



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113453712 A

(43) 申请公布日 2021.09.28

(21) 申请号 201980092687.7

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22) 申请日 2019.12.27

代理人 左路 区斌

(30) 优先权数据

18306874.1 2018.12.28 EP

19306022.5 2019.08.21 EP

(51) Int.Cl.

A61K 39/275 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/863 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/087063 2019.12.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/136235 EN 2020.07.02

(71) 申请人 特兰斯吉恩股份有限公司

地址 法国伊克什格拉芬斯特丹

(72) 发明人 P·克莱因彼得 J·B·马尔尚
C·雷米 D·施密特

权利要求书2页 说明书39页
序列表2页 附图14页

(54) 发明名称

M2缺陷型痘病毒

(57) 摘要

本发明属于溶瘤病毒领域。本发明提供了新的痘病毒，其被工程化成对由M2L基因座编码的功能(即m2功能)有缺陷。此类痘病毒缺乏对CD80和CD86共刺激抗原中的至少一者或两者的功能性m2结合活性。所述溶瘤痘病毒优选为M2L基因座全部或部分缺失的痘苗病毒。本发明还涉及包含此类痘病毒的细胞和组合物，以及它们用于治疗增生性疾病如癌症和用于预防疾病(疫苗接种，尤其是在兽医领域中)的用途。更确切地，本发明提供了主要用于病毒疗法的现有溶瘤病毒的替代方案。m2缺陷型痘病毒特别可用于表达免疫调节多肽如抗CTLA-4抗体，目的是刺激或改善免疫应答。

1. 一种经修饰的痘病毒,其基因组在天然(野生型)背景中包含编码功能性m2痘病毒蛋白的M2L基因座,并且其被修饰成对所述m2功能有缺陷;其中所述功能性M2痘病毒蛋白能够结合CD80或CD86共刺激配体或者CD80和CD86共刺激配体两者,并且其中所述缺陷性m2功能不能够结合所述CD80和CD86共刺激配体。

2. 权利要求1的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒由脊椎动物痘病毒亚科生成或获得,所述脊椎动物痘病毒亚科优选选自禽痘病毒属、羊痘病毒属、兔痘病毒属、软疣痘病毒属、正痘病毒属、副痘病毒属、猪痘病毒属、鹿痘病毒属和亚塔痘病毒属。

3. 权利要求2的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒是所述正痘病毒属的成员,优选选自痘苗病毒(VV)、牛痘(CPXV)、浣熊痘(RCN)、兔痘、猴痘、马痘、田鼠痘、臭鼬痘、天花病毒(或天花)和骆驼痘。

4. 权利要求3的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒是痘苗病毒,优选选自西储(WR)、哥本哈根(Cop)、李斯特、LIVP、惠氏、塔什干、天坛、布莱顿、安卡拉、LC16M8、LC16M0株等,特别优选WR、哥本哈根和惠氏株。

5. 权利要求2的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒是兔痘病毒属的成员,优选粘液瘤病毒。

6. 权利要求1至5中任一项的经修饰的痘病毒,其中不能够结合所述CD80和CD86共刺激配体源于所述M2L基因座内的遗传损害或者源于直接或间接地削弱所述m2功能的异常相互作用。

7. 权利要求6的经修饰的痘病毒,其中所述遗传损害包括m2编码序列内或控制M2L表达的调节元件中的部分或全部缺失和/或一个或多个非沉默突变,优选导致缺陷型m2蛋白的合成或者m2合成的缺乏。

8. 权利要求7的经修饰的痘病毒,其中所述遗传损害是所述M2L基因座的部分或整个缺失。

9. 权利要求1至8中任一项的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒在M2L基因座以外的区域中被进一步修饰。

10. 权利要求9的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒在J2R基因座被进一步修饰,产生对m2和tk功能均有缺陷的经修饰的痘病毒。

11. 权利要求9或10的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒在I4L和/或F4L基因座被进一步修饰,产生对m2和rr功能均有缺陷的经修饰痘病毒。

12. 权利要求9至11中任一项的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒在J2R和I4L/F4L基因座被进一步修饰,产生对m2、tk和rr活性有缺陷的经修饰的痘病毒。

13. 权利要求1至12中任一项的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒是溶瘤的。

14. 权利要求1至13中任一项的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒是重组的。

15. 权利要求14的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒被工程化成表达选自抗原多肽、具有核苷/核苷酸库调控功能的多肽以及免疫调节多肽的至少一种多肽。

16. 权利要求15的经修饰的痘病毒,其中所述免疫调节多肽选自细胞因子、趋化因子、配体和抗体或它们的任何组合。

17. 权利要求16的经修饰的痘病毒,其中所述抗体特异性地结合优选选自CD3、4-1BB、GITR、OX40、CD27、CD40、PD1、PDL1、CTLA4、Tim-3、BTLA、Lag-3和Tigit的免疫检查点蛋白。

18. 权利要求17的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒表达特异性结合PD-L1或CTLA4的拮抗抗体。

19. 权利要求18的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒对m2、tk和rr活性有缺陷,并且编码抗CTLA-4抗体,优选伊匹单抗或替西木单抗。

20. 权利要求18的经修饰的痘病毒,其中所述经修饰的痘病毒对m2、tk和rr活性有缺陷,并且编码抗PD-L1抗体,优选阿特殊单抗、德瓦鲁单抗或阿维单抗。

21. 一种用于产生权利要求1至20中任一项的经修饰的痘病毒的方法,包括以下步骤:
a) 制备生产细胞系, b) 用所述经修饰的痘病毒转染或感染所制备的生产细胞系, c) 在合适的条件下培养所转染或感染的生产细胞系,以允许所述病毒的产生, d) 从所述生产细胞系的培养物中回收所产生的病毒,并且任选地e) 纯化所述回收的病毒。

22. 一种组合物,其包含治疗有效量的权利要求1至20中任一项所述的经修饰的痘病毒以及药学上可接受的载体。

23. 权利要求22的组合物,其包含大约 10^3 至大约 10^{12} pfu,有利地大约 10^4 pfu至大约 10^{11} pfu,优选大约 10^5 pfu至大约 10^{10} pfu;并且更优选大约 10^6 pfu至大约 10^9 pfu的所述经修饰的痘病毒,并且特别是大约 10^6 、 5×10^6 、 10^7 、 5×10^7 、 10^8 或 5×10^8 pfu的单个剂量。

24. 权利要求22或23的组合物,其被配制用于静脉内或瘤内施用。

25. 权利要求22至24中任一项的组合物,其用于治疗或预防增生性疾病,所述增生性疾病选自癌症以及与增加的破骨细胞活性相关的疾病如类风湿性关节炎和骨质疏松,以及心血管疾病如再狭窄。

26. 权利要求25的组合物,其中所述癌症选自肾癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、肝癌、胃癌、胆管癌、子宫内膜癌、胰腺癌和卵巢癌。

27. 权利要求22至24中任一项的组合物,其用于刺激或改善免疫应答,并且尤其是:

- 用于刺激或改善淋巴细胞介导的免疫应答(尤其是针对抗原多肽);
- 用于刺激或改善APC的活性;
- 用于刺激或改善抗肿瘤应答;
- 用于刺激或改善CD28信号传导途径;
- 用于改善在一个被治疗的对象或者一组被治疗的对象中本文所述的经修饰的痘病毒提供的治疗功效;和/或
- 用于降低在一个被治疗的对象或者一组被治疗的对象中本文所述的经修饰的痘病毒提供的毒性。

28. 权利要求22至27中任一项的组合物,用作独立疗法或者与优选选自外科手术、放射疗法、化学疗法、冷冻疗法、激素疗法、毒素疗法、免疫疗法、细胞因子疗法、癌症靶向疗法、基因疗法、光动力疗法和移植的一种或多种额外疗法联合使用。

M2缺陷型痘病毒

技术领域

[0001] 本发明属于溶瘤病毒领域。本发明提供了新的痘病毒,其被工程化成对由M2L基因座编码的功能(即m2功能)有缺陷。此类痘病毒缺乏对CD80和CD86共刺激抗原中的至少一者或两者的功能性m2结合活性。所述溶瘤痘病毒优选为M2L基因座全部或部分缺失的痘苗病毒。本发明还涉及包含此类痘病毒的细胞和组合物,以及它们用于治疗增生性疾病如癌症和用于预防疾病(疫苗接种,尤其是在兽医领域中)的用途。更确切地,本发明提供了主要用于病毒疗法的现有溶瘤病毒的替代方案。m2缺陷型痘病毒特别可用于表达免疫调节多肽如抗CTLA-4抗体,目的是刺激或改善免疫应答。

背景技术

[0002] 每年,全世界超过1200万名对象被诊断患有癌症。在工业化国家中,大约五人中的一人死于癌症。尽管存在大量的化疗药物,它们通常是无效的,尤其是针对在疾病的极早期建立的恶性和转移性肿瘤。

[0003] 基于有复制能力的病毒破坏癌细胞的溶瘤病毒疗法已经出现了二十年(Russell等,2012,Nat.Biotechnol.30(7):658-70)。目前正在进行大量临床前和临床研究,以在多种类型的癌症中评估携带有多种治疗基因的溶瘤病毒的治疗潜力。

[0004] 治疗基因通常插入病毒基因组的非必需基因内以保持溶瘤表型。在J2R基因座(tk)中的插入在本领域中广泛使用,因为其也有利于在存在BUdR时重组病毒的鉴定(Mackett等,1984J.of Virol.,49:857-64;Boyle等,1985,Gene 35,169-177)。然而,还提出了其它基因位点,例如Hind F片段中、M2L基因座(Smith等,1993,Vaccine 11(1):43-53;Guo等,1990,J.Virol.64:2399-2406;Bloom等,1991,J.Virol.65(3):1530-42;Hodge等,1994,Cancer Res.54:5552-5;McLaughlin等,1996,Cancer Res.56:2361-67)和A56R基因座(编码血细胞凝集素(HA))中。

[0005] 痘病毒,尤其是痘苗病毒(VV)已经提供了数种有前景的溶瘤候选物(De Graaf等,2018,doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.03.006),如JX594(Sillajen/Transgene)、GL-ONC1(Genelux)、TG6002(Transgene)和vvDD-CDSR(University of Pittsburg)。这些溶瘤VV源自具有多样不同基因组修饰和多种治疗基因表达的不同VV株。通过缺失病毒J2R基因(其编码胸苷激酶(tk))而减毒并且进一步携带GM-CSF的JX-594(Wyeth株)目前正在肝细胞癌的随机III期试验中进行临床评价(Parato等,2012,Molecular Therapy20(4):749-58)。通过分别插入三个表达盒来取代亲代病毒李斯特菌株(Lister strain)基因组的F14.5L、J2R和A56R基因位点来生成GL-ONC1。一些临床试验中正在评价关于相同品系TG6002的J2R(tk)和I4L(I4L基因座编码核糖核苷酸还原酶(rr-))缺陷型VV(Copenhagen株),其编码使无毒5-氟胞嘧啶(5-FC)转化为细胞毒性5-氟尿嘧啶(5-FU)的FCU1酶。tk和rr双重缺失使病毒的复制限定于含有高核苷酸库的细胞,使得TG6002不能在静息细胞中复制(Foloppe等,2008,Gene Ther.15:1361-71;W02009/065546)。目前在患有难治性皮肤和皮下肿瘤的患者中测定了vvDD-CDSR。其通过使tk(J2R基因座)和痘苗病毒生长因子(vgf)编码基因双重缺

失来工程化,并且携带有用于使5-FC转化为5-FU的胞嘧啶脱氨酶(CD)基因和用于体内成像的生长抑素受体(SR)基因两者。

[0006] 最初,直接溶瘤作用被认为是溶瘤病毒借此发挥其抗肿瘤作用的唯一机制。仅在最近才认识到免疫系统在病毒疗法的成功中起着至关重要的作用(Chaurasiya等,2018, *Current Opinion in Immunology* 51:83-90)。然而,多数病毒通过参与旨在阻断宿主用于对抗病毒感染采用的许多策略的免疫逃避和免疫调节的蛋白质库发展了自身防御机制(Smith和Kotwal,2002, *Crit.Rev.Microbiol.* 28(3):149-85)。此外,肿瘤细胞还进化出了T细胞衰竭的机制以逃避宿主的免疫系统,其特征在于抑制性受体的上调;CTLA-4(细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白-4;也称为CD152)和PD-1(程序性细胞死亡蛋白1)及其配体PD-L1和PD-L2是记载最多的。这些免疫抑制受体充当免疫检查点,作用于不同水平的T细胞免疫。CTLA-4抑制淋巴结中T细胞活化的早期阶段,并且还刺激不期望的Treg,而PD-1在后期阶段起作用。

[0007] 更具体地,T细胞的活化涉及存在于APC(抗原呈递细胞)表面的共刺激配体如CD80(也称为B7-1)和CD86(也称为B7.2)与存在于T细胞表面的受体如CD28、CTLA-4和PDL-1的相互作用。CD80是这3种细胞表面受体的配体,而CD86结合CD28和CTLA-4。CD28受体在静息T细胞上组成型表达,并且CD28与共刺激性CD80和CD86配体的连接向T细胞递送了阳性刺激信号,诱导它们增殖并分泌IL-2,并通过提高Bcl-XL的表达来抑制细胞凋亡(Chen,2004, *Nat.Rev.Immunol.* 4:336-347)。相比之下,CTLA-4或PD-L1在初始T细胞活化后(对于CTLA-4)或在后期阶段(对于PD-L1)的T细胞负调节中发挥作用。具体地,在与CD80和CD86共刺激性配体连接时,CTLA-4顺式作用于活化的T细胞以对抗由CD28与CD80和CD86的相互作用提供的共刺激信号,并且参与IL-10产生。此外,CTLA-4在免疫抑制调节性T细胞(Treg)亚群上组成型表达。另一方面,证明了CD80与T调节细胞表面上的PD-L1的连接增加这些免疫抑制细胞的增殖(Yi,2011, *J Immunol.* 186:2739-2749)。CTLA4在1987年得到鉴定(Brunet等,1987, *Nature* 328:267-70)并且由CTLA4基因编码(Dariavach等, *Eur.J.Immunol.* 18:1901-5)。完整的CTLA-4核酸序列可以根据GenBank登录号L1 5006找到。

[0008] 作为拯救衰竭的抗肿瘤T细胞的手段,对阻断此类免疫抑制检查点的兴趣不断增加。在过去的十年间开发出了大量拮抗抗体(Kahn等,2015, *J.Oncol.* Doi:10.1155/2015/847383),并且数种已被FDA批准,首先针对CTLA4(例如伊匹单抗/Yervoy, Bristol-Myers Squibb)和PD-1(派姆单抗/Keytruda,由Merck开发;以及纳武单抗/Optivo,由BMS开发)。虽然常规的治疗依赖于向患者施用抗体,现在认为通过病毒或质粒载体的载体化将这些抗体直接递送至肿瘤细胞(参见例如W02016/008976)。例如,载有抗PD-1的tk-和rr-VV显示在MCA-205小鼠模型中诱导肿瘤生长控制(Kleinpetter等,2016, *OncoImmunology* 5(10): e1220467)。

[0009] 然而,由于这些免疫相互作用分子和病毒载体的复杂性质以及触发级联事件的风险,临床前以及甚至更多的临床研究可能难以实施。

[0010] 因此,仍然需要进一步开发溶瘤病毒、组合物和方法以用于递送治疗性多肽如检查点定向拮抗抗体,以增强癌症患者中的抗肿瘤适应性免疫应答。

[0011] 技术问题和所提出的解决方案

[0012] 意料不到地,发明人确定了感染有痘苗病毒(VV)的细胞的上清液与共刺激性CD80

和CD86配体相互作用,而感染有减毒的修饰的痘苗病毒安卡拉株(Vaccinia virus Ankara, MVA)的细胞的上清液缺乏该特性。发明人将CD80和CD86结合特性归于由VV M2L基因座编码的M2蛋白。在本发明之前, M2被报道为保留在内质网中的蛋白质,充当NfKb途径的抑制剂(Hinthong等,2008, Virology 373 (2):248-62),并且参与病毒的脱壳(Baoming Liu等,2018, J. Virol. 92 (7) e02152-17)。进一步对于VV, 本发明人确定了在许多复制性痘病毒中存在M2直系同源物。

[0013] 本发明示出了M2蛋白与CD80和CD86结合并分别影响三种免疫抑制途径的能力:i) 其阻断CD80和CD86与CD28的相互作用;ii) 其促进CD80与PD-L1的相互作用;iii) 其触发对CD80/CD86阳性细胞的反向信号传导。

[0014] 在本发明的上下文中,发明人生成了m2功能缺陷型痘苗病毒。当携带免疫调节多肽如抗CTLA-4抗体时,其表达抑制了CTLA-4介导的免疫抑制信号,并且预期m2的不存在允许T细胞应答重定向至CD28介导的免疫刺激信号,而M2L阳性痘苗病毒将负面干扰此类CD28介导的正面信号,这是由于m2与CD80和CD86共刺激配体结合。

[0015] 重要且令人惊奇地,由于在感染的细胞中不存在功能性m2蛋白的合成,预期本文所述的痘病毒将刺激或改善免疫应答,尤其是针对抗原的淋巴细胞介导的应答,而在常规痘病毒(M2L阳性)中,所产生的病毒m2蛋白将结合CD80和CD86共刺激配体,并因此阻止CD28介导的正途径。此外,本文所述的痘病毒显示出被宿主的免疫系统接受的倾向增强,因为它们缺乏参与病毒的免疫逃避的蛋白质;该特征提供了相对于M2阳性痘病毒的竞争优势。本发明提供了独特产品,其结合了用于杀伤分裂细胞的溶瘤作用和免疫刺激活性,例如用于破坏癌症相关的免疫衰竭,从而提高溶瘤病毒的治疗能力。

[0016] 此技术问题通过提供如权利要求所限定的实施方式而解决。从本发明的当前优选实施方式的以下描述中,本发明的其它的和进一步的方面、特征和优势将是明显的。给出这些实施方式是为公开的目的。

发明内容

[0017] 本公开涉及被工程化成对由M2L基因座编码的m2蛋白有缺陷的痘病毒,尤其是溶瘤痘病毒,以及生成和使用此类病毒的方法。如本文所公开,生成了如下痘病毒并进行分离:其对由M2L基因座编码的m2功能有缺陷,任选地与tk编码基因座和/或rr编码基因座的其它功能性失活组合。还预期了工程化成表达抗CTLA4抗体的m2缺陷型痘苗病毒。

[0018] 根据本发明的第一方面,提供了一种经修饰痘病毒,其基因组在天然(野生型)背景中包含编码功能性m2痘病毒蛋白的M2L基因座,并且其被修饰成对所述m2功能有缺陷;其中所述功能性m2痘病毒蛋白能够结合CD80或CD86共刺激配体或者CD80和CD86共刺激配体两者,并且其中所述缺陷性m2功能不能结合所述CD80和CD86共刺激配体。

[0019] 在一个实施方式中,经修饰痘病毒由脊椎动物痘病毒亚科(Chordopoxvirinae)生成或获得,该脊椎动物痘病毒亚科优选选自禽痘病毒属、山羊痘病毒属、兔痘病毒属、软疣痘病毒属、正痘病毒属、副痘病毒属、猪痘病毒属、鹿痘病毒属和亚塔痘病毒属。在一个优选的实施方式中,所述经修饰痘病毒是正痘病毒属的成员,优选选自痘苗病毒(VV)、牛痘(CPXV)、浣熊痘(RCN)、兔痘、猴痘、马痘、田鼠痘、臭鼬痘、天花病毒(或天花)和骆驼痘;特别优选经修饰痘苗病毒。

[0020] 在一个实施方式中,不能够结合所述CD80和CD86共刺激配体源于M2L基因座内的遗传损害或者源于直接或间接地削弱m2功能的异常相互作用。所述遗传损害包括m2编码序列内或控制M2L表达的调控元件中的部分或全部缺失和/或一个或多个非沉默突变(转译为氨基酸残基的变化),优选导致缺陷型m2蛋白的合成或者缺乏m2合成。所述遗传损害优选为M2L基因座的部分或整个缺失。

[0021] 在一个实施方式中,经修饰痘病毒在M2L基因座以外的区域被进一步修饰;具体地在J2R基因座(产生对m2和tk功能均有缺陷的经修饰痘病毒)或在I4L/F4L基因座/基因位点(产生对m2和rr功能均有缺陷的经修饰痘病毒)。优选,经修饰痘病毒在J2R和I4L/F4L基因位点被进一步修饰,产生对m2、tk和rr活性有缺陷的经修饰痘病毒。

[0022] 在一个实施方式中,经修饰痘病毒是溶瘤的。

[0023] 在一个实施方式中,所述经修饰痘病毒是重组体。所述经修饰痘病毒优选被工程化成表达至少一种选自抗原多肽、具有核苷/核苷酸库调节功能的多肽以及免疫调节多肽的多肽。所述免疫调节多肽理想地选自细胞因子、趋化因子、配体和抗体或它们的任何组合。在一个优选的实施方式中,所述经修饰痘病毒对m2、tk和rr活性有缺陷,并且编码抗CTLA-4抗体。在另一个优选的实施方式中,所述经修饰痘病毒对m2、tk和rr活性有缺陷,并且编码抗PD-L1抗体。

[0024] 根据另一方面,提供了一种用于产生经修饰痘病毒的方法,该方法包括以下步骤:a) 制备生产细胞系,b) 用经修饰痘病毒转染或感染所制备的生产细胞系,c) 在合适的条件下培养转染或感染的生产细胞系,以允许病毒产生,d) 从所述生产细胞系的培养物中回收所产生的病毒,并且任选地e) 纯化所述回收的病毒。

[0025] 根据另一方面,提供了一种包含治疗有效量的经修饰痘病毒和药学上可接受的载体的组合物。组合物理想地包含大约 10^3 至大约 10^{12} pfu,有利地大约 10^4 pfu至大约 10^{11} pfu,优选大约 10^5 pfu至大约 10^{10} pfu;并且更优选大约 10^6 pfu至大约 10^9 pfu的经修饰痘病毒。组合物优选被配制用于静脉内或瘤内施用。

[0026] 在又一方面,组合物用于治疗或预防增生性疾病,该增生性疾病选自癌症以及与增加的破骨细胞活性相关的疾病如类风湿性关节炎和骨质疏松以及心血管疾病如再狭窄。待治疗或预防的癌症优选选自肾癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、肝癌、胃癌、胆管癌、子宫内膜癌、胰腺癌和卵巢癌。经修饰痘病毒和组合物用作独立疗法或者与一种或多种优选选自外科手术、放射疗法、化学疗法、冷冻疗法、激素疗法、毒素疗法、免疫疗法、细胞因子疗法、癌症靶向疗法、基因疗法、光动力疗法和移植的额外疗法结合使用。

[0027] 在又一方面,经修饰痘病毒或组合物用于刺激或改善免疫应答。

附图说明

[0028] 图1示出了采用从未受感染的(虚线)或用野生型VV(菱形)或Yervoy(倒三角形)感染的禽DF1细胞收集的上清液进行的CD80/CTLA4(1A)和CD86/CTLA4(1B)竞争ELISA测定。His标记的B7-Fc蛋白与固定化CTLA4-Fc的结合使用抗His标签-HRP缀合抗体执行。

[0029] 图2示出了采用从感染有MVA(MVA)、Copenhagen株(Cop VV)、Western Reserve株(WR VV)、Wyeth株(Wyeth VV)的痘苗病毒、浣熊痘(RCN)、兔痘(RPX)、牛痘(CPX)、禽痘(fowlpox)(FPV)和伪牛痘(PCPV)的HeLa细胞收集的上清液以及未受感染的HeLa细胞(阴性

对照)的上清液实施的CD80/CTLA4竞争ELISA。

[0030] 图3示出了采用直接收集的未受感染的(Sup.cells)或感染有MVA(Sup.MVA)或Copenhagen痘苗病毒(Sup.VV)的CEF细胞的上清液或经20倍浓缩($\times 20$)的上清液在非还原性SDS-PAGE中进行,并且用人CD86与Fc片段(hCD86-Fc)、人CD80与Fc片段(hCD80-Fc)以及人CTLA4与Fc片段(hCTLA4-Fc)的融合物探测的Western印迹。检测采用抗Fc缀合的抗体进行。

[0031] 图4示出了测试生物素化CD80和生物素化CD86与它们的同源受体(分别为CD28/CD86、CD28/CD80、CTLA4/CD80和PDL1/CD80)的相互作用的竞争ELISA。将从感染有MVA(MVA)和Copenhagen株的痘苗病毒(VV)的CEF细胞收集的上清液与未受感染的CEF细胞(CEF)(阴性对照)和Yervoy抗体($10\mu\text{g}/\text{ml}$)的上清液进行比较。均为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的重组人PD1(hPD1)、人CD80(hCD80)和人CTLA4(hCTLA4)的反应性被用作与PDL1/CD80相互作用竞争的阳性对照。结合的生物素化B7蛋白的检测使用HRP缀合的链霉亲和素执行。

[0032] 图5A示出了用于通过亲和层析用固定化CD86-Fc融合物鉴定“干扰因子(IF)”的实验途径,并且图5B提供了VV感染的CEF细胞中捕获的IF的序列。

[0033] 图6示出了采用收集自作为阴性对照的未受感染的HeLa或DF1细胞(HeLa或DF1)或感染有双重缺失(tk-rr-)Copenhagen痘苗病毒(VVTG18277)或三重缺失(tk-rr-m2-)Copenhagen痘苗病毒(COPTG19289)的上清液实施的CD80/CTLA4竞争ELISA。His标记的CD80-Fc蛋白与固定化CTLA4-Fc的结合使用抗His标签-HRP缀合抗体监测。

[0034] 图7示出了在以多种MOI(10^{-1} 至 10^{-4})感染LOVO(A)和HCT116(B)细胞四天之后,tk-rr-m2-痘苗病毒(COPTG19289)及其tk-rr-对应物(VVTG18277)的溶瘤活性。MOCK处理的细胞用作阴性对照。

[0035] 图8示出了皮下植入有B16F10肿瘤的C57BL/6小鼠的荧光素酶表达。在第0、3、6、10和14天瘤内注射VVTG18277病毒和COPTG19289(10^7 pfu),并且在第1、2、6、9、13和16天收集肿瘤采样,以评价每克肿瘤的荧光素酶活性(RLU/g肿瘤)。按时间点包括了三只小鼠。

[0036] 图9示出了皮下植入有CT26肿瘤的Balb/c小鼠中的抗肿瘤活性。在D0、D3、D6、D10和D14(10只小鼠/组)瘤内注射 10^7 pfu的VVTG18277(正方形)、COPTG19289(三角形)或Mock(圆形)。每周跟踪肿瘤生长两次(当肿瘤体积达到 2000mm^3 时处死小鼠)。

[0037] 图10示出了皮下植入有HT116肿瘤的Swiss Nude小鼠中的抗肿瘤活性。在D10当肿瘤达到 100 至 200mm^3 时,使小鼠(10只小鼠/组)接受 10^5 (A)或 10^7 (B)pfu的VVTG18277(圆形)、COPTG19289(正方形)或Mock(菱形)的单个静脉内注射。每周跟踪肿瘤生长两次。

[0038] 图11示出了感染有M2缺陷型痘病毒的细胞的上清液对混合淋巴细胞反应(MLR)的影响。从两个不同的供体纯化PBMC,并且在从感染(MOI 0.05)有COPTG19289(tk-、rr-和m2-)、VVTG18058(tk-rr-)或MVAN33(野生型)的CEF获得的上清液存在的情况下培养。感染后48h收获培养上清液并浓缩约20倍。将未经稀释或稀释10或100倍的这些浓缩上清液添加至PBMC培养物($20\mu\text{L}$ 添加于 $200\mu\text{L}$ 中),以产生分别为2、0.2和0.02倍的最终“上清液浓度”。PBMC培养基中分泌的IL-2的量通过ELISA测量。IL-2测量对于每个测试样品一式三份进行。通过将给定样品的三次重复的IL-2浓度的平均值除以用培养基孵育的PBMC的三次重复的IL-2浓度的平均值,将测量值归一化。

[0039] 图12示出了在人源化小鼠模型中由M2缺陷型COPTG19289提供的对肿瘤体积的影

响。将NOD/Shi-scid/IL-2R γ null免疫缺陷小鼠 (NCG) 用CD34+人干细胞进行人源化,并且用人结肠直肠癌细胞HCT-116移植(在一只小鼠的肋腹中SC注射 5×10^6 个细胞;表示D0)。植入后十二天(D12),小鼠以 10^6 pfu (A) 或 10^5 pfu (B) 的剂量接受COPTG19289 (TD) 或m2+对应物VVTG18058 (DD) 的单次IV注射。载体处理的小鼠被用作阴性对照。在细胞植入后60天内监测肿瘤生长。每组的平均肿瘤生长(以 mm^3 计)表示为细胞注射后天数的函数。

[0040] 图13示出了在上述人源化NCG-CD34+小鼠模型中由M2缺陷型COPTG19289提供的对存活的影响。肿瘤植入后十二天(D12),小鼠以 10^6 pfu (A) 或 10^5 pfu (B) 的剂量接受COPTG19289 (TD) 或m2+对应物VVTG18058 (DD) 的单次IV注射。载体处理的小鼠被用作阴性对照。在细胞植入后90天内监测小鼠存活。每组的存活率(百分比)以细胞注射后天数的函数给出。

[0041] 发明详述

[0042] 一般定义

[0043] 此处提供了有助于理解本发明的许多定义。然而,除非另有定义,本文使用的所有技术术语和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文引用的所参考文献均全文以引用方式并入。

[0044] 除非上下文另外明确规定,否则如在整个申请中使用的术语“一个(a/an)”在它们意指“至少一个”、“至少第一个”、“一个或多个”或“多个”引用的组分或步骤的意义上使用。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括它们的混合物。

[0045] 术语“一个或多个”是指一个或一个以上的数字(例如2、3、4、5等)。

[0046] 无论在本文何处使用的术语“和/或”均包括“和”、“或”和“所述术语相关的全部或任何其它要素的组合”的含义。

[0047] 如本文所用,术语“约”或“大约”意指在给定值或范围的20%内,优选10%内,并且更优选5%内。

[0048] 如本文所用,当用于定义产物、组合物和方法时,术语“包含(comprising)”(和任何形式的包含,如“comprise/comprises”)、“具有(having)”(和任何形式的具有,如“have/has”)、“包括(including)”(和任何形式的包括,如“includes/include”)或“含有(containing)”(和任何形式的含有,如“contains/contain”)是开放式的并且不排除额外的未列举的要素或方法步骤。因此,当氨基酸序列可为多肽的最终氨基酸序列的一部分时,多肽“包括”该氨基酸序列。“由...组成”意指排除任何实质意义的其它组分或步骤。因此,由所叙述的组分组成的组合物将不排除痕量污染物和药学上可接受的载体。“由氨基酸序列组成”的多肽是指存在这样的氨基酸序列:其任选地仅具有几个额外且非必需的氨基酸残基。然而,优选的是多肽不含有除所叙述的氨基酸序列以外的任何氨基酸。在本说明书中,如果需要,术语“包含”(尤其是当涉及特定序列时)可以用“由...组成”代替。

[0049] 在本发明的上下文中,术语“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”和“核苷酸序列”可互换使用,并且定义任何长度的多聚脱氧核糖核苷酸(DNA)(例如cDNA、基因组DNA、质粒、载体、病毒基因组、分离的DNA、探针、引物以及它们的任何混合物)或多聚核糖核苷酸(RNA)(例如mRNA、反义RNA、SiRNA)或混合的多核糖核苷酸-多脱氧核糖核苷酸的聚合物。它们涵盖单链或双链、线性或环状、天然或合成、经修饰或未经修饰的多核苷酸。

[0050] 术语“多肽”应理解为是经由肽键结合的至少九个氨基酸残基的聚合物,无论其大

小以及是否存在翻译后组分(例如糖基化)。对多肽中包含的氨基酸的最大数目没有设限。作为一般性指示,该术语既指短聚合物(本领域中通常称为肽),又指长聚合物(本领域中通常称为多肽或蛋白质)。该术语涵盖天然多肽、经修饰多肽(也称为衍生物、类似物、变体或突变体)、多肽片段、多肽多聚体(例如二聚体)、融合多肽等。该术语还指由编码所述多肽的多核苷酸序列表达的重组多肽。通常,这涉及将编码核酸翻译成mRNA序列,并通过多核苷酸序列递送的细胞的核糖体机制对其进行翻译。

[0051] 术语“相同性”是指两个多肽或核酸序列之间的氨基酸与氨基酸或核苷酸与核苷酸的对应关系。两个序列间的相同性百分比是序列共有的相同位置数量的函数,考虑了为最佳比对需要引入的空位数和每个空位的长度。本领域可获得多种计算机程序和数学算法来确定氨基酸序列之间的相同性百分比,例如在NCBI或ALIGN上在Atlas of Protein Sequence and Structure中获得的Blast程序(Dayhoffed,1981,Suppl.,3:482-9);或Needleman和Wunsh的算法(J.Mol.Biol.48,443-453,1970)。用于确定核苷酸序列之间相同性的程序也可在专门的数据库(例如Genbank,Wisconsin序列分析包、BESTFIT、FASTA和GAP程序)中获得。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列上实现最大比对所需的任何算法。为进行示意性的说明,“至少70%”意指70%或更高(包括71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,而“至少80%相同性”意指80%或更高(包括81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,并且“至少90%”意指90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。

[0052] 如本文所用,术语“分离的”是指从其天然背景中移除(即从与之天然相关联或自然界中存在的至少一种其它组分中分开)的组分(例如多肽、核酸分子、病毒、载体等)。例如,当核苷酸序列与通常在天然条件下与之相关联的序列分开(例如从基因组解离)时,其是分离的,但其可以与异源序列相关联。

[0053] 术语“从…获得”、“源自(originating/originate)”以及它们的任何等同物用于鉴定组分(例如多肽、核酸分子、病毒、载体等)的原始来源,但并不意味着限制制备组分的方法,其可以例如通过化学合成或重组方式。

[0054] 如本文所用,术语“宿主细胞”应广义地理解,而没有涉及组织、器官或分离的细胞中的特定组织的任何限制。此类细胞可为独特类型的细胞或一组不同类型的细胞,如培养的细胞系、原代细胞和分裂细胞。在本发明的上下文中,术语“宿主细胞”优选是指真核细胞如哺乳动物(例如人或非人)细胞以及能够产生本文所述的痘病毒的细胞。该术语还包括可以是或已经是痘病毒接受者的细胞以及此类细胞的子代。

[0055] 术语“对象”通常是指需要或可能受益于本文所述的任何痘病毒、组合物和方法的生物体。通常,生物体是哺乳动物,特别是选自家养动物、农用动物、竞技动物和灵长类动物的哺乳动物。优选地,对象是已被诊断为患有增生性疾病如癌症或处于患有增生性疾病如癌症的风险的人。当涉及人类生物体时,术语“对象”和“患者”可以互换使用并且涵盖男性和女性。待治疗的对象可为新生儿、婴儿、年轻人、成人或老年人。

[0056] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”(和任何形式的治疗,如“treating/treat”)涵盖预防(例如在处于患有待治疗的病理状况的风险的对象中的预防性措施)和/或疗法

(例如在被诊断为患有病理状况的对象中),最终与常规治疗模式相关联。治疗的结果是减缓、治愈、改善或控制目标病理状况的进展。例如,如果在施用如本文所述的痘病毒之后对象显示出其临床状态的可观察的改善,则成功地治疗了对象的癌症。

[0057] 如本文所用,术语“施用(administering)”(或任何形式的施用,如“administered”)是指将治疗剂如本文所述的痘病毒递送给对象。

[0058] 如本文所用,术语“组合”或“关联”是指多种组分(例如痘病毒以及一种或多种在抗癌疗法中有效的物质)可能的任何布置。此类布置包括所述组分的混合物以及用于伴行或顺序施用的单独的组合物。本发明涵盖了包含等摩尔浓度的各组分的组合以及具有大不相同的浓度的组合。应理解,组合中各组分的最佳浓度可由本领域的技术人员确定。

[0059] M2缺陷型痘病毒

[0060] 在一个方面,本发明提供了经修饰痘病毒,其基因组在天然(野生型)背景中包含编码功能性m2痘病毒蛋白的M2L基因座,并且其被修饰成对所述m2功能有缺陷;其中所述功能性M2痘病毒蛋白能够结合CD80或CD86共刺激配体或者CD80和CD86共刺激配体两者,并且其中所述缺陷性m2功能不能够结合所述CD80和CD86共刺激配体。

[0061] 如本文所用,术语“痘病毒”或“痘病毒的”是指当前鉴定或之后鉴定的任何痘病毒科(Poxviridae)病毒,其对一种或多种哺乳动物细胞(例如人细胞)有感染性,并且其基因组在天然(即野生型)背景中包含编码功能性的所谓M2蛋白的M2L基因座。如在痘病毒或本文提及的任何其它病毒的背景中使用,术语“病毒”涵盖病毒基因组以及病毒颗粒(被衣壳包裹和/或包被的基因组)。

[0062] 痘病毒是含有双链基因组的广泛的DNA病毒家族。与大多数病毒一样,痘病毒已通过参与旨在阻断宿主用于对抗病毒感染的许多策略的免疫逃避和免疫调控的蛋白质库发展了自身防御机制(Smith和Kotwal,2002,Crit.Rev.Microbiol.28(3):149-85)。通常,痘病毒基因组编码超过20种使得病毒能够操纵宿主免疫应答并因此促进病毒复制、扩散和传播的宿主应答调节剂。这些包括生长因子、抗凋亡蛋白、NFkB途径和干扰素信号传导的抑制剂,以及主要组织相容性复合体(MHC)的下调剂。

[0063] 对于一般性指导,野生型痘苗病毒(VV)基因组包含M2L基因座,其编码序列编码在病毒生命周期的早期阶段期间产生的称为m2的蛋白质。其分泌或位于内质网(RE)中并且可能是糖基化的(Hinthong等,2008,Virology 373:248-262)。尽管其功能还处于研究中,其参与核心脱壳和病毒DNA复制(Liu等,2018,J.Virol.,doi/10.1128/JVI.02152-17),但其对于体外病毒复制是非必要的(Smith,1993,Vaccine 11:43-53)。此外,其经由Erk1磷酸化抑制下调细胞NF-κB转录因子的功能现在已得到确定(Gedey等,2006,J.Virol.80:8676-85),表明m2因此在痘病毒感染期间参与宿主的抗病毒应答。VV“M2L”基因座存在于野生型VV基因组的5'第三部分;具体地,编码序列位于Copenhagen(Cop)VV基因组的27324位与27986位之间。Cop M2L编码的基因产物为220个氨基酸的蛋白质(具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;也公开于Uniprot的P21092登录号下),并且由包括8个Cys残基的203个氨基酸残基长的成熟多肽以及也具有一个Cys残基的N末端17个氨基酸残基长的信号肽构成。

[0064] 天然背景中的痘病毒基因组为大约200kb的双链DNA,并且具有编码近200种不同功能的蛋白质的潜力(包括M2L基因座)。基因组序列和编码开放阅读框(ORF)是公知的。本发明的经修饰痘病毒包含已被人工修饰成至少对于由天然M2L基因座编码的m2功能有缺陷

的基因组,并且还可包括一种或多种额外的修饰,如本文所述的那些。

[0065] 痘病毒基因组内M2L基因座存在的鉴定

[0066] 使用本文给出的信息和本领域的一般知识,确定给定的痘病毒在天然背景中是否包含编码功能性m2蛋白的M2L基因座是技术人员所能及的。测定技术的具体选择不是很关键,并且本领域的技术人员能够采用这些常规方法中的任一种来确定候选痘病毒是否包含编码功能性m2蛋白的M2L基因座。

[0067] 在一个实施方式中,可通过杂交或PCR技术,使用本文给出的信息并设计适当的探针或引物来筛选痘病毒基因组序列,在给定的痘病毒中鉴定M2L基因座。对于一般性指导,杂交测定通常基于针对在适于杂交的条件下从感染或含有此类候选痘病毒的细胞中提取的核酸的待检测M2L基因座而言,衍生自本文列出的已知核苷酸(nt)序列信息的寡核苷酸探针。寡核苷酸探针是单链RNA或DNA的短片段(通常10至30个核苷酸长),其被设计成与靶M2L序列互补(即至少80%相同性)。探针优选被标记为允许检测(例如,放射性、荧光或酶标记的探针)。杂交通常在严格条件下进行,从而允许仅形成特异性杂交体。

[0068] 在又一个或另选的实施方式中,可以基于编码的基因产物的氨基酸序列来鉴定给定痘病毒的基因组中M2L基因座的存在。例如,可以通过基因组序列的翻译分析并且在可用的数据库中针对已知痘病毒m2蛋白如Cop VV m2 (SEQ ID NO:1) 或粘液瘤病毒(myxoma virus) gp-120样蛋白 (SEQ ID NO:2) 来比对编码的开放阅读框(ORF)的氨基酸序列,以搜索显示出与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列有至少40%,理想地至少50%,优选至少70%,更优选至少80%并且绝对优选至少90%序列相同性的编码ORF的存在,鉴定M2L基因座的存在。

[0069] 另选地或除此之外,可将痘病毒基因组编码的ORF的氨基酸序列针对可用的数据库进行比对。如果候选痘病毒编码所谓的m2多肽家族——其在结构域数据库(例如Gene3D、PANTHER、Pfam、PIRSF、PRINTS、ProDom、PROSITE、SMART、SUPERFAMILY或TIGRFAM)中搜索后给出的结果与m2 VV蛋白(在Uniprot中登录号P21092下引用;本文也公开为SEQ ID NO:1)的结果相同,则认为该候选痘病毒包含M2L基因座。因此,如果候选痘病毒编码多肽——其在利用上述数据库提交给Blast分析时在Uniprot中归属于PFAM基序n°PF04887或Interpro基序n°IPR006971特征,则该候选痘病毒被鉴定为包含M2L基因座。

[0070] 编码的m2蛋白的功能性。

[0071] 如本文所用的功能性m2蛋白是指所述蛋白在体外或体内结合CD80和/或CD86共刺激配体的能力。痘病毒编码功能性m2多肽的能力可以通过常规技术来评价。用于评价蛋白质与其靶标的结合能力的标准测定是本领域已知的,包括例如Biacore™、量热法、荧光测定法、生物层干涉测量法、免疫印迹法(例如Western印迹)、RIA、流式细胞术和ELISA。测定技术的具体选择不是关键的,并且本领域的技术人员能够采用这些常规方法中的任一种来确定候选m2蛋白是否与CD80和/或CD86共刺激配体结合。

[0072] 例如,感染有候选痘病毒的细胞的上清液可用于探测固定在平板上(ELISA)或展示在细胞表面上(FACS)的CD80或CD86。夹心竞争ELISA测定法(参见实施例部分)是特别合适的,因为事实在于不需要生成标记的重组蛋白来获得结果。例如,在添加待测试样品(例如感染有痘病毒的细胞上清液)之前,可用所关注的配体(例如CD86-Fc)包被ELISA板。如果样品包含M2多肽,其将与包被的配体结合。然后,添加检测配体,该检测配体通常被标记以

用于检测,例如通过使标记物质转化为可用读板器测量的有色产物的酶的作用(例如,具有由与HRP(辣根过氧化物酶)偶联的抗-His标签抗体识别的His标签的CTLA4-Fc)。与没有样品或阴性对照样品相比,在候选样品存在下显色检测的下降指示样品含有与检测配体竞争性结合包被的配体的M2多肽。也可以反过来进行,例如通过使用CTLA-4-Fc作为包被的配体并且CD80-Fc-His标签作为检测配体。

[0073] 如本文所用,“m2功能有缺陷”旨在意指m2蛋白在体外或体内不能结合CD80和/或CD86共刺激配体。这种无能可能源于天然M2L基因座内的遗传削弱,其妨碍编码的m2蛋白的正常结合活性。因此,功能失活可由M2L基因座中的一个或多个突变引起。此类突变优选选自编码序列或控制m2蛋白表达的调控序列中的插入、缺失和碱基改变。另选地,功能失活可通过m2蛋白与一种或多种其它基因产物的异常相互作用而发生,该一种或多种其它基因产物结合至所述m2蛋白或以其它方式妨碍所述m2蛋白的功能活性。

[0074] 对于一般性指导,发明人实际上已鉴定了如下文所述的大量痘病毒中的M2L基因座(编码功能性m2蛋白或其直向同源物);更具体地在痘苗病毒的七种株中,粘液瘤病毒的七种株中,猴痘的4种株中,牛痘病毒的多种株中,天花病毒的八种株中以及多种其它痘病毒中,包括但不限于马痘、沙鼠痘(Taterapox)、骆驼痘、浣熊痘、臭鼬痘、约卡痘(Yokapox)、兔纤维瘤病毒(Rabbit fibroma virus)、摩尔曼斯克痘(Murmansk pox)、北棕蝠痘(Eptesipox)、鹿痘、特纳河痘(Tanapox)、科蒂亚鼠病毒(Cotia virus)和田鼠痘。为进行示意性的说明,马痘、天花病毒、猴痘、骆驼痘、牛痘的编码的M2蛋白直向同源物显示出与参考Cop m2蛋白(如SEQ ID NO:1所示)超过90%的相同性,并且粘液瘤、臭鼬、科蒂亚鼠和田鼠痘病毒的那些分别示出与CopVV m2蛋白50%、74%、70%和72%的序列相同性,如表1所示。

[0075] 表1提供了天然背景中包含M2L基因座的多种痘病毒的基因组序列的Genbank登录号以及它们的m2蛋白相对于Cop m2蛋白(Uniprot的登录号P21092以及SEQ ID NO:1)的氨基酸相同性的标示的概述。

属	痘病毒名称	Genbank 参考	%蛋白质相同性
[0076] 正痘病毒属	痘苗病毒	AAA48004.1	100
	兔痘病毒	AAS49736.1	100
	马痘病毒	ABH08137.1	99
	牛痘病毒	ADZ29155.1 和 SNB53780.1	99 和 92
	猴痘病毒	AAY97225.1	98
	重型天花(Variola major)	AAA60767.1	97
	沙鼠痘病毒	ABD97599.1	97
	骆驼痘病毒	AAL73736.1	96
	浣熊痘病毒	AKJ93661.1	75

[0077]		臭鼬痘病毒	AOP31509.1	74
		田鼠痘病毒	AOP31720.1	72
	未分类	科蒂亚鼠病毒	AFB76918.1	70
	Centapoxvirus	约卡痘病毒	AEN03759.1	60
		摩尔曼斯克痘病毒	AST09387.1	58
	兔痘病毒属	兔纤维瘤病毒	AAF18030.1	50
		粘液瘤病毒	AAF15042.1	50
	未分类	北棕蝠痘病毒	ASK51372.1	34
	亚塔痘病毒属	特纳河痘病毒	ABQ43480.1	32
		亚巴样病病毒(Yaba-like disease virus)	CAC21247.1	29
	未分类 鹿痘病毒属	鹿痘病毒(W-1170-84)	ABI99004.1	28
	未分类	鹿痘病毒(白尾鹿痘(White-tailed deer pox))	AUI80579.1	28

[0078] 为清楚起见,本文使用的基因命名法将痘病毒M2L基因座和编码的m2蛋白指定为痘苗病毒的(更具体地为Copenhagen株的)。除非另外指明,其在本文中也用于含有与本文所提及的那些功能上等同的M2L基因和M2蛋白的其它痘病毒。实际上,根据痘病毒科、属和株,基因和相应的基因产物命名可有所不同,但是痘苗病毒和其它痘病毒之间的对应关系通常可在文献中获得。为进行示意性的说明,VV M2L基因的等同物在粘液瘤基因组中命名为M154L,在牛痘基因组中为CPXV040或P2L,在猴痘基因组中为O2L,在兔痘基因组中为RPXV023,并且在天花病毒基因组中为O2L或Q2L。

[0079] 然而,几种痘病毒,如减毒痘苗病毒MVA(经修饰痘苗病毒安卡拉株)和伪牛痘病毒(PCPV)的基因组在天然背景中缺乏M2L基因座(Antoine等,1998,Virology 244(2)365-96),这是由于在减毒过程期间发生了大的基因组缺失。在本发明的上下文中,术语“痘病毒”不包括这样的痘病毒:其在天然背景中具有涵盖M2L基因座(或等同物)的基因组缺失或突变,其因此缺乏m2多肽或者编码非功能性m2蛋白,如伪牛痘病毒(PCPV)、MVA和NYVAC病毒。

[0080] 在一个实施方式中,本发明的经修饰痘病毒由脊椎动物痘病毒亚科生成或获得,该脊椎动物痘病毒亚科优选选自禽痘病毒属、山羊痘病毒属、兔痘病毒属、软疣痘病毒属、正痘病毒属、副痘病毒属、猪痘病毒属、鹿痘病毒属和亚塔痘病毒属。这些痘病毒的基因组序列是本领域可得的,特别是在专门的数据库如Genbank或Refseq中。

[0081] 在一个优选的实施方式中,经修饰痘病毒由正痘病毒属生成或获得。虽然可使用任何正痘病毒,但其优选选自痘苗病毒(VV)、牛痘(CPXV)、浣熊痘(RCN)、兔痘、猴痘、马痘、田鼠痘、臭鼬痘、天花病毒(或天花)和骆驼痘。特别优选的是痘苗病毒。在本发明的上下文中,任何痘苗病株(除了MVA)都是合适的,包括但不限于Western Reserve(WR)、Copenhagen(Cop)、Lister、LIVP、Wyeth、Tashkent、Tian Tan、Brighton、Ankara、LC16M8、LC16M0株等,其中特别优选Lister、WR、Copenhagen和Wyeth株。其基因组序列可在文献和Genbank中获得(例如以登录号AY678276(Lister)、M35027(Cop)、AF095689.1(Tian Tan)和AY243312.1(WR))。这些病毒也可以获自病毒保藏物(例如对于WR为ATCC VR-1354,对于Wyeth为ATCC VR-1536,且对于Lister为ATCC VR-1549)。

[0082] 在另一个实施方式中,经修饰痘病毒生成或获自兔痘病毒属,优选粘液瘤病毒(其基因组序列在Genbank中以登录号NP_051868.1公开)。粘液瘤病毒中的M2L直向同源基因座被命名为M154L基因座,并且编码所谓的gp120样蛋白,该gp120样蛋白具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列并且显示与Cop编码的m2蛋白(SEQ ID NO:1)的50%相同性。

[0083] 缺陷性m2功能

[0084] 如上所述,m2蛋白不能结合CD80和/或CD86共刺激配体可能源于M2L基因座中的遗传削弱或者源于直接或间接地损害m2功能的异常相互作用。具体地,“缺陷性m2功能”是指与天然m2蛋白(例如,m2阳性痘病毒感染的细胞的上清液中所见)相比,结合CD80(例如人)和CD86(例如人)的能力下降至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%,或甚至完全不能结合CD80和CD86,如由常规测定如竞争ELISA测定所测量。

[0085] 可以使用常规分子技术通过本领域的技术人员已知的多种方式,将经修饰痘病毒工程化成使得m2功能有缺陷。在一个优选的实施方式中,经修饰痘病毒在天然M2L基因座中包含至少一个遗传削弱,其导致病毒对m2蛋白的表达受抑制。此类遗传削弱包括m2编码序列内或控制M2L表达的调控元件中的部分或全部缺失和/或一个或多个非沉默突变(转译为 一个或多个氨基酸残基的变化)。所述遗传削弱优选导致缺陷型m2蛋白的合成(不能确保如上所述的天然蛋白的活性)或导致缺乏m2合成(根本没有蛋白质)。例如,所述遗传削弱是M2L基因座的部分或全部缺失,例如从m2编码序列的上游延伸至m2编码序列的至少100个密码子的部分缺失。另选地或组合地,可以通过点突变(例如在编码序列内引入终止密码子)、移码突变(以便修饰阅读框)、插入突变(通过插入破坏编码序列的一个或多个核苷酸),或通过使参与或负责CD80和/或CD86结合功能的一个或多个残基缺失或取代或它们的任何组合来修饰M2L基因座。而且,可以在编码序列内引入外源核酸以破坏m2开放阅读框。而且,可使基因启动子缺失或突变,从而抑制M2L表达。本领域的技术人员基于本公开内容,通过比较野生型和突变m2蛋白结合CD80和/或CD86的能力,将容易地确定特定修饰是否在功能上使m2失活,如实施例部分中所示。

[0086] 其它痘病毒修饰

[0087] 在一个实施方式中,本发明的经修饰痘病毒在M2L基因座以外的区域中被进一步修饰。在本发明的上下文中,可以设想出多种额外的修饰。

[0088] 与没有此类修饰的痘病毒相比,本发明涵盖的一种或多种额外修饰影响例如溶瘤活性(例如,分裂细胞中改善的复制)、安全性(例如,肿瘤选择性)和/或病毒诱导的免疫力。示范性修饰优选涉及参与DNA代谢、宿主毒力或IFN途径的病毒基因(参见例如Guse等,2011,Expert Opinion Biol.Ther.11(5):595-608)。

[0089] 特别适于破坏的基因是胸苷激酶(tk)编码基因座(J2R;Genbank登录号AAA48082)。tk酶参与脱氧核糖核苷酸的合成。tk是正常细胞中病毒复制所需的,因为这些细胞通常具有低浓度的核苷酸,而其在含有高核苷酸浓度的分裂细胞中却是非必要的。此外,已知tk缺陷型病毒对肿瘤细胞的选择性提高。在一个实施方式中,经修饰痘病毒在J2R基因座被进一步修饰(优选导致病毒tk蛋白的表达受抑制的修饰),从而产生对m2和tk功能均有缺陷的经修饰痘病毒(m2-tk-痘病毒)。在本发明的上下文中考虑了所述J2R基因座的部分或完全缺失以及外源核酸在J2R基因座中的插入以使tk功能失活。此类经修饰m2-tk-痘病毒理想地是溶瘤的。

[0090] 可替代地或与之组合地,经修饰痘病毒可以在I4L和/或F4L基因座/基因位点被进一步修饰(优选导致病毒核糖核苷酸还原酶(rr)蛋白的表达受抑制的修饰),从而产生对m2和rr功能均有缺陷的经修饰痘病毒(m2和rr-缺陷型痘病毒)。在天然背景中,该酶催化核糖核苷酸还原成脱氧核糖核苷酸,代表了DNA生物合成中的关键步骤。该病毒酶的亚基结构与哺乳动物酶相似,由两个异源亚基(分别由I4L和F4L基因座编码的R1和R2设计而成)构成。多种痘病毒基因组中的I4L和F4L基因的序列及它们的位置可在公用数据库中获得(参见例如W02009/065546)。在本发明的上下文中,可以将痘病毒在I4L基因(编码r1大亚基)或F4L基因(编码r2小亚基)或两者中修饰以提供rr-缺陷型痘病毒,例如通过部分或完全缺失所述I4L和/或F4L基因座/基因位点。此类经修饰m2-rr-痘病毒理想地是溶瘤的。

[0091] 还提供了在J2R和I4L/F4L基因位点被进一步修饰的经修饰痘病毒(M2L、J2R和I4L基因位点;M2L、J2R和F4L基因位点,或M2L、J2R、I4L和F4L基因位点中具有修饰的三重缺陷型病毒),从而产生对m2、tk和rr活性有缺陷的经修饰痘病毒(m2-、tk-rr-痘病毒)。此类经修饰tk-rr-和m2-痘病毒理想地是溶瘤的。

[0092] 在一个优选的实施方式中,此类双重和三重缺陷型痘病毒优选源自以上关于m2缺陷型痘病毒描述的正痘病毒属或兔痘病毒属。特别优选的是除了MVA之外的溶瘤痘苗病毒,特别优选Lister、WR、Copenhagen、Wyeth株。对于tk和m2活性以及对于tk、rr和m2活性有缺陷的VV是特别优选的,尤其是用于刺激或改善免疫应答(例如针对抗原或其表位的淋巴细胞介导的应答)或用于治疗如本文所述的增生性疾病。

[0093] 其它合适的额外修饰包括导致一种或多种选自病毒血凝素(A56R);丝氨酸蛋白酶抑制剂(B13R/B14R)、补体4b结合蛋白(C3L)、VGF编码基因和干扰素调节基因(B8R或B18R)的病毒基因产物的表达受抑制的那些。另一种合适的修饰包括使F2L基因座失活,从而导致参与维持DNA复制的保真度和提供用于通过胸苷酸合酶产生TMP的前体两者的病毒dUTPase(脱氧尿苷三磷酸酶)的表达受抑制(W02009/065547)。

[0094] 就M2L而言,本文所用的基因命名是Cop VV株的。除非另外指明,其还在本文用于其它痘病毒科的同源基因,本领域的技术人员可获得Copenhagen和其它痘病毒之间的对应关系。

[0095] 在又一个实施方式中,本发明的经修饰痘病毒是溶瘤的。如本文所用,术语“溶瘤”是指痘病毒在分裂细胞(例如增殖细胞,如癌细胞)中选择性复制的能力,目的是在体外或体内减缓所述分裂细胞的生长和/或裂解所述分裂细胞,同时非分裂(例如正常或健康)细胞中显示无复制或最小复制。“复制(Replication)”(或任何形式的复制(replication),如“复制(replicate)”和“复制(replicating)”等)意指在核酸水平上或优选在感染性病毒颗粒水平上发生的病毒复制。术语“感染性(infectious)”(或任何形式的感染性(infectious),如感染(infect)、感染(infecting)等)表示病毒感染并进入宿主细胞或对象的能力。典型地,溶瘤痘病毒含有包装成病毒颗粒(包膜和/或有包膜基因组)的病毒基因组,尽管在本发明的上下文中该术语也可涵盖病毒基因组(例如基因组DNA)或其部分。

[0096] 重组m2缺陷型痘病毒

[0097] 在一个实施方式中,本发明的经修饰痘病毒是重组体。

[0098] 术语“重组体”表示痘病毒被工程化成表达至少一种外源核酸(也称为重组基因、转基因或核酸)。在本发明的上下文中,插入痘病毒基因组中的“外源核酸”在天然存在的痘

病毒基因组中没有发现或不由其表达。然而,外源核酸可以与重组痘病毒引入到其中的对象同源或异源。更具体地,其可以是或不是人类来源的(例如,除了痘病毒以外的细菌、酵母或病毒来源)。有利地,所述重组核酸编码多肽,或者是能够至少部分地(通过杂交)结合至存在于患病细胞中的互补细胞核酸(例如,DNA、RNA、miRNA)的核酸序列,目的在于抑制所述疾病涉及的基因。此类重组核酸可为天然基因或其部分(例如cDNA),或通过突变、缺失、取代和/或添加一个或多个核苷酸获得的其任何变体。

[0099] 在一个实施方式中,重组核酸编码在适当地施用于对象时具有治疗或预防意义的多肽(即治疗意义的多肽),导致对治疗的病理状况的过程或症状的有益效果。可以设想大量的治疗意义的多肽。在一个优选的实施方式中,本文所述的经修饰痘病毒被工程化成表达至少一种选自抗原多肽(例如肿瘤相关的或疫苗抗原)、具有核苷/核苷酸库调节功能的多肽以及免疫调节多肽的多肽。编码可检测基因产物的重组修饰痘病毒也可用于本发明的上下文中。如本文所用,“工程化”是指在适当的调控元件的控制下,将一种或多种外源核酸插入病毒基因组中的合适基因座处(例如代替J2R基因座),以允许所述外源核酸在宿主细胞或生物体中的表达。

[0100] 免疫调节多肽

[0101] 在一个实施方式中,本文所述的经修饰痘病毒被工程化成表达至少一种免疫调节多肽。术语“免疫调节多肽”是指靶向信号传导途径的组分的多肽,其可以直接或间接地参与调节免疫应答。“调节”免疫应答是指免疫系统的细胞或者此类细胞(例如T细胞)的活性的任何改变。此类调节包括对免疫系统的刺激或抑制,其可表现为多种细胞类型的数量增加或减少、这些细胞的活性增加或减少、或在免疫系统内可能发生的任何其它变化。优选地,此类多肽能够至少部分地下调抑制途径(拮抗剂)和/或至少部分上调刺激途径(激动剂);特别是抗原递呈细胞(APC)或癌细胞与效应T细胞之间存在的免疫途径。

[0102] 用于由本文所述的经修饰痘病毒表达的免疫调节多肽可在T细胞介导的免疫的任何步骤起作用,包括抗原特异性细胞的克隆选择、T细胞活化、增殖、输送至抗原和炎症位点、通过细胞因子和膜配体执行直接效应子功能和信号传导。这些步骤中的每者均通过平衡微调响应的刺激和抑制信号来调节。

[0103] 在文献中描述了合适的免疫调节多肽以及使用它们的方法。示例性免疫调节多肽包括但不限于细胞因子、趋化因子、配体和抗体或它们的任何组合。本发明涵盖编码多于一种免疫调节多肽(例如细胞因子和抗体;细胞因子和配体;两种细胞因子;两种免疫检查点抗体;细胞因子、配体和抗体;抗体和两种细胞因子;等)的经修饰并优选溶瘤痘病毒。

[0104] 在一个实施方式中,由本文所述的经修饰痘病毒表达的免疫调节多肽是优选选自IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-36、IFN α 、IFN γ 和巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的细胞因子。

[0105] 在另一个实施方式中,由本文所述的经修饰痘病毒表达的免疫调节多肽是优选选自MIP I α 、IL-8、CCL5、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL12、CCL2、CCL19和CCL21的趋化因子。

[0106] 在又一个实施方式中,由本文所述的经修饰痘病毒表达的免疫调节多肽可独立地选自肽(例如肽配体)、天然受体和抗体的可溶性结构域。在本发明的上下文中特别适当的

是特异性地结合优选选自CD3、4-1BB、GITR、OX40、CD27、CD40、PD1、PDL1、CTLA4、Tim-3、BTLA、Lag-3和Tigit的免疫检查点蛋白的抗体。

[0107] 术语“特异性结合”是指即使在其它蛋白质和生物制品的异源群体的存在下,对特定靶标或表位的结合特异性和亲和力的能力。因此,在指定的测定条件下,抗体优先与其靶标结合,并且不以显著量与测试样品或对象中存在的其它组分结合。优选地,此类抗体以等于或低于 1×10^{-6} M(例如至少 0.5×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-10} 等)的平衡解离常数示出与其靶标的高亲和力结合。评价抗体与其靶标的结合能力的标准测定法是本领域已知的,包括例如ELISA、Western印迹、RIA和流式细胞术。

[0108] 在本发明的上下文中,“抗体”(“Ab”)以最广泛的意义使用并且涵盖天然存在的抗体和由人工程化的那些;包括合成、单克隆、多克隆抗体以及全长抗体以及它们的片段、变体或融合物,条件是此类片段、变体或融合物保留与靶蛋白的结合特性。此类抗体可为任何来源的;人或非人(例如啮齿动物或骆驼抗体)或嵌合的。非人抗体可以通过重组方法人源化,以降低其在人中的免疫原性。抗体可以衍生自任何公知的同种型(例如IgA、IgG和IgM)和IgG的任何亚类(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。另外,它可为糖基化的、部分糖基化的或非糖基化的。除非上下文另外指明,术语“抗体”还包括任何前述抗体的抗原结合片段,并且包括单价和二价片段以及单链抗体。术语抗体还包括多特异性(例如双特异性)抗体,只要其表现出与亲本抗体相同的结合特异性。针对候选抗体的结合特性进行筛选在技术人员的技术范围内。

[0109] 为进行示意性的说明,全长抗体是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链包含重链可变区(VH)以及由三个CH1、CH2和CH3结构域构成的重链恒定区(最终在CH1和CH2之间具有铰链)。每条轻链包含轻链可变区(VL)和含有一个CL结构域的轻链恒定区。VH和VL区包括三个称为互补性决定区(CDR)的高变区,按以下顺序散布有四个称为框架区(FR)的保守区:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重链和轻链的CDR区是结合特异性的决定因素。如本文所用,“人源化抗体”是指非人(例如小鼠、骆驼、大鼠等)抗体,其蛋白质序列已被修饰成提高其与人抗体(即在人中天然产生)的相似性。人源化方法是本领域中公知的,并且通常通过取代FR区的一个或多个残基以看起来像人免疫球蛋白序列进行,而可变区(尤其是CDR)的绝大多数残基未经修饰并且对应于非人免疫球蛋白的那些。“嵌合抗体”包含一个物种的一个或多个元件和另一物种的一个或多个元件,例如,包含人免疫球蛋白的恒定区(Fc)的至少一部分的非人抗体。

[0110] 抗原结合片段的代表性实例是本领域已知的,包括Fab、Fab'、F(ab')₂、dAb、Fd、Fv、scFv、ds-scFv和双抗体。特别可用的抗体片段是单链抗体(scFv),其包含Fv片段的两个结构域VL和VH,它们融合在一起,最终用接头形成单一蛋白质链。

[0111] 在一个实施方式中,由本文所述的经修饰痘病毒表达的抗体是单克隆抗体或单链抗体,其与T细胞表面的分子,优选与参与T细胞活化的调节的免疫抑制受体特异性地结合。除了结合能力之外,此类抗体还能够抑制所述免疫抑制受体的生物活性。

[0112] 特别优选的实施方式涉及表达与PD-L1或CTLA4特异性结合并优选抑制此类受体的生物活性,特别地通过抑制与共刺激CD80和/或CD86配体的相互作用的拮抗抗体的经修饰且优选溶瘤痘病毒。

[0113] 在一个优选的实施方式中,由本文所述的重组修饰痘病毒表达的拮抗抗体是特异

性结合哺乳动物CTLA-4(例如人CTLA-4)并抑制其递送免疫抑制信号(例如通过阻断CTLA-4与CD80和CD86配体的结合)的能力的抗CTLA-4抗体。

[0114] 在其基因组中携带M2L基因座的常规痘病毒的情况下,表达的抗CTLA-4抗体将用于抑制CTLA-4介导的免疫抑制信号,而原位产生的M2蛋白将与CD80和CD86配体相互作用,从而降低或抑制CD28介导的共刺激信号。相比之下,本文所述的缺乏m2功能的抗CTLA-4表达修饰(即m2缺陷型)痘病毒将能够抑制CTLA-4介导的免疫抑制信号并将免疫应答重定向至CD28介导的共刺激信号。

[0115] 多种抗CTLA-4抗体在本领域中是可获得的(参见例如US 8,491,895、W02000/037504、W02007/113648、W02012/122444和W02016/196237等所述的那些),并且它们中的许多已经在最近十年被FDA批准或者正处于高级临床开发中。可用于本公开的抗CTLA-4抗体的代表性实例例如由Bristol Myer Squibb以Yervoy®出售的伊匹单抗(参见例如US 6,984,720;US 8,017,114)、MK-1308(Merck)、AGEN-1884(Agenus Inc.;W02016/196237)和替西木单抗(AstraZeneca;US 7,109,003和US 8,143,379)以及单链抗CTLA4抗体(参见例如W097/20574和W02007/123737)。

[0116] 优选的实施方式涉及(i)修饰(并优选溶瘤)痘病毒,优选编码抗CTLA-4抗体的对m2和tk功能均有缺陷(由M2L和J2R基因位点中的失活突变所致)的溶瘤痘苗病毒;(ii)修饰(并优选溶瘤)痘病毒,优选编码抗CTLA-4抗体的m2和rr活性有缺陷(由M2L基因座和I4L和/或F4L基因中的失活突变所致)的溶瘤痘苗病毒,以及(iii)修饰(并优选溶瘤)痘病毒,优选编码抗CTLA-4抗体的m2、tk和rr活性有缺陷(由M2L、J2R和I4L/F4L基因位点中的失活突变所致)的溶瘤痘苗病毒。

[0117] 在某些实施方式中,抗CTLA-4抗体是伊匹单抗。

[0118] 在某些实施方式中,抗CTLA-4抗体是替西木单抗。

[0119] 适于由本文所述的经修饰痘病毒表达的免疫调节多肽的另一个优选实例由特异性结合PDL-1(程序性死亡配体-1)并抑制其生物活性的抗体表示。PD-1/PD-L1受体/配体复合物的形成导致对CD8+T细胞的抑制,并因此导致对免疫应答的抑制。PD-L1是PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体之一(另一种是PD-L2),其在与PD-1结合时使T细胞活化以及细胞因子分泌下调。完整的人PD-L1序列可以在GenBank登录号Q9NZQ7下找到。

[0120] 拮抗剂抗PD-L1抗体在本领域可得自多种供应商,如Merck、sigma Aldrich和Abcam,并且一些已被FDA批准或处于高级后期临床开发中。可用于本公开的抗PD-L1抗体的代表性实例例如BMS-936559(由Bristol Myer Squibb开发,也称为MDX-1105;W02013/173223)、阿特珠单抗(atezolizumab)(由Roche开发;也称为TECENTRIQ®;US8,217,149)、德瓦鲁单抗(durvalumab)(AstraZeneca;也称为EVIFINZI™;W02011/066389)、MPDL3280A(由Genentech/Roche开发)以及阿维单抗(avelumab)(由Merck和Pfizer以商品名Bavencio开发;W02013/079174)、STI-1014(Sorrento;W02013/181634)和CX-072(Cytomx;W02016/149201)。基于可用文献中公开的信息,可根据标准技术来克隆或分离相应的核苷酸序列。

[0121] 优选的实施方式涉及(i)修饰(并优选溶瘤)痘病毒,优选编码抗PD-L1抗体的对m2和tk功能均有缺陷(由M2L和J2R基因位点中的失活突变所致)的溶瘤痘苗病毒;(ii)修饰(并优选溶瘤)痘病毒,优选编码抗PD-L1抗体的m2和rr活性有缺陷(由M2L基因座和I4L和/

或F4L基因中的失活突变所致)的溶瘤痘苗病毒,以及(iii)修饰(并优选溶瘤)痘病毒,优选编码抗PD-L1抗体的m2、tk和rr活性有缺陷(由M2L、J2R和I4L/F4L基因位点中的失活突变所致)的溶瘤痘苗病毒。

[0122] 在某些实施方式中,抗PD-L1抗体是阿特殊单抗。

[0123] 在某些实施方式中,抗PD-L1抗体是德瓦鲁单抗。

[0124] 在某些实施方式中,抗PD-L1抗体是阿维单抗。

[0125] 其它实施方式涉及(i)修饰并优选溶瘤痘病毒,优选编码抗CTLA-4抗体和抗PD-L1抗体的对m2和tk功能均有缺陷(由M2L和J2R基因位点中的失活突变所致)的溶瘤痘苗病毒;(ii)修饰并优选溶瘤痘病毒,优选编码抗CTLA-4抗体和抗PD-L1抗体的m2和rr活性有缺陷(由M2L基因座和I4L和/或F4L基因中的失活突变所致)的溶瘤痘苗病毒,以及(iii)修饰并优选溶瘤痘病毒,优选编码抗CTLA-4抗体和抗PD-L1抗体的m2、tk和rr活性有缺陷(由M2L、J2R和I4L/F4L基因位点中的失活突变所致)的溶瘤痘苗病毒。

[0126] 在某些实施方式中,抗CTLA-4抗体是伊匹单抗,并且抗PD-L1抗体是阿维单抗。

[0127] 抗原多肽

[0128] 术语“抗原的”是指在引入有编码具备抗原性的多肽的本文所述重组痘病毒的对象中诱导或刺激可测量免疫应答的能力。针对由所述重组痘病毒表达的抗原多肽而刺激或诱导的免疫应答可为体液的和/或细胞的(例如,产生了参与效应免疫细胞活化的抗体、细胞因子和/或趋化因子)。刺激或诱导的免疫应答通常有助于施用的对象中的保护效应。在本领域中可获得大量的直接或间接生物测定法,以在体内(动物或人对象)或在体外(例如在生物样品中)评价多肽的抗原性质。例如,特定抗原刺激先天免疫的能力可以通过例如NK/NKT-细胞的测量(例如活化的代表性水平)以及IFN相关细胞因子和/或趋化因子产生级联、TLR(Toll样受体)和先天免疫的其它标记的活化来进行(Scott-Algara等,2010PLOS One 5(1),e8761;Zhou等,2006,Blood 107,2461-2469;Chan,2008,Eur.J.Immunol.38,2964-2968)。特定抗原刺激细胞介导的免疫应答的能力可例如通过如下方式进行:使用常规生物测定,对活化T细胞(包括衍生自CD4+和CD8+T细胞的那些)产生的细胞因子进行定量(例如,通过ELISpot,通过多参数流式细胞术、ICS(细胞内细胞因子染色),通过细胞因子特征分析使用复用技术或ELISA,对T细胞进行表征和/或定量);测定T细胞的增殖能力(例如,通过³H胸腺嘧啶核苷掺入试验进行T细胞增殖测定);测定致敏对象中抗原特异性T淋巴细胞的细胞毒能力;或通过流式细胞术和通过如本文所述的适当动物模型的免疫来鉴定淋巴细胞亚群。

[0129] 预期术语抗原多肽涵盖天然抗原及其片段(例如表位、免疫原性结构域等)和变体,条件是此类片段或变体能够作为免疫应答的靶标。用于本文的优选的抗原多肽是肿瘤相关抗原。选择适于治疗特定病理状况的一种或多种抗原多肽在技术人员的范围之内。

[0130] 在一个实施方式中,由重组修饰痘病毒编码的抗原多肽是与癌症相关和/或充当癌症标记的癌抗原(也称为肿瘤相关抗原或TAA)。癌抗原涵盖多种类别的多肽,例如在健康细胞中正常沉默(即不表达)的那些,仅以低水平或在分化的某些阶段表达的那些以及暂时表达的那些,如胚胎和胎儿抗原,以及由细胞基因突变产生的那些,如致癌基因(例如活化ras致癌基因)、原癌基因(例如ErbB家族),或染色体易位产生的蛋白。

[0131] 许多肿瘤相关抗原是本领域已知的。示例性肿瘤抗原包括但不限于结肠直肠相关

抗原(CRC)、癌胚抗原(Carcinoembryonic Antigen)(CEA)、前列腺特异性抗原(Prostate Specific Antigen)(PSA)、BAGE、GAGE或MAGE抗原家族、p53、粘蛋白抗原(例如MUC1)、HER2/neu、p21ras、hTERT、Hsp70、iNOS、酪氨酸激酶、间皮素、c-erbB-2、甲胎蛋白、AM-1等以及它们的任何免疫原性表位或变体。

[0132] 肿瘤相关抗原还可以涵盖在癌细胞的癌发生过程期间出现的新表位/抗原,并且包括相对于相应野生型抗原而言氨基酸残基的一个或多个突变。通常,其存在于获自患者的癌细胞或组织中,但不存在于获自患者或健康个体的正常细胞或组织的样品中。

[0133] 肿瘤相关抗原还可以涵盖由能够在对象(尤其是慢性感染的对象)中诱导恶性状况的病原生物体如RNA和DNA肿瘤病毒(例如人乳头瘤病毒(human papillomavirus)(HPV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus)(HCV)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)(HBV)、巴二氏病毒(Epstein Barr virus)(EBV)等)和细菌(例如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*))编码的抗原。

[0134] 在另一个实施方式中,由重组修饰痘病毒编码的抗原多肽是疫苗抗原,当将其递送给人或动物对象时,目的是治疗性或预防性地防治感染性疾病。许多疫苗抗原是本领域已知的。示例性疫苗抗原包括但不限于细胞抗原、病毒、细菌或寄生虫抗原。细胞抗原包括粘蛋白1(MUC1)糖蛋白。病毒抗原包括例如来自于甲、乙、丙、丁、戊型肝炎病毒、免疫缺陷病毒(immunodeficiency viruses)(例如HIV)、疱疹病毒(herpes viruses)、巨细胞病毒(cytomegalovirus)、水痘带状疱疹(varicella zoster)、乳头状瘤病毒(papilloma viruses)、巴二氏病毒、流感病毒(influenza viruses)、副流感病毒(para-influenza viruses)、柯萨奇病毒(coxsackie viruses)、细小核糖核酸病毒(picorna viruses)、轮状病毒(rotaviruses)、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial viruses)、鼻病毒(rhinoviruses)、风疹病毒(rubella virus)、乳多空病毒(papovirus)、腮腺炎病毒(mumps virus)、麻疹病毒(measles virus)和狂犬病病毒(rabbies virus)的抗原。HIV抗原的一些非限制性实例包括gp120 gp40、gp160、p24、gag、pol、env、vif、vpr、vpu、tat、rev、nef tat、nef。人疱疹病毒抗原的一些非限制性实例包括gH、gL gM gB gC gK gE或gD或即刻早期蛋白(Immediate Early protein),如来自HSV1或HSV2的ICP27、ICP47、ICP4、ICP36。巨细胞病毒抗原的一些非限制性实例包括gB。衍生自巴二氏病毒(EBV)的一些非限制性实例包括gp350。水痘带状疱疹病毒抗原的一些非限制性实例包括gp1、11、111和IE63。丙型肝炎病毒抗原的一些非限制性实例包括env E1或E2蛋白、核心蛋白、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、NS5b、p7。人乳头状瘤病毒(HPV)抗原的一些非限制性实例包括L1、L2、E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7。也可根据本发明使用衍生自其它病毒病原体的抗原,如呼吸道合胞病毒(例如F和G蛋白)、副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、黄病毒(flaviviruses)(例如黄热病毒(Yellow Fever Virus)、登革热病毒(Dengue Virus)、蜱传脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus)、日本脑炎病毒(Japanese Encephalitis Virus))和流感病毒细胞(例如HA、NP、NA或M蛋白)。细菌抗原包括例如来自引起TB、麻风(leprosy)的分枝杆菌(*Mycobacteria*)、肺炎球菌(*pneumocci*)、需氧革兰氏阴性菌(aerobic gram negative bacilli)、支原体(*mycoplasma*)、葡萄球菌(*staphylococcus*)、链球菌(*streptococcus*)、沙门氏菌(*salmonellae*)、衣原体(*chlamydiae*)、奈瑟氏球菌(*neisseriae*)等的抗原。寄生虫抗原多肽包括例如来自疟疾(malaria)、利什曼病(leishmaniasis)、锥虫病(trypanosomiasis)、

弓形体病 (toxoplasmosis)、血吸虫病 (schistosomiasis) 和丝虫病 (filariasis) 的抗原。

[0135] 核苷库调节剂

[0136] 在一个实施方式中, 本文所述的经修饰痘病毒在其基因组中携带一个或多个具有核苷库调节功能的重组基因。代表性实例包括但不限于胞苷脱氨酶, 特别是酵母胞苷脱氨酶 (CDD1) 或人胞苷脱氨酶 (hCD) (参见W02018/122088); 作用于代谢和免疫途径的多肽 (例如, 腺苷脱氨酶, 特别是人腺苷脱氨酶huADA1或huADA2; 参见EP17306012.0); 作用于凋亡途径的多肽; 核酸内切酶 (如限制性酶, CRISPR/Cas9) 和靶特异性RNA (例如, miRNA、shRNA、siRNA)。

[0137] 可检测基因产物

[0138] 通常, 此类多肽可通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理方式检测到, 并因此可允许鉴定宿主细胞或对象内的重组痘病毒。合适的可检测基因产物的非限制性实例包括mCherry、Emerald、可通过荧光方式检测的萤火虫荧光素酶和绿色荧光蛋白 (GFP及其增强变体e-GFP) 以及可通过比色方式检测的 β -半乳糖苷酶。

[0139] 重组基因的表达

[0140] 编码治疗意义的多肽的核苷酸序列如上文引用的那些可以通过标准分子生物学技术 (例如PCR扩增、cDNA克隆、化学合成) 使用本领域可获得的序列数据和本文提供的信息而容易地获得。例如, 用于克隆抗体、其片段和类似物的方法是本领域已知的 (参见例如Harlow和Lane, 1988, *Antibodies-A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY)。抗体编码核酸分子可以从生产杂交瘤 (例如Cole等, *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*; Alan Liss, 第77-96页)、免疫球蛋白基因文库, 或从任何可用来源中分离, 或者核苷酸序列可以通过化学合成来生成。

[0141] 此外, 重组核酸可被优化成在特定宿主细胞或对象中提供高水平表达。实际上已经观察到, 生物体的密码子使用模式是高度非随机的, 并且密码子的使用在不同宿主之间可显著不同。例如, 治疗基因可以来自细菌、病毒或低等真核生物来源, 并因此具有不适用于在高等真核细胞 (例如人) 中有效表达的密码子使用模式。通常, 密码子优化通过用一个或多个编码相同氨基酸的更频繁使用的密码子取代一个或多个与宿主生物体中很少使用的密码子相对应的“天然” (例如细菌、病毒或酵母) 密码子来进行。不必替换对应于很少使用的密码子的所有天然密码子, 因为即使部分替换也可以实现提高的表达。

[0142] 除了优化密码子使用之外, 还可以通过重组核酸序列的额外修饰来改善宿主细胞或对象中的表达。例如, 可以设想多种修饰以防止在集中区域中存在罕见的非最佳密码子的簇集和/或抑制或修饰预期负面影响表达水平的“负”序列元件。此类负序列元件包括但不限于具有非常高 (>80%) 或非常低 (<30%) 的GC含量的区域; 富AT或富GC序列段; 不稳定的正向或反向重复序列; RNA二级结构; 和/或内部隐性调控元件, 如内部TATA盒、chi位点、核糖体进入位点和/或剪接供体/受体位点。

[0143] 根据本发明, 一种或多种重组核酸分子中的每者可操作地连接至合适的调控元件, 以用于在宿主细胞或对象中表达。如本文所用, 术语“调控元件”或“调控序列”是指允许、有助于或调节编码核酸在给定宿主细胞或对象中表达的任何元件, 包括核酸或其衍生物 (即mRNA) 的增殖、复制、转录、剪接、翻译、稳定性和/或转运。如本文所用, “可操作地连接”意指被连接的元件被布置成使得它们出于其预期目的而共同起作用。例如, 如果启动子

在容许宿主细胞中实现从所述核酸分子的转录起始到终止子的转录,则启动子可操作地连接至核酸分子。

[0144] 本领域技术人员应理解,调控序列的选择可取决于如核酸本身、其所插入的病毒、宿主细胞或对象、期望的表达水平等因素。启动子是特别重要的。在本发明的上下文中,其可以组成型指导核酸分子在许多类型的宿主细胞中表达或对某些宿主细胞是特异性的(例如肝特异性调控序列)或响应于特定事件或外源因素(例如,通过温度、营养添加剂、激素等)或根据病毒周期的阶段(例如晚期或早期)而调节。还可以使用在产生步骤期间响应于特定事件或外源因素而被抑制的启动子,以便优化病毒产生并且规避所表达多肽的潜在毒性。

[0145] 痘病毒启动子特别适于通过本文所述的经修饰痘病表达重组基因。代表性实例但不限于痘苗病毒7.5K、H5R、11K7.5(Erbs等,2008,CCancer Gene Ther.15(1):18-28)、TK、p28、p11、pB2R、pA35R和K1L启动子,以及合成启动子,如Chakrabarti等人(1997,Biotechniques 23:1094-7;Hammond等,1997,J.Virol Methods 66:135-8;以及Kumar和Boyle,1990,Virology 179:151-8)所述的那些以及早期/晚期嵌合启动子。

[0146] 本领域的技术人员将理解,控制插入到痘病毒基因组中的核酸分子的表达的调控元件还可包含用于适当起始、调节和/或终止转录(例如聚腺苷酸转录终止序列)、mRNA转运(例如核定位信号序列)、加工(例如剪接信号)和稳定性(例如内含子和非编码5'和3'序列)、翻译(例如起始子Met、三联前导序列、IRES核糖体结合位点、信号肽等)的额外元件。

[0147] 当适当时,可能有利的是重组多肽包括额外的调控元件以促进其表达、运输和生物活性。例如,可以包括信号肽以促进感染细胞的分泌。信号肽通常插入在蛋白质的N末端处紧邻Met起始子之后。信号肽的选择是广泛的,并且是本领域的技术人员可获得的。还可以设想添加跨膜结构域以促进编码多肽在受感染细胞的合适膜(例如原生质膜)中的锚定。跨膜结构域通常插入在蛋白质的C末端处终止密码子之前或紧邻终止密码子。在本领域中可获得大量的多种跨膜结构域(参见例如W099/03885)。

[0148] 作为额外实例,还可以添加肽标签(通常是能够被可获得的抗血清或化合物识别的短肽序列),以用于后续表达、运输或纯化编码的基因产物。在本发明的上下文中可以使用大量的标签肽,包括但不限于PK标签、FLAG八肽、MYC标签、His标签(通常为一段4至10个组氨酸残基)和e标签(US 6,686,152)。标签肽可以独立地位于蛋白质的N-末端,或另选地在其C-末端,或另选地在内部,或者当采用若干标签时在这些位置中的任一者。可以通过免疫检测测定法使用抗标签抗体来检测标签肽。

[0149] 又如,可以改变糖基化以提高编码的基因产物的生物活性。此类修饰可以例如通过使糖基化位点内的一个或多个残基突变来实现。改变的糖基化模式可提高抗体的ADCC能力和/或它们对其靶标的亲和力。

[0150] 可以在本发明的上下文中采取的另一种方法是将本文所述的经修饰痘病毒编码的重组基因产物与外部试剂如细胞毒性剂和/或标记试剂偶联。如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指对细胞有直接毒性(例如,阻止其繁殖或生长)的化合物,如毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)。如本文所用,“标记试剂”是指可检测的化合物。标记试剂可以是自身可检测的(例如放射性同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下可以催化可检测的底物化合物的化学修饰。偶联可以通过治疗性多肽与外部试剂之

间的遗传融合进行。

[0151] 重组核酸(装备有适当的调控元件)在痘病毒基因组中的插入使用适当的限制性酶或优选通过同源重组经由常规方式进行。

[0152] 在另一方面,本发明提供了一种通过转移质粒与病毒基因组之间的同源重组来生成本文所述的经修饰痘病毒,特别是重组和溶瘤痘病毒的方法,该转移质粒包含在5'和3'侧翼于分别存在于插入位点的上游和下游的病毒序列的重组核酸(及其调控元件)。在一个实施方式中,所述方法包括生成所述转移质粒(例如,通过常规分子生物学方法)的步骤,以及将所述转移质粒特别地与包含转移质粒中存在的侧翼序列的痘病毒基因组(例如,M2L灭活病毒)一起引入合适的宿主细胞中的步骤。优选地,转移质粒通过转染引入宿主细胞,而病毒通过感染引入。

[0153] 每个侧翼病毒序列的尺寸可以变化。其通常为至少100bp且至多1500bp,优选在重组核酸的每一侧大约150至800bp,有利地180至600bp,优选200至550bp且更优选250至500bp。

[0154] 重组核酸分子可以独立地插入痘病毒基因组的任何位置处,并且插入可以通过本领域公知的常规分子生物学进行。可以考虑多种插入位点,例如在非必需病毒基因中、在基因间区中,或在痘病毒基因组的非编码部分中。J2R基因座在本发明的上下文中特别合适。如上所述,当外源核酸插入痘病毒基因组中时,插入位点处的病毒基因座可以至少部分地缺失,例如导致由完全或部分缺失的基因座编码的病毒基因产物的表达受抑制以及导致针对所述病毒功能而言的缺陷型病毒。

[0155] 在某些实施方式中,经修饰痘病毒的鉴定可以通过使用选择和/或可检测基因来促进。在优选的实施方式中,转移质粒还包含选择标记,特别优选允许在选择性培养基中(例如,在存在霉酚酸、黄嘌呤、次黄嘌呤的情况下)生长的GPT基因(编码鸟嘌呤磷酸核糖转移酶),或编码可检测基因产物如GFP、e-GFP或mCherry的可检测基因。此外,还可以考虑使用能够在所述选择或可检测基因中提供双链断裂的内切核酸酶。所述内切核酸酶可为蛋白质的形式或由表达载体表达。

[0156] 允许生成经修饰痘病毒的同源重组优选在适当的宿主细胞(例如HeLa或CEF细胞)中进行。

[0157] 痘病毒的产生

[0158] 典型地,使用常规技术,使本发明的经修饰痘病毒在合适的宿主细胞系中产生,包括在合适的条件下培养转染或感染的宿主细胞,以允许产生和回收感染性痘病毒颗粒。

[0159] 因此,在另一方面,本发明涉及用于产生本文所述的经修饰痘病毒的方法。优选所述方法包括以下步骤:a)制备生产细胞系,b)用经修饰痘病毒转染或感染所制备的生产细胞系,c)在合适的条件下培养转染或感染的生产细胞系,以允许病毒(例如感染性痘病毒颗粒)产生,d)从所述生产细胞系的培养物中回收所产生的病毒,并且任选地e)纯化所述回收的病毒。

[0160] 在一个实施方式中,生产细胞是选自以下的哺乳动物(例如人或非人)细胞:HeLa细胞(例如ATCC-CRM-CCL-2TM或ATCC-CCL-2.2TM)、HER96、PER-C6(Fallaux等,1998,Human Gene Ther.9:1909-17)和仓鼠细胞系如BHK-21(ATCC CCL-10),或禽细胞(如W02005/042728、W02006/108846、W02008/129058、W02010/130756、W02012/001075等所述的那些之

一),以及由获自受精卵的鸡胚胎制备的原代鸡胚胎成纤维细胞(CEF)。

[0161] 生产细胞优选在适当的培养基中培养,该培养基可根据需要补充或不补充血清和/或合适的生长因子(例如,优选不含动物或人衍生的产物的确定化学成分的培养基)。本领域的技术人员可以根据生产细胞容易地选择适当的培养基。此类培养基是可商购的。生产细胞优选在感染前在包括介于+30°C与+38°C(更优选大约37°C)之间的温度下培养1至8天。如果需要,可以进行1至8天的几次传代,从而增加细胞总数。

[0162] 在步骤b)中,在适当的条件下使用适当的感染复数(MOI)通过经修饰痘病毒感染生产细胞,以允许生产细胞的生产性感染。为进行示意性的说明,适当的MOI的范围为 10^{-3} 至20,特别优选MOI包括0.01至5,并且更优选0.03至1。感染步骤在与用于培养生产细胞的培养基相同或不同的培养基中进行。

[0163] 在步骤c)中,然后在本领域的技术人员公知的适当条件下培养感染的生产细胞,直到产生子代痘病毒(例如感染性病毒颗粒)。感染的生产细胞的培养也优选在与用于培养生产细胞和/或用于感染步骤的培养基/介质相同或不同的培养基中在+32°C至+37°C的温度下进行1至5天。

[0164] 在步骤d)中,从培养上清液和/或生产细胞中收集步骤c)中所产生的痘病毒。从生产细胞中回收可能需要允许生产细胞膜破裂以允许病毒释放的步骤。生产细胞膜的破裂可以通过本领域技术人员公知的多种技术诱导,包括但不限于冻/融、低渗裂解、超声处理、微流化、高剪切(也称为高速)均化或高压均化。

[0165] 然后在根据本发明按剂量分配和使用之前,可对所回收的痘病毒至少部分地纯化。本领域中可获得大量的纯化步骤和方法,包括例如澄清、酶处理(例如内切核酸酶、蛋白酶等)、层析和过滤步骤。在本领域中描述了适当的方法(参见例如W02007/147528;W02008/138533、W02009/100521、W02010/130753、W02013/022764)。

[0166] 在一个实施方式中,本发明还提供了用本文所述的经修饰痘病毒感染的细胞。

[0167] 组合物

[0168] 本发明还提供了一种包含治疗有效量的本文所述的经修饰痘病毒(活性剂)和药学上可接受的载体的组合物。此类组合物可以一次或数次并经由相同或不同的途径进行施用。

[0169] “治疗有效量”对应于足以产生一种或多种有益结果的经修饰痘病毒的量。此类治疗有效量可以作为多种参数的函数而变化,特别是施用模式;疾病状态;对象的年龄和体重;对象对治疗作出反应的能力;并行治疗的种类;治疗频率;和/或对预防或治疗的需求。当涉及预防性用途时,本发明的组合物以足以防止或者延缓尤其是处于风险的对象中的增生性疾病(如癌症)的发作和/或建立和/或复发的剂量施用。对于“治疗性”用途,将组合物以治疗疾病为目标施用于被诊断患有增生性疾病(如癌症)的对象,最终与一种或多种常规治疗模式相关联。特别地,治疗有效量可以是导致临床状态相对于基线状态或相对于预期状态(如果不治疗)可观察到的改善所必需的量,例如减少肿瘤数量;减小肿瘤尺寸,减少转移的数量或扩展,增加缓解期长度,稳定(即不恶化)疾病状态,延缓或减慢疾病进展或严重程度,改善或减轻疾病状态,延长存活,对标准治疗更好的反应,改善生活质量,降低死亡率等。例如,可以使用实验室中常规使用的技术(例如流式细胞术、组织学、医学成像)来进行肿瘤监测。

[0170] 治疗有效量也可以是导致有效的非特异性(先天)和/或特异性(适应性)免疫应答发展所必需的量。典型地,免疫应答,特别是T细胞应答的发展可以在体外、在合适的动物模型中或使用采集自对象的生物样品来评价(ELISA、流式细胞术、组织学等)。还可以使用多种可用的抗体以鉴定治疗的对象中存在的参与抗肿瘤应答的不同免疫细胞群,如细胞毒性T细胞、活化细胞毒性T细胞、自然杀伤细胞和活化自然杀伤细胞。临床状态的改善可以通过医师或其它熟练的医疗保健人员通常使用的任何相关临床测量容易地评估。

[0171] 术语“药学上可接受的载体”旨在包括与哺乳动物特别是人类对象中的施用相容的任何和所有的载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、吸收剂等。药学上可接受的载体的非限制性实例包括水、NaCl、生理盐溶液、乳酸林格氏液、糖溶液(例如葡萄糖、海藻糖、蔗糖、右旋糖等)、醇、油、明胶、碳水化合物如乳糖、直链淀粉或淀粉、脂肪酸酯、羟甲基纤维素等,并且可以使用其它生理学平衡的盐水溶液(参见例如最新版本Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins)。

[0172] 在一个实施方式中,适当地配制组合物,以确保经修饰痘病毒活性剂在制造和长期储存条件下(即至少6个月,优选至少两年)在冷冻(例如-70°C至-10°C)、冷藏(例如4°C)或环境(例如20-25°C)温度下的稳定性。此类制剂通常包括液体载体如水溶液。

[0173] 有利地,对组合物适当地缓冲以供人类使用,优选在生理或弱碱性pH(例如,从大约pH 7至大约pH 9,特别优选pH包括在7与8之间并且更特别地接近7.5)下。合适的缓冲剂包括但不限于TRIS(三(羟甲基)甲胺)、TRIS-HCl(三(羟甲基)甲胺-HCl)、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、磷酸盐缓冲剂(例如PBS)、ACES(N-(2-乙酰氨基)-氨基乙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))、MOPSO(3-(N-吗啉代)-2-羟基丙磺酸)、MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)、TES(2-[[三(羟甲基)甲基]氨基]乙磺酸)、DIPSO(3-[双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙烷-1-磺酸)、MOBS(4-(N-吗啉代)丁磺酸)、TAPSO(3-[N-三(羟甲基)甲基氨基]-2-羟基丙磺酸)、HEPPSO(4-(2-羟乙基)-哌嗪-1-(2-羟基)-丙磺酸)、POPSO(2-羟基-3-[4-(2-羟基-3-磺基丙基)哌嗪-1-基]丙烷-1-磺酸)、TEA(三乙醇胺)、EPPS(N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-3-丙磺酸)和TRICINE(N-[三(羟甲基)-甲基]-甘氨酸)。优选地,所述缓冲剂选自TRIS-HCl、TRIS、Tricine、HEPES以及磷酸盐缓冲剂,包括Na₂HPO₄与KH₂PO₄的混合物或Na₂HPO₄与NaH₂PO₄的混合物。所述缓冲剂(特别是以上提及的那些,特别是TRIS-HCl)优选以10至50mM的浓度存在。

[0174] 可能有利的是在制剂中还包含单价盐以确保适当的渗透压。所述单价盐可特别地选自NaCl和KCl,优选所述单价盐是NaCl,优选为10mM至500mM的浓度。

[0175] 该组合物还可被配制成为以便包括用于在低储存温度下保护经修饰痘病毒的防冻剂。合适的防冻剂包括但不限于蔗糖(或甘蔗糖)、海藻糖、麦芽糖、乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇和甘油,优选浓度为0.5至20%(g重量/L体积,称为w/v)。例如,蔗糖优选以5至15%(w/v)的浓度存在。

[0176] 经修饰痘病毒组合物,尤其是其液体组合物还可包含用于改善稳定性的药学上可接受的螯合剂。药学上可接受的螯合剂可特别地选自乙二胺四乙酸(EDTA)、1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、二巯基琥珀酸(DMSA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和2,3-二巯基-1-丙磺酸(DMPS)。药学上可接受的螯合剂优选以

至少50 μ M的浓度存在,特别优选50至1000 μ M的浓度。优选地,所述药学上可接受的螯合剂是以接近150 μ M的浓度存在的EDTA。

[0177] 还可以存在额外的化合物以增加经修饰痘病毒组合物的稳定性。此类额外的化合物包括但不限于C₂-C₃醇(理想地浓度为0.05至5% (体积/体积或v/v)、谷氨酸钠(理想地浓度低于10mM)、非离子表面活性剂(US7,456,009、US2007-0161085),如低于0.1%的低浓度的Tween 80(也称为聚山梨酯80)。已经发现二价盐如MgCl₂或CaCl₂诱导液体状态的多种生物制品的稳定性(参见Evans等人2004, J Pharm Sci. 93:2458-75和US7,456,009)。已经发现氨基酸,特别是组氨酸、精氨酸和/或甲硫氨酸诱导液体状态的多种病毒的稳定性(参见W02016/087457)。

[0178] 高分子量聚合物如葡聚糖或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的存在特别适合于由涉及真空干燥和冷冻干燥的过程获得的经冷冻干燥组合物,并且这些聚合物的存在有助于在冷冻干燥期间形成饼状物(参见例如W003/053463;W02006/085082;W02007/056847;W02008/114021和W02014/053571)。

[0179] 根据本发明,组合物的制剂也可适于施用模式以确保体内的适当分布或延缓释放。可使用可生物降解和生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯、聚乳酸和聚乙二醇(参见例如J.R.Robinson,“Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems”,Marcel Dekker,Inc.编著,New York,1978;W001/23001;W02006/93924;W02009/53937)。

[0180] 为进行示意性的说明,含有5% (w/v) 蔗糖、10mM谷氨酸钠和50mM NaCl的Tris缓冲制剂(Tris-HCl pH8)适于从-20 $^{\circ}$ C到5 $^{\circ}$ C保存本文所述的组合物。

[0181] 剂量

[0182] 在一个优选的实施方式中,将组合物配制成个人剂量,各剂量根据所使用的定量技术含有约10³至10¹²vp(病毒颗粒)、iu(感染单位)或pfu(噬斑形成单位)的经修饰痘病毒。样品中存在的病毒的量可以通过常规滴定技术来测定,例如通过计数在容许性细胞(例如HeLa细胞)感染后的噬菌斑的数量以获得噬斑形成单位(pfu)滴度,通过测量A260吸光度(vp滴度),或还通过使用抗病毒抗体的定量免疫荧光(iu滴度)。根据相关情况,医师可以常规地作出调整一个对象或一组对象的适当剂量所必需的计算的进一步细化。作为一般性指导,适于痘病毒组合物的个人剂量包含大约10³至大约10¹²pfu,有利地大约10⁴pfu至大约10¹¹pfu,优选大约10⁵pfu至大约10¹⁰pfu;并且更优选大约10⁶pfu至大约10⁹pfu,并且特别大约10⁶、5 \times 10⁶、10⁷、5 \times 10⁷、10⁸或5 \times 10⁸pfu的个人剂量是尤其优选的。

[0183] 施用

[0184] 任何常规施用途径适用于本发明的上下文,包括肠胃外、局部或粘膜途径。肠胃外途径旨在以注射或输注施用并且涵盖全身以及局部途径。可用于施用痘病毒组合物的肠胃外注射类型包括静脉内(进入静脉)、血管内(进入血管)、动脉内(进入动脉如肝动脉)、真皮内(进入真皮)、皮下(在皮肤下)、肌肉内(进入肌肉)、腹膜内(进入腹膜)和瘤内(进入肿瘤或其附近)以及划破。施用可以是单一推注剂量的形式,或者可以例如通过连续输液泵。粘膜施用包括但不限于口服/消化道、鼻内、气管内、肺内、阴道内或直肠内途径。局部施用也可以使用透皮方式(例如贴剂等)进行。优选地,经修饰痘病毒组合物被配制用于在肿瘤内或在其附近经静脉内或瘤内施用。

[0185] 施用可以使用常规注射器和针(例如Quadrafuse注射针)或本领域可用的能够促进或改善经修饰痘病毒在对象中的递送的任何化合物或装置(例如用于促进肌内施用的电穿孔)。一种替代方案是使用无针注射装置(例如Biojector™装置)。也可以设想透皮贴剂。

[0186] 本文所述的组合物适用于单次施用或一系列施用。还可以经由在休息期后重复的顺序施用周期进行。每次施用之间的间隔可为三天至约六个月(例如,24h、48h、72h、每周、每两周、每月或每季度等)。间隔也可为不规则的。每次施用的剂量可以在上述范围内变化。优选的治疗方案涉及每周施用2至10次,可能之后以更长的间隔(例如3周)施用痘病毒组合物2至15次。

[0187] 使用本发明的m2缺陷型痘病毒和组合物的方法

[0188] 在另一方面,本文所述的组合物用于根据本文所述的模式治疗或预防增生性疾病。因此,本发明还提供了治疗方法,包括将所述组合物以足以治疗或预防此类疾病的量施用于有此需要的对象(优选患有癌症的对象);以及抑制肿瘤细胞生长的方法,包括将组合物施用于对象。在本发明的上下文中,本文所述的方法和用途旨在减慢、治愈、改善或控制增生性疾病的发生或进展。

[0189] 如本文所用,术语“增生性疾病”涵盖不受控制的细胞生长和扩散所致的一大类多种疾病,包括癌症以及与增加的破骨细胞活性相关的疾病(例如,类风湿性关节炎、骨质疏松等)和心血管疾病(例如,由血管壁平滑肌细胞增殖所导致的再狭窄)。不受调控的细胞分裂和生长可导致侵入邻近组织的恶性肿瘤的形成,并且还可通过淋巴系统或血流转移至身体的远端部位。术语“癌症”可与术语“肿瘤”、“恶性肿瘤”、“赘生物”等中的任一者互换使用,并且意在包括任何类型的组织、器官或细胞,任何阶段的恶性肿瘤(例如从病灶前期到IV期)并且涵盖实体瘤和血源性肿瘤以及原发性和转移性癌症。

[0190] 可以使用本发明的组合物和方法治疗的癌症的代表性实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病(leukemia),并且更具体地骨癌(bone cancer)、胃肠癌(gastrointestinal cancer)、肝癌、胰腺癌、胃癌、结肠直肠癌、食道癌(esophageal cancer)、口咽癌(oro-pharyngeal cancer)、喉癌(laryngeal cancer)、唾液腺癌(salivary gland carcinoma)、甲状腺癌(thyroid cancer)、肺癌、头或颈癌(cancer of the head or neck)、皮肤癌(skin cancer)、鳞状细胞癌(squamous cell cancer)、黑色素瘤(melanoma)、子宫癌(uterine cancer)、子宫颈癌(cervical cancer)、子宫内膜癌、外阴癌(vulvar cancer)、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌(cancer of the endocrine system)、软组织肉瘤(sarcoma of soft tissue)、膀胱癌(bladder cancer)、肾癌(kidney cancer)、恶性胶质瘤(glioblastoma)以及中枢神经系统(CNS)的多种类型等。在一个实施方式中,根据本发明的方法和用途用于治疗选自肾癌(例如透明细胞癌(clear cell carcinoma))、前列腺癌(例如激素难治性前列腺腺癌(hormone refractory prostate adenocarcinoma))、乳腺癌(例如转移性乳腺癌(metastatic breast cancer))、结肠直肠癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer))、肝癌(例如肝肿瘤(hepatocarcinoma))、胃癌、胆管癌、子宫内膜癌、胰腺癌和卵巢癌的癌症。

[0191] 通常,本文所述的组合物的施用向治疗的对象提供了治疗益处,这可以通过临床状态相对于基线状态或相对于预期状态(如果未治疗)的可观察到的改善加以证明。临床状

态的改善可以通过医师或其它熟练的医疗保健人员通常使用的任何相关临床测量容易地评估。在本发明的上下文中,治疗益处可以是短暂的(停止施用后一个月或两个月)或持续的(数月或数年)。作为可在对象间显著变化的临床状态的自然过程,不要求在每个治疗的对象中观察到治疗益处,但在显著数量的对象中观察到(例如两组之间的统计学显著差异可以通过本领域已知的任何统计学测试来确定,如Tukey参数测试、Kruskal-Wallis测试、根据Mann和Whitney的U测试、学生氏t测试(Student's t-test)、Wilcoxon测试等)。

[0192] 例如,在患有癌症的对象中的治疗益处可以例如通过肿瘤数量的减少、肿瘤尺寸的减小、转移的数量或程度的减少、缓解期长度的增加、疾病状态的稳定(即不恶化)、疾病进展速率或其严重程度降低、延长的存活、对标准治疗更好的反应、疾病的替代标记的改善、生活质量的改善、降低的死亡率和/或疾病复发的预防等来证明。

[0193] 适当的测量如血液测试、生物流体和活组织检查的分析以及医学成像技术可用于评估临床益处。它们可以在施用之前(基线)和在治疗期间和停止治疗之后的多种时间点进行。此类测量在医学实验室和医院中常规地评估,并且大量试剂盒是可商购的(例如免疫测定、定量PCR测定)。

[0194] 一个优选的实施方式涉及一种组合物,该组合物包含经修饰痘病毒,理想地溶瘤经修饰痘病毒并优选溶瘤痘苗病毒(例如Copenhagen株),特别优选如本文所述的编码抗CTLA-4抗体的溶瘤痘苗病毒,以用于治疗患有癌症,并优选肾癌、结肠直肠癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、黑素瘤和卵巢癌的对象。

[0195] 在另一个实施方式中,本文所述的经修饰痘病毒或组合物用于增强抗肿瘤适应性免疫应答或用于增强或延长抗肿瘤应答。

[0196] 在另一方面,使用或施用经修饰痘病毒或其组合物以刺激或改善治疗的对象中的免疫应答。因此,本发明还涵盖了用于刺激或改善免疫应答的方法,包括将组合物根据本文所述的模式以足以刺激或改善对象的免疫力的量施用于有此需要的对象。刺激或改善的免疫应答可以是特异性的(即针对表位/抗原)和/或非特异性的(先天)、体液和/或细胞的,特别是CD4⁺或CD8⁺介导的T细胞应答。本文所述的组合物刺激或改善免疫应答的能力可以在体外(例如使用从对象收集的生物样品)或在体内使用本领域标准的多种直接或间接测定法来评估(参见例如Coligan等,1992和1994,Current Protocols in Immunology;J Wiley&Sons Inc编著,National Institute of Health或后续版本)。以上引用的与多肽的抗原性质有关的那些也是适当的。

[0197] 特别地并且与常规(m2阳性)痘病毒相比,本文所述的经修饰痘病毒或组合物也可用于任何以下目的或它们的任何组合:

[0198] 用于刺激或改善淋巴细胞介导的免疫应答(尤其是针对抗原多肽);

[0199] 用于刺激或改善APC的活性;

[0200] 用于刺激或改善抗肿瘤应答;

[0201] 用于刺激或改善CD28信号传导途径;

[0202] 用于改善在一个被治疗的对象或者一组被治疗的对象中本文所述的经修饰痘病毒提供的治疗功效;和/或

[0203] 用于降低在一个被治疗的对象或者一组被治疗的对象中本文所述的经修饰痘病毒提供的毒性。

[0204] 联合疗法

[0205] 在一个实施方式中,本发明的经修饰痘病毒、组合物或方法被用作独立疗法。在另一个实施方式中,它们可以与一种或多种额外疗法,特别是适合于侵袭被治疗对象的癌症的类型的标准护理疗法结合使用或进行。用于不同癌症类型的标准护理疗法是本领域的技术人员公知的,并且通常公开于Cancer Network和临床实践指南中。此类一种或多种额外疗法选自手术、放射疗法、化学疗法、冷冻疗法、激素疗法、毒素疗法、免疫疗法、细胞因子疗法、癌症靶向疗法、基因疗法、光动力疗法和移植等。

[0206] 根据标准实践,在利用本文所述的经修饰痘病毒或组合物之前、之后、同时或以散布的方式利用本文所述的经修饰痘病毒或组合物,将此类额外的抗癌疗法给予对象。两种或更多种疗法的同时给予不需要同时或通过相同途径施用试剂,只要在组合物和额外抗癌疗法发挥其治疗效果期间的时间段内存在重叠即可。同时施用包括在同一天内(例如0.5、1、2、4、6、8、10、12小时)施用经修饰痘病毒组合物及其它治疗剂。尽管本发明考虑了任何顺序,优选的是经修饰痘病毒组合物在其它治疗剂之前施用于对象。

[0207] 在具体的实施方式中,本文所述的经修饰痘病毒或组合物可与手术结合使用。例如,组合物可以在部分或全部手术切除肿瘤后施用(例如,通过在例如切除的区域内局部施用)。

[0208] 在其它实施方式中,本文所述的经修饰痘病毒或组合物可与放射疗法结合使用。本领域的技术人员可以容易地制定适当的放射治疗方案和参数(参见例如Perez和Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 第2版, JB Lippincott Co; 使用本领域技术人员显而易见的适当改型和修改)。可以特别用于癌症治疗的辐射类型是本领域公知的,并且包括电子束、来自线性加速器或来自如钴或铯、质子和中子的放射源的高能光子。放射性同位素的剂量范围广泛变化,并且取决于同位素的半衰期、所发射辐射的强度和类型,以及肿瘤细胞的摄取。本发明设想了延长时间段内(3至6周)的有规律X射线剂量或高单次剂量。

[0209] 在某些的实施方式中,本文所述的经修饰痘病毒或组合物可与化学疗法结合使用。目前可用于治疗癌症的合适的化疗剂的代表性实例包括但不限于烷基化剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、铂衍生物、酪氨酸激酶受体抑制剂、环磷酰胺、抗代谢物、DNA削弱剂和抗有丝分裂剂。目前可用于治疗感染性疾病的合适的化疗剂的代表性实例尤其包括抗生素、抗代谢物、抗有丝分裂剂和抗病毒药物(例如干扰素 α)。

[0210] 在另一个实施方式中,本文所述的经修饰痘病毒或组合物可与免疫治疗剂如抗肿瘤抗体以及siRNA和反义多核苷酸结合使用。

[0211] 在又一个实施方式中,本文所述的经修饰痘病毒或组合物可与佐剂结合使用。合适的佐剂的代表性实例包括但不限于TLR3配体(Claudepierre等, 2014, J. Virol. 88 (10) : 5242-55)、TLR9配体(例如Fend等, 2014, Cancer Immunol. Res. 2, 1163-74; Carpentier等, 2003, Frontiers in Bioscience 8, e115-127; Carpentier等, 2006, Neuro-Oncology 8 (1) : 60-6; EP 1 162 982; US 7,700,569和US 7,108,844)以及PDE5抑制剂如西地那非(sildenafil) (US 5,250,534、US 6,469,012和EP 463 756)。

[0212] 在额外的实施方式中,本文所述的经修饰痘病毒或组合物可以根据激发增强方法使用,其包括顺序施用激发组合物和增强组合物。典型地,激发和增强组合物使用不同的载

体,其编码与至少一种本文所述的经修饰痘病毒相同的至少一个抗原结构域。此外,激发和增强组合物可以通过相同的施用途径或通过不同的施用途径在相同的部位或在可选的部位施用。

[0213] 根据说明书和附图以及权利要求书,本发明的其它特征、目的和优点将是显而易见的。引入以下实施例以举例说明本发明的优选实施方式。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,可以对所公开的具体实施方式

实施例

[0214] 材料和方法

[0215] 蛋白质和病毒

[0216] 在其C末端具有或不具有His标签的重组Fc融合蛋白(人类和鼠)在R&D Systems订购。人CD80-Fc和CD86-Fc使用生物素酰胺己酰基-6-氨基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(Sigma)内部生物素化。

[0217] 使用了多种痘苗病毒:

[0218] • 野生型痘苗病毒(Copenhagen、Wyeth和Western Reserve株);

[0219] • 对胸苷激酶和核糖核苷酸还原酶活性均有缺陷(tk⁻;rr⁻;描述于W02009/065546)的双重缺失痘苗病毒(Copenhagen株)。

[0220] • 对tk、rr⁻和m2活性有缺陷的三重缺失痘苗病毒(Copenhagen株)。如下文所述,通过特异性同源重组到M2L基因座的开放阅读框中,由双重缺失tk-rr⁻生成三重缺失病毒。

[0221] 除非另外指明,除痘苗病毒外,测试的所有痘病毒均为野生型株。

[0222] rr⁻、tk⁻痘苗病毒中M2L的缺失

[0223] 对于体内研究,将双重(tk-rr⁻)和三重(tk-rr⁻m2⁻)缺失痘苗病毒工程化成在p11K7.5启动子下在J2R基因座处编码萤火虫荧光素酶。

[0224] 引入VV基因组中的M2L基因缺失涵盖m2 ORF上游的64个核苷酸和m2 ORF的前169个密码子。缺失使用PUC18来源的转移质粒通过同源重组进行。此转移质粒含有被表达盒隔开的左臂(VV基因组登录号M35027的nt26980至27479)和右臂(nt28051至28550),该表达盒编码痘苗pH5R启动子控制下的选择标志物增强的绿色荧光蛋白/黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(EGFP/GPT)的融合物。使用Amaya Nucleofactor通过电穿孔将所得质粒转染到感染有编码荧光素酶的痘苗病毒(rr⁻;tk⁻/荧光素酶)的鸡胚胎成纤维细胞(CEF)中。通过EGFP/GPT选择来分离重组病毒。通过PCR分析确认M2L的缺失和EGFP/GPT盒的插入。通过使重组病毒在CEF上传代来去除EGFP/GPT选择盒而无需选择。在CEF上产生初级研究原液。M2L基因的缺失通过PCR和测序验证。

[0225] 在以MOI 0.05感染并孵育三天后,在CEF上产生病毒。在感染后三天,回收含有感染的细胞和培养上清液的粗收获物并储存于-20°C直至使用。在纯化之前,将此悬浮液匀化以释放病毒颗粒。然后通过深度过滤除去较大细胞碎片。随后通过使用切向流过滤和尺寸中空纤维微滤过滤器将澄清的病毒悬浮液浓缩并以配制物缓冲液渗滤。最后,将经纯化病毒使用相同的切向流过滤系统进一步浓缩,等分并储存于-80°C直至使用。

[0226] B7结合的ELISA测定

[0227] 将九十六孔板(Nunc immune plate Medisorp)用100 μ L在包被缓冲液(50mM碳酸钠,pH 9.6)中的0.5 μ g/mL的B7、CTLA4或CD28蛋白于4 $^{\circ}$ C下包被过夜。用PBS/0.05%Tween20洗涤微板,并用200 μ L封闭溶液(PBS;0.05%Tween20;5%脱脂奶粉(Non-Fat Dry Milk)(Biorad))饱和。所有抗体制备和稀释均在封闭溶液中进行。对于一些实验,将100 μ L的样品一式三份并且以两倍连续稀释添加至各孔中(结合曲线)。然后,将微板用100 μ L的稀释10000倍的抗Flag-HRP(Sigma)孵育。然后,将微板用100 μ L/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Sigma)孵育,并且用100 μ L 2M H₂SO₄终止反应。用酶标仪(TECAN Infinite M200PRO)在450nm下测量吸光度。将吸光度值转入软件GraphPadPrism中以用于分析和图示。

[0228] 竞争ELISA

[0229] 除非另有说明,实验条件和溶液与以上所述相同。对于CTLA4/CD80、CD28/CD80和PDL1/CD80竞争测定,将100 μ L的CTLA4、CD28和PDL1以0.25(CTLA4)或1 μ g/mL(CD28和PD-L1)包被。添加样品并在含有恒定浓度的CD80(对于CTLA4、CD28和PD-L1分别为50、250或500ng/mL)的封闭溶液中稀释(两倍连续稀释)。对于CD86/CTLA4和CD28/CD86竞争测定,将100 μ L的CD86或CD28以0.25(CD86)或2 μ g/mL(CD28)包被。添加样品并在分别含有恒定浓度的CTLA4(100ng/mL)或CD86(500ng/mL)的封闭溶液中稀释(两倍连续稀释)。将1/2000的抗His标签-HRP(Qiagen)或1/1000的链霉亲和素HRP(Southern Biotech)用作缀合试剂。如上所述,对板进一步处理,并分析结果。

[0230] Western印迹

[0231] 在含有(还原条件)或不含有(非还原条件)5% β -巯基乙醇(BME)的Laemmlie缓冲液中制备25 μ L样品。在Criterion TGX 4-15%免染凝胶(Biorad)上电泳之后,将蛋白质转移至PVDF膜(Transblot Turbo System)。iBind Flex Western系统(Invitrogen)用于蛋白质/抗体孵育和洗涤。用1/1000的抗Flag-HRP、2.5 μ g/mL CD80-Fc、CD86-Fc或CTLA4-Fc探测印迹。对于CD80-Fc、CD86-Fc和CTLA4-Fc,使用1/3000的HRP抗人Fc(Bethyl)作为缀合抗体。1X iBind Flex溶液用于封闭、稀释抗体,洗涤并润湿iBind Flex Card。使用Amersham ECL Prime Western印迹试剂来检测免疫复合物。用分子成像仪ChemiDOC XRS(Biorad)记录化学发光。

[0232] 亲和层析

[0233] 在感染后72小时收集感染有MVA或痘苗病毒Copenhagen(MOI 0.05)的CEF的上清液。将上清液离心并在0.2 μ m过滤器上过滤以去除大部分细胞碎片和痘苗病毒。然后,将补充有0.05%Tween 20的经处理上清液使用vivaspin20 30 000MWC0截留浓缩器(Sartorius)浓缩约20倍。用不相关的单克隆生物素化抗体(chCXIIIG6)、CTLA4-Fc-Biot或CD86-Fc-Biot包被链亲和素磁珠(GE healthcare)。将4mL的浓缩上清液(MVA和痘苗病毒Copenhagen)与24 μ L的chCXIIIG6-链霉亲和素珠一起孵育,以去除非特异性结合。将此第一次孵育的流过物分成2等份,并且与CTLA4-Fc-Biot-链霉亲和素珠或CD86-Fc-Biot-链霉亲和素珠一起孵育,以得到以下四个分支(arm):MVA上清液+CTLA4珠(MVA A4);MVA上清液+CD86珠(MVACD);痘苗病毒+CTLA4珠上清液(VV A4)以及痘苗病毒+CD86珠(VV CD86)。将珠用PBS、0.05%Tween20,之后PBS彻底洗涤,并且用通过添加4 μ L 2M Tris Base立即中和的50 μ L 0.1M乙酸对结合的蛋白质洗脱两次。然后在MS分析之前合并两次洗脱液。

[0234] 用于消化的蛋白制备物。

[0235] 使10或20 μ l的样品蒸发,并且通过溶解在10 μ l的含10mM DTT的25mM NH_4HCO_3 (1H, 57 $^\circ\text{C}$ 下)中进行还原。将还原的半胱氨酸残基在暗处于室温用10 μ l的含55mM碘乙酰胺的25mM NH_4HCO_3 烷基化30分钟。将新鲜稀释在25mM NH_4HCO_3 中的胰蛋白酶(12.5ng/ μ L; Promega V5111)以1:100(酶/蛋白质)的比添加到样品中至30 μ l的终体积,并在37 $^\circ\text{C}$ 下孵育5小时。通过用5 μ l的 H_2O /TFA 5%酸化来抑制胰蛋白酶的活性。

[0236] MS/MS分析.

[0237] 在与四极-轨道阱混合质谱仪(Q-Exactive plus, Thermo Scientific, San Jose, CA)联接的nanoUPLC-系统(nanoAcquity, Waters)上分析样品。UPLC系统配备有Symmetry C18预柱(20 \times 0.18mm, 5 μ m粒度, Waters, Milford, USA)和ACQUITY UPLC $\text{\textcircled{R}}$ BEH130C18分离柱(75 μ m \times 200mm, 1.7 μ m粒度, Waters)。溶剂体系由含0.1%甲酸的水(溶剂A)和含0.1%甲酸的乙腈(溶剂B)组成。注射2 μ L的各样品。在3分钟期间用99%A和1%B以5 μ L/min捕获肽。使用79分钟的1-35%B线性梯度,在60 $^\circ\text{C}$ 下以400nL/min的流速进行洗脱。为使遗留物最小化,除了在各样品之后进行的空白溶剂注射之外,在各样品之间包括柱洗涤(50%CAN持续20分钟)。

[0238] Q-Exactive Plus以正离子模式操作,源温度设定为250 $^\circ\text{C}$,喷雾电压为1.8kV。在m/z 200下的140,000的分辨率、50ms的最大注射时间和 3×10^6 电荷的AGC目标值下获得全扫描MS光谱(300-1800m/z),其中启用锁定质量选项(445.12002m/z)。每个全扫描使用2m/z窗口分离最多10个最强前体,并使用较高能量的碰撞解离(HCD, 27eV的归一化碰撞能量)使其碎裂,并且将已经碎裂的前体的动态排除设定为60秒。采用m/z200下的17,500分辨率、100ms的最大注射时间和 1×10^5 的AGC目标值获得MS/MS光谱。系统完全由XCalibur软件(v3.0.63; Thermo Fisher Scientific)控制。

[0239] MS/MS数据解释

[0240] 使用Mascot(2.5.1版, Matrix science, London, England),针对原鸡(Gallus gallus)和痘苗病毒Uniprot数据库衍生的组合靶标-诱饵数据库(01-04-2018,含有33939个靶标序列加上相同数量的反向诱饵序列)对MS/MS数据进行搜索。将靶蛋白hCTLA4、hCD86和hCXIIIG6以及靶标-诱饵手动加入数据库中。数据库包括常见污染物(人角蛋白和猪胰蛋白酶),并且使用内部数据库生成工具箱(<http://msda.u-strasbg.fr>)创建。应用以下参数:考虑了胰蛋白酶的一个切割遗漏和可变的修饰(甲硫氨酸的氧化(+16Da),半胱氨酸的氨甲酰甲基化(+57Da)。搜索窗口设定为前体离子25ppm,碎片离子0.07Da。将Mascot结果文件(.dat)导入Proline软件(<http://proline.profiroteomics.fr/>)中,并且蛋白质根据等于1的良好等级,基于调整的e值的肽谱匹配的1%FDR,每种蛋白质至少1个特异性肽,蛋白质组的1%FDR和Mascot Modified Mudpit评分来验证。

[0241] 混合淋巴细胞反应(MLR)

[0242] 在MLR测定中评价了m2病毒活化淋巴细胞的能力。通过COPTG19289、VVTG18058或MVAN33感染(MOI 0.05)CEF细胞,并在感染后48h收获培养上清液,并使用vivaspin 203000MWC0截留浓缩器(Sartorius)浓缩约20倍。添加未经稀释或稀释10和100倍的浓缩上清液(20 μ L添加于200 μ L中),以产生分别为2、0.2和0.02倍的最终“上清液浓度”。

[0243] 来自不同健康供体的血液在Etablissement Français du sang(EFS Grand Est, 67065Strasbourg)购买。通过Ficoll-Paque方法(Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare)纯

化PBMC,并以约 1×10^7 个细胞/mL重悬于补充有20%FBS(胎牛血清)和10%DMSO的RPMI培养基中,并且于-150℃储存直至使用。使PBMC在37℃下解冻,重悬于含有10%FBS的RPMI培养基中并在300g下离心5分钟。将所收集的细胞重悬于RPMI培养基+10%FBS中,并将细胞浓度调节至 3×10^6 个细胞/mL。将来自两个不同供体的100 μ L的PBMC在96孔微板的孔中一式三份混合。向各孔中添加20 μ L上述感染的细胞上清液,并将微板在37℃下5%CO₂气氛中孵育72h。

[0244] 然后收获MLR的培养上清液,并使用人IL-2*-2ELISA MAX™ deluxe Set试剂盒(BioLegend)通过ELISA测量人白介素-2(IL-2)。通过将给定样品的三次重复的IL-2浓度的平均值除以用培养基孵育的PBMC的三次重复的IL-2浓度的平均值,将测量值归一化。

[0245] 人源化NCG-34+小鼠中的体内实验

[0246] 小鼠人源化

[0247] NOD/Shi-scid/IL-2R γ null免疫缺陷小鼠品系(NCG)由Taconic提供。将四周龄的动物用白消安经腹膜内(化学消融)处理,并且次日静脉内(IV)注射CD34+人干细胞(每只小鼠50,000个细胞)。在注射细胞十四周之后,通过流式细胞术经由全血白细胞中的人CD45+细胞的分析来监测移植水平。人源化率定义为循环hCD45/总CD45(mCD45+hCD45)的比率。

[0248] T淋巴细胞免疫表型

[0249] 在肿瘤移植前2天,从后眼眶窦收集血液(100 μ L)。使用针对hCD45(Ref 563879;BD)、CD4(Ref 130-092-373;Miltenyi)、CD3(Ref 130-109-462;Miltenyi)和CD8(Ref130-096-561;Miltenyi)的抗体以及活/死黄色标记物(Ref L34968;ThermoFisher),通过流式细胞术(Attune NxT,Lifetechnologies)评估人CD45+、CD3+、CD3+CD4+和CD3+CD8+淋巴细胞群。简而言之,将血样与多种抗体于4℃一起孵育30分钟时间。然后,使用高产率裂解缓冲液(High Yield Lysis buffer)(HYL250;Thermo Fischer Scientific)在室温(RT)下将红细胞裂解15分钟,然后直接进行流式细胞术分析(Attune NxT,Life technologies)。

[0250] 用溶瘤病毒处理

[0251] 人结肠直肠癌细胞HCT-116购自ATCC(CCL-247™),在补充有10%FBS+青霉素/链霉素的McCoy's 5A培养基中生长,并在37℃用胰蛋白酶分离10分钟。在洗涤之后,将细胞以 5×10^7 个细胞/ml重悬于无菌PBS中,并且在小鼠的一侧肋腹中皮下注射100 μ l细胞悬浮液(5×10^6 个细胞)。当平均肿瘤体积几乎达到70mm³时,将小鼠基于其人源化率和肿瘤尺寸随机分成五组(5只小鼠/组):

[0252] • 组1接受载体

[0253] • 组2接受 10^5 pfu的VVTG18058

[0254] • 组3接受 10^6 pfu的VVTG18058

[0255] • 组4接受 10^5 pfu的COPTG19289

[0256] • 组5接受 10^6 pfu的COPTG19289

[0257] 对于每组,在随机化当天(定义为D0)进行100 μ l病毒制剂的单次静脉内(IV)注射。每天监测小鼠意外的应激迹象。每周监测体重和肿瘤体积3次。使用卡尺测量肿瘤直径。根据下式计算肿瘤体积(以mm³计):体积=1/2(长度 \times 宽度²)。当肿瘤体积超过1500mm³或当体重减轻超过25%时,处死动物。

[0258] 实施例1:痘苗病毒m2蛋白干扰B7介导的共刺激途径的能力的鉴定及其结合特性

的特性描述

[0259] 痘苗病毒感染的细胞的上清液抑制CTLA4与CD80或CD86的相互作用

[0260] 建立了两个定量监测由不同的候选病毒提供的CD80/CTLA4和CD86/CTLA4阻断活性的测定。在这些测定中,将人CTLA4 (hCTLA4) 固定在ELISA板上,并添加可溶性标记的hCD80或hCD86。在该设置中,与固定化或可溶性配偶体结合的任何竞争性分子将诱导信号的降低(竞争测定)。抗hCTLA4抗体伊匹单抗(Yervoy)和未受感染的DF1(可用的鸡细胞系;例如得自ATCC®CRL-12208™)的上清液分别用作阳性和阴性对照。令人惊奇地,如同与包被的hCTLA-4相互作用的Yervoy,发现被痘苗病毒(Copenhagen、Wyeth和Western Reserve株)感染的细胞的所有上清液以剂量反应方式与CD80/CTLA4和CD86/CTLA4测定均有竞争性(图1A和1B),而未受感染的DF1细胞的上清液不具有任何效果。令人感兴趣地,感染有经修饰痘苗病毒安卡拉株(MVA)的DF1的上清液对hCTLA4/hCD80和hCTLA4/hCD86相互作用没有产生任何抑制,表明此干扰能力在减毒过程期间丧失六个基因组片段(从I到VI缺失)的病毒中不是保守的(数据未示出)。这些结果表明,VV上清液中的一些物质干扰了CTLA-4与CD80和CD86的结合。

[0261] 为排除任何涉及细胞或培养基组分的假象,测试了来自不同来源的不同细胞系(禽原代细胞系和人肿瘤细胞系),并且还测定了FACS竞争方法。

[0262] 竞争FACS分析使用在其表面展示天然hCD80和hCD86的人细胞系(即KM-H2,霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma))进行。使用荧光染料缀合的抗Fc抗体显示了可溶性重组CTLA4-Fc与KM-H2细胞的结合。当与CTLA4-Fc共同孵育时,痘苗病毒感染的细胞的上清液与CTLA4-Fc竞争性结合KM-H2细胞,这与表现为阴性对照的MVA感染的细胞形成显著对比(数据未示出)。

[0263] 使用感染有不同痘病毒的HeLa(代替DF1)细胞的上清液进行竞争ELISA,以评价它们干扰CTLA4与CD80或CD86结合的能力。测试了痘苗病毒的多个株(Wyeth、WR和Copenhagen)以及其它正痘病毒(例如浣熊痘、兔痘、牛痘、MVA)、avipox(禽痘)和parapox病毒(伪牛痘病毒)。未受感染的HeLa细胞用作阴性对照。在此筛选实验中,用不同痘病毒以高MOI(MOI 1)感染HeLa细胞以保证最佳感染,并收集所得上清液并通过评价其抑制CTLA4-Fc与CD 80结合的能力(表示为OD450nm)来测试。如图2所示,感染有痘苗病毒的三个株或浣熊痘(RCN)、兔痘(RPX)和牛痘(CPX)的细胞的所有上清液能够干扰hCTLA4与hCD80的结合。这些结果表明在用这些痘病毒感染期间分泌的因子干扰CTLA4-B7途径。参与此抑制活性的新未知因子称为“干扰因子”(IF)。同样,如同未受感染的HeLa细胞(HeLa),MVA和感染有一些其它痘病毒如伪牛痘病毒(PCPV)和禽痘病毒(FPV)的细胞的上清液未显示出对CTLA4/CD80-CD86相互作用的任何抑制。

[0264] “干扰因子”存在于痘苗病毒上清液中但不存在于MVA上清液中

[0265] 为确定存在于感染有VV的上清液中的分子IF相互作用,未受感染或感染有MVA或痘苗病毒的CEF(也称为CEP)的上清液的Western印迹用上述ELISA测定的三种组分(即hCD80、hCD86和hCTLA4)进行探测。选择CEF是因为它们分别允许产生或不产生IF的痘苗病毒和MVA。用于探测Western印迹的每种蛋白质是与Fc部分的融合物,该Fc部分尤其允许其二聚化以及用相同的抗Fc缀合的抗体对其进行检测。各上清液原样使用或浓缩20倍($\times 20$)。图3所示的印迹清楚地表明,约200kDa的大分子仅存在于感染有痘苗病毒的上清液中,

并且hCD80和hCD86均醒目,而hCTLA4不醒目(至少在这些免疫印迹条件下)。该条带即使在未经浓缩的上清液中也容易地检测出。与hCD80-Fc和hCD86-Fc的反应性在还原条件下丧失(没有检测到任何条带),这指示内部二硫键和/或内二硫键对于维持IF的结构以及与CD80和CD86的相互作用是必需的(数据未示出)。形成显著对比的是,MVA上清液中未无醒目条带。

[0266] 结合特性的表征:痘苗病毒上清液中存在的“干扰因子”抑制CD80和CD86与CTLA4和CD28的结合,但有潜力使CD80与PD-L1结合。

[0267] 如上所讨论,CD80和CD86是参与调节适应性T细胞应答的重要共刺激抗原。因为CD80和CD86参与数种分子相互作用,在免疫应答方面具有阴性(CTLA4针对两者,且PD-L1仅针对CD80)和阳性(CD28)结果,建立不同的ELISA以解释IF对这5种特异性相互作用中的每种的影响。在这些不同的测定中测试了来自感染有非重组痘苗病毒(VV)的CEF的未经稀释的上清液,并与MVA感染的CEF的上清液和抗hCTLA4抗体Yervoy(10 μ g/ml)进行比较。未受感染的CEF细胞的上清液用作阴性对照。如图4所示,VV上清液抑制CD80和CD86与CTLA4的相互作用(如通过OD450nm吸光度的显著降低所证实),这与Yervoy类似(如所预期的,这是由于Yervoy与其CTLA-4靶标的结合,其阻止触及CD80并因此阻止CTLA4/CD80连接)。形成显著对比的是,MVA感染的细胞上清液没有效果(与阴性CEF对照相同的吸光度)。此外,VV上清液也能够消除CD80或CD86与CD28的阳性相互作用(相对于用未受感染的CEF细胞的上清液测量的吸光度,OD450nm吸光度的较强减少)。相比之下,MVA感染的细胞上清液和Yervoy(如对仅靶向CTLA4受体的抗体所预期的)没有效果(与阴性对照相同的吸光度)。这些结果证实实在VV感染的细胞的上清液中存在“IF”,而MVA基因组不产生此类因子。

[0268] 令人惊奇地,PD-L1/CD80相互作用由于痘苗病毒上清液的存在而增大(与阴性对照相比,OD450nm吸光度的较强增大),从而增强PDL1介导的免疫抑制信号传导。相比之下,Yervoy和MVA感染的CEF上清液对PDL1/CD80没有影响(与未受感染的对照相同的吸光度)。如所预期的,重组hCD80、hCTLA4和hPD1消除了该相互作用。该结果指示CD80上的IF和CTLA4结合位点没有完全重叠。应指出的是,CD80/PD-L1相互作用最近已涉及到Treg存活。

[0269] 这些结果突出了由痘病毒m2多肽展示的改善的免疫抑制特性。实际上,m2通过阻断CD80/CD28、CD86/CD28且通过使PDL1-CD80途径具有潜力来推进免疫抑制途径,而CTLA4-Fc抑制这三种途径,包括免疫抑制性PDL1-CD80相互作用。

[0270] m2痘病毒蛋白作为干扰因子的鉴定

[0271] 基于大约200kDa的表观分子量以及在MVA感染的上清液中不存在IF的事实,作为潜在候选研究了在痘苗Copenhagen株与MVA之间不同的37个基因,而没有发现任何明显的候选。不能鉴定到约200kDa的蛋白质。在这37个基因候选中,最大编码的蛋白是理论质量为147kDa的DNA依赖性RNA聚合酶亚基rpo147(J6R),因此观察到低于200kDa。基于一级结构,不存在可能与IF相关联的明显的病毒蛋白候选。

[0272] 因此,尝试了使用亲和层析(参见方案图5A)捕获IF来鉴定IF的实验途径。将20倍浓缩的痘苗病毒感染的(VV感染的)CEF的上清液上样到该亲和层析上。平行处理20倍浓缩的MVA感染的(MVA感染的)细胞的上清液。在用酸洗脱前,将VV和MVA上清液经过固定化CTLA4(阴性对照)或固定化CD86-Fc融合物。在胰蛋白酶消化后,通过MS/MS(质谱)来分析亲和层析分支的不同洗脱液。使用所获得的m/z数据来探测鸡(原鸡)和痘苗病毒数据库。一次

命中仅获自与CD86包被的珠一起孵育的痘苗感染的CEF的上清液,其覆盖由M2L基因座编码的痘苗病毒蛋白m2蛋白的75% (包括肽信号) 或82% (没有肽信号) (图5B,其中检测的肽覆盖的序列以粗体表示)。该结果与MVA基因组中M2L基因座的缺乏以及m2具有使其成为推定的分泌蛋白的预测信号肽的事实完全一致。

[0273] 然而,m2蛋白具有仅25kDa的计算分子量,并且据报道在还原条件下在SDS-PAGE上作为35kDa蛋白质迁移(Hinthong等人2008),其远非在SDS-PAGE上观察到的IF的200kDa质量。然而,据我们所知,没有记载在非还原条件下m2蛋白在SDS-PAGE上的行为。因此,我们推测,IF可能是涉及具有亚基间二硫键的VV m2蛋白的同源或异源多聚体复合体,在SDS-PAGE上产生大约200kDa的表观质量。

[0274] 实施例2:m2缺陷型痘病毒不再产生IF

[0275] M2L缺失痘病毒的构建

[0276] 通过使痘苗病毒基因组中的M2L基因缺失,进一步研究IF中涉及的m2。具体地,在表达荧光素酶的双重缺失(DD)痘苗病毒(即W02009/065546中所述的 tk^- 、 rr^- ,并命名为VVTG18277)中破坏M2L基因座,产生如上所述的表达荧光素酶的重组三重缺失(TD)病毒(即 tk^- 、 rr^- 、 $m2^-$) (COPTG19289)。从m2 ORF上游的64个核苷酸延伸至前169个密码子的M2L部分缺失导致m2蛋白($m2^-$)的表达受抑制,并且与亲本相比对CEF的病毒复制没有任何显著影响(数据未示出)。

[0277] M2L缺失的病毒不再产生IF

[0278] 如前所述,通过竞争ELISA来研究在用DD和TD病毒感染人HeLa和禽DF1细胞后获得的上清液。如图6所示,不同于与阴性对照相比显示出吸光度测量值的较强降低的亲代DD病毒(VVTG18277),在用M2L缺失痘苗病毒COPTG19289感染时收集的上清液不再能够抑制CTLA4/CD80相互作用(如通过与在未受感染的HeLa或DF1细胞中测量的相同的吸光度所证实)。

[0279] 此外,当经过如上的Western印迹时,用M2L缺失病毒的上清液不再检测到使用CD80-Fc或CD86-Fc探针检测的在200kDa迁移的较大复合体(数据未示出)。这些结果证实,m2至少为IF的一部分。

[0280] 实施例3:m2缺陷型重组痘病毒

[0281] 表达荧光素酶的 tk^- 、 rr^- 、 $m2^-$ 溶瘤痘苗病毒(基因插入J2R基因座中)的构建如上所述。

[0282] 溶瘤活性

[0283] 将LOV0(ATCC®CCL-229™)和HCT116(ATCC®CCL-247™)结肠癌细胞以 $8 \cdot 10^5$ 个细胞/孔的细胞密度接种在96孔板中。在感染前,在37°C、5%CO₂下将板孵育4小时。用均表达荧光素酶的 tk^- 、 rr^- 、 $m2^-$ -COPTG19289病毒或 tk^- 、 rr^- -VVTG18277病毒以 10^{-1} 至 10^{-4} 个颗粒/细胞的MOI范围感染细胞。在感染后96小时(D4)使用细胞计数器(Vi-Cell,Beckman coulter)通过台盼兰排除法来测定细胞活力。LOV0(图7A)和HCT116(图7B)的%细胞存活的定量表明,在LOV0细胞和HCT116两者中,由m2缺陷型COPTG19289病毒提供的溶瘤效力与用m2阳性VVTG18277获得的溶瘤效力相当。具体地,在以 10^{-1} 和 10^{-2} 的MOI感染VVTG18277和COPTG19289时LOV0细胞裂解,而在 10^{-3} 的低MOI下观察到80%的细胞活力并且在 10^{-4} 的MOI下完全保留下来。在HCT116细胞中的病毒溶瘤活性甚至更高,因为在 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 的MOI

下不可检测到细胞活力(0%),并且在 10^{-4} 的MOI下少于50%的细胞有活力。MOCK处理对细胞没有影响,并用于确定LOVO和HCT116细胞的100%活力。

[0284] 在其它肿瘤细胞系中证实了这种在双重和三重缺失病毒之间不存在的差异,包括黑色素瘤B16F10(ATCC®CCL-6475TM)、鼠结肠癌CT26WT(ATCC®CRL-2638TM)和鼠结肠腺癌MC38WT细胞(购自Kerafast和Cellosaurus CVCL_B288)。两种痘苗病毒在这三种细胞系中在MOI为 10^{-1} 时且在B16F10和MC38WT中在MOI为 10^{-2} 时是溶瘤的,而在CT26WT中是部分溶瘤的。

[0285] 总之,重组m2缺陷型病毒示出与其m2阳性对应物相当的溶瘤活性,这支持了M2L基因座的没有不利地影响肿瘤细胞系中的溶瘤活性的事实。

[0286] 体内转基因表达

[0287] 在皮下注射后植入有B16F10肿瘤的C57BL/6小鼠中评估由tk-rr-m2-溶瘤痘苗病毒(COPTG19289)生成的荧光素酶表达,并与用tk-rr-VVTG18277病毒获得的荧光素酶表达进行比较。在第0、3、6、10和14天瘤内注射各病毒(10^7 pfu),并且在第1、2、6、9、13和16天收集肿瘤采样,以评价每克肿瘤的荧光素酶活性(RLU/g肿瘤)。如图8所示,对于两种病毒,在病毒注射后的第一天(D1和D2)检测到强的荧光素酶活性,之后减小。然而,在感染VVTG18277后13天,荧光素酶表达达到背景水平,而在感染COPTG19289后测量到较弱但持久的表达水平,其随时间推移(D9、D13和D16)维持。

[0288] 抗肿瘤活性

[0289] 分别在三个肿瘤模型B16F10、CT26和HT116中测定由tk-rr-m2-溶瘤痘苗病毒(COPTG19289)提供的抗肿瘤活性。

[0290] 在第一设置下,通过皮下注射对C57BL/6小鼠(10只小鼠/组)植入B16F10肿瘤。当肿瘤达到25-100mm³的体积时,测量每只动物的肿瘤,并将小鼠随机化,并在D0、D3、D6、D10和D14通过瘤内途径注射 10^7 pfu的COPTG19289、VVTG18277或MOCK载体(阴性对照)。每周跟踪动物存活和肿瘤生长两次(当肿瘤体积达到2000mm³或以上时处死小鼠)。在两个VV处理组之间没有显著差异。值得注意的是,在两组中,一些动物展示出减慢的肿瘤生长。相比之下,在Mock处理的动物中肿瘤生长非常迅速,在24天内达到2000mm³,导致所有小鼠在D24死亡。通过痘苗病毒处理改善了小鼠的存活。具体地,在该实验中,用tk-rr-VVTG18277处理的小鼠在D23以及用tk-rr-m2-COPTG19289处理的小鼠在D28获得了50%存活。为清楚起见,除10只注射的小鼠中有2只在几天后死亡(数据未示出)之外,匹配两组VV之间的存活曲线。

[0291] 还在通过皮下注射植入CT26肿瘤的Ba1b/c小鼠中测定了抗肿瘤活性。当肿瘤达到25-100mm³的体积时,单独测量肿瘤,并且在瘤内注射tk-rr-m2-溶瘤痘苗病毒(COPTG19289)或tk-rr-VVTG18277病毒或MOCK载体(10只小鼠/组)之前将小鼠随机化(D0)。在D0、D3、D6、D10和D14将50μl对应于 10^7 pfu的每种痘苗病毒制剂(或Mock)注射到肿瘤中。每周跟踪肿瘤生长两次,并且当肿瘤体积达到2000mm³或以上时处死小鼠。如图9所示,Mock处理的动物中的肿瘤体积迅速增加以在D28达到2000mm³,而在VV处理的组中肿瘤生长得到延缓,其中肿瘤体积仅在tk-rr-m2-痘苗病毒组中低于1000mm³。

[0292] 还在通过皮下注射植入HT116肿瘤的Swiss Nude小鼠(10只小鼠/组)中测定了抗肿瘤活性。在肿瘤植入后10天,静脉内注射两种不同剂量的痘苗病毒,分别为 10^5 和 10^7 pfu。每周跟踪肿瘤生长两次,并且当肿瘤体积达到2000mm³或以上时处死小鼠。如所预期的,在

肿瘤植入后45天,Mock处理的动物中的肿瘤体积迅速增加至达到2000mm³或更高,而在用10⁵pfu的VV处理的组中肿瘤生长得到延缓。值得注意的是,在注射10⁷pfu痘苗病毒的两组中肿瘤生长被完全抑制,如图10所示。

[0293] 总之,修饰VV M2L基因座使痘苗病毒不能够产生免疫抑制性M2蛋白对于溶瘤活性、抗肿瘤作用和转基因的表达没有影响。

[0294] 实施例4:混合淋巴细胞反应(MLR)测定

[0295] 在MLR中评价从用COPTG19289(tk⁻、rr⁻和m2⁻)、或VVTG18058(tk-rr⁻)或MVAN33感染的CEF细胞获得的上清液活化淋巴细胞的能力。感染(MOI 0.05)后48h收获培养上清液并浓缩约20倍。

[0296] 通过Ficoll-Paque PLUS(GE healthcare)从收集自健康供体的血液中纯化PBMC。更具体地,将来自2个不同供体的3×10⁵个PBMC在96孔微板中混合。将未经稀释或稀释10或100倍的浓缩上清液添加至PBMC培养物(20μL添加于200μL中),以产生分别为2、0.2和0.02倍的最终“上清液浓度”,并且在37℃下5%CO₂气氛中培养72h。添加RPMI培养基用作阴性对照。通过ELISA(IL-2*-2ELISA MAXTM deluxe Set试剂盒,来自BioLegend)对培养上清液中的IL-2分泌进行定量作为淋巴细胞活化的标志物。通过将给定样品的三次重复的IL-2浓度的平均值除以用培养基孵育的PBMC的三次重复的IL-2浓度的平均值,将测量值归一化。

[0297] 阴性对照代表归一化淋巴细胞活化状态1。如图11所示,在用MVA和COPTG19289(tk-rr-m2⁻;TD)感染的细胞的上清液的存在下孵育的PBMC诱导了淋巴细胞活化,当稀释10或100倍时达到接近1的值,并且在未稀释测试时超过1。形成显著对比的是,VVTG18058(tk-rr⁻;DD)感染的上清液在所有测试的稀释度下显示出淋巴细胞活化的明显抑制,证实了编码M2编码病毒的免疫抑制活性。

[0298] 实施例5:人源化NCG-CD34+小鼠中的抗肿瘤活性

[0299] 在用CD34+人干细胞人源化并且移植人结肠直肠癌细胞HCT-116(在一只小鼠的肋腹中SC注射5×10⁶个细胞;表示D0)的NOD/Shi-scid/IL-2Rγ null免疫缺陷小鼠品系(NCG)中,评估由m2-COPTG19289病毒提供的抗肿瘤活性。植入后十二天(D12),小鼠以10⁵pfu或10⁶pfu的剂量接受单次IV注射的COPTG19289(tk-rr-m2⁻;TD)或其m2+对应物VVTG18058(tk-rr⁻;DD)。载体处理的小鼠被用作阴性对照。在细胞植入后至少60天内监测肿瘤生长和小鼠存活。

[0300] 如图12A和B所示,在载体处理的小鼠组中肿瘤体积非常迅速地增加。形成显著对比的是,在用m2-COPTG19289(TD)或m2+VVTG18058(DD)处理的小鼠中,无论注射的剂量如何,肿瘤生长都受到明显抑制,但是一些动物出现了剂量依赖性毒性问题;因此妨碍了60天时间段内的肿瘤生长监测。在10⁶剂量下,两种病毒均以大致相同的效力延缓肿瘤生长(图12A),但是与DD VVTG18058病毒相比,TD病毒COPTG19289观察到较低的毒性。应注意,一只TD处理的动物在细胞植入后55天时是无肿瘤的,并且无肿瘤状态保持超过85天。在10⁵剂量下,TD病毒COPTG19289显示相对于DD VVTG18058病毒改善的抗肿瘤作用(图12B)。更具体地,与DD组的2/5相比,TD组的5/5动物的肿瘤生长受到明显抑制。此外,与DD组相比,在TD组中观察到较低的毒性。

[0301] 小鼠存活的比较证实,在单次IV注射10⁶pfu(图13A)或10⁵pfu(图13B)后,与m2+VVTG18058(DD)相比,m2-COPTG19289(TD)提供改善的抗肿瘤作用。更具体地,100%载体处

理的动物在52天内死亡,而通过VVTG18058 (DD) 处理使存活明显延长,并且通过COPTG19289 (TD) 处理更加明显延长。例如,50%存活估计对于阴性对照为52天,对于DD- 10^6 pfu处理组为54天且对于TD- 10^6 pfu处理组为70天(图13A)。

[0302] 此外,在 10^5 pfu剂量下,DD和TD病毒的50%存活分别为52天和80天。

[0303] 这些结果示出了由m2缺陷型痘病毒提供的用于治疗病理学如癌症的改善的治疗意义。

[0304] 参考文献:

[0305] Antoine等,1998,Virology 244 (2) 365-96

[0306] Baoming Liu等,2018,J.Virol.92 (7) e02152-17

[0307] Bloom等,1991,J.Virol.65 (3) :1530-42

[0308] Boyle等,1985,Gene 35,169-177

[0309] Brunet等,1987,Nature 328:267-70

[0310] Carpentier等,2003,Frontiers in Bioscience 8,e115-127

[0311] Carpentier等,2006,Neuro-Oncology 8 (1) :60-6

[0312] Chakrabarti等,1997,Biotechniques 23:1094-7

[0313] Chan,2008,Eur.J.Immunol.38,2964-2968

[0314] Chaurasiya等,2018,Current Opinion in Immunology 51:83-90

[0315] Chen,2004,Nat.Rev.Immunol.4:336-347

[0316] Claudepierre等,2014,J.Virol.88 (10) :5242-55

[0317] Cole等,Monoclonal antibodies and Cancer Therapy;Alan Liss,第77-96页

[0318] Coligan等,1992和1994,Current Protocols in Immunology;J Wiley&Sons Inc 编著,National Institute of Health

[0319] Dariavach等,Eur.J.Immunol.18:1901-5

[0320] De Graaf等,2018,doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.03.006

[0321] Erbs等,2008,Cancer Gene Ther.15 (1) :18-28

[0322] Evans等,2004,J Pharm Sci.93:2458-75

[0323] Fallaux等,1998,Human Gene Ther.9:1909-17

[0324] Fend等,2014,Cancer Immunol.Res.2,1163-74

[0325] Foloppe等,2008,Gene Ther.15:1361-71

[0326] Gedey等,2006,J.Virol.80:8676-85

[0327] Guo等,1990,J.Virol.64:2399-2406

[0328] Guse等,2011,Expert Opinion Biol.Ther.11 (5) :595-608

[0329] Hammond等,1997,J.Virol Methods 66:135-8

[0330] Harlow和Lane,1988,Antibodies-A laboratory manual;Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor NY

[0331] Hinthong等,2008,Virology 373 (2) :248-62

[0332] Hodge等,1994,Cancer Res.54:5552-5

[0333] Kahn等,2015,J.Oncol.Doi:10.1155/2015/847383

[0334] Kleinpetter等,2016,OncoImmunology 5 (10) :e1220467

- [0335] Kumar和Boyle,1990,Virology 179:151-8
- [0336] Liu等,2018,J.Virol.,doi/10.1128/JVI.02152-17
- [0337] Mackett等,1984J.of Virol.,49:857-64
- [0338] McLaughlin等,1996,Cancer Res.56:2361-67
- [0339] Needleman和Wunsh.J.Mol.Biol.48,443-453,1970
- [0340] Parato等,2012,Molecular Therapy 20(4):749-58
- [0341] J.R.Robinson,“Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems”,Marcel Dekker,Inc.编著,New York,1978
- [0342] Russell等,2012,Nat.Biotechnol.30(7):658-70
- [0343] Scott-Algara等,2010PLOS One 5(1),e8761
- [0344] Smith等,1993,Vaccine 11(1):43-53
- [0345] Smith和Kotwal,2002,Crit.Rev.Microbiol.28(3):149-85
- [0346] Yi,2011,J Immunol.186:2739-2749
- [0347] Zhou等,2006,Blood 107,2461-2469
- [0348] W097/20574
- [0349] W099/03885
- [0350] W000/037504
- [0351] W001/23001
- [0352] W003/053463
- [0353] W02005/042728
- [0354] W02006/085082
- [0355] W02006/93924
- [0356] W02006/108846
- [0357] W02007/056847
- [0358] W02007/113648
- [0359] W02007/123737
- [0360] W02007/147528
- [0361] W02008/114021
- [0362] W02008/129058
- [0363] W02008/138533
- [0364] W02009/53937
- [0365] W02009/065546
- [0366] W02009/065547
- [0367] W02009/100521
- [0368] W02010/130753
- [0369] W02010/130756
- [0370] W02011/066389
- [0371] W02012/001075
- [0372] W02012/122444

[0373] W02013/022764
[0374] W02013/079174
[0375] W02013/173223
[0376] W02013/181634
[0377] W02014/053571
[0378] W02016/008976
[0379] W02016/149201
[0380] W02016/196237
[0381] W02018/122088
[0382] EP17306012.0
[0383] EP 463 756
[0384] EP 1 162 982
[0385] US 5,250,534
[0386] US 6,469,012
[0387] US 6,686,152
[0388] US 6,984,720
[0389] US 7,108,844
[0390] US 7,109,003
[0391] US 7,456,009
[0392] US 7,700,569
[0393] US 8,017,114
[0394] US 8,143,379
[0395] US 8,217,149
[0396] US 8,491,895
[0397] US2007-016108

序列表

<110> Transgene SA

<120> M2缺陷型痘病毒

<130> B377256PCT-D39862

<150> EP 18306874.1

<151> 2018-12-28

<150> EP 19306022.5

<151> 2019-08-21

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 220

<212> PRT

<213> Vaccinia virus

<400> 1

Met Val Tyr Lys Leu Val Leu Leu Phe Cys Ile Ala Ser Leu Gly Tyr
 1 5 10 15
 Ser Val Glu Tyr Lys Asn Thr Ile Cys Pro Pro Arg Gln Asp Tyr Arg
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Phe Ala Ala Glu Leu Thr Ile Gly Val Asn Tyr Asp Ile
 35 40 45
 Asn Ser Thr Ile Ile Gly Glu Cys His Met Ser Glu Ser Tyr Ile Asp
 50 55 60
 Arg Asn Ala Asn Ile Val Leu Thr Gly Tyr Gly Leu Glu Ile Asn Met
 65 70 75 80
 Thr Ile Met Asp Thr Asp Gln Arg Phe Val Ala Ala Ala Glu Gly Val
 85 90 95
 Gly Lys Asp Asn Lys Leu Ser Val Leu Leu Phe Thr Thr Gln Arg Leu
 100 105 110
 Asp Lys Val His His Asn Ile Ser Val Thr Ile Thr Cys Met Glu Met
 115 120 125
 Asn Cys Gly Thr Thr Lys Tyr Asp Ser Asp Leu Pro Glu Ser Ile His
 130 135 140
 Lys Ser Ser Ser Cys Asp Ile Thr Ile Asn Gly Ser Cys Val Thr Cys
 145 150 155 160
 Val Asn Leu Glu Thr Asp Pro Thr Lys Ile Asn Pro His Tyr Leu His
 165 170 175
 Pro Lys Asp Lys Tyr Leu Tyr His Asn Ser Glu Tyr Gly Met Arg Gly

	180		185		190
Ser Tyr Gly Val Thr Phe Ile Asp Glu Leu Asn Gln Cys Leu Leu Asp					
	195		200		205
Ile Lys Glu Leu Ser Tyr Asp Ile Cys Tyr Arg Glu					
	210		215		220
<210> 2					
<211> 214					
<212> PRT					
<213> Myxoma virus					
<400> 2					
Met Ala Arg Tyr Ile Ile Ile Val Leu Ala Cys Leu Val Ala Thr Ser					
1	5		10		15
Thr Cys Ala Thr Tyr Pro Lys Lys Tyr Trp His Leu Ala Ala Glu Leu					
	20		25		30
Thr Ile Gly Leu Asn Arg Tyr Val Glu Thr Val Met Gly Glu Cys His					
	35		40		45
Met Lys Glu Arg Cys Asp His Lys Thr Ser Thr Leu Ile Leu Thr Gly					
	50		55		60
Tyr Gly Leu Met Ile Asn Ile Thr Ile Thr Asn Val Val Gln Arg Phe					
65	70		75		80
Val Ala Ala Ser Ala Gly Ala Gly Asp Gly Asn Lys Leu Ser Ile Met					
	85		90		95
Leu Phe Thr Thr His Pro Leu Thr Lys Tyr Ser Asp Ile Tyr Leu Thr					
	100		105		110
Ile Thr Cys Leu Glu Pro Glu Gly Asp Val Gly Asn Tyr Gly Asn Gln					
	115		120		125
Leu Pro Asp Ser Leu His His Asn Lys Asp Val Ser Ile Thr Ile Leu					
	130		135		140
Gly Ser Cys Val Thr Cys Val Asn Leu Glu Thr Asn Pro Ile Lys Val					
145	150		155		160
Asn Pro His Phe Thr His Pro Ile Ser Met Phe Val Tyr Asp Asn Lys					
	165		170		175
Glu Asp Val Arg Gly Ser Tyr Gly Val Thr Phe Glu Asp Glu Leu Asn					
	180		185		190
Val Cys Phe Leu Asp Ile Lys Lys Val Ser Tyr Asp Leu Cys Tyr Arg					
	195		200		205
Gln Thr Arg Tyr Leu Ile					
	210				

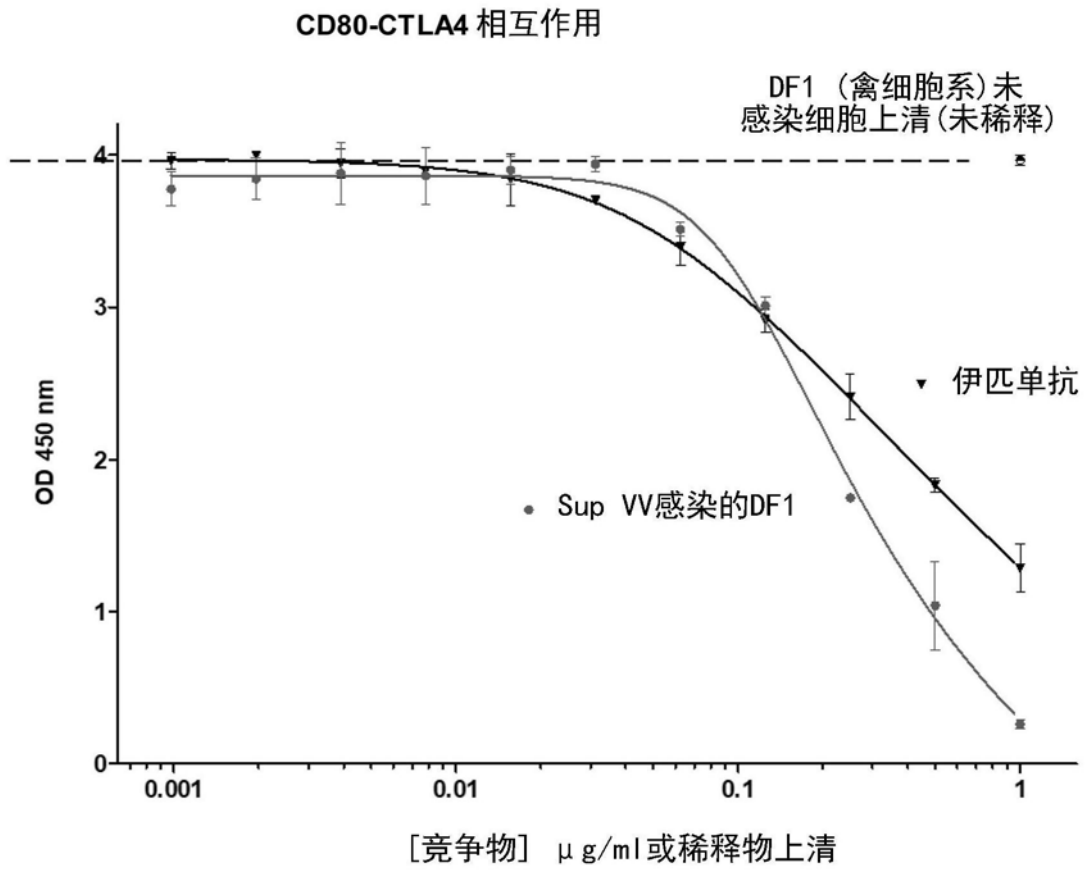


图1A

CD86-CTLA4 相互作用

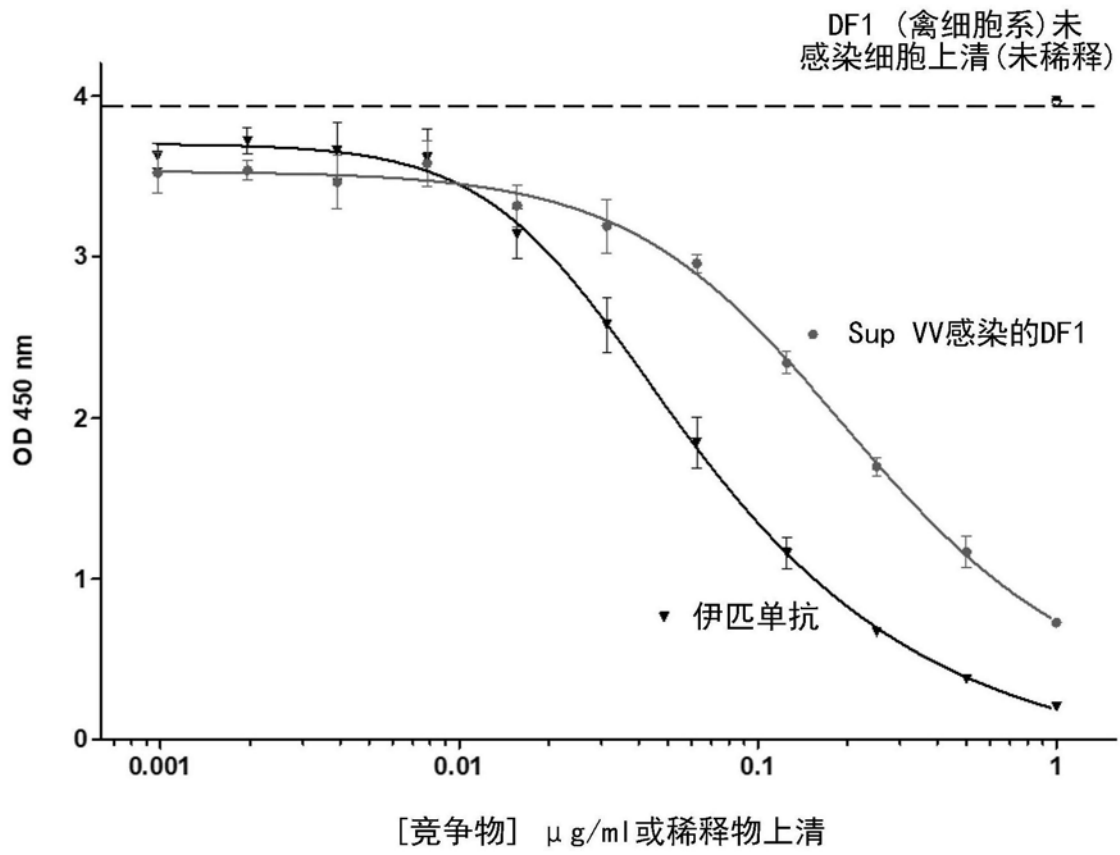


图1B

竞争 CD80/CTLA4

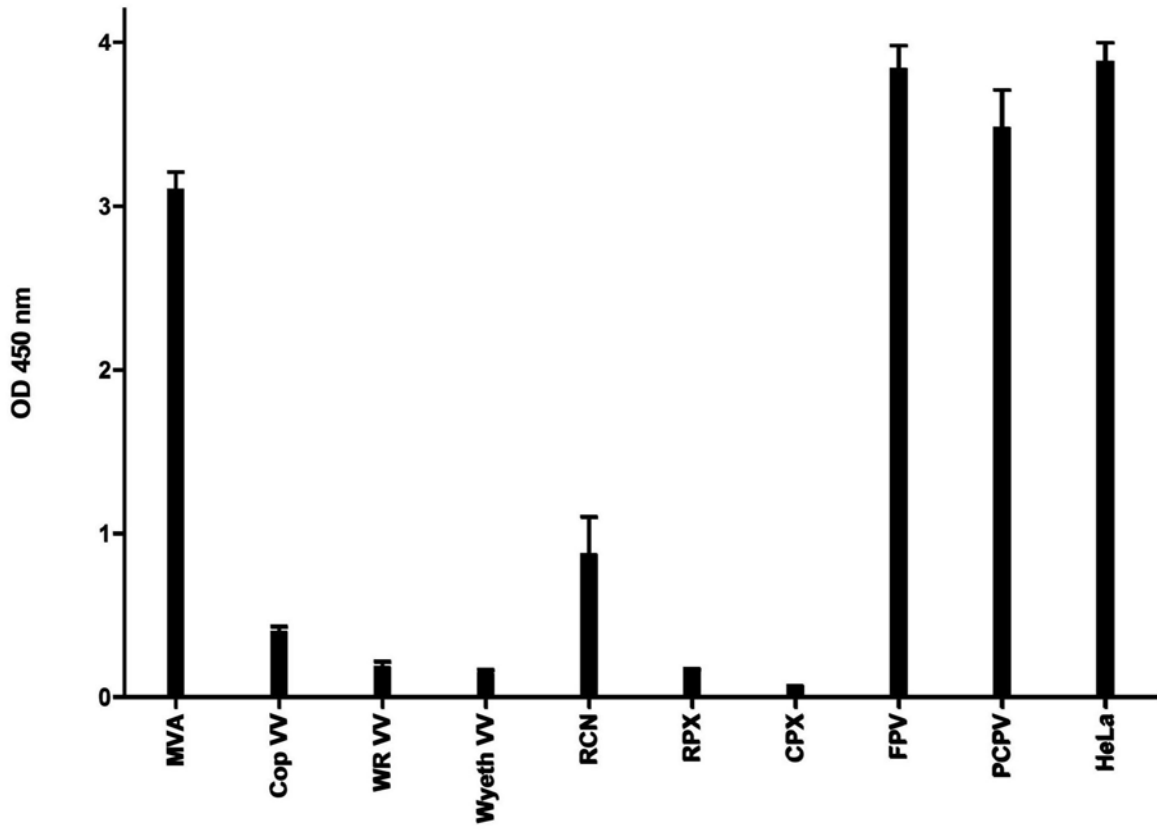


图2

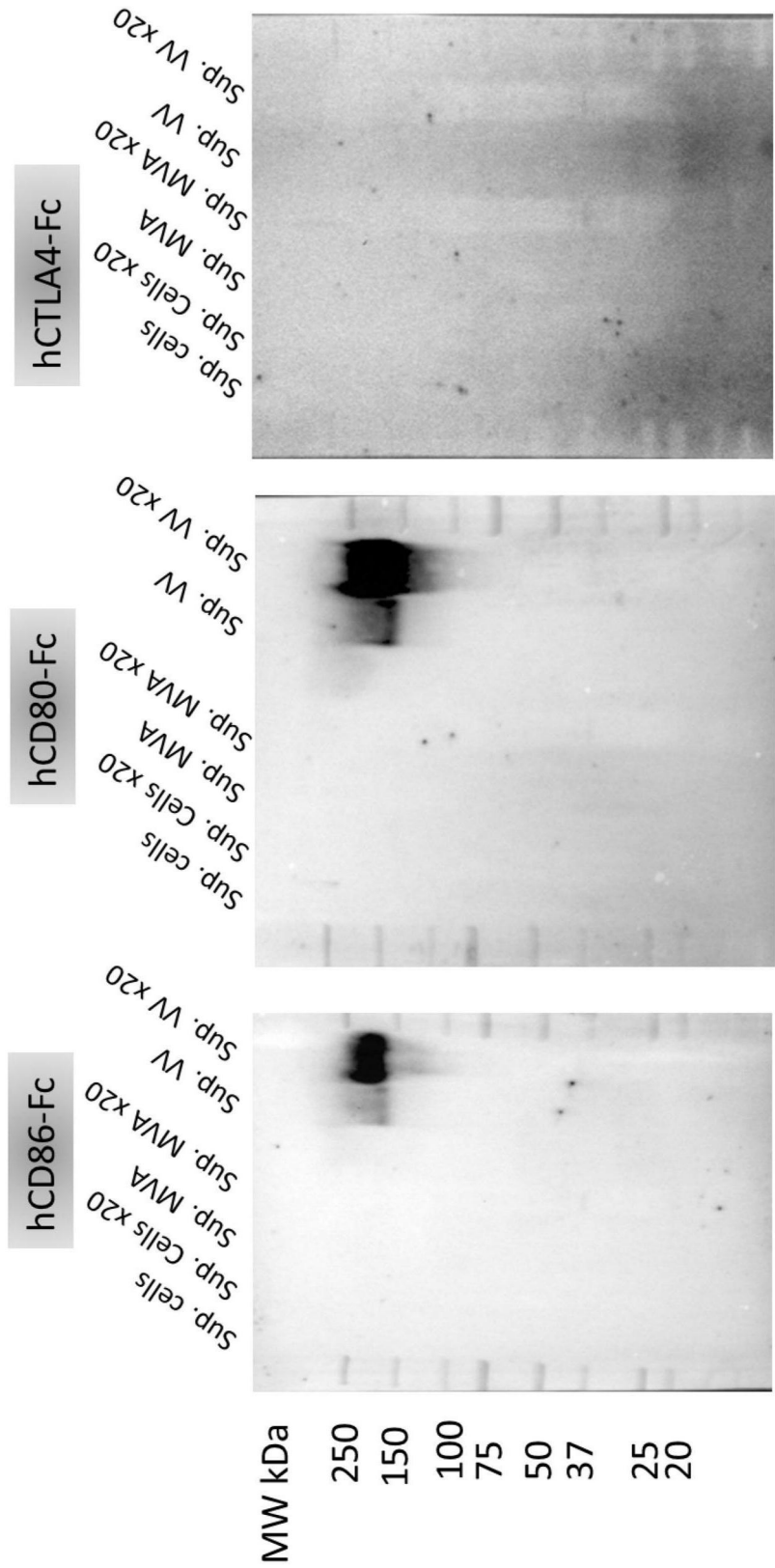


图3

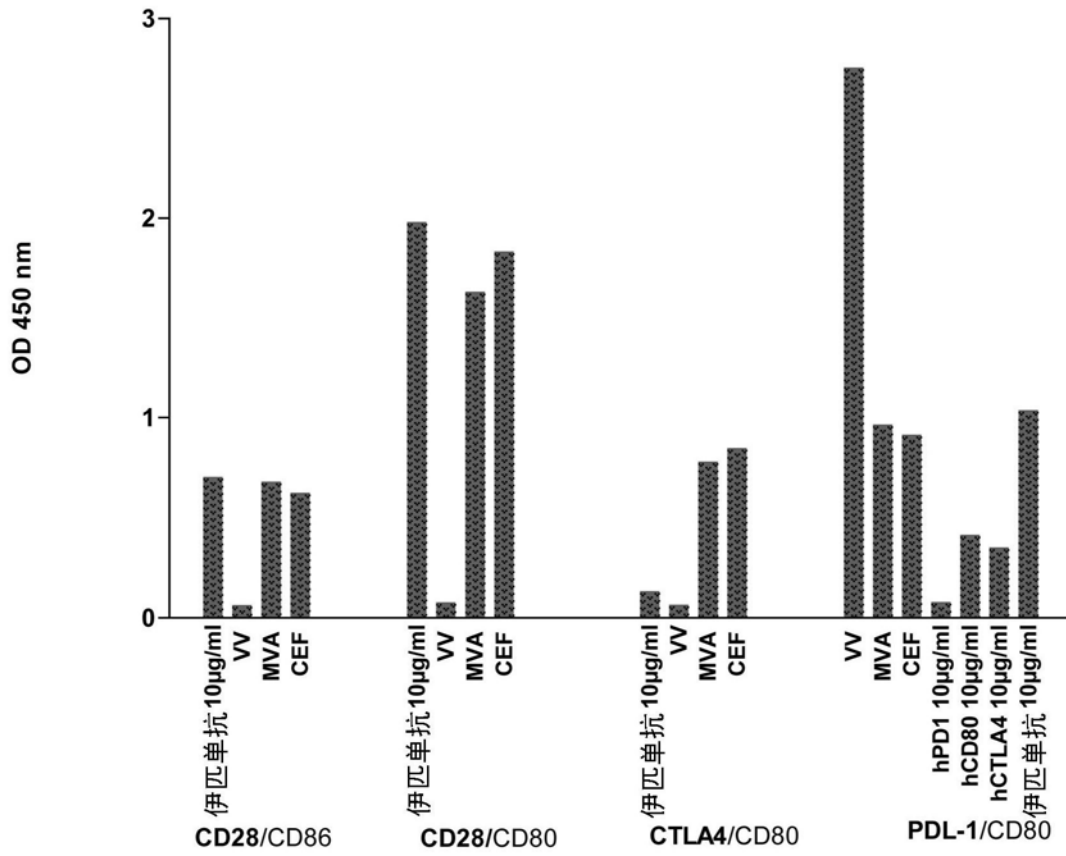


图4

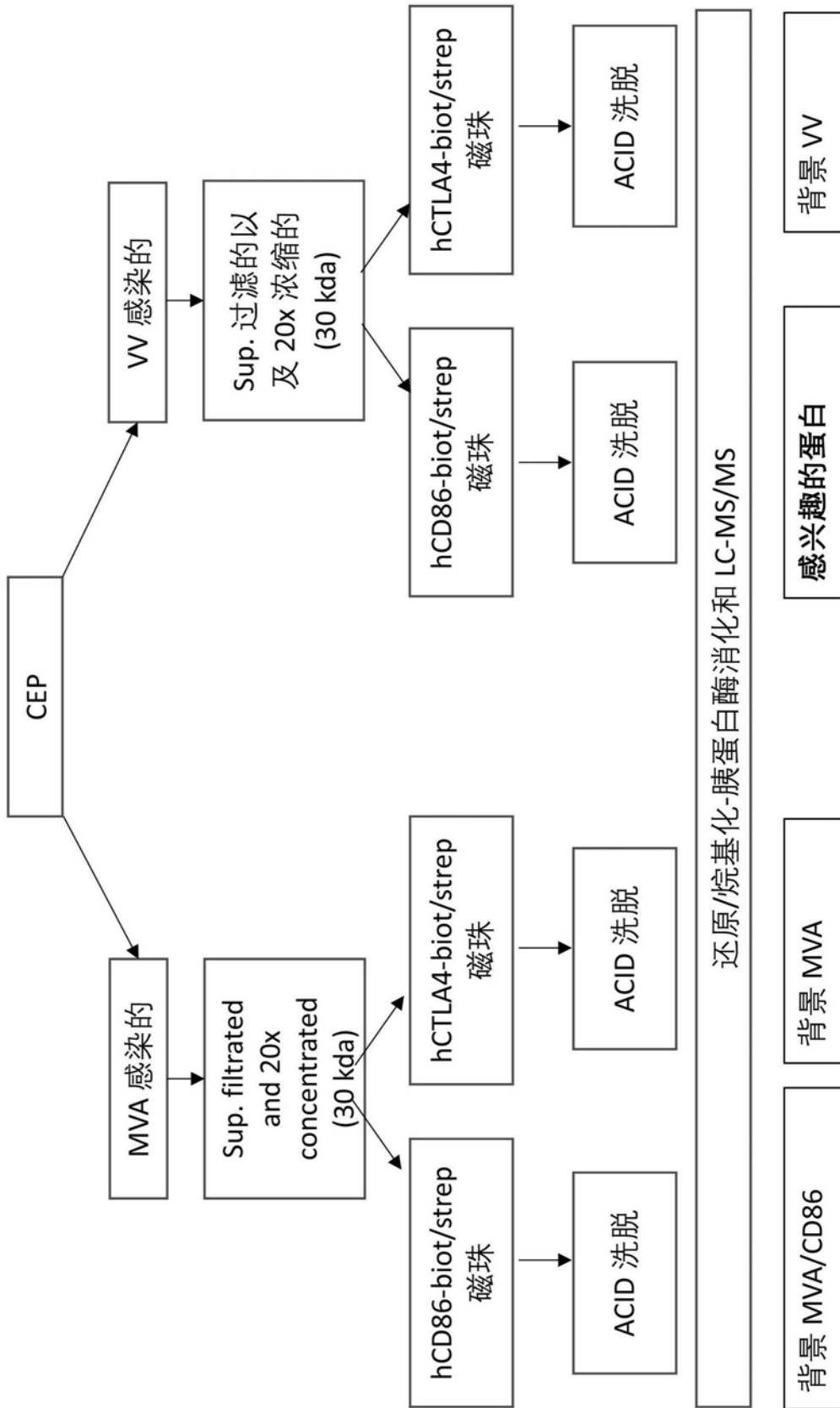


图5A

分数: 1741
 标称质量 (Mr): 25091
 计算的pI: 5.11
 MS数据文件: D:\Partage\MGF_files\Q-Exactive\QE20317MS.mgf
 酶: 胰蛋白酶:切去KR C端侧除非下一个残基是P
 可变修饰: 半胱氨酸经碘乙酰胺 (C) 氧化 (C)
 蛋白序列覆盖率: 75%
 粗体显示配对的肽

1	MVYKLVLLFC	IASLGYSVEY	KNTICPPRQD	YRYWYFAEL	TIGVNYDINS
51	TIIGECHMSE	SYIDR NANIV	LTGYGLEINM	TIMDTDQRFV	AAAEGVGKDN
101	KLSVLLFTTQ	RLDKVHHNIS	VTITCMEMNC	GTTYDSDLP	ESIHKSSSCD
151	ITINGSCVTC	VNLETDP TKI	NPHYLHPKDK	YLYHNSEYGM	RGSYGVTFID
201	ELNQCLLDIK	ELSYDICYRE			

图5B

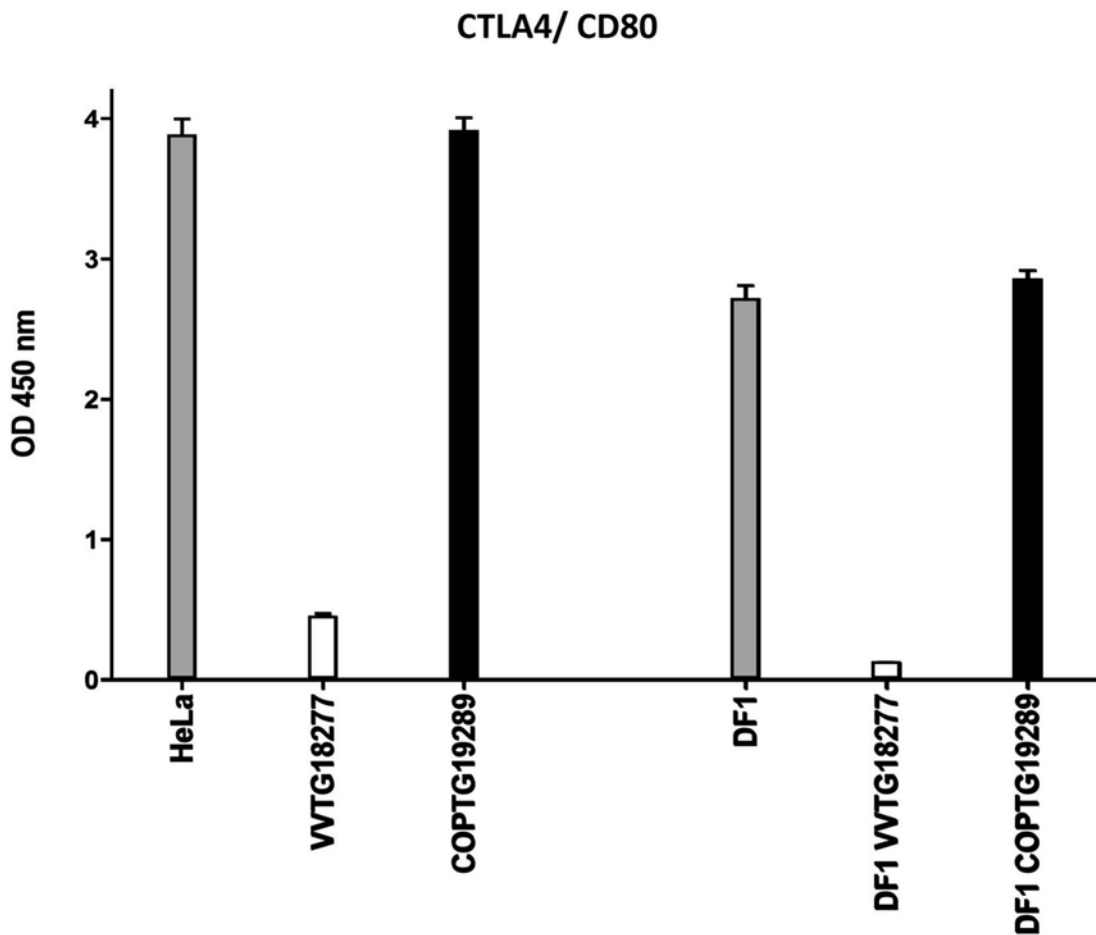


图6

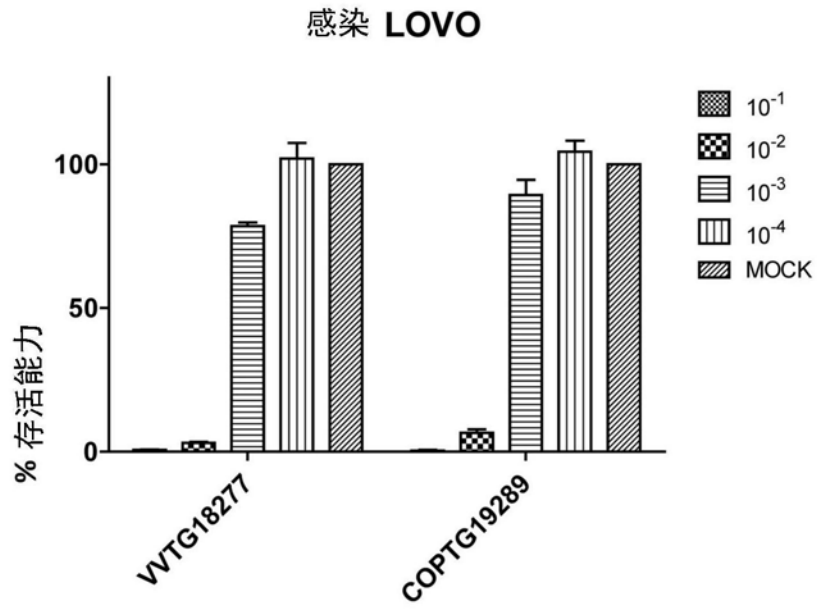


图7A

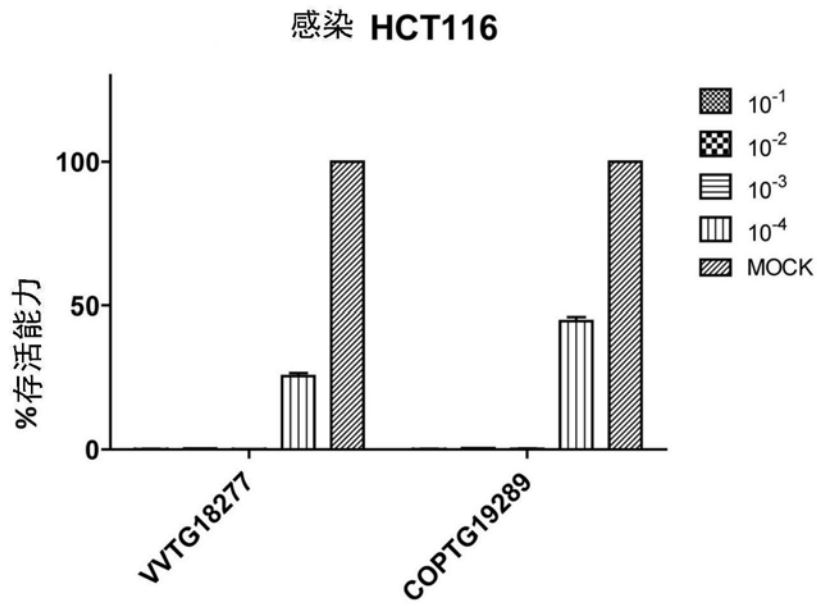


图7B

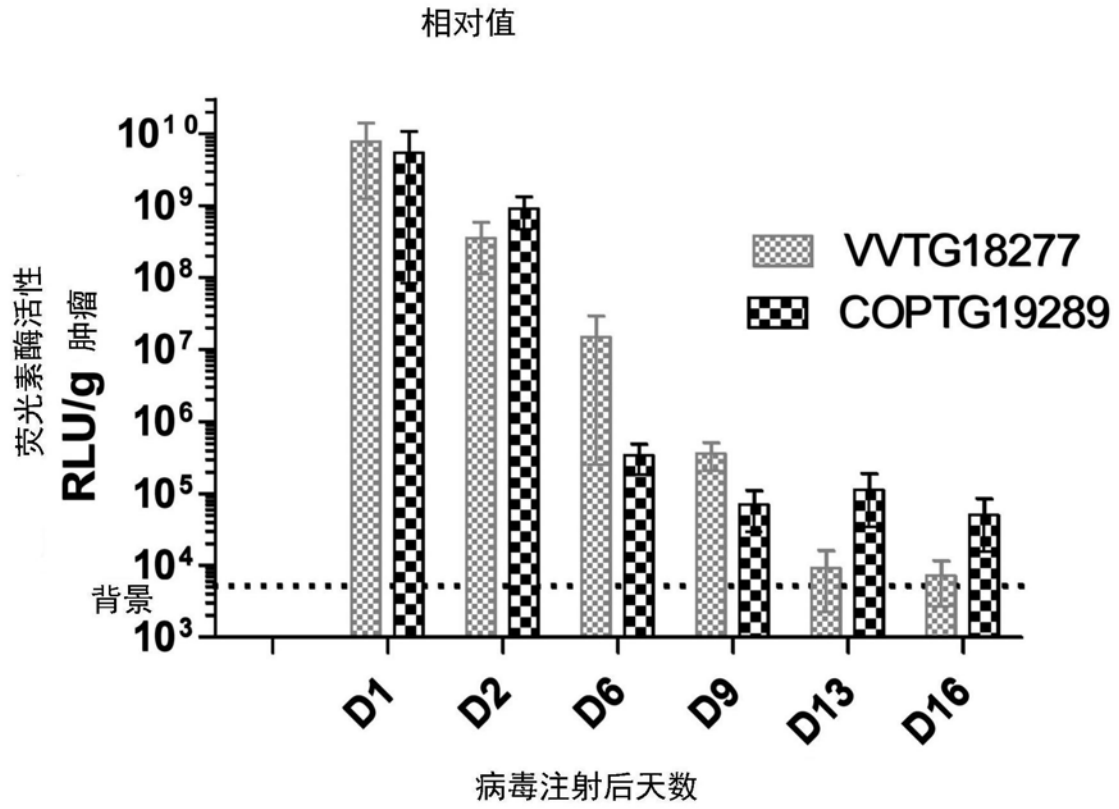


图8

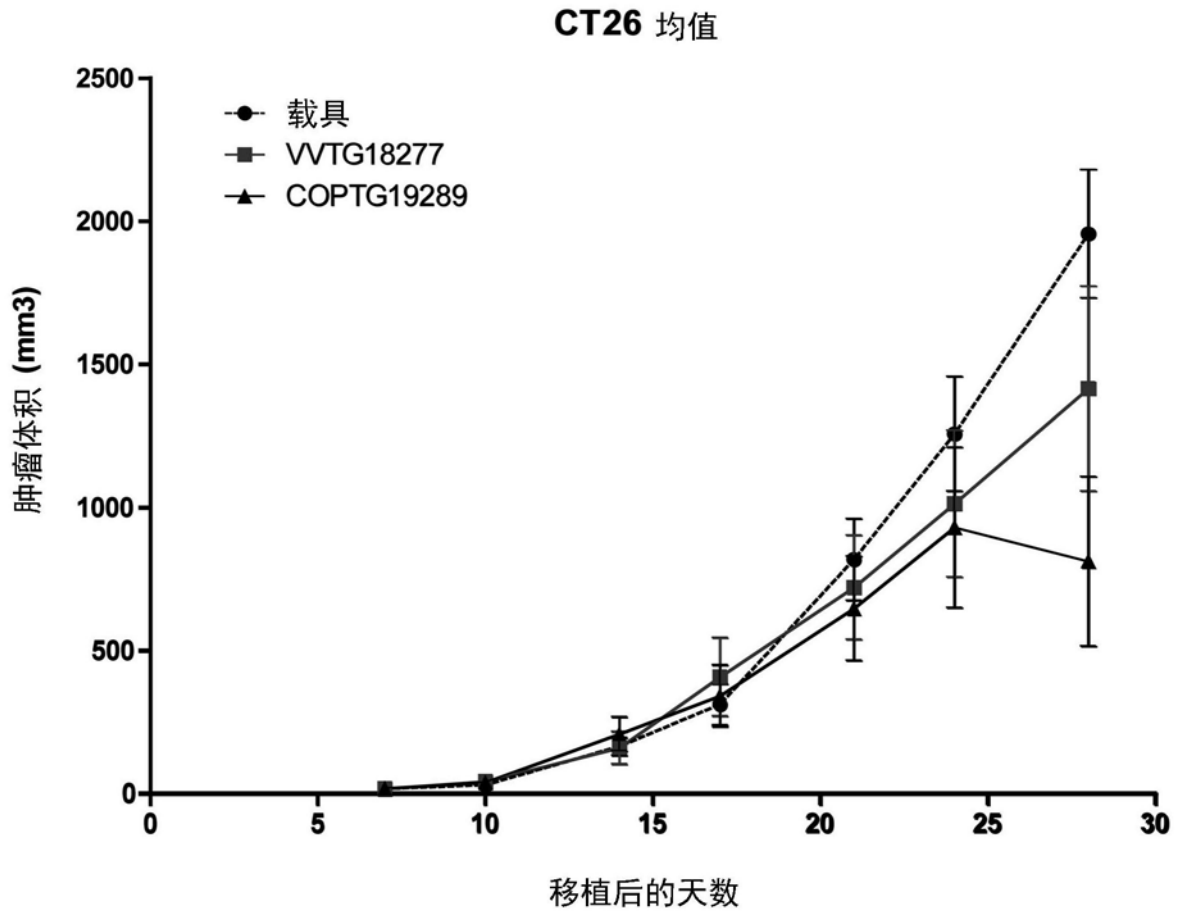


图9

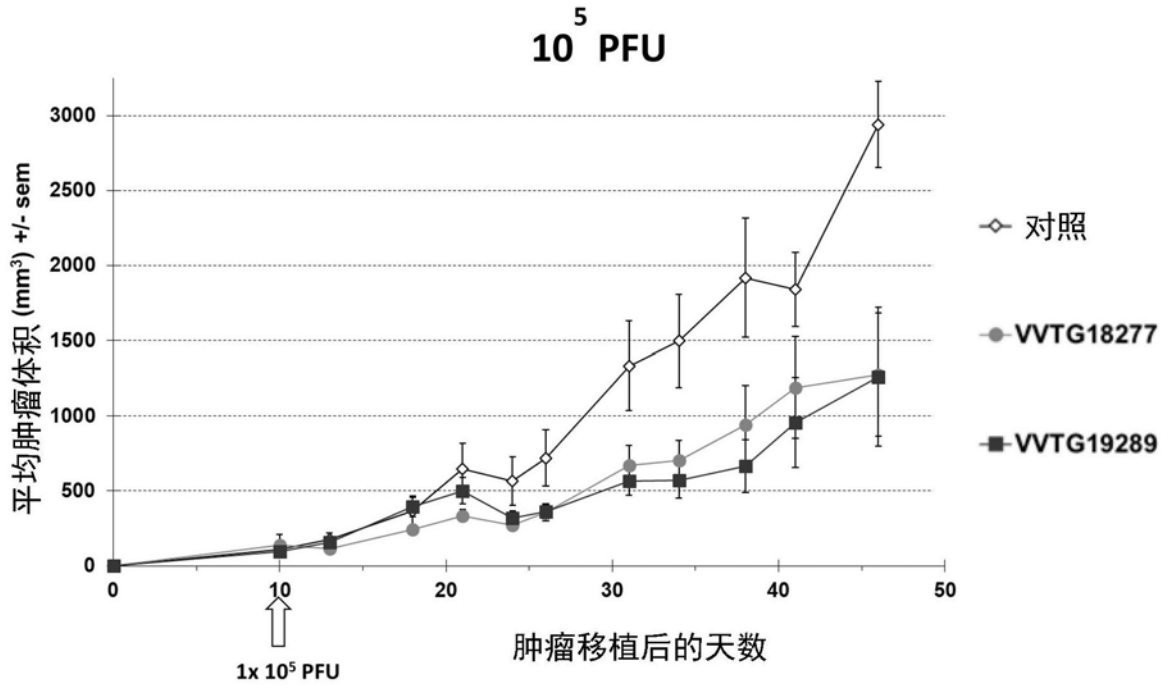


图10A

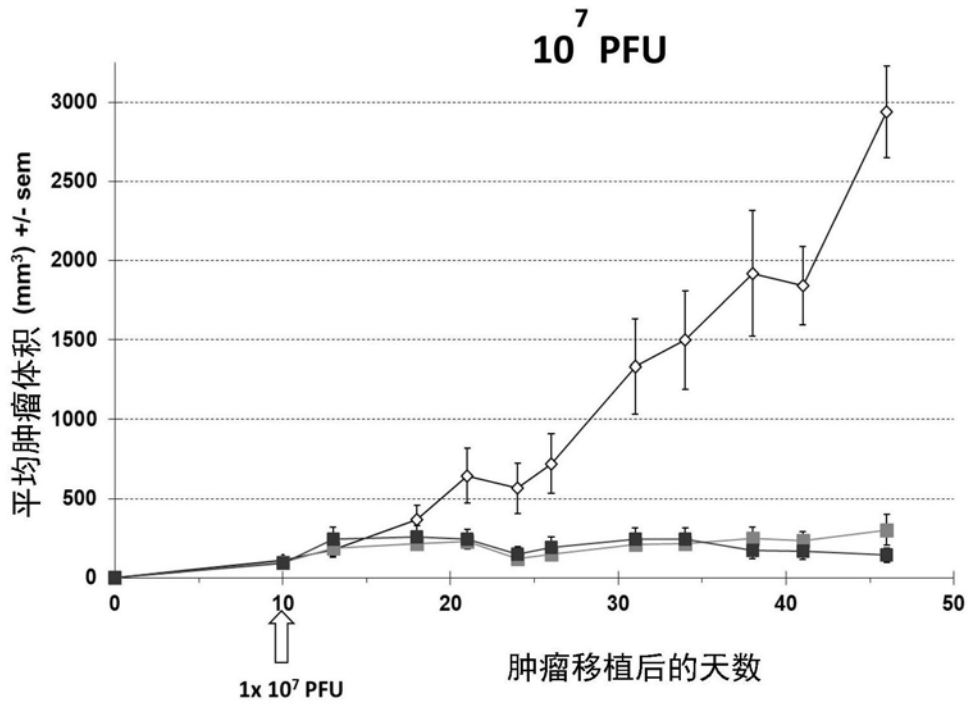


图10B

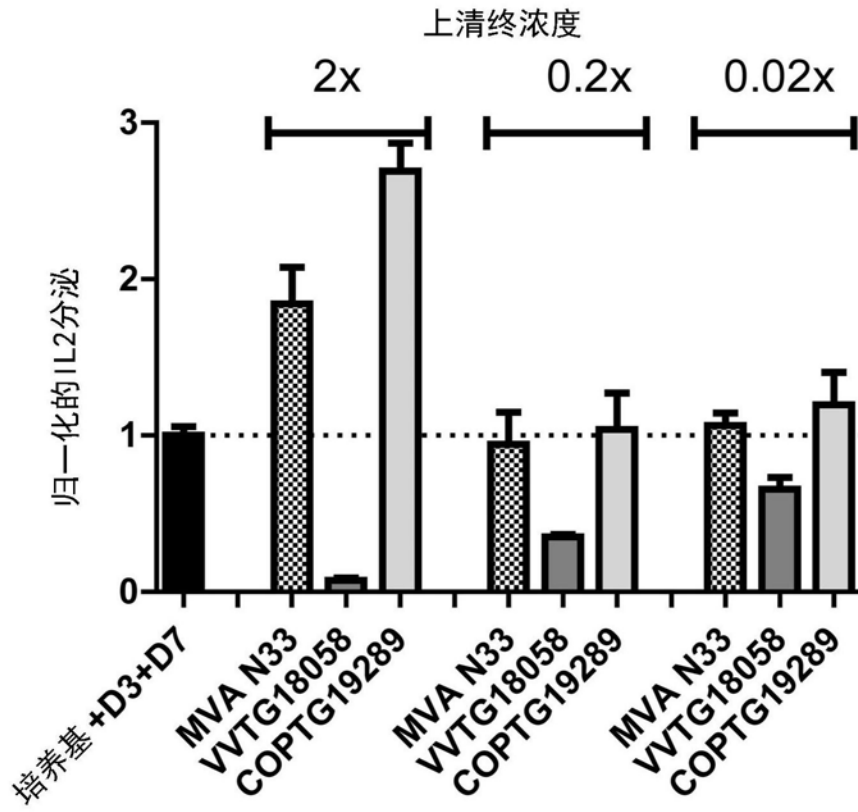


图11

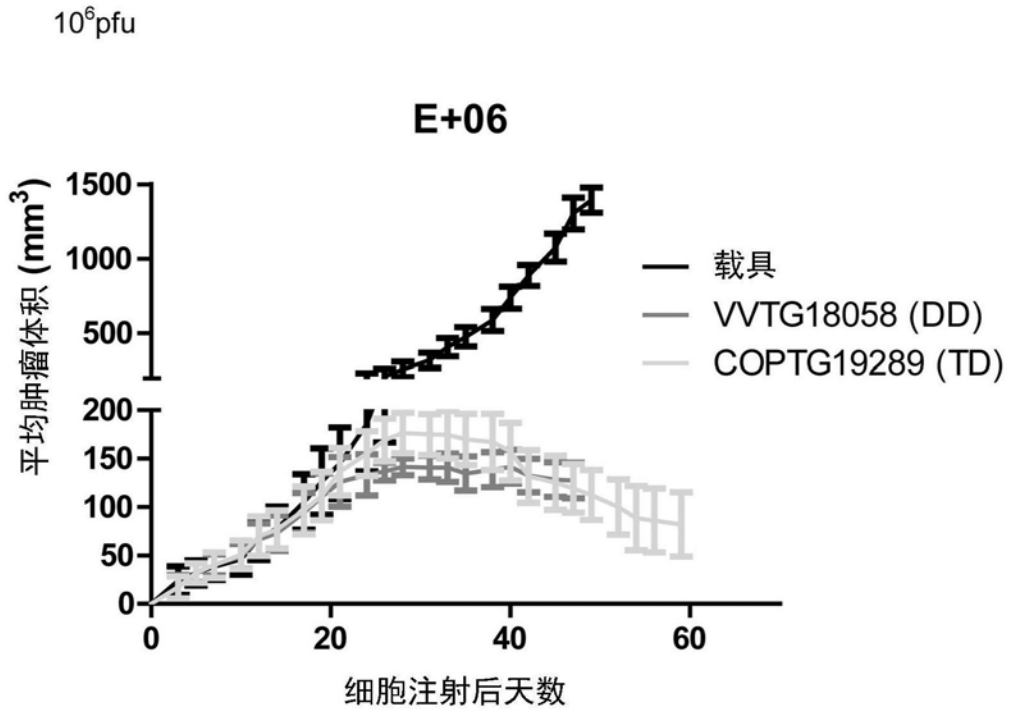


图12A

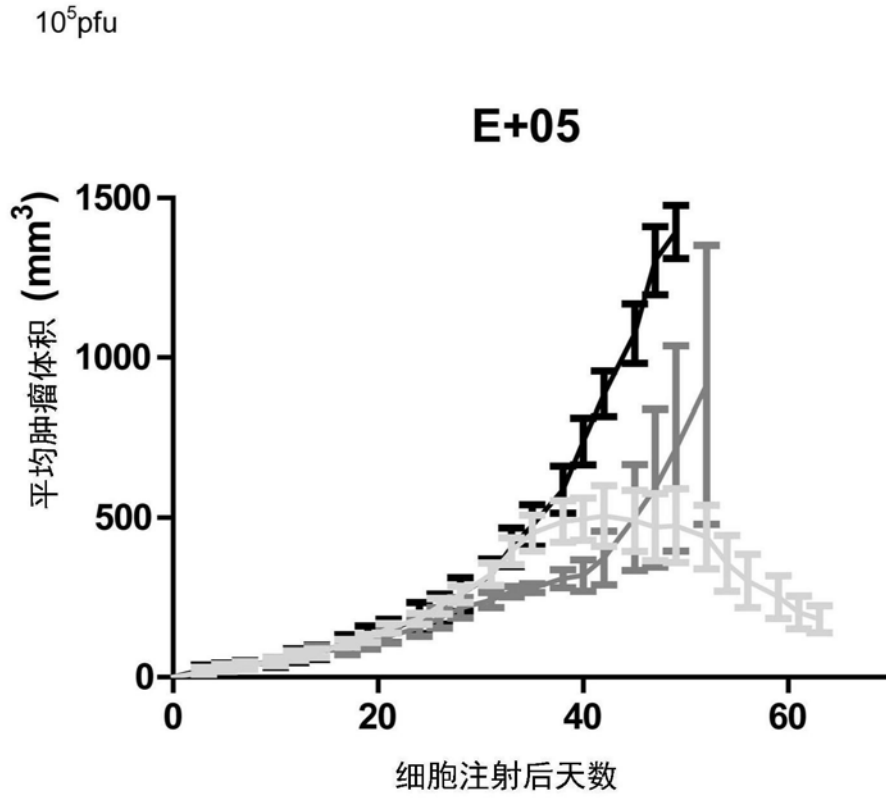


图12B

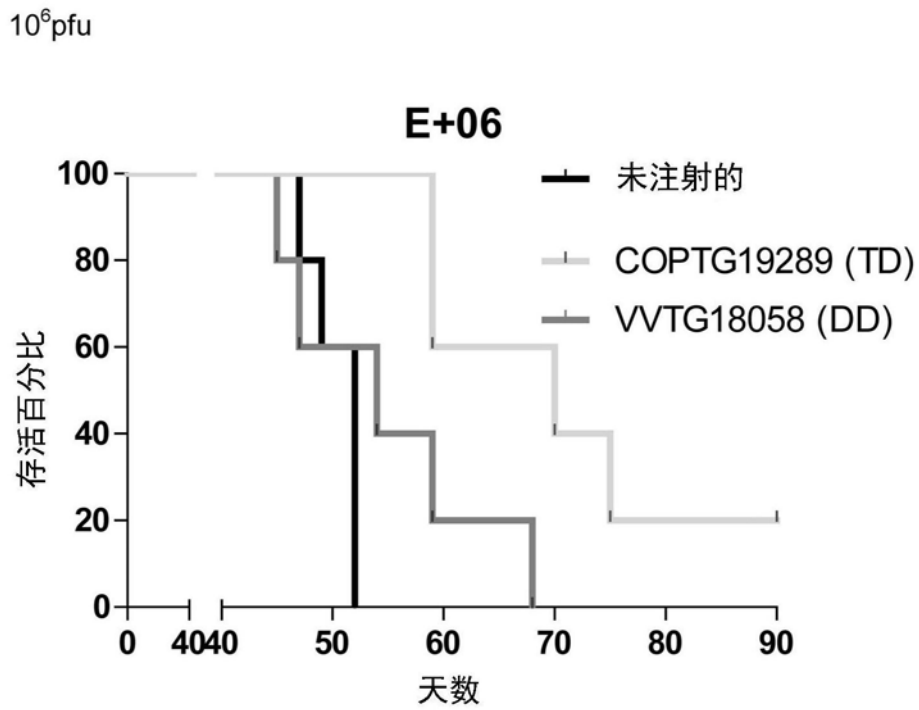


图13A

10^5 pfu

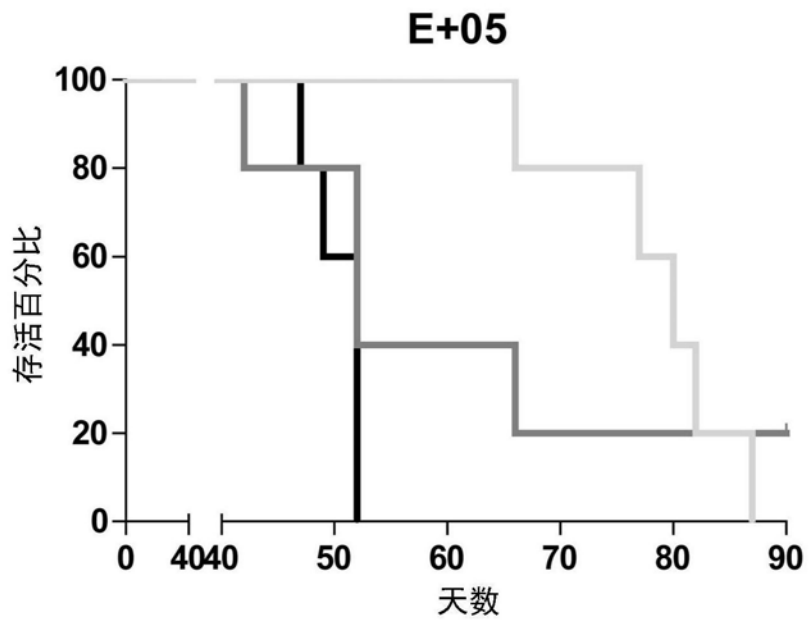


图13B