(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118834841 A
(43)申请公布日 2024.10.25

(21)申请号 202410794965.6
(22)申请日 2019.02.13
(30)优先权数据
1802539.5 2018.02.16 GB
(62)分案原申请数据
201980026226.X 2019.02.13
(71)申请人 加的夫大学学院咨询有限公司
地址 英国南威尔士
(72)发明人 A·帕克 H·尤斯-喀图拉
(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 王建秀 刘小立
(51)Int.Cl.
C12N 7/01(2006.01)
C12N 15/34(2006.01)
A61K 35/761(2015.01)
A61P 35/00(2006.01)

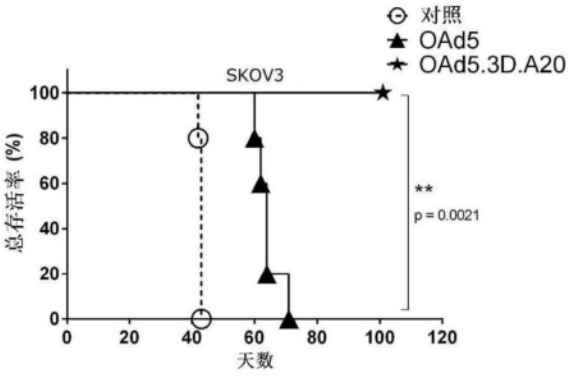
权利要求书2页 说明书13页
序列表（电子公布） 附图33页

(54)发明名称

修饰的腺病毒

(57)摘要

提供了修饰的腺病毒。本发明涉及修饰的溶瘤Ad5血清型腺病毒，包含该腺病毒的药物组合物，以及使用该腺病毒治疗癌症的方法，其中所述修饰的腺病毒包含六邻体高变区7中的至少一个防止病毒与凝血因子10(FX)结合的点突变(HVR7突变)；纤维球状突起区AB环中的至少一个防止病毒与柯萨奇腺病毒受体(CAR)结合的点突变(KO1突变)；以及五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp(RGD)中的至少一个防止病毒与$\alpha_V\beta_3$/$\alpha_V\beta_5$整联蛋白结合的点突变。



CN 118834841 A

1.修饰的Ad5血清型腺病毒,包含:

a)六邻体高变区7中的I421G、T423N、E424S、E450Q或L426Y点突变中的至少一个(HVR7突变),其中所述突变防止病毒与凝血因子10(FX)结合;

b)纤维球状突起区AB环中的S408E或P409A点突变中的至少一个(KO1突变),其中所述突变防止病毒与柯萨奇腺病毒受体(CAR)结合;和

c)五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp(RGD)中的D342E或D342A点突变中的至少一个,其中所述突变防止病毒与$\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$整联蛋白结合。

2.根据权利要求1所述的修饰的腺病毒,其中所述HVR7突变包含以下点突变中的至少一个或由其组成:I421G、T423N、E424S和L426Y。

3.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的腺病毒,其中所述KO1突变包含S408E和P409A点突变或由其组成。

4.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的腺病毒,其中所述RGD突变是产生RGE的D342E。

5.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的腺病毒,其中所述腺病毒经进一步修饰而包括至少一个选择性靶向肿瘤细胞的癌症靶向修饰或序列。

6.根据权利要求5所述的修饰的腺病毒,其中所述腺病毒包含至少一个结合氨肽酶N的(含)NGR肽基序,其中所述NGR在腺病毒纤维蛋白的HI环中;或至少一个与泛癌标志物EphA2结合的(含)YSA肽基序,其中所述YSA在嵌合纤维中,或至少一种癌症靶向抗体或至少一种生长因子抗体或至少一种基质降解酶。

7.根据权利要求5所述的修饰的腺病毒,其中所述癌症靶向修饰包括将αvβ6整联蛋白结合肽或A20肽序列NAVPNLRGDLQVLAQKVART(SEQ ID NO:1)插入所述病毒或通过所述病毒表达。

8.根据权利要求7所述的修饰的腺病毒,其中所述A20肽序列被插入所述病毒纤维球状突起HI环中或在其中表达。

9.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的腺病毒,其中所述腺病毒(Ad5.3D.A20)包含:

a)六邻体高变区7中的I421G、T423N、E424S、E450Q或L426Y点突变中的至少一个(HVR7突变),其中所述突变防止病毒与凝血因子10(FX)结合;

b)纤维球状突起区AB环中的S408E或P409A点突变中的至少一个(KO1突变),其中所述突变防止病毒与柯萨奇腺病毒受体(CAR)结合;

c)五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp(RGD)中的D342E或D342A点突变中的至少一个,其中所述突变防止病毒与$\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$整联蛋白结合;和

d)在所述病毒纤维球状突起HI环中插入或表达A20肽序列NAVPNLRGDLQVLAQKVART(SEQ ID NO:1)。

10.根据权利要求8所述的修饰的腺病毒,其中修饰的腺病毒(Ad5.3D.A20)包含:

a)六邻体高变区7中的I421G、T423N、E424S和L426Y点突变(HVR7突变),其中所述突变防止病毒与凝血因子10(FX)结合;

b)所述纤维球状突起区AB环中的S408E和P409A点突变(KO1突变),其中所述突变防止病毒与柯萨奇腺病毒受体(CAR)结合;

c)五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp(RGD)中的D342E点突变,以产生RGE突变,其中所述突变防止病毒与$\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$整联蛋白结合;和

d)在所述病毒纤维球状突起区HI环中插入或表达A20肽序列NAVPNLRGDLQVLAQKVART(SEQ ID NO:1)。

11.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的腺病毒,其中所述腺病毒经进一步修饰而包括至少一个编码治疗分子或试剂的转基因。

12.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的腺病毒,其中所述腺病毒经进一步修饰而在E1A基因中包括24-碱基对缺失d1922-947(Δ24突变),以将病毒复制限制为pRB缺陷型细胞。

13.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的腺病毒,其中所述腺病毒经进一步修饰而在E3/19K的内质网(ER)保留结构域内的位置445处包括单个腺嘌呤碱基添加(T1突变),以增强溶瘤效力。

14.前述权利要求中任一项所述的修饰的腺病毒,其用作药物。

15.权利要求1-14中任一项所述的修饰的腺病毒,其用于癌症治疗。

16.权利要求1-14中任一项所述的修饰的腺病毒,其用于制备用于治疗癌症的药物。

17.根据权利要求15或16中任一项所述的修饰的腺病毒,其中所述癌症选自:鼻咽癌、滑膜癌、肝细胞癌、肾癌、结缔组织癌、黑素瘤、肺癌、肠癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、脑癌、喉癌、口腔癌、肝癌、骨癌、胰腺癌、绒毛膜癌、胃泌素瘤、嗜铬细胞瘤、催乳素瘤、T细胞白血病/淋巴瘤、神经瘤、希佩尔·林道综合征、佐林格·埃里森综合症、肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、输尿管癌、脑癌、少突胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、脑膜瘤、脊髓瘤、骨癌、骨软骨瘤、软骨肉瘤、尤因氏肉瘤、原发部位未知的癌症、类癌、胃肠道类癌、纤维肉瘤、乳腺癌、佩吉特氏病、宫颈癌、结肠直肠癌、直肠癌、食道癌、胆囊癌、头癌、眼癌、颈癌、肾癌、威尔姆斯瘤、肝癌、卡波济肉瘤、前列腺癌、肺癌、睾丸癌、霍奇金氏病、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、皮肤癌、间皮瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、内分泌胰腺癌、胰高血糖素瘤、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、垂体癌、软组织肉瘤、视网膜母细胞瘤、小肠癌、胃癌、胸腺癌、甲状腺癌、滋养细胞癌、葡萄胎、子宫癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、听神经瘤、蕈样肉芽肿、胰岛素瘤、类癌综合征、生长抑素瘤、牙龈癌、心脏癌、唇癌、脑膜癌、口腔癌、神经癌、上颚癌、腮腺癌、腹膜癌、舌咽癌、胸腔癌、唾液腺癌、舌癌以及扁桃体癌。

18.根据权利要求17中任一项所述的修饰的腺病毒,其中所述癌症选自:卵巢癌、胰腺癌、食道癌、肺癌、宫颈癌、头颈癌、口腔癌、喉癌、皮肤癌、乳腺癌、肾癌以及结肠直肠癌。

19.药物组合物,包含权利要求1-13中任一项所述修饰的腺病毒和药学上可接受的载体、佐剂、稀释剂或赋形剂。

20.制备药物组合物的方法,包括使权利要求1-13中任一项所述修饰的腺病毒与药学或兽医学可接受的载体或媒介结合或联合。

21.治疗癌症的方法,包括向有需要的患者施用有效量的权利要求1-13中任一项所述修饰的腺病毒或权利要求19所述的药物组合物。

修饰的腺病毒

[0001] 本申请是申请日为2019年02月13日,申请号为201980026226.X,发明名称为“修饰的腺病毒”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及修饰的溶瘤Ad5血清型腺病毒,包含该腺病毒的药物组合物;以及使用该腺病毒治疗癌症的方法,其中所述修饰的腺病毒包含六邻体高变区7中的至少一个防止病毒与凝血因子10(FX)结合的点突变(HVR7突变);纤维球状突起区(fiber knob region)AB环中的至少一个防止病毒与柯萨奇腺病毒受体(coxsackie and adenovirus receptor,CAR)结合的点突变(KO1突变);以及五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp(RGD)中的至少一个防止病毒与αVβ3/αVβ5整联蛋白结合的点突变。

背景技术

[0003] 癌症病毒疗法是快速兴起的领域,基于1型单纯疱疹的Talimogene Laherparepvec(T-VEC)是首个用于晚期黑素瘤的溶瘤免疫疗法。溶瘤腺病毒是高免疫原性病毒,经常用于各种针对感染病的疫苗方法中。重要的是,它们具有引发和增强免疫应答的出色能力。而且,肿瘤中溶瘤腺病毒的存在及其引起的免疫原性细胞死亡很可能通过使TH1型免疫调节剂例如IFNg表达,使敌对的肿瘤微环境朝着发生临床相关抗肿瘤免疫力的更易感状态发展。然而,溶瘤腺病毒的免疫原性是一把双刃剑,抗病毒免疫力通常如此势不可挡,以至于它可以抵消针对肿瘤表达的自身抗原引起的弱得多的免疫应答。

[0004] 腺病毒5(Ad5)是许多癌症和基因疗法临床试验中使用的常见载体(clinicaltrials.gov,2016),因为它可以进行基因操作,并且可以耐受大的转基因。然而,这种血清型具有几个妨碍了其更广泛临床应用的次优特征。Ad5是常见的呼吸道病毒,在某些人群中血清阳性率接近100%-中和抗体(nAb)迅速使系统递送的治疗载体失活。其他次优特征包括它通过桥接病毒六邻体蛋白和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)广泛地脱靶隔离于脾脏和肝脏,这是人凝血因子10(FX)介导的向性决定的相互作用(tropism-dictating interaction)。在体外,Ad5通过病毒纤维蛋白与柯萨奇腺病毒受体(CAR)之间的相互作用进入宿主细胞,后者在极化上皮细胞的紧密连接内普遍表达,但在进行性癌症中下调。随后,Ad5通过病毒五邻体基底蛋白介导的网格蛋白介导的内吞作用,经由αvβ3/5整联蛋白在宿主细胞中内化。

[0005] 在过去的十年中,随着免疫疗法和刺激患者自身免疫系统靶向和攻击癌症的流行,对溶瘤病毒在癌症治疗中作用的认识发生了巨大变化。在本世纪初,溶瘤病毒被认为是癌症治疗中的活性剂,仅通过其经由溶瘤作用裂解肿瘤细胞的固有能力起作用。近来,它们作为癌症疫苗的用途受到关注,并且它们在溶瘤后从癌细胞中释放肿瘤抗原来激活免疫系统的能力被认为是设计针对癌症的最终免疫疗法的重要特征。

[0006] 因此,病毒载体在临床环境中变得越来越有吸引力,但是,常见的血清型即Ad5的临床疗效因肿瘤特异性差、广泛的脱靶递送和先天性免疫失活而受到阻碍,因此,需要创新

的处理策略。

[0007] 我们在此公开了设计用于克服上述缺点的修饰的腺病毒载体。

发明内容

[0008] 根据本发明的第一方面,提供了修饰的Ad5血清型腺病毒,其包含:

[0009] a)六邻体高变区7中的I421G、T423N、E424S、E450Q或L426Y点突变中的至少一个(HVR7突变),其中所述突变防止病毒与凝血因子10(FX)结合;

[0010] b)纤维球状突起区AB环中的S408E或P409A点突变中的至少一个(KO1突变),其中所述突变防止病毒与柯萨奇腺病毒受体(CAR)结合;和

[0011] c)五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp(RGD)中的D342E或D342A点突变中的至少一个,其中所述突变防止病毒与$\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$整联蛋白结合。

[0012] 本发明的修饰的Ad5血清型腺病毒是有利的,因为其感染脱靶组织的能力受到严重损害,实际上,它对肝脏和脾脏的感染受到阻止和抑制,并且其广泛感染体细胞的能力也受到损害。因此,就可感染的组织而言,修饰的腺病毒受到损害。

[0013] 腺病毒是中等大小的(90-100nm)、无包膜(无外部脂质双层)病毒,其二十面体核衣壳含有双链DNA基因组。在人类中,有57种公认的人类腺病毒血清型(Ad-1至57),分为7种(人类腺病毒A至G):A-12、18、31;B-3、7、11、14、16、21、34、35、50、55;C-1、2、5、6、57;D-8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、36、37、38、39、42、43、44、45、46、47、48、49、51、53、54、56;E-4;F-40、41以及G-52。因此,本文中提到Ad5是指属于腺病毒C亚类的血清型5腺病毒。

[0014] 如本领域技术人员已知的,腺病毒病毒体由围绕病毒DNA-蛋白核心复合物的非包封的二十面体形衣壳组成。六邻体是最丰富的结构蛋白,每个衣壳中有240拷贝的三聚体分子。十二拷贝的六邻体三聚体形成衣壳的20个三角面中的每一个。五邻体基底蛋白和纤维蛋白的复合物封闭了衣壳的顶点,并促进了病毒的吸附(纤维)和内化(五邻体基底)。

[0015] 除了9种高变区(HVR)之外,六邻体蛋白在不同的腺病毒血清型之间是高度保守的。这些HVR位于两个形成六邻体蛋白暴露表面的不同环中,HVR 1-6位于DE1环中,而HVR 7-9位于FG1环中。

[0016] 因此,本文中提到HVR7的至少一个突变是指高变区7中的突变。具体而言,所述至少一个HVR7突变防止与凝血因子X的相互作用,从而限制了修饰的腺病毒脱靶隔离于肝脏,以及改善靶向靶癌细胞。

[0017] 在优选的实施方案中,所述至少一个HVR7突变包含至少一个防止FX相互作用的氨基酸取代突变,所述氨基酸取代突变选自I421G,T423N、E424S、E450Q或L426Y中的一个或多个。最优选地,所述至少一个HVR7突变另外或可替代地包含I421G、T423N、E424S和L426Y点突变中的至少一个。

[0018] 如本领域技术人员所知,腺病毒载体具有导致该载体广泛分布的天然向性。C群腺病毒例如Ad5进入细胞被认为涉及病毒通过病毒纤维蛋白与柯萨奇病毒-腺病毒受体(CAR)相互作用对细胞的高度亲和结合。因此,出于抗癌治疗的目的,腺病毒载体靶向特异性组织或细胞类型需要修饰载体的正常向性,以提高特异性。

[0019] 腺病毒感染开始于通过病毒表面上的专门蛋白识别宿主细胞受体,即腺病毒纤维

蛋白,特别是腺病毒纤维蛋白的球状羧基末端结构域,称为羧基末端球状突起结构域。因此,本文中提到腺病毒纤维蛋白的球状突起是指腺病毒纤维蛋白的球状羧基末端结构域。

[0020] 因此,提到至少一个KO1突变是指纤维球状突起区AB环中的至少一个突变。具体而言,所述至少一个KO1突变防止病毒与CAR结合。在优选的实施方案中,所述至少一个KO1突变包含至少一个防止CAR结合的点突变,所述点突变选自S408E或P409A中的一个或多个。最优选地,所述点突变包含S408E和P409A点突变。

[0021] 腺病毒五邻体基底包含五个Arg-Gly-Asp序列,并结合整联蛋白αvβ3和αvβ5($\alpha_V\beta_3$/$\alpha_V\beta_5$),从而通过允许病毒内化来促进病毒感染。通过防止这种相互作用,我们发现减少了针对脾脏的场外靶向(off-site targeting),从而促进了肿瘤特异性靶向,而且,抑制了用于抗癌治疗背景时另外导致不良免疫宿主应答的促炎性细胞因子的释放。

[0022] 因此,提到至少一个RGD突变是指五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp中的至少一个突变(RGD突变),其中所述突变防止病毒与αVβ3/αVβ5整联蛋白结合。在优选的实施方案中,所述至少一个RGD突变包含至少一个选自D342E或D342A中的一个或多个的点突变,以分别产生RGE或RGA。最优选地,所述点突变是产生RGE的D342E。

[0023] 还在另一个优选的实施方案中,进一步修饰所述腺病毒以包括至少一个选择性靶向肿瘤细胞,特别是特定类型的肿瘤细胞的癌症靶向修饰。如本领域技术人员应当认识到的,通过并入本文所述突变以修饰腺病毒的天然向性,而且引入至少一个靶向修饰/序列,所述修饰的病毒具有改善的肿瘤特异性和减少的场外靶向,从而减少了不良副作用。癌症靶向修饰/序列的实例是本领域技术人员已知的,例如但不限于结合氨基肽酶N的(含)NGR肽,特别是在腺病毒纤维蛋白的HI环中携带NGR的腺病毒(Ad);与泛癌标志物EphA2结合的(含)YSA肽,特别是在嵌合纤维中携带YSA的腺病毒,可导致EphA2阳性而不是EphA2阴性癌细胞的强转导;生长因子抗体,特别是这些靶向部分的化学连接,例如bFGF、EGFR、使用抗生物素蛋白/生物素连接的腺病毒抗体(例如西妥昔单抗、赫赛汀、阿瓦斯汀等);基质降解酶,其一旦附着(通常通过化学连接,例如通过透明质酸酶连接)到病毒外部就会降解细胞外膜,从而使病毒更有效地渗透到肿瘤微环境中。

[0024] 在优选的实施方案中,所述癌症靶向修饰包括将αvβ6整联蛋白结合肽(使用常规技术,例如序列结合和同源技术鉴定),例如A20肽序列NAVPNLRGDLQVLAQKVART(SEQ ID NO:1)插入病毒中,或由病毒表达,并且理想的是,插入病毒纤维球状突起HI环(在下文中这种修饰的病毒称为Ad5.3D.A20)内或在其中表达。A20最初源自口蹄疫病毒(FMDV)衣壳蛋白VP1,对αvβ6整联蛋白具有天然的高亲和力。αvβ6整联蛋白在三分之一的卵巢癌和多种其他上皮癌中表达,在健康的成人组织中无法检测到。因此,如本领域技术人员应当理解的,通过在修饰的病毒中表达和并入该序列,修饰的病毒可以选择性靶向过表达αvβ6整联蛋白的癌症,例如但不限于卵巢癌、胰腺癌、食道癌、肺癌、宫颈癌、头颈癌、口腔癌、喉癌、皮肤癌、乳腺癌、肾癌和结肠直肠癌。

[0025] 技术人员应当理解,所述突变的同源物、直向同源物或功能性衍生物也可用于本发明。因此,例如,本发明涵盖包括一个或多个添加、缺失、取代等的突变。另外,有可能用一个类似“类型”的氨基酸替代另一个氨基酸。例如,可以通过使用诸如CLUSTAL程序之类的程序比较氨基酸序列来实现用一种疏水性氨基酸替代另一种疏水氨基酸。该程序比较氨基酸序列,并通过在两个序列中适当插入空格来找到最佳比对。可以计算氨基酸同一性或相似

性(同一性表示氨基酸类型的保守性)以获得最佳比对。像BLASTx这样的程序会比对相似序列的最长的一段序列,并为拟合指定一个值。因此,可以在发现多个相似区域的情况下进行比较,每个区域都具有不同的得分。在本发明中考虑了两种分析类型。

[0026] 在又一个优选的实施方案中,所述修饰的腺病毒载体(Ad5.3D.A20)包含:

[0027] a)六邻体高变区7中的I421G、T423N、E424S、E450Q或L426Y点突变的至少一个(HVR7突变),其中所述突变防止病毒与凝血因子10(FX)结合;

[0028] b)纤维球状突起区AB环中的S408E或P409A点突变的至少一个(KO1突变),其中所述突变防止病毒与柯萨奇腺病毒受体(CAR)结合;

[0029] c)五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp(RGD)中的D342E或D342A点突变的至少一个,其中所述突变防止病毒与$\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$整联蛋白结合;和

[0030] d)在病毒纤维球状突起HI环中插入或表达A20肽序列NAVPNLRGDLQVLAQKVART(SEQ ID NO:1)。

[0031] 更优选,所述修饰的腺病毒载体(Ad5.3D.A20)包含:

[0032] a)六邻体高变区7中的I421G、T423N、E424S和L426Y点突变(HVR7突变),其中所述突变防止病毒与凝血因子10(FX)结合;

[0033] b)纤维球状突起区AB环中的S408E和P409A点突变(KO1突变),其中所述突变防止病毒与柯萨奇腺病毒受体(CAR)结合;

[0034] c)五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp中的D342E点突变(产生RGE突变),其中所述突变防止病毒与αVβ3/αVβ5整联蛋白结合;和

[0035] d)在病毒纤维球状突起区HI环中插入或表达A20肽序列NAVPNLRGDLQVLAQKVART(SEQ ID NO:1)。

[0036] 在本发明的上述病毒载体中,通过突变主要衣壳蛋白:六邻体、纤维和五邻体,成功地消除了Ad5的天然向性。在分别负责与凝血因子10(FX)、柯萨奇腺病毒受体(CAR)以及αvβ3/5整联蛋白结合的氨基酸残基中进行取代突变,在六邻体高变区7(HVR7突变)、纤维球状突起AB环(KO1突变)和五邻体整联蛋白结合基序Arg-Gly-Asp(RGD突变)中进行修饰,生成了三重脱靶Ad5基载体主链(Ad5.3D)。

[0037] 使用同源重组技术生成了Ad5.3D载体,并使用经改造而拯救受损的腺病毒的互补细胞系以高病毒滴度提供。三种向性消除突变的组合在体外完全阻断了经由αvβ3/5整联蛋白、CAR和FX的细胞进入。此外,作为原理上的证明,我们通过以下方式进一步修饰腺病毒:并入额外靶向序列(即αvβ6)以优先靶向和感染特定癌症肿瘤细胞,该并入通过将异源αvβ6整联蛋白结合肽(A20,NAVPNLRGDLQVLAQKVART;SEQ ID NO:1)遗传并入病毒纤维球状突起HI环(Ad5.3D.A20)中进行。使用经改造过表达β6的296-β6细胞繁殖Ad5.3D.A20腺病毒。

[0038] αvβ6整联蛋白在三分之一的卵巢癌和多种其他上皮癌中表达,并且在健康的成人组织中无法检测到。即使在存在高度中和性的腹水的情况下,Ad5.3D.A20仍能有效转导αvβ6+卵巢癌细胞系和主要临床腹水来源的EOC离体培养物。与Ad5相比,在非荷瘤小鼠中系统递送后,Ad5.3D.A20的体内生物分布状况发生了显著变化,萤光素酶在所有脱靶器官中的表达均降低,并且肝脏中的病毒基因组载荷降低了7个对数。此外,在携带腹膜内SKOV3(-β6)EOC异种移植物的免疫功能低下的小鼠中评估了腹膜内递送后溶瘤Ad5.3D.A20(OAd5.3D.A20)的抗肿瘤功效。与Ad5治疗相比,使用OAd5.3D.A20进行溶瘤治疗可改善总存

活率。

[0039] 因此,Ad5.3D修饰的腺病毒是一种病毒载体,其通过并入另外的癌症特异性靶向突变,代表了用于癌症治疗和腺病毒疗法的令人兴奋的靶向平台。

[0040] 在又一个优选的实施方案中,进一步修饰所述腺病毒,以包括至少一个编码分子或试剂例如但不限于治疗剂的转基因。因此,该实施方案涉及在细胞内递送试剂以对靶癌细胞发挥治疗作用。试剂的实例可以包括直接刺激免疫应答的试剂,例如GM-CSF、IL-12;间接刺激免疫系统的试剂,例如编码免疫检查点抑制剂以抑制诸如CTLA-4、PD-L1、PD1或Lag3等共阻遏物的抗体(或抗体片段);双特异性T细胞结合(BiTE)抗体构建体;双特异性自然杀伤细胞结合(BiKE)抗体构建体;使肿瘤对于细胞基免疫疗法敏感的试剂,例如编码CD19;耗尽肿瘤微环境内调节性T细胞的试剂;编码抗CD25抗体;使肿瘤对放射疗法敏感或用于成像的试剂,例如通过编码钠/碘同向转运蛋白(NIS)或2型生长抑素受体(SSTR2))。或者,转基因可以编码对肿瘤细胞直接毒性的治疗剂,例如通过编码转基因在永生化细胞中表达减少(REIC/DKK3),或通过将无毒前药转化为有毒药物来使癌细胞敏感的酶,例如胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、胸苷激酶。本领域已知的和可用于治疗癌症的其他转基因可用于本发明的工作中。

[0041] 在又一个优选的实施方案中,进一步修饰所述腺病毒,以在E1A基因中包括24-碱基对缺失dl922-947(Δ24突变),以将病毒复制限制为pRB缺陷型细胞。

[0042] 仍然更优选地,进一步修饰所述腺病毒,以在E3/19K的内质网(ER)保留结构域内的位置445处包括单个腺嘌呤碱基添加(T1突变),以增强溶瘤效力。

[0043] 根据本发明的第二方面,提供了本文所定义的修饰的腺病毒,其用作药物。

[0044] 根据本发明的第三方面,提供了本文定义的修饰的腺病毒,其用于治疗癌症。

[0045] 本发明的第四方面,提供了本文所定义的修饰的腺病毒,其用于制备用于治疗癌症的药物。

[0046] 最优选地,本文所指的癌症包括以下癌症中的任何一种或多种:鼻咽癌、滑膜癌、肝细胞癌、肾癌、结缔组织癌、黑素瘤、肺癌、肠癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、脑癌、喉癌、口腔癌、肝癌、骨癌、胰腺癌、绒毛膜癌、胃泌素瘤、嗜铬细胞瘤、催乳素瘤、T细胞白血病/淋巴瘤、神经瘤、希佩尔·林道综合征(von Hippel-Lindau disease)、佐林格·埃里森综合症(Zollinger-Ellison syndrome)、肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、输尿管癌、脑癌、少突胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、脑膜瘤、脊髓瘤、骨癌、骨软骨瘤、软骨肉瘤、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、原发部位未知的癌症、类癌、胃肠道类癌、纤维肉瘤、乳腺癌、佩吉特氏病(Paget's disease)、宫颈癌、结肠直肠癌、直肠癌、食道癌、胆囊癌、头癌、眼癌、颈癌、肾癌、威尔姆斯瘤(Wilms'tumor)、肝癌、卡波济肉瘤、前列腺癌、肺癌、睾丸癌、霍奇金氏病、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、皮肤癌、间皮瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、内分泌胰腺癌、胰高血糖素瘤、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、垂体癌、软组织肉瘤、视网膜母细胞瘤、小肠癌、胃癌、胸腺癌、甲状腺癌、滋养细胞癌(trophoblastic cancer)、葡萄胎、子宫癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、听神经瘤(acoustic nueroma)、蕈样肉芽肿、胰岛素瘤、类癌综合征、生长抑素瘤、牙龈癌、心脏癌、唇癌、脑膜癌、口腔癌(mouth cancer)、神经癌、上颚癌、腮腺癌、腹膜癌、舌咽癌(pharynx cancer)、胸腔癌(pleural cancer)、唾液腺癌、舌癌以及扁桃体癌。

[0047] 用于药物中的化合物通常会以药物或兽医学组合物的形式提供,因此,还根据本

发明的第五方面,提供了包含本文所定义的腺病毒和药学上可接受的载体、佐剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0048] 合适的药物赋形剂是本领域技术人员众所周知的。可以将药物组合物配制为通过任何合适的途径给药,例如口服、颊、鼻或支气管(吸入)、透皮或肠胃外给药,并且可以通过药学领域公知的任何方法制备。

[0049] 可以通过使上文定义的腺病毒与载体联合(association)来制备组合物。通常,通过将腺病毒与液体载体或细分的固体载体或两者均匀且紧密地联合,然后如果需要使产品成型来制备制剂。本发明延伸至制备药物组合物的方法,包括使上文定义的腺病毒与药学或兽医学可接受的载体或媒介结合或联合。

[0050] 进一步根据本发明的另一个方面,提供了治疗癌症的方法,包括向有需要的患者施用有效量的本文定义的修饰的腺病毒或药物组合物。

[0051] 本文提到“有效量”的腺病毒或包含“有效量”的腺病毒的组合物是指,足以实现所需的生物学效果例如癌细胞死亡的腺病毒或组合物。应当理解,有效剂量会取决于接受者的年龄、性别、健康状况和体重,如果有的话,同时进行的治疗的种类、治疗的频率以及所需效果的性质。通常,有效量由施用治疗的人确定。

[0052] 在所附的权利要求书和本发明的前述说明中,除非上下文由于表达语言或必要的含义而另外需要,否则以包括性的含义使用单词“包含(comprises)”或诸如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”等变体,即指定在本发明的各种实施方案中存在所陈述特征,但不排除存在或添加其他特征。

[0053] 本说明书引用的所有参考文献,包括任何专利或专利申请,均通过引用并入本文。不承认任何参考文献构成现有技术。此外,不承认任何现有技术构成了本领域公知常识的一部分。

[0054] 本发明每个方面的优选特征可以如结合任何其他方面所描述的。

[0055] 根据以下实施例,本发明的其他特征会变得显而易见。一般而言,本发明扩展到本说明书(包括所附权利要求和附图)中公开的特征中任何新颖特征的或其任何新颖组合。因此,结合本发明的具体方面、实施方案或实施例描述的特征、整数、特性、化合物或化学部分应理解为适用于本文所述的任何其他方面、实施方案或实施例,除非与其不相容。

[0056] 此外,除非另有说明,否则本文公开的任何特征可以由具有相同或相似目的的替代特征代替。

[0057] 在本发明的整个说明书和权利要求书中,单数形式包括复数形式,除非上下文另有要求。特别是,在使用不定冠词的情况下,除非上下文另外要求,否则本说明书应理解为考虑复数以及单数。

附图说明

[0058] 现在通过参考以下内容仅以实施例的方式描述本发明的实施方案,其中:

[0059] 图1A-1C.生成的载体。(A)Ad5和三重脱靶的avβ6整联蛋白重新靶向载体Ad5.3D.A20的病毒滴度和预期向性。(B)溶瘤Ad5.3D.A20的载体图。(C)血清型5腺病毒(Ad5)纤维球状突起和在HI环中插入A20肽(NAVPNLRGDLQVLAQKVART;SEQ ID NO:1)(绿色)的修饰的Ad5.3D.A20纤维球状突起的比较预测3D建模。CAR,柯萨奇腺病毒受体;FX,凝血因

子10;HVR7,六邻体高变区7中的FX结合突变;KO1,纤维球状突起AB环中的CAR结合突变;Luc,荧光素酶转基因;vp,病毒颗粒。

[0060] 图2A-2B.天然受体向性的消除。(A)复制缺陷型Ad5和Ad5.3D.A20载体与柯萨奇腺病毒受体(CAR)的结合。长方形条的上面显示了来自Ad5.3D.A20的病毒转基因表达相对于Ad5的比率。(B)复制缺陷型Ad5和HVR7突变的Ad5变体与凝血因子10的结合(在萤光素酶测定中,通过在存在人FX的情况下,用(+)或不使用(-)抗凝血剂X-bp,在37℃下将细胞感染3h,评估FXO)。HVR7,FX结合突变。统计显著性:ns,p?0.05;**,p<0.01。

[0061] 图3A-3D.αvβ6整联蛋白靶向的体外评估。复制缺陷型野生型(Ad5)和三重脱靶整联蛋白重新靶向(Ad5.3D.A20)载体在(A)αvβ6+BT-20乳腺癌细胞和(B)来自患者004的αvβ6+原发性上皮性卵巢癌(EOC)细胞中的转导效率。(C)溶瘤载体(T1/Δ24)在感染的avβ6-low/CAR+SKOV3和avβ6-high/CAR+SKOV3-β6细胞(内部产生的SKOV3细胞,具有avβ6的逆转录病毒表达)的荧光素酶表达。(D)αvβ6整联蛋白介导的细胞进入的竞争抑制。通过FACS对表达αvβ6最高的前10%的SKOV3-β6细胞进行分选、继代培养并感染。IgG,正常小鼠IgG对照;10D5,抗αvβ6功能阻断抗体。长方形条的上面显示了病毒转基因表达的比例。统计学显著性ns,p>0.05;*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001。

[0062] 图4A-4D.恶性卵巢腹水对离体载体转导的影响。(A)通过ELISA量化二十个临床卵巢腹水(OAS)样品中和来自健康男性志愿者的对照血清(黑色实线)中的抗Ad5抗体。水平线表示对照血清中抗Ad5抗体的50%和100%结合。(B)通过蛋白质印迹,抗Ad5抗体在腹水和血清中的抗原特异性。在(C)BT-20细胞和(D)来自患者004上皮卵巢癌细胞的原代离体培养物中,在不存在和存在卵巢癌患者004的不同腹水稀释液的情况下,复制缺陷型(Ad5)载体和Ad5.3D.A20载体的载体转导效率。将细胞用浓度递增的腹水预孵育并感染。

[0063] 图5A-5H.系统递送后72小时,复制缺陷型载体的生物分布。静脉内注射3天后,复制缺陷型(Ad5)病毒和三重脱靶的Ad5.3D.A20病毒的生物分布研究方案(A)和生物分布的体内成像(B)。图板B的总发光信号量化:在(C)全身、(D)肝脏、335(E)脾脏、(F)肺脏、(G)卵巢和(H)心脏中。i.p.,腹膜内;IVIS,体内成像系统;p.i.,感染后;vp,病毒颗粒。误差棒表示平均值的标准误差;n=5/组;ns,p>0.05;*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001。

[0064] 图6A-6E.系统递送后脱靶器官中的病毒基因组拷贝数。系统载体递送后,利用qPCR,来自在图5中切除的组织的六邻体的腺病毒基因组拷贝数:(A)肝脏,(B)脾脏,(C)肺,(D)卵巢和(E)心脏,通过qPCR进行六邻体基因的表达。通过在GraphPad Prism中进行单向ANOVA和事后检验的Sidak多重比较,对数据进行标准化和分析。误差棒表示平均值的标准误差;n=5/组;*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;p<0.0001;ns,无统计学显著差异。图形下方的数字表示Ad5.3D.A20组相对于Ad5组的倍数减少。

[0065] 图7A-7F.溶瘤功效研究:在卵巢癌异种移植模型中溶瘤载体的腹膜内递送。(A)研究方案。将人卵巢癌细胞的腹膜内异种移植物(SKOV3和SKOV3-□6)植入免疫功能低下的小鼠(n=5/组)中,然后在第14天、第16天和第18天用3剂量的静脉内溶瘤Ad5或三重脱靶整联蛋白重新靶向的Ad5.3D.A20进行处理。在第一次处理后349 48h(第16天)和第一次处理后7天(第21天)测定了发光热图图像(B,D)和全身发光量化(C,E)。接种(F)SKOV3(αvβ6-low/CAR+)和(G)SKOV3-β6(αvβ6-high/CAR+)细胞,然后如上所述用病毒处理的动物的总存活

率,显示为Kaplan-Meyer存活曲线,直到101天的最终研究终点。i.p.,腹膜内;IVIS,体内成像系统;vp,病毒颗粒*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001。IVIS,体内成像系统。

[0066] 图8A-8D.生物分布研究:离体发光强度的热图图像。尸体解剖后立即从已经用(A)PBS(对照)、(B)Ad5.Luc或(C)Ad5.3D.A20载体静脉内接种的动物中收集肝脏、脾脏、肺、卵巢和心脏。将器官浸入D-荧光素中,并在IVIS成像仪中成像。组织的颜色表示萤光素酶转基因发出的相对发光强度。将标度(scale)标准化以排除背景发光。(D)总发光(光子/秒)相对于Ad5.Luc的倍数减少。将Ad5.Luc组的平均发光强度除以Ad5.3D.A20组中每个器官的平均发光强度。从所有值中减去PBS对照组的平均值。

[0067] 图9A-9B.生物分布研究:福尔马林固定的石蜡包埋的肝脏切片的免疫组织化学。(A)苏木精-伊红染色,用于使细胞结构可视化,以及使用兔IgG同种型对照抗体(1μg/mL)、兔抗CAR一抗(1:100)和兔抗ITGB6(αvβ6)一抗(1:10)对小鼠肝脏染色。(B)使用兔抗Ad5一抗(1μg/mL)对用Ad5或Ad5.3D.A20载体感染的动物的Ad5感染的肝细胞进行染色。DAB用作底物,将切片在苏木精中复染,封装在盖玻片上并在光学显微镜下观察。

[0068] 图10.初步研究:NOD/SCID小鼠的肿瘤定位和摄取率(take rate)。在第0天,腹膜内植入1×10^7个SKOV3-β6细胞/动物,并在每个时间点处死两只小鼠:在第7、14、21和48/49天(最后终点)。测量肿瘤的大致大小,并量化腹水体积。

[0069] 图11A-11B.溶瘤功效研究:终点肿瘤的表征。通过qPCR,在来自SKOV3和SKOV3-β6同期组群的OAd5和OAd5.3D.A20的尸体解剖后的肿瘤中,(A)病毒基因组拷贝数(每40ng DNA)和(B)αvβ6整联蛋白(ITGB6)基因表达。通过使用人ACTB(β-肌动蛋白)作为内源对照,显示了相对于来自阴性对照PBS组的小鼠#1,SKOV3同期组群的αvβ6表达水平。

[0070] 图12A-12I.在胰腺癌细胞系中表达荧光素酶的Ad5.3D.A20和Ad5的转导活性。测定了αvβ6和hCAR在ASPC-1(A)、BxPc(B)、CFPAC(C)、PANC10-05(D)、SW1990(E)、PANC0403(F)、SUIT-2(G)、MiPaCa2(H)和PT45(I)胰腺癌细胞系中的表达水平。以5,000vp表达荧光素酶的病毒/细胞感染细胞,并在感染后48小时对转基因表达进行量化和校正总细胞蛋白。

[0071] 图13.在食道癌细胞系中表达荧光素酶的Ad5.3D.A20和Ad5的转导活性。测定了αvβ6和hCAR在Kyse-30食道癌细胞中的表达水平。以5,000vp表达荧光素酶的病毒/细胞感染细胞,并在感染后48小时对转基因表达进行量化和校正总细胞蛋白。

[0072] 图14A-14D.在乳腺癌细胞系中表达荧光素酶的Ad5.3D.A20和Ad5的转导活性。测定了αvβ6和hCAR在BT-20(A)、BT-474(B)、MDA-MB-361(C)和MDA-MB-231(D)乳腺癌细胞中的表达水平。以5,000vp表达荧光素酶的病毒/细胞感染细胞,并在感染后48小时对转基因表达进行量化和校正总细胞蛋白。

[0073] 图15A-15C.在肺癌细胞系中表达荧光素酶的Ad5.3D.A20和Ad5的转导活性。测定了αvβ6和hCAR在A427(A)、A549(B)和NCI-H460(C)肺癌细胞中的表达水平。以5,000vp表达荧光素酶的病毒/细胞感染细胞,并在感染后48小时对转基因表达进行量化和校正总细胞蛋白。

[0074] 图16.复制缺陷型溶瘤(O)Ad5.3D.A20和Ad5在胰腺癌细胞系和乳腺癌细胞系中的溶瘤活性。将胰腺癌细胞系Suit 2($\alpha v\beta6^{high}/hCAR^{high}$)、MiCaPa2($\alpha v\beta6^{low}/hCAR^{high}$)、PANC0403($\alpha v\beta6^{vhigh}/hCAR^{high}$)和PT45($\alpha v\beta6^{neg}/hCAR^{high}$)以及乳腺癌细胞系BT-20($\alpha v\beta6^{high}/hCAR^{neg}$)和MDA-MB-231($\alpha v\beta6^{neg}/hCAR^{high}$)以20,000个细胞/孔的密度接种在96孔板中。以5,

000vp/细胞感染细胞,并使用标准MTS细胞活力测定,每24小时对细胞活力进行量化。如预期的那样,复制缺陷型载体对细胞活力没有有害影响,而OAd5.3D.A20和OAd5的细胞杀伤(溶瘤)活性与细胞αvβ6和hCAR的存在/不存在直接相关。

具体实施方式

[0075] 材料和方法

[0076] 腺病毒载体、细胞系和临床腹水

[0077] 所有生成的载体均表达萤光素酶(Luc),并基于在细菌人工染色体(BAC)中捕获的野生型Ad5基因组。如先前所述(Uusi-Kerttula et al.,2016),通过AdZ同源重组方法(Stanton et al.,2008),将所有基因修饰引入BAC中。在T-Rex 293或HEK293-β6细胞中产生了病毒(A20修饰的病毒)。复制缺陷型载体携带完整的E1/E3基因缺失,而溶瘤载体在E1A基因中具有24个碱基对的缺失d1922-947(Δ24)(Fueyo et al.,2000),以将病毒复制限制为pRB缺陷型细胞(Sherr,1996),并具有T1突变,即在E3/19K的内质网(ER)保留域内的位置445处添加一个腺嘌呤碱基,以增强溶瘤效力(Gros et al.,2008)。将来自FMDV的异源A20肽序列(NAVPNLRGDLQVLAQKVART;SEQ ID NO:1)遗传插入纤维球状突起HI环中。基本上如先前所述(Uusi-Kerttula et al.,2015,Uusi-Kerttula et al.,2016),在T-REx-293或HEK293-β6细胞中产生高滴度病毒。

[0078] 内部产生SKOV3-β6细胞系。使用Effectene将具有β6基因插入的嘌呤霉素选择性pBABE-β6质粒(#13596;Addgene)转染到293Phoenix包装细胞系中。48h后,收集并过滤逆转录病毒,并用于感染SKOV3细胞。在5μg/mL嘌呤霉素存在下选择表达αvβ6整联蛋白的细胞。通过Wales Cancer Bank生物材料申请(编号WCB 14/004),允许从腹水收集和培养原代EOC细胞。所有患者在收集前均签署了知情同意书。从在加的夫的Velindre Cancer Centre(Velindre Cancer Centre,Cardiff)接受晚期卵巢癌治疗的患者中收集腹水临床样品,并进行匿名化。如前所述(Uusi-Kerttula et al.,2015,Uusi-Kerttula et al.,2016)对细胞进行处理和继代培养。

[0079] 体外测定

[0080] 如前所述(Uusi-Kerttula et al.,2015,Uusi-Kerttula et al.,2016),通过流式细胞术,使用抗αvβ6克隆10D5和抗CAR抗体克隆RmcB,随后是继发性F(ab')2-山羊α-小鼠IgG(H+L)IgG AlexaFluor647,评估细胞表面受体表达。基本上根据先前报道的ELISA方法(Stallwood et al.,2000)确定卵巢腹水和血清中抗Ad5抗体的存在。通过蛋白质印迹评估抗体的抗原特异性。

[0081] 基本上如早先所述(Uusi-Kerttula et al.,2015,Uusi-Kerttula et al.,2016),在萤光素酶报告基因测定中,在多模式读板仪上,评估了体外细胞转导效率,并将相对光单位(RLU)标准化为每个孔中的总蛋白浓度(RLU/mg)。为了评估FX对转导效率的影响,转导培养基补充了10μg/mL的人FX。如前所述(Uusi-Kerttula et al.,2016),使用抗αvβ6抗体(10μg/mL;克隆10D5,Millipore)或正常的抗小鼠对照IgG(10μg/mL;Santa Cruz)在竞争抑制测定中评估了细胞受体的载体向性。中和测定包括在无细胞OAS的2倍连续稀释液(1:40-1:2.5,对应于2.5×40%的最终浓度)中的预孵育步骤。

[0082] 体内研究

[0083] 所有动物实验均在美国罗切斯特的梅奥诊所(Mayo Clinic,Rochester,USA)进行。出于结果的一致性,所有动物均为7周龄且性别匹配。之所以选择母鼠是因为它们易于饲养。所有动物的处理和注射均由经验丰富的兽医技术人员即Jill M.Thompson女士按照当地法规进行。

[0084] 由于野生型B6白化病小鼠(B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrl)(n=5/组)的白色外套(white coat)对荧光素酶追踪的可行性,因此在该小鼠中进行复制缺陷型载体的生物分布研究。将病毒以1×10^{11}vp注入尾侧静脉。在感染后72小时,在IVIS成像后,通过吸入CO_2处死所有小鼠,并收集器官进行分析。在免疫功能低下的NOD/SCID小鼠(n=5/组)中进行了功效研究。首先在初步研究中优化处理方案(n=8)。在第0天,腹膜内植入1×10^{7}个SKOV3-β6细胞,并在第7、14、21和48/49天(最终终点)处死两只小鼠。通过流式细胞术评估每个时间点肿瘤中CAR和αvβ6的表达。在溶瘤功效研究中,在第0天用,用1×10^{7}个SKOV3细胞或SKOV3-β6细胞对NOD/SCID小鼠进行腹膜内异种移植。然后,通过在第14、16和18天腹膜内注射1×10^{10}vp的OAds(PBS,OAd5和OAd5.3D.A20)对小鼠(n=5/组)进行处理。主要终点是总存活率(%)。通过在Xenogen IVIS200成像仪(PerkinElmer)中量化荧光素酶转基因发出的发光信号来监测载体的摄取。通过qPCR量化原发性脱靶器官和终点肿瘤中的病毒基因组拷贝数。通过qPCR量化终点肿瘤中的αvβ6基因表达水平。

[0085] 细胞活力测定简要方案

[0086] 对于细胞活力测定,根据制造商建议的方案使用了CellTiter 96AQueous One Solution Cell Proliferation测定(Promega)。将20,000或30,000个细胞接种到96孔板的每个孔中,并孵育过夜。在无血清培养基中以5,000病毒颗粒/细胞(vp/细胞)将细胞感染3小时。在感染后24、48、72、96和144小时,通过在每个孔中添加20μl CellTiter 96AQueous One Solution试剂确定活细胞。在潮湿的5%CO_2气氛中孵育2小时后,在490nm处测量吸光度。计算与未处理细胞相关的活细胞百分比。结果是平均值,n=3,误差棒代表标准偏差。

[0087] 统计分析

[0088] 所有图形和统计分析均在GraphPad Prism 6.03版中完成。通过双尾不配对t检验或单向ANOVA与事后检验的Dunnett多重比较分析了体外和离体测定。通过单向ANOVA和事后检验的Sidak的多重比较,对体内数据进行了标准化和分析。溶瘤处理后的总存活率(%)显示为Kaplan-Meier存活曲线;通过Gehan-Breslow-Wilcoxon检验分析存活率。所有检验:ns,p>0,05;*,p<0.05;**,p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0089] 结果

[0090] 我们生成并生产了新型Ad5.3D.A20载体的高病毒滴度复制缺陷型溶瘤变体,该突变具有将载体重新靶向表达αvβ6整联蛋白的细胞的三个脱靶突变和A20肽插入物(图1A-1C)。多基因操作对滴度没有显著影响。在SWISS147 MODEL平台中的预测建模显示出免疫优势HI环内A20肽的突出(图1C)。

[0091] 在表达数量可变的CAR和αvβ6整联蛋白的细胞系中,评估复制缺陷型载体的转导效率。Ad5.3D.A20的脱靶突变完全消除了经由CAR进入CAR-CHO细胞(CAR+)中,而Ad5有效地转导了这些细胞(图2A)。HVR7突变消除了经由FX进行的载体转导(图2B)。正如预期的那样,与无FX培养条件相比,FX显著增加了Ad5向这些细胞的转导(图2B;右图)。相反,在培养基中添加人FX对结合切除的Ad5.HVR7对照载体的FX在CHO-K1细胞中的转导效率没有影响(图

2B;左图)。此外,通过在培养基中添加3:1摩尔过量的与FX结合并使其失活的Gla结构域相互作用蛋白即抗凝剂X-bp,可以逆转观察到的Ad5的转导增强(图2B,右图)。相反,FX消耗不影响Ad5.HVR7载体的转导(图2B,左图)。

[0092] 已证实αvβ6整联蛋白是三重脱靶整联蛋白重新靶向的Ad5.3D.A20的主要进入受体(图3A-3D)。相对于Ad5,Ad5.3D.A20以305倍的效率转导αvβ6+/CAR-BT-20乳腺癌细胞效率(图3A;p＝0.0270),而以69倍效率转导原代EOC004细胞(αvβ6+/CAR-)(图3B;p＝0.0090)。另外,相对于表达低水平αvβ6的SKOV3细胞(αvβ6-low/CAR+,图3C;$p<0.0001$),Ad5.3D.A20载体的溶瘤变体以增加到5倍的效率转导SKOV3-β6细胞(αvβ6-high/CAR+),这证实溶瘤修饰未损害A20肽:αvβ6相互作用。使用抗αvβ6抗体(10D5)进行的竞争试验显著抑制了Ad5.3D.A20载体的转导(169图3D;p＝0.0010),从而确认了对αvβ6的选择性。

[0093] 通过ELISA筛查来自20例患者的临床卵巢腹水(OAS)样品中是否存在抗Ad5抗体。针对健康成年男性志愿者的血清抗Ad5抗体滴度,核对恶性卵巢腹水中抗Ad5抗体的滴度(图4A)。发现相等比例的患者具有比对照血清低和高的抗体滴度(图4A,黑色虚线)。由于来自患者001(OAS001)的抗体滴度与对照血清相似,因此选择来自该患者的腹水进行后续中和测定。OAS001和对照血清中的抗体似乎对纤维蛋白具有特异性,尽管在蛋白质印迹中,使用变性的病毒颗粒,仅以非常低的水平识别出最丰富的衣壳蛋白六邻体(图4B)。在αvβ6+/CAR-EOC004原代细胞中评估了OAS001对Ad5.3D.A20转导效率的中和作用。在OAS浓度为2.5%、5%和10%时,Ad5.3D.A20显示出比Ad5更好的转导效率(高达902倍),而Ad5没有以可检测的水平转导这些细胞(图4C)。

[0094] 静脉内接种非荷瘤小鼠,以体内评估载体向性,特别是三脱靶突变对载体生物分布的影响(图5A)。Ad5在肝脏和脾脏区域表现出强烈的定位,而在72小时未检测到Ad5.3D.A20载体发光(图5B)。接种Ad5的动物的全身发光明显高于用PBS($p<0.0001$)或Ad5.3D.A20($p<0.0001$)处理的对照动物(图5C)。取出肝脏、脾脏、肺、卵巢和心脏并量化离体发光(关于发光热图,参见图8A-8C)。受Ad5攻击的动物的肝脏发出的发光明显比PBS对照或Ad5.3D.A20组多(均为$p<0.0001$)(图5D)。同样,相对于Ad5,Ad5.3D.A20在脾脏、肺、卵巢和心脏中的转基因表达明显降低(图5E-5H;所有$p<0.0001$)。有关每个器官发光强度的倍数变化,请参见图8D。

[0095] 通过qPCR量化脱靶器官中的病毒载荷,证实了Ad5.3D.A20中的修饰导致多个正常组织中196的病毒隔离减少。相对于Ad5,Ad5.3D.A20的基因组拷贝数在肝脏中降低了1000万倍(图6A;$p<0.0001$)。同样,与Ad5相比,脾脏中Ad5.3D.A20基因组的拷贝数要低700倍以上(图6B;$p<0.0001$)。此外,相对于Ad5,Ad5.3D.A20载体在所有器官中均显示出改善的脱靶特征,在肺、心脏和卵巢中的病毒载荷分别降低10^5、10^4和10^3(图6C-6E)。肝脏切片的免疫组织化学染色支持由于我们对Ad5进行了基因修饰,肝脏成功脱靶,这表明了CAR的高表达水平,而αvβ6却无法检测到(图9A)。观察到小鼠肝脏切片在Ad5组中对Ad衣壳蛋白显示阳性染色,而在用A5攻击的小鼠肝脏中则没有,这一观察结果证实了Ad5.3D.A20基因修饰的脱靶作用(图9B)。

[0096] 为了在体内癌症模型中评估αvβ6重新靶向的功效,在免疫功能低下的NOD/SCID小鼠体内建立了αvβ6-high/CAR-SKOV3-β6人卵巢癌异种移植物。动物在腹膜内植入SKOV3-β6细胞后的14天内,在细胞注射部位和腹腔内的各个部位形成了大型实体瘤,到第49天,肿瘤

扩散到整个腹腔,并积聚了大量腹水。肿瘤保留了高αvβ6表达(用于流式细胞术,参见图10)。基于这些观察,我们通过在植入αvβ6-low/CAR-SKOV3和αvβ6-high/CAR-SKOV3-β6后的第14、16和18天静脉注射3剂量的Ad5和Ad5.3D.A20溶瘤变体进行病毒疗法功效研究。

[0097] 在SKOV3和SKOV3-β6异种移植模型,首次病毒疗法处理剂量后第48小时(第16天)的IVIS成像显示,在用溶瘤Ad5载体处理的动物的整个腹部区域都有广泛的发光,肝脏/脾脏区域强度最高(图7B)。5天后,在第21天,这种分布得以维持,但强度变低(图7D)。然而,相反,Ad5.3D.A20223载体显示出选择性非常高的定位,相对于Ad5而言,其整体发光显著降低,这与非肿瘤组织的成功脱靶一致。对于SKOV3和SKOV3-β6模型,在第16天(图7C;分别为$p<0.05$和<0.01)和第21天(图7E;$p<0.0001$),对全身发光的量化显示Ad5.3D.A20载体的摄取均显著低于Ad5。

[0098] 在SKOV3异种移植模型中,观察到溶瘤Ad5和溶瘤Ad5.3D.A20的抗肿瘤活性(图7F)。与Ad5.3D.A20增强的肿瘤选择性效果一致,用Ad5.3D.A20处理的所有五只小鼠在101天的最后时间点仍然存活,而用Ad5处理的动物仅存活了70天。

[0099] 我们在胰腺(图12A-12I)、食道(图13)、乳腺(图14A-14D)和肺(图15A-15C)来源的一系列癌细胞系中进行了其他转导试验。首先分析所有细胞类型的αvβ6和hCAR表达(每个图中的直方图)。7/9胰腺细胞系(ASPC-1、BxPc、CFPAC、PANC 10.05、SW1990、PANC 0403和Suit2)表达不同水平的αvβ6,并可以用Ad5.3D.A20有效地转导(图12A-12G)。相反,MiPaCa2(图12H)和PT45(图12I)细胞表达非常低的αvβ6或不表达αvβ6,并且对Ad5.3D.A20介导的转导的容许性很差,这正如所预料的。食管细胞系Kyse-30表达高水平的αvβ6,并且对Ad5.3D.A20介导的转导容许性很高(图13)。在测试的乳腺癌细胞系中,所测试的4中细胞系中有3种(BT-20、BT-474和MDA-MB361)不同程度地表达αvβ6,并且容许Ad5.3D.A20的转导(图14A-14C),相反,在MDA-MB-231细胞中缺乏αvβ6的表达使得该细胞对Ad5.3D.A20无感染性(图14D)。在测试的所有3种肺癌细胞系(A427、A549和NCI-H460,图15A-15C)中,不存在αvβ6,并且细胞对Ad5.3D.A20介导的转导具有折射作用。

[0100] 为了评估溶瘤型Ad5.3D.A20的细胞杀伤活性,在$\alpha v\beta 6^{high}$(Suit2,Panc0403)和$\alpha v\beta 6^{low}$(MiPaCa2)或$\alpha v\beta 6^{neg}$(PT45)胰腺癌细胞系中进行了细胞活力测定(图16)。以5,000vp复制缺陷型Ad5或Ad5.3D.A20或溶瘤(O)Ad5或Ad5.3D.A20/细胞,感染细胞。如预期的那样,复制缺陷型载体未介导对细胞活力的任何显著影响,而溶瘤载体的细胞杀伤活性显示与αvβ6表达良好相关。同样,在$\alpha v\beta 6^{high}/hCAR^{neg}$三重阴性乳腺癌细胞BT-20中,高水平的αvβ6的存在加上hCAR的缺乏导致只有OAd5.3D.A20能够有效介导细胞杀伤。相反,在$\alpha v\beta 6^{neg}/hCAR^{high}$乳腺癌细胞系MDA-MB-231中,由于存在hCAR和不存在αvβ6,只有OAd5可以有效杀伤细胞。

[0101] 讨论

[0102] 我们描述了新型肿瘤选择性溶瘤腺病毒载体Ad5.3D.A20,该载体对于所有已知的天然向性是部分切除的,并重新靶向过表达的预后性癌症标志物αvβ6整联蛋白。整联蛋白αvβ6由于在积极转化的癌症中表达而成为治疗癌症的有希望的靶标。

[0103] 在本研究中,复制缺陷型Ad5.3D.A20载体成功地使经由天然病毒摄取途径的细胞病毒摄取脱靶(图2A-2B),而是在体外和离体选择性地重新靶向αvβ6+细胞(图3A-3D)。尽管从理论上讲,可以经由腹膜内途径通过载体腔内给药绕过在腺病毒载体的系统递送中发生的功效限制相互作用,实际上,这种方法提出了挑战,因为野生型Ad5被腹水中的抗Ad5 nAb

隔离。因此,我们评估了在具有先存的高水平抗Ad5 nAbs的OAS存在下Ad5.3D.A20的转导效率(图4A)。与Ad5不同,即使在相对较高的OAS浓度下,Ad5.3D.A20仍保留了转导αvβ6+细胞的能力(图4C)。

[0104] 具有未修饰的衣壳的Ad5载体的临床功效还受到脱靶组织隔离的限制,特别是在肝脏中。我们证明,Ad5.3D.A20成功地改变了Ad5载体的体内生物分布。在无瘤小鼠中,复制缺陷型Ad5.3D.A20与亲代Ad5相比,显示出改善的生物分布,肝脏、脾脏和肺部的病毒转基因表达显著降低(图5A-5H),并且与Ad5相比,在所有脱靶器官274中,病毒基因组拷贝数较低(图6A-6E)。

[0105] 为测试溶瘤形式的脱靶/重新靶向Ad5.3D.A20载体的功效,我们在免疫功能低下的小鼠中建立了人卵巢癌原位腹膜内异种移植模型。腹膜内给药后,溶瘤Ad5.3D.A20的病毒编码转基因表达的更局限性生物分布与减少的脱靶隔离和/或肿瘤选择性病毒摄取一致(图7B-7E)。在SKOV3异种移植模型中,相对于Ad5,用Ad5.3D.A20处理的动物的优越存活率支持了这一点(图7F)。

[0106] Ad5.3D或Ad5.3D.A20给药为晚期耐化疗癌症或αvβ6+癌症,特别是但不仅限于卵巢癌、胰腺癌、食道癌和乳腺癌提供了有希望的治疗选项。该载体提供了经修饰最终用于精确的病毒治疗应用的重要的平台。

[0107] 参考文献

[0108] FUEYO,J.,GOMEZ-MANZANO,C.,ALEMANY,R.,LEE,P.S.Y.,MCDONNELL,T.J.,MITLIANGA,P.,SHI,Y.X.,LEVIN,V.A.,YUNG,W.K.A.&KYRITSIS,A.P.2000.A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo.Oncogene,19,2-12.

[0109] GROS,A.,MARTÍNEZ-QUINTANILLA,J.,PUIG,C.,GUEDAN,S.,MOLLEVÍ,D.G.,ALEMANY,R.&CASCALLO,M.2008.Bioselection of a gain of function mutation that enhances adenovirus 5release and improves its antitumoral potency.Cancer Research,68,8928-8937.

[0110] SHERR,C.J.1996.Cancer cell cycles.Science,274,1672-1674.

[0111] STALLWOOD,Y.,FISHER,K.D.,GALLIMORE,P.H.&MAUTNER,V.2000.Neutralisation of adenovirus infectivity by ascitic fluid from ovarian cancer patients.Gene Therapy,7,637-643.

[0112] STANTON,R.J.,MCSHARRY,B.P.,ARMSTRONG,M.,TOMASEC,P.&WILKINSON,G.W.G.2008.Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function.BioTechniques,45,659-668.

[0113] UUSI-KERTTULA,H.,DAVIES,J.,COUGHLAN,L.,HULIN-CURTIS,S.,JONES,R.,HANNA,L.,CHESTER,J.D.&PARKER,A.L.2016.Pseudotyped alphavbeta6 integrin-targeted adenovirus vectors for ovarian cancer therapies.Oncotarget.

[0114] UUSI-KERTTULA,H.,LEGUT,M.,DAVIES,J.,JONES,R.,HUDSON,E.,HANNA,L.,STANTON,R.J.,CHESTER,J.D.&PARKER,A.L.2015.Incorporation of PeptidesTargeting EGFR and FGFR1 into the Adenoviral Fiber Knob Domain and Their Evaluationas Targeted Cancer Therapies.Hum Gene Ther,26,320-9.

载体	滴度 (vp/ml)		受体结合			
	复制缺陷型	溶瘤	αvβ3/5	αvβ6	CAR	FX
Ad5.Luc	3.9×10^{12}	1.1×10^{12}	+	–	+	+
Ad5.KO1.HVR7.RGE.A20 *'Ad5.3D.A20'*	3.0×10^{12}	1.5×10^{12}	–	+	–	–

图1A

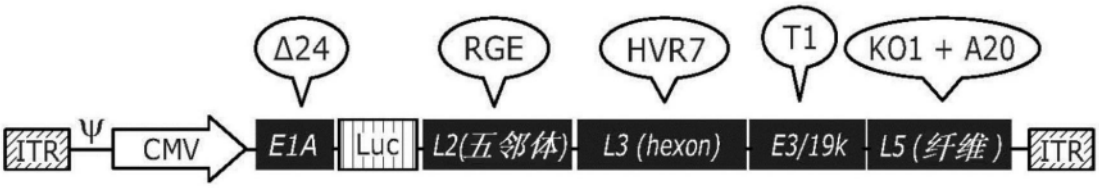


图1B

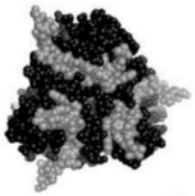
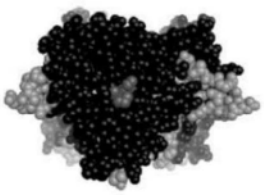
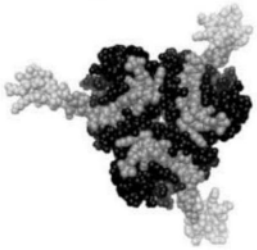
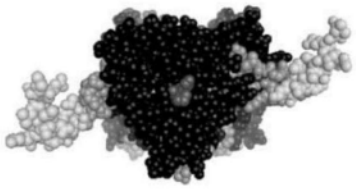
球状突起	顶视图	侧视图
野生型 Ad5		
Ad5 + A20 肽		

图1C

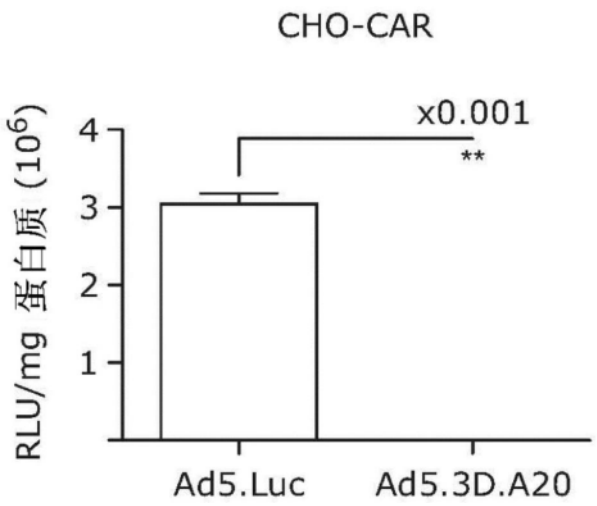

CHO-CAR
RLU/mg 蛋白质 (10^6)
4
3
2
1
x0.001
**
Ad5.Luc
Ad5.3D.A20

图2A

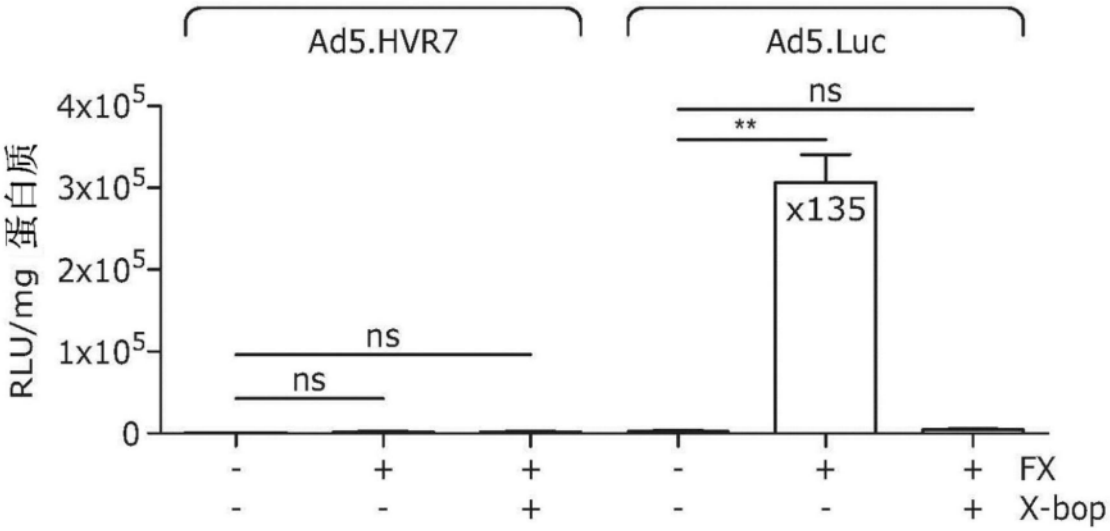

Ad5.HVR7
Ad5.Luc
RLU/mg 蛋白质
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
ns
ns
ns
**
x135
- + + - + + FX
- - + - - + X-bop

图2B

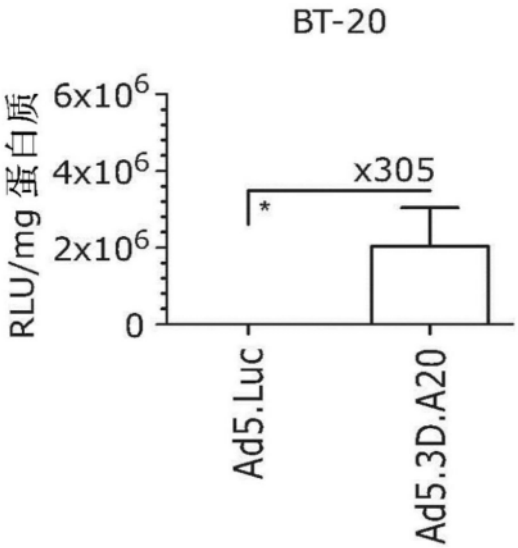

BT-20
RLU/mg 蛋白质
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
x305
*
Ad5.Luc
Ad5.3D.A20

图3A

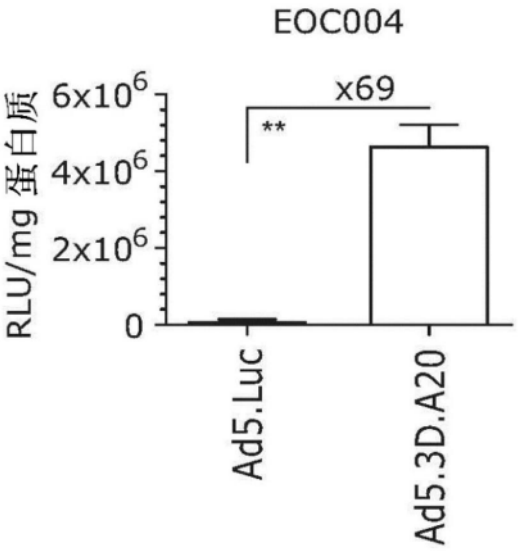

EOC004
RLU/mg 蛋白质
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
x69
**
Ad5.Luc
Ad5.3D.A20

图3B

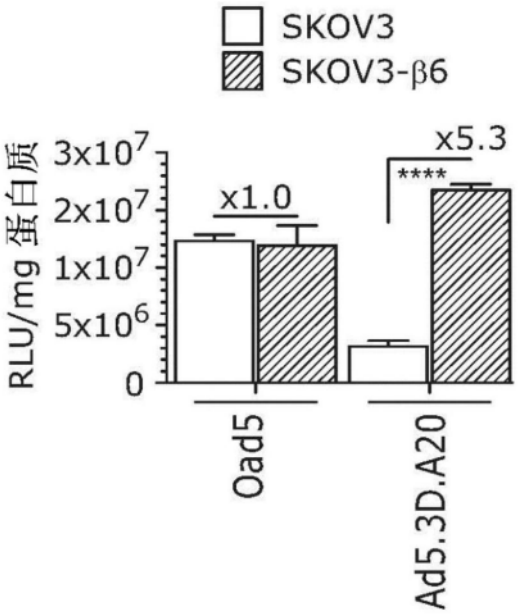

SKOV3
SKOV3-β6
RLU/mg 蛋白质
3x10^7
2x10^7
1x10^7
5x10^6
0
x1.0
x5.3
****
Oad5
Ad5.3D.A20

图3C

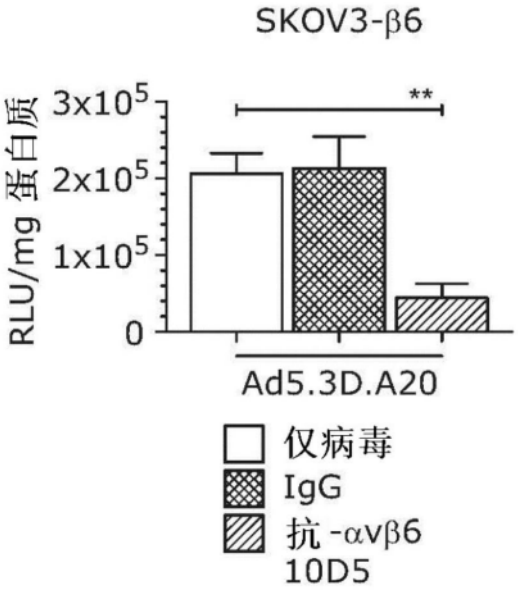

SKOV3-β6
RLU/mg 蛋白质
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
**
Ad5.3D.A20
仅病毒
IgG
抗 -αvβ6
10D5

图3D

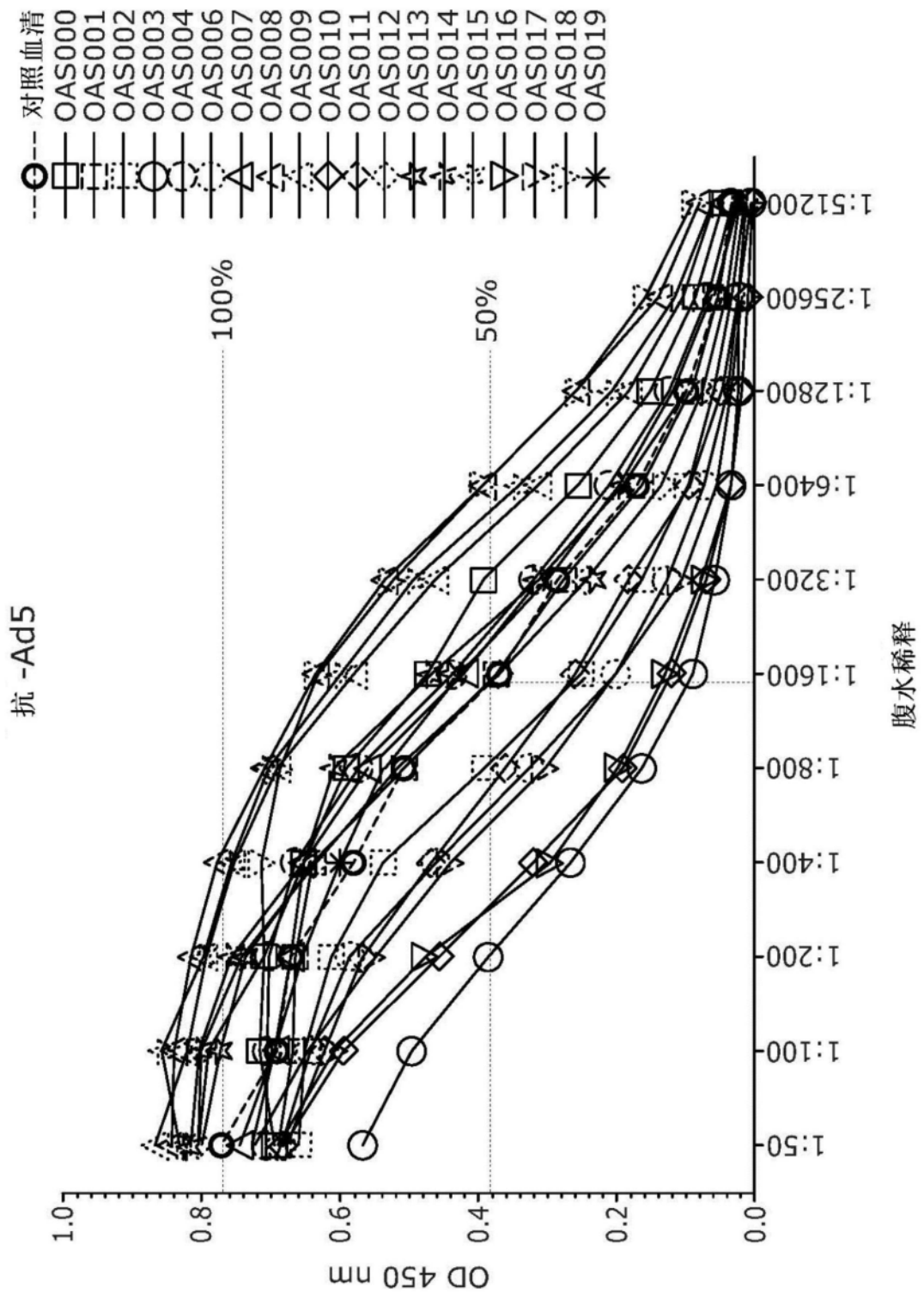

对照血清
OAS000
OAS001
OAS002
OAS003
OAS004
OAS006
OAS007
OAS008
OAS009
OAS010
OAS011
OAS012
OAS013
OAS014
OAS015
OAS016
OAS017
OAS018
OAS019
100%
50%
抗 -Ad5
OD 450 nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
腹水稀释
1:50
1:100
1:200
1:400
1:800
1:1600
1:3200
1:6400
1:12800
1:25600
1:51200

图4A

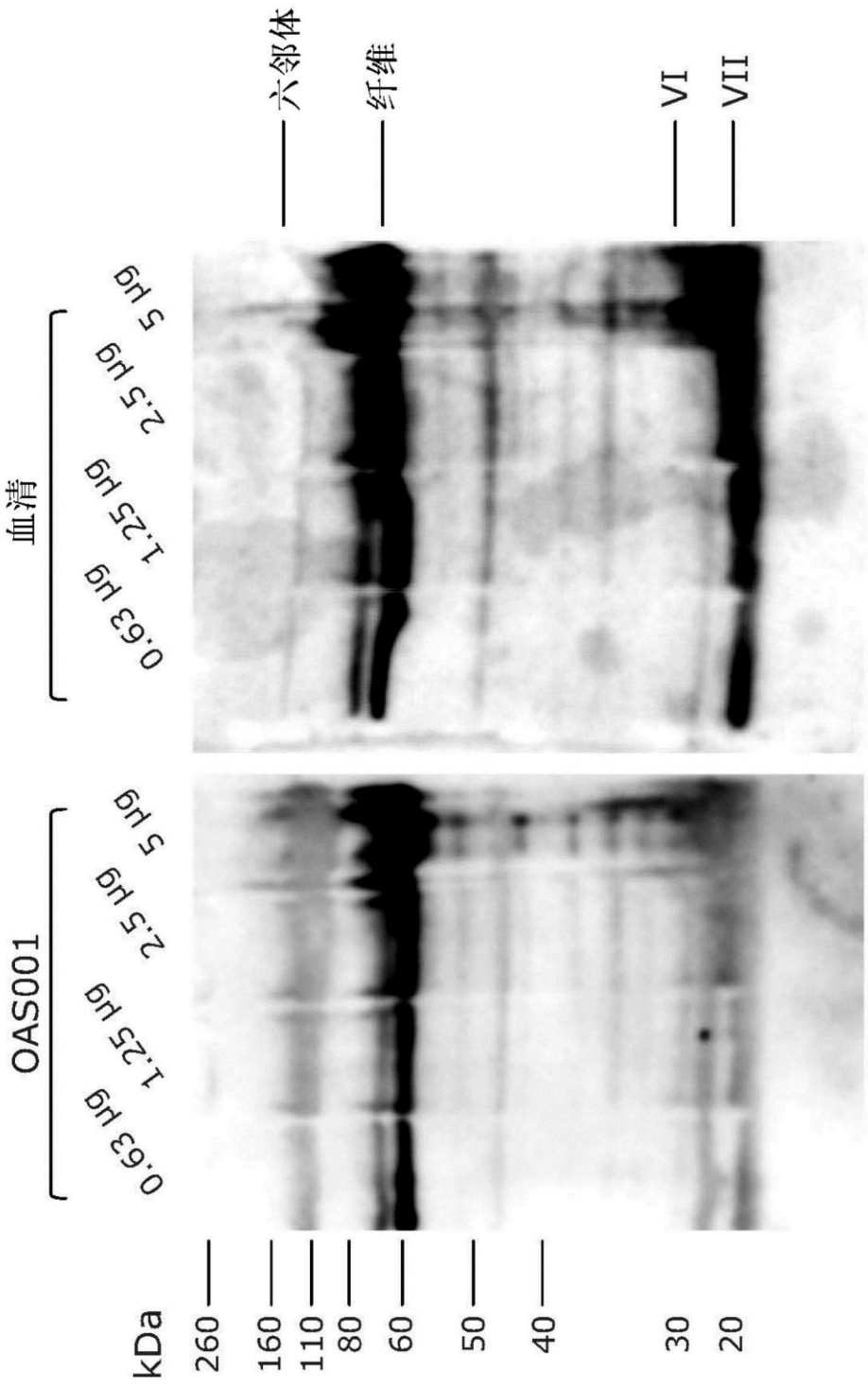

六邻体
纤维
VI
VII
血清
0.63 µg
1.25 µg
2.5 µg
5 µg
OAS001
0.63 µg
1.25 µg
2.5 µg
5 µg
kDa
260
160
110
80
60
50
40
30
20

图4B

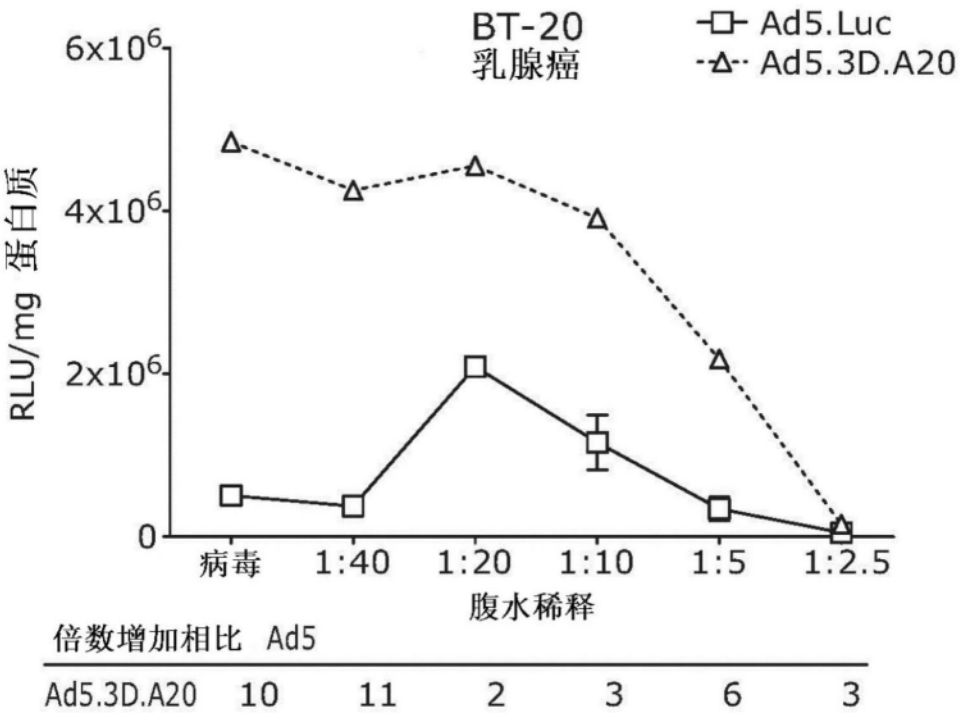

BT-20
乳腺癌
Ad5.Luc
Ad5.3D.A20
RLU/mg 蛋白质
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
病毒
1:40
1:20
1:10
1:5
1:2.5
腹水稀释
倍数增加相比 Ad5
Ad5.3D.A20 10 11 2 3 6 3

图4C

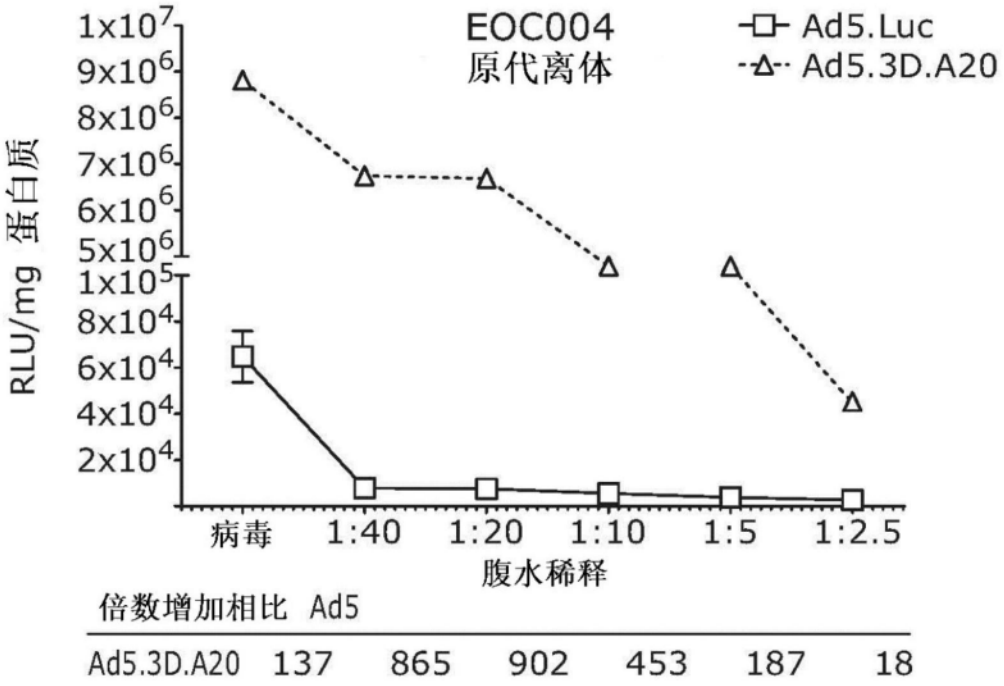

EOC004
原代离体
Ad5.Luc
Ad5.3D.A20
RLU/mg 蛋白质
1x10^7
9x10^6
8x10^6
7x10^6
6x10^6
5x10^6
1x10^5
8x10^4
6x10^4
4x10^4
2x10^4
病毒
1:40
1:20
1:10
1:5
1:2.5
腹水稀释
倍数增加相比 Ad5
Ad5.3D.A20 137 865 902 453 187 18

图4D

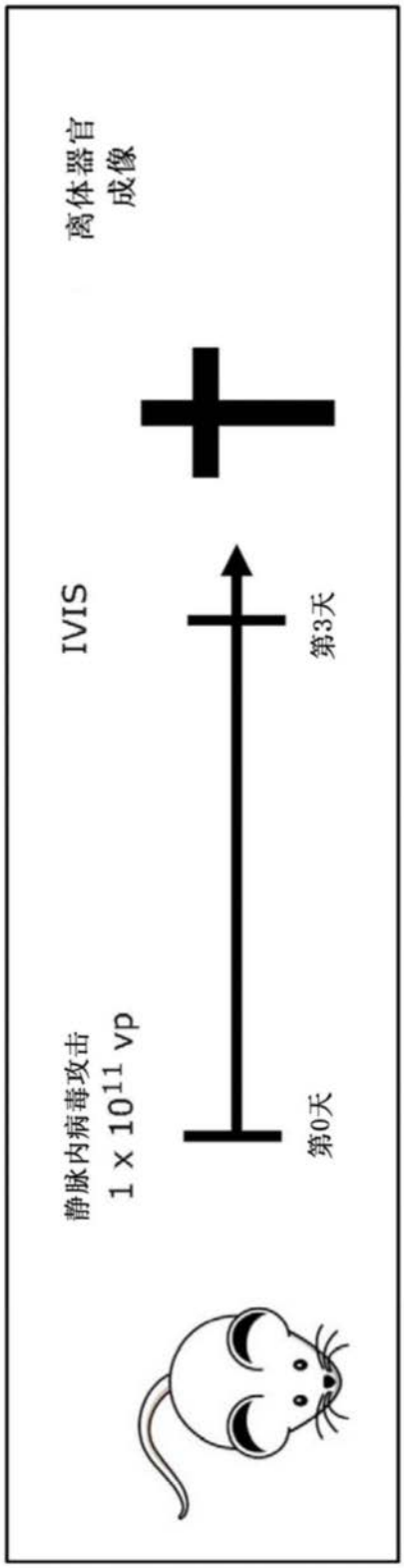


图5A

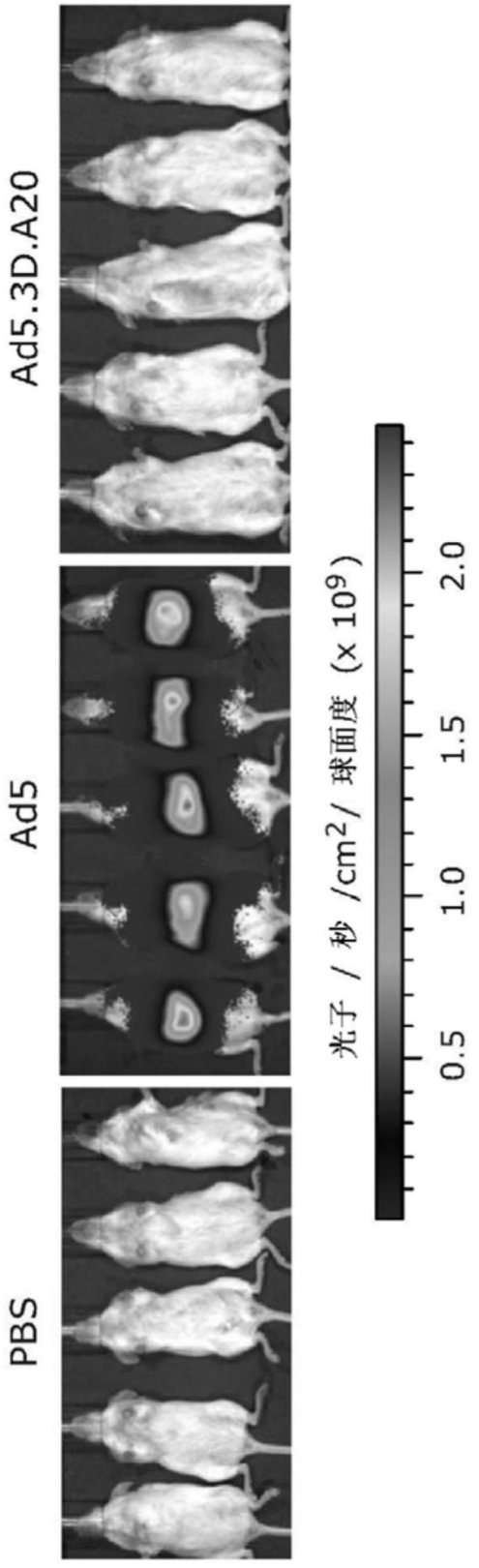


图5B

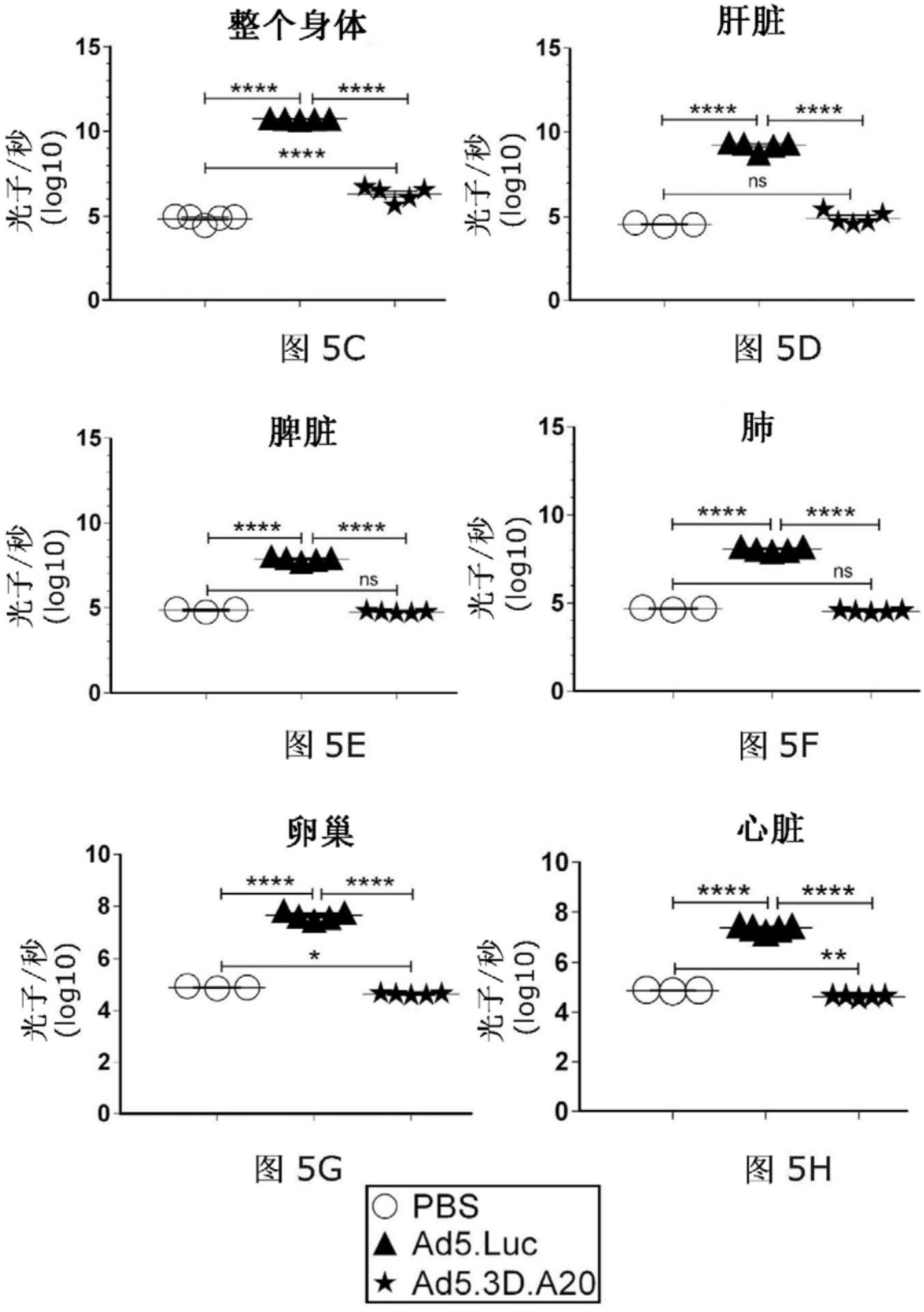


图 5C 图 5D 图 5E 图 5F 图 5G 图 5H

图5(续)

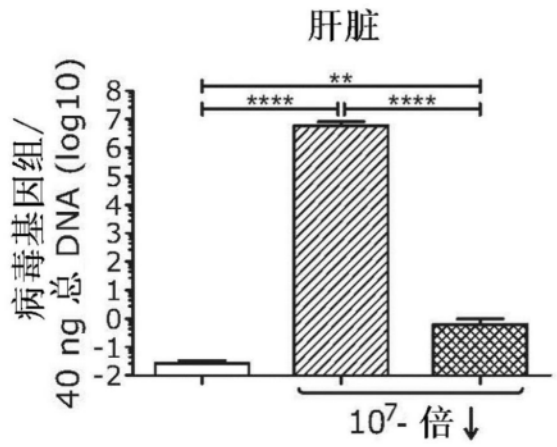


图 6A

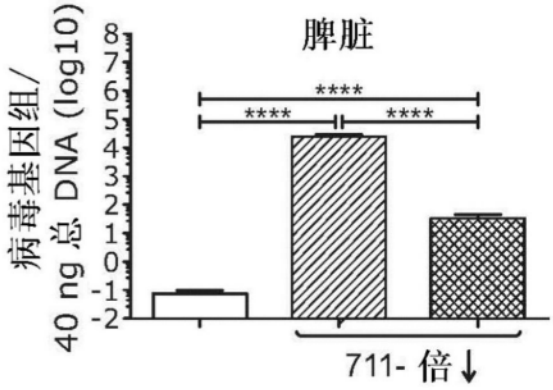


图 6B

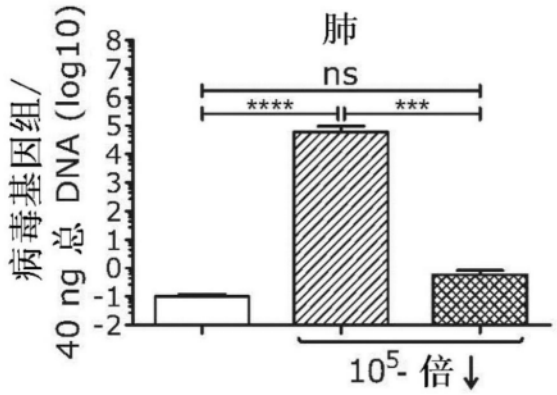


图 6C

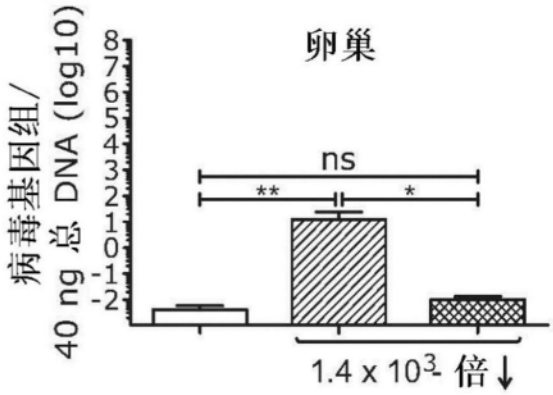


图 6D

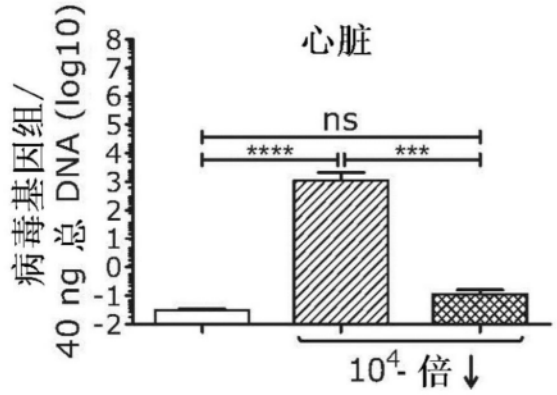
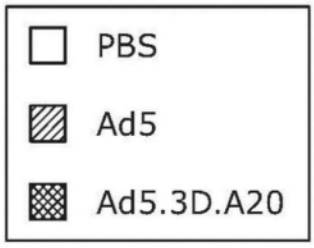


图 6E



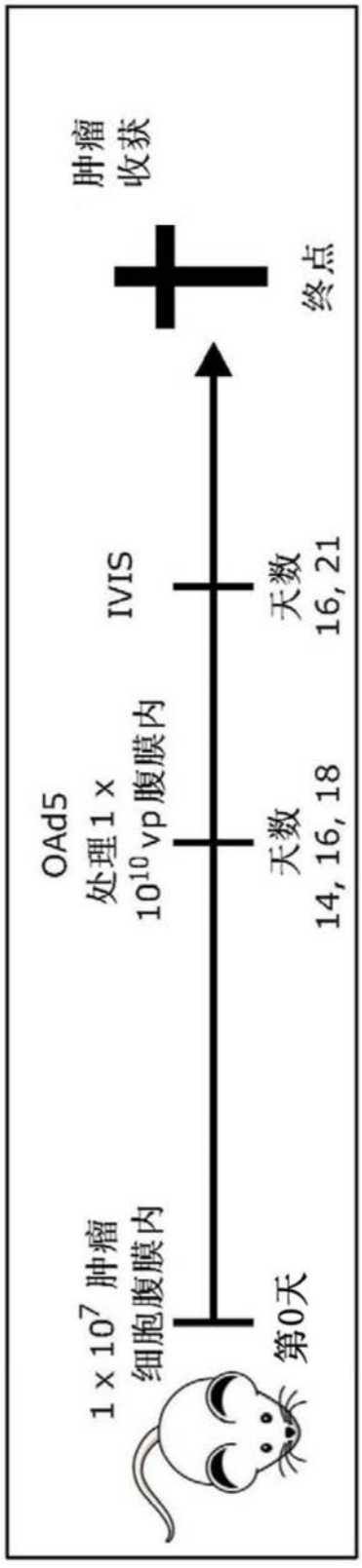

1 x 10^7 肿瘤
细胞腹膜内
第0天
OAd5
处理1 x
10^10 vp腹膜内
天数
14, 16, 18
IVIS
天数
16, 21
终点
肿瘤
收获

图7A

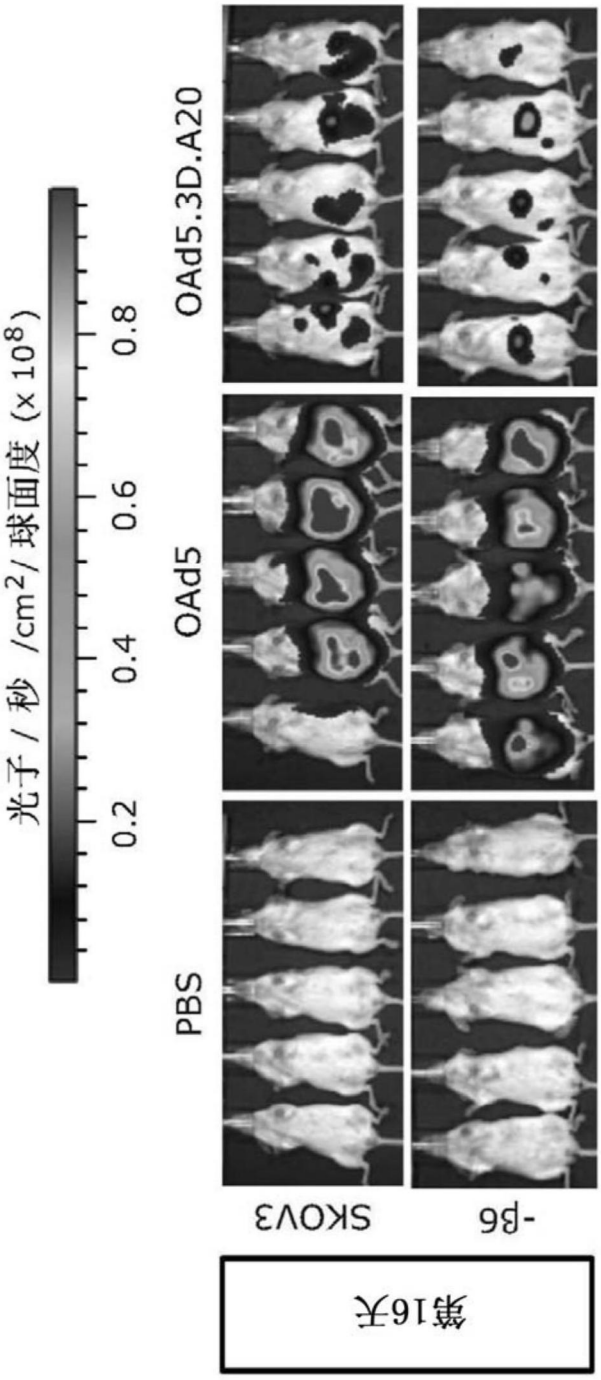


图7B

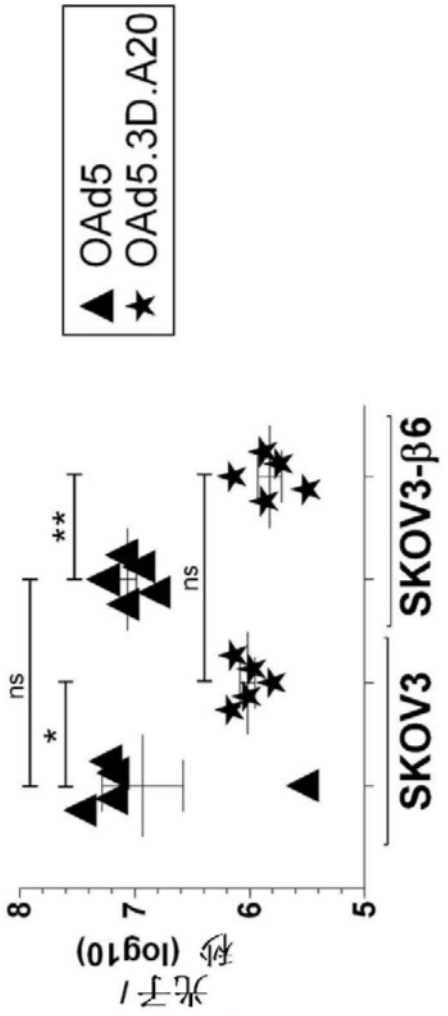


图7C

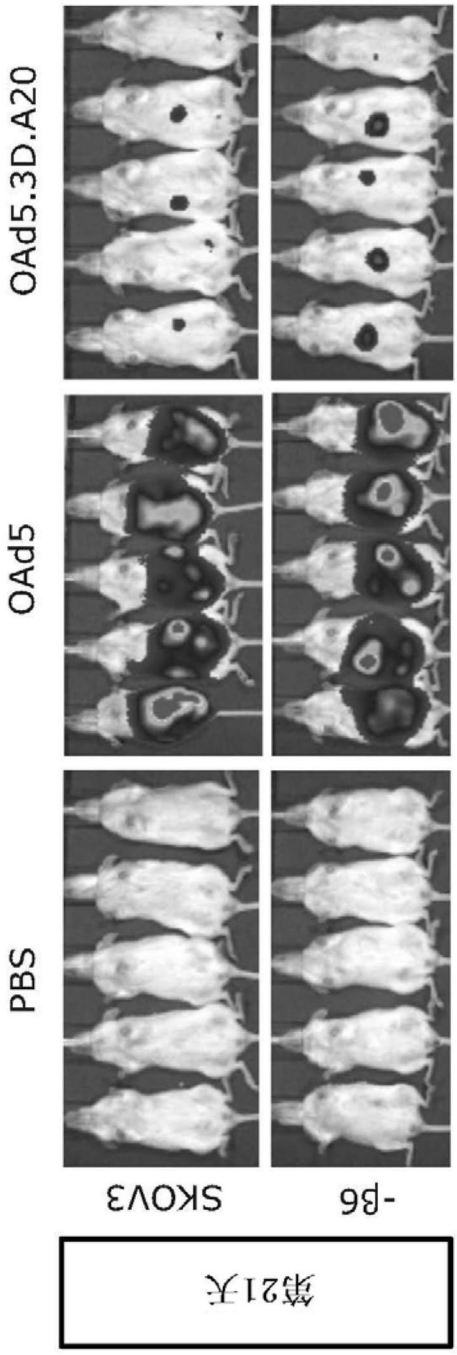


图7D

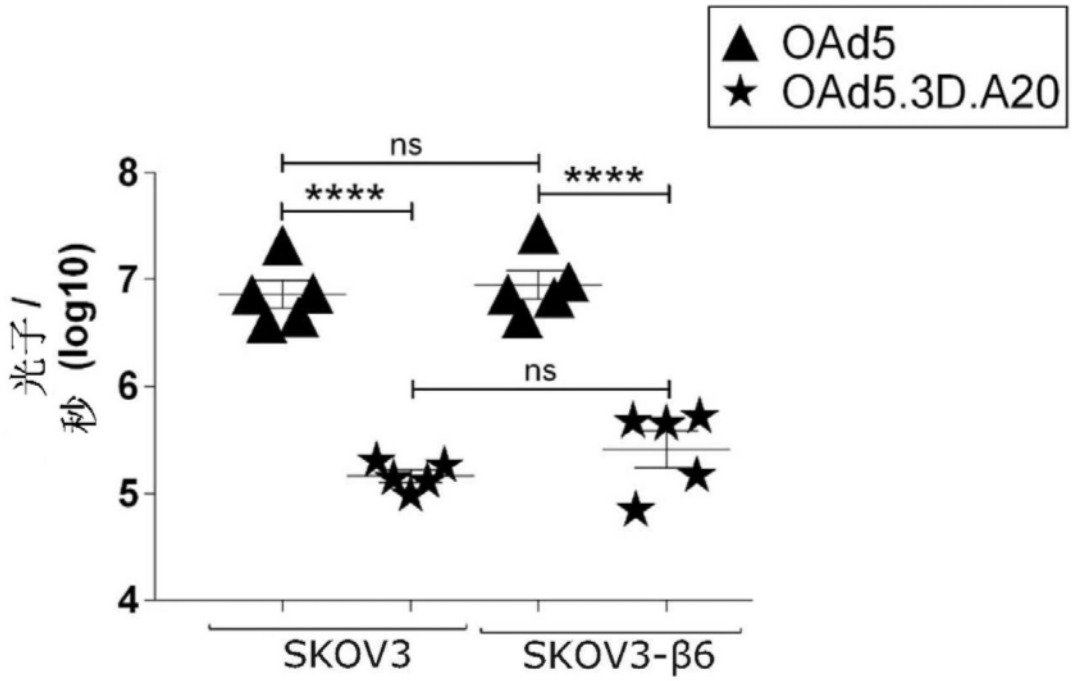

OAd5
OAd5.3D.A20
ns
****
****
ns
光子 / 秒 (log10)
8
7
6
5
4
SKOV3
SKOV3-β6

图7E

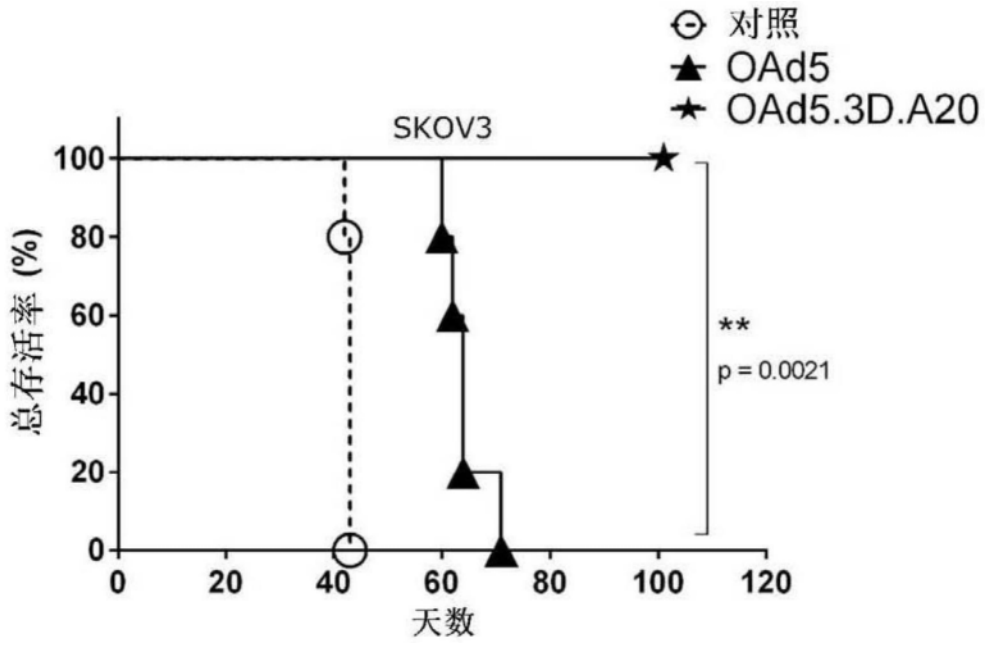

对照
OAd5
OAd5.3D.A20
SKOV3
总存活率 (%)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
天数
**
p = 0.0021

图7F

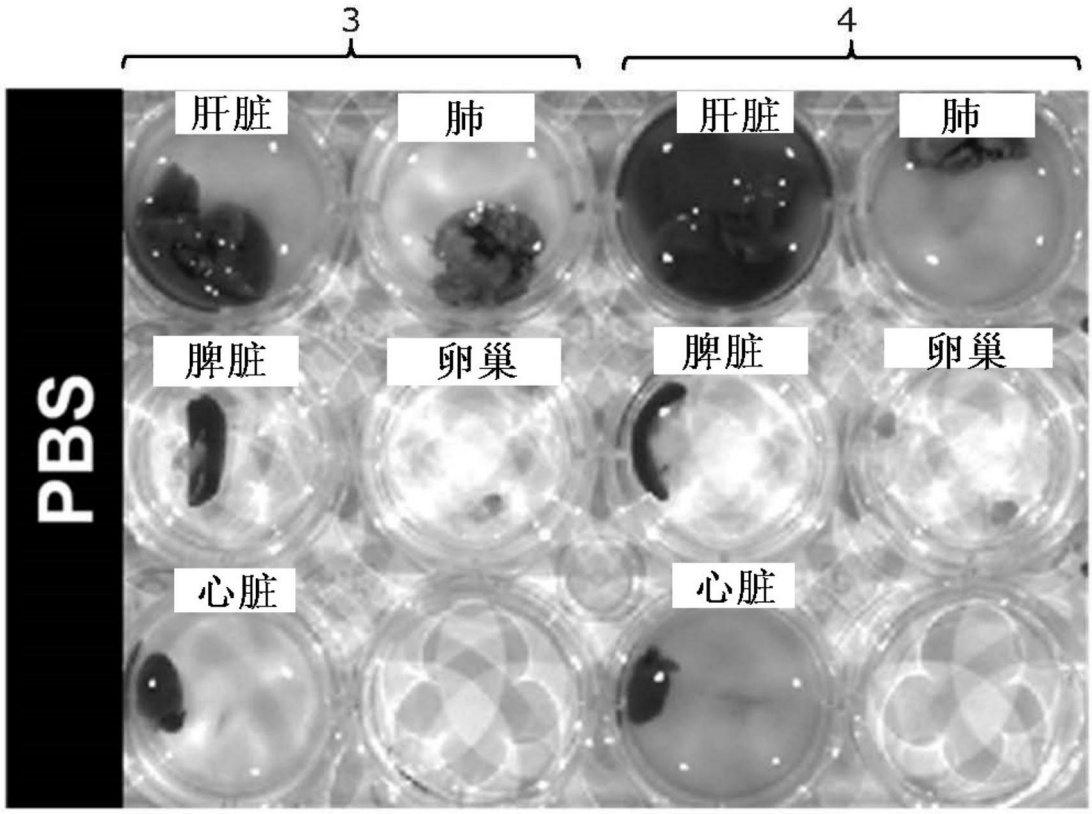


图8A

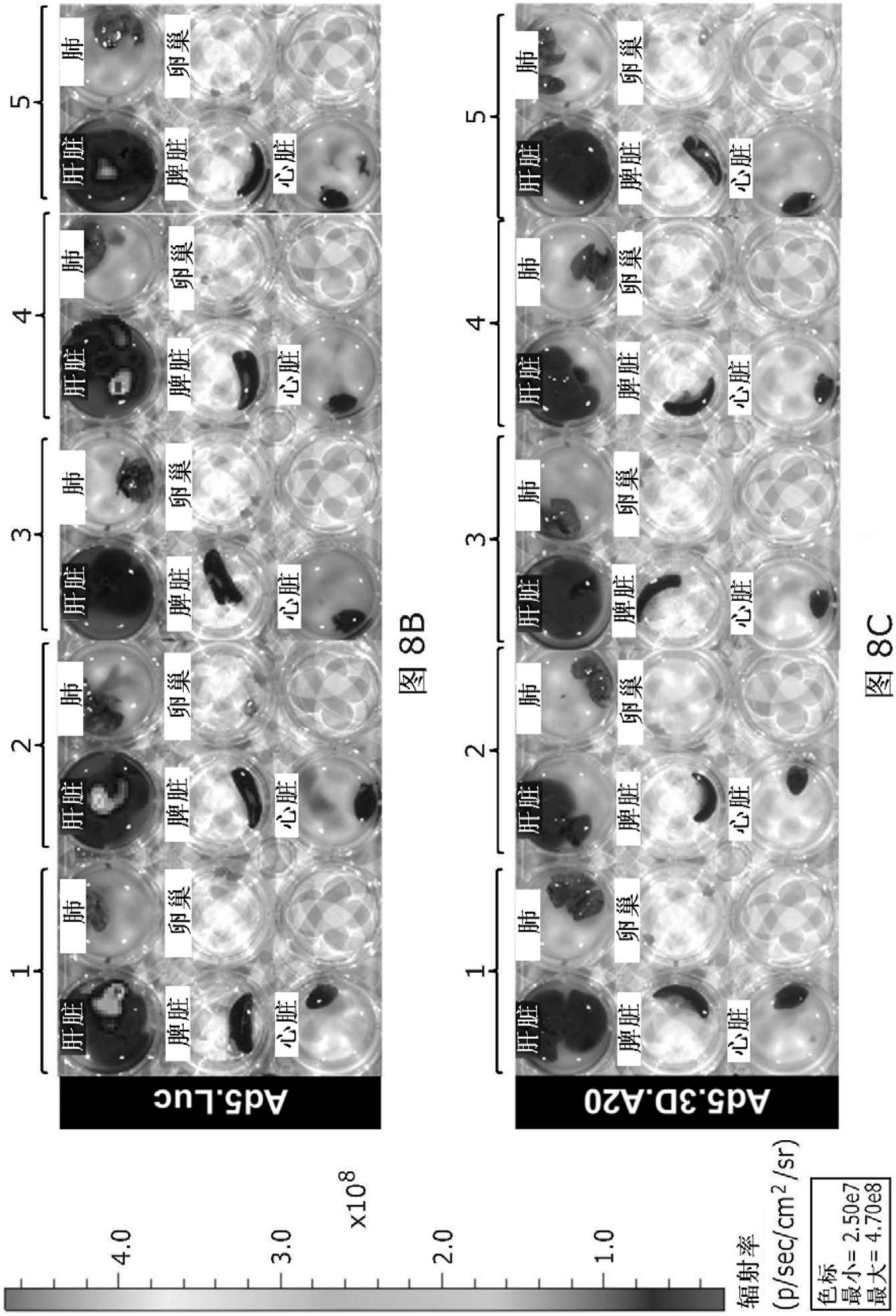

Ad5.Luc
Ad5.3D.A20
1
2
3
4
5
肝脏
肺
脾脏
卵巢
心脏
辐射率
(p/sec/cm²/sr)
x10⁸
4.0
3.0
2.0
1.0
色标
最小= 2.50e7
最大= 4.70e8

图 8B

图 8C

相对于Ad5组，离体发光的倍数降低					
组	肝脏	脾脏	肺	卵巢	心脏
Ad5.3D.A20	13 300	9230	3700	1100	573

图8D

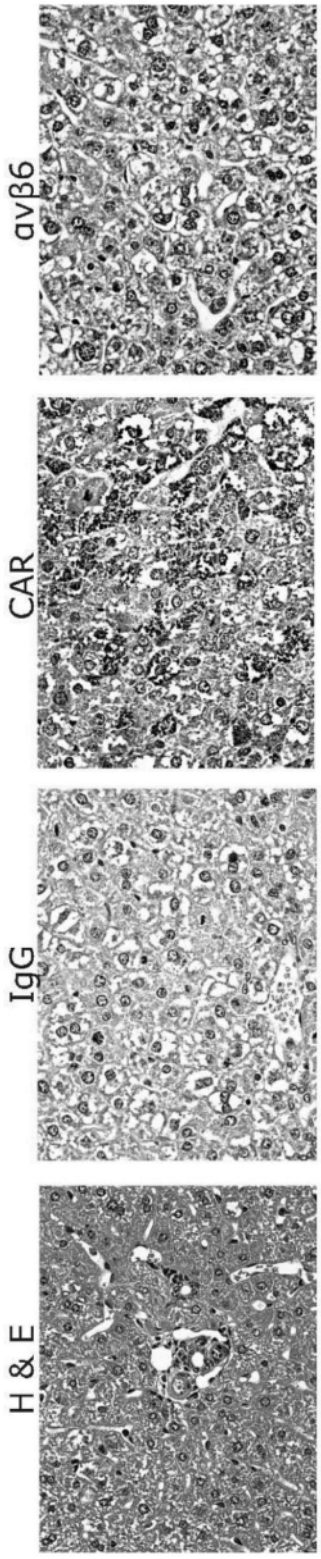


图9A

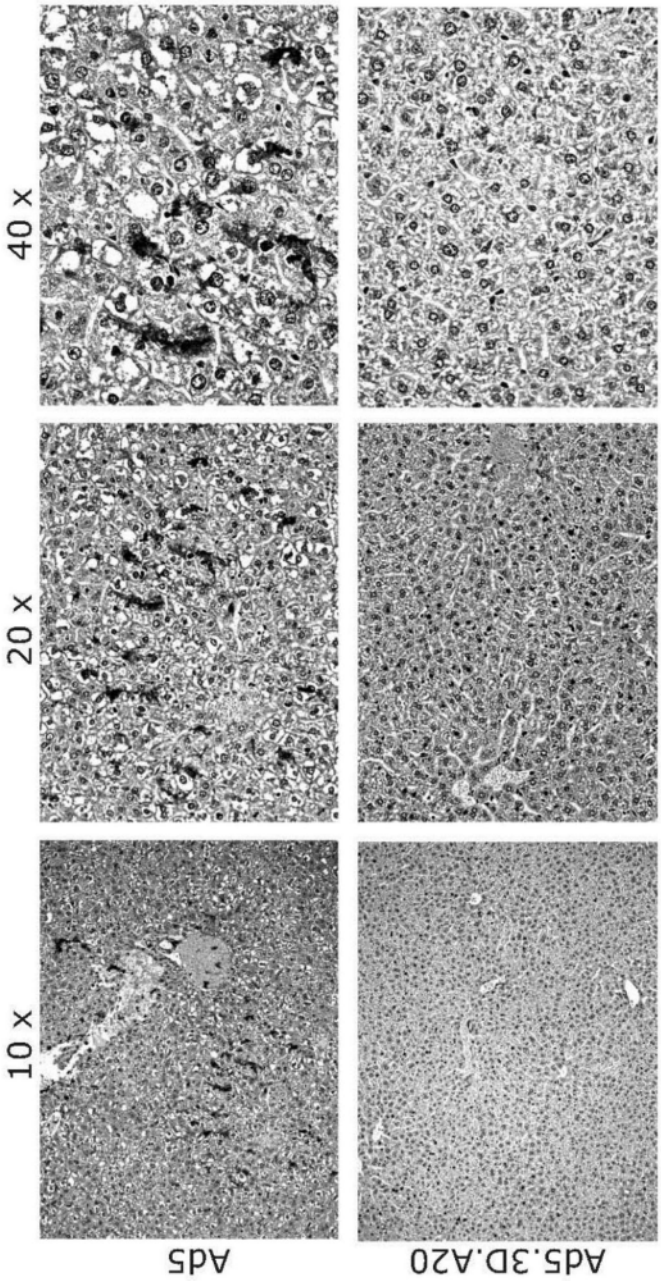


图9B

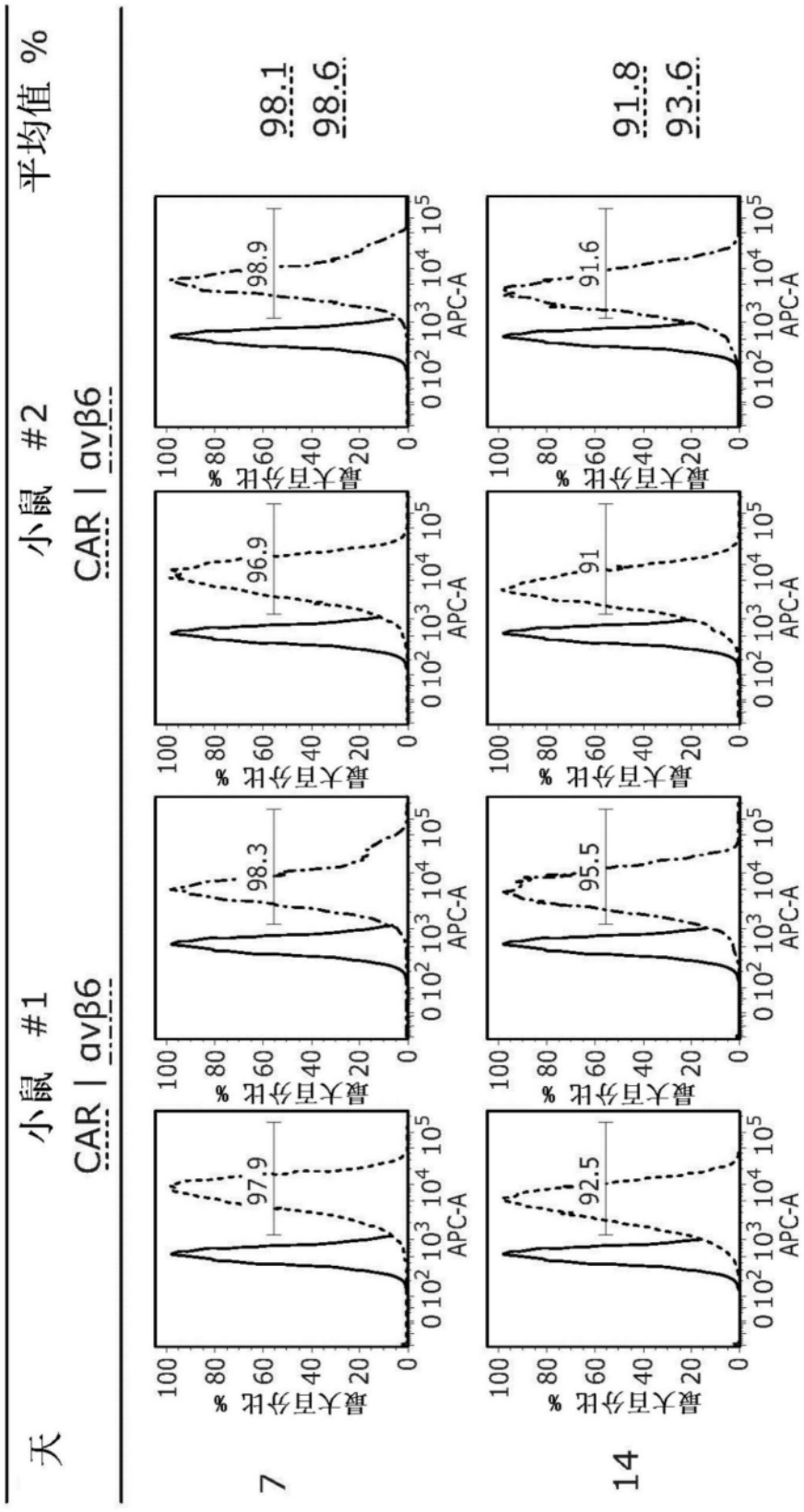

天
小鼠 #1
CAR | avβ6
小鼠 #2
CAR | avβ6
平均值 %
7
14
98.1
98.6
91.8
93.6
97.9
98.3
98.9
96.9
92.5
95.5
91.6
91
最大百分比 %
APC-A

图10

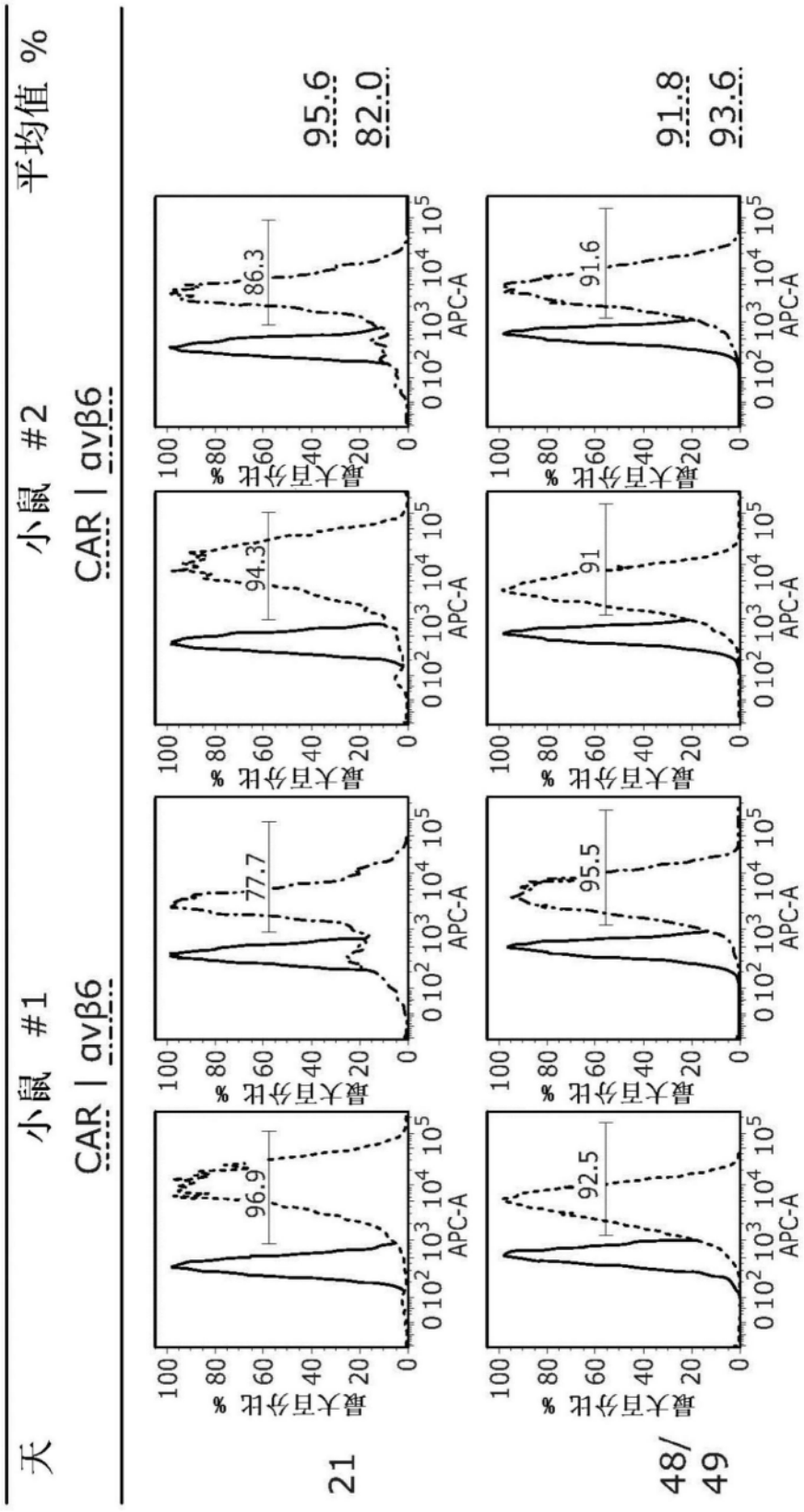

天
小鼠 #1
CAR | avβ6
小鼠 #2
CAR | avβ6
平均值 %
21
48/49
最大百分比 %
APC-A
96.9
77.7
94.3
86.3
92.5
95.5
91
91.6
95.6
82.0
91.8
93.6

图10(续)

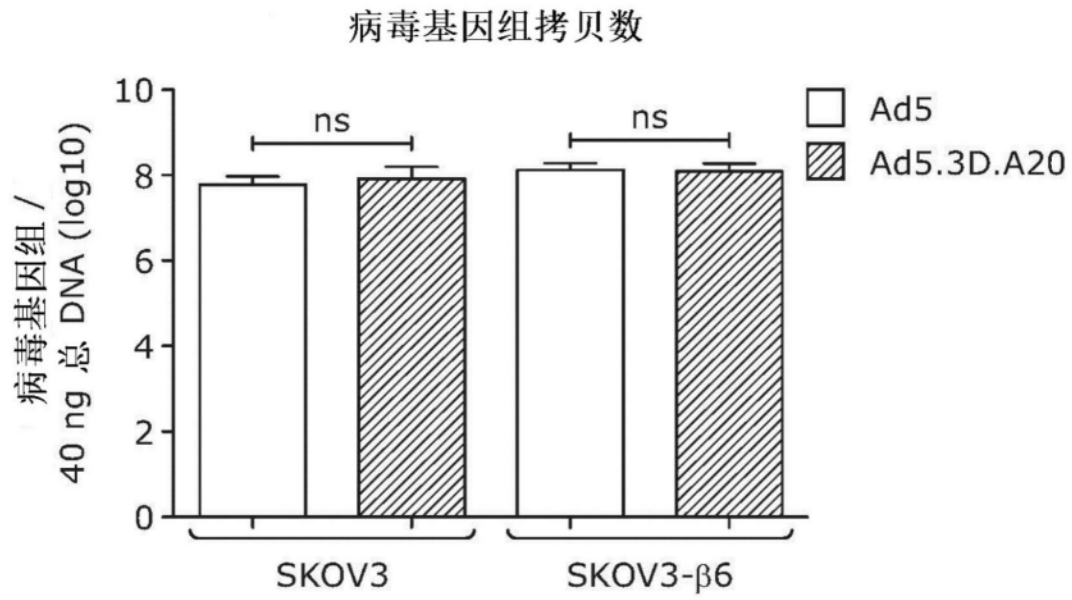

病毒基因组拷贝数
病毒基因组 / 40 ng 总 DNA (log10)
10
8
6
4
2
0
ns
ns
Ad5
Ad5.3D.A20
SKOV3
SKOV3-β6

图11A

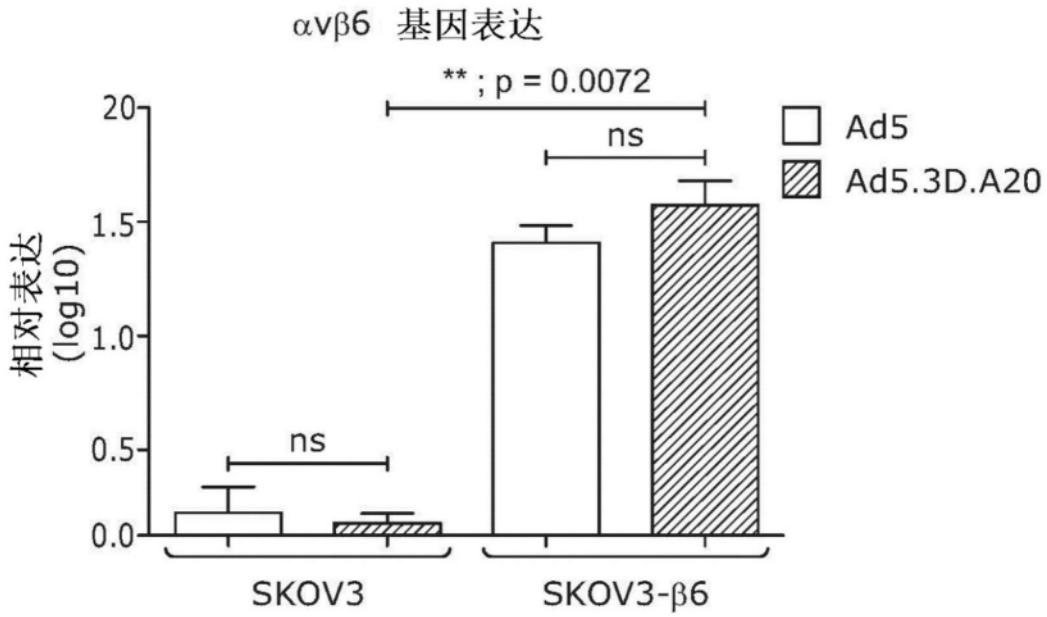

αvβ6 基因表达
** ; p = 0.0072
ns
相对表达 (log10)
20
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
Ad5
Ad5.3D.A20
SKOV3
SKOV3-β6

图11B

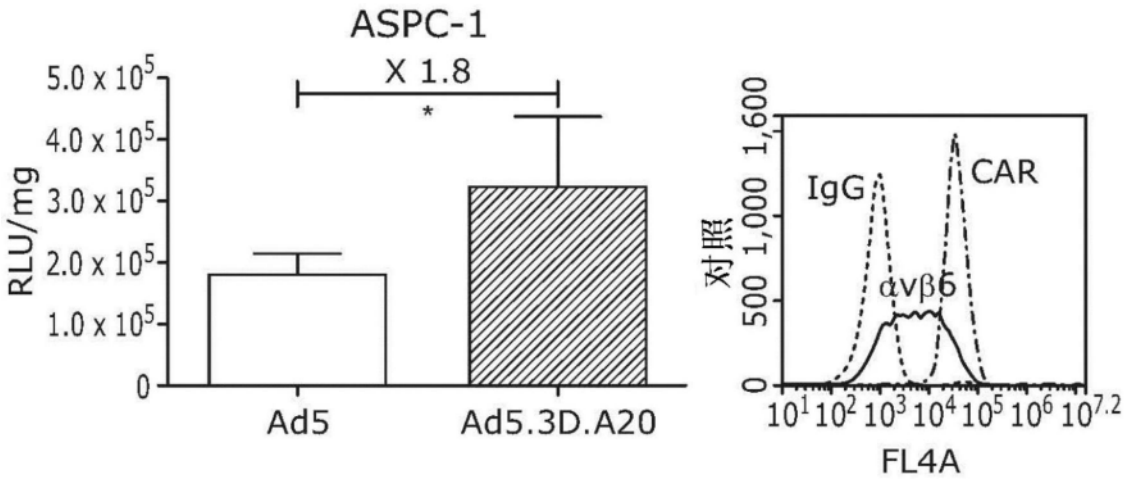


图12A

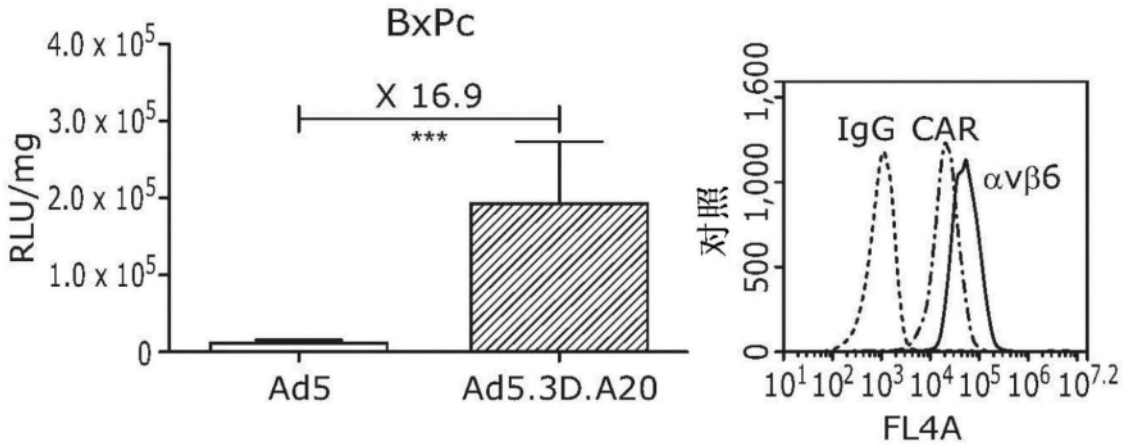


图12B

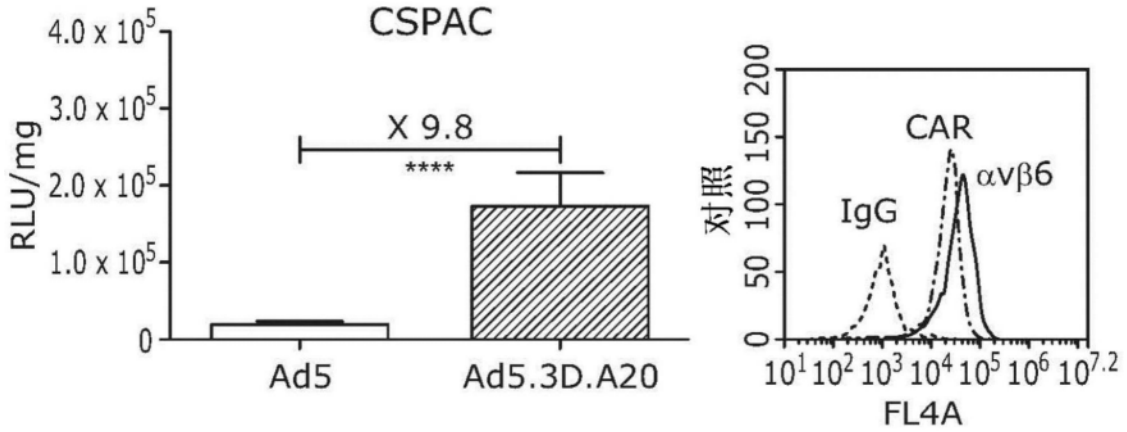


图12C

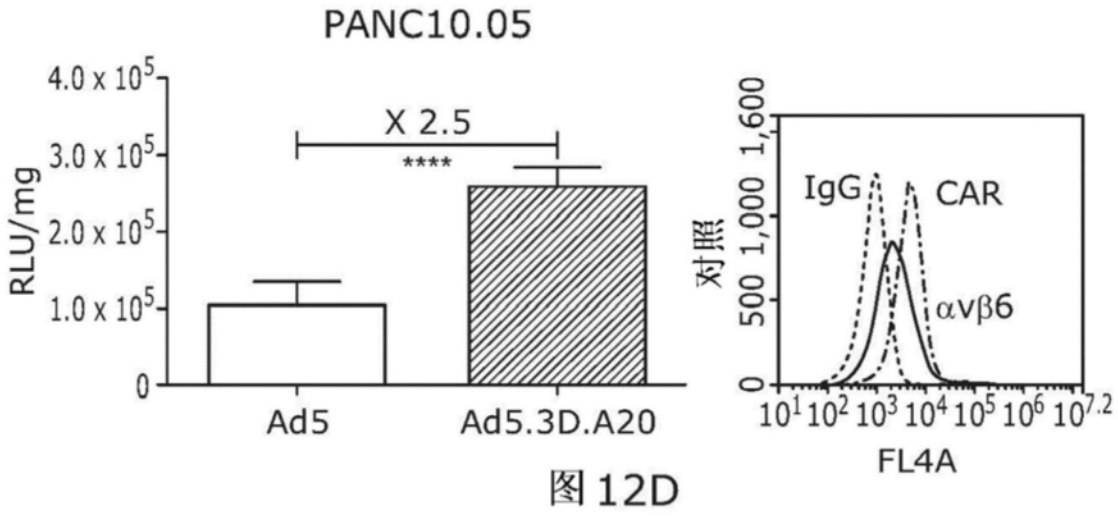


图 12D

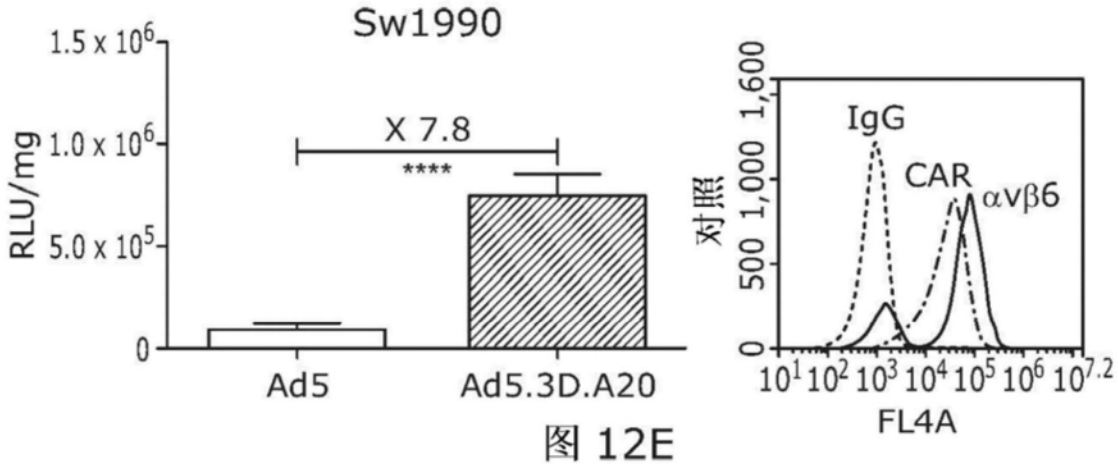


图 12E

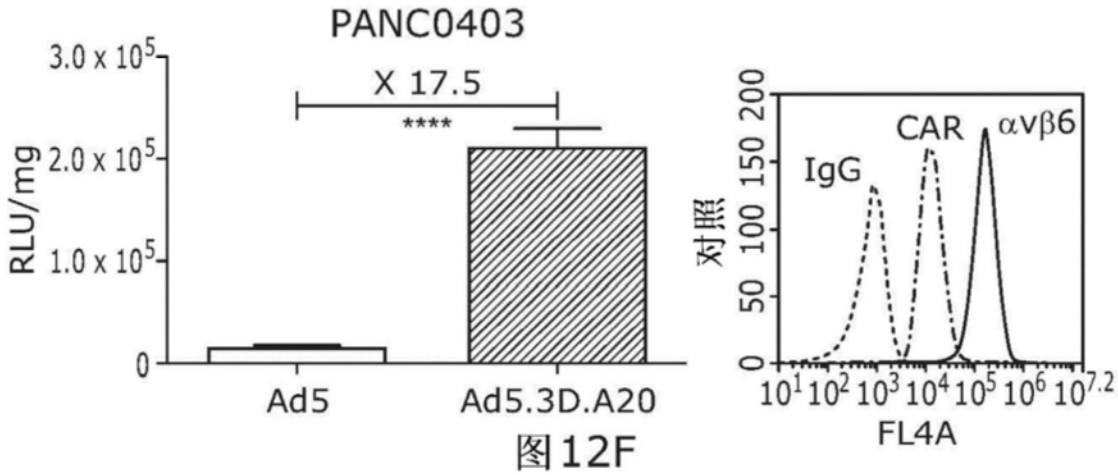


图12F

图12(续)



图12G

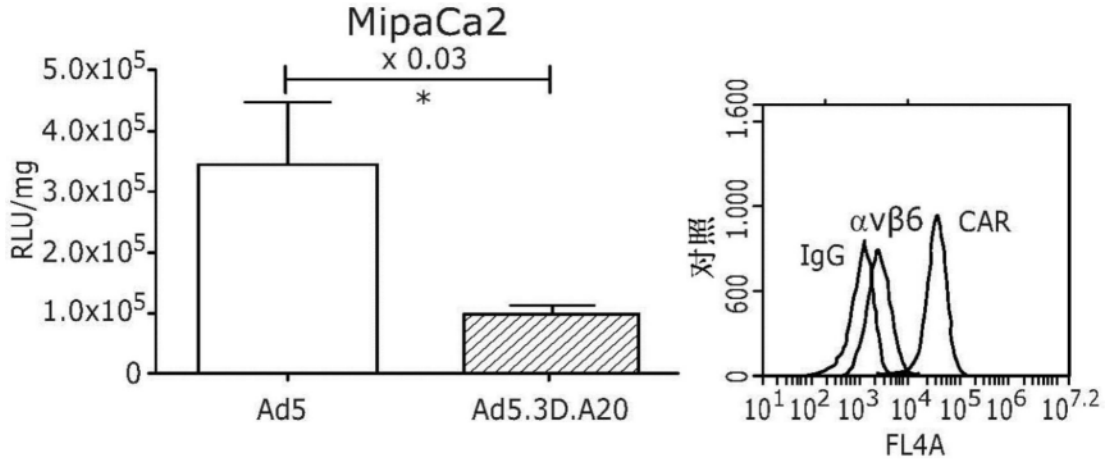


图12H

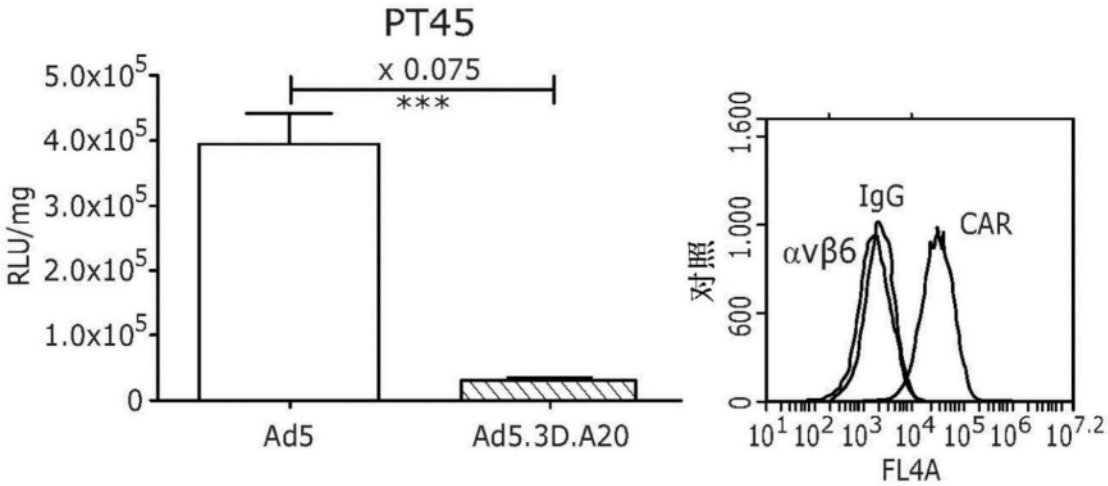


图12I

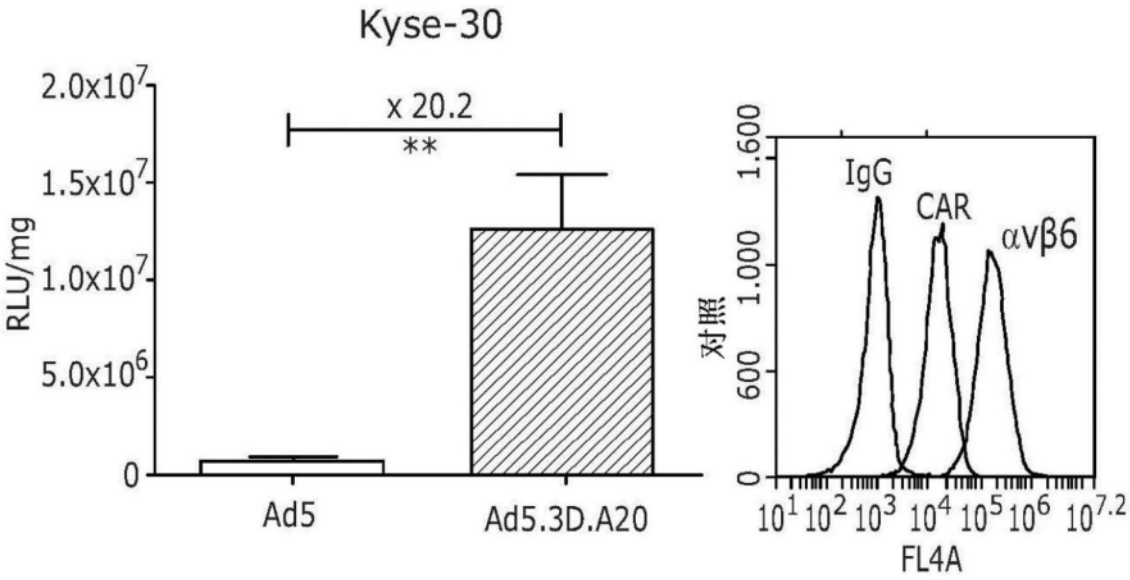


图13

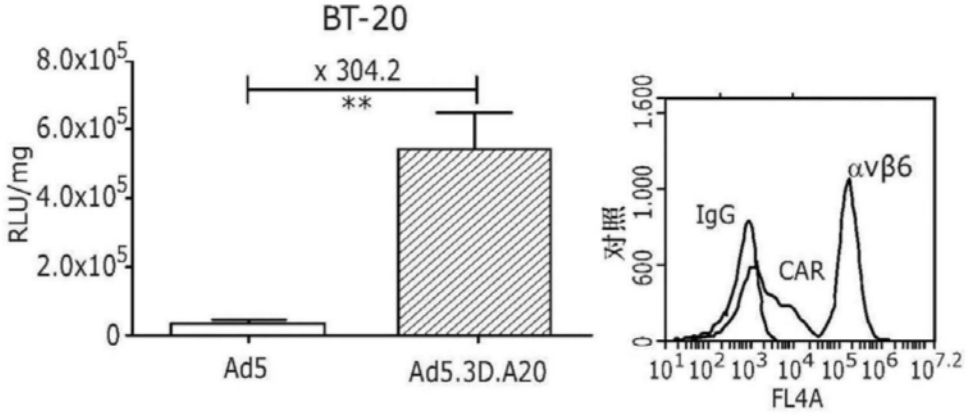


图14A

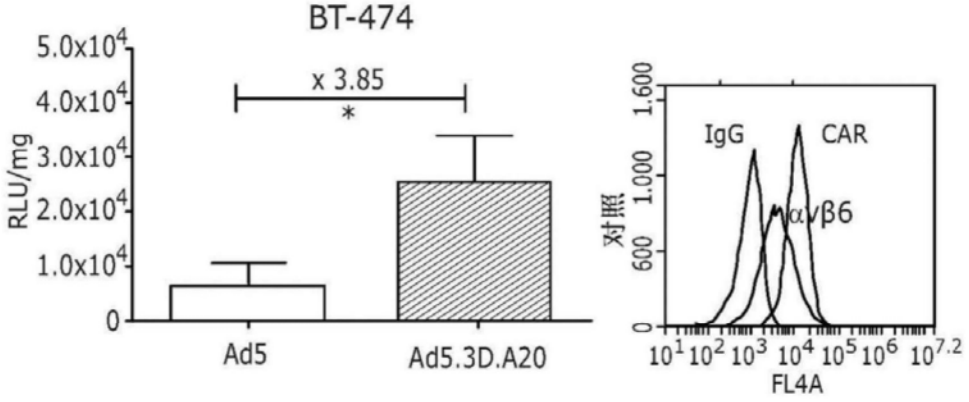


图14B

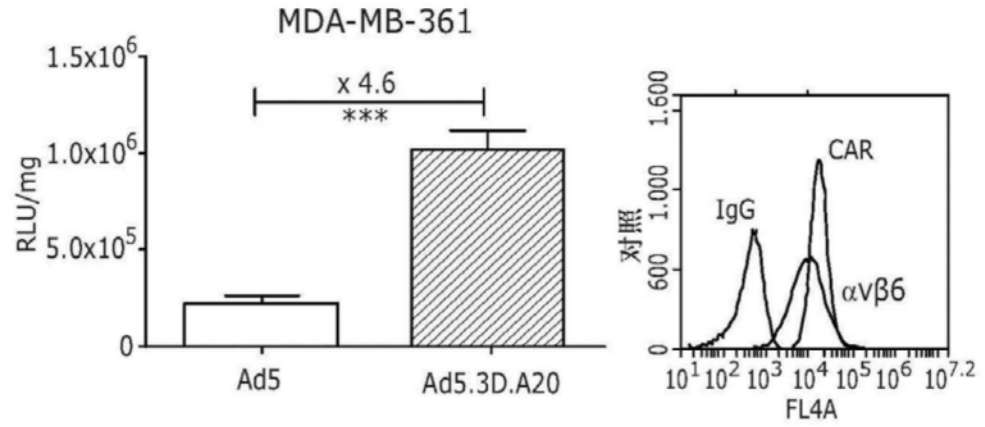


图14C

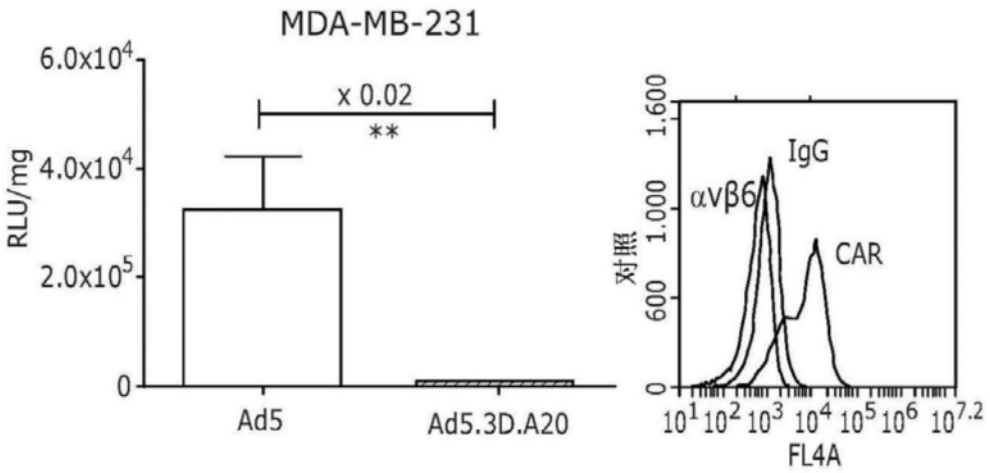


图14D

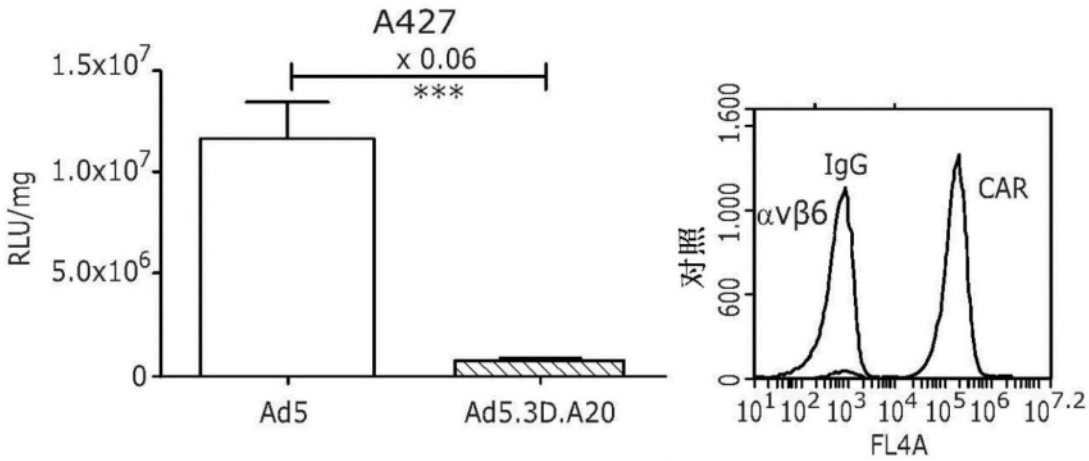


图15A

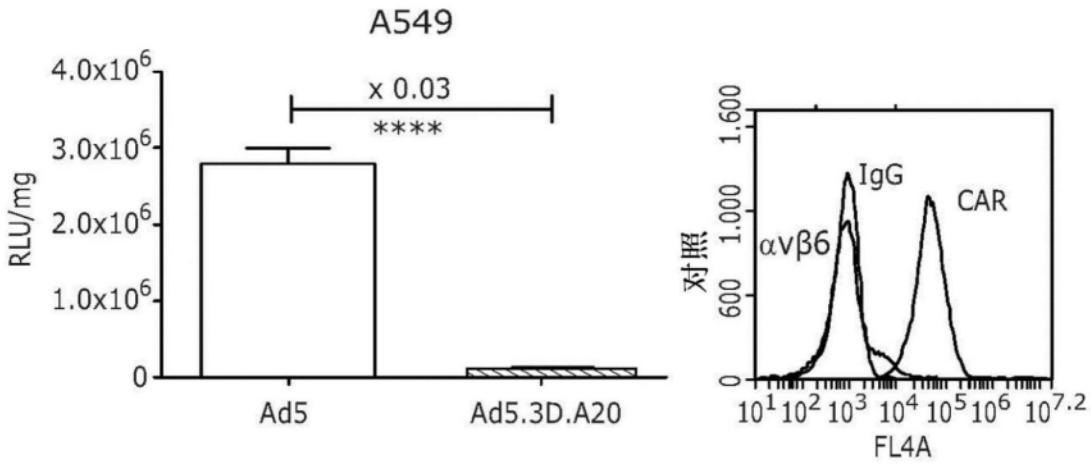

A549
4.0x10^6
3.0x10^6
2.0x10^6
1.0x10^6
0
RLU/mg
x 0.03
****
Ad5
Ad5.3D.A20
对照
1.600
1.000
600
0
IgG
CAR
αvβ6
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7.2
FL4A

图15B

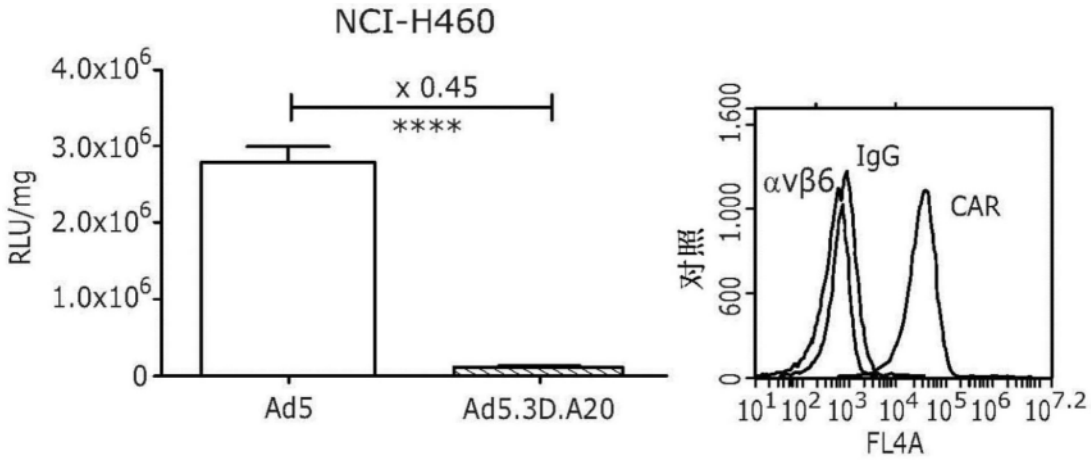

NCI-H460
4.0x10^6
3.0x10^6
2.0x10^6
1.0x10^6
0
RLU/mg
x 0.45
****
Ad5
Ad5.3D.A20
对照
1.600
1.000
600
0
IgG
CAR
αvβ6
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7.2
FL4A

图15C

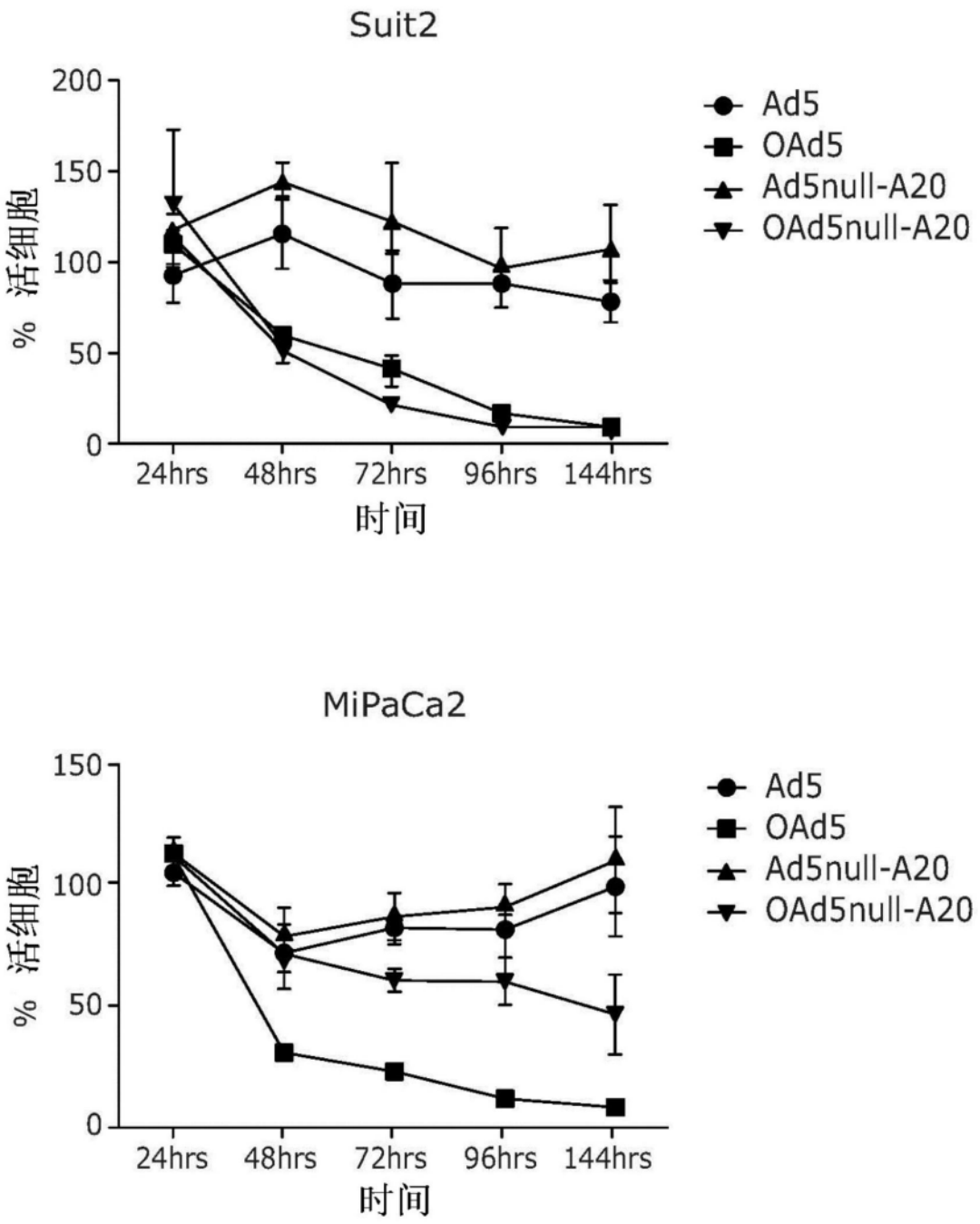

Suit2
200
150
100
50
0
% 活细胞
24hrs
48hrs
72hrs
96hrs
144hrs
时间
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20
MiPaCa2
150
100
50
0
% 活细胞
24hrs
48hrs
72hrs
96hrs
144hrs
时间
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20

图16

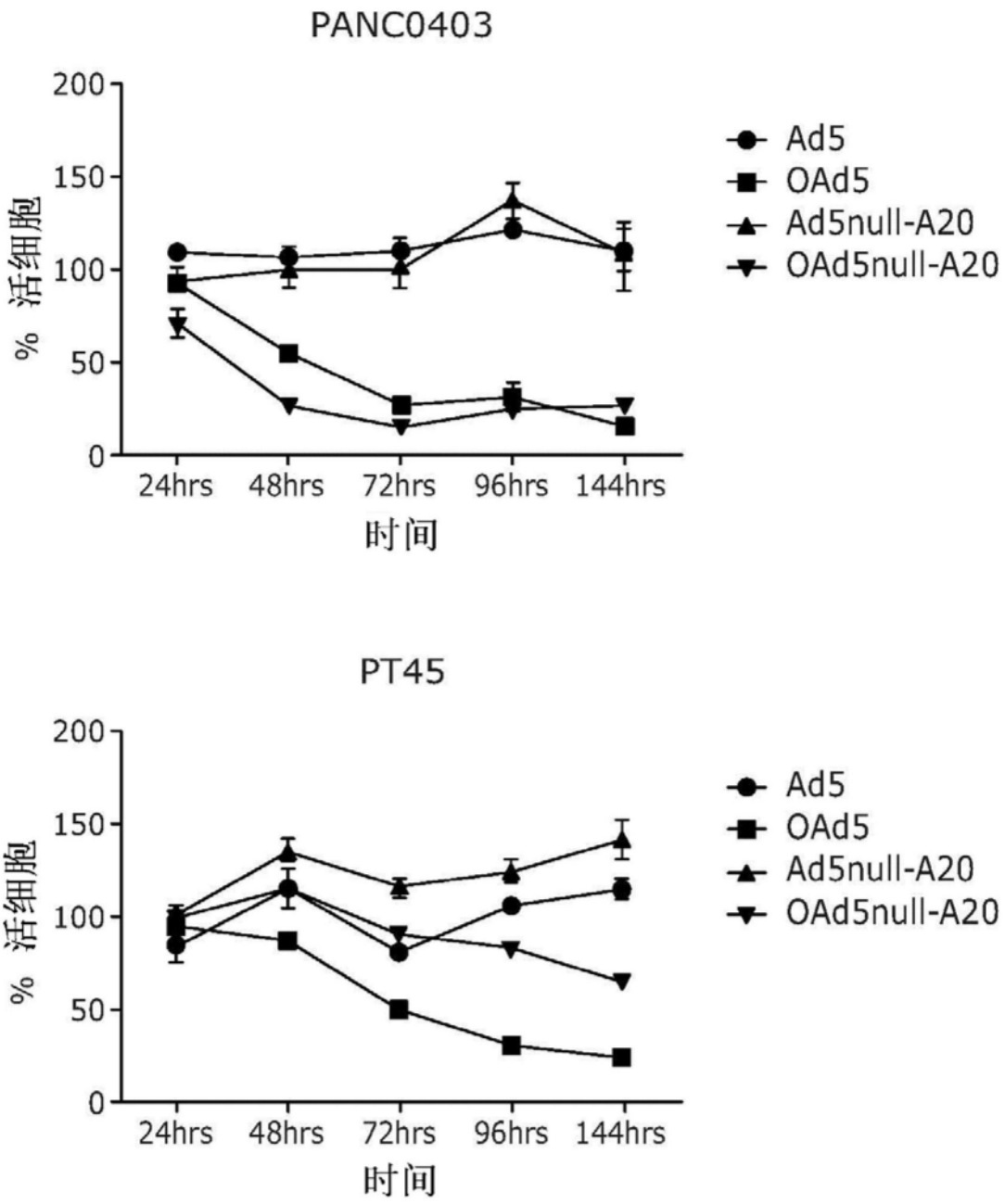

PANC0403
200
150
100
50
0
% 活细胞
24hrs
48hrs
72hrs
96hrs
144hrs
时间
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20
PT45
200
150
100
50
0
% 活细胞
24hrs
48hrs
72hrs
96hrs
144hrs
时间
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20

图16(续)

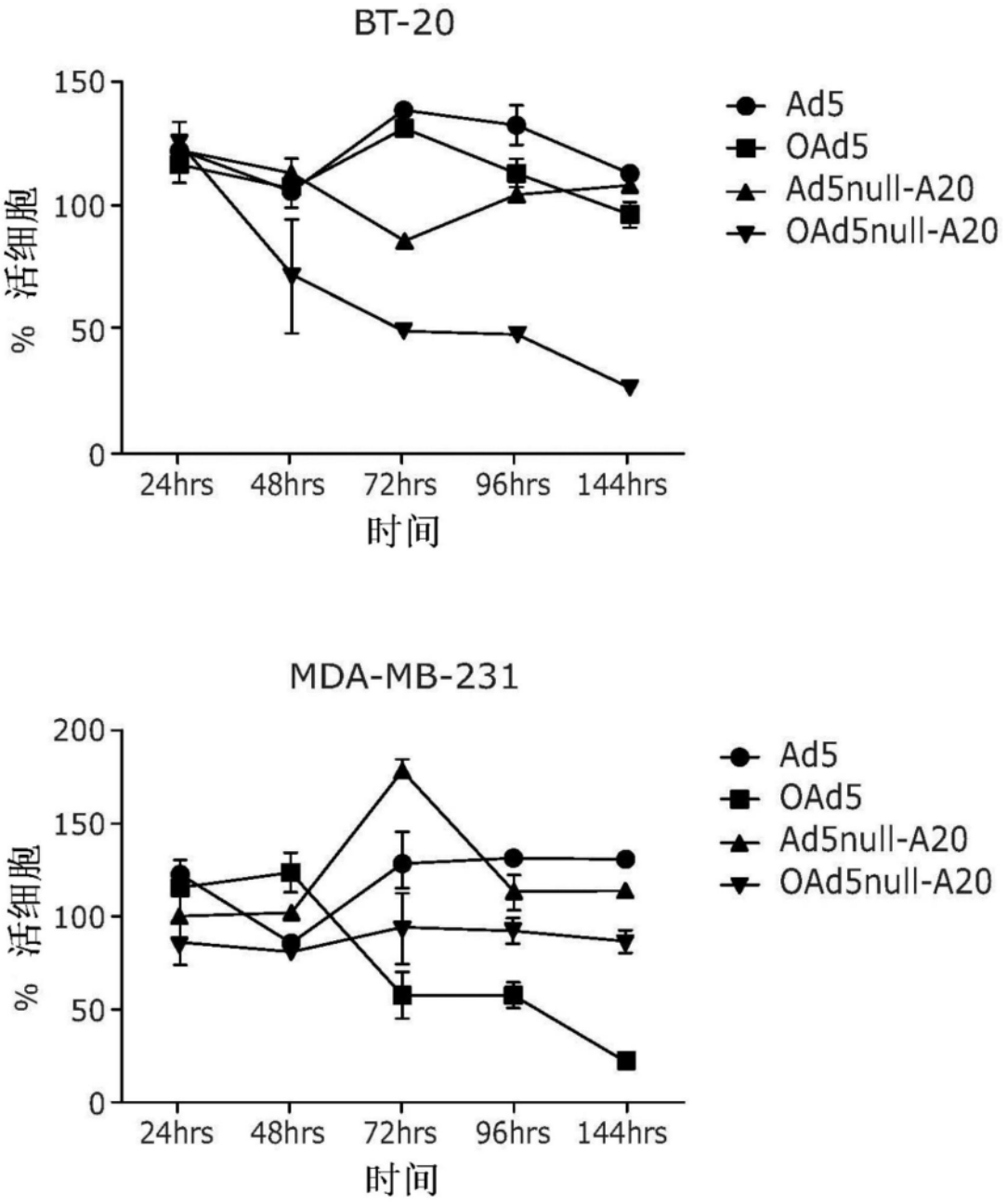

BT-20
150
100
50
0
% 活细胞
24hrs
48hrs
72hrs
96hrs
144hrs
时间
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20
MDA-MB-231
200
150
100
50
0
% 活细胞
24hrs
48hrs
72hrs
96hrs
144hrs
时间
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20

图16(续)