相比,仅Ad-p53+CD122/132+抗PD-1组显示出对侧肿瘤生长的统计学上显著的降低(p值＝0.0360)。综上所述,这些发现表明,在所有Ad-p53疗法中,只有三联组合Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗通过诱导介导实质性远位效应的强大局部和全身性抗肿瘤免疫力而产生了治愈功效。

[0317] Ad-p53治疗组:治疗功效促成延长的生存期。用PBS、CD122/132+抗PD-1、Ad-p53或组合Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1和Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗的小鼠的卡普兰-梅尔生存曲线在图7中示出。通过对数秩检验,这些生存曲线存在统计学上显著的差异(总体p＜0.0001;比较Ad-p53+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的p值＜0.0003)。结果还证明了Ad-p53+CD122/132+抗PD-1疗法的出乎意料的实质性协同。在40天后尚未达到Ad-p53+CD122/132+抗PD-1疗法组的中位生存期,并且该治疗组中的80％仍然存活。与之形成鲜明对比的是,其他治疗组中的动物的98％(49/50)均在第30天时死亡,并且具有在10天至28天之间的范围内的中位生存期。

[0318] VirRx007加CD122/132激动剂和检查点抑制剂免疫疗法:还通过评定肿瘤体积(在原发性肿瘤和对侧肿瘤中)、完整的肿瘤应答率和生存期,观察到了VirRx007与CD122/132激动剂和抗PD-1治疗的组合的同样令人印象深刻和出乎意料的治疗功效。关于原发性肿瘤体积,图8中的图式示出了接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、VirRx007、或组合VirRx007+CD122/132、VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的肿瘤体积。在CD122/132、抗PD-1和CD122/132+抗PD-1疗法期间存在严重的肿瘤进展,所述严重的肿瘤进展通过与VirRx007疗法组合而逆转。结果显示,与所述疗法中的任何单独疗法相比,VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的功效得到增强。与使用Ad-p53的发现相反,VirRx007没有证明与CD122/CD132治疗的协同。到第30天,用PBS、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、VirRx007和VirRx007+CD122/CD132治疗的组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。相比之下,与单独的非VirRx007疗法或VirRx007治疗中的任一者相比,使用VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1的组合治疗中的每一者均诱导肿瘤体积的大幅减小。在第30天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(这些治疗的总体或每一者对比VirRx007的p值＜0.0001)。VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗优于VirRx007+抗PD-1(p值＝0.0002)。惊人的是,尽管与VirRx007单一疗法相比,组合治疗VirRx007+CD122/132没有明显益处,但是证明了组合VirRx007+CD122/132+抗PD-1的三联疗法的协同。

[0319] VirRx007治疗组--完全肿瘤应答率的评估。一般认为,对疗法的完全肿瘤应答与

重要的治疗益处相关,并且是治愈结局所必需的。如图9所示,对于VirRx007治疗组及其对照,仅VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗促成原发性肿瘤和对侧肿瘤两者的完全肿瘤消退。在VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组的60%中观察到了原发性肿瘤和对侧肿瘤两者的完全肿瘤应答,并且在其他治疗组中的70只动物对原发性肿瘤和对侧肿瘤没有完全肿瘤应答(通过比较VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组与所有其他治疗组中的动物的双侧费希尔精确检验所得的p值＜0.0001;通过比较VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的双侧费希尔精确检验所得的p值＜0.011)。出乎意料的是,完全肿瘤应答是持久的,并在40天后在VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组的50%中得以维持,从而据推测治愈了这些动物的这些肿瘤。

[0320] VirRx007治疗组--对于对侧肿瘤生长的全身/远位治疗效应。在啮齿动物中评定原发性肿瘤治疗对于对侧植入肿瘤的全身/远位效应,所述啮齿动物的原发性肿瘤已经接受了VirRx007疗法中的一种,并且结果在图10中示出。与VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗对原发性肿瘤生长和完全消退率的出乎意料的、显著增强的协同效应相一致,我们还观察到VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗与其他VirRx007治疗组相比惊人地强大并且有统计学上非常显著的远位效应。如图10A所示,对侧肿瘤生长在接受了VirRx007+CD122/132+抗PD-1原发性肿瘤治疗的动物的80%中被消除。相比之下,在其他VirRx007治疗组中的动物的80%至100%中观察到了对侧肿瘤生长。对侧肿瘤生长的差异是统计学上显著的(通过比较所有治疗组的卡方分析所得的p值＝0.0002;通过比较VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的双侧费希尔精确检验所得的p值＜0.0230)。这些发现暗示,组合VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗诱导强大的全身抗肿瘤免疫力,并且以潜在的治愈功效介导实质性远位效应。图10B描绘了示出接受使用VirRx007+CD122/132、VirRx007+抗PD-1或VirRx007+CD122/132+抗PD-1的三种最有效原发性肿瘤组合治疗的啮齿动物随时间推移的对侧肿瘤体积的图式。在第22天对这些对侧肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(总体p值＝0.0171)。与VirRx007+抗PD-1组相比,仅VirRx007+CD122/132+抗PD-1组显示出对侧肿瘤生长的统计学上显著的降低(p值＝0.0115)。综上所述,这些发现表明,在所有VirRx007疗法中,只有三联组合VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗通过诱导介导实质性远位效应的强大局部和全身性抗肿瘤免疫力而产生了治愈功效。

[0321] VirRx007治疗组--治疗功效促成延长的生存期。用PBS、CD122/132+抗PD-1、VirRx007、或组合VirRx007+CD122/132、VirRx007+抗PD-1和VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗的小鼠的卡普兰-梅尔生存曲线在图11中示出。通过对数秩检验,这些生存曲线存在统计学上显著的差异(总体p＜0.0001;比较VirRx007+CD122/132+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的p值＜0.0005)。结果还证明了VirRx007+CD122/132+抗PD-1疗法的出乎意料的实质性协同。在40天后尚未达到VirRx007+CD122/132+抗PD-1疗法组的中位生存期,并且该治疗组中的90%仍然存活。与之形成鲜明对比的是,其他治疗组中的动物的98%(49/50)均在第40天时死亡,并且具有在10天至33天之间的范围内的中位生存期。惊人的是,尽管与VirRx007单一疗法相比,组合治疗VirRx007+CD122/132没有明显生存益处,但是证明了组合VirRx007+CD122/132+抗PD-1的三联疗法的协同。

[0322] Ad-IL24加CD122/132激动剂和检查点抑制剂免疫疗法:通过评定原发性肿瘤体积

和存活期,也观察到了Ad-IL24与CD122/132激动剂和抗PD-1治疗的组合的类似优越治疗功效。关于原发性肿瘤体积,图12中的图式示出了接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、Ad-IL24、或组合Ad-IL24+CD122/132和Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的肿瘤体积。在CD122/132、抗PD-1和CD122/132+抗PD-1疗法期间存在严重的肿瘤进展,所述严重的肿瘤进展通过与Ad-IL24疗法组合而逆转。与所述疗法中的任何单独疗法相比,Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1疗法的功效得到增强。到第16天,用PBS、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1和Ad-IL24治疗的组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。相比之下,与单独的非Ad-IL24疗法或Ad-IL24治疗中的任一者相比,使用Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1的组合治疗诱导肿瘤体积的显著减小。在第16天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(p值＜0.0001)。与Ad-IL24(p＝0.0025)或CD122/132+抗PD-1治疗(p值＜0.0001)相比,Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治疗的肿瘤体积存在统计学上显著的减小。

[0323] Ad-IL24治疗组--治疗功效促成延长的生存期。用PBS、CD122/132+抗PD-1、Ad-IL24或组合Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1治疗的小鼠的卡普兰-梅尔生存曲线在图13中示出。通过对数秩检验,这些生存曲线存在统计学上显著的差异(p＜0.0001)。结果证明了Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1疗法的出乎意料的实质性协同。Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1疗法组的中位生存期得到了协同地提高。PBS、CD122/132+抗PD-1和IL24治疗组中的所有动物均在第16天死亡,而Ad-IL24+CD122/132+抗PD-1疗法组中的动物中的50％在第19天存活着。与单独的Ad-IL24(p＝0.0003)或CD122/132+抗PD-1治疗组(p＜0.0001)相比,Ad-IL24+CD122/132+抗PD1疗法组显示出统计学上显著延长的生存期。有趣的是,与CD122/132+抗PD-1双联体相比,Ad-IL24+CD122/132双联体具有惊人的优越功效(通过对数秩检验所得的p＝0.0002,数据未示出)。

[0324] 带有Ad-荧光素酶(Ad-Luc)的阴性对照。Ad-Luc对照+CD122/132激动剂+抗PD-1:肿瘤体积。图14中的图式描绘了接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132、抗PD-1、CD122/132+抗PD-1、Ad-Luc对照、或组合Ad-Luc对照+CD122/132、Ad-Luc对照+抗PD-1和Ad-Luc对照+CD122/132+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的原发性肿瘤体积。与使用Ad-p53、VirRx007和Ad-IL24的治疗相比,当Ad-Luc与抗PD-1、CD122/132或CD122/132+抗PD-1治疗组合时,治疗功效没有显著的增加。到第16天,所有组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。在第16天对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较不是统计学上显著的(p值＝0.1212;任何治疗组之间的平均肿瘤体积均不是统计学上显著的)。

[0325] 与使用CD122/132+抗PD-1的Ad-Luc阴性对照相比,分别使用Ad-p53、VirRx007和Ad-IL24与CD122/132+抗PD-1的组合的“三联疗法”的优势。关于存活期,图15揭示与使用Ad-Luc+CD122/132+抗PD-1的治疗相比,分别使用Ad-p53、VirRx007和Ad-IL24与CD122/132+抗PD-1的组合的“三联疗法”各自具有统计学上显著延长的存活期。通过对数秩检验,这些生存曲线存在统计学上显著的差异(p＜0.0001)。与Ad-Luc+CD122/132+抗PD-1三联疗法对照(通过对数秩检验,Ad-p53和VirRx007与CD122/132+抗PD-1三联疗法的组合两者的p值均＜0.0001;Ad-IL24与CD122/132+抗PD-1的组合的p＜0.015)相比,Ad-p53、VirRx007和Ad-IL24中的每一者与CD122/132+抗PD-1组合的三联疗法均显示出统计学上显著延长的生存期。

[0326] 其中CD122/CD132激动剂由重组小鼠IL-15和IL-15-Rα-Fc构成的实验。在这些研究中,优先的CD122/CD132激动剂是通过将这些药剂一起在37℃下孵育30分钟而制备的,并且在肿瘤可触知之后的第3天、第5天和第7天腹膜内(IP)注射所得的免疫复合物。

[0327] Ad-p53加上CD122/132(IL15)激动剂和检查点抑制剂免疫疗法--肿瘤体积:通过评定肿瘤体积(在原发性肿瘤和对侧肿瘤中)和生存期,来评估Ad-p53与基于IL15的CD122/132激动剂和抗PD-1疗法的组合的治疗功效。关于原发性肿瘤体积,图16中的图式示出了接受磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照、CD122/132+抗PD-1、单独Ad-p53或组合Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1的啮齿动物随时间推移的肿瘤体积。在PBS、CD122/132+抗PD-1和Ad-p53疗法期间存在严重的肿瘤进展。与上述较早的Ad-p53组合治疗结果相一致,与所述疗法中的任一疗法相比,Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗的功效显著提高。到第30天,用PBS、CD122/132+抗PD-1和Ad-p53治疗的组的平均肿瘤体积均超过2,000mm^3。相比之下,使用Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1的组合治疗诱导肿瘤体积的大幅减小。对肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(总体p值＜0.0001,并且与每个其他治疗组相比,单独p值＜0.0001)。

[0328] Ad-p53加CD122/132(IL15)激动剂和检查点抑制剂免疫疗法--对于对侧肿瘤生长的全身性/远位治疗效应。在啮齿动物中评定原发性肿瘤治疗对于对侧植入肿瘤的全身/远位效应,所述啮齿动物的原发性肿瘤已经接受了Ad-p53疗法中的一种,并且结果在图17中示出。与图16中所示的Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗对原发性肿瘤生长的出乎意料的实质上增加的协同效应一致,我们还观察到了与其他Ad-p53治疗组相比,Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗的惊人强大并且统计学上显著的远位效应。图17描绘了示出接受使用组合Ad-p53+CD122/132、Ad-p53+抗PD-1或Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1的原发性肿瘤治疗的啮齿动物随时间推移的对侧肿瘤体积的图式。在第22天对这些对侧肿瘤体积的统计方差分析(ANOVA)比较确定了Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗的抗肿瘤效应的协同(总体p值＝0.0433)。与Ad-p53+抗PD-1组相比,仅Ad-p53+CD122/132+抗PD-1组显示出对侧肿瘤生长的统计学上显著的降低(p值＝0.0359)。

[0329] Ad-p53加上CD122/132(IL15)激动剂和检查点抑制剂免疫疗法--治疗功效促成延长的生存期。用PBS、CD122/132+抗PD-1、Ad-Luc+CD122/132+抗PD-1对照、Ad-p53或组合Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗的小鼠的卡普兰-梅尔生存曲线在图18中示出。通过对数秩检验,这些生存曲线存在统计学上显著的差异(总体p＜0.0001;比较Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1治疗组与任何其他治疗组的p值＜0.0001)。结果还证明了Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1疗法的出乎意料的实质性协同。在Ad-p53+CD122/132(IL15)+抗PD-1疗法组中,动物中的50％在第36天存活着。与之形成鲜明对比的是,其他治疗组中的所有动物均在第22天时死亡,并且具有在10天至18天之间的范围内的中位生存期。

[0330] 实例2-使用经工程改造为具有N1L缺失和IL12表达的牛痘病毒载体和优先的CD122/CD132激动剂与PI3Kδ/γ抑制剂的组合用于局部区域和全身性施用的应用

[0331] 在该治疗方法的另一个实施例中,将称为VVL 15-N1L-IL12的新颖溶瘤牛痘病毒用作附加治疗性病毒,以增强上述实例1中所述的方法的功效。已报道了几种溶瘤牛痘病毒菌株,例如Western Reserve、Wyeth和Lister菌株。已经创建了这些菌株中每一者的各种缺失突变体。Wang等人(专利WO2015/150809A1)已经开发出了具有失活的N1L基因的TK缺陷型

牛痘病毒菌株,其显示出增强的选择性和抗肿瘤功效。据信N1L抑制感染细胞的凋亡以及NF-kB活化。N1L基因缺失已显示,除了调节自然杀伤(NK)细胞应答外,还使得由NF-kB控制的促炎性抗病毒细胞因子增加。N1L缺失衍生物在Wang等人,2015(专利WO2015/150809A1)中描述。为了增强VVL 15N1L的抗肿瘤功效,将GM-CSF、IL-12、IL-21、肿瘤抑制因子和其他治疗基因插入VVL 15N1L载体的N1L区域中。将这些治疗性"武装的"VVL 15N1L载体与如上文实例1中所述的单独或多重的治疗组合使用,以增强治疗的局部和远位效应。

[0332] 除了评估上述实例1和实例2中所述的方法外,还将病毒载体与PI3K抑制剂组合。描述了掺入PI3Kδ或PI3Kγ/δ抑制剂以增强病毒载体的静脉内施用的实例。动物接受浓度为75mg kg^{-1}的IC87114(PI3Kδ抑制剂),然后三小时后将VVL 15N1L载体通过尾静脉以100μl PBS中1×10^{8}PFU/小鼠静脉内注射。在第0天、第3天和第5天给予这种治疗至少三次。将这些治疗与如上所述的相同疗法组合。测量肿瘤大小和动物存活期,并如上所述分析数据,表明与Ad-p53和/或Ad-IL24和/或VVL 15N1L载体、CD122/CD132激动剂、免疫检查点抑制剂和PI3K抑制剂组合的治疗的功效增加。

[0333] 实例3-对在包括免疫疗法在内的先前治疗时进展的患者进行使用瘤内Ad-p53、CD122/CD132激动剂和抗PD-1治疗的组合疗法

[0334] 每个小瓶供应2mL体积的Ad-p53;每mL含有1×10^{12}个病毒颗粒(vp)。其被提供为在含有10%(v/v)甘油作为稳定剂的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的无菌病毒悬浮液。在施用之前将Ad-p53按照方案描述的工序稀释并过滤。根据FDA批准的包装插页说明书施用抗PD-1疗法。CD122/CD132激动剂疗法(例如,IL-2/抗IL-2免疫复合物、IL-15/抗IL-15免疫复合物、IL-15/IL-15受体α-IgG1-Fc(IL-15/IL-15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物、聚乙二醇化的IL-2、聚乙二醇化的IL-15、IL-2突变蛋白和/或IL-15突变蛋白)是以每周一次至每2-4周一次范围内的间隔通过SQ或IV给予的介于5-100ug/kg之间范围内的剂量施用的。CD122/CD132激动剂可以是与IL-15受体α/IgG1 Fc融合蛋白(诸如ALT-803)结合的IL-15突变体(例如,IL-15N72D)。

[0335] 该治疗设计为例如通过用Ad-p53、优先的CD122/CD132激动剂和抗PD-1抗体进行治疗来改善晚期HNSCC患者的预后。组合疗法的临床功效包括评估总体应答率[ORR=部分应答(PR)+完全应答(CR)]、完全消退率(CRR)、持久应答率(DRR=PR+CR维持至少6个月);内脏器官转移的速率和时间;无进展生存期(PFS)和总体生存期(OS)。还评估了研究药物对以下方面的影响:淋巴细胞表型和血清细胞因子、疾病相关的生物标志物、对选定抗原的抗体应答,以及对肿瘤抗原的体液和细胞应答。在探索性分析中,功效终点与PD-L1、PD-L2、免疫细胞浸润物和肿瘤突变负荷生物标志物相关。

[0336] 每28天,患者在第1天、第2天和第3天接受Ad-p53瘤内注射;从第5天开始每2周进行一次纳武单抗输注,并且优先的CD122/CD132激动剂疗法(例如IL2/抗IL2免疫复合物和/或IL15/抗IL15免疫复合物和/或IL15/IL15受体α-IgG1-Fc(IL15/IL15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物和/或聚乙二醇化的IL2和/或聚乙二醇化的IL15和/或IL2突变蛋白和/或IL15突变蛋白)以从每周至每2-4周范围内的间隔以通过SQ或IV给予的介于5-100ug/kg之间的范围内的剂量施用。

[0337] 根据表3中所列肿瘤病变直径确定Ad-p53注射剂量(mL)和Ad-p53注射方法:应使用表3来确定每个肿瘤病变的Ad-p53注射剂量(mL),所述注射剂量对应于在CT或MRI扫描时

测量的肿瘤病变的二维病变直径。应从提供的2mL小瓶中取出以mL为单位计的Ad-p53注射剂量,该小瓶含有1×10^{12}个病毒颗粒(vp)/mL。与所列病变直径相对应的Ad-p53注射剂量(mL)将使得每个肿瘤病变接受至少1×10^{11}个病毒颗粒(vp)/cm^3肿瘤体积的Ad-p53剂量。该治疗剂量是根据以前的Ad-p53临床试验的肿瘤应答、生存期和安全性数据确定的。

[0338] 应治疗所有肿瘤病变。然而,Ad-p53注射剂量(mL)的总和必须小于25mL,因为Ad-p53的MTD为2.5×10^{13}vp/治疗日。下表基于Ad-p53注射剂量(mL)列出了每个病变要利用的对应Ad-p53注射方法。基于Ad-p53注射剂量(mL)的量,采用如下表中列出的针对每个病变的Ad-p53注射方法。小于或等于2mL的Ad-p53注射剂量(mL)应通过细针注射器技术进行施用,而等于或大于4mL的Ad-p53注射剂量(mL)应按照其包装插页使用说明书使用以下所示的Quadra-Fuse设备进行施用。

[0339] 表3:基于病变直径的Ad-p53注射剂量(mL)和Ad-p53注射方法。

[0340]

病变直径[a](cm)(L×W)	Ad-p53注射剂量[b](mL)	Ad-p53注射方法[c]
1x1	1	细针注射器

[0341]

病变直径[a] (cm)（L × W）	Ad-p53 注射剂量[b] (mL)	Ad-p53 注射方法[c]
2x1	2	细针注射器
2x2	2	细针注射器
3x2	2	细针注射器
3x3	2	细针注射器
4x1	2	细针注射器
4x2	2	细针注射器
4x3	2	细针注射器
4x4	4	Quadra-Fuse
5x2	2	细针注射器
5x3	2	细针注射器
5x4	4	Quadra-Fuse
5x5	6	Quadra-Fuse
6x2	2	细针注射器
6x3	4	Quadra-Fuse
6x4	5	Quadra-Fuse
6x5	8	Quadra-Fuse
6x6	12	Quadra-Fuse
7x2	2	细针注射器
7x3	4	Quadra-Fuse
7x4	6	Quadra-Fuse
7x5	8	Quadra-Fuse
7x6	12	Quadra-Fuse
7x7	18	Quadra-Fuse
8x2	2	细针注射器
8x3	4	Quadra-Fuse
8x4	6	Quadra-Fuse
8x5	10	Quadra-Fuse
8x6	14	Quadra-Fuse
8x7	20	Quadra-Fuse
8x8	24	Quadra-Fuse
9x2	2	细针注射器

[0342]

病变直径[a] (cm) (L×W)	Ad-p53 注射剂量[b] (mL)	Ad-p53 注射方法[c]
9x3	4	Quadra-Fuse
9x4	8	Quadra-Fuse
9x5	12	Quadra-Fuse
9x6	16	Quadra-Fuse
9x7	22	Quadra-Fuse
10x2	2	细针注射器
10x3	4	Quadra-Fuse
10x4	8	Quadra-Fuse
10x5	12	Quadra-Fuse
10x6	18	Quadra-Fuse
10x7	24	Quadra-Fuse

[0343] a:病变直径-L是较长的直径,并且W是较短的直径(以cm为单位计)(四舍五入到最接近的整数)。b:来自含有1×10^{12}vp(病毒颗粒)/mL的小瓶的以mL为单位计的Ad-p53注射剂量,其将使得每个肿瘤病变接受约1×10^{11}个病毒颗粒(vp)/cm^3肿瘤体积的Ad-p53剂量。Ad-p53注射剂量(mL)的总和必须小于25mL,因为Ad-p53的MTD为2.5×10^{13}vp/治疗日。c:Ad-p53注射方法。

[0344] Ad-p53注射方法:基于Ad-p53注射剂量(mL)的量,采用如表3中列出的针对每个病变的Ad-p53注射方法。小于或等于2mL的Ad-p53注射剂量(mL)应通过细针注射器技术进行施用,而大于2mL的Ad-p53注射剂量(mL)应通过如所述的Quadra-Fuse设备进行施用。

[0345] 用于小于或等于2mL的Ad-p53注射剂量(mL)的细针注射器:对于Ad-p53注射剂量(mL)小于或等于2mL的病变,应使用带有27号针的标准1mL注射器递送Ad-p53注射剂量(1或2mL)。应将总Ad-p53注射剂量(mL)的四分之一注射到肿瘤病变的每个象限中,在注射的同时将针定位以最大化每个象限内的分布。

[0346] 用于大于2m的Ad-p53注射剂量(mL)的Quadra-Fuse设备:对于Ad-p53注射剂量(mL)大于2mL的病变,应使用Quadra-Fuse递送设备(Rex Medical,PA)递送Ad-p53注射剂量。Quadra-Fuse设备(FDA 1类医疗设备)由中心套管针组成,三个尖头从所述中心套管针以可调节的1-5cm直径径向取向延伸(图3)。

[0347] Quadra-Fuse设备允许如下所述同时在病变的多个区域中精确且扩散地递送药物。

[0348] 1.将来自表3的与肿瘤病变的二维直径匹配的Ad-p53注射剂量(mL)吸入标准注射器中,并附接至Quadra-Fuse设备的延伸管。

[0349] 2.首先对肿瘤病变的下半部分进行治疗,使用设备的深度标记将Quadra-Fuse中心套管针尖端置于病变的最长长度直径(L)的底部处,以匹配CT或超声引导下病变的最长直径。将Quadra-Fuse设备的尖头阵列治疗直径调整为比肿瘤病变的较短宽度直径(W)小1cm(尖头阵列治疗直径=宽度肿瘤直径-1cm)。在将Quadra-Fuse设备调整至尖头阵列治疗

直径之后,将尖头打开,并在此位置处递送Ad-p53注射剂量(mL)的四分之一。(注意:将相同的尖头阵列治疗直径用于每个病变的所有四次Ad-p53注射剂量输注。将尖头缩回,并将设备在相同深度处旋转60度。然后重新打开尖头,并在此位置处递送Ad-p53注射剂量(mL)的第二四分之一。这些工序有效地将Ad-p53治疗剂量的一半递送到了肿瘤病变的下半部分。

[0350] 3.为了治疗肿瘤病变的上半部分,再次将尖头缩回,并且将中心套管针尖端向上移动到肿瘤病变最长L直径的中点。将尖头再次延伸至尖头阵列治疗直径=(宽度肿瘤直径-1cm),并在此位置处递送Ad-p53注射剂量(mL)的第三四分之一。将尖头缩回,并将设备在相同的中点肿瘤深度处旋转60度。然后重新打开尖头,并在此位置处递送Ad-p53注射剂量(mL)的最终四分之一。

[0351] 以这种方式,每个肿瘤病变内的总共48个位点将接受Ad-p53。对于每个尖头阵列部署有总共12个同时药物输注点,每个尖头具有两个通孔(四个流体出口)(4个尖头阵列部署×12=48个Ad-p53递送部位)。

[0352] 5×4cm肿瘤病变的治疗:如表3中列出的,病变直径L(最长直径)=5cm并且W(最短直径)=4cm的肿瘤将通过Quadra-Fuse Ad-p53注射方法,使用4mL的Ad-p53注射剂量进样治疗。

[0353] 在CT或US指导下Quadra-Fuse中心套管针尖端的初始放置应处于较长的L=5cm肿瘤直径的底部处。尖头应扩展到3cm的尖头阵列治疗直径(宽度肿瘤直径4cm-1cm=3cm),并且输注治疗剂量(1mL)的第一四分之一。(注意:将相同的尖头阵列治疗直径用于该病变的所有四次Ad-p53注射剂量输注。将尖头缩回,并将设备在肿瘤的同一底部5cm深处旋转60度。将尖头重新扩展到3em的尖头阵列治疗直径,并输注1mL Ad-p53剂量的第二四分之一。这些工序已将Ad-p53注射剂量的一半分配到了肿瘤的下半部分。

[0354] 为了治疗肿瘤病变的上半部分,将Quadra-Fuse中心套管针的深度提高到最长病变直径=2.5cm的中点。再次将尖头扩展到3cm的尖头阵列治疗直径,并输注治疗剂量(1mL)的第三四分之一。在沿最长的肿瘤直径保持相同的瘤内深度2.5cm时,缩回尖头,旋转中心套管针60°并将尖头重新扩展至3cm的尖头阵列治疗直径,并且输注1mL Ad-p53剂量的第四也即最终四分之一。这些工序已将Ad-p53注射剂量的一半分配到了肿瘤的上半部分。总共地,这些工序将向肿瘤病变内的48个输注点递送4mL的Ad-p53。

[0355] 治疗持续时间:一个治疗周期的持续时间为28天(4周)。治疗周期的第一天将是研究治疗施用的第一天。治疗方案如下:

[0356] 治疗方案:计划的治疗日将为在第1天、第2天和第3天,每隔28天使用Ad-p53。将从第5天开始,每2周施用一次纳武单抗。根据FDA批准的包装插页说明书施用抗PD-1疗法。优先的CD122/CD132激动剂疗法(例如IL2/抗IL2免疫复合物和/或IL15/抗IL15免疫复合物和/或IL15/IL15受体α-IgG1-Fc(IL15/IL15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物和/或聚乙二醇化的IL2和/或聚乙二醇化的IL15和/或IL2突变蛋白和/或IL15突变蛋白)以从每周至每2-4周范围内的间隔以通过SQ或IV给予的介于5-100ug/kg之间的范围内的剂量施用。

[0357] 在研究第28天或第29天,将在新的治疗周期开始之前完成用于评估一个或多个肿瘤位置和测量值的检查。

[0358] 除非存在局部疾病进展(不包括新的可治疗的病变)或不可接受的不良事件,否则将对患者进行三个或更多个周期的治疗。

[0359] 功效评估的标准：

[0360] 1.通过CT或MRI监测肿瘤大小。如果使用CT或MRI,则在第三周期的第1天进行注射之前,在研究的第28天或第29天执行测量,每8周扫描一次。RECIST 1.1标准将适用。

[0361] 2.应答持续时间定义为从应答日到进展时间所经过的时间。

[0362] 3.无进展生存期定义为从随机化之日到进展记录日所经过的时间。

[0363] 4.总体生存期定义为从随机化之日到死亡所经过的时间。

[0364] 5.在探索性分析中,功效终点与PD-L1、PD-L2、免疫细胞浸润物和肿瘤突变负荷生物标志物相关

[0365] 安全性评估：

[0366] 1.不良事件报告。

[0367] 2.体格检查、生命体征、包括CBC在内的的实验室测试、生物化学和尿液分析。

[0368] 3.使用抗体测试的腺载体生物分布。

[0369] Ad-p53功效的有利生物标志物是治疗和研究患者入选标准所需要的,并且包括野生型p53基因序列或如通过在Sobol等人,2012中所述的免疫组织化学方法获得的少于20％p53-阳性的肿瘤细胞。

[0370] 鉴于最近抗PD-1疗法在复发性HNSCC中的突破性认定和加速批准,我们对复发性HNSCC患者中的Ad-p53治疗数据进行荟萃分析,以确定具有改进已公布的抗PD-1结果的潜力的治疗剂量和时间表。荟萃分析涉及具有良好的p53生物标志物谱的复发性HNSCC患者(n＝54),所述患者中的大多数用先前的手术、放射和基于铂的化学疗法进行过治疗。在荟萃分析中,在临床试验中观察到了最高应答率,其中将Ad-p53以每周进行三次瘤内注射作为第一周过程中的连续三天每日治疗或每月治疗周期的前2周中每隔一天治疗的治疗方案进行施用。所有应答者(由RECIST 1.1标准定义)均已接受大于7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3肿瘤体积的Ad-p53剂量。

[0371] 如下表所示,使用大于7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3治疗的患者与以较低Ad-p53剂量治疗的患者相比之间存在肿瘤应答的统计学上显著的差异(Ad-p53＞7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3的肿瘤应答率为31％(9/29),相比之下Ad-p53＜7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3的肿瘤应答率为0％(0/25);p＝0.0023)。

[0372] 表6.通过Ad-p53剂量HNSCC获得的RECIST靶标病变应答率

[0373]

剂量 Ad-p53 vp/cm^3	应答者的数量	非应答者的数量	应答率 %	双侧费希尔精确检验的 P 值
＞7×10^{10}	9	20	31.0% (9/29)	0.0023
＜7×10^{10}	0	25	0% (0/25)	

[0374] 图1示出与Ad-p53剂量≤7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3(右小图)相比,用Ad-p53＞7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3(左小图)治疗的患者亚组的肿瘤应答的瀑布图。

[0375] 对Ad-p53应答者的更详细检查显示,大部分应答者(7/9名患者)已接受接近或超过1×10^{11}vp/cm^3(范围7.81至333.2×10^{10}vp/cm^3)的Ad-p53剂量。

[0376] 将用Ad-p53剂量≥7×10^{10}个病毒颗粒/cm^3治疗的具有有利Ad-p53生物标志物谱的患者的一年生存期和总体生存期与来自先前3期复发性HNSCC临床试验的具有良好Ad-

p53生物标志物谱的经甲氨蝶呤治疗的患者的一年生存期和总体生存期进行比较。结果示出在图2中,并证明与甲氨蝶呤相比,Ad-p53生物标志物和剂量优化的Ad-p53治疗的总体生存期具有统计学上显著的提高(Ad-p53治疗的中位生存期为11.5个月对比甲氨蝶呤的中位生存期为4.5个月;p＜0.016,HR 1.9767)。

[0377] 如表4所示,来自荟萃分析数据的最佳Ad-p53复发性HNSCC治疗在肿瘤应答的功效终点、1年生存期和中位总体生存期方面与由Ferris等人,2016报告的护理标准(SOC)化学疗法和抗PD-1治疗相比更有利。

[0378] 表4:复发性头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)中Ad-p53、护理标准(SOC)和抗PD-1的功效终点比较

[0379]

功效 终点	护理标准	Ad-p53*	抗 PD-1
肿瘤应答	约 5%	**31%**	16%
一年生存期	16.6%	**40.0%**	36.6%
中位生存期	5.1 个月	**11.5** 个月	7.5 个月

[0380] *N＝30;预测性p53生物标志物和剂量优化的群体

[0381] 因此,基于该数据选择Ad-p53的剂量(1×10^{11}vp/cm^3肿瘤体积),以用于与优先的CD122/CD132激动剂和抗PD-1疗法进行组合治疗。

[0382] 实例4-使用Ad-MDA7(IL24)、CD122/CD132激动剂和抗PD1抗体的组合疗法

[0383] 抗PD-1治疗已成为用于具有晚期、不可切除疾病的黑素瘤患者的公认疗法。尽管抗PD-1代表使许多患者受益的突破性治疗,但是来自多项研究的临床数据表明,大多数患者对这种疗法无应答。

[0384] 该疗法设计为通过使用Ad-MDA-7(注意Ad-MDA-7＝Ad-IL24)以及CD122/CD132激动剂和抗PD-1抗体进行治疗,来改善晚期黑素瘤患者的预后。组合疗法的临床功效包括评估总体应答率[ORR＝部分应答(PR)+完全应答(CR)]、完全消退率(CRR)、持久应答率(DRR＝PR+CR维持至少6个月);内脏器官转移的速率和时间;无进展生存期(PFS)和总体生存期(OS)。还评估了研究药物对以下方面的影响:淋巴细胞表型和血清细胞因子、疾病相关的生物标志物、对选定抗原的抗体应答,以及对肿瘤抗原的体液和细胞应答。

[0385] 此外,检查肿瘤样品的临床活动的病理关联,包括(但不限于)炎性浸润物的丰度和特征(例如,CD8和CD4细胞以及程序性死亡-1(PD-1)和程序性死亡配体1(PD-L1)分别在淋巴细胞和肿瘤细胞上的表达)和肿瘤突变负荷。

[0386] 如果患者当时有应答,则可以进行长达12个月或长达18个月的治疗。在12个月时有应答的患者(CR或PR)应继续治疗直至18个月或出现临床上相关的进行性疾病(PDr),以较早者为准。

[0387] 由于免疫疗法可能使得肿瘤应答延迟发作,并且与误认为肿瘤进展的肿瘤炎症相

关,因此定义了三种类型的PD。非临床相关的进行性疾病(PDn)定义为没有患有体力状态下降和/或根据医生的意见不需要替代疗法的患者的PD。使显示出PDn的患者继续进行治疗。临床相关的进行性疾病(PDr)定义为与体力状态下降和/或根据医生的意见患者需要替代疗法相关的PD。除非医生的意见认为需要其他治疗,否则允许PDr患者保持治疗直至24周的疗法。CNS进行性疾病(PDcns)定义为在中枢神经系统(脑)中的进展。

[0388] Ad-IL24治疗提供为在含有盐水和10%甘油的中性缓冲液中浓度为1×10^{12}vp/mL的冷冻小瓶悬浮液(2.0mL/小瓶)。不存在符合注射条件的肿瘤团块的最小大小。皮肤病变应包括在要治疗的第一组肿瘤中,以增强由皮肤抗原呈递细胞介导的疗法的免疫效应。

[0389] 个体患者可具有至多20个病变,其中单个病变的最长直径不大于5cm。目的是最终使用至少一个周期的Ad-IL24疗法(每周两次瘤内注射,持续3周)来治疗所有病变。将每个患者的病变分为Ad-IL24治疗组,每个治疗组中的病变数量由肿瘤直径和剂量递增同期群决定,以使在每个治疗日递送的Ad-IL24将不超过在表4中指定的剂量递增方案中所指定的每个治疗日所允许的总体积剂量。递送至一个或多个肿瘤的总剂量(体积)将不超过表4中指定的体积,并且注入治疗组内的每个单独肿瘤的量取决于一个或多个肿瘤结节的大小并且根据以下算法确定:

[0390] • 对于最长尺寸为至多0.5cm的肿瘤为至多0.1mL。

[0391] • 对于最长尺寸为0.5至1.5cm的肿瘤为至多0.5mL。

[0392] • 对于最长尺寸为1.5至2.5cm的肿瘤为至多1.0mL。

[0393] • 对于最长尺寸为2.5至5cm的肿瘤为至多2.0mL。

[0394] 注入任何单个病变的最大体积为2mL。在任何一个治疗日的最大剂量为2mL、4mL或6mL,具体取决于下表中指定的治疗剂量递增同期群。

[0395] 表4:治疗时间表。

[0396]

周期	一								二								三							
周	1		2		3		4		1		2		3		4		1		2		3		4	
天	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T			M	T	M	T	M	T		
Ad-IL24	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+		
纳武单抗*									+				+				+				+			
派姆单抗*									+					+						+				

[0397]

周期	四								五								六							
周	1		2		3		4		1		2		3		4		1		2		3		4	
天	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T			M	T	M	T	M	T		
Ad-IL24	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+		
纳武单抗	+				+				+				+				+				+			
派姆单抗		+							+					+						+				

[0398] *用抗PD-1治疗的患者变得用抗PD-1难治。

[0399] 表5:剂量递增设计。

[0400]

同期群编号	患者数量	**Ad-IL24** 剂量/周一和周四	所治疗的最大总体肿瘤直径/所施用的 **Ad-IL24** 体积/天	纳武单抗 **3 mg/kg IV** 输注耐纳武单抗的患者	**IV** 输注 **2 mg/kg** 的派姆单抗耐派姆单抗的患者
剂量递增 3	6-16	6×10^{12} vp	20 cm/6 ml	相同*	相同*
剂量递增 2	3-12	4×10^{12} vp	10 cm/4 ml	相同*	相同*
起始剂量 1	**3-12**	**2×10^{12} vp**	**5 cm/2 ml**	**3 mg/kg/IV***	**2 mg/kg/IV***
剂量降级 2	3-12	1×10^{12} vp	2.5 cm/1 ml	相同*	相同*
剂量降级 3	3-12	5×10^{11} vp	1.25 cm/0.5 ml	相同*	相同*

[0401] 上表中的治疗方案将与优先的CD122/CD132激动剂(诸如IL2/抗IL2免疫复合物和/或IL15/抗IL15免疫复合物和/或IL15/IL15受体α-IgG1-Fc(IL15/IL15Rα-IgG1-Fc)免疫复合物和/或聚乙二醇化的IL2和/或聚乙二醇化的IL15和/或IL2突变蛋白和/或IL15突变蛋白)组合,其是以从每周至每2-4周范围内的间隔以通过SQ或IV给予的介于5-100ug/kg之间的范围内的剂量施用的。

[0402] 总结:实例中所述的动物研究群体使用高度侵袭性形式的癌症,所述癌症已知通常对免疫疗法具有抗性。惊人地,局部区域肿瘤抑制因子和溶瘤病毒治疗与优先的CD122/CD132疗法的组合逆转了对全身免疫检查点抑制剂疗法的抗性,证明了与免疫检查点抑制剂治疗具有出乎意料的协同作用,并且组合疗法诱导对未用肿瘤抑制因子或溶瘤病毒疗法治疗的远端肿瘤的优越远位效应。在高度抗免疫疗法的癌症中,这些治疗惊人地促成了完全肿瘤消退和治愈结局。

[0403] 考虑到本公开,可以在不进行过度实验的情况下进行和执行本文公开和要求保护的所有方法。尽管已经根据优选的实施例描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员而言将显而易见的是,在不背离本发明的概念、精神和范围的情况下,可以对本文所述的方法以及方法的步骤或所述步骤的顺序施加变化。更具体地,将显而易见的是,化学上和生理上均相关的某些药剂可以代替本文所述的药剂,同时将实现相同或相似的结果。对于本领域的技术人员显而易见的所有此类类似的替代和修改都被认为在由所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0404] ***

[0405] 参考文献

[0406] 以下参考文献以提供对本文所述的那些的示例性程序或其他细节补充的程度明确以引用方式合并于本文。

[0407] Aghi等人,Cancer Res.,59:3861-3865,1999。

[0408] Aksentijevich等人,Human Gene Ther.7:1111,1996。

[0409] Aoki等人,J Cell Sci.,120:3327-35,2007。

[0410] Backman等人,Curr Opin Neurobiol.,12(5):516,2002。

[0411] Baichwal和Sugden,在:Gene Transfer,Kucherlapati R编辑,New York,

[0412] Plenum Press,第1 17-148页,1986。

[0413] Bailey和Levine,J.Pharm.Biomed.Anal.,11:285-292,1993。

[0414] Bernstein等人,Mutat Res.,511(2):145-78,2002。
[0415] Bouvet等人,Cancer Res.,58:2288-2292,1998。
[0416] Buller等人,Cancer Gene Therapy,9:553-566,2002。
[0417] Camacho等人,J Clin Oncology,22(145),2004。
[0418] Carroll等人,Mol Cancer Therapeutics,1:49-60,2001。
[0419] Caudell等人,J Immunol.,168:6041-6046,2002。
[0420] Chada等人,Cancer Gene Ther.,13:490-502,2006.444-448,1998。
[0421] Chada等人,Cancer Gene Ther.,13:490-502,2006.444-448,1998。
[0422] Chase等人,Nat.Biotechnol.,16:
[0423] Chen and Okayama,Mol.Cell.Biol.7:2745-2752,1987。
[0424] Choi等人,Gene Therapy,17:190-201,2010。
[0425] Corrales等人,Cell Reports,11,1018-1030,2015。
[0426] Couch等人,Am.Rev.Resp.Dis.,88:394-403,1963。
[0427] Doronin等人,Virology,305:378-387,2003。
[0428] Dubois等人,2008。
[0429] 欧洲专利申请号EP2403951A2
[0430] 欧洲专利申请号EP2724728A1
[0431] Fraley等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.76:3348-3352,1979。
[0432] Fujiwara等人,J Natl Cancer Inst,86:1458-1462,1994。
[0433] Ghiringhelli等人,Biomed.J.,38:111-116,2015。
[0434] Giono等人,J Cell Physiol.209(1):13-20,2006。
[0435] Gladden等人,Dev Cell.16;19(5):727-39,2010。
[0436] Graham和Van Der Eb,Virology,52:456-467,1973。
[0437] Greenberg等人,Chromosoma.117(4):305-17,2008。
[0438] Gumani等人,Cancer Chemother Pharmacol.,44(2):143-151,1999。
[0439] Harland和Weintraub,J.Cell Biol,101:1094-1099,1985。
[0440] Hartwell等人,Science,266:1821-1828,1994。
[0441] Hashemi等人,Cancer Lett.,180(2):211-21,2002。
[0442] Heldin等人,Curr Opin Cell Biol.21(2):166-76,2009。
[0443] Hurwitz等人,Proc Natl Acad Sci.95(17):10067-10071,1998。
[0444] Hynes和Ferretti,Methods Enzymol.,235:606-616,1994。
[0445] Iannello等人,J Experimental Medicine,210(10):2057-2069。
[0446] IMLYGIC™[包装插页]。Amgen,Inc.,Thousand Oaks,CA;2015年10月。
[0447] Inoue等人,Cancer Letters,157:105-112,2000。
[0448] 国际专利申请号WO1995001994。
[0449] 国际专利申请号WO1998042752。
[0450] 国际专利申请号WO2000037504。
[0451] 国际专利申请号WO2001014424。
[0452] 国际专利申请号WO2004058801。

[0453] 国际专利公布号WO 2005/003168。
[0454] 国际专利公布号WO 2005/009465。
[0455] 国际专利公布号WO 2006/003179。
[0456] 国际专利公布号PCT/KR2011/004693
[0457] 国际专利公布号WO 2006/072625。
[0458] 国际专利公布号WO 2006/072626。
[0459] 国际专利公布号WO 2007/042573。
[0460] 国际专利公布号WO 2008/084106。
[0461] 国际专利公布号WO 2010/065939。
[0462] 国际专利公布号WO 2012/071411。
[0463] 国际专利公布号WO 2012/160448。
[0464] 国际专利公布号WO 2012009703。
[0465] 国际专利公布号WO1995011986。
[0466] 国际专利公布号WO2014/047350
[0467] 国际专利公布号WO2014/047350。
[0468] 国际专利公布号WO2014/138314
[0469] 国际专利公布号WO2014/138314。
[0470] 国际专利公布号WO2014100014A1
[0471] 国际专利公布号WO2015/016718。
[0472] 国际专利公布号WO2015/027163
[0473] 国际专利公布号WO2015/027163。
[0474] 国际专利公布号WO2015/150809。
[0475] 国际专利公布号WO2016/009017
[0476] 国际专利公布号WO2016/009017。
[0477] Jiang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,93:9160-9165。
[0478] Johannessen等人,Proc Natl Acad Sci U S A.102(24):8573-8,2005。
[0479] Kaelin等人,Nat Rev Cancer,2(9):673-82,2002。
[0480] Kawabe等人,Mol Ther.6(5):637-44,2002。
[0481] Kawabe等人,Mol.Ther.6(5):637-644,2002。
[0482] Kim等人Journal of the National Cancer Institute,98(20):1482-1493,2006。
[0483] Kotin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:221 1-2215,1990。
[0484] Kreil,Protein Sci.,4:1666-1669,1995。
[0485] Li Phase 1Clinical Trial,Gene Therapy;16 376-382,2009。
[0486] Lichtenstein等人,Int.Rev.Immunol.,23:75-111,2004。
[0487] Liu等人,J.Biol.Chem.,270:24864,1995。
[0488] Lui等人,Gene Therapy,10:292-303,2003。
[0489] Lui等人,Gene Therapy,10:292-303,2003。
[0490] Mann等人,Cell,33:153-159,1983。

[0491] Markowitz等人,J.Virol.,62:1 120-1 124,1988。

[0492] McLaughlin等人,J.Virol.,62:1963-1973,1988。

[0493] Mellman等人,Nature 480:480-489,2011。

[0494] Mellman等人,Nature,480:480-489,2011。

[0495] Mhashilkar等人,Mol.Medicine 7(4):271-282,2001。

[0496] Miyahara等人,Cancer Gene Therapy,13:753-761,2006。

[0497] Mokyr等人,Cancer Res.,58:5301-5304,1998。

[0498] MultiVir Inc.,Form S-1 Registration Statement,U.S.Securities and Exchange Commission,2015

[0499] Muzyczka,Curr.Top.Microbiol Immunol,158:97-129,1992。

[0500] Nemunaiti等人,Clin Cancer Res.,15(24):7719-25,2009。

[0501] Nicolas和Rubenstein,在:Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses,Rodriguez和Denhardt(编辑),Stoneham:Butterworth,第493-513页,1988。

[0502] Nicolau和Sene,Biochim.Biophys.Acta,721:185-190,1982。

[0503] Nicolau等人,Methods Enzymol,149:157-176,1987。

[0504] Nishikawa等人,Mol.Ther.,9(8):818-828,2004b。

[0505] Nishikawa等人,Oncogene,23(42):7125-7131,2004a。

[0506] Nishizaki M等人,Clin.Can.Res.,5:1015-1023,1999。

[0507] Ohashi M等人,Gut,44:366-371,1999。

[0508] Pardoll,Nat Rev Cancer,12(4):252-64,2012。

[0509] Pardoll,Nature Rev Cancer,12:252-264,2012。

[0510] Philip等人J.Biol.Chem.,268:16087,1993。

[0511] Pierceall等人,Dev Biol.,166:654-665,1994。

[0512] Qin,X.等人,Biol Reprod.,56:800-11,1997a。

[0513] Qin,X.等人,Biol Reprod.,56:812-20,1997b。

[0514] Rhode等人,Cancer Immunol Res,4(1):49-60,2016。

[0515] Ridgeway,在:Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses,Rodriguez RL.Denhardt DT编辑,Stoneham:Butterworth,第467-492页,1988。

[0516] Rippe等人,Mol.Cell Biol,10:689-695,1990。

[0517] Rocco等人,Exp Cell Res.,10;264(1):42-55,2001。

[0518] Rosenberg等人,Nat Med.,10(19):909-15,2004。

[0519] Samulski等人,EMBO J.10:3941-3950,1991。

[0520] Samulski等人,J Virol,63:3822-3828,1989。

[0521] Sherwood等人,Endocrinology 114:806-13,1984。

[0522] Sobol RE等人,第11章:Tp53 Gene Therapy for Cancer Treatment and Prevention,NY:Springer Science+Business Media,2013。

[0523] Solodin等人,Biochemistry,34:13537,1995。

[0524] Spitz等人,Clin Cancer Research,2:1665-1671,1996。

[0525] Starker等人,Curr Opin Oncol.,21(1):29-33,2009。

[0526] Swisher等人,Clin Cancer Research,9:93-101,2003。

[0527] Tatebe S等人,Int.J Oncol.,15:229-235,1999。

[0528] Tatebe S等人,Int.J Oncol.,15:229-235,1999。

[0529] Tchekmedyian等人,Oncology,29(12):990-1002,2015。

[0530] Temin,n:Gene Transfer,Kucherlapati(编辑),New York:Plenum Press,第149-188页,1986。

[0531] Textor等人,Cancer Res.,71(18):5998-6009,2011。

[0532] Thierry等人Proc.Natl.Acad.Sci.,92(21):9742-6,1995。

[0533] Timiryasova等人,Biotechniques.31:534,6,8-40,2001。

[0534] Toda等人,Mol.Therapy,2(4):324-329,2000。

[0535] Tollefson等人,J.Virol.,70:2296-2306,1996。

[0536] Top等人,J.Infect.Dis.,124:155-160,1971。

[0537] Tsukamoto等人,Nature Genetics,9:243,1995。

[0538] 美国专利申请号US20110008369。

[0539] 美国专利申请号US2014022021。

[0540] 美国专利申请号US20140294898。

[0541] 美国专利号4,797,368。

[0542] 美国专利号4,835,251。

[0543] 美国专利号5,023,321。

[0544] 美国专利号5,139,941。

[0545] 美国专利号5,302,523。

[0546] 美国专利号5,384,253。

[0547] 美国专利号5,464,765。

[0548] 美国专利号5,580,859。

[0549] 美国专利号5,589,466。

[0550] 美国专利号5,656,610。

[0551] 美国专利号5,702,932。

[0552] 美国专利号5,736,524。

[0553] 美国专利号5,780,448。

[0554] 美国专利号5,789,215。

[0555] 美国专利号5,811,395

[0556] 美国专利号5,925,565

[0557] 美国专利号5,935,819

[0558] 美国专利号5,945,100

[0559] 美国专利号5,981,274

[0560] 美国专利号5,994,136

[0561] 美国专利号5,994,624

[0562] 美国专利号6,013,516

[0563] 美国专利号6,207,156
[0564] 美国专利号7,223,593
[0565] 美国专利号7,537,924
[0566] 美国专利号8,017,114
[0567] 美国专利号8,119,129
[0568] 美国专利号8,329,867
[0569] 美国专利号8,354,509
[0570] 美国专利号9,746,471
[0571] 美国专利公开号US 2017/0044229
[0572] 美国专利公开号US20060257361
[0573] 美国专利公开号US20070160578
[0574] 美国专利公开号US2011/0039778。
[0575] 美国专利公开号US2015/0202290
[0576] 美国专利公开号US2015/0202290。
[0577] 美国专利公开号US20170183403
[0578] 美国专利号8,067,567
[0579] Vincent等人,Cancer Res.,70(8):3052-3061,2010。
[0580] Waku等人,J Immunol.,165:5884-5890,2000。
[0581] Xu等人,Gene Therapy,22(3):31-40,2015。
[0582] Xu等人,J Gastroenterol.,48(2):203-13,2013。
[0583] Xue等人,Nature,445(7128):656-660,2007。
[0584] Yachida等人,Arch Pathol Lab Med.133(3):413-22,2009。
[0585] Yamasaki,Cancer Treat Res.115:209-39,2003。
[0586] Young等人,Cancer Gene Ther.,20(9):531-537,2013。
[0587] Yu和Fang,Current Cancer Drug Targets;7 659-670,2007。
[0588] Yun等人,Human Gene Therapy 23:609-622,2012。
[0589] Zeimet和Marth,Lancer Oncology,7:415-422,2003。
[0590] Zhang等人,Cancer Gene Ther,22:17-22,2015。
[0591] Zhang等人,Cancer Gene Ther.,1:5-13,1994。

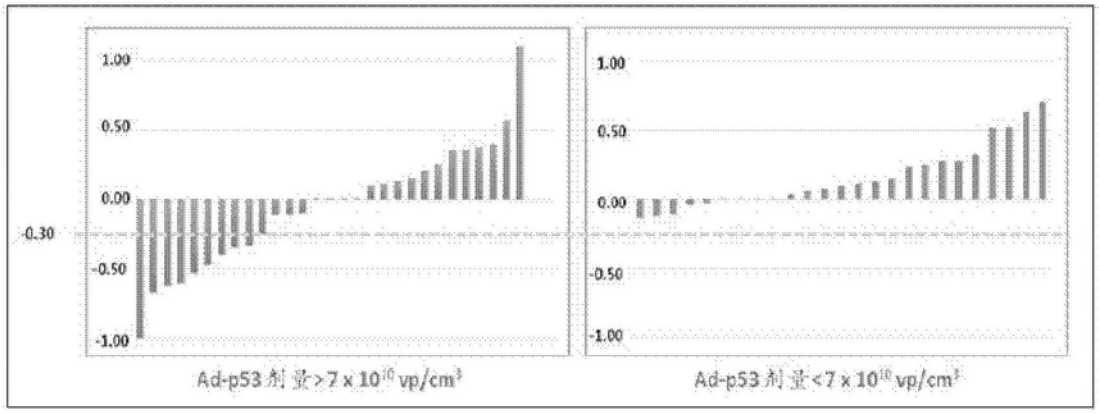

1.00
0.50
0.00
-0.30
-0.50
-1.00
Ad-p53 剂量>7 x 10^10 vp/cm³
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
Ad-p53 剂量<7 x 10^10 vp/cm³

图1

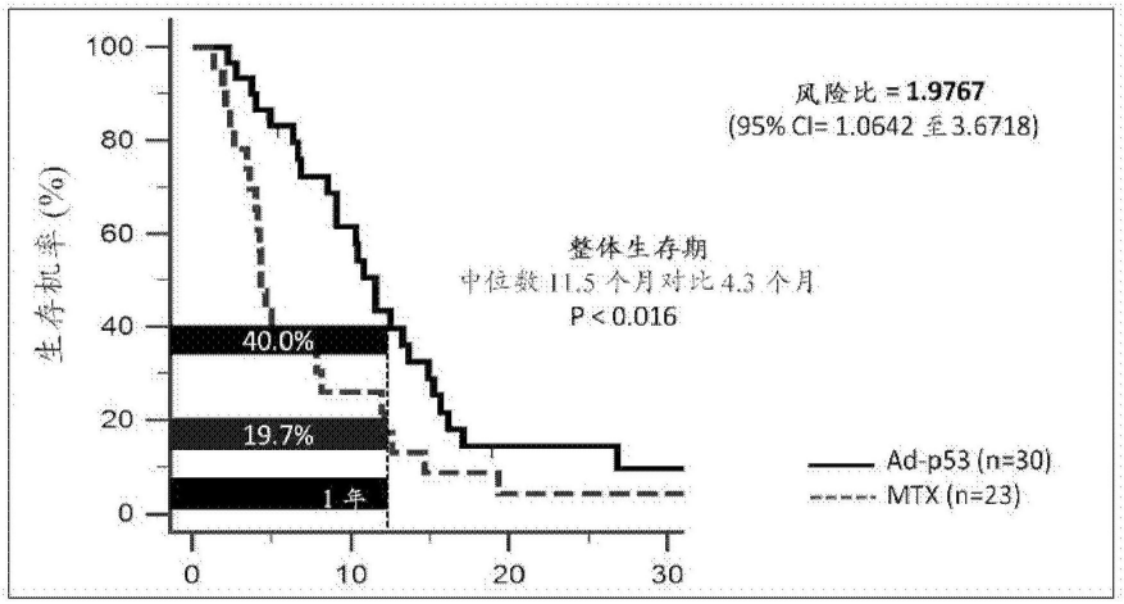

生存机率 (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40.0%
19.7%
1 年
风险比 = 1.9767
(95% CI= 1.0642 至3.6718)
整体生存期
中位数 11.5 个月对比 4.3 个月
P < 0.016
Ad-p53 (n=30)
MTX (n=23)

图2

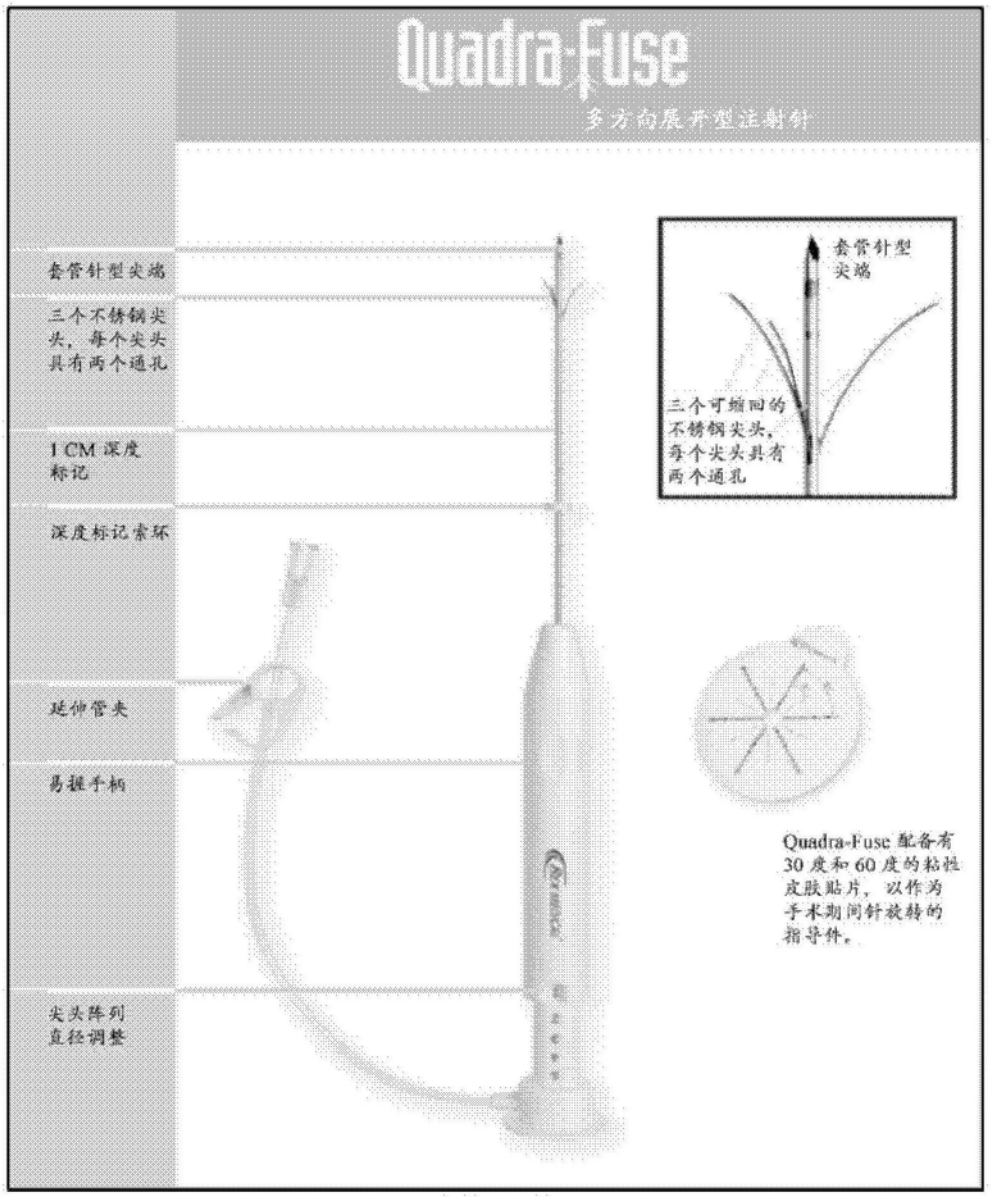

Quadra-Fuse
多方向展开型注射针
套管针型尖端
三个不锈钢尖头，每个尖头具有两个通孔
1 CM 深度标记
深度标记索环
延伸管夹
易握手柄
尖头阵列直径调整
套管针型尖端
三个可缩回的不锈钢尖头，每个尖头具有两个通孔
Quadra-Fuse 配备有30 度和 60 度的粘性皮肤贴片，以作为手术期间针放置的指导件。

图3

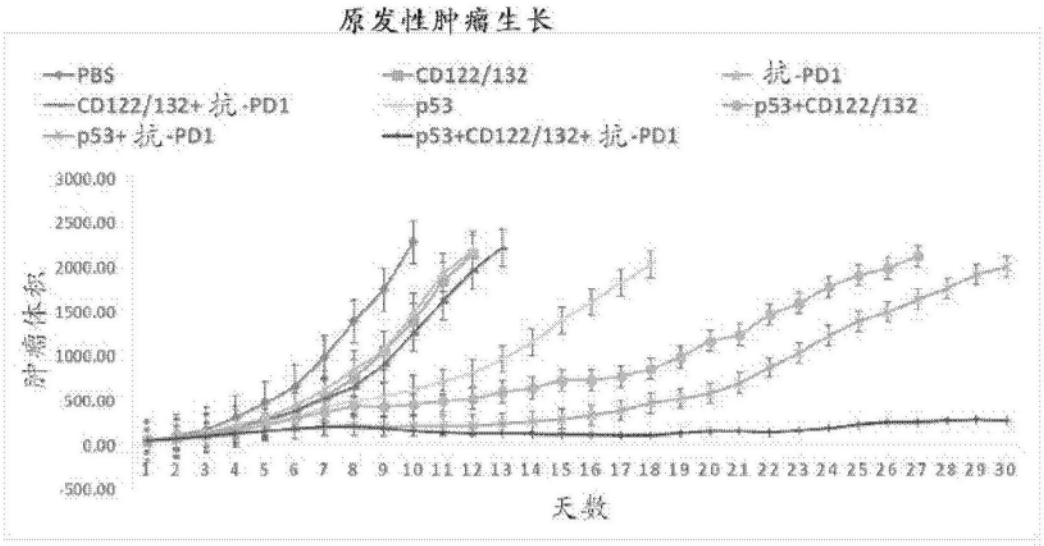

原发性肿瘤生长
PBS
CD122/132
抗-PD1
CD122/132+抗-PD1
p53
p53+CD122/132
p53+抗-PD1
p53+CD122/132+抗-PD1
肿瘤体积
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
天数
p < 0.0001

图4

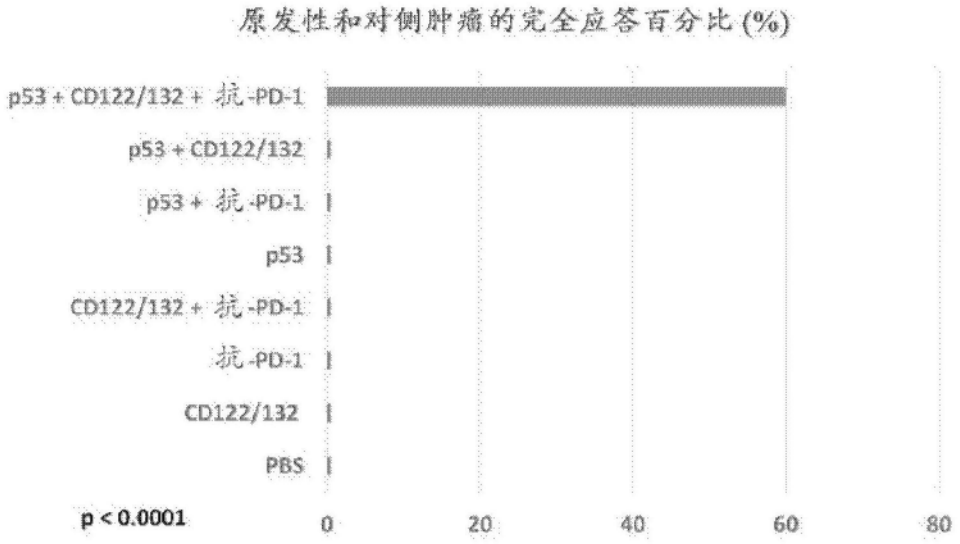

原发性和对侧肿瘤的完全应答百分比 (%)
p53 + CD122/132 + 抗-PD-1
p53 + CD122/132
p53 + 抗-PD-1
p53
CD122/132 + 抗-PD-1
抗-PD-1
CD122/132
PBS
p < 0.0001
0
20
40
60
80

图5

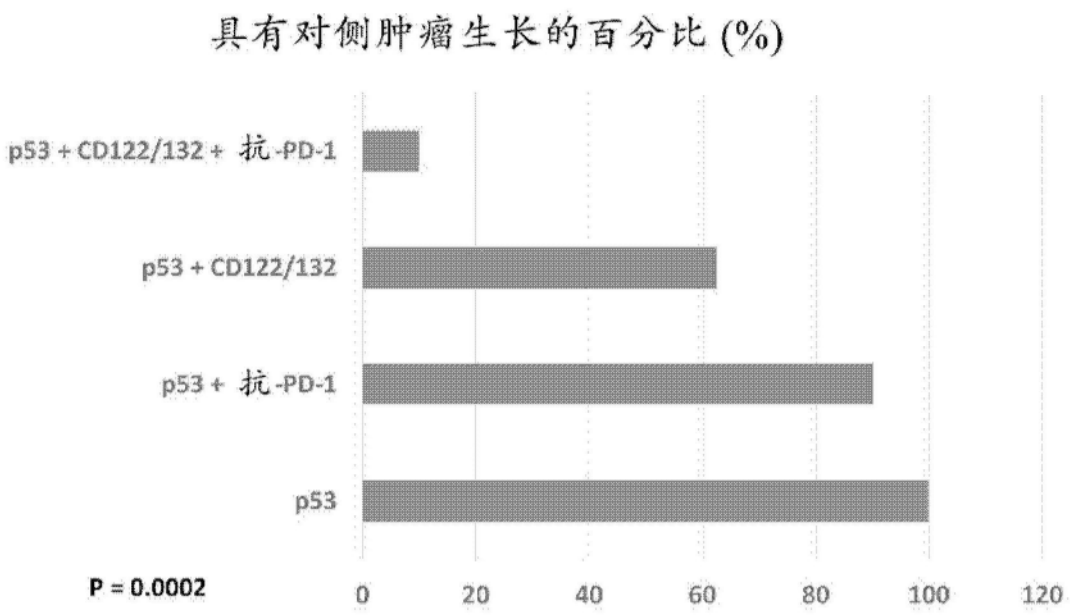

具有对侧肿瘤生长的百分比 (%)
p53 + CD122/132 + 抗-PD-1
p53 + CD122/132
p53 + 抗-PD-1
p53
P = 0.0002
0
20
40
60
80
100
120

图6A

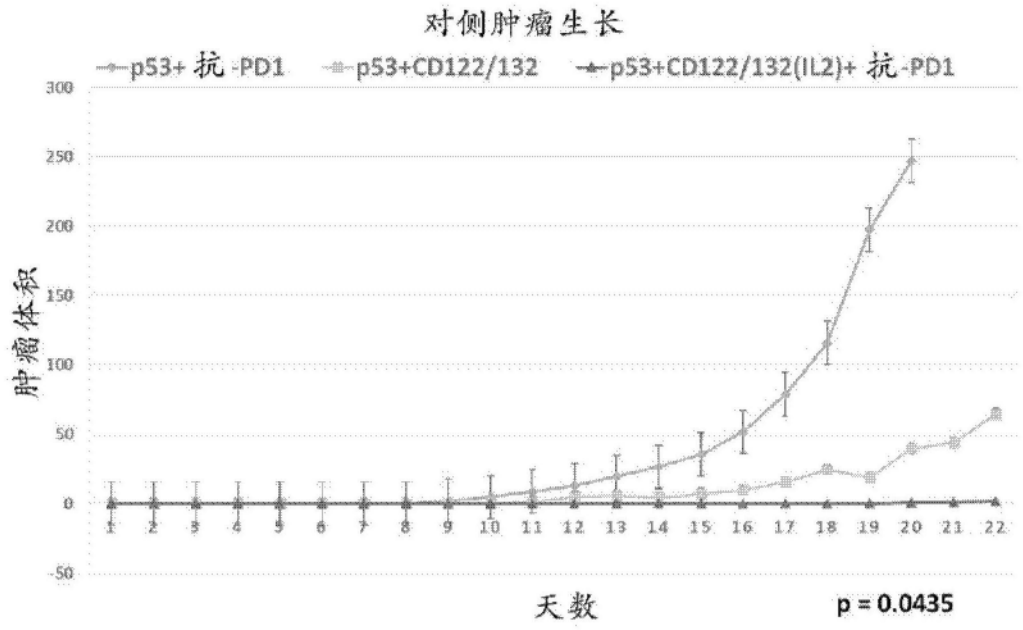

对侧肿瘤生长
p53+ 抗-PD1
p53+CD122/132
p53+CD122/132(IL2)+ 抗-PD1
肿瘤体积
300
250
200
150
100
50
0
-50
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
天数
p = 0.0435

图6B

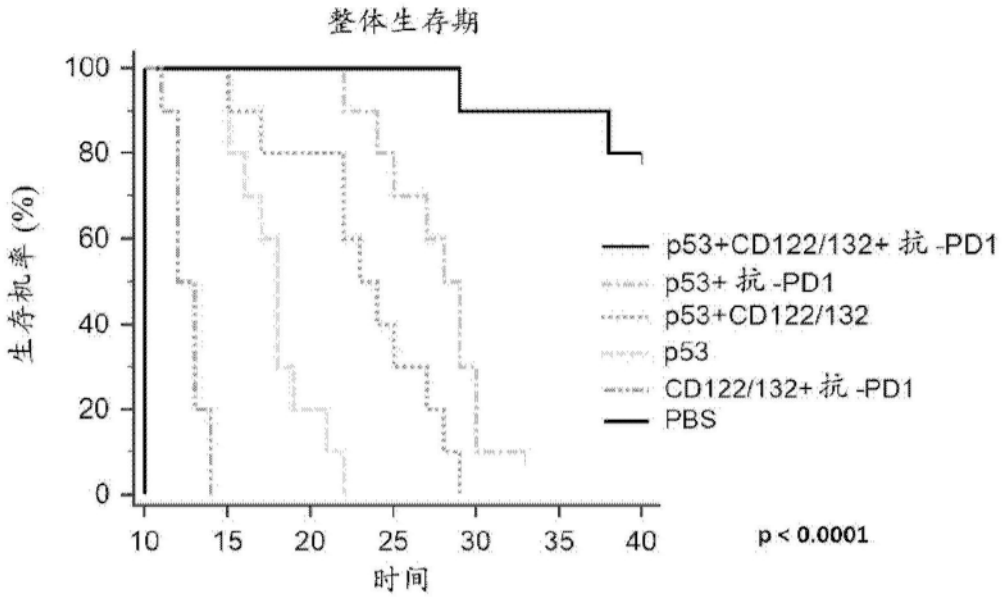

整体生存期
生存机率 (%)
100
80
60
40
20
0
10
15
20
25
30
35
40
时间
p53+CD122/132+ 抗 -PD1
p53+ 抗 -PD1
p53+CD122/132
p53
CD122/132+ 抗 -PD1
PBS
p < 0.0001

图7

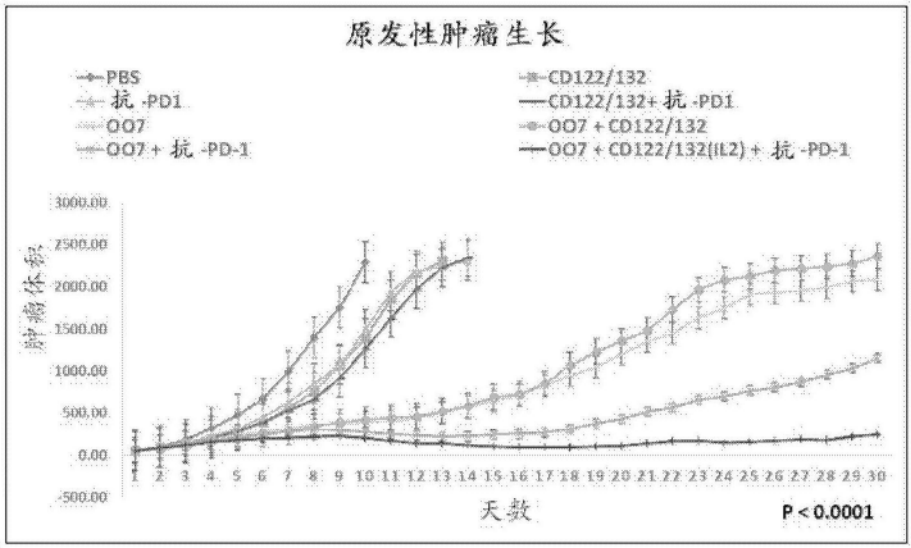

原发性肿瘤生长
PBS
抗 -PD1
OO7
OO7 + 抗 -PD-1
CD122/132
CD122/132+ 抗 -PD1
OO7 + CD122/132
OO7 + CD122/132(IL2) + 抗 -PD-1
肿瘤体积
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
-500.00
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
天数
P < 0.0001

图8

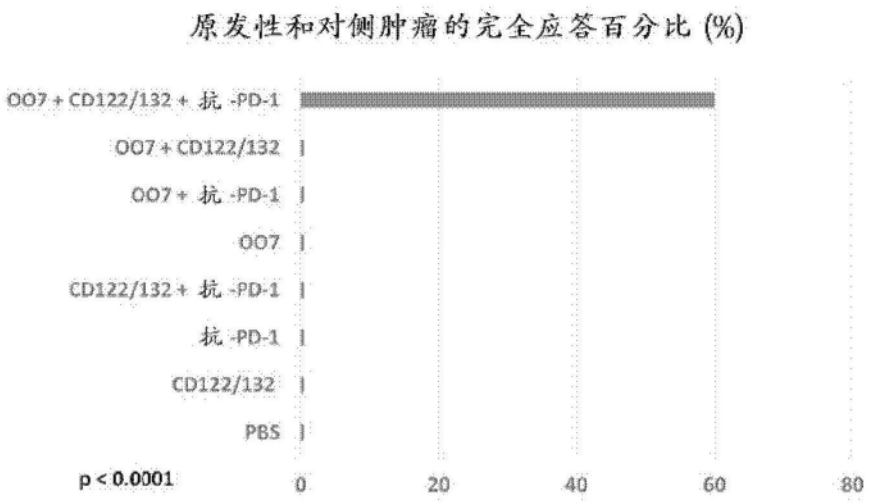

原发性和对侧肿瘤的完全应答百分比 (%)
OO7 + CD122/132 + 抗 -PD-1
OO7 + CD122/132
OO7 + 抗 -PD-1
OO7
CD122/132 + 抗 -PD-1
抗 -PD-1
CD122/132
PBS
p < 0.0001
0
20
40
60
80

图9

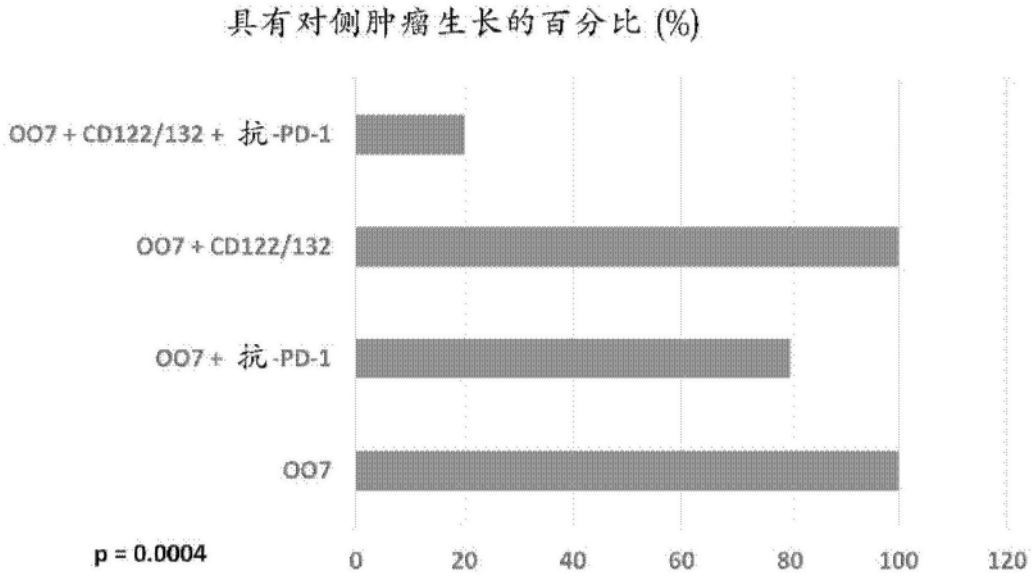

具有对侧肿瘤生长的百分比 (%)
OO7 + CD122/132 + 抗 -PD-1
OO7 + CD122/132
OO7 + 抗 -PD-1
OO7
p = 0.0004
0
20
40
60
80
100
120

图10A

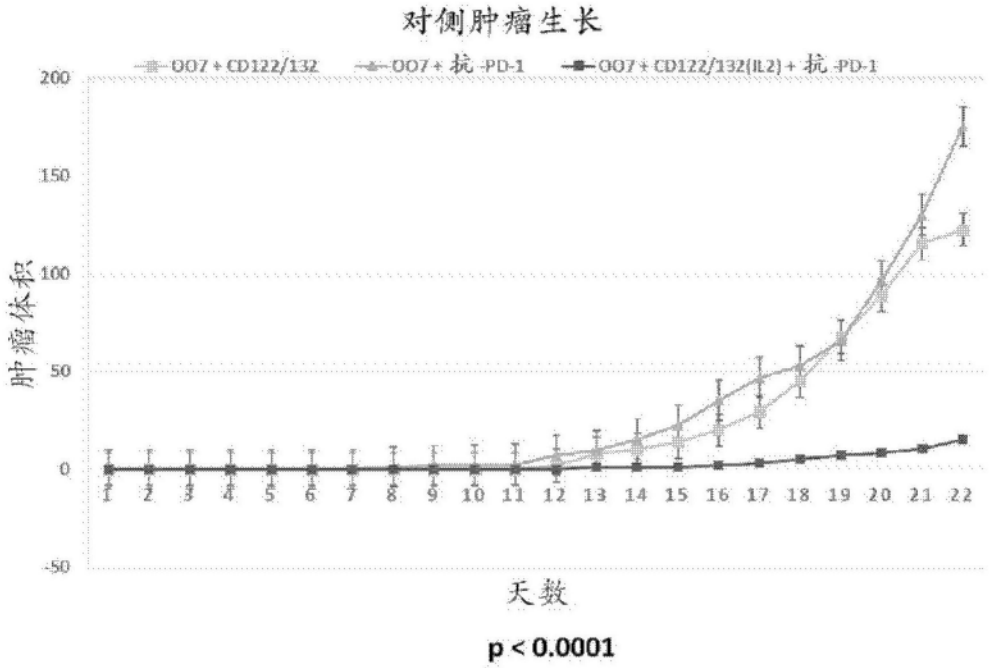

对侧肿瘤生长
OO7 + CD122/132
OO7 + 抗 -PD-1
OO7 + CD122/132(IL2) + 抗 -PD-1
肿瘤体积
200
150
100
50
0
-50
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
天数
p < 0.0001

图10B

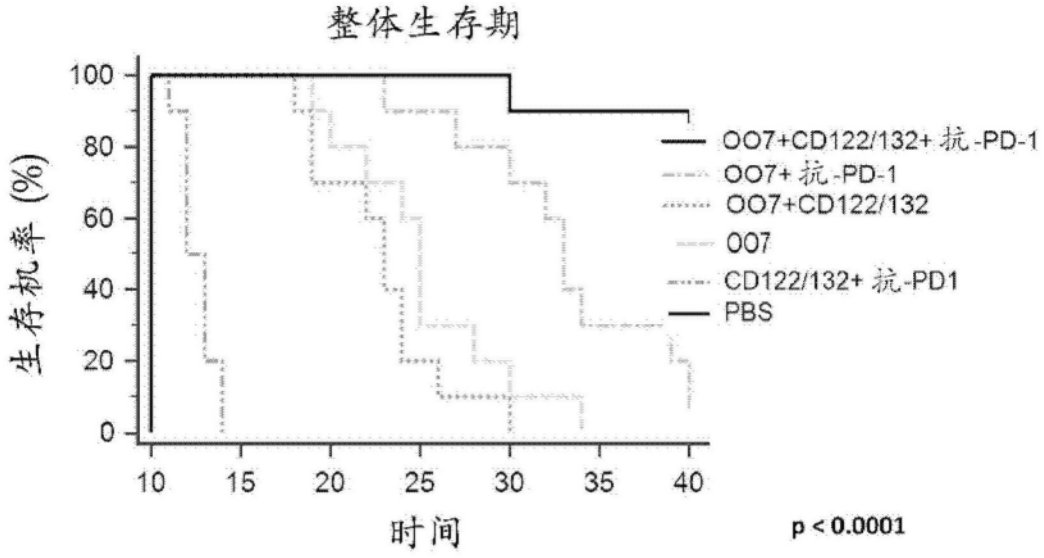

整体生存期
生存机率 (%)
100
80
60
40
20
0
10 15 20 25 30 35 40
时间
OO7+CD122/132+ 抗 -PD-1
OO7+ 抗 -PD-1
OO7+CD122/132
OO7
CD122/132+ 抗-PD1
PBS
p < 0.0001

图11

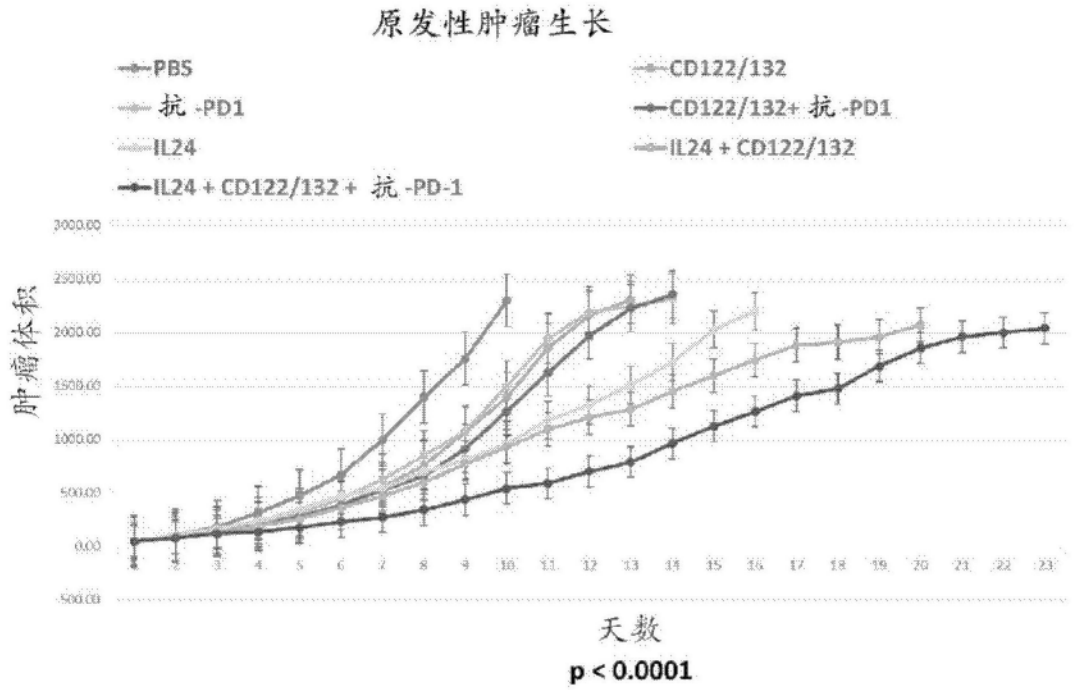

原发性肿瘤生长
PBS
抗 -PD1
IL24
IL24 + CD122/132 + 抗 -PD-1
CD122/132
CD122/132+ 抗 -PD1
IL24 + CD122/132
肿瘤体积
天数
p < 0.0001

图12

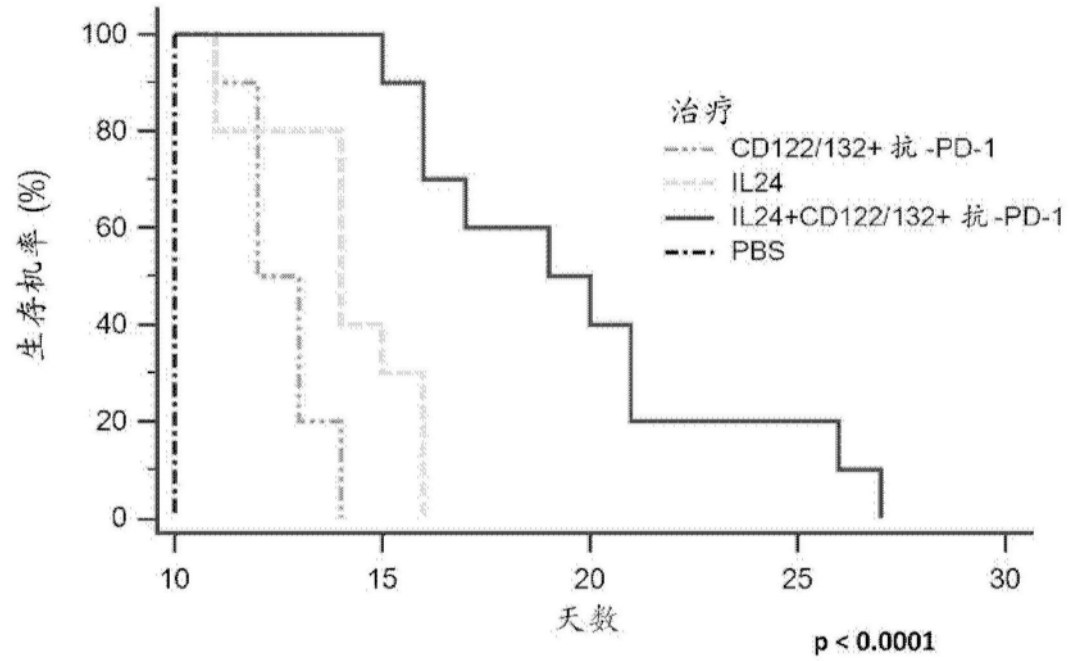

治疗
CD122/132+ 抗 -PD-1
IL24
IL24+CD122/132+ 抗 -PD-1
PBS
生存机率 (%)
天数
p < 0.0001

图13

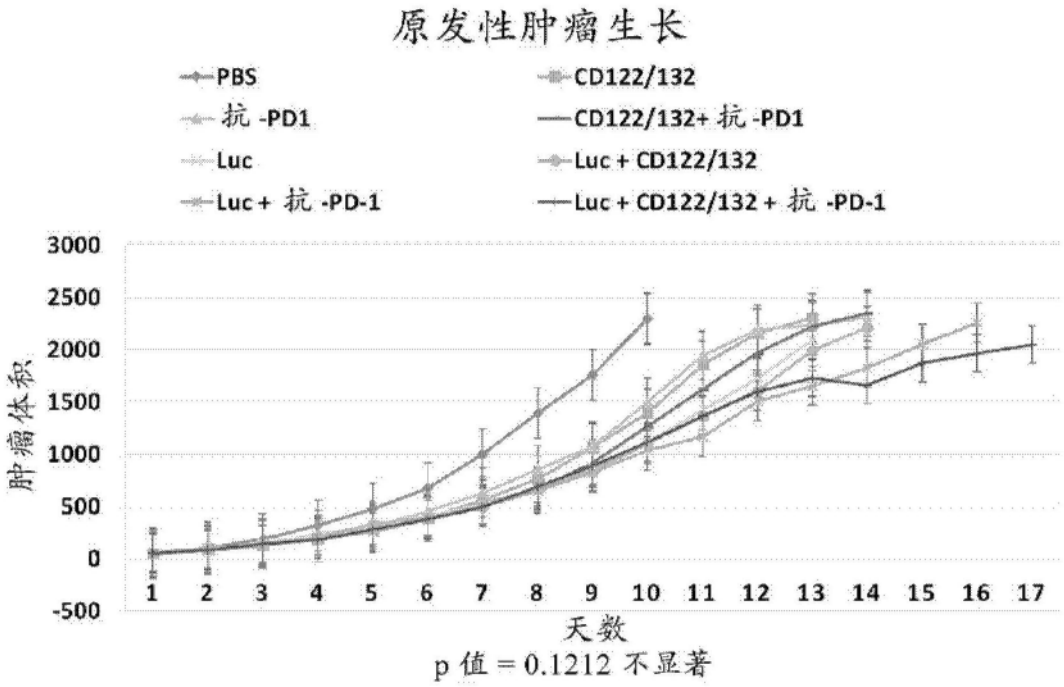

原发性肿瘤生长
PBS
抗 -PD1
Luc
Luc + 抗 -PD-1
CD122/132
CD122/132+ 抗 -PD1
Luc + CD122/132
Luc + CD122/132 + 抗 -PD-1
肿瘤体积
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
天数
p 值 = 0.1212 不显著

图14

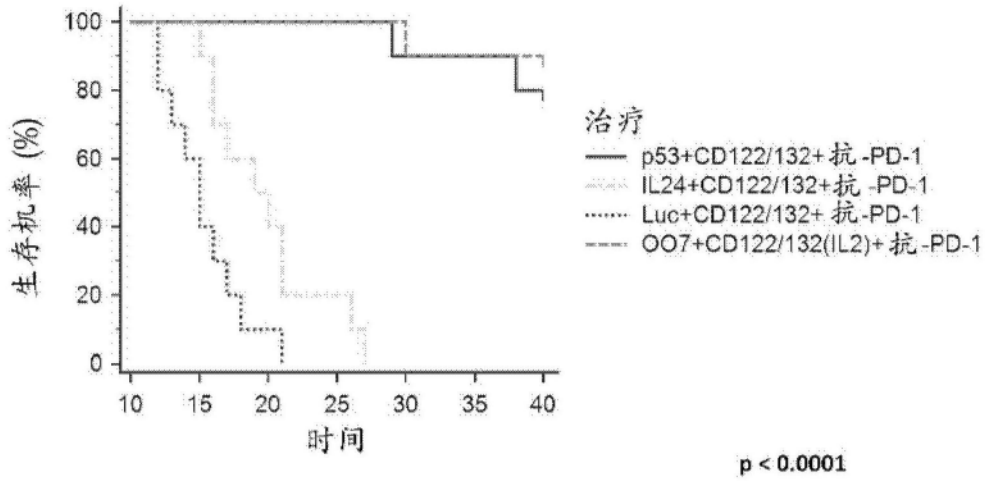

生存机率 (%)
100
80
60
40
20
0
10 15 20 25 30 35 40
时间
治疗
p53+CD122/132+ 抗 -PD-1
IL24+CD122/132+抗 -PD-1
Luc+CD122/132+ 抗-PD-1
OO7+CD122/132(IL2)+ 抗-PD-1
p < 0.0001

图15

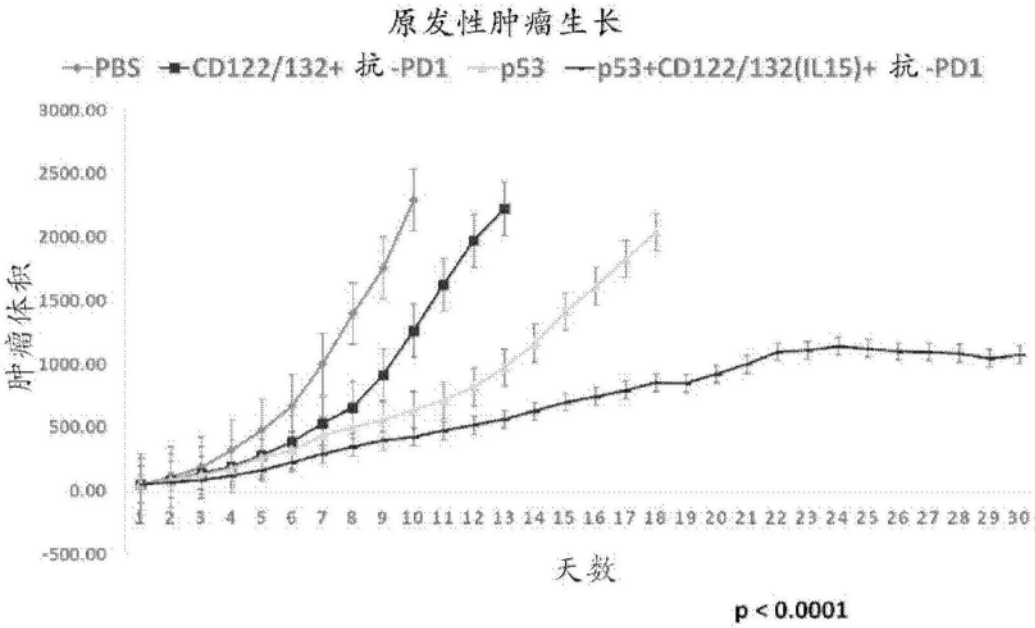

原发性肿瘤生长
PBS
CD122/132+ 抗-PD1
p53
p53+CD122/132(IL15)+ 抗-PD1
肿瘤体积
天数
p < 0.0001

图16

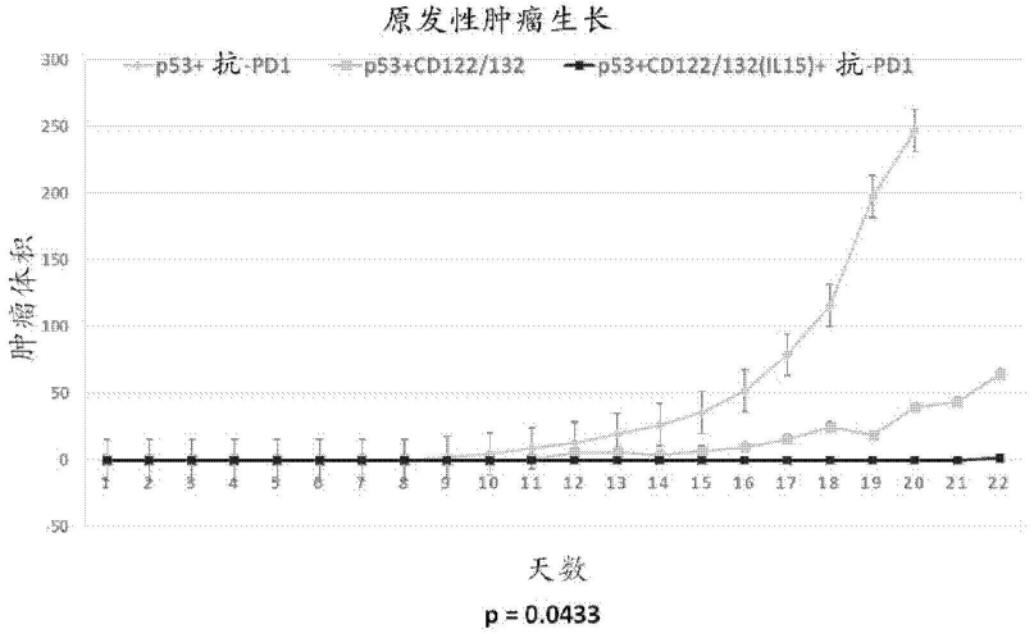

原发性肿瘤生长
p53+ 抗-PD1
p53+CD122/132
p53+CD122/132(IL15)+ 抗-PD1
肿瘤体积
天数
p = 0.0433

图17

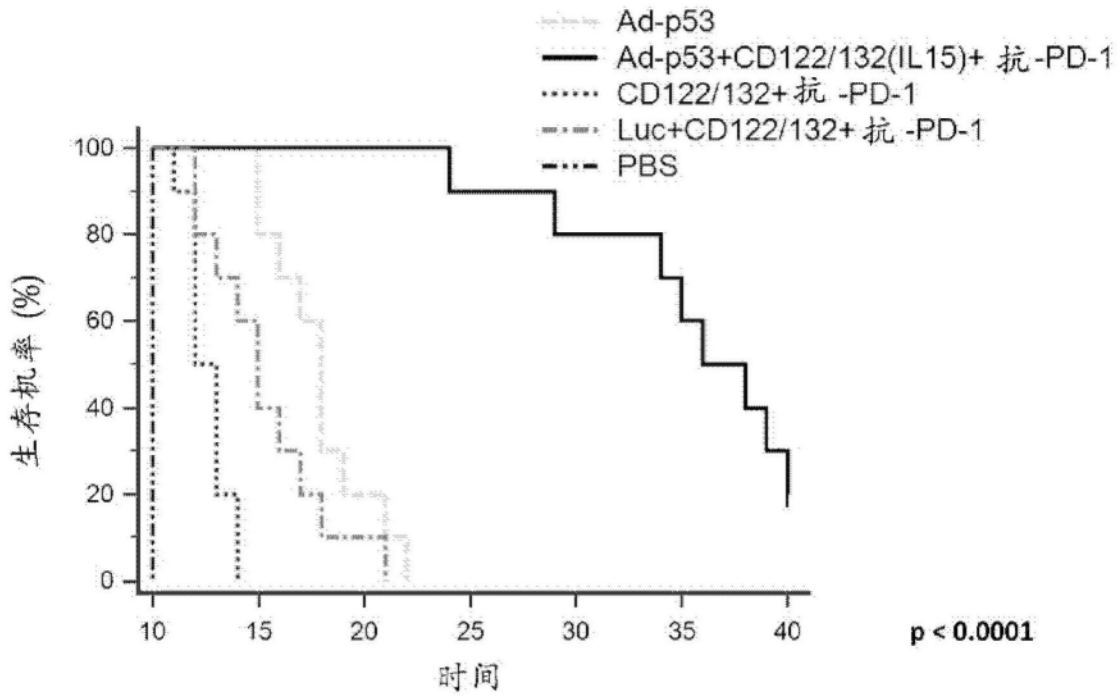

Ad-p53
Ad-p53+CD122/132(IL15)+ 抗-PD-1
CD122/132+抗 -PD-1
Luc+CD122/132+抗 -PD-1
PBS
生存机率 (%)
100
80
60
40
20
0
10
15
20
25
30
35
40
时间
p < 0.0001

图18