



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104427992 B

(45)授权公告日 2017.12.19

(21)申请号 201380010639.1

埃米·亨伯格

(22)申请日 2013.01.25

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104427992 A

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(43)申请公布日 2015.03.18

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

A61K 38/19(2006.01)

61/590,441 2012.01.25 US

A61K 31/00(2006.01)

61/637,191 2012.04.23 US

C12N 15/86(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.08.22

(56)对比文件

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/023304 2013.01.25

Kim CH et al..Enhanced antitumor immunity by combined use of temozolomide and TAT-survivin pulsed dendritic cells in a murine glioma.《Immunology》.2007,第122卷(第4期),615-622.

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/112942 EN 2013.08.01

Jarnagin WR et al..Neoadjuvant treatment of hepatic malignancy:an oncolytic herpes simplex virus expressing IL-12 effectively treats the parent tumor and protects against recurrence-after resection.《Cancer gene ther》.2003,第10卷(第3期),摘要,材料和方法,结果,讨论.

(73)专利权人 德那翠丝有限公司
地址 美国德克萨斯州
专利权人 德克萨斯州大学系统董事会

审查员 王胜佳

(72)发明人 弗兰克·图法罗 查尔斯·康拉德
胡安·富埃约-马加雷托
弗雷德里克·兰
坎德拉里亚·戈麦斯-曼扎诺
W·K·阿尔弗雷德·扬

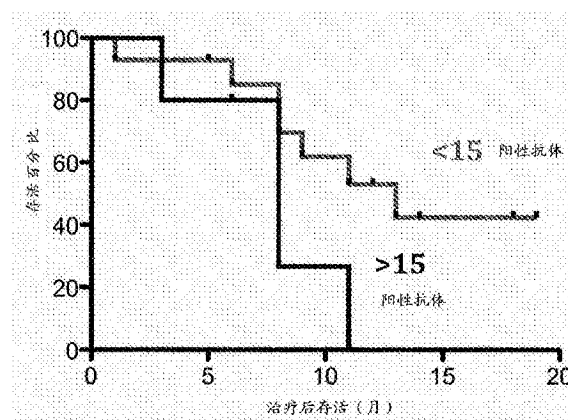
权利要求书2页 说明书39页 附图5页

(54)发明名称

生物标志物及使用溶瘤病毒和免疫调节剂的组合法

(57)摘要

本文所公开的发明描述了生物标志物,其可用于患有多种类型癌症的患者的溶瘤病毒治疗的预后、选择和监测。特别地,本发明提供了对其表达模式强烈预示着癌症患者中溶瘤病毒治疗结果的蛋白质的鉴定。本发明提供了用于鉴定和选择可能不响应于溶瘤病毒治疗的癌症患者的方法。可向这些患者共施用在所述患者中刺激细胞介导免疫应答的药剂和所述溶瘤病毒,或者可施用溶瘤病毒治疗以外的治疗。



CN 104427992 B

1. (a) 选自IL-12p70、IL-2或IFN- γ 的Th1细胞因子或提高一种或更多种所述Th1细胞因子的产生的药剂;

(b) 选自Delta-24和Delta-24-RGD的溶瘤病毒;以及任选地

(c) 抑制调节性T细胞和/或刺激细胞介导免疫应答的药剂,

在制备用于治疗患有或怀疑患有神经胶质瘤之患者中的神经胶质瘤的药物中的用途。

2. 权利要求1所述的用途,其中所述细胞因子或所述提高一种或更多种Th1细胞因子的产生的药剂选自重组IL-12p70、重组IFN- γ 、雷利米得和来那度胺。

3. 权利要求1或2所述的用途,其中所述抑制调节性T细胞的药剂选自:替莫唑胺(4-甲基-5-氧代-2,3,4,6,8-五氮杂双环[4.3.0]壬-2,7,9-三烯-9-甲酰胺)、环磷酰胺((RS)-N,N-双(2-氯乙基)-1,3,2-oxazaphosphinan-2-胺-2-氧化物)、洛莫司汀(CCNU;N-(2-氯乙基)-N'-环己基-N-亚硝基脒)、双-氯乙基亚硝基脒(BCNU)、美法仑盐酸盐(4[双(氯乙基)氨基]苯丙氨酸)、白消安(丁烷-1,4-二基二甲磺酸酯)、氮芥、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺、链脲霉素、达卡巴嗪、塞替派、六甲蜜胺、顺铂、卡铂和奥沙利铂。

4. 权利要求1或2所述的用途,其中所述刺激细胞介导免疫应答的药剂选自:CTLA-4拮抗剂;PD-1/PD-L1受体拮抗剂;特异性结合B7-H3的抗体;以及吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂。

5. 权利要求4所述的用途,其中所述CTLA-4拮抗剂为伊匹单抗或Tremelimumab。

6. 权利要求4所述的用途,其中所述PD-1/PD-L1受体拮抗剂为MDX-1106、MK-3475、AMP-224、Pidilizuma或MDX-1105。

7. 权利要求4所述的用途,其中所述特异性结合B7-H3的抗体为MGA271。

8. 权利要求4所述的用途,其中所述吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂为D-1-甲基-色氨酸(Lunate)。

9. 权利要求1或2所述的用途,其中所述刺激细胞介导免疫应答的药剂还选自:BMS-663513、CP-870,893、OX40(CD 134)激动剂、CDX-1127、CD47/SIRP α 拮抗剂、(9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-六氢-10-羟基-10-(羟甲基)-9-甲基-9,12-环氧-1H-二吲哚并[1,2,3-fg:321k1]吡咯并[3,4-i][1,6]苯并二氮芳辛-1-酮、11-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-14,19-二氧杂-5,7,26-三氮杂-四环[19.3.1.1(2,6).1(8,12)]二十七-1(25),2(26),3,5,8,10,12(27),16,21,23-癸烯、3-[(3R,4R)-4-甲基-3-[甲基(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基]哌啶-1-基]-3-氧丙腈、((3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)吡啶-1-基]丙腈、N-(氰基甲基)-4-[2-(4-吗啉代苯胺基)嘧啶-4-基]苯甲酰胺、2-[1-乙基磺酰基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)吡啶-1-基]氮杂环丁烷-3-基]乙腈和N-叔丁基-3-[5-甲基-2-[4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基氨基]-苯磺酰胺。

10. 权利要求1所述的用途,其中通过瘤内施用所述病毒。

11. 权利要求1所述的用途,其中以单次剂量施用所述病毒。

12. 权利要求1所述的用途,其中以 1×10^6 至 1×10^{13} 噬斑形成单位(pfu)的剂量施用所述病毒。

13. 权利要求12所述的用途,其中以 1×10^8 至 1×10^{12} 噬斑形成单位(pfu)的剂量施用所述病毒。

14. 权利要求1所述的用途,其中在所述病毒之前向所述患者施用所述Th1细胞因子或

提高一种或更多种所述Th1细胞因子的产生的药剂或抑制调节性T细胞的药剂或刺激细胞介导免疫应答的药剂。

15. 权利要求1所述的用途,其中在所述病毒之后向所述患者施用所述Th1细胞因子或提高一种或更多种所述Th1细胞因子的产生的药剂或抑制调节性T细胞的药剂或刺激细胞介导免疫应答的药剂。

生物标志物及使用溶瘤病毒和免疫调节剂的组合疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2012年1月25日提交的美国临时专利申请No.61/590,441和于2012年4月23日提交的美国临时专利申请No.61/637,191的权益,每个专利申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 背景

I. 技术领域

[0004] 本发明一般地涉及肿瘤和癌症治疗领域。在一些方面,本发明关注于包括溶瘤病毒(如腺病毒)和免疫调节治疗的组合疗法。在另一些方面,本发明关注于测量或检测区分溶瘤病毒治疗的响应者和非响应者的生物标志物。

II. 背景技术

[0005] 据估计,2005年在美国诊断了43,800例恶性和非恶性两种原发性脑肿瘤的新增病例。据估计,2007年预计有20,500例原发性恶性脑肿瘤,其包括42%的星形细胞瘤。这是一种男性更占主导的疾病,据估计2007年男性中为11,700例,女性中为8,800例。2007年,在美国估计有约12,700人死于源自这些肿瘤的脑疾病。这些肿瘤占全部成人癌症的1.4%,和全部儿童癌症的22%。这占全部癌症相关死亡的2.4%(SEER Cancer Statistics Review)。

[0006] 溶瘤病毒已经表现出了作为抗癌剂的潜力。对病毒进行遗传修饰以选择性地在癌细胞中复制进一步增强了其效力。例如,在神经胶质瘤中,已经显示三种病毒可用在动物模型中:呼肠孤病毒,其可通过激活的ras途径选择性地在肿瘤中复制(Coffey等,1998);经遗传改变的单纯疱疹病毒(Martuza等,1991;Mineta等,1995;Andreanski等,1997),包括可通过在正常细胞和癌细胞中蛋白质的差异表达而被激活的那些(Chase等,1998);以及无法表达E1B55kDa蛋白质的突变腺病毒,其可用于治疗p53-突变肿瘤(Bischof等,1996;Heise等,1997;Freytag等,1998;Kim等,1998)。在全部三种体系中,目标是病毒的瘤内传播和选择性地杀死癌细胞的能力。以靶向细胞途径中关键点的经遗传修饰的腺病毒在神经胶质瘤中具有强效和选择性抗癌作用二者。频繁测试的腺病毒的修饰包括缺失与肿瘤抑制基因相互作用的病毒基因,改变向性以更强效地感染癌细胞,以及在病毒基因组中包含对癌细胞中上调的转录因子敏感的转录元件。

[0007] 目前尚不知道已有免疫条件的作用及其对溶瘤病毒治疗的整体临床结果的影响。对使用溶瘤病毒(如Delta-24-RGD)治疗的患者的存活情况的准确预测能力可改善现有治疗决策。此外,其将有助于设计基于肿瘤性质和免疫状态而可定制的新疗法。在生物治疗领域将出现重大的进步,因为目前严重缺乏用于癌症免疫治疗策略的临床生物标志物。

[0008] 对有效对抗神经系统的原发性肿瘤的治疗的需求特别迫切,所述神经系统原发性肿瘤例如:弥漫性神经胶质瘤、间变性星形细胞瘤、间变性少突神经胶质瘤、间变性混合的少突星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、室管膜瘤和间变性室管膜瘤或任何原发性脑肿瘤。

发明内容

[0009] 本发明涉及鉴定Th1 (炎性) 细胞因子和抗肿瘤相关抗原的抗体作为生物标志物, 以将其表达模式作为预测因子而与癌症患者对溶瘤病毒治疗的响应性相关联。因此本发明提供了表达谱的鉴定和使用, 所述表达谱与具有好或差治疗结果的患者相关联(从而能够区分具有好或差治疗结果的患者)。在数个实施方案中, 本发明提供了能够鉴定可能不响应于使用溶瘤病毒治疗的癌症患者和响应于或很可能响应于使用溶瘤病毒治疗的癌症患者的表达模式。可根据随时间更好的存活结果来观察响应性。也可根据肿瘤尺寸(例如, 根据RECIST标准)的减少来观察响应性。

[0010] 本发明还涉及用于治疗癌症患者的新方法, 其包括共施用溶瘤病毒和刺激患者中的Th1免疫应答和/或抑制Th2免疫应答和/或抑制患者中的调节性T细胞的药剂。

[0011] 在一个方面中, 本发明提供了通过分析本文所述一种或更多种生物标志物的表达水平来鉴定很可能响应于或不太可能响应于使用溶瘤病毒治疗的癌症患者的客观手段。因此, 这些生物标志物的表达提供了具有高准确度的确定癌症预后(治疗结果)的客观手段。这些生物标志物可与主观标准组合使用。

[0012] 本文所述生物标志物被鉴定为与癌症患者中的溶瘤病毒治疗结果相关, 因此其表达水平关系到合适治疗方案的确定。在一个实施方案中, 所述患者是患有高级神经胶质瘤的患者, 而所述溶瘤病毒是腺病毒, 例如Delta-24-RGD。

[0013] 本文所述生物标志物可高准确度地单独使用, 或以任意组合(例如, 以表达水平的比率的形式)使用以提高使表达谱与治疗结果准确关联的能力。所述生物标志物可用于预测治疗响应性、存活结果以及确定和/或改变治疗。赋予鉴定很可能响应于或不太可能响应于溶瘤病毒治疗的患者的能力是通过对生物标志物之表达水平的鉴定, 而不是通过用来测定该表达水平的方法。因此, 测定可利用本文所述生物标志物的任何特征, 只要所述测定提供对蛋白质(或基因)的定性或优选定量表达即可。举例来说, 可通过多种方法测量或检测生物标志物, 所述方法包括但不限于免疫组织化学(IHC)、免疫测定、蛋白质阵列、反向蛋白质阵列、核酸阵列、质谱、聚合酶链式反应(PCR)等。

[0014] 在数个实施方案中, 提供了用于预测患有或怀疑患有癌症的患者是否将对包括施用溶瘤病毒的癌症治疗方法具有治疗响应的方法, 其包括以下步骤: (a) 相对于对照, 测定来自所述患者的测试样品中一种或更多种Th1生物标志物和/或一种或更多种Th2生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的一种或更多种抗体的表达水平, (b) 将所述测试样品中一种或更多种Th1生物标志物和/或一种或更多种Th2生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的一种或更多种抗体的表达水平与对照中的表达水平进行比较, 其中所述测试样品中一种或更多种Th1生物标志物和/或一种或更多种Th2生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的表达水平相对于对照样品的改变预示了患者对溶瘤病毒的治疗响应。所述测试样品包括但不限于: 血液、血浆、血清、组织活检物和脑脊液。在相关实施方案中, 所述方法包括在步骤(a)中测定至少一种Th1生物标志物的水平和抗至少一种肿瘤相关抗原的抗体的水平以及在步骤(b)中将这此水平与对照进行比较。

[0015] 可在施用溶瘤病毒之前、施用溶瘤病毒的同时和施用溶瘤病毒之后测定一种或更多种生物标志物的表达水平以预测治疗结果。在一个实施方案中, 提供了用于治疗患者中

的癌症的方法,其包括:(a)相对于对照,测定在施用溶瘤病毒之前获得的来自患者的测试样品中一种或更多种Th1生物标志物和/或一种或更多种Th2生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的一种或更多种抗体的表达水平;(b)将所述测试样品中一种或更多种Th1生物标志物和/或一种或更多种Th2生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的一种或更多种抗体的表达水平与对照中的表达水平进行比较,其中所述测试样品中一种或更多种Th1生物标志物和/或一种或更多种Th2生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的表达水平相对于对照样品的改变预示了所述患者对溶瘤病毒的治疗响应;以及任选地(c)如果确定所述患者很可能响应于使用病毒的治疗,则向所述患者施用溶瘤病毒。在一个优选实施方案中,溶瘤病毒是腺病毒,例如Delta-24-RGD,测试样品是血清样品,并且测定样品中IL-12p70和任选的至少一种另外的Th1生物标志物的水平并与对照比较。

[0016] 在一个相关实施方案中,如果相对于对照在测试样品中测定出低水平的一种或更多种Th1生物标志物(例如,IL-12p70)和/或高水平的抗一种或更多种肿瘤相关抗原(例如,NLRP4)的抗体,则确定患者不太可能响应于溶瘤病毒治疗。例如,上述步骤(b)可包括相对于来自患有相同癌症并且响应于使用溶瘤病毒的治疗的对象的一种或更多种Th1生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的水平,检测测试样品中一种或更多种Th1生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的水平,其中在患有相同癌症并且响应于治疗的对象中更低水平的一种或更多种Th1生物标志物和/或更高水平的抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体表明所述患者不响应于使用溶瘤病毒的治疗。优选地,在相同的时间点采集来自患者的测试样品和来自对象的样品。因此,本文所述生物标志物的表达模式可用于鉴定不太可能响应于使用溶瘤病毒的治疗的存在癌症患者。因此,这些患者被鉴定为是用于共施用刺激Th1免疫应答的药剂和溶瘤病毒的良好候选。或者,这些患者被鉴定为是用于替代治疗方式的良好候选。

[0017] 在另一个相关实施方案中,如果相对于对照在测试样品中测定出高水平的一种或更多种Th1生物标志物(例如IL-12p70)和/或低水平的抗一种或更多种肿瘤相关抗原(例如NLRP4)的抗体,则确定所述患者很可能响应于溶瘤病毒治疗。例如,上述步骤(b)可包括:相对于来自患有相同癌症并不响应于使用溶瘤病毒的治疗的对象的一种或更多种Th1生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的水平,检测所述测试样品中一种或更多种Th1生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的水平,其中患有相同癌症并且不响应于治疗的对象中更高水平的一种或更多种Th1生物标志物和/或更低水平的抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体表明所述患者响应于使用溶瘤病毒的治疗。优选地,在相同的时间点采集来自患者的测试样品和来自对象的样品。因此,本文所述生物标志物的表达模式可用于鉴定很可能响应于使用溶瘤病毒的治疗的存在癌症患者。这些患者是施用溶瘤病毒的良好候选,并且可施用所述病毒。

[0018] 在另一些实施方案中,提供了用于评估患有癌症的患者对溶瘤病毒治疗的响应性的方法,其包括:(a)测量或检测来自对象的测试样品中指示所述对象的免疫状态的一种或更多种生物标志物(b)基于所述一种或更多种生物标志物的水平鉴定很可能或不太可能响应于所述治疗的患有癌症的对象,其中如果对象的免疫状态指示Th1极化,则很可能是有利的响应;以及任选地(c)如果很可能是有利的响应,则对所述对象施用溶瘤病毒治疗。在某些方面,所述生物标志物是细胞因子、细胞表面标记或抗体。

[0019] 在一个方面,用于预测对象将对通过施用溶瘤病毒之癌症治疗方法的治疗响应之可能性的方法包括以下步骤:(a)在施用病毒之前测量适于测定对象的Th1和/或Th2免疫状态的至少一种生物标志物的表达水平;(b)将步骤(a)的表达水平与预定对照比较,通过Th1免疫状态的一种或更多种生物标志物相对于对照的增加和/或Th2免疫状态的一种或更多种生物标志物相对于对照的降低表明对象对所述癌症治疗方法治疗响应之可能性增加;以及任选地(c)如果表明响应的可能性增加,则向对象施用溶瘤病毒。

[0020] 在另一个方面,在多个时间点评估癌症患者中一种或更多种生物标志物的表达水平,将其作为预测患者的临床结果的手段,其中所述患者在进行溶瘤病毒治疗。该方法包括测量一段时间内来自所述患者的两份或更多份测试样品中至少一种Th1生物标志物和/或抗至少一种肿瘤相关抗原的抗体,以确定是应该继续使用溶瘤病毒对所述患者进行治疗还是将所述患者作为共施用产生Th1表型的药剂的候选。与较早时间点相同Th1生物标志物和/或抗体的水平相比,至少一种Th1生物标志物的减少和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的增加表明患者处于不利结果的风险中。或者,与进行相同治疗的另一患者中一种或更多种相同Th1生物标志物和/或抗体的水平相比,至少一种Th1生物标志物的减少和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的增加表明患者处于不利结果的风险中。因此,在一个实施方案中,提供了用于治疗患有或怀疑患有癌症的患者中癌症的方法,其包括:(a)施用溶瘤病毒;(b)测量第一时间点和随后第二时间点的一种或更多种Th1生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的水平;以及(c)将第一时间点和第二时间点的一种或更多种Th1生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤抗原的抗体的水平进行比较,其中与第一时间点相比或与患有相同癌症并施用相同溶瘤病毒的另一患者中相同Th1生物标志物和/或抗体的水平相比,第二时间点一种或更多种Th1生物标志物的减少和/或抗一种或更多种肿瘤抗原的抗体的增加表明患者不响应于使用溶瘤病毒的治疗。在被鉴定为对病毒不响应的患者中,可停止溶瘤病毒治疗;或者,可向所述患者共施用产生Th1表型的一种或更多种药剂和所述病毒。

[0021] 在一个方面,Th1免疫状态的生物标志物(即,Th1生物标志物)包括但不限于:免疫调节剂,例如IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 、GM-CSF、切割的胱天蛋白酶-3(cleaved caspase-3)、新喋呤和 β 2-微球蛋白。根据本文所述方法,Th1生物标志物可单独使用或任意组合使用。在一个优选实施方案中,测量来自患者的测试样品中选自IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 、GM-CSF、切割的胱天蛋白酶-3、新喋呤和 β 2微球蛋白的至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种或全部12种Th1生物标志物的表达。在一个特别优选的实施方案中,测量来自患者的测试样品中IL-12和任选地选自IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-18、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 、GM-CSF、切割的胱天蛋白酶-3、新喋呤和 β 2微球蛋白的至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种或至少10种生物标志物的表达。在另一些优选实施方案中,测量来自患者的测试样品中选自IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF和切割的胱天蛋白酶-3的至少1、2、3、4、5、6、7种或全部8种Th1生物标志物的表达。相对于预定对照,任意(优选大部分或全部)这些生物标志物提高的表达表明患者响应于溶瘤病毒治疗的可能性增加。应理解的是,如果评估了来自患者的测试样品中的例如10种Th1生物标志物,则这些生物标志物中高水平的1、2、3、4、5、6、7、8或9种(任

意组合)或者高水平的全部10种这些生物标志物表明患者很可能有利地响应于溶瘤病毒治疗。

[0022] 在另一些方面, Th2免疫状态的生物标志物(即, Th2生物标志物)包括但不限于: IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、TGF- β 和磷酸化的STAT3。根据本文所述方法, Th2生物标志物可单独使用或任意组合使用。优选地, 测量来自患者的测试样品中选自IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、TGF- β 和磷酸化的STAT3的至少一种、至少2、3、4、5种或至少6种Th2生物标志物。应理解的是, 如果评估了来自患者的测试样品中的例如5种Th2生物标志物, 则高水平的1、2、3或4种(任意组合)这些生物标志物或者高水平全部5种这些生物标志物表明患者不太可能有利地响应于溶瘤病毒治疗。

[0023] 在相关实施方案中, 根据本发明方法测量来自患者的测试样品中选自IL1 β 、IL-2、IL-8、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF和切割的胱天蛋白酶-3的至少1、2、3、4、5、6、7种或全部8种Th1生物标志物以及选自IL-6、IL-10和磷酸化的STAT3(Tyr705)的至少一种、至少两种或全部三种Th2生物标志物的表达。在一个特别优选的实施方案中, 所述方法包括测量IL-12和任选地选自IL1 β 、IL-2、IL-8、IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 和切割的胱天蛋白酶-3的至少1、2、3、4、5、6种或全部7种生物标志物的表达, 并且测量选自IL-6、IL-10和磷酸化的STAT3(Tyr705)的至少1、2种或全部3种生物标志物的表达。相对于预定对照, 任意(优选全部)Th1生物标志物提高的表达以及任意(优选全部)Th2生物标志物类似或降低的表达表明对象响应于溶瘤病毒治疗的可能性增加。优选地, 计算Th1生物标志物和Th2生物标志物的表达, 并计算Th1/Th2生物标志物表达的比率, 通过比预定对照高的比率表明对象响应于溶瘤病毒治疗的可能性增加。例如, 比率大于0.2、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0或更大表明对象响应于溶瘤病毒治疗的可能性增加。在一个相关实施方案中, 所述方法包括测量来自对象的测试样品中IL-12和任选的IL-6或IL-10的表达, 其中相对于预定对照IL-12/IL-6和/或IL-12/IL-10表达比率的提高表明对象响应于溶瘤病毒治疗的可能性增加。

[0024] 在另一个方面, Th1免疫状态的生物标志物包括细胞表面标记, 包括但不限于: CXCR3、CCR5、CCR1和IL-12受体 β 1和 α 链。在另一些方面, Th2免疫状态的生物标志物包括但不限于细胞表面标记, 包括但不限于: CXCR4、CCR3、CCR4、CCR7、CCR8、IL-1受体和CD30。

[0025] 在另一个方面, 可被测量来作为确定癌症患者的免疫状态的手段生物标志物包括但不限于抗肿瘤相关抗原(例如, 癌症/睾丸抗原)的抗体, 所述肿瘤相关抗原选自: BRAF、CABYR、CRISP3、CSAG2、CTAG2、DHFR、FTHL17、GAGE1、LDHC、MAGEA1、MAGEA3、MAGEA4、MAGEB6、MAPK1、MICA、MUC1、NLRP4、NYES01、P53、PBK、PRAME、SOX2、SPANXA1、SSX2、SSX4、SSX5、TSGA10、TSSK6、TULP2、XAGE2和ZNF165。根据本文所述方法, 抗肿瘤相关抗原抗体生物标志物可单独使用或任意组合使用。因此, 根据本文所述方法, 可测量测试样品中抗选自以下肿瘤相关抗原的至少1种、至少2种、至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29种或至少30种抗体的表达水平: BRAF、CABYR、CRISP3、CSAG2、CTAG2、DHFR、FTHL17、GAGE1、LDHC、MAGEA1、MAGEA3、MAGEA4、MAGEB6、MAPK1、MICA、MUC1、NLRP4、NYES01、P53、PBK、PRAME、SOX2、SPANXA1、SSX2、SSX4、SSX5、TSGA10、TSSK6、TULP2、XAGE2和ZNF165。优选地, 测量来自患者的测试样品中抗选自以下肿瘤相关抗原的至少1种、至少2、3、4、5、6、7、8种或至少9种抗体的表达水平: CABYR、MAGEA1、MAGEA3、MAGEB6、NLRP4、NYES01、PBK、SSX2、SSX5和ZNF165。在相关实施方案中, 测量来自对象的测试样品中

抗NLRP4和任选地选自CABYR、MAGEA1、MAGEA3、MAGEB6、NYESO1、PBK、SSX2、SSX5和ZNF165的至少1、2、3、4、5、6、7种或至少8种肿瘤相关抗原的抗体的表达水平。与对照水平相比,这些肿瘤相关抗原中一种或更多种的高表达水平表明患者不太可能响应于溶瘤病毒治疗。应理解的是,如果评估来自患者的测试样品中例如抗9种肿瘤相关抗原的抗体(生物标志物),则高水平的1、2、3、4、5、6、7或8种这些生物标志物(以任意组合)或者高水平的全部9种这些生物标志物表明患者不太可能有利地响应于溶瘤病毒治疗。

[0026] 在相关实施方案中,根据本发明方法,测量来自患者的测试样品中选自IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF和切割的胱天蛋白酶-3的至少1、2、3、4、5、6、7种或全部8种Th1生物标志物的表达以及抗选自BRAF、CABYR、CRISP3、CSAG2、CTAG2、DHFR、FTHL17、GAGE1、LDHC、MAGEA1、MAGEA3、MAGEA4、MAGEB6、MAPK1、MICA、MUC1、NLRP4、NYESO1、P53、PBK、PRAME、SOX2、SPANXA1、SSX2、SSX4、SSX5、TSGA10、TSSK6、TULP2、XAGE2和ZNF165的至少1种、至少2种、至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29种或至少30种肿瘤相关抗原的抗体的表达水平。在一个特别优选的实施方案中,所述方法包括测量IL-12和任选地选自IL-1 β 、IL-2、IL-8、IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 和切割的胱天蛋白酶-3的至少1、2、3、4、5、6种或全部7种生物标志物的表达,以及测量抗选自CABYR、MAGEA1、MAGEA3、MAGEB6、NLRP4、NYESO1、PBK、SSX2、SSX5和ZNF165的至少1、至少2、3、4、5、6、7、8种或至少9种肿瘤相关抗原的抗体的表达。相对于预定对照,任意(优选全部)Th1生物标志物提高的表达和/或任意(优选全部)抗肿瘤相关抗原的抗体降低的表达表明对象响应于溶瘤病毒治疗的可能性提高。

[0027] 在一个优选实施方案中,获自患者的测试样品是血清样品,并通过例如ELISA测定IL-12和任选地至少一种另外的Th1生物标志物的水平。可选地或附加地,测量来自患者的血清样品中至少一种Th2生物标志物的水平和/或抗NLRP4和任选地至少一种另外的肿瘤相关抗原的抗体的水平。

[0028] 在又一个方面,在溶瘤病毒治疗之前或期间,通过测量来自患者的测试样品(例如,血清)中一种或更多种Th1生物标志物的水平和抗上述一种或更多种肿瘤抗原的抗体水平来确定患者的免疫状态。因此,与Th1生物标志物和抗一种或更多种肿瘤抗原的抗体的对照水平相比,具有低水平的一种或更多种Th1生物标志物(例如,IL-12)和高水平的抗一种或更多种肿瘤抗原(例如,NLRP4)的抗体的患者不太可能响应于溶瘤病毒治疗。相反地,与对照水平相比,具有高水平的一种或更多种Th1生物标志物和低水平的抗一种或更多种肿瘤抗原的抗体的患者很可能有利地响应于溶瘤病毒治疗。

[0029] 在另一些相关方面,所述方法包括从来自对象的组织样品中分离淋巴细胞。在一个方面,测量CD4⁺和CD8⁺T细胞的浓度(例如在利用抗CD4和抗CD8抗体处理后通过流式细胞术分析)并计算测试样品中CD8⁺/CD4⁺细胞的比率,通过相对于预定对照的测试样品中CD8⁺/CD4⁺细胞比率的增加表明对象将响应于溶瘤病毒治疗的可能性增加。在另一个方面,从来自对象的组织样品中分离淋巴细胞并计算FoxP3⁻/FoxP3⁺细胞的比率,通过相对于预定对照的测试样品中FoxP3⁻/FoxP3⁺细胞比率的增加表明对象将响应于溶瘤病毒治疗的可能性增加。FoxP3主要在调节性T细胞上表达并因此作为调节性T细胞的标志物,调节性T细胞的作用是抑制细胞介导的免疫。任选地,测量FoxP3以及CD25和CD4,作为用于测定调节性T细胞水平的方法。可利用例如抗FoxP3、抗CD4、抗CD8、抗CD38和抗HLA-DR抗体来检测CD4⁺、CD8⁺

或调节性T细胞。T细胞亚群特异的表面标志物谱是本领域中已知的。

[0030] 在相关方面,所述方法包括测量来自对象的至少一个测试样品的:(i) CD4⁺细胞、CD8⁺细胞和任选地FOXP3⁺细胞相对于样品中的总淋巴细胞的百分比和(ii) 抗至少一种肿瘤相关抗原的抗体的水平和/或(iii) 至少一种Th1生物标志物的水平,通过大于总淋巴细胞的50%、60%、70%、80%或90%的CD4⁺和/或FoxP3⁺细胞的百分比和相对于预定对照高水平的抗至少一种肿瘤相关抗原的抗体和/或低水平的Th1生物标志物表明对象不太可能响应于溶瘤病毒治疗。相反地,相对于CD4⁺和/或FoxP3⁺细胞更高百分比的CD8⁺细胞和/或相对于预定对照低水平的抗至少一种肿瘤相关抗原的抗体和/或高水平的Th1生物标志物表明对象很可能响应于溶瘤病毒治疗。

[0031] 在另一个实施方案中,提供了用于治疗对象中的癌症的方法,其包括以下步骤:(a) 在治疗器向所述对象施用溶瘤病毒;(b) 在治疗期中至少两次测量来自对象的测试样品中一种或更多种Th1和/或Th2生物标志物,以及如果检测到一种或更多种Th1生物标志物的水平降低,则(c) (1) 共施用Th1刺激剂和溶瘤病毒或(c) (2) 停止施用溶瘤病毒。任选地,在治疗期临开始前或开始时测量测试样品中一种或更多种Th1和/或Th2生物标志物以提供基线测量值。在治疗期中一种或更多种Th1生物标志物的降低表明需要共施用Th1刺激剂和病毒或者终止溶瘤病毒治疗,特别是如果一种或更多种Th2生物标志物的水平未降低(例如保持基本相同或提高)。

[0032] 根据所述方法,获自对象的测试样品包括但不限于获自以下的一种或更多种样品:组织(例如肿瘤活检物)、脑脊液(CSF)、淋巴、血液、血浆、血清、外周血单核细胞(PBMC)、淋巴液、淋巴细胞、滑液和尿液。在一些具体实施方案中,测试样品获自CSF或肿瘤组织。在另一些具体实施方案中,测试样品获自肿瘤组织,并且例如样品中CD4⁺和/或CD8⁺细胞的相对数目的测定和/或样品中一种或更多种Th1和/或Th2细胞因子的测量是通过例如利用抗Th1和/或Th2细胞因子的抗体对来自样品的固定并透化的细胞进行免疫荧光染色进行的。在另一些具体实施方案中,测试样品获自血液,并且例如通过ELISA测量样品中一种或更多种Th1和/或Th2细胞因子的水平。

[0033] 在一个广义方面,本发明还提供了用于治疗患者中的癌症的组合疗法,其包括向患者共施用溶瘤病毒和一种或更多种产生Th1免疫表型的药剂,这种使用溶瘤病毒(例如,腺病毒)和免疫刺激剂二者的方法是违反直觉的,因为激活免疫系统可潜在地降低病毒(如Delta-24-RGD)产生的溶瘤作用水平。可预期激活的免疫系统加速清除病毒,因此降低溶瘤病毒治疗的效果。实际上,有证据表明减缓Th1应答之发展对于溶瘤细胞治疗的效果是重要的。然而,本发明人出乎意料地发现在放射成像下呈现强肿瘤应答以及延长的存活的患者表现出病毒复制、免疫刺激和T细胞介导的细胞毒性的激活。相反地,本发明人出乎意料地发现表现出相对强的Th1谱的患者更可能对溶瘤细胞治疗呈现出积极响应。

[0034] 可在施用溶瘤病毒之前、期间或之后施用在患者中产生Th1免疫表型的药剂。在一个实施方案中,向根据任意前述方法而被确定为处于无法有利地响应于溶瘤病毒治疗之风险下的癌症患者共施用所述病毒和一种或更多种Th1刺激剂,所述Th1刺激剂的量足以提高本发明的一种或更多种Th1生物标志物的水平和/或降低一种或更多种Th2生物标志物的水平和/或降低抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的水平。在一个优选实施方案中,在施用溶瘤病毒之前向患者施用一种或更多种产生Th1免疫表型的药剂,以“致敏(prime)”患者的

免疫系统以有利地响应于溶瘤病毒治疗,从而增加患者将具有有利的临床结果的可能性。在另一个实施方案中,向根据任意前述方法而被确定为很可能有利地响应于溶瘤病毒治疗之癌症患者共施用所述病毒和一种或更多种Th1刺激剂,所述Th1刺激剂的量足以提高本发明的一种或更多种Th1生物标志物的水平和/或降低一种或更多种Th2生物标志物的水平和/或降低抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的水平。在一个优选实施方案中,在施用溶瘤病毒之前向患者施用一种或更多种产生Th1免疫表型的药剂,以“致敏”患者的免疫系统以加强对溶瘤病毒的抗肿瘤应答。

[0035] 某些实施方案涉及治疗患者中的癌症的方法,其包括施用:(i)能够复制的溶瘤病毒(例如,腺病毒)和(ii)上调或激活细胞免疫系统的药剂。所述药剂可在施用所述病毒之前、期间或之后施用。上调或激活细胞免疫系统可通过刺激细胞免疫系统或遏制对细胞免疫系统的抑制来完成。所述方法可用于治疗原发性肿瘤或由转移形成的肿瘤。在某些方面,所述病毒还包含靶向部分。在另一些方面,所述能够复制的病毒是腺病毒,例如Delta-24。在又一个方面,所述Delta-24腺病毒包含靶向部分。在某些方面,所述靶向部分是含RGD的肽。在某些方面,RGD或其他天然存在的细胞表面结合肽赋予溶瘤病毒免疫特权,使得所述病毒在提升免疫系统活性时期能够保持治疗性。

[0036] 在一个优选实施方案中,提供了用于治疗患者中的癌症的方法,其包括:(a)向所述患者施用细胞因子(例如,重组IL-12p70或重组IFN- γ)或者一种或更多种提高Th1细胞因子(如IL-12p70或IFN- γ)的产生的药剂(例如,雷利米得(Revlimid)或来那度胺(lenalidomide)),(b)向所述患者施用溶瘤病毒(例如,Delta-24-RGD),以及任选地(c)向所述患者施用抑制调节性T细胞的药剂(例如,替莫唑胺、环磷酰胺、CCNU、BCNU、美法仑、白消安)和/或刺激细胞介导的免疫应答的药剂(例如,伊匹单抗(Ipilimumab)、Tremelimumab、MDX-1106、MK-3475、AMP-224、Pidilizumab、MDX-1105)。优选地,通过瘤内注射将溶瘤病毒施用到肿瘤的一个或多个区域。患者可能已通过本发明方法而被预先确定为很可能响应于溶瘤病毒治疗,或者可能已被预先确定为不太可能响应于溶瘤病毒治疗。优选地,在溶瘤病毒之前施用细胞因子或提高Th1细胞因子产生的药剂,并且在溶瘤病毒治疗期间或随后施用抑制调节性T细胞和/或刺激细胞免疫应答的药剂。在一个相关实施方案中,步骤(a)进一步或可选地包括施用一种或更多种抑制Th2细胞因子(如IL-10和IL-4)产生的药剂。

[0037] 在某些方面,在施用溶瘤病毒之前或之后的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24小时,1、2、3、4、5、6、7或更多天,1、2、3、4周,或1、2、3、4、5、6个月(包括之间的所有值和范围)向患者施用产生Th1表型的药剂。在一个优选实施方案中,在施用溶瘤病毒之前施用产生Th1表型的药剂,并且任选地在施用所述病毒之后继续施用。在一个实施方案中,在施用溶瘤病毒之前或之后的1至14天之间向患者施用产生Th1表型的药剂。在另一个实施方案中,在施用溶瘤病毒之前或之后的1至4周之间施用所述药剂。在另一些实施方案中,同时向患者共施用所述药剂和溶瘤病毒。

[0038] 在某些方面,在施用溶瘤病毒或免疫活化剂之前、期间或之后,通过例如测量血液中本文所述的一种或更多种Th1和/或Th2生物标志物和/或抗一种或更多种肿瘤相关抗原的抗体的水平来对细胞免疫功能进行评估。或者,可检测来自肿瘤的活检物样品中的免疫细胞浸润物,例如抗原递呈细胞(例如,巨噬细胞、树突状细胞、星形胶质细胞和小胶质细

胞)、细胞毒性T细胞或自然杀伤细胞。

[0039] 在一个方面,评估肿瘤浸润的CD4⁺和CD8⁺淋巴细胞的浓度,其中向与对照相比具有高CD4⁺/CD8⁺比率的患者(代表Th2谱)同时、分开或相继共施用能够复制的溶瘤病毒和上调或激活细胞免疫系统的药剂。在另一个方面,通过测量CD4与一种或更多种Th1细胞因子(例如,IL-12p70或IFN- γ)和Th2细胞因子(例如,IL-4)的共表达并测定Th1/Th2CD4⁺细胞的相对数来确定来自对象的测试样品(例如,活检物或外周血单核细胞)中Th1/Th2CD4⁺细胞的相对数。优选地,对细胞进行刺激(例如,用佛波酯加离子霉素)、固定、透化、利用适当的抗体染色并进行流式细胞术分析。在一个实施方案中,可测量血液、血清或其他体液中指示Th1谱的一种或更多种细胞因子水平。在一个方面,向与适当的对照相比具有低水平Th1细胞因子或与适当的对照相比具有高水平Th2细胞因子的患者共施用能够复制的溶瘤病毒和上调或激活细胞免疫系统的药剂。

[0040] 在一个相关实施方案中,测量选自IL1 β 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 和GM-CSF的一种或更多种Th1细胞因子。其他Th1生物标志物如切割的胱天蛋白酶-3、新喋呤和 β 2微球蛋白也可以作为Th1谱的一部分测量。在另一个相关实施方案中,测量选自IL-4、IL-5、IL-6、IL-10和IL-13以及TGF- β 的一种或更多种Th2细胞因子。其他Th2生物标志物如磷酸化的STAT3(Tyr705)也可作为Th2谱的一部分测量。在另一些方面,在溶瘤病毒(例如,腺病毒)治疗期间监测指示Th1和/或Th2谱的细胞因子或其他生物标志物,其中向在治疗期间表现出从Th1谱向Th2谱转变的患者施用上调或激活细胞免疫系统的药剂。可检测和/或测量治疗诱发的坏死。

[0041] 在某些实施方案中,产生Th1表型(上调或激活细胞免疫系统)的药剂是细胞免疫抑制剂的拮抗剂(细胞免疫抑制的拮抗剂)。细胞免疫抑制的拮抗剂是作用于抑制细胞免疫系统的细胞或分子的药剂。细胞免疫抑制的拮抗剂包括细胞毒性T-淋巴细胞抗原4(CTLA-4;也被称为CD152)拮抗剂,例如伊匹单抗(也被称为YervoyTM、MDX-010或MDX-101;由Bristol-Myers Squibb开发的抗CTLA-4的人源化单克隆抗体)和Tremelimumab(之前称为ticilimumab、CP-675,206;抗CTLA-4的人源化单克隆抗体,MedImmune/AstraZeneca);PD-1/PD-L1受体拮抗剂,例如MDX-1106(α -PD-1人源化单克隆抗体,Bristol-Myers Squibb);MK-3475(α -PD-1人源化单克隆抗体,Merck);AMP-224(Fc-PD-1融合蛋白,其阻碍PD-1与配体B7-DC和B7-H1之间的相互作用;Glaxo Smith Kline);Pidilizumab(也称为CT-011,抗 α PD-1的人源化单克隆抗体,Chirotech);MDX-1105(α -PD-L1人源化单克隆抗体,Bristol-Myers Squibb);特异性结合B7-H3的抗体,例如MGA271(α -B7-H3人源化单克隆抗体, Microgenics)或在美国申请公开号2012-0294796中描述的其他抗体,其内容通过引用并入本文;或吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂,例如D-1-甲基-色氨酸(Lunate)及在美国专利号7,799,776中描述的其他化合物,其内容通过引用并入本文。

[0042] 在某些实施方案中,上调细胞免疫系统的药剂是细胞免疫系统刺激物。免疫刺激物是在被引入到对象中时导致细胞介导的免疫应答的活性增加的小分子、肽、多肽(例如,抗体)或细胞。免疫刺激物包括共刺激途径激动剂,例如:CD137激动剂,包括但不限于BMS-663513(α -CD137人源化单克隆抗体激动剂,Bristol-Myers Squibb);CD40的激动剂,例如CP-870,893(α -CD40人源化单克隆抗体,Pfizer);OX40(CD134)激动剂(例如,抗-OX40人源化单克隆抗体,AgonOx以及在美国专利号7,959,925中描述的那些);或CD27的激动剂,例如

CDX-1127 (α -CD27人源化单克隆抗体, Celldex)。

[0043] 在某些方面, 免疫刺激物是诱导或刺激与Delta-24-RGD抗原相关的抗原递呈细胞的药剂, 例如CD47或SIRP α 的作为单克隆抗体或小分子抑制剂的拮抗剂, 包括但不限于SIRP α Fc (Trillium Therapeutics Inc.) 及美国专利公开号2012/0189625中描述的其他抑制剂, 所述专利的内容通过引用并入本文。

[0044] 破坏肿瘤免疫沉默的小分子抑制剂包括JAK-2、JAK-3、STAT-3或STAT-5的抑制剂, 例如来他替尼 (CEP-701水合物, (9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-六氢-10-羟基-10-(羟甲基)-9-甲基-9,12-环氧-1H-二吲哚并[1,2,3-fg:321k1]吡咯并[3,4-i][1,6]苯并二氮芳辛-1-酮 ((9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-10-(hydroxymethyl)-9-methyl-9,12-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:321k1]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocin-1-one); Sigma-Aldrich; JAK-2抑制剂)、Pacritinib (SB1518; 11-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-14,19-二氧杂-5,7,26-三氮杂-四环[19.3.1.1(2,6).1(8,12)]二十七-1(25),2(26),3,5,8,10,12(27),16,21,23-癸烯(11-(2-pyrrolidin-1-yl-ethoxy)-14,19-dioxa-5,7,26-triaza-tetracyclo[19.3.1.1(2,6).1(8,12)]heptacos-1(25),2(26),3,5,8,10,12(27),16,21,23-decaene); JAK-2/FLT3抑制剂)、托法替尼 (CP-690550; 3-[(3R,4R)-4-甲基-3-[甲基(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基]哌啶-1-基]-3-氧丙腈; JAK-3抑制剂, Pfizer); Ruxolitinib ((3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)吡啶-1-基]丙腈; JAK-1/JAK-2抑制剂, Incyte and Novartis); CYT387 (JAK-2抑制剂; N-(氰基甲基)-4-[2-(4-吗啉代苯胺基)嘧啶-4-基]苯甲酰胺; YM BioSciences); Baricitinib (LY3009104; 2-[1-乙基磺酰基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)吡啶-1-基]氮杂环丁烷-3-基]乙腈; JAK-1/JAK-2抑制剂); 和TG101348 (N-叔丁基-3-{5-甲基-2-[4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基氨基}-苯磺酰胺; JAK-2抑制剂)。

[0045] 在另一些方面, 可在溶瘤病毒治疗之前或期间向癌症患者施用一种或更多种产生Th1表型 (激活细胞免疫应答) 的生物调节剂以改善患者对病毒的响应, 所述生物调节剂例如细胞因子 (优选重组的), 包括但不限于GM-CSF、IL-2、IL-12、IL-18和干扰素- γ 。已知IFN- γ 和IL-12抑制Th2细胞因子的产生, 并因此对于激活细胞免疫应答是特别优选的细胞因子。或者, 可向这些患者施用一种或更多种刺激IL-12p70和/或其他Th1细胞因子的产生的药剂, 例如来那度胺 (雷利米得) 或泊马度胺 (pomalidomide)。在一个相关方面, 可在溶瘤病毒治疗之前、期间或之后向这些患者可选地或额外地施用一种或更多种减少T调节细胞的药剂, 例如烷化剂, 包括但不限于替莫唑胺、环磷酰胺、洛莫司汀 (CCNU)、双氯乙基亚硝基脲 (BCNU)、美法仑盐酸盐、白消安 (丁烷-1,4-二基二甲磺酸酯)、氮芥 (nitrogen mustard)、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺、链脲霉素、达卡巴嗪 (DTIC)、塞替派、六甲蜜胺 (hexamethylmelamine)、顺铂、卡铂和奥沙利铂。在另一个相关方面, 可在溶瘤病毒治疗之前或期间向这些患者施用一种或更多种中和Th2细胞因子的药剂, 所述Th2细胞因子例如IL-4、IL-5、IL-6、IL-10和IL-13, 特别是IL-4和IL-10; 因为这些Th2细胞因子抑制Th1途径, 对其进行中和可改善患者对病毒的响应。

[0046] 本发明人已发现, 在施用溶瘤病毒 (如Delta-24-RGD) 之前向癌症患者施用烷化剂如替莫唑胺出乎意料地提高了患者将有利地响应于病毒的可能性。不受理论的约束, 相信在利用烷化剂 (如替莫唑胺) 治疗后, 在神经胶质瘤患者中诱发的淋巴细胞减少症可导致肿

瘤环境从主要的Th2表型转变为Th1表型,从而增强使用溶瘤病毒对肿瘤的治疗。因此,在本发明的一个优选实施方案中,提供了用于治疗患者中癌症的方法,其包括向患者施用烷化剂,随后向所述患者施用溶瘤病毒。优选地,所述患者是患有原发性或转移性脑肿瘤(例如神经胶质瘤)的患者,所述病毒是腺病毒,例如Delta-24或Delta-24-RGD,而所述烷化剂选自替莫唑胺、环磷酰胺、洛莫司汀(CCNU)、双氯乙基亚硝基脲(BCNU)、美法仑盐酸盐和白消安(丁烷-1,4-二基二甲磺酸酯)。在一个特别优选的实施方案中,所述烷化剂是替莫唑胺。可在施用溶瘤病毒前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24小时,1、2、3、4、5、6、7或更多天,1、2、3、4周或1、2、3、4、5、6个月(包括其间的所有值和范围)施用烷化剂。

[0047] 在另一些实施方案中,可共施用溶瘤病毒和一种或更多促进Th1应答的佐剂,所述佐剂的非限制性实例包括单磷酸脂质A(MPL®)、QS-21(包含可溶性三萜烯葡萄糖苷化合物的植物提取物)或其他皂苷、包含CpG或由CpG组成的寡脱氧核苷酸以及核糖体蛋白质提取物(ribosomal protein extract,RPE)。

[0048] 在某些方面,待根据本方法治疗的癌症是中枢神经系统的癌症。在相关方面,所述癌症是神经上皮肿瘤,例如但不限于:星形细胞肿瘤(例如,星形细胞瘤、间变性星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、胶质肉瘤、毛细胞型星形细胞瘤、巨细胞星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤)、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、少突星形细胞瘤、恶性神经胶质瘤、成星形细胞瘤、脉络丛乳头状瘤、脉络丛癌、神经节细胞瘤、神经节神经胶质瘤、神经细胞瘤、神经上皮肿瘤、成神经细胞瘤、松果体区肿瘤(例如,松果体细胞瘤、成松果体细胞瘤或混合的松果体细胞瘤/成松果体细胞瘤)、髓上皮瘤、成神经管细胞瘤、成神经细胞瘤或成神经节神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤或成室管膜细胞瘤。在另一个相关方面,所述癌症是中枢神经系统赘生物,例如,但不限于:鞍区肿瘤(例如,垂体腺瘤、垂体腺癌或颅咽管瘤)、造血肿瘤(例如,原发性恶性淋巴瘤、浆细胞瘤或粒细胞肉瘤)、生殖细胞肿瘤(例如,生殖细胞瘤、胚胎性癌、卵黄囊瘤、绒膜癌、畸胎瘤或混合的生殖细胞瘤)、脑膜瘤、间充质细胞肿瘤、黑色素细胞瘤或者颅神经或脊神经肿瘤(例如,神经鞘瘤或神经纤维瘤)。在一个具体方面,所述癌症是低级神经胶质瘤(例如,室管膜瘤、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤或混合的神经胶质瘤)或高级(恶性)神经胶质瘤(例如,多形性成胶质细胞瘤)。在另一个方面,所述癌症是原发性或转移性脑肿瘤。在另一些方面,所述癌症是包含脑肿瘤细胞干细胞的原发性或转移性脑肿瘤。在一个优选实施方案中,所述癌症是包含脑肿瘤细胞干细胞的恶性神经胶质瘤。

[0049] 在另一些方面,待根据本方法治疗的癌症包括但不限于:肺癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫颈癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、皮肤癌、喉癌、膀胱癌和前列腺癌。优选地,待治疗癌症呈现被终端的Rb通路。在又一些方面,施用溶瘤病毒以治疗过度增殖性紊乱,例如组织变形、发育异常或增生。

[0050] 在某些方面,所述溶瘤病毒是腺病毒,例如Delta-24-RGD。溶瘤腺病毒(如Delta-24-RGD)具有在多种细胞系中复制的能力,包括肺、乳腺、前列腺、肉瘤和神经胶质瘤干细胞样细胞。因此,可向患有任何允许病毒复制之癌症的患者施用例如溶瘤腺病毒(如Delta-24-RGD)以治疗癌症。

[0051] 附图简述

[0052] 图1. 抗体vs存活:(体液vs细胞倾斜(skew))。示图描述了使用溶瘤腺病毒(Delta-

24-RGD) 治疗的神经胶质瘤患者中抗肿瘤相关抗原的抗体与存活之间的相关性。简要地说, 在Delta-24-RGD治疗之前, 通过自动化蛋白质微阵列使用改进的固相ELISA (Seramatrix) 评估20位神经胶质瘤患者亚组的血清中抗31种肿瘤相关抗原的抗体, 所述抗原包括BRAF、CABYR、CRISP3、CSAG2、CTAG2、DHFR、FTHL17、GAGE1、LDHC、MAGEA1、MAGEA3、MAGEA4、MAGEB6、MAPK1、MICA、MUC1、NLRP4、NYES01、P53、PBK、PRAME、SOX2、SPANXA1、SSX2、SSX4、SSX5、TSGA10、TSSK6、TULP2、XAGE2和ZNF165。在治疗后, 超过40%的具有少于15种阳性抗体的患者存活超过20个月, 而具有超过15种阳性抗体的各患者均未存活超过11个月。另外, 具有少于15种阳性抗体的未存活超过20个月的那些患者相比于具有超过15种阳性抗体的那些患者经历改善的临床结果。

[0053] 图2. 对抗原NLRP4的免疫力vs存活。示图描述了在使用Delta-24-RGD治疗的神经胶质瘤患者中对肿瘤相关抗原NLRP4的免疫力作为存活的函数。在施用病毒之前和此后通常间隔一个月的数个时间点, 评估来自神经胶质瘤患者的血清中的抗NLRP4抗体。患者K、O、I、E、L、N、Q、A、D和J在治疗后存活1个月至11个月, 具有相对高水平的抗NLRP4抗体, 而患者P、C、H、B、M和G在治疗后存活超过12个月至超过19个月, 具有非常低至不可检测水平的抗NLRP4抗体。患者G对治疗表现为完全响应。

[0054] 图3. 抗肿瘤相关抗原抗体与肿瘤复发的相关性。上图是描述了神经胶质瘤患者(患者F)中抗肿瘤抗原抗体与肿瘤复发的相关性的示图。在Delta-24-RGD治疗结束时以及治疗后15天、1个月、4个月和6个月时, 测量来自患者的血清样品中的抗一系列肿瘤相关抗原(图1中描述的那些)的抗体。在15天或1个月时期, 未检测到抗体。但是, 在4个月至6个月时期之间, 阳性抗体的数目从2种跃至20种, 并且与肿瘤复发一致。下图描述了在Delta-24-RGD治疗结束时(左)和治疗后6个月时(右)对患者F的扫描图。在6个月时间点的扫描图中可以看到肿瘤的复发。

[0055] 图4. 患者G和I的比较。热图描述了在来自利用Delta-42-RGD治疗的两位神经胶质瘤患者(患者G, 完全响应者(左图), 和患者I, 恶化者(右图))的血清中检测抗一组肿瘤相关抗原(图1中描述的那些)的抗体的肽阵列结果, 所述血清在利用病毒治疗之前(0个月)以及治疗后1、4和6个月(患者G)以及治疗后1、3和4个月(患者I)时采集。热图中描述的结果是获自吸光度分析的原始数据(即, 未减去背景)。观察到了~0.2的平均背景, 因此可普遍应用到所有抗原用于阳性与阴性结果对比的截断是 $3 \times \text{背景} = 0.6$ 。在利用病毒治疗后超过30个月, 患者G目前依然活着。患者I在治疗后6个月时死亡。患者G在每一时间点具有0分(血清中抗所有31种测试的肿瘤相关抗原的抗体阴性)。另一方面, 患者I在利用病毒治疗之前具有10分(抗CABYR、MAGEA1、MAGEA3、MAGEB6、NLRP4、NYES01、PBK、SSX2、SSX5和ZNF165抗体阳性), 并且该数值在1个月时间点提高至18, 三个月时间点提高至22, 四个月时间点提高至31(即, 抗所有测试的肿瘤相关抗原的抗体)。这清楚地表明可使用这些肿瘤抗原作为生物标志物来预测响应于溶瘤病毒治疗(如Delta-42-RGD)的可能性。

[0056] 图5. 描述了图4中所述肽分析的结果的示图。上图说明了来自完全响应者患者G的血清分析结果。下图说明了来自不响应的患者I的血清分析结果。在利用病毒治疗前(两位患者)以及利用病毒治疗后1个月、4个月和6个月时(患者G)以及利用病毒治疗后1个月、3个月和4个月时(患者I)获得血清样品并分析抗特定肿瘤相关抗原的抗体反应。抗体水平在“y”轴, 抗原在“x”轴。患者G在利用病毒治疗之前和之后全部31种抗体都是阴性的。患者H在

利用病毒治疗之前10种抗体阳性,且在第4个月时间点全部31种抗体都是阳性。

[0057] 图6.描述了在利用Delta-42-RGD治疗之前具有非常高水平的IL-12p70的神经胶质瘤患者(患者30A)的脑扫描图。上部左扫描图展示了施用Delta-42-RGD治疗之前(11/18/2011)患者中的神经胶质瘤。上部中扫描图展示了在治疗后8天(10/26/2011)和治疗后11天(10/29/2011)时肿瘤中的阳性响应。底部左扫描图展示了治疗后差不多两个月(1/7/2012)和治疗后差不多三个月(2/8/2012)的响应。

[0058] 图7. 患者血清样品中IL-12p70的测量(以皮克/ml)。图7是描述了在治疗之前(pre-op)以及治疗之后1个月、2个月和3个月时在利用Delta-24-RGD治疗的神经胶质瘤患者的血清中的IL-12p70(以皮克/ml)的示图(以对数标度)。患者12A、30A和33A具有非常高的基线(利用病毒治疗之前)IL-12p70水平,并且这些水平在利用病毒治疗之后提高。患者12A和30A和33A表现出了对病毒的完全响应,并且这与治疗之前和之后二者的IL-12p70水平(相对于不响应者,这些患者中IL-12p70水平高超过100倍和超过1000倍)相关。另一方面,示图中描述的其余患者在施用病毒之前和之后表现出低水平的IL-12p70,并且对病毒不响应。患者37A(在示图中未示出)具有低的基线IL-12p70水平,并且在利用病毒治疗后约2个月给予IFN- γ 以刺激Th1免疫应答并提高IL-12p70水平。向患者37A施用IFN- γ 导致IL-12p70水平显著提高(表明转变成了Th1免疫应答),并且与对病毒完全响应相对应。因此,IL-12p70水平(例如,治疗前)与治疗结果非常好地相关,同时响应者在治疗前和治疗期间二者均具有高水平的IL-12。相反,不响应者在治疗前和治疗期间具有低水平的IL-12。显著地,向表现低IL-12p70水平的患者施用Th1刺激剂IFN- γ 加强了患者中的IL-12p70水平,并且在所述患者中观察到了对病毒的完全响应。

[0059] 发明详述

[0060] 定义

[0061] 本文使用的术语“抗原”是能够被抗体或T细胞受体结合的分子。抗原还能够诱导体液免疫应答和/或细胞免疫应答,导致产生B-和/或T-淋巴细胞。产生生物应答的抗原的结构方面(如三维构象或修饰(例如,磷酸化作用))在本文中被称为“抗原决定簇”或“表位”。B淋巴细胞通过产生抗体对外来抗原决定簇应答,而T淋巴细胞是细胞免疫中介体。因此,抗原决定簇或表位是抗原被抗体识别或在MHC的情况下被T细胞受体识别的那些部位。抗原决定簇未必是蛋白质的连续序列或段(segment),其可包含多个彼此未直接相邻的序列。在某些方面,使用Tau寡聚物作为抗原。

[0062] 术语“抗体”或“免疫球蛋白”用于包括完整的抗体及其结合片段(fragment)/段。通常,片段与衍生这些片段的完整抗体竞争地与抗原特异性结合。片段包括单独重链、轻链Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab_c和Fv。片段/段通过重组DNA技术或通过酶促或化学地分离完整免疫球蛋白产生。术语“抗体”还包括与其他蛋白质化学缀合或表达为融合蛋白的一条或更多条免疫球蛋白链。术语“抗体”还包括双特异性抗体。双特异性或双功能抗体是具有两个不同的重/轻链对和两个不同的结合位点的人工杂交抗体。双特异性抗体可通过多种方法产生,包括融合杂交瘤或连接Fab'片段。参见,例如Songsivilai & Lachmann(1990); Kostelny等(1992)。

[0063] 在一个方面,本文使用的术语“对照”或“预定对照”是指由一位被认为或通过诊断确认为未患癌症的“正常”或“健康”对象或优选多于一位所述对象获得的平均值确定的Th1

和/或Th2生物标志物和/或抗肿瘤相关抗原抗体的基线水平。一旦建立了标准人群的水平,可直接将测试样品的结果与预定对照比较。例如,可由至少一位对象获得基线,并且优选地由对象的平均值获得基线,其中所述一位或更多位对象之前不具有癌症病史。以示例的方式,可将来自患者的血清样品中Th1生物标志物(如IL-12p70)的水平与无疾病对象中相同的Th1生物标志物的血清水平或多于一位无疾病对象的平均血清水平进行比较。

[0064] 在另一个方面,术语“对照”或“预定对照”是指由与待治疗患者患有相同类型癌症的对象中的平均值确定的Th1和/或Th2生物标志物和/或抗肿瘤相关抗原抗体的基线水平。以示例的方式,可将来自患者的血清样品中Th1生物标志物(如IL12p70)的水平与获自与待治疗患者患有相同类型癌症的多个对象的平均血清水平进行比较。神经胶质瘤患者通常表现出10-20皮克/ml范围内的IL-12p70血清水平。

[0065] 在一个相关方面,术语“对照”或“预定对照”是指与待治疗患者患有相同类型的癌症的已经施用了相同溶瘤病毒并且表现为对病毒不响应的一位对象中Th1和/或Th2生物标志物和/或抗肿瘤相关抗原抗体的水平或优选地多于一位对象的平均水平。例如,将来自患者的血清样品中Th1细胞因子(如IL12p70)的水平与获自患有相同类型癌症的对病毒不响应的多于一位对象的平均血清水平进行比较,通过与不响应者的平均水平相比高水平的Th1细胞因子表明所述患者很可能有利地响应于所述病毒。

[0066] 在另一个相关方面,术语“对照”或“预定对照”是指与待治疗患者患有相同类型的癌症的已经施用了相同溶瘤病毒并且对病毒表现出良好响应的一位对象中生物标志物的水平或优选地多于一位对象的平均水平。例如,将来自患者的血清样品中Th1细胞因子(如IL12p70)的水平与获自患有相同类型癌症的对病毒良好响应的多于一位对象的平均血清水平进行标记,通过与来自良好响应者的平均水平相比低水平的Th1细胞因子表明所述患者不太可能有利地响应于所述病毒。

[0067] 为了比较,待测量的测试样品中Th1和/或Th2生物标志物和/或抗肿瘤相关抗原抗体的水平与用于测定基线对照水平的是相同的类型(获自相同生物来源)并且以相同方式进行处理。例如,如果通过测量血清中IL-12p70的水平来测定IL-12p70的水平,则通过测量例如来自正常健康对象的血清中的IL-12p70水平来测定IL-12p70的基线水平。如本文使用的,相对于预定对照“高”水平的Th1生物标志物或Th1生物标志物的测量水平“提高”意味着测试样品中Th1生物标志物的量或浓度相对于Th1生物标志物的预定对照水平在测试样品中充分更高。例如,相对于预定对照Th1生物标志物水平的提高可以是任何可检测的统计学上的显著提高,例如但不限于:相对于预定对照,提高约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约30%、约40%、约60%、约80%、约2倍、约3倍、约5倍、约8倍、约10倍、约20倍、50倍、100倍、200倍、500倍或甚至1000倍或更多。在另一个方面,与对照相比测试样品中“高水平”的生物标志物可指抗体的检测水平高于预定阈值,其中对照水平低于所述预定阈值。

[0068] 术语“相关”或“相关性”或其等同用语是指与缺乏响应相比,一种或更多种基因或蛋白质的表达与癌细胞和/或癌症患者的治疗结果之间相关。本发明提供了一种或更多种本文公开的生物标志物的表达的提高与癌症患者对溶瘤病毒治疗的响应性之间的相关性。

[0069] 术语“神经胶质瘤”是指起源于脑或脊髓的神经胶质的肿瘤。神经胶质瘤源于神经胶质细胞类型,例如星形胶质细胞和少突胶质细胞,因此神经胶质瘤包括星形细胞瘤和少突神经胶质瘤以及间变性神经胶质瘤、成胶质细胞瘤和室管膜瘤。星形细胞瘤和室管膜瘤

可在儿童和成人二者的脑和脊髓的全区域发生。少突神经胶质瘤通常发生在成人的大脑半球中。其他脑肿瘤是脑膜瘤、室管膜瘤、松果体区肿瘤、脉络丛肿瘤、神经上皮肿瘤、胚胎性肿瘤、外周成神经细胞肿瘤、颅神经肿瘤、造血系统肿瘤、生殖细胞肿瘤以及星状(stellar)区肿瘤。

[0070] 术语“IL-12p70”或“IL-12”是指主要由单核细胞、巨噬细胞、B淋巴细胞和树突细胞产生的70kDa (p70) 细胞因子IL-12的生物活性形式。IL-12是由两个亚基构成的异质二聚体,一个40kDa (p40) 和另一个35kDa (p35) 的亚基通过二硫键连接在一起。

[0071] 本文在诊断或预后的语境下使用的术语“正常”是指未表现出任何癌症症状并且已知未患病症的个体或个体的组。优选地,正常个体未服用治疗癌症的药物,并且如果可能未诊断出癌症或任何其他过度增殖病症。根据本发明“正常”还指分离自正常个体的样品。

[0072] 术语“溶瘤病毒”通常是指任何能够在肿瘤细胞中复制并杀死肿瘤细胞的病毒。优选地,所述病毒被改造以例如提高肿瘤细胞选择性。溶瘤病毒的代表性实例包括但不限于腺病毒、呼肠孤病毒、单纯疱疹病毒(HSV)、新城疫病毒、痘病毒、粘液瘤病毒、弹状病毒、小核糖核酸病毒、流感病毒、柯萨奇病毒和细小病毒。在一些优选的实施方案中,溶瘤病毒是痘苗病毒(例如,哥本哈根Western Reserve、Wyeth毒株)、弹状病毒(例如,水泡性口炎病毒(VSV))或腺病毒(例如,ONYX-015、Delta-24-RGD)。在一个特别优选的实施方案中,溶瘤病毒是腺病毒。优选的腺病毒是Delta-24-RGD。Delta-24-RGD是肿瘤选择性腺病毒血清型5毒株,其在涵盖负责与Rb蛋白质结合之区域的E1A区包含24个碱基对(核苷酸923-946)的缺失,其对应于编码的E1A蛋白质中120-127的8个氨基酸(Fueyo J等,Oncogene,19:2-12(2000))。Delta-24-RGD还包含插入在纤维染色体(knob)蛋白的H1环中的RGD-4C序列(其与 $\alpha v\beta 3$ 和 $\alpha v\beta 5$ 整联蛋白强力结合)(Pasqualini R.等,Nat Biotechnol,15:542-546(1997))。E1A缺失提高了病毒对癌细胞的选择性,RGD-4C序列提高了病毒在神经胶质瘤中的感染力。

[0073] 术语“提供”根据其普遍含义用于表示“为使用供应或供给”。在一些实施方案中,通过施用蛋白质直接提供所述蛋白质,而在另一些实施方案中,通过施用编码蛋白质的核酸来有效提供所述蛋白质。

[0074] 术语“响应”通常是指患者对溶瘤治疗表现出完全响应或部分响应,如由实体瘤应答评估标准(Reesponse Evaluation Criteria in Solid Tumors,RECIST)之标准定义的(Eisenhauer等,European Journal of Cancer,45:228-247(2009),其通过引用并入本文)。完全响应意指所有靶病灶消失。部分响应意指以基线总和最长直径(LD)作为参考,靶病灶的LD的总和减少至少30%。特别地,响应通常是指肿瘤尺寸完全或部分改变。类似地,对溶瘤治疗不响应的患者是指表现出稳定的疾病(既没有作为部分响应的足够收缩也没有作为进行性(progressive)疾病的足够增加)或进行性疾病(自治疗开始后,以最小总和LD作为参考,靶病灶的LD总和增加至少20%)的那些人。熟练的临床医师/放射科医师将理解用于测定肿瘤测量值的适当方法,例如结合临床评价使用计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI)。

[0075] 术语“治疗益处”或“治疗”是指关于其病症的医学治疗,任何促进或增强对象的健康的事情,其包括癌前、癌症和过度增殖性疾病的治疗。其一系列非穷举的实例包括使对象的生命延长任意时间段、降低或延迟疾病的赘生性发展、降低过度增殖、降低肿瘤生长、延迟转移、降低癌细胞或肿瘤细胞的增殖速率以及降低对象中可因对象的病症造成的疼痛。

不必需将癌症治愈到实现有意义的治疗,必需的是使癌症减慢至一定程度或改善与癌症相关的一些病症。

[0076] 在整个本申请中讨论了本发明的另一些实施方案。关于本发明的一个方面讨论的任何实施方案也适用于本发明的另一些方面,反之亦然。本文描述的每一个实施方案应理解为是适用于本发明所有方面的本发明实施方案。可设想,本文讨论的任何实施方案可关于本发明的任何方法或组合物来实施,反之亦然。此外,本发明的组合物和试剂盒可用于实现本发明的方法。

[0077] 当在权利要求和/或说明书中结合术语“包括”使用时,无量词修饰之名词的使用可指“一个/种”,但是其也符合“一个/种或更多个/种”、“至少一个/种”和“一个/种或超过一个/种”的含义。

[0078] 在整个本申请中,术语“约”用来指示包括用来测定值的装置或方法之误差标准差的值。

[0079] 在权利要求中使用的术语“或”用于意指“和/或”,除非明确地指出仅指可选的或可选的是互相排斥的,但是本公开内容支持仅指可选的和“和/或”的限定。

[0080] 本说明书和一项或更多项权利要求中使用的词语“包括”、“具有”、“包含”或“含有”是包括性或开放式的,并且不排除另外的未提及的要素或方法步骤。

[0081] 通过以下详细描述,本发明的其他主题、特征和优点将变得明显。但是应理解的是,尽管详细描述和具体实施例指出了本发明的具体实施方案,但是其仅以说明的方式给出,这是因为通过本详细描述,在本发明精神和范围内的多种改变和修改对本领域技术人员将变得明显。

[0082] 脑的原发性和转移性肿瘤二者的常见特征是缺少对这些肿瘤的免疫监督。脑中的正常抗原递呈细胞也称为小胶质细胞,被频繁地发现“关闭”,并因此使得对免疫系统的抗原递呈活性功能缺失。这种免疫监督的缺少被认为是这些肿瘤如此难以治疗的一个原因。

[0083] 使用在原发性神经胶质瘤内复制的溶瘤腺病毒(Delta-24-RGD)来治疗恶性神经胶质瘤的阶段I的临床试验数据出乎意料地表明不仅对腺病毒抗原,对癌症相关抗原的免疫应答也被提高。简要地说,已经发现在用Delta-24感染神经胶质瘤细胞系之后,这些肿瘤相关抗原被释放(或暴露)。另外,该阶段I临床研究出乎意料地表明大群细胞毒性T细胞浸润物大量募集到治疗相关之坏死的大片区域。该发现表明了不仅具有Delta-24-RGD药剂的主动溶瘤作用还具有细胞介导的对肿瘤细胞细胞毒性作用的过程。不受理论的约束,认为在使用病毒成功治疗的患者中,对溶瘤病毒的初始免疫应答产生之后,接下来免疫力向癌症相关抗原转移。

[0084] 本发明人已经发现Th1(炎症)细胞因子的优势表达与进行溶瘤病毒治疗的患者中的积极结果良好相关;因此,这些患者中Th1极化的程度可用于预测患有癌症(如神经胶质瘤)的患者中溶瘤病毒治疗的结果。不受理论的约束,提议对具有优势Th1细胞因子谱的患者致敏以建立细胞介导的对溶瘤病毒的抗肿瘤免疫应答。特别地,本发明人已经出乎意料地发现在积极临床结果中,对溶瘤腺病毒Delta-24-RGD具有可测量之响应的神经胶质瘤患者具有高水平的Th1细胞因子IL-12p70、IL-2和IFN- γ ,而Th2体液抗体的应答预示着这些患者将对病毒无响应。在阶段I临床研究中,具有完全响应或高水平响应的患者在手术前具有高水平的Th1细胞因子白介素-12p70(与阶段I试验中的其他人群相比血清水平极大提

高),该水平在注射病毒后提高。三位对病毒具有完全响应的患者也具有与阶段I试验中的其他人相比极大提高的IL-12p70血清水平。提供了Th1生物标志物用于预测癌症患者对溶瘤病毒治疗的响应的用途。

[0085] 在临床试验中,向一位表现出低IL-12p70基线水平(即,在利用Delta-24-RGD治疗之前)的患者在施用病毒两个月后施用IFN- γ 。IFN-g刺激患者中的Th1免疫应答(通过IL-12产生的增加来指示)并且对应于非常好的病毒响应。因此,还提供了用于治疗癌症的方法,其包括向癌症患者施用刺激或加强Th1应答和/或抑制调节性T细胞的药剂与溶瘤病毒的组合。

[0086] 恶性神经胶质瘤构成了大部分的原发性恶性脑肿瘤。这些致命肿瘤在常规治疗后无不复发,并且患有最常见形式的恶性高级神经胶质瘤——成胶质细胞瘤(GBM)的患者的中值存活时间是14个月。除了血脑屏障使得药物递送困难外,常规化学疗法和小分子方法无法显著改善这些患者的预后。溶瘤病毒(如Delta-24-RGD)已作为用于治疗这些肿瘤的常规疗法的有希望的替选而出现。但是,目前不可能预测患者是否将有利地响应于这样的治疗。尽管出现的证据表明病毒治疗期间的免疫应答涉及到抗肿瘤活性,但是目前仍不知道预先存在的免疫条件在溶瘤病毒治疗期间发挥的作用及其对临床结果的影响。本发明人已经发现使用溶瘤病毒(如Delta-24-RGD)的治疗诱导自噬性细胞死亡,导致神经胶质瘤感染之细胞中具有抗原加工的内质网应激和表位呈递。本发明人还已经出乎意料地发现作为溶瘤病毒治疗的好响应者的患者表现出对T细胞效应器倾斜的应答而不是体液倾斜的应答。溶瘤病毒治疗的好响应者的患者表现出特定的Th1生物标志物谱。这些生物标志物在脑瘤和其他癌症的预后和治疗中具有价值,包括确定在利用溶瘤病毒治疗时很可能具有积极临床结果并因此显著提高了其存活的患有癌症(如恶性神经胶质瘤)患者的最佳组,以及确定患者是否为另外治疗模式的好的候选。预期本发明的生物标志物谱与目前严重缺乏生物标志物的绝大部分实体瘤具有相关性。

[0087] 可测量或检测的生物标志物包括但不限于:蛋白质(例如,细胞因子、抗体)、细胞(例如,淋巴细胞)、核酸和代谢物。可用作响应于溶瘤病毒治疗之可能性的生物标志物的蛋白质包括但不限于:细胞因子如淋巴因子、单核因子、生长因子和传统的多肽激素。包含在细胞因子中的是:生长激素,例如人生长激素、N-甲硫氨酰基人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原(prorelaxin);糖蛋白激素,例如促滤泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH);肝生长因子;前列腺素;成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素;OB蛋白;肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β ;米勒氏抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;活化素;血管内皮生长因子;整联蛋白;促血小板生成素(TPO);神经生长因子,例如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),例如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,例如干扰素- α 、干扰素- β 和干扰素- γ ;集落刺激因子(CSF),例如巨噬细胞-CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF)和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL),例如IL-1、IL-1 α 、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-19、IL-20、IL-24、G-CSF、GM-CSF、EPO、kit-配体或FLT-3。可测量其他抗原,例如CMV抗原、EGFRvIII或IL13R。在另一个方面,可测量或检测指示一般的血管形成和肿瘤的血管生成(angiogenesis)和/或血管发生(vasculogenesis)的

标志物,特别是纤连蛋白、纤连蛋白原以及酸性钙调理蛋白3和胶原结合蛋白(colligin)2。

[0088] 可测量或检测的核酸包括编码上述蛋白质的那些mRNA以及多种非编码核酸,例如miRNA。许多mRNA和miRNA的核酸阵列是市场上可得到的。

[0089] 可作为响应于溶瘤病毒治疗之可能性的生物标志物而被测量或检测的抗体包括但不限于:抗肿瘤相关抗原的抗体,所述抗肿瘤相关抗原例如BRAF(v-raf鼠肉瘤病毒致癌基因同系物B1)、CABYR(钙结合酪氨酸-(Y)-磷酸化作用调节的)、CRISP3(富含半胱氨酸的分泌蛋白3)、CSAG2(CSAG家族,成员2)、CTAG2(癌症/睾丸抗原2)、DHFR(二氢叶酸还原酶)、FTHL17(铁蛋白,重多肽1;睾丸特异性表达)、GAGE1(G抗原1)、LDHC(乳酸脱氢酶C)、MAGEA1(黑色素瘤抗原家族A,1)、MAGEA3(黑色素瘤抗原家族A,3)、MAGEA4(黑色素瘤抗原家族A,4)、MAGEB6(黑色素瘤抗原家族B,6)、MAPK1(丝裂原活化蛋白激酶1)、MICA(MHC I类多肽相关序列A)、MUC1(粘蛋白1,细胞表面相关)、NLRP4(NLR家族,含热蛋白结构域4)、NY-ES-01(纽约食管鳞状(squamos)细胞癌1)、P53、PBK(PDZ结合激酶)、PRAME(优选地在黑色素瘤中表达抗原)、SOX2(性别决定区Y-box2)、SPANXA1(与核相关的精子蛋白质,X连锁,家族成员A1)、SSX2(滑膜肉瘤,X断点2)、SSX4(滑膜肉瘤,X断点4)、SSX5(滑膜肉瘤,X断点5)、TSGA10(睾丸特异的,10)、TSSK6(睾丸特异的丝氨酸激酶6)、TULP2(tubby样蛋白)、XAGE2(X抗原家族2,成员2)和ZNF165(锌指蛋白165)。应理解的是,本发明的抗体生物标志物不限于此,并延伸至抗任何种肿瘤相关抗原的抗体。在一个具体方面,使用抗癌/睾丸抗原的抗体作为本发明的生物标志物。优选使用已经鉴定为存在于患有脑癌(如神经胶质瘤)的患者中的抗肿瘤相关抗原的抗体作为本发明的生物标志物,其包括但不限于:AIM2(在黑色素瘤2中不存在)、BMI1(BMI1多梳(polycomb)无名指致癌基因)、COX-2(环加氧酶-2)、TRP-1(酪氨酸相关蛋白2)、TRP-2(酪氨酸相关蛋白2)、GP100(糖蛋白100)、EGFRvIII(表皮生长因子受体变体III)、EZH2(zeste增强子同系物2)、LICAM(人L1细胞粘附分子)、Livin、Livin β 、MRP-3(多药耐药蛋白3)、巢蛋白、OLIG2(少突胶质细胞转录因子)、SOX2(SRY-相关HMG-盒2)、ART1(被T细胞1识别的抗原)、ART4(被T细胞4识别的抗原)、SART1(被T细胞1识别的鳞状细胞癌抗原)、SART2、SART3、B-细胞周期蛋白、b-联蛋白、Gli 1(神经胶质瘤相关致癌基因同系物(homlog)1)、Cav-1(小窝蛋白-1)、组织蛋白酶B、CD74(分化簇74)、E-钙黏蛋白(上皮细胞钙依赖粘附)、EphA2/Eck(EPH受体A2/上皮细胞激酶)、Fra-1/Fos1 1(fos-相关抗原1)、GAGE-1(G抗原1)、神经节苷脂/GD2、GnT-V、 β 1,6-N(乙酰葡萄糖胺基转移酶-V)、Her2/neu(人表皮生长因子受体2)、Ki67(抗体Ki67的细胞核增殖相关抗原)、Ku70/80(人Ku异二聚体蛋白质亚基)、IL-13R α 2(白介素-13受体亚基 α -2)、MAGE-A(黑色素瘤相关抗原1)、MAGE-A3(黑色素瘤相关抗原3)、NY-ES0-1(纽约食管鳞状细胞癌1)、MART-1(被T细胞识别的黑色素瘤抗原)、PROX1(普洛斯彼罗(prospiero)同源框蛋白1)、PSCA(前列腺干细胞抗原)、SOX10(SRY-相关HMG-盒10)、SOX11、生存素、UPAR(尿激酶型纤溶酶原激活物受体)和WT-1(威尔姆斯肿瘤蛋白1)。

[0090] 因此,在一个实施方案中,可根据本文所述方法测量测试样品中的抗体的表达水平,所述抗体抗选自以下的至少1种、至少2种、至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或至少70种或更多种肿瘤相关抗原的任意组合: BRAF、CABYR、CRISP3、CSAG2、CTAG2、DHFR、FTHL17、GAGE1、LDHC、MAGEA1、MAGEA3、MAGEA4、MAGEB6、MAPK1、MICA、MUC1、NLRP4、NYES01、P53、PBK、PRAME、SOX2、SPANXA1、SSX2、

SSX4、SSX5、TSGA10、TSSK6、TULP2、XAGE2、ZNF165、AIM2、BMI1、COX-2、TRP-1、TRP-2、GP100、EGFRvIII、EZH2、LICAM、Livin、Livin β 、MRP-3、巢蛋白、OLIG2、SOX2、ART1、ART4、SART1、SART2、SART3、B-细胞周期蛋白、b-联蛋白、Gli1、Cav-1、组织蛋白酶B、CD74、E-钙黏蛋白、EphA2/Eck、Fra-1/Fosl 1、神经节苷脂/GD2、GnT-V、 β 1,6-N、Her2/neu、Ki67、Ku70/80、IL-13Ra2、MART-1、PROX1、PSCA、SOX10、SOX11、生存素、UPAR和WT-1。

[0091] 因此,在一个实施方案中,可根据本文所述方法测量测试样品中的抗体的表达水平,所述抗体抗选自以下的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45或至少46种神经胶质瘤相关抗原的任意组合:AIM2、BMI1、COX-2、TRP-1、TRP-2、GP100、EGFRvIII、EZH2、LICAM、Livin、Livin β 、MRP-3、巢蛋白、OLIG2、SOX2、ART1、ART4、SART1、SART2、SART3、B-细胞周期蛋白、b-联蛋白、Gli1、Cav-1、组织蛋白酶B、CD74、E-钙黏蛋白、EphA2/Eck、Fra-1/Fosl 1、GAGE-1、神经节苷脂/GD2、GnT-V、 β 1,6-N、Her2/neu、Ki67、Ku70/80、IL-13Ra2、MAGE-A、MAGE-A3、NY-ESO-1、MART-1、PROX1、PSCA、SOX10、SOX11、生存素、UPAR和WT-1。

[0092] 在另一些实施方案中,可根据本文所述方法测量测试样品中抗本文所述肿瘤相关抗原任意组合之抗体的表达水平和一种或更多种Th1生物标志物的表达水平以及任选地一种或更多种Th2生物标志物的表达水平。

[0093] 可测量或检测的细胞包括CD4T细胞、CD8T细胞、调节性T细胞、小胶质细胞等。

[0094] CD4T细胞在其表面表达CD4蛋白。在通过主要组织相容性复合物(MHC) II类分子递呈抗原后,幼稚CD4T细胞主要分化成Th1、Th2或Th17(调节性T细胞)细胞,其每一种分泌不同的细胞因子群以促进不同类型的免疫应答。例如,Th1细胞分泌IL-2、IFN- γ 和TNF- β ;Th2细胞分泌IL-4、IL-5、IL-6、IL-10和IL-13;而Th17细胞分泌IL-17 α 。

[0095] CD8T细胞(细胞毒性T细胞或CTL)在其表面表达CD8糖蛋白,在递呈MHC I类分子相关抗原后,破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞。

[0096] 调节性T细胞(也被称为抑制性T细胞或Th17细胞)是CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺,作用是关闭T细胞介导的免疫并朝向免疫反应的终点,并抑制在胸腺中逃离阴性选择的自反应T细胞。

[0097] 自然杀伤T(NKT)细胞连接适应性免疫系统与先天性免疫系统。与识别由MHC分子递呈之肽抗原的常规T细胞不同,NKT细胞识别由被称为CD1d的分子递呈的糖脂抗原。一旦被激活,这些细胞可产生细胞因子并释放细胞溶解/细胞杀伤分子。它们还能够识别和消除一些肿瘤细胞和被病毒感染的细胞。

[0098] 小胶质细胞是作为脑和脊髓的定居巨噬细胞的胶质细胞,主要介导激活中枢神经系统(CNS)中的免疫防御。小胶质细胞构成脑中全部胶质细胞群的20%。小胶质细胞不断地清除CNS的感染原。脑和脊髓被认为是“免疫特权”器官,在于其与身体的其余部分通过被称为血脑屏障的一系列内皮细胞分开,所述血脑屏障防止大部分感染到达易损的神经组织。在感染原被直接引入到脑中或穿过血脑屏障的情况下,小胶质细胞必须在其损害敏感的神经组织之前迅速反应以降低炎症并破坏感染原。由于不能利用来自身体其余部分的抗体(很少有抗体足够小能够穿过血脑屏障),小胶质细胞必须能够识别异物,吞下它们,并作为抗原递呈细胞激活T细胞。

[0099] 样品的分离

[0100] 可在利用溶瘤病毒治疗之前、利用溶瘤病毒治疗的同时或利用溶瘤病毒治疗之后由患者获得样品(测试样品),其不受限制地来自:组织(例如肿瘤活检物)、脑脊髓液、血液、血浆、血清、淋巴和滑液。使用本领域中已知用于获得这样的样品的标准程序。在一个优选实施方案中,样品是血清样品,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测定本文所述一种或更多种生物标志物的水平。

[0101] 用于肿瘤活检的程序包括但不限于立体定向活检,其可如下进行,将金属探针精确引入到脑肿瘤中,切下脑肿瘤小块并将其移除从而可对其进行检查。例如,将患者运送至MRI或CAT扫描套件,并且在局部麻醉的情况下使框架连接到头皮上。框架的“插脚”连接到颅骨上以刚性固定(在完成活检之前框架不会并且不能从该点向前移动)。获得扫描图(MRI或CT)。神经外科医师检查扫描图并确定到达靶标的最安全轨迹或路径。这意味着避开关键结构。确定靶标的空间坐标,并选择最佳路径。在全身麻醉下进行活检。在入口点创建小的切口,钻一个穿通颅骨的小孔。对“硬脑膜”穿孔,并将活检探针缓慢引入至靶标。取出活检物标本并放在液体或防腐剂中以评估生物标志物。

[0102] 一旦获得了样品,通过测量或检测或分析多种生物标志物以产生用于确定对象免疫状态(例如,Th1极化程度)的数据来确定对象的免疫状态,以确定例如患者对溶瘤病毒治疗的易感性或者共施用刺激Th1免疫应答的药剂和溶瘤病毒治疗的必要性。

[0103] 在某些实施方案中,肿瘤对治疗的相互作用或响应与肿瘤或周围组织的免疫状态、之前存在的抗病毒抗体和/或治疗前淋巴细胞减少症的存在和程度有关。认为具有表明免疫抑制之免疫状态的患者可能指示肿瘤将对溶瘤病毒治疗有抗性。

[0104] 生物标志物的评估

[0105] 可使用免疫组织化学(IHC)(包括半定量或定量IHC)或其他基于抗体测定(Western印记、荧光免疫测定(FIA)、荧光原位杂交(FISH)、放射免疫测定(RIA)、放射免疫沉淀(RIP)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、化学发光测定、生物发光测定、凝胶电泳)直接评估或通过定量这些基因的转录本(例如,通过原位杂交、核酸酶保护、Northern印记、聚合酶链式反应(PCR),包括逆转录酶PCR(RT-PCR))间接评估上述标志物的表达水平。可以使用FAC技术或使用抗体的石蜡包埋肿瘤切片来分析细胞(例如淋巴细胞)。相关方法在下文讨论。

[0106] 可将抗体用在本发明中以通过技术如免疫组织化学、ELISA和Western印记表征靶细胞的蛋白质含量。这可针对例如对象存在或不存在对溶瘤病毒治疗有利响应的可能性和/或共施用免疫刺激剂和溶瘤病毒的需要提供筛选。

[0107] 免疫组织化学通常在来自活检物的组织样品上进行。可检查新鲜的或冷冻的样品。将组织样品极薄地切片,使得其为约一个细胞厚,然后将样品固定在载玻片上。可使用样品中在其细胞表面具有特征抗原的细胞来帮助识别特定类型的细胞。将抗这些特征抗原的抗体添加到载玻片上的样品,且抗体结合无论存在何处的抗原。然后冲洗掉过量抗体。保持与细胞结合的抗体标记有荧光或进行了化学反应以使其通过显微镜可见。

[0108] 如果样品是组织裂解物、血液、血清或脑脊液,则考虑在ELISA测定中使用抗体。例如,将抗待检测抗原的抗体固定在所选表面上,优选具有蛋白质亲和力的表面,例如聚苯乙烯微量滴定板的壁。在冲洗除去不完全吸附的物质后,期望用已知对于测试抗血清抗原中性的非特异性蛋白质结合或包被测定板壁,例如牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或奶粉的溶

液。这允许封闭固定表面上的非特异性吸附位点,从而降低抗原与表面的非特异性结合造成的背景。

[0109] 在抗体与壁结合后,包被非反应性物质以降低背景,并冲洗以除去未结合物质后,在有利于免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下使固定表面与待测样品接触。

[0110] 在测试样品与结合抗体之间形成特异性免疫复合物之后,随后洗涤,可通过使其经受第二抗体来确定免疫复合物构造的存在甚至是量,所述第二抗体对不同于被第一抗体识别之抗原的抗原具有特异性。优选的适当条件包括用稀释剂如BSA、牛 γ 球蛋白(BGG)和磷酸盐缓冲盐水(**PBS**)/**Tween**[®]稀释样品。这些添加的试剂还有助于帮助降低非特异性背景。然后允许将分层的抗血清优选在近似约25°C至27°C的温度下孵育约2至约4小时。在孵育之后,洗涤抗血清接触表面以除去非免疫复合物物质。优选的冲洗程序包括用如**PBS/Tween**[®]或硼酸盐缓冲液的溶液冲洗。

[0111] 为了提供检测手段,第二抗体将优选地具有关联的酶或可被检测的可检测部分,例如,在与适当的显色底物孵育后将产生彩色显影。因此,例如将期望使第二抗体结合表面与脲酶或过氧化物酶耦合抗人IgG在有利于免疫复合物构造显影的条件下接触并孵育一段时间(例如,在含PBS的溶液(如**PBS/Tween**[®])中在室温孵育2小时)。

[0112] 在与第二可检测抗体孵育后,随后冲洗以除去未结合物质,在过氧化物酶作为作为酶标志物的情况下,通过与显色底物(如尿素和溴甲酚紫或2,2'-连氨基-二-(3-乙基-苯并噻唑啉)-6-磺酸(ABTS)和H₂O₂)孵育来对标志物的量进行定量。然后通过例如使用可见光谱分光光度计测量产生的颜色的程度来实现定量。

[0113] 通过首先使样品与测定板结合,然后使样品与第一抗体接触,接着通过使用对第一抗体具有特异性标记的第二抗体检测结合的第一抗体来改变之前的形式。

[0114] 抗体还可用于免疫印迹或Western印记分析。抗体可用作高亲和力第一试剂以鉴定固定在固体支持物基质(如硝化纤维、尼龙或其组合)上的蛋白质。与免疫沉淀结合,随后凝胶电泳,这些可用作单步骤试剂用于检测第二试剂所针对的抗原,所述第二试剂用于检测造成不利背景的抗原。用于与Western印记结合使用的基于免疫之检测方法被认为在这一点上特别有用,其包括酶促、放射性标记或荧光标记的抗目的抗原的第二抗体。

[0115] 本文所述方法的一些方面涉及以下面的一个或更多个方面:(i)结合溶瘤病毒(例如,腺病毒)的施用刺激对象中的细胞免疫应答(ii)结合溶瘤病毒(例如,腺病毒)的施用拮抗免疫抑制,或(iii)结合溶瘤病毒(例如,腺病毒)的施用刺激对象中的细胞免疫应答并拮抗对象中的免疫抑制。

[0116] A. 免疫抑制的拮抗

[0117] 免疫抑制涉及降低免疫系统的活化或效力的作用。免疫系统自身的一些部分对免疫系统的另一些部分具有免疫抑制作用,且免疫抑制可在某些疾病或病症的影响下发生。疾病相关免疫抑制可发生在例如营养不良、衰老、多种类型癌症(例如,神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤)和某些慢性感染(如获得性免疫缺陷综合征(AIDS))中。疾病相关免疫抑制的有害作用是免疫缺陷,导致对过度增殖细胞的生长的易感性提高。

[0118] 在某些方面,本文所述治疗方法可降低对象中的免疫抑制并增强病毒治疗的溶瘤作用。在某些方面,所述方法可降低对象中免疫调节性T细胞的活性。降低免疫调节性T细胞

的活性可通过向个体施用消耗或失活个体中的免疫调节性T细胞的药剂(例如烷化剂)来实现。降低免疫调节性T细胞的活性还可通过使用至少一种与免疫调节性T细胞结合的抗体来实现。这样的抗体可选自但不限于:抗CD4、抗CD25、抗神经毡蛋白和/或抗CTLA4。可在施用溶瘤病毒之前、期间或之后降低个体中免疫调节性T细胞的活性。本文使用的术语“消耗或失活体内的免疫调节性T细胞”是指降低抑制宿主抗肿瘤免疫应答的免疫调节性T细胞的数量或功能能力。可通过减少免疫调节性T细胞(即,消耗)或使免疫调节性T细胞的抗肿瘤免疫抑制功能失活来实现免疫抑制的拮抗。这样处理的最终结果是降低治疗接受者中免疫调节性T细胞的活性。

[0119] 消耗或失活调节性T细胞可通过施用本文所述药物制剂如CD4抗原的特异性抗体、IL-2受体(即,CD25)的 α 链亚基等实现。另外,可使用 $\gamma\delta$ 免疫调节性T细胞的抗体来消耗这样的细胞并刺激抗肿瘤免疫力。Seo等, *J. Immunol.* (1999) 163:242-249。也可使用抗CD40配体消耗或失活免疫调节性T细胞。

[0120] 部分抗体构建体(例如CTLA-4与免疫球蛋白(Ig)重链的Fc的融合蛋白CTLA4Ig)可用于通过阻断CD28和B7分子之间的相互作用来抑制全T细胞活性的基本协同刺激信号。可将CTLA4Ig作为药物施用以使得调节性T细胞无响应(即,失活)。参见Park等, *Pharm Res.* (2003) 20 (8):1239-48。与假单胞菌外毒素(OnTac)的IL-2融合体是用于消耗或失活调节性T细胞的另一种试剂。

[0121] 在另一种方式中,可施用阻止诱导CD8+细胞溶解T淋巴细胞(CTL)肿瘤无反应性的药剂。可使用激动CD137的药剂(如激动性抗体)来使建立的无反应性CTL在重遇其同源抗原后恢复其肿瘤细胞溶解功能。参见Wilcox等, *Blood* (2004) 103:177-184。这种方式可用于破坏对肿瘤抗原的T细胞耐受。

[0122] 激动CD4/CD25+免疫调节性T细胞上的糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)配体的药剂逆转这些细胞的抑制作用。GITR配体激动剂描述在Tone等, *PNAS* (2003) 100:15059-15064; Stephens等, 2004和Shimizu等2002中。

[0123] 也可在体内施用神经毡蛋白的抗体(例如,Bruder等, 2004)和CTLA-4的抗体(例如,Leach等, 1996)以消耗免疫调节性T细胞或降低其活性。

[0124] 可使用去除、消耗或失活免疫调节性T细胞的方法,即使所述方法不仅限于这样的细胞。去除、消耗或失活免疫调节性T细胞的工作可在给予治疗期期间的多个时间进行。另外,不同的方法可以一起使用(例如,体外细胞去除和体内消耗或失活)。施用来消耗或失活的抗T细胞抗体的量可与在移植领域中使用的量类似。参见,例如,Meiser等, *Transplantation.* (1994) 27;58 (4):419-23。

[0125] 可在施用溶瘤病毒之前、期间和/或之后去除、消耗或失活免疫调节性T细胞。优选在施用溶瘤病毒之前去除、消耗或失活免疫调节性T细胞。

[0126] B. 免疫系统的刺激

[0127] 术语“增强细胞免疫系统”和“刺激细胞免疫系统”(及类似用语)是指药剂刺激产生抗原特异性细胞溶解活性(免疫细胞,特别是细胞毒性T淋巴细胞的活性)和/或NK细胞活性、提高对抗原的细胞免疫应答(通过至少细胞毒性T淋巴细胞的激活)、提高免疫保护(通过至少恢复细胞毒性T淋巴细胞和/或NK细胞的活性以及增强细胞因子的产生)、恢复免疫保护(通过至少恢复或刺激细胞毒性T淋巴细胞活性和/或NK细胞的活性以及增强细胞因子

的产生)或产生促炎性(Th1)细胞因子的能力。

[0128] 增强细胞免疫系统(或产生Th1表型)的药剂包括细胞因子(优选重组的),其代表性实例是GM-CSF、IL-2、IL-12、IL-18和干扰素- γ 。这些细胞因子可在溶瘤病毒治疗之前、期间或之后施用以改善患者对病毒的反应。重组细胞因子是市售可获得的并根据其推荐剂量施用。另一些产生Th1表型的药剂包括刺激产生IL-12p70和/或其它Th1细胞因子的药剂,包括但不限于来那度胺(雷利米得)和泊马度胺。

[0129] 另一些产生Th1表型的药剂包括烷化剂,其代表性实例是替莫唑胺、环磷酰胺、洛莫司汀(CCNU)、双氯乙基亚硝基脲(BCNU)、美法仑盐酸盐、白消安(丁烷-1,4-二基二甲磺酸酯)、氮芥(nitrogen mustard)、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺、链脲霉素、达卡巴嗪(DTIC)、塞替派、六甲蜜胺(hexamethylmelamine)、顺铂、卡铂和奥沙利铂。良好地建立了这些烷化剂治疗多种类型癌症的用途并且可以其推荐剂量使用以产生Th1表型。

[0130] 另一些产生Th1表型的药剂包括佐剂,其非限制性实例是单磷酰脂质A(MPL®)、QS-21(包含可溶性三萜烯葡萄糖苷化合物的植物提取物)或其他皂苷、包含CpG或由CpG组成的寡脱糖核苷酸以及核糖体蛋白质提取物(RPE)。

[0131] 另一些产生Th1表型的药剂包括:CD137激动剂如BMS-663513、CD40激动剂如CP-870,893、OX40(CD134)激动剂和CD27激动剂如CDX-1127。

[0132] 另一些产生Th1表型的药剂包括JAK-2、JAK-3、STAT-3或STAT-5的抑制剂。

[0133] 另一些产生Th1表型的药剂包括CTLA-4拮抗剂(例如,伊匹单抗或Tremelimumab)、PD-1/PD-L1受体拮抗剂(例如,MDX-1106、MK-3475、AMP-224、Pidilizumab或MDX-1105);与B7-H3特异性结合的抗体(例如MGA271)以及吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂,例如D-1-甲基-色氨酸(Lunate)。

[0134] 在另一个实施方案中,用于治疗癌症的方法可包括继承转移免疫细胞以增强抗肿瘤免疫力。本文使用的“继承转移”是指施用来自另一个体或来自同一个体的免疫细胞。这些优选为T细胞,其可在体外活化以增强其支持抗肿瘤免疫应答功能的能力。继承转移的免疫细胞可通过多种周知药剂中的任一种体外激活,包括例如暴露于IL-2和/或抗CD3抗体。体外激活还可包括暴露于癌细胞疫苗。这样的癌细胞疫苗可由来自待治疗个体或来自另一个癌症实体的活的(但非复制的)或杀死的癌细胞组成。疫苗还可以是癌细胞提取物或来自癌细胞的纯化的疫苗制剂。癌细胞疫苗是本领域中周知的,可根据周知的方法制备。

[0135] III. 抗体

[0136] 免疫抑制剂的拮抗剂或免疫系统的刺激剂可以是抗体。本文使用的术语“抗体”包括免疫球蛋白(其为B细胞的产物)及其变体以及T细胞受体(TCR)(其为T细胞的产物)及其变体。免疫球蛋白是包含基本由免疫球蛋白 κ 和 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因以及无数免疫球蛋白可变区基因编码的一条或更多条多肽的蛋白质。已知典型的免疫球蛋白结构单元包含四聚体。每一四聚体由两对相同的多肽链构成,每一对具有一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。每一条链的N末端限定了约100至110个或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链(VL)和可变重链(VH)分别指这些轻链和重链。

[0137] 重组抗体可以是常规的全长抗体、已知来自蛋白消化的抗体片段、独特的抗体片段如Fv或单链Fv(scFv)、结构域缺失抗体等。Fv抗体为约50kD大小,并包含轻链可变区和重链可变区。单链Fv(“scFv”)多肽是共价连接的VH:VL异质二聚体,其可由包含直接连接或

通过肽编码接头连接的VH编码序列和VL编码序列的核酸表达。参见Huston等。(1988) Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883。许多结构用于将来自抗体V区的天然聚集但是化学分离的轻多肽链和重多肽链转变成scFv分子,所述scFv分子将折叠成与抗原结合位点的结构疾病基本类似的三维结构。参见,例如美国专利5,091,513、5,132,405和4,956,778。

[0138] 抗体可以是非人抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体,后者包含人抗体序列和非人抗体序列。如本领域已知的,通过用人恒定区抗体交换非人恒定区(重链、轻链或二者)来制备嵌合抗体。参见,例如美国专利4,816,567。由非人抗体(如由鼠抗体)制备人源化抗体的方法是周知的(参见,例如美国专利5,565,332)。

[0139] IV. 溶瘤病毒

[0140] 可根据本发明方法施用的溶瘤病毒包括但不限于:腺病毒(例如,Delta-24、Delta-24-RGD、ICOVIR-5、ICOVIR-7、Onyx-015、ColoAd1、H101、AD5/3-D24-GMCSF)、呼肠孤病毒、单纯疱疹病毒(HSV;OncoVEX GMCSF)、新城疫病毒、麻疹病毒、逆转录病毒((例如,流感病毒)、痘病毒(例如,痘苗病毒,包括哥本哈根Western Reserve、Wyeth毒株)、粘液瘤病毒、弹状病毒(例如,水泡性口炎病毒(VSV))、小核糖核酸病毒(例如,Seneca Valley病毒;SVV-001)、柯萨奇病毒和细小病毒。

[0141] 在一些优选的实施方案中,所述溶瘤病毒是腺病毒,包括其任意57种人血清型的成员(HAdV-1至57)。在一个方面,所述腺病毒是Ad5血清型。在另一些方面,所述腺病毒是包含或不包含Ad5组分的杂合血清型。可根据本方法施用的腺病毒的非限制性实例包括Delta-24、Delta-24-RGD、ICOVIR-5、ICOVIR-7、ONYX-015、ColoAd1、H101和AD5/3-D24-GMCSF。Onyx-015是病毒血清型Ad2和Ad5的杂合,其在E1B-55K和E3B区具有缺失以增强癌选择性。H101是修饰型的Onyx-015。ICOVIR-5和ICOVIR-7包含E1A的Rb结合位点缺失,并用E2F启动子替换E1A启动子。Colo Ad 1是嵌合的Add11p/Ad3血清型。AD5/3-D24-GMCSF (CGTG-102)是血清型5/3衣壳修饰的腺病毒,编码GM-CSF(Ad5衣壳蛋白染色组被来自血清型3的染色组结构域替换)。

[0142] 在一个特别优选的实施方案中,溶瘤病毒是Delta-24或Delta-24-RGD。Delta-24描述在美国专利申请公开No.20030138405和20060147420中,其每个通过引用并入本文。Delta-24腺病毒来源于5型腺病毒(Ad-5),并在E1A基因的CR2部分中包含24个碱基对缺失。Delta-24-RGD还包含插入在纤维染色组蛋白的HI环中的RGD-4C序列(其与 $\alpha v\beta 3$ 和 $\alpha v\beta 5$ 整联蛋白强力结合)(Pasqualini R.等,Nat Biotechnol,15:542-546(1997))。

[0143] 已经在细胞培养系统和恶性神经胶质瘤异种移植物模型中示出了Delta-24的显著的抗肿瘤作用。目前在临床试验中示出了Delta-24的抗肿瘤功效。条件性复制腺病毒(CRAD)(如Delta-24)具有数种性质,使得其成为了用作生物治疗剂的候选。一个这样的性质是在允许之细胞或组织中复制的能力,其放大了溶瘤病毒的原始输入剂量并将病毒传播到相邻肿瘤细胞,提供了直接的抗肿瘤作用。

[0144] 已经证明了Delta-24腺病毒的体外和体内溶瘤作用。通常,腺病毒是36kb线性双链DNA病毒(Grunhaus和Horwitz,1992)。腺病毒感染宿主细胞,导致腺病毒DNA保持游离体形式,其降低了与整合载体相关的潜在的基因毒性。另外,腺病毒是结构稳定的,在大量扩增后未检测到基因组重排。腺病毒实际上可感染大部分上皮细胞,而不论其细胞周期阶段。迄今为止,腺病毒感染似乎仅与轻微疾病相关联,例如人中的急性呼吸道疾病。

[0145] 数种因素有助于使用溶瘤腺病毒治疗脑肿瘤。首先,神经胶质瘤通常是局部性的,因此有效的局部方法应足以治愈所述疾病。其次,神经胶质瘤具有表达不同基因异常的数个细胞群(Sidransky等,1992;Collins和James,1993;Furnari等,1995;Kyritsis等,1996)。因此,对癌细胞的单基因转移敏感的肿瘤谱可能有限。第三,能够复制的腺病毒可感染和破坏在G0被捕获的癌细胞。由于神经胶质瘤总是包含非周期细胞,因此该性质很重要。最后,p16-Rb途径在大部分神经胶质瘤中是异常的(Hamel等,1993;Henson等,1994;Hirvonen等,1994;Jen等,1994;Schmidt等,1994;Costello等,1996;Fueyo等,1996b;Kyritsis等,1996;Ueki等,1996;Costello等,1997)。因此,使得Delta-24策略适合大多数这些肿瘤。但是成视网膜细胞瘤抑制剂基因功能的丧失与多种类型肿瘤的发生相关,并且不限于治疗神经胶质瘤。

[0146] 如果腺病毒已经突变使得其不能复制或条件性复制的(在某些条件下能够复制),可能需要辅助细胞用于病毒复制。当需要时,辅助细胞系可源于人细胞,例如人胚胎肾细胞、肌细胞、造血细胞或其他人胚胎间充质细胞或上皮细胞。或者,辅助细胞可源于允许人腺病毒的其他哺乳动物物种的细胞。这样的细胞包括,例如Vero细胞或其他猴胚胎间充质或上皮细胞。在某些方面,辅助细胞系是293。可在现有技术中找到多种培养宿主细胞和辅助细胞的方法,例如Racher等,1995。

[0147] 在某些方面,腺病毒通常能够利用突变Rb途径在细胞中复制。在转染后,腺病毒斑被从琼脂糖覆盖的细胞中分离并扩展病毒颗粒用于分析。对于详细方案,技术人员可参阅Graham和Prevac,1991。

[0148] 产生腺病毒载体的替代技术包括利用细菌人工染色体(BAC)系统,利用含互补腺病毒序列的两种质粒在recA+细菌菌株中体内细菌重组,以及酵母人工染色体(YAC)系统(PCT公开95/27071和96/33280,其通过引用并入本文)。

[0149] 腺病毒容易生长和操作,并且在体外和体内具有广泛的宿主范围。这群病毒可高滴度地获得(例如, 10^9 - 10^{10} 噬斑形成单位(pfu)每ml),其是高感染性的。腺病毒的生命周期不需要整合到宿主细胞基因组中。

[0150] 对本文所述溶瘤腺病毒进行修饰可改善溶瘤腺病毒治疗癌症的能力。对溶瘤病毒的这些修饰已在Jiang等(Curr Gene Ther.2009Oct9(5):422-427)中描述,还可参见美国专利申请公开No.20060147420,其每个通过引入并入本文。

[0151] 数种肿瘤类型中不存在或存在低水平的柯萨基病毒和腺病毒受体(CAR)可能限制溶瘤腺病毒的效力。可向纤维染色组添加多种肽基序,例如RGD基序(模拟细胞表面整联蛋白的正常配体的RGD序列)、Tat基序、聚赖氨酸基序、NGR基序、CTT基序、CNGRL基序、CPRECES基序或链霉标签(strept-tag)基序(Rouslahti和Rajotte,2000)。可将基序插入到腺病毒纤维蛋白的HI环中。衣壳修饰允许CAR独立地靶细胞感染。这允许更高效复制,更高效感染并增加肿瘤细胞的裂解(Suzuki等,2001,通过引用并入本文)。也可添加与人神经胶质瘤受体(如EGFR或uPR)特异性结合的肽序列。可使用专门或优选在癌细胞表面发现的特定受体作为腺病毒结合和感染的靶标,例如EGFRvIII。

[0152] 根据本发明的溶瘤病毒可局部施用或全身施用。例如,非限制地,根据本发明的溶瘤病毒可经血管内(动脉内或静脉内)、瘤内、肌内、皮内、腹腔内、皮下、经口、肠胃外、鼻内、气管内、透皮、脊柱内、经眼或颅内施用。

[0153] 根据本发明的溶瘤病毒可以以单次施用或多次施用的方式施用。可以按照以下剂量施用病毒： 1×10^5 噬斑形成单位(PFU)、 5×10^5 PFU、至少 1×10^6 PFU、 5×10^6 或约 5×10^6 PFU、 1×10^7 、至少 1×10^7 PFU、 1×10^8 或约 1×10^8 PFU、至少 1×10^8 PFU、约或至少 5×10^8 PFU、 1×10^9 或至少 1×10^9 PFU、 5×10^9 或至少 5×10^9 PFU、 1×10^{10} PFU或至少 1×10^{10} PFU、 5×10^{10} 或至少 5×10^{10} PFU、 1×10^{11} 或至少 1×10^{11} 、 1×10^{12} 或至少 1×10^{12} 、 1×10^{13} 或至少 1×10^{13} 。例如，可以按照约 10^7 - 10^{13} 之间、约 10^8 - 10^{13} 之间、约 10^9 - 10^{12} 之间或约 10^8 - 10^{12} 之间的剂量施用病毒。

[0154] 根据本发明的溶瘤病毒还可以以细胞载体施用。在这一方面，神经元和间充质干细胞具有高迁移潜力并且保持被限制在肿瘤组织中。在注射到神经胶质瘤中后，成年间充质细胞亚群(骨髓衍生的肿瘤浸润细胞或BM-TIC)表现为浸润整个肿瘤。因此，可在产生病毒的神元或间充质干细胞(例如，BM-TIC)载体(例如，通过将载体细胞注射到肿瘤中)中施用根据本发明的溶瘤病毒。

[0155] A. 组合疗法

[0156] 可以将另外的治疗与任意前述本发明方法组合以提高对癌细胞的杀伤、抑制癌细胞生长、抑制血管生成或者逆转或减少肿瘤细胞的恶性表型的其他改善。这些组合物将按照有效杀伤细胞或抑制细胞增殖的组合物提供。这一方法可包括使细胞同时与表达构建体和一种或更多种药剂或一种或更多种因子接触。这可通过使细胞与包含两种药剂的单种组合物或药物制剂接触或通过使细胞同时与两种不同的组合物或制剂接触来实现，其中一种组合物包含溶瘤病毒而另一种包含第二治疗剂。

[0157] 或者，所述治疗可在另一药剂或治疗之前或之后间隔数分钟至数周。在分别向细胞施用药剂的实施方案中，通常应确保每次递送之间有意义的时间段没有到期，以使得药剂依然能够对细胞发挥有利的组合作用。在这样的情况下，可以预期使细胞与两种用药模式在彼此的约12至24小时内接触，更优选在彼此的约6至12小时内，仅约12小时的延迟时间是最优选的。在一些情况下，可能期望显著延长治疗的时间段，但是分别施用之间间隔数天(2、3、4、5、6或7)至数周(1、2、3、4、5、6、7或8)至数月(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0158] 还可以想到的是，可能期望超过一次地施用任一药剂。可使用多种组合，例如在施用第二药剂之前施用一次或更多次溶瘤病毒治疗；或可在施用溶瘤病毒之前施用第二药剂。连续施用可包括一次或更多次施用溶瘤病毒治疗或第二药剂。此外，为实现细胞杀伤，两种药剂以有效杀伤细胞的组合物向细胞递送。例如，Delta-24或Delta-24-RGD与免疫调节剂的组合。

[0159] 替选癌症疗法

[0160] 根据本发明的某些实施方案，提供了一旦对象被鉴定为是这种治疗(例如Delta-24-RGD治疗)的响应者或很可能响应于这种治疗，就可联合溶瘤病毒治疗使用治疗癌症的方法。当本发明的测定表明对象不太可能响应于能够复制的溶瘤病毒如腺病毒(例如，Delta-24-RGD)的治疗时，可使用这样的治疗。或者，在通过本发明的方法鉴定对象不太可能响应于仅用能够复制的溶瘤病毒之治疗的情况下，可组合能够复制的溶瘤病毒(如腺病毒)来使用这样的治疗。

[0161] 手术

[0162] 约60%的癌症患者将进行某些类型的手术，其包括预防、诊断、分期、治疗或姑息(palliative)手术。治疗手术是可联合其他疗法使用的癌症治疗，所述其他疗法例如本发

明的疗法、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或另类治疗 (alternative therapy)。

[0163] 治疗手术包括切除,其中全部或部分癌组织被物理地移除、切离和/或破坏。肿瘤切除是指物理地移除至少一部分肿瘤。除了肿瘤切除外,通过手术的治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制手术 (Mohs手术)。还可以预期联合浅层癌、初癌或附带量的正常组织的移除来使用本发明。

[0164] 在某些方面,在手术之前或在切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤时通过瘤内注射来施用治疗。治疗还可通过在这些区域输注、直接注射或局部施用另外的抗癌治疗来完成。这样的治疗可例如每1、2、3、4、5、6或7天,或每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复。这些治疗可以是不同剂量的。

[0165] 化学疗法

[0166] 可根据本发明使用多种化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物治疗癌症。术语“化学治疗剂”用于指在癌症的治疗中施用的化合物或组合物。通过其在细胞内的活性模式将这些药剂或药物分类,例如是否影响细胞周期及其影响细胞周期的阶段。或者,可基于药剂与DNA直接交联或插入DNA或通过影响核酸合成诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来对其进行表征。大部分化学治疗剂落在以下分类中:烷化剂、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂和有丝分裂抑制剂。

[0167] 烷化剂直接与基因组DNA相互作用以阻止癌细胞增殖。这一类药物包括影响细胞周期的所有阶段的药剂,且常用于治疗慢性白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金氏病、恶性黑色素瘤、多发性骨髓瘤以及乳腺、肺和卵巢的特定癌症。它们包括:氮芥类(例如氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺 (**Cytoxan®**))、异环磷酰胺和美法仑)、亚硝基脲(例如链脲霉素、卡莫司汀 (BCNU) 和洛莫司汀)、烷基磺酸盐(例如白消安)、三嗪(例如达卡巴嗪 (DTIC) 和替莫唑胺 (**Temodar®**))、乙撑亚胺(例如塞替派和六甲蜜胺)、以及铂药物(例如顺铂、卡铂和奥沙利铂)。

[0168] 抗代谢药干扰DNA和RNA的合成。与烷化剂不同,其特定地在S期影响细胞周期。其已被用于抗慢性白血病以及乳腺、卵巢和胃肠道的肿瘤。抗代谢药包括5-氟尿嘧啶 (5-FU)、6-巯基嘌呤 (6-MP)、卡培他滨 (**Xeloda®**)、克拉屈滨、氟达拉滨、阿糖胞苷 (**Ara-C®**)、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨 (**Gemzar®**)、羟基脲、氨甲喋呤、培美曲塞、喷司他丁和硫鸟嘌呤。

[0169] 抗肿瘤抗生素具有抗菌活性和细胞毒活性二者。这些药物还通过对酶和有丝分裂的化学抑制或者改变细胞膜来干扰DNA。这些药剂作用于细胞周期的所有阶段,被用于治疗多种癌症。代表性实例包括柔红霉素、阿霉素 (**Adriamycin®**)、表柔比星、伊达比星、放线菌素D、博来霉素和丝裂霉素C。通常,以25-100mg/kg的剂量通过快速静脉 (bolus i.v.) 注射来施用这些化合物。

[0170] 拓扑异构酶抑制剂干扰拓扑异构酶——帮助分开DNA链从而使其可进行复制的酶,其被用于治疗某些白血病、以及肺癌、卵巢癌、胃肠道癌和其他癌症,包括拓扑替康、伊立替康、依托泊苷 (VP-16) 和替尼泊苷。

[0171] 有丝分裂抑制剂(通常是植物生物碱)作用于细胞周期的M期并阻止有丝分裂或抑制酶产生细胞繁殖所需的蛋白质。代表性实例包括:紫杉烷(例如紫杉醇(**Taxol®**))和多西他赛(**Taxotere®**)、埃博霉素(例如伊沙匹隆(**Ixempra®**))、长春花生物碱(例如硫酸长春碱(**Velban®**)、长春新碱(**Onocovin®**)和长春瑞滨(**Navelbine®**))以及雌莫司汀(**Emcyt®**)。

[0172] 其他化学治疗剂包括靶向治疗剂(例如伊马替尼(**Gleevec®**)、吉非替尼(**Iressa®**)、舒尼替尼(**Sutent®**)、索拉非尼(**Nexavar®**)、硼替佐米(**Velcade®**)、贝伐单抗(**Avastin®**)、曲妥单抗(**Herceptin®**)、西妥昔单抗(**Erbix®**)和帕尼单抗(**Vectibix®**))、激素治疗剂(包括抗雌激素(例如氟维司群(Faslodex)、它莫西酚、托瑞米芬(toremifine))、芳香化酶抑制剂(例如阿那曲唑、依西美坦和来曲唑)、孕酮(例如醋酸甲地孕酮和促性腺激素释放激素)以及免疫治疗剂(例如抗肿瘤特异性抗原(例如,前列腺特异性抗原、癌胚抗原、泌尿肿瘤相关抗原、胎儿抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMGF、Sialyl Lewis抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B和p155)的抗体,其可与药物或毒素(例如,放射性同位素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素)缀合)。

[0173] 放射疗法

[0174] 放射疗法(radiotherapy),也称为放疗(radiation therapy),是利用电离辐射治疗癌症和其他疾病,其可用于治疗局部实体瘤(例如皮肤、舌、喉、脑、乳腺或子宫颈的癌症)或者可用于治疗血液形成细胞的癌症(白血病)和淋巴系统的癌症(淋巴瘤)。放射疗法包括但不限于使用 γ 射线、X射线和/或直接递送放射性同位素到肿瘤细胞。预期了其他形式的DNA损伤因素,例如微波和UV辐射。X射线的剂量范围为从用于长时期(3至4周)的50-200伦琴的每日剂量,至2000-6000伦琴的单次剂量。

[0175] 放射疗法还包括使用放射性同位素标记的抗体直接递送放射剂量到癌部位(例如,放射免疫疗法、适形放射疗法)、高分辨率强度调制放射疗法和立体定向放射手术。用于脑和其他肿瘤的立体定向放射手术(伽马刀)使用来自数百不同角度的精确靶向的伽马光束放射治疗。仅一次手术,需要花费约4至5小时。

[0176] V. 药物组合物

[0177] 本文描述的细胞、病毒、多肽、肽和化合物(即,治疗剂)可作为与可药用载体配制的药物或药剂施用。因此,所述治疗剂可用于制造药剂或药物组合物。本发明的药物组合物可配制成溶液剂或冻干散剂用于经肠胃外施用。散剂可在使用前通过添加合适的稀释剂或其他可药用载体复溶。液体制剂可以是缓冲等渗水溶液。散剂还可以以干形式喷雾。合适的稀释剂的实例是普通等渗盐水溶液、标准5%葡萄糖水或缓冲的醋酸钠或醋酸铵溶液。这样的制剂特别适于经肠胃外施用,但是其也可用于口服施用或含在计量剂量吸入器或喷雾器中用于吸入。可以期望添加赋形剂,例如聚乙烯吡咯烷酮、明胶、羟纤维素、阿拉伯胶、聚乙二醇、甘露醇、氯化钠、柠檬酸钠等。

[0178] 或者,治疗剂可以是胶囊化剂、片剂或制备成乳剂或糖浆剂用于经口施用。可添加

可药用固体或液体载体以增强或稳定组合物,或促进组合物的制备。固体载体包括淀粉、乳糖、硫酸钙二水合物、白土、硬脂酸镁或硬脂酸、滑石、果胶、阿拉伯胶、琼脂或明胶。液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、盐水和水。载体还可包含缓释物质,例如单独或与蜡一起的单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。固体载体的量不同,但优选为约20mg至约1g每剂量单位。根据药理学常规技术制备所述药物制剂,包括研磨、混合、粒化和压缩(当需要时),用于片剂形式;或研磨、混合和填充,用于硬明胶胶囊剂形式。当使用液体载体时,制剂可以是糖浆剂、酞剂、乳剂或水性或非水性混悬剂的形式。对于直肠施用,本发明化合物可与赋形剂如可可脂、甘油、明胶或聚乙二醇组合并模塑成栓剂。

[0179] 治疗剂可配制为包含其他医学可用药物或生物剂。还可与本发明化合物所针对的疾病或病症可用的其他药物或生物剂的施用联合来施用所述治疗剂。

[0180] 如本文所使用的,用语“有效量”是指这样的剂量,其足以对其接受者提供足够高以赋予有益效果的浓度。任何特定对象特有的治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括被治疗的病症、病症的严重程度、特定化合物的活性、施用途径、化合物的清除速率、治疗持续时间、与化合物组合或同时使用的药物,对象的年龄、体重、性别、饮食和总体健康情况以及医学领域和科学中周知的类似因素。被考虑以确定“治疗有效量”的多种一般考虑因素是本领域一般技术人员已知的,并描述在例如Gilman等编辑,Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics,第8版,Pergamon Press,1990;和Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1990。剂量水平通常落在约0.001至100mg/kg/天的范围,约0.05至10mg/kg/天的水平是通常适用的。化合物可经肠胃外施用,例如血管内、静脉内、动脉内、肌内、皮下等。施用也可是经口、鼻、直肠、透皮或通过气雾剂吸入。可以快速输注或缓慢输注施用所述化合物。

实施例

[0181] 包含以下实施例和附图以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应理解的是,在实施例或附图中公开的技术代表本发明人发现的在本发明的实践中运行良好的技术,因此可被认为构成了用于其实践的优选模式。但是,本领域技术人员在本公开内容的基础上应理解,不偏离本发明的精神和范围,可对公开的具体实施方案进行许多改变并且依然取得相同或相似的结果。

[0182] 实施例1-阶段I临床研究

[0183] 最近进行了用于治疗恶性神经胶质瘤的能够有条件地复制的腺病毒(Delta-24-RGD)的阶段I剂量递增的双臂临床试验。研究的A臂测试直接瘤内注射单剂量的Delta-24-RGD到复发性神经胶质瘤的生长区域中。B臂测试在切除复发性神经胶质瘤后瘤内施用分开的剂量到切除基床中。A臂研究以 1×10^7 病毒颗粒(vp)的剂量开始,以半对数的增加逐渐提高直至 3×10^{10} vp,未达到最大耐受剂量(MTD),这是因为未发现剂量限制性毒性,也未报道任何严重的不良事件(SAE)。阶段I试验示出了肿瘤应答的明显证据以及在达到 3×10^8 vp的相对低的剂量后A臂和B臂二者好的存活。通过MRI,阶段I A臂数据(n=24)表明了高的响应率(30-40%),如通过MRI上肿瘤收缩和特征改变(“信号改变”)证明的。表明这些信号改变是相关的之证据来源于手术切除肿瘤的病理报道。在Delta-24-RGD治疗后数月,在肿瘤看起来恶化的响应中,切除两个肿瘤。在两个实例中,病理学家报道,肿瘤80%和90%死亡(坏

死),其余肿瘤主要被CD8T细胞浸润。实际上,瘤内递送Delta-24-RGD引起的MRI上信号的改变可用作临床响应的早期指示,而不需要依赖于肿瘤尺寸的准确测量。

[0184] Delta-24-RGD是一种腺病毒,其已经被改造来高选择性地感染缺少Rb肿瘤抑制基因的细胞,这是肿瘤细胞的特有情况。理论上,腺病毒在肿瘤块中传播导致一系列的感染-复制-裂解-感染事件,其将产生传播波,可能根除肿瘤块。因此,溶瘤病毒如腺病毒具有克服神经胶质瘤对常规治疗的抗性的特有希望,并避免了手术对肿瘤的难接近性和癌细胞放射治疗和化学治疗的趋势。阶段I研究的目的是发现具有复发性恶性神经胶质瘤的患者通过瘤内注射施用以及进入切除后空腔中的Delta-24-RGD的最大耐受剂量。这些试验的结果显示瘤内注射病毒引起溶瘤的初始阶段,接着是延迟的炎性(Th1极化)应答,其最终导致肿瘤收缩并在这些患者的一个亚组中完全退化。这是首次证明患有神经胶质瘤的患者在暴露于溶瘤病毒(如Delta-24-RGD)后发展了免疫应答,并且这种免疫应答可用作预测治疗的成功的基础。

[0185] 尽管本文所述结果获自患有高级神经胶质瘤的患者,但是已经证明了一般溶瘤病毒(特别地,Delta-24-RGD病毒)在多种肿瘤类型中复制的能力,包括但不限于:乳腺癌、前列腺癌、大细胞肺癌和肉瘤。本提供的治疗神经胶质瘤的数据预期与大多数其他实体瘤有相关性。

[0186] 在使用Delta-24-RGD的阶段I临床试验中的一个完全出乎意料独特发现是,基于连续核磁共振成像(MRI)扫描图,至少两位之前已经利用替莫唑胺和放射疗法进行治疗(并且失败)的患者具有最小的似乎完整的放射照相响应。这些患者通过MRI具有典型肿瘤响应,一位在MRI上表现出巨大改变但是未收缩,在随后切除后,通过病理学报道的肿瘤90%坏死,其余被免疫细胞浸润。这些患者中的一位依然存活,在单次注射病毒治疗后超过2¹/₂年良好。这是惊人的发现,更未预料到的是所述2位具有这些完全响应的患者也具有与阶段I试验中的其余人群相比大大提高的IL-12p70血清水平。细胞因子的这些IL-12p70水平与辅助T细胞1(Th-1)极化对于溶瘤腺病毒的最佳作用是必需的这一假设有极好的关联。实际上,所有响应于Delta-24-RGD治疗的患者在利用病毒治疗之前和之后具有显著提高的IL-12p70水平(100%相关性)。该数据还与下文将讨论的发现一致:具有完全响应之这些患者的血清具有非常低水平的抗癌相关抗原的抗体。另外,对在阶段I研究中来自响应于病毒的患者切除的肿瘤的分析表明在治疗后两周巨噬细胞浸润,接着数月CD8T细胞浸润。

[0187] 该数据表明在施用溶瘤病毒(如Delta-24-RGD)之前或之后,通过例如施用Th1细胞因子(如人重组IL-12p70、IL-2、IFN- γ)或刺激IL-12p70产生的药剂(如雷利米得或来那度胺)刺激患者中的Th1表型(即,高水平的Th1细胞因子如IL-12)可潜在地用于提高患者对病毒作用的响应。因此,向一位具有低基线IL-12p70水平的患者在接受Delta-24-RGD后两个月施用IFN- γ (连续在星期一、星期三和星期五皮下施用2百万单位的干扰素 γ -1b (**Actimmune®**))以产生Th1表型并因此提高病毒的抗肿瘤作用。患者对病毒良好响应并且好像是完全响应者,因此提供了原则性证据。抑制Th2细胞因子(如IL-4、IL-5、IL-10、IL-13)也可代表提高溶瘤病毒的效果的新策略。

[0188] 本发明人还发现在接受Delta-24-RGD之前具有高水平抗癌相关抗原抗体的患者或在溶瘤病毒治疗过程中发展提高的循环的抗癌抗原的自身抗体的患者对病毒未表现出响应。相反,完全响应者的患者血清具有低水平的抗癌相关抗原的抗体。再次观察到了

100%相关性,符合IL-12p70和对病毒的响应之间的相关性。因此,辅助T细胞1(Th-1)极化是溶瘤腺病毒最佳作用所必需的。简要地说,在接受Delta-24-RGD之前测试进入阶段I临床试验的患者血清中存在或不存在抗31种不同癌症相关抗原的抗体以及治疗后抗体的发展。这些癌症抗原包括癌症/睾丸抗原,这是一类通常局限于在生殖细胞系表达但是在多种癌症类型中激活的肿瘤抗原,通常编码在癌症患者中为免疫原性的抗原。目前没有对神经胶质瘤患者中抗癌症抗原的这些抗体的出现进行的系统研究。本发明人已获得了神经胶质瘤患者对癌症抗原产生了免疫应答的第一证据。出乎意料地,在放射照相中对Delta-24-RGD具有响应的肿瘤患者的血清具有低的或不具有抗限定组抗原的体液抗体应答。响应于Delta-24-RGD的患者中抗体应答的缺乏与响应病毒需要Th1极化的免疫系统是一致的。

[0189] 这些独特发现具有极为广泛地意义:(1)高水平的Th1细胞因子(如IL-12p70)和/或低水平的抗癌症相关抗原的抗体提供了一组新的生物标志物,其可用于鉴定响应于溶瘤病毒(例如,腺病毒)治疗的患者亚组,以及(2)可在施用溶瘤病毒之前或之后共施用产生Th1免疫表型(即,提高IL-12p70和其他Th1细胞因子的水平)的药剂以增强溶瘤病毒治疗。例如,可向癌症患者系统地施用重组人IL-12p70(或干扰素 γ 或刺激产生这些细胞因子的药剂,例如雷利米得)以增强溶瘤病毒(如腺病毒)的效果,从而提高抗肿瘤活性并改善治疗结果。

[0190] 因此,本发明人已发现Th1细胞因子的优势表达可用于预测患有癌症(如神经胶质瘤)的患者中溶瘤病毒治疗的结果。不希望受到理论的约束,提议对具有优势Th1细胞因子谱的癌症患者亚组致敏以建立细胞介导的抗肿瘤免疫应答。特别地,本发明人已出乎意料地发现在积极临床结果中对溶瘤腺病毒Delta-24-RGD具有可测量的响应的神经胶质瘤患者具有高水平的Th1细胞因子IL-12p70、IL-2和IFN- γ ,而高水平的抗肿瘤相关抗原抗体似乎预示着这些患者对病毒无响应。在手术前,具有完全响应或高水平响应的患者具有高水平的Th1细胞因子白介素-12p70(与阶段I试验中的其余人群相比血清水平极大提高),且该水平在注射病毒后提高。具有完全响应的两位患者具有与阶段I试验中的其余人群相比极大提高的IL-12p70血清水平。

[0191] 研究了其它促炎利用的Th1细胞因子(例如IFN- γ)和抗炎Th2细胞因子(例如,IL-4和IL-10)在神经胶质瘤患者对溶瘤腺病毒Delta-24-RGD治疗的响应中的作用。还检查了磷酸-STAT3(Tyr705)和切割的半胱天冬酶-3的作用。磷酸-STAT3(Tyr705)。因此,使用定制包被的多点板(multispot plate)和Sector Imager6000根据制造商的方案(微小改动的Meso Scale)测定细胞裂解物中的磷酸-STAT3(Tyr705)和切割的半胱天冬酶-3以及细胞培养基中的GM-CSF、IFN γ 、IL1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40和TNF α 水平。为了定量细胞因子,收集细胞培养基并储存在-80 $^{\circ}$ C。为了定量切割的半胱天冬酶-3和磷酸-STAT3(Tyr705),经进行实验操作的细胞用冰冷的磷酸盐缓冲盐水洗涤然后通过放置在冰上在MSD完全裂解缓冲液(150mM NaCl、20mM Tris[pH7.5]、1mM EDTA、1mM EGTA、1% Triton X-100、10mM NaF、MSD磷酸酶抑制剂I、MSD酶抑制剂II和蛋白酶抑制剂混合物)中裂解,伴随不时涡流混合30分钟。在4 $^{\circ}$ C下于17,968g离心10分钟后,收集上清液,确定蛋白质浓度并将澄清裂解液储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0192] 使用捕获抗体预包装的来自Meso Scale Discovery(MSD;Gaithersburg,MD)的96孔多点板在生物学双份样品上进行电化学发光测定。简要地说,在室温通过振动对板进行

封闭1小时并用含有0.1% Tween-20的Tris缓冲盐水洗涤4次。将15微克蛋白质或25微升上清液或校准物添加到每一孔中并在室温振动孵育1小时或在4℃过夜。洗涤板,然后通过向每一孔中添加25μl 1μg/ml标记有MSD SULFO-TAG试剂的特异性检测抗体并在室温振动孵育2小时来量化特定蛋白质水平。如前将板用含有0.1% Tween-20的Tris缓冲盐水洗涤4次,添加150μl 2×或1×阅读缓冲液(read buffer),并立即使用SECTOR Imager 6000对板进行阅读,且使用Discovery Workbench和SOFTmax PR04.0对数据定量。

[0193] 迄今获得的数据已经证明Th1细胞因子的优势表达预示着患者的临床结果。不受理论的约束,建议对具有优势Th1细胞因子谱的癌症患者亚组致敏以建立细胞介导的抗肿瘤免疫应答。特别地,本研究证明神经胶质瘤患者中通过细胞因子IL-12和IFN-γ的Th1驱动的免疫应答与对Delta-24-RGD可测量的响应和积极的临床结果相关,而高水平的抗肿瘤相关抗原的抗体似乎预示着患者对病毒不响应。在Delta-24-RGD治疗期间不涉及Th2细胞因子IL-4和IL-10的应答,其表达水平不表现为与临床结果相关。因此,免疫应答从体液(通过例如自身抗体滴定测量)向细胞(通过例如细胞因子分析证明)的倾斜可用于预测很可能响应于溶瘤病毒(如Delta-24-RGD)的患者。

[0194] 用于增强溶瘤病毒(如Delta-24-RGD)的作用的可选或另外的策略是降低或抑制调节性T细胞(其也被称为T-regs)的水平,其可通过若干化学治疗剂实现,包括若干烷化剂,例如替莫唑胺和环磷酰胺。在之前替莫唑胺治疗失败的两位完全响应者中,在治疗之前和治疗期间高度Th1极化的免疫系统证明可在溶瘤病毒治疗之前向神经胶质瘤或其他癌症患者施用抑制调节性T细胞的药剂以致敏患者的免疫系统来响应于病毒。或者,可在施用病毒之后施用抑制调节性T细胞的药剂。

[0195] 利用本文所述发现,通过使用溶瘤病毒(如Delta-24-RGD)可预期或实现一种“完美风暴”治疗,其包括(a)在施用病毒之前预施用IL-12刺激剂(例如,重组人IL-12p70或IFN-γ)或者药剂(如雷利米得(来那度胺))以刺激IL-12p70的产生,(b)向肿瘤的多个区域注射病毒以取得最大的溶瘤作用,以及任选地(c)向患者施用可降低在增殖的情况下的T-reg群和/或刺激细胞介导的免疫应答的药剂。例如,可以以潜在的剂量密集方式使用替莫唑胺来降低T-reg群,其可以是7天施药并且7天停药,或者21天施药并且7天停药,或者标准施药,5天施药并且23天停药。该组合疗法可首先增加Th1细胞因子,其驱动Th1或辅助T细胞1应答,其介导T细胞效应细胞。将Delta-24-RGD引入到肿瘤块中,然后随着肿瘤细胞裂解,产生病毒抗原和推测的癌症相关抗原二者的“抗原爆发”。最后,施用刺激抗肿瘤相关抗原的细胞介导的免疫应答的药剂,例如CTLA-4拮抗剂,(如伊匹单抗)和PD-1/PD-L1受体拮抗剂,刺激和保持T细胞介导克隆的复制和活性。

[0196] 实施例2-阶段IB临床试验:共施用溶瘤病毒和Th1刺激剂

[0197] 进行阶段IB临床研究设计来确定与静脉内施用的伊匹单抗一起的通过瘤内施用以及进入切除后空腔的Delta-24-RGD的最大耐受剂量,以及组合的剂量限制毒性和抗肿瘤活性。

[0198] 伊匹单抗是阻断全人细胞毒性T淋巴细胞抗原(CTLA-4)的IgG1k单克隆抗体(之前称为MDX-010)。CTLA-4是T细胞活性的负调节物。CTLA-4的功能是通过发挥对T细胞活性的抑制控制以及阻断该特定通路来起免疫检验点的作用。利用伊匹单抗的阻断允许持续免疫应答。伊匹单抗与CTLA-4结合并阻断CTLA-4与其配体CD80/CD86的相互作用。已经表明

CTLA-4的阻断增强T细胞的活性和增殖,伊匹单抗的作用机制可能是通过T细胞介导的抗肿瘤免疫应答进行。简要地说,伊匹单抗阻断由CTLA-4介导的调控反馈回路,从而有效刺激T细胞增殖并分泌IL-2。伊匹单抗已经获得了FDA的管理批准用于治疗不可切除的或转移性黑色素瘤。在阶段3临床试验中,向患有这些癌症的患者施用gp100(包含黑色素瘤相关抗原的肽疫苗)、伊匹单抗或其二者的组合。单独利用伊匹单抗治疗的患者死亡的风险比gp100臂降低34%,但是在单独伊匹单抗与gp100+伊匹单抗组合之间没有观察到中值总存活(OS)的差异。

[0199] 患者入选资格

[0200] 具有组织学上被证明的复发的恶性原发性神经胶质瘤的患者是合格的。神经胶质瘤类型限于:多形性成胶质细胞瘤(GBM)和胶质肉瘤(GS)。患者同意在注射Delta-24-RGD-4C之前在立体定向注射时采集活检物以确认恶性神经胶质瘤的存在(基于冷冻切片)。患者必须愿意并且能够给出知情同意书。患者年龄必须 ≥ 18 岁。患者的卡氏(Karnofsky)体力状态必须 ≥ 60 。患者必须已经从之前治疗的毒性作用中恢复(即,CTC级别1或更低),例如,它们必须在施用长春新碱后至少2周、亚硝基脲后6周以及丙卡巴肼或替莫唑胺后3周。在开始治疗之前患者必须具有充分的骨髓功能(绝对粒细胞数 $\geq 1,500$,且血小板数 $\geq 75,000$)、充分的肝功能(SGPT和碱性磷酸酶 ≤ 2 倍的所制定标准,且胆红素 $< 1.5\text{mg}\%$)、以及充分的肾功能(BUN或肌酸酐 < 1.5 倍所制定标准)。本研究旨在包括女性和少数民族,但是不旨在测量干扰效果之间的差异。将没有性别偏向地招募男性和女性。本研究不会有基于种族的排除。将积极招募少数民族来参与。

[0201] 排除

[0202] 本研究将排除以下患者:(1) 主动不受控制的感染或者不稳定或严重的间发医学病症。所有患者在基线时必须不发热(即, $< 38.0^\circ\text{C}$ (摄氏度))。(2) 在手术前的出血体质的证据或使用抗凝剂药物或任何可能提高无法停止的出血的风险的药物。如果在注射Delta-24-RGD-4C之前可停药 ≥ 1 周,则患者是合格的。(3) 历史上或当前被诊断具有以下任何医学或心理病症,其在研究者的意见中可能干扰对象的参与能力或由于精神病或并发的医学问题而无法获得知情同意书。(4) 怀孕和/或哺乳的妇女。因为含有涉及细胞生长调节和分化的基因的重组病毒的潜在风险,其可能潜在地影响胎儿发育或婴儿生长,排除在研究期间怀孕、处于怀孕风险下或母乳喂养婴儿的妇女。(5) 免疫功能低下对象,具有自身免疫病症、活跃肝炎病毒(A、B、C或D[δ])或HIV血清阳性的对象。(6) 具有Li-Fraumini综合征或具有在成视网膜细胞瘤基因或其相关途径中已知的种系缺陷的患者。(7) 多发性颅内恶性神经胶质瘤损伤。(7) 有记录的颅外转移。(8) 在施用Delta-24-RGD-4C的2周内进行生物学/免疫治疗(例如,IL-2、IL-12、干扰素)。(9) 任何进行MRI的禁忌症,例如:具有起搏器、心外膜起搏器线、输液泵、手术和/或动脉瘤夹、弹片、金属假体、具有潜在的磁特性的植入物、眼内的金属体等的个体。(10) 白细胞(WBC) $< 2.5 \times 10^3/\text{mm}^3$,绝对中性粒细胞数(ANC) $< 1.5 \times 10^3/\text{mm}^3$,血小板 $< 75,000/\text{mm}^3$,血红蛋白(Hgb) $\leq 10.0\text{gm}/\text{dL}$,凝血酶原时间/国际标准化比率(PT/INR)或局部凝血活酶时间(PTT) $> 1.8 \times$ 对照。(11) 4级血液毒性。(12) 血清肌酸酐 $> 1.5\text{mg}/\text{dL}$ 。(13) 肝转氨酶(天冬氨酸转氨酶[AST]和/或丙氨酸转氨酶[ALT])或总胆红素 $> 2 \times$ 对照的上限。(14) 诊断为除治愈性原位宫颈癌、皮肤基底或鳞状细胞癌之外的其他癌症。(15) 具有脑炎、多发性硬化、可干扰对象的评估的其他CNS感染或原发性CNS疾病病史。(16)

拒绝在研究期间以及直到注射Delta-24-RGD-4C后6个月内使用双屏蔽形式避孕的男性或女性。

[0203] 治疗计划-研究概述

[0204] 本研究具有有限的阶段IB部分,利用伊匹单抗和Delta-24-RGD-4C的组合治疗具有复发性成胶质细胞瘤的患者。研究的患者需要活检确诊复发性肿瘤,并允许两种之前的治疗或两次之前的肿瘤复发。

[0205] 活检确诊首次或分段复发的GBM的患者将是被允许的并实施初始瘤内或切除床注射1ml 3×10^{10} vp Delta-24-RGD。在多个时间点监测患者的病毒释放,以及在第二周和第四周通过MRI监测肿瘤响应以在MRI上寻找肿瘤破坏的“信号”证据。向MRI上没有出现改变的证据的患者提供一次额外剂量的Delta-24-RGD,接着在治疗后第2个月任选地提供第三剂量。该策略将控制在单注射过程中Delta-24-RGD可能次优递送的可能性。次优递送可能是由于:(1)缺少或未选择肿瘤的增强区域,(2)由于瘤内压力,病毒倒流出肿瘤,(3)肿瘤内的遗传改变,使得不能支持强力的Delta-24-RGD复制,或(4)由于之前的毒性化学治疗或皮质类固醇导致的免疫抑制,其可能影响Delta-24-RGD建立肿瘤响应的能力。

[0206] 监测所有患者的肿瘤响应、安全性、无发展性(progression-free)、总存活和生命质量评估。除了包括Ad血清转变在内的所有标准血液测量外,我们还将使用由Seramatrix (Carlsbad, CA)开发的专有测定以及细胞因子测定来登记血清抗肿瘤抗体的出现(或消失)。

[0207] 剂量递增-阶段I

[0208] 以比在之前的Delta-24-RGD-4C的阶段I研究过程中作为单药剂安全给予的最高剂量低一个log单位的剂量给予Delta-24-RGD-4C的剂量,即以 3×10^9 病毒颗粒每ml的剂量将1ml的量通过立体定向框架递送系统注射到肿瘤床中(在之前阶段I单药剂研究中给予的最高剂量为 3×10^{10} 病毒颗粒每ml)。阶段I部分将基于3×3设计,但是如果在前三位患者中未看到大于1或2级的毒性,那么可将患者提升到下一剂量,其为再次通过立体定向框架递送方法给予1ml注射体积的 1×10^{10} 病毒颗粒每ml的剂量。再一次,如果在该剂量水平没有大于1或2级的毒性,那么我们将达到该试验的最高剂量,其为 3×10^{10} 病毒颗粒每ml,在开始替莫唑胺给药后第28天给予。在随后月疗程2和疗程3中,允许患者最多总共3次注射病毒,仍在开始新的替莫唑胺疗程后第21天给予。一旦达到最高剂量组合,假设没有大于1或2级的毒性,那么开始该组合临床试验的阶段II部分。

[0209] 所有对象

[0210] 在病毒施用和手术程序之后,将所有对象转移到ICU直到稳定。然后基于主要的外科医师决定,可以将对象转移到住院病人病房(in-patient unit)或二级病房(Step-Down unit)。3天后,最后由研究人员决定对象出院。在对象的术后住院期间将其隔离接触安置并根据腺病毒感染的制度政策管理。

[0211] 剂量(Dosing)和剂量递增(Dose-Escalation)

[0212] 安全停止规程-主要的安全性变量是具有任何3级或更大毒性的对象的比例,所述毒性至少可能与Delta-24-RGD-4C相关(且不是手术程序)。

[0213] 任意剂量水平的毒性率不大于30%。如果具有3级或更大毒性(被认为至少可能与Delta-24-RGD-4C相关)的对象的数目大于或等于上述接受Delta-24-RGD-4C的对象的可能

性,则认为剂量毒性过高,具有由Delta-24-RGD-4C引起的DLT的对象将由主要研究人员审核。

[0214] 另外的研究停止标准包括 (a) 至少可能归因于Delta-24-RGD-4C的死亡, (b) 至少可能归因于Delta-24-RGD-4C的严重过敏反应 (CTC3或4级) 和/或 (c) ≥ 2 位患者中DLT在最低剂量水平。

[0215] 剂量中断-如果对象出现了脑功能降低或心血管灌注的症状或如果有过敏反应或过敏症的迹象,则应中断Delta-24-RGD-4C的施用。过敏症的迹象或症状包括皮疹、荨麻疹、血压改变、对象未在全麻下的呼吸短促。在研究人员的意见中,对于任何有必要中断的不良事件,也应中断Delta-24-RGD-4C的施用。另外,如果似乎已经发生了心室渗透,则终止程序并不再施用Delta-24-RGD-4C。

[0216] 皮质类固醇和抗惊厥药-地塞米松 (Anticonvulsants-Decadron) 将被用于研究,因为病毒基因治疗的最大挑战在于对病毒本身的免疫应答。类固醇也控制脑炎症和水肿。在手术前一天记录类固醇的总日剂量 (表示为mg地塞米松/天)。根据研究人员的决定调节剂量,除临手术前所有对象接受10mg IV之外。“手术”包括立体定向注射和开颅术二者。将努力降低类固醇剂量至最小临床有效剂量。根据研究人员决定施用抗惊厥药。

[0217] 排除治疗-在注射Delta-24-RGD-4C之后的研究中,对象不能接受任何以下药物或治疗: (1) 接种疫苗 (2) 基因转移治疗。

[0218] 伊匹单抗的剂量改变-根据处方信息改变推荐剂量。停止任何中度免疫介导的不良反应或有症状的内分泌病的剂量,直到返回基线、改善到轻度严重或完全消退,且患者每天接受 < 7.5 mg强的松或等效物。对于以下任何情况,永久停止YERVOY (1) 持久的中度不良反应或不能将皮质类固醇剂量降低到7.5mg强的松或等效物每天 (2) 从施用第一剂量开始,在16周内不能完成整个疗程 (3) 严重的或威胁生命的不良反应,包括任意以下情况: (i) 伴随腹痛、发热、肠梗阻或腹膜症状的结肠炎;排便频率提高 (超过基线 ≥ 7)、排便失禁、需要静脉补水 > 24 小时、胃肠出血和胃肠穿孔 (ii) AST或ALT $> 5 \times$ 正常值上限 (ULN) 或总胆红素 $> 3 \times$ ULN (iii) 斯-约二氏 (Stevens-Johnson) 综合征、毒性表皮坏死溶解或并发全层皮肤溃疡或坏死、大泡或出血性临床表现的皮疹 (iv) 严重运动或感觉神经病变、格林-巴利综合征 (Guillain-Barre syndrome) 或重症肌无力 (v) 涉及任何器官系统的严重免疫介导的反应 (vi) 免疫介导的眼病,对局部免疫抑制治疗无响应。

[0219] 研究程序

[0220] 在开始任何研究相关评估之前,所有患者必须已经签署了IRB批准的知情同意书。另外,签订所述机构对创伤性程序的手术同意书。

[0221] 获得患者的完整病史 (包括之前的肿瘤治疗和并发的非恶性疾病的详情) 并在第0天/基线程序之前2周内评估全部神经学症状。另外,对其进行彻底的体检,包括一般检查和神经检查。记录生命体征测量值和体重,并确定卡氏体力状态评分。在第0天/基线程序之前2周内进行日常基线实验室测试。这些测试将被作为基线并用于手术清除。

[0222] 最后,在第0天/基线程序之前2周内,通过施用或不施用钆对所有对象进行脑部MRI。基于扫描结果初步决定进行基因转移治疗和注射的对象的资格和/或确定每一对象所需的程序。

[0223] 特定的预处理实验评估-对所有对象进行特定的实验室研究,测定血清的抗AdV5

抗体滴度 (ELISA) ;使用基于MSD的ELISA测试另外的血清的癌症相关抗原 (CRA) 的特异性抗体以及细胞因子谱;对外周血进行流式细胞术 (由P.I.判断);对可能生育的女性进行血清妊娠测试;对所有对象进行HIV-1测试;肝炎筛选血清学:甲型肝炎、乙型肝炎[核心抗体和表面抗原]、丙型肝炎和丁型肝炎[δ 病毒];使用以下物质测试病毒传播:血清、鼻咽分泌物和尿液;以及Delta-24-RGD-4C和野生型AdV特异的AdV DNA的PCR。

[0224] 手术程序后评估-在立体定向活检后36小时内,对对象进行CT扫描以评估血肿的存在。当对象在医院中时,将进行每日评估,包括短时神经评估,卡氏体力状态、生命体征测量、不利迹象或症状(临床毒性)和皮质类固醇剂量的确定。在所有手术程序后的当天,收集血清、尿液和鼻咽分泌物以监测病毒传播并测定血清抗AdV5抗体滴度。在手术后24小时内,对对象进行血清化学和血液学研究。

[0225] 开颅后评估:在开颅后48小时内,对所有对象进行具有和不具有钆的脑MRI以评估切除的程度和/或瘤内注射的不良作用。

[0226] 出院后评估:患者可在手术后3天内出院。然后在第28天(+/-2天)和2个月(+/-4天)、3个月(+/-4天)和4个月(+/-4天)时对对象进行评估。此后,每两个月(+/-7天)进行随访。

[0227] 随访评估-在门诊患者后续随访期间,对每位对象进行彻底的身体和神经检查,评估卡氏体力状态、体重、生命体征测量、不利事件确定以及评估类固醇和伴随用药。还进行不具有和具有钆的脑MRI。进行临床安全性试验,获得血清、尿液和鼻咽分泌物的样品用于系统AdV的释放研究。最后,收集血清用于抗AdV5抗体滴度测定。

[0228] 标本分析:所有实验室测试记录在适当的CRF/工作表档案上或电子数据库中。如果基于临床判断进行了计划外的实验室测试,则这些测试的结果也必须记录。在立体定向活检时采集活检物样品。所述活检物标本的一部分在OCT介质中冷冻,另一部分固定在福尔马林中并用石蜡包埋。其余活检物样品快速冷冻。在H&E染色后分析肿瘤活检物标本。

[0229] 用于病毒传播研究的标本:在指定时间点在鼻咽分泌物、尿液和血清中监测病毒释放和传播。通过Delta-24-RGD-4C和野生型AdV DNA的PCR分析确定病毒传播,以及根据在添加对象样品后,记录基于293细胞的测定中CPE的出现的需要的培养,。293细胞系提供反式E1蛋白,因此支持E1缺陷的Delta-24-RGD-4C的复制。通过六邻体蛋白的基于ELISA的测定,确定所选样品中的CPE是否是腺病毒来源。通过不提供反式E1蛋白的293细胞系中的CPE测定来测试样品中能够复制的腺病毒(RCA)的存在。

[0230] 统计

[0231] 本研究阶段I部分的主要目的是确定伊匹单抗和Delta-24-RGD的组合的MTD。

[0232] 阶段I:如果3位患者中未出现DLT,则每剂量水平入选3位患者。如果出现了DLT,将该群组扩大到6位患者。预期最多4个较高剂量群组。如果在开始剂量发现了DLT,可研究最多两个低剂量群组。至少6位患者以推荐剂量(或MTD-1)水平治疗。因此,在这一部分中将治疗至少9位至多12位(病毒递增的两个剂量水平)患者。在本研究的阶段I部分中以MTD治疗的患者,对象的数目可扩大用于初期阶段II部分。

[0233] 对于目前的单阶段试验,待测试假设是 $H_0: p < p_0$ 对比 $H_1: p > p_1$,其中 p 是在6个月保持存活并且无恶化的概率。如果将 p_0 值(不感兴趣的低响应)设置为20%, p_1 为40%,具有40位患者的试验将给出可接受的用于假设检验的误差率和估计的精确度(α 为5%,功效为

87%)。当在6个月时有13位或更多患者存活并且无恶化,则试验是成功的(拒绝零假设)。

[0234] 为了确保可评估患者的充分增长,使样品量增加10%(4位额外患者)。因此,总计44位患者入选。

[0235] 不良事件定义

[0236] 对于该方案,不良事件(adverse event,AE)是临床研究中施用研究产品的对象在施用期间或随访期中出现或相对于注射前基线恶化的任何不幸的医学事件(例如,迹象、症状、疾病、综合征、间发疾病、异常的实验室发现)。所述不幸的医学事件可能未必与施用产品具有因果关系。因此,AE可能是在时间上与使用医学(研究)产品关联的任何不利和/或未预期迹象(包括异常的实验室结果)、症状或疾病,而无论是否与医学(研究)产品相关。

[0237] 围绕手术程序的常见事件/症状(例如,疼痛、头疼、标准血压变化即使需要抗高血压药、便秘等)都在正常实践之内。与基线相比保持不变的慢性潜在的疾病相关病症不被认为是AE。可对潜在慢性病症的加重的“严重性”进行评估,且如果使用标准定义确定其为“严重”,将在适当表格中将其报道为严重不良事件(Serious Adverse Event,SAE)。

[0238] 致残:严重破坏人进行正常生命功能的能力。

[0239] 威胁生命的不良事件:在研究人员的观点来看,任何由于其发生的反应使对象处于死亡的即时风险之下的不良药物体验,即,其不包括以更严重形式发生时可能造成死亡的反应。

[0240] 意料之外的不良事件:其特异性或严重性与当前研究员手册(Investigator Brochure)不符的任何不良药物体验;或者根据修订,如果研究员手册不需要或不可得,则其特异性或严重性与在一般研究计划中或当前应用中别处描述的风险信息不符的任何不良药物体验。例如,在该定义下,如果研究员手册或其他产品资料中仅提及提高的肝酶或肝炎,则肝坏死将是意料之外的(由于具有更大严重性)。类似地,如果研究员手册仅列举了脑血管意外,则脑血管炎将是意料之外的(由于具有更强特异性)。本定义中使用的“意料之外的”是指不良药物体验先前从未观察到(例如,包含在研究员手册中),而不是从另一角度说这样的体验未被所研究产品的药理性质所预测。

[0241] 与使用所研究药物相关(因果性,即与研究药物相关);有合理的可能性体验可能由所研究药剂造成。主要研究人员必须检查每一不良事件并确定其是否与所研究药剂相关。

[0242] 严重不良事件-如果在任何剂量(包括过剂量)下发生以下不良事件,则将其归类为严重:(1)其导致死亡(即,造成或导致死亡的AE)(2)其威胁生命(即,使对象处于死亡的即时风险之下的AE,不适用于假设如果其更严重时可能造成死亡的AE)(3)需要或延长对象住院治疗(即,需要至少24小时的对象住院治疗或使住院治疗延长到预期住院时间以外的AE。根据该标准,用于选择性医学/手术程序、预定治疗或例行检查的住院治疗不是SAE)注意:导致手术程序或诊断程序的疾病应被记录为AE或SAE,但是程序本身不是。在所述情况下,程序应被记录为响应于疾病的动作的一部分。

[0243] 其为致残的(即,AE导致严重破坏了对对象进行正常生命功能的能力)。

[0244] 其为先天异常/先天缺陷(即,在怀孕之前或怀孕期间暴露于分子或研究药物的对象的孩子或胎儿的不良后果)。

[0245] 其不满足任何上述严重性标准,但是可能危害对象或可能需要医学或手术干预以

防止上述后果之一(即,重大或重要的医学事件)。

[0246] 注意:考虑到患者将经受本身可能导致不幸事件或坏的结果的创伤性手术程序,还必须确定严重不良事件的原因。仅被认为可能或很可能与研究药物有关的那些事件被认为是DLT。

[0247] 严重不良事件将从患者签署同意书开始一直记录到最后一次给药后30天。必须跟随严重不良事件,直到临床恢复完成以及实验室测试返回基线、事件的恶化稳定或对事件具有了可接受的解决方案。

[0248] 安全性

[0249] 所有接受任何Delta-24-RGD-4C的对象都包含在安全性分析中。因为任何原因未完成研究的对象的直到终止前的一切可利用数据都包含在安全性分析中。

[0250] 总结整体和剂量组二者的不良事件,并通过严重性、与Delta-24-RGD-4C的关系以及因果性列表。按照体系/优选条款为整体和按剂量分组二者对具有不良事件的对象的数量和百分比列表。当不良事件出现不止一次时,对最大严重性和因果性计数。另外,分别总结严重不良事件、可能与Delta-24-RGD-4C相关的不良事件以及与Delta-24-RGD-4C无关的不良事件。并发疾病将被列出,并且可能作为在治疗响应关系中可能的混杂因素而被检查。还将列出伴随的药物和治疗,如将列出之前用于恶性神经胶质瘤的治疗。将分析任何潜在的相关副作用。将按对象提供所有不良事件的数据列表。

[0251] 生命体征测量:生命体征测量(血压、心率、呼吸率和体温)结果按照访问、剂量群组和时间间隔酌情表示在数据列表中。还将显示包括平均值、标准误差和中值的单变量统计的概要数据。

[0252] 身体和神经学检测/体能状态-按照访问和剂量群组总结每一对象的身体检查结果。也可进行肿瘤相关神经学症状、体能状态和体重的纵向分析。也将适当显示包括平均值、标准误差和中值的单变量统计的概要数据。还对疾病恶化的时间和小于60的体能状态进行评估。

[0253] MRI扫描-由本研究人员对MRI扫描进行评估并报道描述性统计。按访问对象和剂量群组和/或视情况报道结果。

[0254] 临床实验室结果-给出整体以及按对象按研究天和剂量分组的所选实验参数的描述性统计。对于相同的实验参数,可提供移位表,示出在基线时和通过剂量分组注射Delta-24-RGD-4C后具有高、正常、和低(或正常/异常)实验室结果的对象的数量和百分比。计算各实验参数的组平均值、中值和标准误差。还按对象列出实验值,并标记超过标准参考范围的那些。

[0255] 效力

[0256] 在本研究中,根据MacDonald标准(即,基于2D测量值)评估肿瘤响应。为了与之前公开的研究可比较,部分响应和进行性疾病的阈值分别为50%和25%。

[0257] 肿瘤响应是施用Delta-24-RGD-4C后7天、14天、21天、28天、2个月、3个月和4个月以及此后在最后一次注射病毒后每两个月与基线(施用Delta-24-RGD-4C后4天内)相比脑损伤尺寸的改变。当检查到肿瘤尺寸改变时,将考虑临床疾病状态的改变和类固醇施用。还考虑了任何抗肿瘤癌症治疗和时间表的施用来分析在这些研究时间点获得的测量值。由MRI扫描图计算脑肿瘤尺寸。

[0258] 不认为在先前未增强的肿瘤床区域显影了新的增强边缘的对象(例如,常在全切除后数天开始的钆后T1加权的MRI上可见)发展了进行性疾病,除非增强边缘的最大直径超过10mm或者出现了结节性增强的区域。在通过PI难以确定判断时,可进行立体定向活检以确定是否发生了恶化。另外,确定对比增强区的测量值,并与使用WHO标准的所有病灶垂直直径乘积的和比较。

[0259] 计算疾病恶化的时间,由在肿瘤注射和切除时开始施用Delta-24-RGD-4C的时间直到通过临床检查、体力状态和/或MRI证明恶化的时间。本研究人员将根据需要阅读MRI来用于临床评定。

[0260] 使用描述性统计来总结存活数据。根据Brem等,具有复发性恶性成胶质细胞瘤的对象6个月的历史存活为35%。

[0261] 还使用95%置信区间总结了在每一研究阶段的注射结束时具有改善的或稳定的症状的对象的百分比。还利用单变量统计总结卡氏评分的改变。还可通过Kaplan-Meier分析法评估疾病恶化和KPS \leq 60的时间。

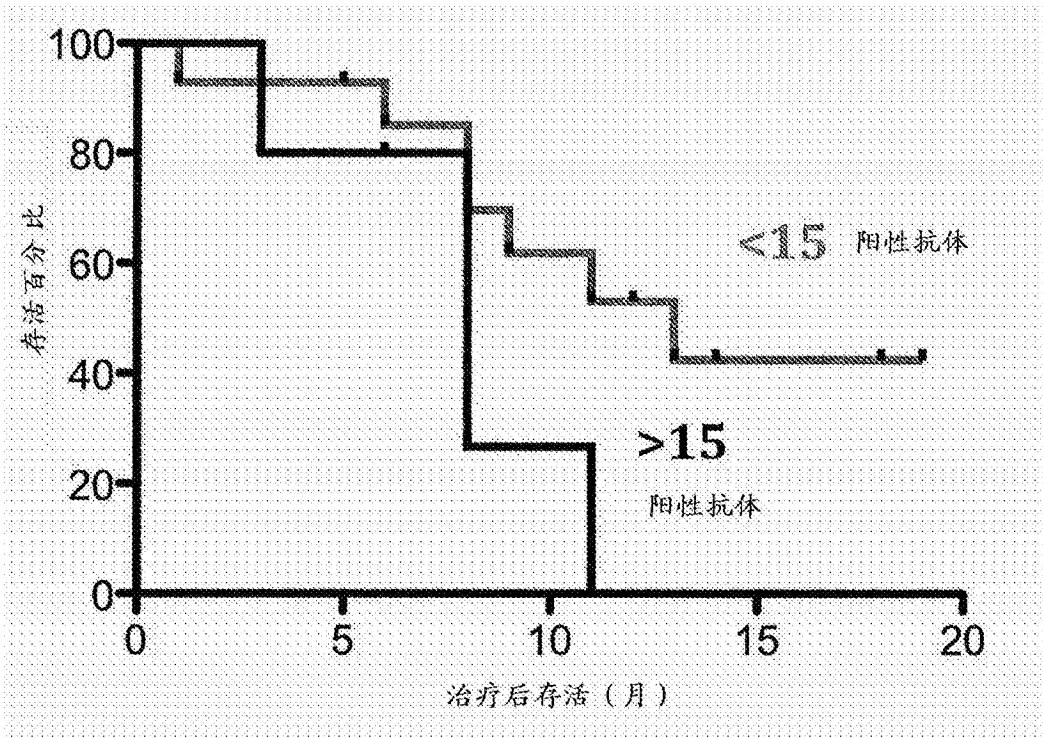


图1

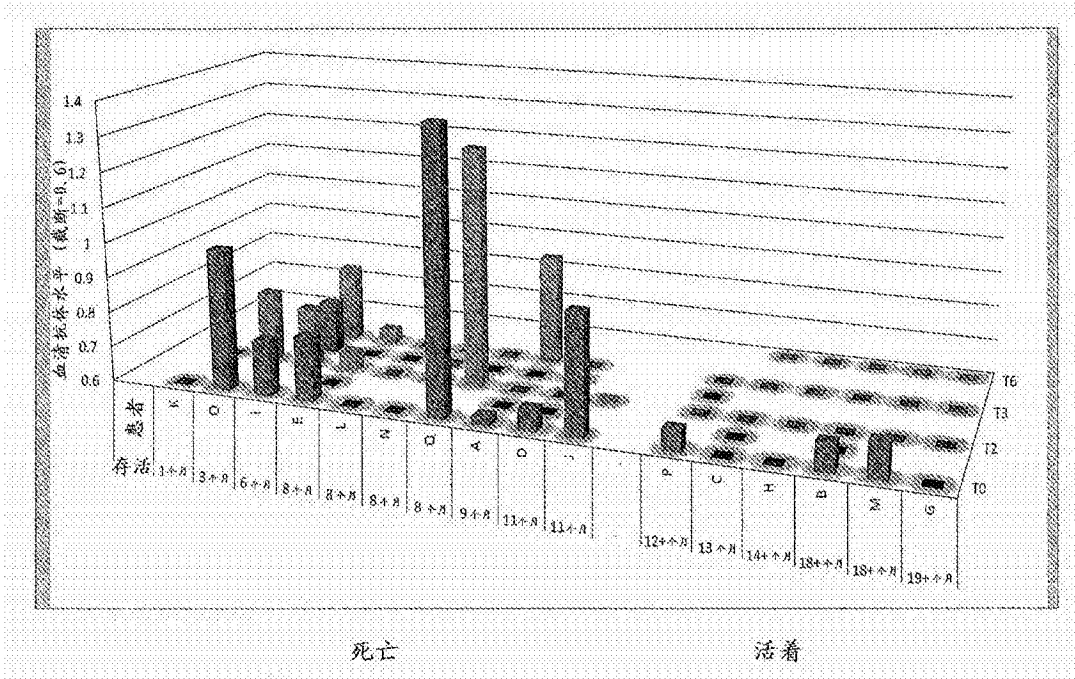


图2

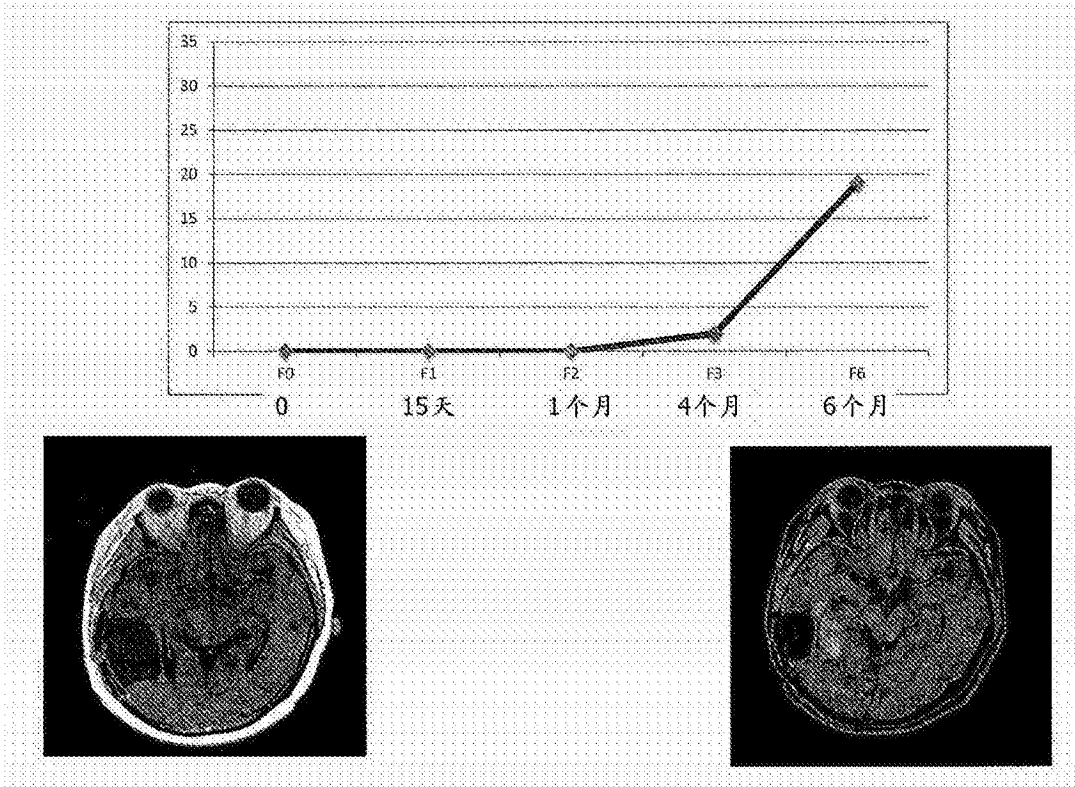


图3

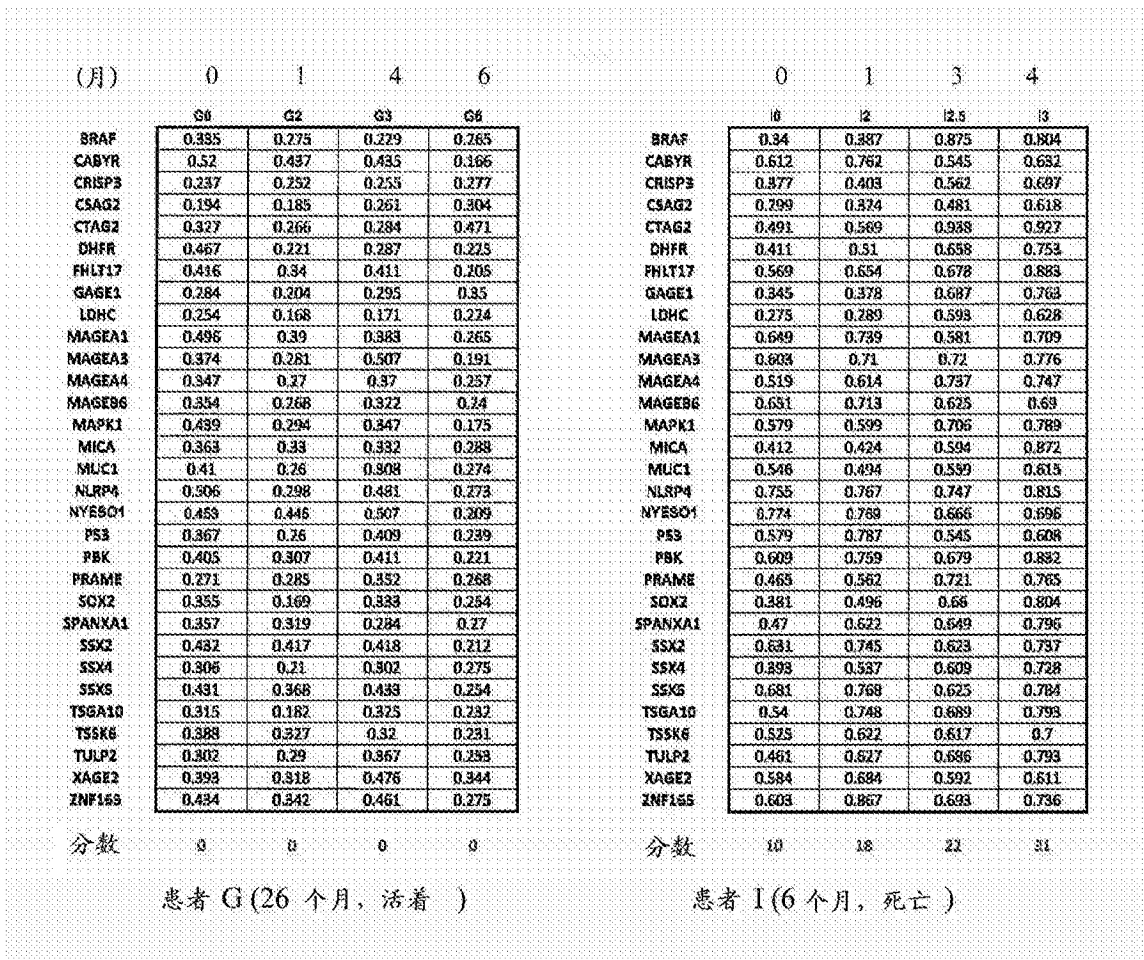


图4

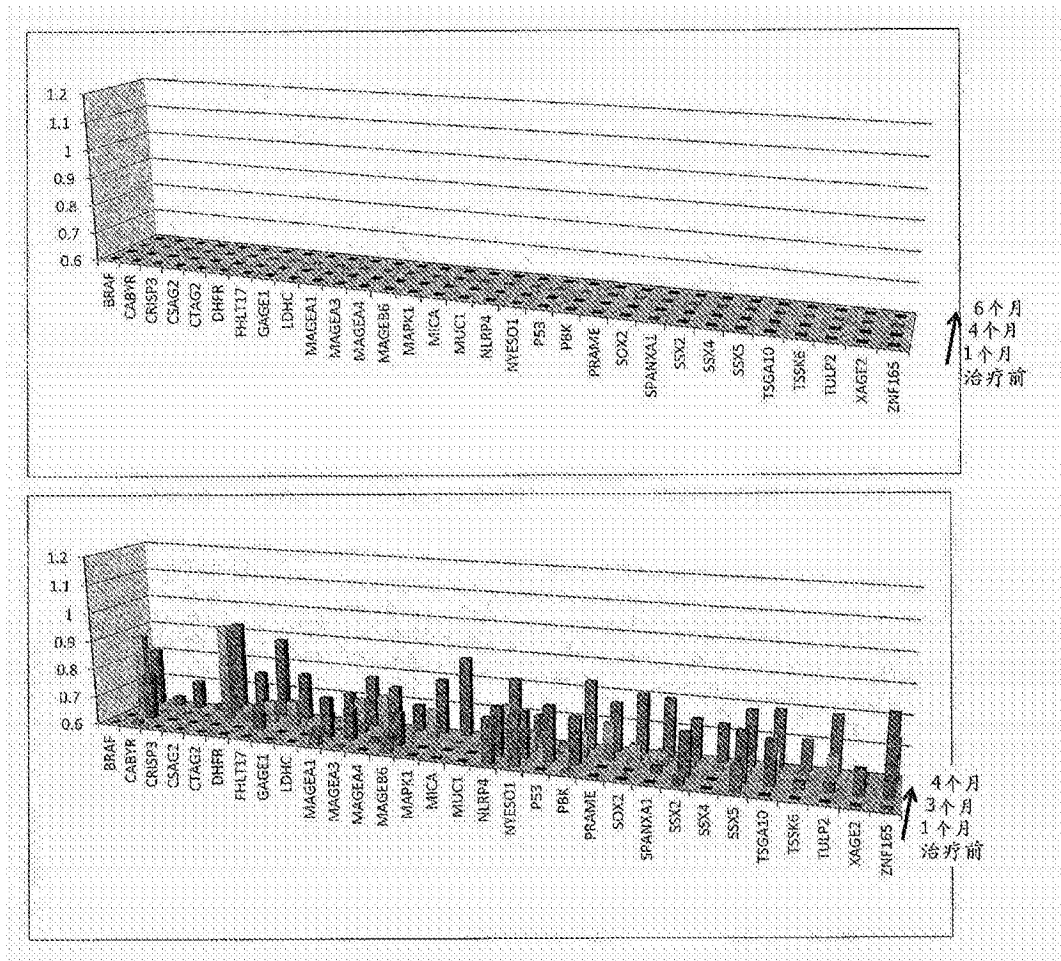


图5

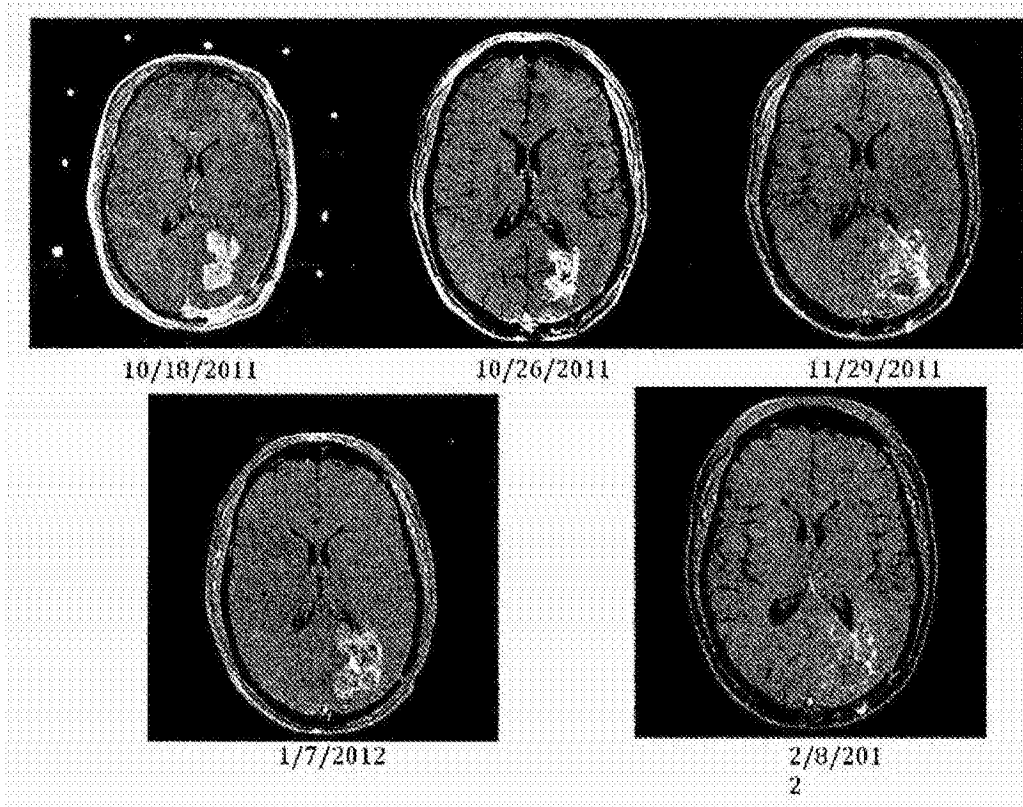


图6

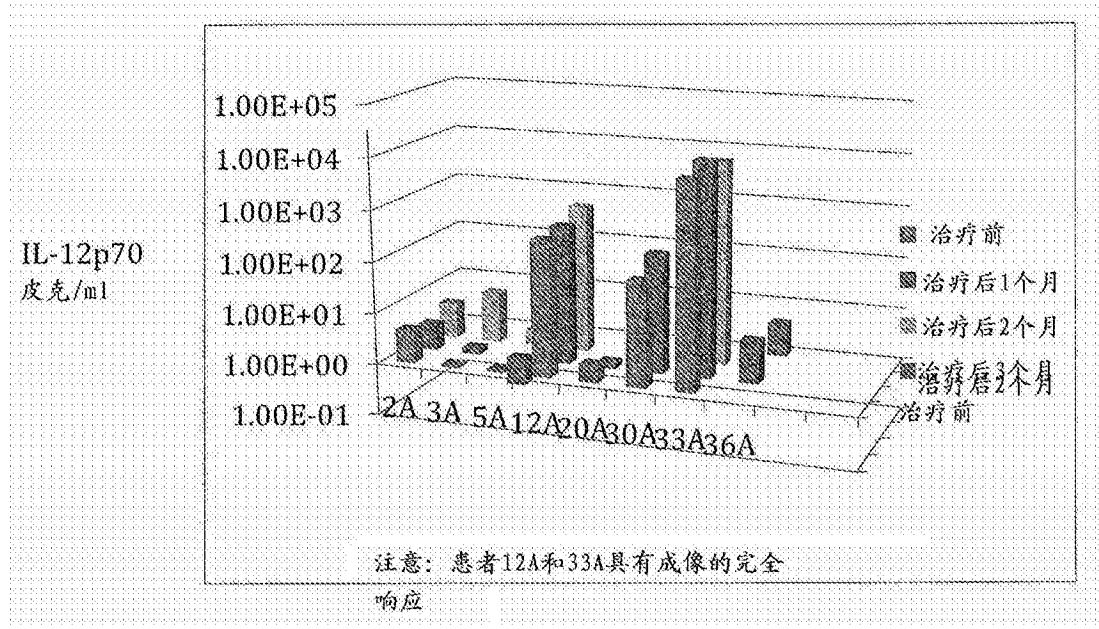


图7