(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992401 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.09

(22) Дата подачи заявки
2018.06.01

(51) Int. Cl. *A61K 35/761* (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ВИРУС И СПОСОБ

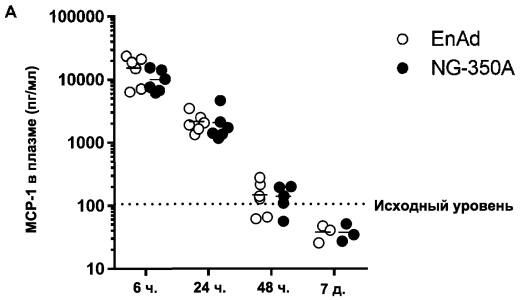
(31) **1708778.4; 1708779.2**
(32) **2017.06.01**
(33) **GB**
(86) **PCT/EP2018/064524**
(87) **WO 2018/220207 2018.12.06**

(71) Заявитель:
ПСАЙОКСУС ТЕРАПЬЮТИКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Чемпион Брайан, Бромли Элис Клэр Ноэль, Беснё Матьё (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Онколитический вирус (например, компетентный по репликации вирус), который содержит трансгенную кассету, кодирующую антитело против CD40 или связывающий фрагмент указанного антитела, причем указанная трансгенная кассета содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, или последовательность, идентичную указанной последовательности по меньшей мере на 95% (например, идентичную указанной последовательности на 96, 97, 98 или 99%), в частности кассету согласно SEQ ID NO: 12; фармацевтическая композиция, содержащая указанный онколитический вирус, способы получения указанного онколитического вируса и композиции и применение указанного онколитического вируса или композиции для лечения, в частности для лечения рака. Также предложено лечение популяции пациентов, которые характеризуются как имеющие рак, экспрессирующий CD40, в частности рак, сверхэкспрессирующий CD40, терапией согласно настоящему изобретению.



201992401 A1

201992401 A1

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ВИРУС И СПОСОБ

В настоящем изобретении предложен онколитический вирус, такой как аденовирус, композиции, содержащие онколитический вирус согласно настоящему изобретению, способы получения указанного онколитического вируса и композиции и применение онколитического вируса или композиции при лечении, в частности, при лечении рака. Также предложено лечение популяции пациентов, которые характеризуются как имеющие рак, экспрессирующий CD40, в частности, рак, сверхэкспрессирующий CD40, терапией согласно настоящему изобретению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

CD40 является активатором B- и T-клеток, например, CD40 на антигенпрезентирующих клетках связывается с CD40L (также известен как CD154) на T-клетках, чтобы активировать последние. CD40 также присутствует на множестве опухолевых клеток, которые используют CD40 для получения цитокинов и факторов роста от окружающих клеток с целью поддержания роста и обеспечения распространения рака.

Агонистические антитела против CD40 *in vivo* могут быть способны стимулировать противоопухолевые иммунные ответы благодаря своему воздействию на иммунные клетки. Такое воздействие может быть обусловлено тем, что CD40 обладает способностью, например, активировать макрофаги и «подготавливать» дендритные клетки, что позволяет им примировать эффективные ответы цитотоксических T-клеток.

На сегодняшний день наблюдается значительная заинтересованность в вариантах иммунотерапии онкологических заболеваний и/или вариантах терапии, направленных на опухоль-ассоциированные макрофаги (tumor associated macrophages, TAM). Данные опухоль-ассоциированные макрофаги окружают опухоль и способствуют созданию микроокружения, способствующего росту и развитию опухоли. Данное микроокружение часто является гипоксическим и может нейтрализовать иммунные клетки, предназначенные для связывания с опухолью и ее уничтожения. Таким образом, микроокружение физически защищает опухоль. Более того, микроокружение снабжает опухоль энергией и питательными веществами для поддержания ее роста.

Однако, чтобы являться эффективными, варианты терапии должны быть действительно нацеленными на данное окружение для повторной стимуляции, высвобождения, рекрутирования и реактивации иммунных клеток, например, уже вовлеченных в

микроокружение. Данное нацеливание на микроокружение не так легко обеспечить, поскольку иногда в опухоли развиваются механизмы для защиты, такие как механизмы активного транспорта, которые перемещают терапевтические средства из окружающей среды опухоли. Данный процесс представляет собой, например, один из механизмов, участвующих в устойчивости.

Онколитические вирусы, такие как онколитические аденовирусы группы B, которые характеризуются хомингом к опухолевым клеткам и селективно инфицируют раковые клетки, можно приспособить для доставки антитела против CD40 в микроокружение опухоли. Онколитический вирус обладает противораковыми свойствами, которые вызывают гибель раковой клетки и высвобождение содержимого указанной клетки. Содержимое клетки включает антитело против CD40, продуцированное онколитическим вирусом. Таким образом, в результате гибели раковой клетки указанное антитело высвобождается в микроокружение опухоли. Авторы настоящего изобретения неожиданно установили, что антитела против CD40 можно эффективно доставлять с помощью множества различных онколитических вирусов путем встраивания в такие вирусы трансгенов, кодирующих антитела против CD40, например, путем трансдукции указанных вирусов трансгенной кассетой согласно настоящему изобретению.

Кроме того, поскольку в опухолях развивается множество механизмов защиты, в перспективе считают, что наиболее эффективным вариантам противораковой терапии в будущем будет необходимо воздействовать на рак посредством двух или более биологических механизмов.

Применение агонистических антител против CD40 может характеризоваться дополнительным преимуществом, которое заключается в том, что, как только указанное антитело поступает в микроокружение опухоли в подходящих концентрациях, оно может конкурировать с экспрессирующими CD40 раковыми клетками за связывание с CD40L. В конечном счете это означает, что у раковых клеток будет меньше возможностей связаться с CD40L на Т-клетке. В свою очередь, это может означать, что количество энергии и питательных веществ, доступных для указанной опухоли, может быть снижено.

Авторы настоящего изобретения сконструировали трансгенную кассету, кодирующую антитело против CD40 или связывающий фрагмент указанного антитела, которую можно применять для получения стабильных вирусов.

ПУНКТЫ, ОБОБЩАЮЩИЕ НАСТОЯЩЕЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ

В настоящем изобретении предложены:

1. Онколитический вирус (например, компетентный по репликации вирус), который содержит трансгенную кассету, кодирующую антитело против CD40 или связывающий фрагмент указанного антитела, причем указанная трансгенная кассета содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 12, или последовательность, идентичную указанной последовательности по меньшей мере на 95% (например, идентичную указанной последовательности на 96, 97, 98 или 99%, в особенности, на протяжении полной длины указанной последовательности), в частности, кассету SEQ ID NO: 12.

(Альтернативный) пункт 1: Онколитический аденовирус (например, компетентный по репликации онколитический аденовирус), кодирующий антитело против CD40 или связывающий фрагмент указанного антитела, причем указанный аденовирус содержит SEQ ID NO: 1 или последовательность, идентичную указанной последовательности по меньшей мере на 95% (например, идентичную указанной последовательности на 96, 97, 98 или 99%).

2. Онколитический вирус по п. 1, отличающийся тем, что указанный вирус выбран из аденовируса, вируса простого герпеса, реовируса, вируса кори, вируса болезни Ньюкасла, вируса Сенека-Валли, вируса везикулярного стоматита, полиовируса, энтеровируса ECHO, вируса Коксаки и вируса оспoвакцины, в частности, аденовируса.

3. Онколитический вирус по пп. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный вирус выбран из группы, состоящей из энаденотуцирева (Enadenotucirev), талимогена лахерпарепвека (talimogene laherparepvec), RIGVIR, Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12, Каватака™, CG0070, DNX-2401, G207, HF10, Имлигика®, JX-594, MG1-MA3, MV-NIS, OBP-301, Реолизина®, Toca 511, в частности, энаденотуцирева.

4. Онколитический вирус по любому из пп. 1 – 3, отличающийся тем, что указанный вирус содержит SEQ ID NO: 1.

5. Онколитический вирус по п. 4, который состоит из SEQ ID NO: 1.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая вирус по любому из пп. 1 – 5 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

7. Онколитический вирус по любому из пп. 1 – 5 или фармацевтическая композиция по п. 6 для применения при лечении.

8. Онколитический вирус по любому из пп. 1 – 5 или фармацевтическая композиция по п. 6 для применения при лечении рака, резистентности к инсулину, ожирения и/или иммунодефицита.

9. Применение по п. 6, отличающееся тем, что указанные вирус или композиция предназначены для применения при лечении рака, например, для лечения рака, экспрессирующего CD40 (такого как рак с повышенным уровнем экспрессии CD40).

10. Комбинированная терапия (например, для применения при лечении рака), включающая вирус по любому из пп. 1 – 5 или композицию по п. 6 и дополнительную противораковую терапию.

11. Комбинированная терапия по п. 10, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой химиотерапию.

12. Комбинированная терапия по п. 10 или 11, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой ингибитор контрольной точки.

13. Комбинированная терапия по п. 12, отличающаяся тем, что указанная противораковая терапия выбрана из группы, включающей ингибитор PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор CTLA-4, ингибитор TIM-3, ингибитор LAG-3, ингибитор TIGIT, ингибитор B7-H3 (CD276), ингибитор B7-H4 (B7S1), ингибитор B7H7 (HHLA2), ингибитор CD96, ингибитор VISTA и комбинацию двух или более указанных ингибиторов.

14. Комбинированная терапия по п. 13, отличающаяся тем, что указанный ингибитор представляет собой антитело или связывающий фрагмент указанного антитела.

15. Комбинированная терапия по любому из пп. 10 – 14, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой агонист костимуляторного пути.

16. Комбинированная терапия по п. 15, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия выбрана из группы, включающей агонист CD27, агонист CD28, агонист ICOS, агонист TMIGD2 (IGPR-1/CD28H), агонист CD226, агонист OX40, агонист 4-1BB и комбинацию двух или более указанных агонистов.

17. Комбинированная терапия по п. 16, отличающаяся тем, что указанная терапия представляет собой антитело или связывающий фрагмент указанного антитела.

18. Комбинированная терапия по любому из пп. 10 – 17, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия активирует иммунные ответы или отменяет супрессию иммунных ответов, например, выбранных из ИЛ-10 (интерлейкина-10), ФРОβ (фактора роста опухоли β), ингибиторов IDO и комбинации двух или более указанных молекул.

19. Комбинированная терапия по любому из пп. 10 – 18, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой онколитический вирус (дополнительный онколитический вирус), например, компетентный по репликации онколитический вирус, такой как аденовирус, в частности, аденовирус группы B.

20. Комбинированная терапия по п. 19, отличающаяся тем, что указанный онколитический вирус (дополнительный онколитический вирус) кодирует терапевтический ген, кодирующий материал, выбранный из группы, состоящей из последовательности РНКи, антитела или связывающего фрагмента антитела, хемокинов, цитокинов, иммуномодулятора и ферментов.

21. Комбинированная терапия по п. 20, отличающаяся тем, что указанное антитело или связывающий указанного фрагмент антитела является специфичным к OX40, лиганду OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, лиганду CD40, CD70, CD137, GITR, 4-1BB, ICOS, лиганду ICOS, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT, CD160, CTLA-4, PD-1,

PD-L1, PD-L2, CD40, лиганду CD40 и комбинации двух или более указанных молекул.

22. Комбинированная терапия по п. 20 или 21, отличающаяся тем, что указанный цитокин независимо выбран из группы, включающей ИЛ□□□, ИЛ-1□, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-24, ИЛ-25, ИЛ-26, ИЛ-27, ИЛ-33, ИЛ-35, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-15, ИЛ-21, ИЛ-25, ИЛ-1RA, ИФН (интерферон) □, ИФН□, ИФН□, ФНО (фактор некроза опухоли) α, ФРО□□□лимфотоксин α (LTA)□и ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), например, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-22, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, ИФН□, ФНО□ ,ФРО□□и лимфотоксин α (LTA) и комбинации двух или более указанных цитокинов.

23. Комбинированная терапия по любому из пп. 20 – 22, отличающаяся тем, что указанный хемокин независимо выбран из группы, включающей ИЛ-8, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 и CRTH2, например, CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 и CXCR4, рецептор любого из указанных хемокинов и комбинацию двух или более указанных хемокинов или рецепторов.

24. Комбинированная терапия по любому из пп. 19 – 23, отличающаяся тем, что указанный онколитический вирус (дополнительный онколитический вирус) кодирует трансмембранную заякоренную форму белка B7, например, B7-1 или B7-2.

25. Комбинированная терапия по любому из пп. 19 – 24, отличающаяся тем, что указанный онколитический вирус (дополнительный онколитический вирус) кодирует ингибитор контрольной точки, выбранный из группы, включающей ингибитор PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор CTLA-4, ингибитор TIM-3, ингибитор LAG-3, ингибитор TIGIT, ингибитор B7-H3 (CD276), ингибитор B7-H4 (B7S1), ингибитор B7H7 (HHLA2), ингибитор CD96, ингибитор VISTA и комбинации двух или более указанных ингибиторов.

26. Комбинированная терапия по п. 25, отличающаяся тем, что указанный ингибитор представляет собой антитело или связывающий фрагмент указанного антитела.

27. Комбинированная терапия по любому из пп. 19 – 26, отличающаяся тем, что указанный онколитический вирус (дополнительный онколитический вирус) кодирует агонист костимуляторного пути.

28. Комбинированная терапия по п. 27, отличающаяся тем, что указанный онколитический вирус (дополнительный онколитический вирус) кодирует агонист костимуляторного пути, выбранный из группы, включающей агонист CD27, агонист CD28, агонист ICOS, агонист TMIGD2 (IGPR-1/CD28H), агонист CD226, агонист OX40, агонист 4-1BB и комбинацию двух или более указанных агонистов.

29. Комбинированная терапия по любому из пп. 19 – 28, отличающаяся тем, что указанный онколитический вирус (дополнительный онколитический вирус) кодирует молекулу, которая активирует иммунные ответы или отменяет супрессию иммунных ответов, например, выбранную из ИЛ-10, ФРОβ, ингибиторов IDO и комбинации двух или более указанных молекул.

30. Фармацевтический состав, содержащий онколитический аденовирус согласно любому из пп. 1 – 5, и содержащий дополнительный онколитический вирус согласно любому из пп. 19 – 29.

31. Комбинированная терапия согласно любому из из пп. 19 – 29, или фармацевтическая композиция, как определено в п. 30, для применения при лечении.

32. Онколитический вирус по любому из пп. 1 – 5 или фармацевтическая композиция по п. 6 или 30 для применения при получении лекарственного средства для лечения рака, резистентности к инсулину, ожирения и/или иммунодефицита.

33. Применение по п. 32, отличающееся тем, что указанные аденовирус или композиция предназначены для применения при получении лекарственного средства для лечения рака.

34. Применение по п. 33, отличающееся тем, что целевая популяция пациентов для лечения имеет рак, который экспрессирует CD40, например популяция, в которой рак характеризуется повышенным уровнем экспрессии CD40.

35. Комбинированная терапия для применения при получении лекарственного средства для лечения рака, содержащего вирус по любому из пп. 1 – 5 или композицию по п.

6 или 30 и дополнительную противораковую терапию, например, когда целевая популяция пациентов для лечения имеет рак, который экспрессирует CD40, например, популяция, в которой рак характеризуется повышенным уровнем экспрессии CD40.

36. Комбинированная терапия по п. 35, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой химиотерапию.

37. Комбинированная терапия по п. 35 или 36, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой ингибитор контрольной точки.

38. Комбинированная терапия по п. 37, отличающаяся тем, что указанная противораковая терапия выбрана из группы, включающей ингибитор PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор CTLA-4, ингибитор TIM-3, ингибитор LAG-3, ингибитор TIGIT, ингибитор B7-H3 (CD276), ингибитор B7-H4 (B7S1), ингибитор B7H7 (HHLA2), ингибитор CD96, ингибитор VISTA и комбинации двух или более указанных ингибиторов.

39. Комбинированная терапия по любому из пп. 35 – 38, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой онколитический вирус, например, компетентный по репликации онколитический вирус согласно любому из пп. 19 – 29.

40. Способ лечения, включающий введение терапевтически эффективного количества онколитического аденовируса по любому из пп. 1 – 5 или фармацевтической композиции по п. 6 или 30 пациенту, который нуждается в таком лечении.

41. Способ по п. 40 для лечения рака, резистентности к инсулину, ожирения и/или иммунодефицита.

42. Способ по п. 41 для лечения рака, например, рака, экспрессирующего CD40 (такого как рак с повышенной экспрессией CD40).

43. Способ по любому из пп. 37 – 42, отличающийся тем, что указанное лечение также включает дополнительную противораковую терапию.

44. Комбинированная терапия по п. 43, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой химиотерапию.

45. Комбинированная терапия по п. 42 или 44, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой ингибитор контрольной точки.

46. Комбинированная терапия по п. 45, отличающаяся тем, что указанная противораковая терапия выбрана из группы, включающей ингибитор PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор CTLA-4, ингибитор TIM-3, ингибитор LAG-3, ингибитор TIGIT, ингибитор B7-H3 (CD276), ингибитор B7-H4 (B7S1), ингибитор B7H7 (HHLA2), ингибитор CD96, ингибитор VISTA и комбинации двух или более указанных ингибиторов.

47. Комбинированная терапия по любому из пп. 42 – 46, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой онколитический вирус, например, компетентный по репликации онколитический вирус, например, вирус согласно любому из пп. 19 – 29.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 представлена схема трансгенной кассеты против CD40

Фигура 2A и B представлена активность вируса NG-350, выраженная в суммарном образовании частиц (A) и образовании частиц вируса в супернатанте клеток (B)

Фигура 2C представлена концентрация секретированного антитела IgG2 против CD40, измеренная с применением метода ELISA.

Фигура 3 представлены результаты рестрикционного расщепления контрольной ДНК по сравнению с ДНК NG-350 с применением комбинации EcoRv/NheI (A) или отдельных ферментов NcoI или FspI (B)

Фигура 4 представлен участок в трансгенной кассете NG-350, с которым связываются праймеры

Фигура 5 представлено разделение продуктов ПЦР (полимеразной цепной реакции) с применением гель-электрофореза

Фигура 6 представлено разделение продуктов ПЦР с применением набора праймеров D (A) и набора праймеров K (B)

Фигура 7A представлено количественное определение % выживаемости клеток при различной плотности инфекции для EnAd и NG-350A (вирус согласно SEQ ID NO: 1)

Фигура 7 и 8 представлено количественное определение числа обнаруженных геномов вируса на клетку для NG-350A и EnAd

Фигура 9A и B представлено поглощение при 450 нм в каждой лунке планшета, измеренное с помощью считывающего устройства для планшетов (BioTek), и концентрации секретированного антитела IgG2 против CD40

Фигура 9C представлено поглощение при 450 нм для EnAd, NG-350A и положительных контролей (Фигура 4C), а также специфичное связывание с CD40 секретированного антитела против CD40, которое присутствует в супернатанте клеток, инфицированных NG-350A.

Фигура 10 представлено поглощение при 620 нм, измеренное для каждого образца клеток, инфицированных NG-350A, EnAd или NG-165, с применением считывающего устройства для планшетов

Фигура 11A и B представлено поглощение при 450 нм в каждой лунке планшета, измеренное с помощью считывающего устройства для планшетов (BioTek), и концентрации секретированного антитела IgG2 против CD40

Фигура 12 представлена концентрация секретированного антитела IgG2 против CD40, измеренная с применением ELISA

Фигура 13 представлен процент ДКмп (дендритных клеток моноцитарного происхождения), экспрессирующих маркеры активации CD86 (A), CD54 (B) и HLA-DR (C)

Фигура 14 представлена секреция ИЛ-12 p40 ДКмп, которые культивировали с антителом против CD40, продуцированным опухолевыми клетками,

которые инфицировали NG-350A в присутствии или при отсутствии вируса EnAd, или только вирусом EnAd

Фигура 15 представлен процент CD19+ клеток, экспрессирующих CD86 (A), CD54 (B), СИФ (средняя интенсивность флуоресценции) HLA-DR (C) и CD80 (D)

Фигура 16 представлен процент делящихся B-клеток после обработки очищенным антителом против CD40, продуцированным опухолевыми клетками, которые инфицировали NG-350A и вирусом EnAd совместно, по сравнению с обработкой антителом или вирусом самим по себе

Фигура 17 представлено, что обедненный вирусом препарат антитела, продуцированного опухолевыми клетками, которые инфицировали NG-350A, связывается с CD40 на поверхности ДКмп (MoDC) человека

Фигура 18 представлены эффекты обедненного вирусом АТ (антитела) против CD40, продуцированного опухолевыми клетками, которые инфицировали NG-350A, в отношении повышающей регуляции маркера поверхности клетки на ДКмп человека в качестве примера (A) и дозозависимые эффекты в моменты времени 24 и 48 часов для 4 различных доноров ДКмп (B-E)

Фигура 19 представлены эффекты обедненного вирусом АТ против CD40, продуцированного опухолевыми клетками, которые инфицировали NG-350A, в отношении секреции цитокинов ДКмп человека в качестве дозозависимых эффектов в моменты времени 24 и 48 часов для 4 различных доноров ДКмп (B-D)

Фигура 20 представлено, что не обедненный вирусом препарат антитела, продуцированного опухолевыми клетками, которые инфицировали NG-350A, связывается с CD40 на поверхности ДКмп человека

Фигура 21 представлены эффекты не обедненного вирусом АТ против CD40, продуцированного опухолевыми клетками, которые инфицировали NG-350A, в отношении повышающей регуляции маркера

поверхности клетки в моменты времени 24 и 48 часов на ДКмп человека от 2 различных доноров

Фигура 22 представлены эффекты не обедненного вирусом АТ против CD40, продуцированного опухолевыми клетками, которые инфицировали NG-350A, в отношении секреции цитокинов ДКмп человека в качестве дозозависимых эффектов в моменты времени 24 и 48 часов для 2 различных доноров

Фигура 23 представлены эффекты обедненного вирусом АТ против CD40, продуцированного опухолевыми клетками, которые инфицировали NG-350A, в отношении повышающей регуляции маркера поверхности клетки на В-клетках человека в качестве дозозависимых эффектов в моменты времени 24 и 48 часов для 3 различных доноров В-клеток

Фигура 24 представлены эффекты не обедненного вирусом АТ против CD40, продуцированного опухолевыми клетками, которые инфицировали NG-350A, в отношении повышающей регуляции маркера поверхности клетки в моменты времени 24 и 48 часов на В-клетках человека от 3 различных доноров

Фигура 25 представлена зависимость репликации вирусного генома (кПЦР, количественная ПЦР) от времени в 10 различных линиях опухолевых клеток, инфицированных NG-350A, по сравнению с таковой для EnAd

Фигура 26 представлена зависимость вызванного вирусом онколизиса (анализ xCELLigence) от времени на четырех иллюстративных линиях опухолевых клеток, инфицированных NG-350A, по сравнению с таковой для EnAd

Фигура 27 представлена зависимость экспрессии мРНК антитела против CD40 от времени в 10 различных линиях опухолевых клеток, инфицированных NG-350A

Фигура 28 представлено обнаружение экспрессии белка трансгена против CD40 методом ELISA с IgG2 различными линиями опухолевых клеток

Фигура 29 представлена зависимость острых ответов цитокинов в плазме от времени после в.в. (внутривенного) введения дозы частиц NG-350A по сравнению с таковой для EnAd; MCP-1 (A), ИЛ-6 (B) и ФНО□ (C)

Фигура 30 представлена зависимость концентраций аланинтрансаминазы (ALT) в плазме от времени после однократного внутривенного введения дозы EnAd или NG-350A

Фигура 31 представлены острые ответы цитокинов в плазме после введения первой и третьей дозы повторяющегося в.в. режима введения доз частиц NG-350A по сравнению с таковыми для EnAd; MCP-1 (A), ИЛ-6 (B)

Фигура 32 представлена фармакокинетика вируса в периферической крови после введения каждой из трех внутривенных доз EnAd или NG-350A

Фигура 33 представлено восстановление живого вируса из тканей мыши после однократного внутривенного введения дозы частиц вируса NG-350A

Фигура 34 представлена репликация генома вируса в подкожных опухолях A549 (A и B) и HCT116 (C и D) после трех в.в. инъекций или одной дробной в.о. (внутриопухолевой) дозы NG-350A или EnAd

Фигура 35 представлена экспрессия мРНК E3 вируса в подкожных опухолях A549 (A и B) или HCT-116 (C и D) после трех в.в. инъекций или одной дробной в.о. дозы NG-350A или EnAd

Фигура 36 представлена экспрессия мРНК трансгена агонистического антитела против CD40 в подкожных опухолях A549 (A и B) и HCT-116 (C и D) после трех в.в. инъекций или одной дробной в.о. дозы NG-350A или EnAd

Фигура 37 представлен белок антитела против CD40 в подкожных опухолях A549 после трех в.в. инъекций или одной дробной в.о. дозы NG-350A либо EnAd

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

CD40 представляет собой костимуляторный белок, обнаруженный, например, на антигенпрезентирующих клетках. CD40 также известен как Bp50, CDW40, TNFRSF5, p50, белок CD40, молекула CD40. Белок человека характеризуется номером UniProt P25942. Белок мыши характеризуется номером UniProt P27512.

Онколитический вирус с селективностью в отношении раковых клеток в настоящем документе обозначает вирус, который предпочтительно уничтожает раковые клетки, например, поскольку он предпочтительно инфицирует раковые клетки, и/или жизненный цикл вируса зависит от гена, такого как p53, регуляция которого нарушена, например, который сверхэкспрессируется, в раковых клетках. Согласно одному варианту реализации онколитический вирус предпочтительно инфицирует раковые клетки и продолжает реплицировать свой геном и продуцировать белки капсида для образования новых вирусных частиц, например, как в случае EnAd.

Селективность в отношении раковых клеток (терапевтический индекс) можно проанализировать, как описано в публикации WO2005/118825, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно одному варианту реализации онколитический вирус представляет собой вирус, выбранный из аденовируса, вируса простого герпеса, реовируса, вируса кори, вируса болезни Ньюкасла, вируса Сенека-Валли, вируса везикулярного стоматита, полиовируса, энтеровируса ECHO, вируса Коксаки и вируса оспoвакцины, в частности, аденовируса.

Согласно одному варианту реализации аденовирус выбран из группы, состоящей из энаденотуцирева, талимогена лахерпарепвека, RIGVIR, Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12, Каватака™, CG0070, DNX-2401, G207, HF10, Имлигика®, JX-594, MG1-MA3, MV-NIS, OBP-301, Реолизина®, Toca 511, в частности, энаденотуцирева.

Согласно одному варианту реализации онколитический аденовирус, применяемый в комбинированной терапии согласно настоящему изобретению, является компетентным по репликации.

Согласно одному варианту реализации онколитический аденовирус, применяемый в комбинации согласно настоящему изобретению, является дефицитным по репликации.

Согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему изобретению применяют в комбинированной терапии.

Согласно одному варианту реализации онколитический аденовирус, применяемый в настоящем изобретении или в качестве второго компонента в комбинированной терапии согласно настоящему изобретению, например, характеризуется формулой **(I)**:

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_A\text{-}B_2\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad \textbf{(I)},$$

где:

B_1 представляет собой связь или содержит: E1A, E1B или E1A-E1B (в частности, E1A, E1B или E1A-E1B);

B_A представляет собой E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или содержит E3 или трансген, например, под контролем эндогенного или экзогенного промотора;

B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую: сайт рестрикции, один или несколько трансгенов или как первое, так и второе;

B_B содержит L5;

B_Y содержит трансгенную кассету, которая кодирует терапевтический белок или его активный фрагмент (в частности, содержит SEQ ID NO: 12); и

B_3 представляет собой связь или содержит E4.

Согласно одному варианту реализации онколитический аденовирус характеризуется формулой **(Ia)**:

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_A\text{-}B_2\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad \textbf{(Ia)},$$

где:

B_1 представляет собой связь или содержит: E1A, E1B или E1A-E1B (в частности, E1A, E1B или E1A-E1B);

B_A представляет собой E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или содержит E3;

B_B содержит L5;

B_Y содержит трансгенную кассету, которая кодирует терапевтический белок или его активный фрагмент (в частности, содержит SEQ ID NO: 12); и

B_3 представляет собой связь или содержит E4.

Согласно одному варианту реализации геном вируса в конструкциях согласно формуле (**I**) и/или (**Ia**) получен из Ad11 или EnAd, в частности, EnAd.

Согласно одному варианту реализации трансгенная кассета находится под контролем эндогенного промотора, например, главного позднего промотора.

Терапевтические белки включают антитело или связывающий фрагмент (например, выбранные из группы, включающей антитела или фрагменты, специфичные в отношении CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT или CD160, например, CTLA-4, PD-1, PD-L1 и/или PD-L2), белка B-7 (такого как B7-1 и/или B7-2), цитокина (например, выбранного из ИЛ□□□, ИЛ-1□, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-24, ИЛ-25, ИЛ-26, ИЛ-27, ИЛ-33, ИЛ-35, интерлейкина-2 (ИЛ-2), ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-15, ИЛ-21, ИЛ-25, ИЛ-1RA, ИФН□, ИФН□, ИФН□, ФНО□, ФРО□□□□лимфотоксина α (LTA) и ГМ-КСФ) и хемокина (например, ИЛ-8, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 и/или CRTH2), и комбинации двух или более указанных антител или связывающих фрагментов.

Терапия согласно настоящему изобретению может включать два или более онколитических вируса.

Регуляторные элементы

Согласно одному варианту реализации B_Y содержит трансгенную кассету согласно настоящему изобретению, причем указанная кассета дополнительно содержит трансген, кодирующий ингибитор контрольной точки, например, антитело против CTLA-4, антитело против PD-1 и антитело против PD-L1 или связывающий фрагмент любого из указанных антител, и регуляторный элемент, такой как комбинация регуляторных элементов.

Согласно одному варианту реализации регуляторный элемент представляет собой последовательность акцептора сплайсинга.

Согласно одному варианту реализации регуляторный элемент представляет собой последовательность Козака.

Согласно одному варианту реализации, например, когда трансген кодирует полицистронную молекулу РНК, регуляторный элемент представляет собой последовательность IRES.

Согласно одному варианту реализации регуляторная последовательность представляет собой последовательность высокоэффективного саморасщепляющегося пептида, такого как P2A, T2A, F2A, E2A.

Согласно одному варианту реализации регуляторная последовательность представляет собой полиА-«хвост».

Согласно одному варианту реализации присутствует по меньшей мере две регуляторные последовательности, например, акцептор сплайсинга и последовательность Козака, либо акцептор сплайсинга и полиА-«хвост», либо акцептор сплайсинга и последовательность IRES, либо акцептор сплайсинга и последовательность P2A.

Согласно одному варианту реализации присутствует по меньшей мере три регуляторные последовательности, например, последовательность акцептора сплайсинга, последовательность Козака и полиА-«хвост», либо последовательность акцептора сплайсинга, IRES или последовательность 2A и полиА-«хвост»; либо последовательность акцептора сплайсинга, последовательность Козака и последовательность IRES или 2A.

Согласно одному варианту реализации присутствует по меньшей мере четыре регуляторные последовательности, например, последовательность акцептора сплайсинга, последовательность Козака, последовательность IRES или 2A и полиА-«хвост», в частности, расположенные между L5 и E4 в следующем порядке: последовательность акцептора сплайсинга, последовательность Козака, последовательность IRES или 2A и полиА-«хвост».

Согласно одному варианту реализации трансген кодирует полицистронную молекулу РНК, содержащую регуляторную последовательность как IRES, так и 2A.

Согласно одному варианту реализации белок или белки, кодируемые в трансгенной кассете для экспрессии на мембране клетки, могут также содержать пептидный линкер или спейсер между трансмембранным доменом или ГФИ (гликозилфосфатидилинозитольный)-якорь и внеклеточный лиганд-связывающий домен. Такие линкеры или спейсеры могут добавить подвижности экспрессированному на поверхности клетки белку, которая усиливает способность белка взаимодействовать с его молекулой-мишенью, например, на соседней клетке. Такие линкеры или спейсеры можно также сконструировать или выбрать для стимуляции димеризации или тримеризации белков на поверхности клетки путем образования дисульфидной связи или белок-белковых взаимодействий. Например, шарнирные области молекул иммуноглобулина или CD8 можно применять для усиления как подвижности, так и димеризации.

Согласно одному варианту реализации белок или белки, кодируемые в трансгенной кассете, могут также содержать пептидную метку.

Пептидная метка может включать метки c-myc, полигистидин, V5 или FLAG и может быть расположена на N-конце или C-конце полипептида, например, внутриклеточно или внеклеточно, либо может кодироваться в пределах белка, например, во внеклеточной петле или между трансмембранным доменом и внеклеточным доменом. Пептидные метки можно применять в качестве спейсеров или линкеров между различными доменами белка, например, трансмембранным и внеклеточным доменом, и можно применять для обнаружения либо очистки или обнаружения белка либо клетки, экспрессирующей белок.

Согласно одному варианту реализации один или несколько дополнительных трансгенов, например, в вирусе согласно формуле (**I**) или (**Ia**), находятся под контролем экзогенного или эндогенного промотора, например, эндогенного промотора. Согласно одному варианту реализации трансген в области E3 (B_2) находится под контролем экзогенного промотора.

Согласно одному варианту реализации один или несколько дополнительных генов трансгенов расположены между областью E3 и фибером L5 в геноме аденовируса, например, в положении B_X в конструкции согласно формуле (**I**), в частности, под контролем экзогенного промотора. Таким образом, согласно одному варианту реализации трансген в B_X находится под контролем экзогенного промотора.

Согласно одному варианту реализации один или несколько дополнительных генов трансгенов расположены между областью E4 и фибером L5 в геноме аденовируса, например, в положении B_Y в конструкции согласно формуле (**I**) или (**Ia**), в частности, под контролем эндогенного промотора, такого как главный поздний промотор. Данные гены могут являться дополнением к терапевтическому белку или его активному фрагменту, кодируемому в области B_Y.

Трансген в настоящем документе обозначает ген, который был встроен в последовательность генома аденовируса, причем ген является неприродным по отношению к вирусу (экзогенным) или в норме не обнаруживается в данном конкретном расположении в вирусе. Примеры трансгенов приведены в настоящем документе. Трансген в настоящем документе также включает функциональный фрагмент гена, представляющий собой часть гена, которая после встраивания способна осуществлять функцию или большую часть функции полноразмерного гена, например, 50% функции или более.

Термины «трансген» и «кодирующая последовательность» используются в настоящем документе взаимозаменяемо применительно к вставкам в геном вируса, если в контексте не указано обратное. Кодирующая последовательность в настоящем документе обозначает, например, последовательность ДНК, кодирующую функциональную РНК, пептид, полипептид или белок. Как правило, кодирующая последовательность представляет собой кДНК для трансгена, которая кодирует функциональную РНК, пептид, полипептид или белок, представляющий интерес. Функциональная РНК, пептиды, полипептид и белки, представляющие интерес, описаны ниже.

Согласно одному варианту реализации трансген в настоящем документе обозначает сегмент ДНК, содержащий ген или последовательность кДНК, которая была выделена из одного организма и введена в отличный организм, т.е. вирус согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации данный ненативный сегмент ДНК, как правило, будет сохранять способность продуцировать функциональную РНК, пептид, полипептид или белок. Применяемые трансгены могут, например, кодировать отдельный белок или его активный фрагмент, химерный белок или слитый белок.

Понятно, что геном вируса содержит кодирующие последовательности ДНК. Эндогенные (встречающиеся в природе гены) в геномной последовательности вируса в контексте настоящего описания не считают трансгеном, если они не были

модифицированы с помощью рекомбинантных методик, в результате чего стали находиться в неприродном расположении или в неприродном окружении.

Таким образом, согласно одному варианту реализации встроенный трансген или трансгены кодируют белок, полипептид или пептид человека либо гуманизированный белок, полипептид или пептид. Трансген или трансгены могут быть расположены, например, в трансгенной кассете.

ГФИ-якорь в настоящем документе обозначает гликолипид, который может быть присоединен к С-концу белка в процессе посттрансляционной модификации. ГФИ-якорь состоит из группы фосфатидилинозитола, присоединенной с помощью углевод-содержащего линкера (глюкозамина и маннозы, связанных гликозидной связью с остатком инозитола) и с помощью мостика из фосфата этаноламина (EtNP) к С-концевой аминокислоте зрелого белка. Две жирные кислоты в гидрофобной группе фосфатидилинозитола заякоревают белок в мембрану клетки.

Глипиированные (ГФИ-связанные) белки обычно содержат сигнальный пептид, таким образом направляющий их в эндоплазматический ретикулум (ЭР). С-конец состоит из гидрофобных аминокислот, которые остаются встроенными в мембрану ЭР. Затем гидрофобный конец отщепляется и заменяется ГФИ-якорем. По мере прохождения через секреторный путь белок переносится везикулами в аппарат Гольджи и, наконец, во внеклеточное пространство, где остается присоединенным к внешнему листку мембраны клетки. Поскольку глипиирование является единственным средством присоединения таких белков к мембране, отщепление данной группы фосфолипазами приведет к контролируемому высвобождению белка из мембраны. Последний механизм применяют *in vitro*; т.е. белки мембраны, которые высвобождаются из мембран в ферментативном анализе, являются глипиированными белками.

Фосфолипаза С (PLC) представляет собой фермент, который, как известно, расщепляет фосфо-глицерольную связь, обнаруженную в ГФИ-заякоренных белках. Обработка PLC вызывает высвобождение ГФИ-связанных белков из внешней мембраны клетки. Маркер Т-клеток Thy-1 и ацетилхолинэстераза, а также щелочные фосфатазы кишечника и плаценты, как известно, являются ГФИ-связанными и высвобождаются в результате обработки PLC. ГФИ-связанные белки, как считают, предпочтительно расположены в липидных рафтах, что свидетельствует о высоком уровне организации в микродоменах плазматической мембраны.

Обзор ГФИ-якорей, подготовленный авторами Ferguson, Kinoshita и Hart, доступен в Главе 11 2-го издания руководства «Essentials of Glycobiology».

Вирусы

«Компетентный по репликации» в контексте настоящего описания обозначает вирус, который содержит все структуры, необходимые для репликации в клетках *in vitro* и *in vivo*, т.е. без помощи пакующей линии клеток. Вирусный вектор, например, в котором делетирована по меньшей мере область E1A, способный реплицироваться в комплементарной пакующей линии клеток, не является компетентным по репликации вирусом в контексте настоящего изобретения.

Вирусный вектор представляет собой дефицитный по репликации вирус, для репликации которого необходима пакующая линия клеток (содержащая комплементарный трансген).

Способный к репликации вирус в настоящем документе обозначает компетентный по репликации вирус или вирус, репликация которого зависит от фактора в раковых клетках, например, фактора, уровень экспрессии которого повышен, такого как p53 или аналогичный.

Согласно одному варианту реализации аденовирус представляет собой аденовирус человека. «Аденовирус», «серотип» или «серотип аденовируса» в настоящем документе обозначает любой аденовирус, который может быть отнесен к любому из свыше 50 известных на сегодняшний день серотипов аденовирусов, которые классифицируют на подгруппы A-F, и дополнительно расширяется до любого, пока еще не определенного или не классифицированного серотипа аденовирусов. См., например, публикации Strauss, "Adenovirus infections in humans," in The Adenoviruses, Ginsberg, ea., Plenum Press, New York, NY, pp. 451-596 (1984) и Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," in Fields Virology, Vol.2, Fourth Edition, Knipe, 35ea., Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2265-2267 (2001), как представлено ниже:

Подгруппа	**Серотип аденовируса**
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 51
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-
E	4

[illegible]	[illegible]

Аденовирусы подразделяют на группы в зависимости от их капсидов.

Согласно одному варианту реализации аденовирус представляет собой подгруппу B, например, независимо выбран из группы, включающей или состоящей из: Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34 и Ad51, такого как Ad11, в частности, Ad11p (штамм Slobitski). Согласно одному варианту реализации аденовирус согласно настоящему изобретению содержит капсид, такой как гексон и/или фибер аденовируса подгруппы B, такого как Ad11, в частности, Ad11p. Согласно одному варианту реализации аденовирус представляет собой Ad11 или содержит фибер, и/или гексон, и/или пентон Ad11, такого как Ad11p.

Согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему изобретению не представляет собой вирус группы A.

Согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему изобретению не содержит белок смерти аденовирусов (adeno death protein, ADP).

Согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему изобретению не представляет собой вирус группы C.

Согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему изобретению не содержит еще одни фрагменты вируса Ad5.

Согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему изобретению не представляет собой Ad5.

Энаденотуцирев (EnAd) представляет собой химерный онколитический аденовирус, ранее известный как ColoAd1 (WO2005/118825), с фибером, пентоном и гексоном из Ad11p; как следствие, он представляет собой вирус подгруппы B. Энаденотуцирев содержит химерную область E2B, которая содержит ДНК из Ad11p и Ad3. Практически вся область E3 и часть области E4 в EnAd делетированы. Вследствие этого EnAd содержит значительное пространство в геноме для размещения дополнительного генетического материала, при этом оставаясь жизнеспособным. Более того, поскольку EnAd относится к подгруппе B аденовируса, предсуществующий иммунитет к данному вирусу у людей является менее распространенным, чем, например, к Ad5. Другие примеры

химерных онколитических вирусов с фибером, пентоном и гексоном Ad11 включают OvAd1 и OvAd2 (см. публикацию WO2006/060314).

EnAd, как представляется, предпочтительно инфицирует опухолевые клетки, быстро реплицируется в данных клетках и вызывает их лизис. Данные события, в свою очередь, могут вызвать воспалительные иммунные ответы, тем самым стимулируя организм также бороться с раком. Часть эффективности EnAd, как предполагают, связана с быстрой репликацией вируса *in vivo*.

Важно отметить, что клиническим способом было продемонстрировано, что EnAd можно вводить системно (например, путем внутривенной или интраперитонеальной инъекции или инфузии), а затем вирус впоследствии будет селективно инфицировать опухолевые клетки и экспрессировать в них белки. Данное свойство EnAd, которое может быть присуще Ad11p и другим аденовирусам группы B, в частности, таковым, экспрессирующим белки капсида Ad11p (например, таковым, описанным в настоящем документе), делает возможной экспрессию кодируемых белков в опухоли и/или микроокружении опухоли.

В то время как EnAd селективно лизирует опухолевые клетки, может быть возможно ввести дополнительные свойства, которые характеризуются преимуществом, например, увеличением терапевтической активности вируса или снижением побочных эффектов вируса, с помощью включения в вирус трансгенов, таких как трансген, который кодирует белок передачи сигналов клеток или антитело, либо трансген, который кодирует молекулу, стимулирующую белок или белки передачи сигналов клеток.

В качестве преимущества, введение в вирус ДНК, кодирующей определенные белки, которые могут быть экспрессированы внутри раковой клетки, может сделать возможным использование собственных защитных механизмов организма для более эффективной борьбы с опухолевыми клетками, например, путем повышения доступности клеток для иммунной системы или путем доставки терапевтического гена/белка предпочтительно к опухолевым клеткам-мишеням.

Согласно одному варианту реализации онколитический аденовирус согласно настоящему изобретению стимулирует иммунную систему пациента бороться с опухолью, например, путем снижения способности рака супрессировать иммунные ответы.

Согласно одному варианту реализации антитело против CD40 или связывающий фрагмент, кодируемые вирусом согласно настоящему изобретению, обладают способностью активировать иммунные клетки, например, Т-клетки, в микроокружении опухоли и/или поблизости от опухоли.

Согласно одному варианту реализации онколитический вирус содержит белки фибер, гексон и пентон одинакового серотипа, например, Ad11, в частности, Ad11p, например, обнаруженные в положениях 30812-31789, 18254-21100 и 13682-15367 геномной последовательности последнего, причем положения нуклеотидов относятся к записи Genbank ID 217307399 (учетный номер: GC689208).

Согласно одному варианту реализации аденовирус представляет собой энаденотуцирев (также известен как EnAd и ранее как ColoAd1). Энаденотуцирев в настоящем документе обозначает химерный аденовирус согласно SEQ ID NO: 21, раскрытой в публикации WO2016/174200 и включенной посредством ссылки. Энаденотуцирев представляет собой компетентный по репликации онколитический химерный аденовирус, который обладает усиленными терапевтическими свойствами по сравнению с аденовирусами дикого типа (см. публикацию WO2005/118825). EnAd содержит химерную область E2B, содержащую ДНК из Ad11p и Ad3, и делеции в E3/E4. Структурные изменения в энаденотуциреве приводят к получению генома, который приблизительно на 3,5 т.о. (тысяч оснований) меньше, чем Ad11p, что обеспечивает дополнительное «пространство» для встраивания трансгенов.

Согласно одному варианту реализации кассета согласно настоящему изобретению расположена между L5 и областью E4 в аденовирусе, таком как аденовирус группы B, в частности, под контролем главного позднего промотора.

Согласно одному варианту реализации применяемый вирус не представляет собой EnAd.

Другие вирусы, которые можно применять в настоящем изобретении, включают вирус простого герпеса, реовирус, вирус кори, вирус болезни Ньюкасла, вирус Сенека-Валли, вирус везикулярного стоматита, полиовирус, энтеровирус ECHO, вирус Коксаки и вирус осповакцины, в частности, аденовирус, например, выбранный из группы, состоящей из талимогена лахерпарепвека, RIGVIR, Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12, Каватака™, CG0070, DNX-2401, G207, HF10, Имлигика®, JX-594, MG1-MA3, MV-NIS, OBP-301, Реолизина®, Toca 511.

Антитело или фрагмент антитела

Согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему изобретению кодирует полноразмерное антитело против CD40.

Термин «антитело» в настоящем документе обозначает молекулу иммуноглобулина, способную к специфичному связыванию с антигеном-мишенью, таким как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид, пептид и т.д., с помощью по меньшей мере одного сайта распознавания антигена (также обозначается в настоящем документе как «связывающий сайт»), расположенного в вариабельной области молекулы иммуноглобулина.

В настоящем документе молекула антитела включает антитела и их связывающие фрагменты, а также молекулы, содержащие одно или несколько указанных антител или фрагментов.

Антигенсвязывающий сайт в настоящем документе обозначает часть молекулы, которая содержит пару вариабельных областей, в частности, когнатную пару, которая специфично взаимодействует с антигеном-мишенью.

Связывающий фрагмент антитела в настоящем документе обозначает часть, меньшую, чем целое антитело, которая все еще способна к специфичному связыванию с антигеном-мишенью.

Более конкретно, в настоящем документе данный термин предназначен для обозначения связывающего сайта, который распознает исключительно антиген, к которому является специфичным, или связывающего сайта, который характеризуется значительно большей аффинностью связывания с антигеном, к которому является специфичным, по сравнению с аффинностью к антигенам, по отношению к которым он не является специфичным, например, в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз большей аффинностью связывания.

Применяемые молекулы антитела могут содержать полную молекулу антитела, содержащую полноразмерные тяжелые и легкие цепи, формат биспецифичного антитела, содержащий полноразмерные антитела, или фрагмент любого из указанных антител, включая, без ограничения, Fab, модифицированный Fab, Fab’, модифицированный Fab’, F(ab’)2, Fv, однодоменные антитела (например, VH или VL, или VHH), scFv, би, три- или тетравалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, тетратела и эпитоп-связывающие фрагменты любого из указанных выше антител (см., например, публикации Holliger and

Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Способы получения и производства данных фрагментов антител хорошо известны в данной области техники (см. например, публикацию Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Другие фрагменты антитела для применения в настоящем изобретении включают Fab- и Fab'-фрагменты, описанные в международных заявках на патент WO2005/003169, WO2005/003170 и WO2005/003171. Мультивалентные антитела могут характеризоваться множественными специфичностями, например, биспецифичные, или могут являться моноспецифичными (см., например, публикации WO 92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 и WO2010/035012).

Согласно одному варианту реализации молекула антитела, применяемая в вирусе согласно настоящему изобретению, является гуманизированной, химерной или отличной от молекулы человека.

Термин «гуманизированные» (которые включают антитела с привитым CDR) в настоящем документе обозначает молекулы, содержащие один или несколько участков, определяющих комплементарность (complementarity determining regions, CDR), из вида, отличного от человека, и каркасный участок из молекулы иммуноглобулина человека (см., например, публикации US 5,585,089; WO91/09967). Понятно, что может быть необходимо только перенести остатки CDR, определяющие специфичность, вместо целого CDR (см., например, публикацию Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Гуманизированные антитела могут необязательно дополнительно содержать один или несколько каркасных остатков, полученных из вида, отличного от человека, от которого были получены CDR.

Когда CDR или остатки, определяющие специфичность, привиты, можно применять любую подходящую акцепторную каркасную последовательность вариабельной области с учетом класса/типа донорного антитела, из которого были получены CDR, включая каркасные участки мыши, примата и человека. Для удобства гуманизированное антитело согласно настоящему изобретению содержит вариабельный домен, содержащий акцепторные каркасные участки человека, а также один или несколько CDR, предложенных в настоящем документе.

Примеры каркасных участков человека, которые можно применять в настоящем изобретении, представляют собой KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., ссылка выше). Например, KOL и NEWM можно применять для тяжелой цепи, REI можно применять для легкой цепи, и EU, LAY и POM можно применять как для тяжелой

цепи, так и для легкой цепи. В качестве альтернативы, можно применять последовательности зародышевой линии человека; они доступны по адресу: http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/

В гуманизированном антителе согласно настоящему изобретению акцепторные тяжелые и легкие цепи не обязательно должны быть получены из одного и того же антитела и могут, при необходимости, содержать составные цепи, содержащие каркасные участки, полученные из различных цепей.

Каркасные участки не обязательно должны содержать точно такую же последовательность, что и акцепторное антитело. Например, необычные остатки могут быть заменены более часто встречающимися остатками для данного класса или типа акцепторной цепи. В качестве альтернативы, выбранные остатки в акцепторных каркасных участках можно заменить так, чтобы они соответствовали остатку, обнаруженному в том же положении в донорном антителе (см. публикацию Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Такие изменения следует свести к минимуму, необходимому для восстановления аффинности донорного антитела. Протокол выбора остатков в акцепторных каркасных участках, которые может быть необходимо заменить, представлен в публикации WO91/09967.

Химерные антитела обычно содержат вариабельные области, отличные от областей человека, и константные области человека.

Согласно одному варианту реализации молекулы антитела согласно настоящему изобретению являются полностью молекулами человека, в частности, один или несколько из вариабельных доменов являются полностью доменами человека.

Полностью молекулы человека являются таковыми, в которых вариабельные области и константные области (в случае их наличия) тяжелой и легкой цепей все получены от человека или по существу идентичны последовательностям, полученным от человека, не обязательно от одного и того же антитела. Примеры полностью антител человека могут включать антитела, полученные, например, способами фагового дисплея, описанными выше, и антитела, наработанные мышами, в которых гены вариабельной и необязательно константной области иммуноглобулина мыши были заменены своими аналогами от человека, например, как описано в общем виде в публикациях EP0546073, US5,545,806, US5,569,825, US5,625,126, US5,633,425, US5,661,016, US5,770,429, EP0438474 и EP0463151.

Определения применительно к формуле (I) и (Ia)

Связь обозначает ковалентную связь, присоединяющую одну последовательность ДНК к другой последовательности ДНК, например, присоединяющую одну секцию генома вируса к другой. Таким образом, когда переменная в формуле (**I**) и (**Ia**) в настоящем документе представляет собой связь, свойство или элемент, представленный связью, отсутствуют, т.е. делетированы.

Поскольку структура аденовирусов является, в общем виде, подобной, элементы ниже обсуждаются применительно к структурным элементам и общепринято используемой номенклатуре, обозначающей элементы, которые известны специалисту. Когда в настоящем документе упоминается элемент, значит, авторы настоящего изобретения имеют в виду последовательность ДНК, кодирующую данный элемент, или последовательность ДНК, кодирующую такой же структурный белок элемента в аденовирусе. Последнее является актуальным в связи с вырожденностью кода ДНК. Возможно, для получения оптимальных результатов нужно принимать во внимание предпочтительное использование кодонов вирусами.

Любой структурный элемент из аденовируса, применяемый в вирусах согласно настоящему изобретению, может содержать или состоять из природной последовательности или может характеризоваться подобием на протяжении данной длины, составляющим по меньшей мере 95%, таким как 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Исходную последовательность можно изменить или модифицировать, чтобы исключить 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% генетического материала. Однако согласно одному варианту реализации последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 95% подобна или идентична, кодирует тот же продукт гена, т.е. РНК и/или белок. Специалист понимает, что при внесении изменений не должны быть нарушены рамки считывания вируса, в результате чего экспрессия структурных белков будет нарушена. Настоящее изобретение также распространяется на полинуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью, раскрытой в настоящем документе, в жестких условиях.

Согласно одному варианту реализации данный элемент представляет собой полноразмерную последовательность, т.е. полноразмерный ген. Полноразмерный ген в настоящем документе обозначает по меньшей мере всю протяженность кодирующей

последовательности гена, однако может включать любые связанные некодирующие области, в особенности, если они имеют отношение к функции гена.

Согласно одному варианту реализации данный элемент представляет собой менее чем полноразмерную последовательность и сохраняет ту же или соответствующую функцию, что и полноразмерная последовательность.

Согласно одному варианту реализации для данного элемента, который является необязательным в конструкциях согласно настоящему изобретению, последовательность ДНК может представлять собой менее чем полноразмерную и может не характеризоваться функциональностью, например, область E3 может быть полностью или частично делетирована. Однако может быть подходящим делетировать по существу всю область E3, поскольку это оптимизирует пространство, доступное для встраивания трансгенов.

Структурные гены, кодирующие структурные или функциональные белки аденовируса, обычно связаны некодирующими областями ДНК. Таким образом, существует некоторая вариативность относительно того, где «разрезать» геномную последовательность структурного элемента, представляющего интерес (в особенности, в его некодирующих областях), с целью встраивания трансгена в вирусы согласно настоящему изобретению. Таким образом, для целей настоящего описания элемент будут считать эталонным структурным элементом в той степени, в которой он соответствует цели и не кодирует чужеродный материал. Таким образом, в случае необходимости, ген будет связан с подходящими некодирующими областями, например, которые обнаружены в природной структуре вируса.

Таким образом, согласно одному варианту реализации вставку, такую как ДНК, кодирующую трансген, встраивают в некодирующую область геномной ДНК вируса, такую как интрон или межгенная последовательность. При этом некоторые некодирующие области аденовируса могут выполнять функцию, например, при альтернативном сплайсинге, регуляции транскрипции или регуляции трансляции, и данный факт может быть необходимо принимать во внимание.

Сайты, идентифицированные в настоящем документе, которые связаны с областью L5, подходят для размещения множества последовательностей ДНК, кодирующих сложные молекулы, такие как РНКи, цитокины, одноцепочечные или мультимерные белки, такие как антитела, в частности, SEQ ID NO: 12.

Ген в настоящем документе обозначает кодирующие и любые связанные с ними некодирующие последовательности, например, интроны и связанные экзоны. Согласно одному варианту реализации ген содержит или состоит из только необходимых структурных компонентов, например, кодирующей области.

Ниже представлено обсуждение применительно к конкретным структурным элементам аденовирусов.

Последовательности инвертированных концевых повторов (Inverted Terminal Repeat, ITR) свойственны всем известным аденовирусам (они получили название вследствие своей симметрии) и представляют собой точки начала репликации хромосомы вируса. Другое свойство данных последовательностей заключается в их способности образовывать шпильку.

5'ITR в настоящем документе обозначает часть или весь ITR от 5'-конца аденовируса, который сохраняет функцию ITR при встраивании в аденовирус в соответствующем расположении. Согласно одному варианту реализации 5'ITR содержит или состоит из последовательности от приблизительно 1 п.о. (пары оснований) до 138 п.о. SEQ ID NO: 21 из публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки) либо последовательности, идентичной указанной последовательности на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% по всей длине, в частности, последовательности, состоящей из от приблизительно 1 п.о. до 138 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки).

3'ITR в настоящем документе обозначает часть или весь ITR от 3'-конца аденовируса, который сохраняет функцию ITR при встраивании в аденовирус в соответствующем расположении. Согласно одному варианту реализации 3'ITR содержит или состоит из последовательности от приблизительно 32189 п.о. до 32326 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200, либо последовательности, идентичной указанной последовательности на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% по всей длине, в частности, последовательности, состоящей из от приблизительно 32189 п.о. до 32326 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200.

B1 в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, кодирующую: часть или всю E1A из аденовируса, часть или всю область E1B аденовируса и независимо часть или всю область E1A и E1B аденовируса.

Если B1 представляет собой связь, тогда последовательности E1A и E1B будут исключены из вируса. Согласно одному варианту реализации B1 представляет собой связь, и, таким образом, вирус представляет собой вектор.

Согласно одному варианту реализации B1 дополнительно содержит трансген. В данной области техники известно, что в области E1 можно разместить трансген, который может быть встроен разрушающим способом в область E1 (т.е. в «середину» последовательности), либо часть или всю область E1 можно делетировать для получения большего пространства для размещения генетического материала.

E1A в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, кодирующую часть или всю область E1A аденовируса. Последняя в настоящем документе обозначает полипептид/белок E1A. E1A можно подвергнуть мутации так, чтобы белок, кодируемый геном E1A, содержал консервативные или неконсервативные замены аминокислоты (например, 1, 2, 3, 4 или 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислоты по всей длине), чтобы он характеризовался той же функцией, что и белок дикого типа (т.е. соответствующий не содержащий мутацию белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; сниженной функцией, такой как отсутствие функции, по сравнению с белком дикого типа; или характеризовался новой функцией по сравнению с белком дикого типа или их комбинацией в соответствующих случаях.

E1B в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, кодирующую часть или всю область E1B аденовируса (т.е. полипептид или белок). E1B можно подвергнуть мутации так, чтобы белок, кодируемый геном/областью E1B, содержал консервативные или неконсервативные замены аминокислоты (например, 1, 2, 3, 4 или 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислоты по всей длине), чтобы он характеризовался той же функцией, что и белок дикого типа (т.е. соответствующий не содержащий мутацию белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; сниженной функцией, такой как отсутствие функции, по сравнению с белком дикого типа; или характеризовался новой функцией по сравнению с белком дикого типа или их комбинацией в соответствующих случаях.

Таким образом, B1 может являться модифицированной или немодифицированной по сравнению с областью E1 дикого типа, такой как E1A и/или E1B дикого типа. Специалист может легко определить, присутствует ли E1A и/или E1B либо (их часть) делетирована или подвергнута мутации.

«Дикий тип» в настоящем документе обозначает известный аденовирус или последовательность из известного аденовируса. Известный аденовирус представляет собой вирус, который был идентифицирован и назван, вне зависимости от того, доступна ли информация о его последовательности.

Согласно одному варианту реализации B1 содержит последовательность от 139 п.о. до 3932 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200.

B_A в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, кодирующую области E2B-L1-L2-L3-E2A-L4, включая в соответствующих случаях любые некодирующие последовательности (в частности, соответствующие природной последовательности из аденовируса). Обычно данная последовательность не будет содержать трансген. Согласно одному варианту реализации последовательность по существу подобна или идентична непрерывной последовательности из известного аденовируса, например, серотипа, представленного в таблице 1, в частности, вируса группы B, например, Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 или их комбинации, такого как Ad3, Ad11 или их комбинации. Согласно одному варианту реализации «представляет собой E2B-L1-L2-L3-E2A-L4» обозначает «содержащий» данные элементы и другие структурные элементы, связанные с областью, например, BA будет обычно включать последовательность, кодирующую белок IV2a, например, следующим образом: IV2A IV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4.

Согласно одному варианту реализации область E2B является химерной. То есть, содержит последовательности ДНК из двух или более различных серотипов аденовирусов, например, из Ad3 и Ad11, такого как Ad11p. Согласно одному варианту реализации область E2B содержит последовательность от 5068 п.о. до 10355 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200, или последовательность, идентичную указанной последовательности на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по всей длине.

Согласно одному варианту реализации E2B в компоненте B_A содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO: 18, раскрытой в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки).

Согласно одному варианту реализации B_A содержит последовательность от 3933 п.о. до 27184 п.о. SEQ ID NO: 18, раскрытой в публикации WO2016/174200.

E3 в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, кодирующую часть или всю область E3 аденовируса (т.е. белок/полипептид). E3 можно подвергнуть мутации так, чтобы белок, кодируемый геном E3, содержал консервативные или неконсервативные замены аминокислоты (например, 1, 2, 3, 4 или 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислоты по всей длине), чтобы он характеризовался той же функцией, что и белок дикого типа (соответствующий не содержащий мутацию белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; сниженной функцией, такой как отсутствие функции, по сравнению с белком дикого типа, или характеризовался новой функцией по сравнению с белком дикого типа или их комбинацией в соответствующих случаях.

Согласно одному варианту реализации область E3 получена из серотипа аденовируса, представленного в таблице 1, или их комбинации, в частности, серотипа группы B, например, Ad3, Ad7, Ad11 (в частности, Ad11p), Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 или их комбинации, такого как Ad3, Ad11 (в частности, Ad11p) или их комбинации.

Согласно одному варианту реализации область E3 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, раскрытой в публикации WO2016/174200.

Согласно одному варианту реализации область E3 частично делетирована, например, делетирована на 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%.

Согласно одному варианту реализации B_2 представляет собой связь, причем ДНК, кодирующая область E3, отсутствует.

Согласно одному варианту реализации ДНК, кодирующая область E3, может быть заменена или может прерываться трансгеном. В настоящем документе выражение «область E3 заменена трансгеном» в настоящем документе включает случаи, в которых часть области E3 или вся область E3 заменена трансгеном.

Согласно одному варианту реализации область B_2 содержит последовательность от 27185 п.о. до 28165 п.о. SEQ ID NO: 98, раскрытой в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки).

Согласно одному варианту реализации B_2 состоит из последовательности от 27185 п.о. до 28165 п.о. SEQ ID NO: 98, раскрытой в публикации WO2016/174200.

B_X в настоящем документе обозначает последовательность ДНК поблизости от 5'-конца гена L5 в BB. Расположенный «поблизости от» или «проксимально к» 5'-концу гена L5 в настоящем документе обозначает: смежный (прилегающий) к 5'-концу гена L5 или некодирующей области, от природы с ним связанной, т.е. примыкающий или прилегающий к 5'-концу гена L5 или некодирующей области, от природы с ним связанной. В качестве альтернативы, «поблизости от» или «проксимально к» может обозначать нахождение рядом с геном L5, так, чтобы кодирующие последовательности между областью BX и 5'-концом гена L5 отсутствовали.

Таким образом, согласно одному варианту реализации B_X присоединен напрямую к основанию L5, которое представляет собой, например, начало кодирующей последовательности гена L5.

Таким образом, согласно одному варианту реализации B_X присоединен напрямую к основанию L5, которое представляет собой, например начало некодирующей последовательности, или присоединен напрямую к некодирующей области, в природе связанной с L5. Некодирующая область, в природе связанная с L5, в настоящем документе обозначает часть всей некодирующей области, которая представляет собой часть гена L5 или прилегает к нему, но не является частью другого гена.

Согласно одному варианту реализации B_X содержит последовательность SEQ ID NO: 98, раскрытую в публикации WO2016/174200. Данная последовательность представляет собой искусственную некодирующую последовательность, причем в нее может быть встроена последовательность ДНК, например, содержащая трансген (или трансгенную кассету), сайт рестрикции или их комбинации. Данная последовательность характеризуется преимуществом, поскольку она выступает в качестве буфера по той причине, что обеспечивает некоторую подвижность в точном расположении трансгена и при этом минимизирует разрушающие эффекты в отношении стабильности и жизнеспособности вируса.

Вставка или вставки могут возникать где-либо в пределах SEQ ID NO: 98, раскрытой в публикации WO2016/174200, с 5'-конца, 3'-конца или в любой точке между п.о. 1 и 201, например, между парами оснований 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34, 34/35, 35/36, 36/37, 37/38, 38/39, 39/40, 40/41, 41/42, 42/43, 43/44, 44/45, 45/46, 46/47, 47/48, 48/49, 49/50, 50/51, 51/52,

52/53, 53/54, 54/55, 55/56, 56/57, 57/58, 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 63/64, 64/65, 65/66, 66/67, 67/68, 68/69, 69/70, 70/71, 71/72, 72/73, 73/74, 74/75, 75/76, 76/77, 77/78, 78/79, 79/80, 80/81, 81/82, 82/83, 83/84, 84/85, 85/86, 86/87, 87/88, 88/89, 89/90, 90/91, 91/92, 92/93, 93/94, 94/95, 95/96, 96/97, 97/98, 98/99, 99/100, 100/101, 101/102, 102/103, 103/104, 104/105, 105/106, 106/107, 107/108, 108/109, 109/110, 110/111, 111/112, 112/113, 113/114, 114/115, 115/116, 116/117, 117/118, 118/119, 119/120, 120/121, 121/122, 122/123, 123/124, 124/125, 125/126, 126/127, 127/128, 128/129, 129/130, 130/131, 131/132, 132/133, 133/134, 134/135, 135/136, 136/137, 137/138, 138/139, 139/140, 140/141, 141/142, 142/143, 143/144, 144/145, 145/146, 146/147, 147/148, 148/149, 150/151, 151/152, 152/153, 153/154, 154/155, 155/156, 156/157, 157/158, 158/159, 159/160, 160/161, 161/162, 162/163, 163/164, 164/165, 165/166, 166/167, 167/168, 168/169, 169/170, 170/171, 171/172, 172/173, 173/174, 174/175, 175/176, 176/177, 177/178, 178/179, 179/180, 180/181, 181/182, 182/183, 183/184, 184/185, 185/186, 186/187, 187/188, 189/190, 190/191, 191/192, 192/193, 193/194, 194/195, 195/196, 196/197, 197/198, 198/199, 199/200 или 200/201.

Согласно одному варианту реализации B_X содержит SEQ ID NO: 98, раскрытую в публикации WO2016/174200, с последовательностью ДНК, встроенной между п.о. 27 и п.о. 28, или место, соответствующее положениям между 28192 п.о. и 28193 п.о. SEQ ID NO: 98, раскрытой в публикации WO2016/174200.

Согласно одному варианту реализации B_X содержит последовательность от 28166 п.о. до 28366 п.о. SEQ ID NO: 21, раскрытой в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки). Согласно одному варианту реализации B_X представляет собой связь.

B_B в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, кодирующую область L5. В настоящем документе область L5 обозначает последовательность ДНК, содержащую ген, который кодирует полипептид/белок фибер, в зависимости от контекста. Ген/область фибера кодирует белок фибер, который является главным компонентом капсида аденовирусов. Фибер участвует в распознавании рецепторов и вносит вклад в способность аденовируса селективно связываться с клетками и инфицировать их.

В вирусах согласно настоящему изобретению фибер может быть получен из любого серотипа аденовируса, и аденовирусы, которые являются химерными в результате замены фибера одним из отличных серотипов, также предусмотрены в настоящем изобретении.

Согласно одному варианту реализации фибер получен из вируса группы B, в частности, Ad11, такого как Ad11p.

Согласно одному варианту реализации B_B содержит последовательность от 28367 п.о. до 29344 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки).

Последовательность ДНК применительно к B_Y в настоящем документе обозначает последовательность ДНК поблизости от 3'-конца гена L5 B_B. Расположенный «поблизости от» 3'-конца или «проксимально к» 3'-концу гена L5 в настоящем документе обозначает: смежный (прилегающий) к 3'-концу гена L5 или некодирующей области, от природы с ним связанной, т.е. примыкающий или прилегающий к 3'-концу гена L5 или некодирующей области, от природы с ним связанной (т.е. всей или части некодирующей последовательности, эндогенной по отношению к L5). В качестве альтернативы, «поблизости от» или «проксимально к» может обозначать нахождение рядом с геном L5, так, чтобы кодирующие последовательности между областью B_Y и 3'-концом гена L5 отсутствовали.

Таким образом, согласно одному варианту реализации B_Y присоединен напрямую к основанию L5, которое представляет собой «конец» кодирующей последовательности.

Таким образом, согласно одному варианту реализации B_Y присоединен напрямую к основанию L5, которое представляет собой «конец» некодирующей последовательности, или присоединен напрямую к некодирующей области, в природе связанной с L5.

Термины «от природы» и «в природе» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Согласно одному варианту реализации B_Y содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 99, раскрытой в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки). Данная последовательность представляет собой некодирующую последовательность, в которую может быть встроена последовательность ДНК, например, содержащая трансген (или трансгенную кассету), сайт рестрикции или их комбинации. Данная последовательность характеризуется преимуществом, поскольку она выступает в качестве буфера по той причине, что обеспечивает некоторую подвижность в точном расположении трансгена и при этом минимизирует разрушающие эффекты в отношении стабильности и жизнеспособности вируса.

Вставка или вставки могут возникать где-либо в пределах SEQ ID NO: 18, раскрытой в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки), с 5'-конца, 3'-конца или в любой точке между п.о. 1 и 35, например, между парами оснований 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34 или 34/35.

Согласно одному варианту реализации B_Y содержит SEQ ID NO: 99, раскрытую в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки), с последовательностью ДНК, встроенной между положениями п.о. 12 и 13, или место, соответствующее 29356 п.о. и 29357 п.о. в SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки). Согласно одному варианту реализации вставка представляет собой вставку сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 19 п.о., содержащую 2 сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 9 п.о., содержащую 1 сайт рестрикции. Согласно одному варианту реализации вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два, или три трансгена, такие как один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 19 п.о., содержащую 2 сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 9 п.о., содержащую 1 сайт рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации два сайта рестрикции содержат прослойки одного или нескольких, таких как два, трансгенов (например, в трансгенной кассете). Согласно одному варианту реализации, когда B_Y содержит два сайта рестрикции, указанные сайты рестрикции являются отличными друг от друга. Согласно одному варианту реализации указанный один или несколько сайтов рестрикции в B_Y являются не встречающимися в природе (такими как уникальные) в геноме конкретного аденовируса, в который они были встроены. Согласно одному варианту реализации указанный один или несколько сайтов рестрикции в B_Y являются отличными от других сайтов рестрикции, расположенных в другом месте в геноме

аденовируса, например, отличными от встречающихся в природе сайтов рестрикции или сайтов рестрикции, введенных в другие части генома, такие как B_X. Таким образом, согласно одному варианту реализации сайт или сайты рестрикции позволяют специфично разрезать ДНК в данной секции.

Согласно одному варианту реализации B_Y содержит последовательность от 29345 п.о. до 29379 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200. Согласно одному варианту реализации B_Y представляет собой связь.

Согласно одному варианту реализации вставка расположена после п.о. 12 в SEQ ID NO: 99, раскрытой в публикации WO2016/174200.

Согласно одному варианту реализации вставка расположена приблизительно в положении 29356 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200.

Согласно одному варианту реализации вставка представляет собой трансгенную кассету, содержащую один или несколько трансгенов, например, 1, 2 или 3, такие как 1 или 2.

E4 в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, кодирующую часть области E4 или всю область E4 аденовируса (т.е. область полипептида/белка), которую можно подвергнуть мутации так, чтобы белок, кодируемый геном E4, содержал консервативные или неконсервативные замены аминокислоты (например 1, 2, 3, 4 или 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислоты) и характеризовался той же функцией, что и белок дикого типа (соответствующий не содержащий мутацию белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; сниженной функцией, такой как отсутствие функции, по сравнению с белком дикого типа, или характеризовался новой функцией по сравнению с белком дикого типа или их комбинацией в соответствующих случаях.

Согласно одному варианту реализации область E4 частично делетирована, например, делетирована на 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. Согласно одному варианту реализации область E4 содержит последовательность от 32188 п.о. до 29380 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200.

Согласно одному варианту реализации E4 присутствует, за исключением области E4orf4, которая делетирована.

Согласно одному варианту реализации B_3 представляет собой связь, т.е. E4 отсутствует.

Согласно одному варианту реализации B_3 содержит последовательность, состоящую из от 32188 п.о. до 29380 п.о. SEQ ID NO: 17, раскрытой в публикации WO2016/174200.

В настоящем документе диапазоны чисел включают конечные точки.

Специалист понимает, что элементы в формулах в настоящем документе, таких как формула (**I**), (**Ia**), являются смежными и могут представлять собой некодирующие последовательности ДНК, а также гены и кодирующие последовательности ДНК (структурные свойства), упомянутые в настоящем документе. Согласно одному или нескольким вариантам реализации с помощью формул согласно настоящему изобретению предпринята попытка описать встречающуюся в природе последовательность в геноме аденовируса. В данном контексте специалисту будет понятно, что формула обозначает главные элементы, характеризующие соответствующую секцию генома, и не предназначена для того, чтобы являться исчерпывающим описанием геномной протяженности ДНК.

E1A, E1B, E3 и E4 в настоящем документе каждый независимо обозначает дикий тип и его эквиваленты, мутированные или частично делетированные формы каждой области, как описано в настоящем документе, в частности, последовательность дикого типа из известного аденовируса.

«Вставка» в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, которая встроена на 5'-конце, 3'-конце или в пределах данного эталонного сегмента последовательности ДНК так, чтобы она нарушала эталонную последовательность. Эталонная последовательность используется в качестве эталонной точки, относительно которой размещена вставка. В контексте настоящего изобретения вставки обычно возникают в пределах SEQ ID NO: 98 или SEQ ID NO: 99, обе из которых раскрыты в публикации WO2016/174200. Вставка обычно содержит трансгенную кассету. Когда последовательность нарушена, вирус все еще будет содержать исходную последовательность, но обычно она будет представлена в виде двух фрагментов, между которыми размещена вставка.

Согласно одному варианту реализации трансген или трансгенная кассета не содержит несмещенный вставочный транспозон, такой как транспозон TN7 или его часть. Транспозон Tn7 в настоящем документе обозначает несмещенный вставочный транспозон, как описано в публикации WO2008/080003.

Согласно одному варианту реализации трансген или трансгенная кассета дополнительно содержит регуляторный элемент или последовательность.

Промоторы

Промотор в настоящем документе обозначает область ДНК, которая инициирует транскрипцию конкретного гена или генов. Промоторы обычно расположены проксимально к генам, которые они транскрибируют, на той же цепи и «выше по течению» (т.е. в направлении 5') на ДНК. «Проксимально» в данном контексте обозначает в достаточной степени близко для того, чтобы выполнять функцию промотора. Согласно одному варианту реализации промотор находится в пределах 100 п.о. от сайта начала транскрипции. Таким образом, эндогенный промотор в настоящем документе обозначает промотор, который встречается в природе в аденовирусе или конструкции (т.е. является нативным по отношению к аденовирусу или конструкции), в которые встроен трансген. Согласно одному или нескольким вариантам реализации применяемый эндогенный промотор представляет собой встречающийся в природе промотор в вирусе в его исходном расположении в геноме вируса, в частности, он представляет собой первичный или единственный промотор, используемый при экспрессии трансгена или трансгенов. Согласно одному варианту реализации эндогенный промотор, применяемый для стимуляции трансляции и необязательно транскрипции трансгена, является постоянным, т.е. встроенным в геном аденовируса, а не введенным предварительно с помощью рекомбинантных методик.

«Под контролем эндогенного промотора» в настоящем документе обозначает ситуацию, когда трансген/трансгенная кассета встроены в соответствующей ориентации, чтобы находиться под контролем указанного эндогенного промотора. Это означает, что, когда промотор обычно расположен на антисмысловой цепи, кассету встраивают, например, в антисмысловой ориентации.

При этом гены можно экспрессировать в одной из двух ориентаций. Однако обычно одна ориентация обеспечивает повышенные уровни экспрессии по сравнению с другой ориентацией для данного (конкретного) трансгена.

Согласно одному варианту реализации кассета находится в смысловой ориентации. То есть, транскрибируется в направлении от 5’ к 3’. Согласно одному варианту реализации кассета находится в антисмысловой ориентации. То есть, транскрибируется в ориентации от 3’ к 5’.

Эндогенные промоторы в вирусе можно, например, применять с использованием гена, кодирующего трансген, и последовательности акцептора сплайсинга. Таким образом, согласно одному варианту реализации кассета будет содержать последовательность акцептора сплайсинга, которая облегчает использование трансгеном эндогенного промотора. Таким образом, согласно одному варианту реализации кодирующая последовательность, например, последовательность, кодирующая антитело или связывающий фрагмент антитела, дополнительно содержит последовательность акцептора сплайсинга.

Согласно одному варианту реализации трансген, трансгены или трансгенная кассета находятся под контролем промотора E4 или главного позднего промотора, такого как главный поздний промотор (промотор ML).

«Под контролем» в настоящем документе обозначает, что трансген активируется, т.е. транскрибируется, когда это обуславливает конкретный промотор.

Главный поздний промотор (промотор ML или MLP, Major Late Promoter) в настоящем документе обозначает промотор аденовируса, который контролирует экспрессию «поздно экспрессируемых» генов, таких как ген L5. MLP представляет собой промотор «смысловой цепи». Это означает, что промотор влияет на гены, расположенные «ниже по течению» от промотора в направлении 5’-3’. Главный поздний промотор в настоящем документе обозначает исходный главный поздний промотор, расположенный в геноме вируса.

Промотор E4 в настоящем документе обозначает промотор области E4 аденовируса. Область E4 представляет собой антисмысловую область; вследствие этого промотор представляет собой антисмысловой промотор. Это означает, что промотор расположен «выше по течению» от области E4 в направлении 3’-5’. Вследствие этого может быть необходимо ориентировать любую трансгенную кассету под контролем промотора E4 соответствующим образом. Согласно одному варианту реализации кассета под контролем промотора E4 находится в антисмысловой ориентации. Согласно одному варианту реализации кассета находится под контролем промотора E4 в смысловой ориентации.

Промотор E4 в настоящем документе обозначает исходный промотор E4, расположенный в геноме вируса.

Таким образом, согласно одному варианту реализации предложен компетентный по репликации онколитический аденовирус серотипа 11 (такой как Ad11p) или вирус-производное указанного вируса, причем фибер, гексон и капсид относятся к серотипу 11 (такому как Ad11p), причем геном вируса содержит последовательность ДНК, кодирующую терапевтическое антитело или связывающий фрагмент антитела, причем указанная последовательность ДНК находится под контролем промотора, эндогенного по отношению к аденовирусу, выбранного из группы, состоящей из E4 и главного позднего промотора (т.е. промотора E4 или главного позднего промотора), так, что трансген не препятствует репликации вируса, например, связан с областью L5 (т.е. до или после указанной области), например, расположен в геноме вируса после L5.

Согласно одному варианту реализации эндогенный промотор введен в геном вируса в желаемом участке с помощью рекомбинантных методик, например, введен в трансгенной кассете. Однако в контексте настоящего описания данное расположение обычно обозначается как экзогенный промотор.

Согласно одному варианту реализации трансгенная кассета содержит экзогенный промотор. Экзогенный промотор в настоящем документе обозначает промотор, который не встречается в природе в аденовирусе, в который встроен трансген. Как правило, экзогенные промоторы получены из других вирусов или представляют собой промоторы млекопитающих. Экзогенный промотор в настоящем документе обозначает элемент ДНК, обычно расположенный выше по течению от гена, представляющего интерес, который регулирует транскрипцию гена.

Согласно одному варианту реализации регулятор экспрессии гена представляет собой экзогенный промотор, например, CMV (промотор цитомегаловируса), CBA (промотор бета-актина цыпленка) или PGK (промотор фосфоглицераткиназы 1), такой как промотор CMV.

Согласно одному варианту реализации экзогенный промотор является индуцибельным.

Согласно одному варианту реализации предложен компетентный по репликации онколитический аденовирус серотипа 11 (такой как Ad11p) или вирус-производное

указанного вируса, причем фибер, гексон и капсид относятся к серотипу 11 (такому как Ad11p), причем геном вируса содержит последовательность ДНК, кодирующую терапевтическое антитело или связывающий фрагмент антитела, расположенную в части генома вируса, которая поздно экспрессируется в цикле репликации вируса, и вследствие чего трансген не препятствует репликации вируса, причем указанная последовательность ДНК находится под контролем промотора, экзогенного по отношению к аденовирусу (например, промотора CMV). Согласно одному варианту реализации последовательность ДНК, кодирующая антитело или фрагмент, связана с областью L5, как описано в другом месте в настоящем документе.

Другие регуляторные последовательности

«Регулятор экспрессии гена» (или регулятор/регуляторный элемент) в настоящем документе обозначает генетический элемент, такой как промотор, энхансер или последовательность акцептора сплайсинга, который играет роль в экспрессии гена, как правило, путем инициации или усиления транскрипции или трансляции.

«Последовательность акцептора сплайсинга», «акцептор сплайсинга» или «сайт сплайсинга» в настоящем документе обозначает регуляторную последовательность, которая определяет, когда молекула РНК будет распознана малыми ядерными рибонуклеопротеинами комплекса сплайсосомы. После сборки сплайсосома катализирует сплайсинг между акцепторным сайтом сплайсинга молекулы РНК и расположенным «выше по течению» донорным сайтом сплайсинга с образованием зрелой молекулы РНК, которая может быть транслирована с образованием одного полипептида или белка.

В настоящем изобретении можно применять последовательности акцептора сплайсинга различного размера, и они могут быть описаны как короткий акцептор сплайсинга (малый), акцептор сплайсинга (средний) и разветвленный акцептор сплайсинга (большой).

SSA в настоящем документе обозначает короткий акцептор сплайсинга, как правило, содержащий только сайт сплайсинга, например, SA размером 4 п.о. в настоящем документе обозначает акцептор сплайсинга, как правило, содержащий короткий акцептор сплайсинга и полипиримидиновый тракт, например, bSA размером 16 п.о. в настоящем документе обозначает разветвленный акцептор сплайсинга, как правило, содержащий короткий акцептор сплайсинга, полипиримидиновый тракт и точку разветвления, например, размером 26 п.о.

Согласно одному варианту реализации акцептор сплайсинга, применяемый в конструкциях согласно настоящему изобретению, представляет собой CAGG или SEQ ID NO: 15 или 16 (обе раскрыты в публикации WO2016/174200 как SEQ ID NO: 10 и 11 данного документа, причем указанные последовательности включены в настоящий документ посредством ссылки). Согласно одному варианту реализации SSA содержит нуклеотидную последовательность CAGG. Согласно одному варианту реализации SA содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15. Согласно одному варианту реализации bSA содержит нуклеотидную последовательность cagg. Согласно одному варианту реализации последовательность акцептора сплайсинга независимо выбрана из группы, содержащей: tgctaatctt cctttctctc ttcagg (SEQ ID NO: 15), tttctctctt cagg (SEQ ID NO: 16) и cagg.

Согласно одному варианту реализации сайт сплайсинга непосредственно продолжается (т.е. за ним следует в направлении от 5' к 3') консенсусной последовательностью Козака, содержащей CCACC. Согласно одному варианту реализации сайт сплайсинга и последовательность Козака перемежаются (отделены) до 100 или менее п.о. Согласно одному варианту реализации последовательность Козака содержит нуклеотидную последовательность CCACC.

Как правило, при нахождении под контролем эндогенного или экзогенного промотора (такого как эндогенный промотор) кодирующей последовательности будет непосредственно предшествовать последовательность Козака. Начало кодирующей области обозначено кодоном инициации (AUG), например, применительно к последовательности (gcc)gccRcc**AUG**g (SEQ ID NO: 8) начало кодирующей последовательности обозначено основаниями, выделенными жирным шрифтом. Строчная буква обозначает общепринятые основания в данном положении (которые, тем не менее, могут варьировать), а прописные буквы обозначают высококонсервативные основания, т.е. последовательность «AUGG» является константной или редко изменяется, если это вообще имеет место; «R» обозначает, что в данном положении обычно присутствует пурин (аденин или гуанин), а последовательность в скобках (gcc) имеет неопределенное значение. Таким образом, согласно одному варианту реализации кодон инициации AUG встроен в последовательность Козака.

Последовательность ДНК внутреннего участка посадки рибосомы (internal ribosome entry site, IRES) в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, кодирующую последовательность внутреннего участка посадки рибосомы (IRES). IRES в

настоящем документе обозначает нуклеотидную последовательность, которая обеспечивает инициацию трансляции последовательности матричной РНК (мРНК), включая инициацию, начинающуюся в пределах последовательности мРНК. Данная последовательность является в особенности подходящей, когда кассета кодирует полицистронную мРНК. Использование IRES приводит к получению полицистронной мРНК, которая транслируется во множество отдельных белков или пептидов. Согласно одному варианту реализации последовательность ДНК внутреннего участка посадки рибосомы содержит нуклеотидную последовательность, раскрытую в публикации WO2016/174200 как SEQ ID NO: 6 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки). Согласно одному варианту реализации конкретный IRES используется в геноме только один раз. Данный подход может характеризоваться преимуществами применительно к стабильности генома.

«Высокоэффективный саморасщепляющийся пептид 2A» или «пептид 2A» в настоящем документе обозначает пептид, который эффективно отщепляется после трансляции. Подходящие пептиды 2A включают P2A, F2A, E2A и T2A. Авторы настоящего изобретения отметили, что после того, как конкретная последовательность ДНК, кодирующая данный пептид 2A, однажды была использована, та же конкретная последовательность ДНК не может быть использована во второй раз. Однако вырожденность кода ДНК можно использовать для получения последовательности ДНК, которая транслируется в тот же пептид 2A. Применение пептидов 2A является в особенности подходящим, когда кассета кодирует полицистронную мРНК. Применение пептидов 2A приводит к получению одной полипептидной цепи, которая транслируется, модифицирующейся после трансляции с получением множества отдельных белков или пептидов.

Согласно одному варианту реализации применяемый кодируемый пептид P2A содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 24. Согласно одному варианту реализации применяемый кодируемый пептид F2A содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 25. Согласно одному варианту реализации применяемый кодируемый пептид E2A содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 26. Согласно одному варианту реализации применяемый кодируемый пептид T2A содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 27.

Согласно одному варианту реализации мРНК или каждая мРНК, кодируемая трансгеном, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, такую как

расположенная, как правило, на конце последовательности мРНК, например, как представлено в SEQ ID NO: 10. Таким образом, согласно одному варианту реализации трансген или трансгенная кассета содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую последовательность сигнала полиаденилирования.

«ПолиА», «сигнал полиаденилирования» или «последовательность полиаденилирования» в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, обычно содержащую сайт AATAAA, которая после транскрипции может распознаваться мультибелковым комплексом, который расщепляет и полиаденилирует образовавшуюся молекулу РНК.

Согласно одному варианту реализации последовательность полиаденилирования содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6, раскрытую в публикации WO2016/174200 (указанная последовательность включена в настоящий документ посредством ссылки).

Согласно одному варианту реализации конструкция не содержит последовательность полиаденилирования. Согласно одному варианту реализации регулятор экспрессии гена представляет собой последовательность акцептора сплайсинга.

Согласно одному варианту реализации последовательность, кодирующая белок/полипептид/пептид, такой как антитело или связывающий фрагмент антитела, дополнительно содержит сигнал полиаденилирования.

Составы

Настоящее изобретение также распространяется на фармацевтический состав вируса, как описано в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации предложен жидкий парентеральный состав, например, для инфузии или инъекции, способного к репликации онколитического вируса согласно настоящему изобретению, причем состав обеспечивает дозу в диапазоне от 1 x 10^{10} до 1 x 10^{14} вирусных частиц на объем дозы.

Парентеральный состав обозначает состав, не предназначенный для доставки через желудочно-кишечный тракт. Обычные пути парентеральной доставки включают инъекцию, имплантацию или инфузию. Согласно одному варианту реализации состав предложен в форме для болюсной доставки.

Согласно одному варианту реализации парентеральный состав находится в форме инъекции. Инъекция включает внутривенную, подкожную, внутриопухолевую или внутримышечную инъекции. Инъекция в настоящем документе обозначает введение жидкости в тело с помощью шприца. Согласно одному варианту реализации способ согласно настоящему изобретению не включает внутриопухолевую инъекцию.

Согласно одному варианту реализации парентеральный состав находится в форме инфузии.

Инфузия в настоящем документе обозначает введение жидкостей с более медленной скоростью с помощью капельницы, инфузионного насоса, шприцевой помпы или эквивалентного устройства. Согласно одному варианту реализации инфузию вводят в течение периода времени в диапазоне от 1,5 минут до 120 минут, такого как приблизительно 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, 70, 65, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 или 115 минут.

Согласно одному варианту реализации одну дозу состава менее 100 мл, например, 30 мл, вводят с помощью шприцевой помпы.

Согласно одному варианту реализации инъекцию вводят в виде медленной инъекции, например, в течение периода времени от 1,5 до 30 минут.

Согласно одному варианту реализации состав предназначен для внутривенного (в.в.) введения. Данный путь является в особенности эффективным для доставки онколитического вируса, поскольку он обеспечивает быстрый доступ к большинству органов и тканей и является в особенности подходящим для лечения метастазов, например, установившихся метастазов, в особенности таковых, расположенных в областях с высокой степенью васкуляризации, таких как печень и легкие.

Терапевтические составы, как правило, будут стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в состав в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другого парентерального состава, подходящего для введения человеку, и может быть приготовлена в состав в виде преднаполненного устройства, такого как шприц или ампула, в частности, в виде однократной дозы.

Состав будет обычно содержать фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, например, нетоксичный изотонический носитель, совместимый с вирусом, в котором вирус является стабильным в течение необходимого периода времени.

Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерол, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие смеси указанных веществ. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, с применением диспергирующего вещества или поверхностно-активного вещества, такого как лецитин, или неионного поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат 80 или 40. В дисперсиях поддержанию требуемого размера частиц можно способствовать с помощью добавления поверхностно-активного вещества. Примеры изотонических средств включают сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия в композиции.

Согласно одному варианту реализации применяемые парентеральные составы могут содержать один или несколько следующих компонентов: буфер, например, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту, фосфатный буфер и/или Трис-буфер, сахар, например, декстрозу, маннозу, сахарозу или аналогичный сахар, соль, такую как хлорид натрия, хлорид магния или хлорид калия, детергент, такой как неионное поверхностно-активное вещество, такое как BRIJ, PS-80, PS-40 или аналогичное вещество. Состав также может содержать консервант, такой как ЭДТА или этанол либо комбинацию ЭДТА и этанола, которые, как считают, предотвращают один или несколько возможных путей деградации.

Согласно одному варианту реализации состав будет содержать очищенный онколитический вирус согласно настоящему изобретению, например, от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на дозу, такие как от 1×10^{10} до 1×10^{12} вирусных частиц на дозу. Согласно одному варианту реализации концентрация вируса в составе находится в диапазоне от 2×10^{8} до 2×10^{14} в.ч./мл, такая как 2×10^{12} в.ч./мл.

Согласно одному варианту реализации парентеральный состав содержит глицерол.

Согласно одному варианту реализации состав содержит онколитический аденовирус, как описано в настоящем документе, HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту), глицерол и буфер.

Согласно одному варианту реализации парентеральный состав состоит из вируса согласно настоящему изобретению, HEPES, например 5 мМ, глицерола, например, 5 – 20% (об./об.), хлористоводородной кислоты, например, для доведения pH до диапазона 7 – 8, и воды для инъекций.

Согласно одному варианту реализации 0,7 мл вируса согласно настоящему изобретению в концентрации 2 x 10^{12} в.ч./мл приготовлены в состав в 5 мМ HEPES, 20% глицероле при конечном pH 7,8.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Согласно одному варианту реализации состав предложен в качестве состава для местного введения, включая ингаляцию.

Подходящие ингалируемые препараты включают ингалируемые порошки, дозированные аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, или ингалируемые растворы, не содержащие газы-пропелленты. Ингалируемые порошки согласно настоящему изобретению обычно содержат вирус, как описано в настоящем документе, с физиологически приемлемым вспомогательным веществом.

Данные ингалируемые порошки могут содержать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), многоатомные спирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или смеси указанных соединений друг с другом. Предпочтительно, применяют моно- и дисахариды, такие как лактоза или глюкоза, в частности, но не исключительно, в виде гидратов.

Для осаждения в легких требуются частицы размером менее 10 микрон, такие как 1 – 9 микрон, например, 0,1 – 5 мкм, в частности, 1 – 5 мкм. Размер частицы, несущей вирус, имеет первостепенное значение, и, таким образом, согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему изобретению может быть адсорбирован или абсорбирован на частице, такой как частица лактозы данного размера.

Газы-пропелленты, которые можно применять для получения ингалируемых аэрозолей, известны в данной области техники. Подходящие газы-пропелленты выбирают из углеводородов, таких как n-пропан, n-бутан или изобутан, и галогенированных углеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Упомянутые выше газы-пропелленты можно применять по отдельности или в смесях.

Наиболее подходящие газы-пропелленты представляют собой галогенированные производные алканов, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Из перечисленных

выше галогенированных углеводородов в особенности подходят для применения TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси.

Ингалируемые аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, также могут содержать другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (сурфактанты), антиоксиданты, смазывающие вещества и регуляторы pH. Все данные ингредиенты известны в данной области техники.

Ингалируемые аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, согласно настоящему изобретению могут содержать до 5 масс. % активного вещества. Аэрозоли согласно настоящему изобретению содержат, например, от 0,002 до 5 масс. %, от 0,01 до 3 масс. %, от 0,015 до 2 масс. %, от 0,1 до 2 масс. %, от 0,5 до 2 масс. % или от 0,5 до 1 масс. % активного компонента.

В качестве альтернативы, местное введение в легкие можно также осуществлять с помощью введения жидкого состава раствора или суспензии, например, с применением устройства, такого как небулайзер, например, небулайзер, присоединенный к компрессору (например, небулайзер Pari LC-Jet Plus(R), присоединенный к компрессору Pari Master(R), произведенные компанией Pari Respiratory Equipment, Inc., Ричмонд, Вирджиния.).

Вирус согласно настоящему изобретению можно доставлять диспергированным в растворителе, например, в форме раствора или суспензии, например, как было описано выше для парентеральных составов. Вирус может быть суспендирован в соответствующем физиологическом растворе, например, солевом растворе либо другом фармакологически приемлемом растворителе или буферном растворе. Известные в данной области техники буферные растворы могут содержать от 0,05 до 0,15 мг динатрия эдетата, от 8,0 до 9,0 мг NaCl, от 0,15 до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 до 0,30 мг безводной лимонной кислоты и от 0,45 до 0,55 мг натрия цитрата в 1 мл воды таким образом, чтобы достичь величины pH приблизительно от 4,0 до 5,0.

Составы терапевтических суспензий или растворов также могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества хорошо известны в данной области техники и включают буферы (например, цитратный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевину, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), EDTA, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерол. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или микросферы, разрушаемые биологическим способом.

Состав обычно предложен в по существу стерильной форме с использованием стерильного процесса производства.

Такой процесс может включать получение и стерилизацию путем фильтрации буферного растворителя/раствора, применяемого для состава, асептическую суспензию антитела в стерильном буферном растворе растворителя и помещение состава в стерильные резервуары способами, известными средним специалистам в данной области техники.

Состав для распыления согласно настоящему изобретению может быть предложен, например, в виде емкостей с однократной дозой (например, в запечатанных пластиковых контейнерах или ампулах), упакованных в пакеты из фольги. Каждая ампула содержит однократную дозу в объеме, например, в 2 мл, буферного растворителя/раствора

Настоящее изобретение также распространяется на жидкие растворы или суспензии, которые доставляют интраназально, например, с помощью устройства, как раскрыто в публикациях WO2009/068877 и US2004/0153033, обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Лечение

Согласно следующему аспекту настоящее изобретение распространяется на вирус или его состав, как описано в настоящем документе, для применения при лечении, в частности, для лечения рака.

Согласно одному варианту реализации способ лечения предназначен для применения при лечении опухоли.

Опухоль в настоящем документе обозначает абнормальную массу ткани, возникающую в результате избыточного деления клетки, которое не контролируется и прогрессирует, и также называется «новообразованием». Опухоли могут быть либо доброкачественными (нераковыми), либо злокачественными. В объем термина «опухоль» входят все формы рака и метастазов. Согласно одному варианту реализации опухоль является раковой.

Согласно одному варианту реализации опухоль представляет собой солидную опухоль. Солидная опухоль может быть локализованной или метастатической.

Согласно одному варианту реализации опухоль представляет собой опухоль эпителиального происхождения.

Согласно одному варианту реализации опухоль представляет собой злокачественное новообразование, такое как рак толстой и прямой кишок, гепатома, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак щитовидной железы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи или рак легких

Согласно одному варианту реализации опухоль представляет собой злокачественное новообразование толстой и прямой кишок.

Злокачественное новообразование в настоящем документе обозначает раковые клетки.

Согласно одному варианту реализации онколитический аденовирус применяют при лечении или предотвращении метастазов.

Согласно одному варианту реализации способ или состав в настоящем документе применяют при лечении устойчивых к лекарственным средствам типов рака.

Согласно одному варианту реализации вирус вводят в комбинации с введением дополнительного противоракового лечения или терапии.

Согласно одному варианту реализации предложен вирус или состав согласно настоящему изобретению для применения при получении лекарственного средства для лечения рака, например, рака, описанного выше.

Согласно следующему аспекту предложен способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества вируса или состава согласно настоящему изобретению пациенту, который нуждается в таком лечении, например, пациенту-человеку.

Согласно одному варианту реализации онколитический вирус или состав в настоящем документе вводят в комбинации с другой терапией.

Термин «в комбинации» в настоящем документе включает ситуации, когда онколитический вирус вводят до, одновременно и/или после лечения или терапии рака. Однако обычно режимы лечения для комбинированной терапии, как правило, перекрываются.

«Комбинированная терапия» в настоящем документе обозначает два лекарственных средства вместе, например, в виде набора, или совместно приготовленные в состав, в частности, для применения при лечении рака.

Противораковая терапия включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, терапию направленного действия и/или химиотерапию.

Лечение рака в настоящем документе обозначает лечение терапевтическим соединением или биологическим средством, например, антителом, предназначенным для лечения рака и/или его поддерживающей терапии.

Согласно одному варианту реализации лечение рака выбрано из любой другой противораковой терапии, включая химиотерапевтическое средство, противораковое средство направленного действия, такое как конъюгат антитело-лекарственное средство, лучевую терапию, радиоизотопную терапию или любую комбинацию перечисленных способов.

Согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему изобретению, такой как онколитический аденовирус, можно применять в качестве предварительного лечения перед терапией, такой как хирургическое вмешательство (неоадъювантная терапия), например, чтобы уменьшить опухоль, например, для лечения метастазов и/или предотвращения метастазов или дальнейших метастазов. Онколитический аденовирус можно применять после терапии, такой как хирургическое вмешательство (адъювантная терапия), например, для поддержания ремиссии рака, лечения метастазов и/или предотвращения метастазов или дальнейших метастазов.

Согласно одному варианту реализации вирус или состав согласно настоящему изобретению применяют в поддерживающей терапии.

«Одновременное» в настоящем документе представляет собой введение дополнительного лечения рака в то же время или приблизительно в то же время, в которое проводят введение состава, содержащего онколитический аденовирус. Данное лечение может содержаться в том же составе или вводиться в виде отдельного состава.

Согласно одному варианту реализации вирус вводят в комбинации с введением химиотерапевтического средства.

«Химиотерапевтическое средство» в настоящем документе обозначает специфические противоопухолевые химические средства или лекарственные средства, которые избирательно разрушают злокачественные клетки и ткани. Например, алкилирующие средства, антиметаболиты, антрациклины, алкалоиды растений, ингибиторы топоизомеразы и другие противоопухолевые средства. Примеры конкретных химиотерапевтических средств включают доксорубицин, 5-фторурацил (5-FU), паклитаксел, капецитабин, иринотекан и платины, такие как цисплатин и оксалиплатин. Дозу может выбрать практикующий врач в зависимости от природы рака, лечение которого проводят.

Согласно одному варианту реализации терапевтическое средство представляет собой ганцикловир, который может помочь контролировать иммунные ответы и/или васкуляризацию опухоли.

Согласно одному варианту реализации один или несколько вариантов терапии, применяемых в способе в настоящем документе, являются метрономными, то есть представляют собой непрерывное или частое лечение низкими дозами противораковых лекарственных средств, которые часто применяют одновременно с другими способами терапии.

Онколитические аденовирусы подгруппы B, в частности, Ad11 и полученные из него аденовирусы, такие как EnAd, могут быть в особенности синергичными с химиотерапевтическими средствами, так как представляется, что механизм действия данных вирусов в большей степени не зависит от апоптоза, и они уничтожают раковые клетки преимущественно посредством некролитического механизма. Более того, иммуносупрессия, которая происходит во время химиотерапии, может позволить онколитическому вирусу функционировать с большей эффективностью.

Терапевтическая доза в настоящем документе обозначает количество вируса, такого как онколитический аденовирус, которое подходит для достижения предполагаемого терапевтического эффекта при применении в подходящем режиме лечения, например, для облегчения симптомов или состояний заболевания, в частности, не вызывая дозолимитирующие эффекты. Дозу можно считать терапевтической дозой для лечения рака или метастазов, если количества вирусных частиц может быть достаточно для того, чтобы привести к следующим эффектам: рост опухоли или метастазов замедляется или останавливается либо обнаруживают уменьшение размера опухоли или метастазов, и/или

продлевается время жизни пациента. Подходящие терапевтические дозы, как правило, представляют собой равновесие между терапевтическим эффектом и переносимой токсичностью, например, когда побочный эффект и токсичность являются переносимыми при условии, что терапия приносит пользу.

Согласно одному варианту реализации предложено системное введение множества доз парентерального состава онколитического аденовируса согласно настоящему изобретению в одном цикле лечения, например, причем суммарная доза, доставляемая при каждом введении, находится в диапазоне от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на дозу.

Согласно одному варианту реализации одну или несколько доз (например, каждую дозу) вируса или композиции, содержащей вирус, вводят так, чтобы скорость доставки вирусных частиц находилась в диапазоне от 2×10^{10} частиц в минуту до 2×10^{12} частиц в минуту.

Согласно одному варианту реализации вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему изобретению (которая содержит состав, содержащий вирус) вводят еженедельно, например, в одну неделю 1 дозу вводят в дни 1, 3, 5, после чего вводят одну дозу каждую следующую неделю.

Согласно одному варианту реализации вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему изобретению (которая содержит состав, содержащий вирус) вводят два раза в неделю или три раза в неделю, например, вводят в неделю 1 в дни 1, 3 и 5, и в неделю 2 или 3 также вводят в дни 1, 3 и 5. Данный режим введения доз можно повторять много раз в соответствующих случаях.

Согласно одному варианту реализации вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему изобретению (которая содержит состав, содержащий вирус) вводят ежемесячно, например, в цикле лечения или в качестве поддерживающей терапии.

Согласно одному варианту реализации вирусы и конструкции согласно настоящему изобретению получены с помощью рекомбинантных методик. Специалист понимает, что готовый к использованию геном аденовируса можно получить с помощью других технических средств, включая полный синтез генома или плазмиды, содержащей часть всего генома. Специалист понимает, что в случае синтеза генома область вставки может не содержать нуклеотиды сайта рестрикции, поскольку последние являются артефактами после встраивания генов с применением способов клонирования.

Согласно одному варианту реализации готовый к использованию геном аденовируса получен полностью синтетическим способом.

Изобретение, описанное в настоящем документе, также распространяется на аденовирус согласно формуле (I) или ее подформуле, полученный или получаемый в результате встраивания трансгена или трансгенной кассеты.

«Представляет собой» в настоящем документе обозначает «содержащий».

В контексте настоящего описания термин «содержащий» следует понимать как «включающий».

Варианты реализации настоящего изобретения, включающие некоторые свойства/элементы, также распространяются на альтернативные варианты реализации, «состоящие» или «состоящие по существу» из соответствующих элементов/свойств.

Где это технически возможно, варианты реализации настоящего изобретения могут быть объединены.

Технические источники, такие как патенты и заявки, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Любые варианты реализации, конкретно и в явном виде приведенные в настоящем документе, могут послужить основанием для отказа сами по себе или в комбинации с одним или несколькими дополнительными вариантами реализации.

Заголовки используются в настоящем документе с целью разделения документа на разделы и не предназначены для использования с целью толкования смысла настоящего изобретения, предложенного в настоящем документе.

Настоящее изобретение также распространяется на любую последовательность вируса или последовательность кассеты, конкретно раскрытую в настоящем документе, композиции, содержащие указанные вирусы, применение указанных кассет для получения вирусов и применение вирусов согласно настоящему изобретению в терапии, в частности, противораковой терапии.

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявок GB1708779.2 и GB1708778.4, обе из которых были поданы 1 июня 2017 года. Содержание каждой из указанных заявок включено в настоящий документ посредством ссылки, в частности,

включены аминокислотные и полинуклеотидные последовательности, раскрытые в указанных заявках. Приоритетные документы могут быть использованы в качестве основания для корректировки настоящего описания.

Настоящее изобретение исключительно в качестве иллюстрации дополнительно описано в следующих примерах.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение вирусов EnAd, экспрессирующих моноклональные антитела против CD40 (NG-350).

Первый полученный геном вируса энаденотуцирев, кодирующего моноклональные антитела против CD40, был обозначен NG-350 (SEQ ID NO. 13).

Для получения генома NG-350 плазмиду, pNG-350, получали путем прямой вставки кассеты, кодирующей: 5'-короткую последовательность акцептора сплайсинга (CAGG, SEQ ID NO.2); лидерную последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO. 3), цепь VH антитела против CD40 (SEQ ID NO. 4), константную область тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO. 5), высокоэффективный саморасщепляющийся пептид P2A (SEQ ID NO. 6), лидерную последовательность легкой цепи (SEQ ID NO. 7), цепь VL антитела против CD40 (SEQ ID NO. 8), константную область легкой цепи антитела (SEQ ID NO. 9) и поли(A)-«хвост» SV40 (SEQ ID NO.10), в плазмиду pEnAd2.4. Схема трансгенной кассеты (SEQ ID NO. 11) представлена на Фигуре 1.

Получение вируса и изучение его характеристик

Плазмиду pNG-350 линеаризовали с помощью рестрикционного расщепления ферментом AscI для получения генома вируса NG-350 (SEQ ID NO. 1). Вирус NG-350 амплифицировали и очищали согласно методам, представленным ниже.

Расщепленную ДНК очищали с помощью экстракции фенолом/хлороформом и преципитировали в течение 16 ч, -20^{0}C в 300 мкл >95% этанола степени чистоты «для молекулярной биологии» и 10 мкл 3 М ацетата натрия. Преципитированную ДНК осаждали центрифугированием при 14000 об./мин., 5 мин. и промывали в 500 мкл 70% этанола, после чего вновь центрифугировали при 14000 об./мин., 5 мин. Чистый осадок ДНК высушивали на воздухе, ресуспендировали в 500 мкл среды OptiMEM, содержащей 15 мкл реактива для

трансфекции липофектамина, и инкубировали в течение 30 мин. при к.т. (комнатной температуре). Затем трансфекционную смесь добавляли по каплям в колбу Т-25, содержащую клетки 293, выращенные до конфлюэнтности 70%. После инкубации клеток с трансфекционной смесью в течение 2 ч при температуре 37^0C, 5% CO_2 к клеткам добавляли 4 мл среды для клеток (DMEM с высоким содержанием глюкозы и глутамином с добавлением 2% ЭБС, эмбриональной бычьей сыворотки), и колбы инкубировали при температуре 37^0C, 5% CO_2.

За трансфицированными клетками 293 наблюдали каждые 24 ч и каждые 48 – 72 ч добавляли дополнительную среду. Получение вируса контролировали путем обнаружения значительного цитопатического эффекта (ЦПЭ) в монослое клеток. После того как наблюдался обширный ЦПЭ, вирус собирали из клеток 293 в ходе трех циклов замораживания-оттаивания. Собранные вирусы применяли для повторного инфицирования клеток 293 для амплификации базового материала вируса. Наработку жизнеспособного вируса в течение амплификации подтверждали обнаружением значительного ЦПЭ в монослое клеток. После того как наблюдался ЦПЭ, вирус собирали из клеток 293 в ходе трех циклов замораживания-оттаивания. Амплифицированный базовый материал применяли для последующей амплификации, после чего вирус очищали с помощью двойного связывания с хлоридом цезия для получения базового материала вируса NG-350.

Пример 2: Активность вируса NG-350 и получение антитела против CD40

Активность вируса NG-350, выраженную в выходе частиц, и продукцию секретированного антитела против CD40 оценивали на линии клеток суспензионной культуры HEK293. Клетки HEK293 высевали во встряхиваемые колбы при плотности 1 x 10^6 в.ч./мл и инфицировали 50 вирусными частицами NG-350 на клетку (ч./кл.). Клетки HEK293 также инфицировали родительским вирусом NG-350, энаденотуцировом (EnAd), в качестве контроля (50 ч./кл.). Через 48 и 72 ч после инфекции супернатанты клеток собирали центрифугированием в течение 5 мин., 1200 об./мин. Образцы осветленного супернатанта применяли для оценки концентрации вирусных частиц методом ВЭЖХ или концентрации антитела против CD40 методом ELISA с IgG2 человека.

Анализ ВЭЖХ

Концентрацию вирусных частиц в супернатантах количественно определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением колонки

Resource Q (анионообменной). Элюирование вируса обнаруживали при 260 нм, и концентрацию вируса определяли путем интегрирования сигналов пиков при 260 нм и вычисления концентрации с помощью калибровочной кривой энаденотуцирева. Сравнение продукции вируса из клеток с NG-350 и энаденотуциревом продемонстрировало, что активность вируса NG-350, выраженная в суммарной продукции частиц и продукции частиц вируса в супернатанте клеток, была значительно ниже, чем энаденотуцирева (Фигуры 2A и 2B).

ELISA с IgG2

Осветленные супернатанты разводили в соотношении 1 к 2 в ФБР (фосфатном буферном растворе) с 10% БСА (бычьим сывороточным альбумином). Калибровочную кривую и образцы отрицательного контроля готовили согласно протоколу производителя (набор IgG2 Human SimpleStep ELISA Kit, ab202402, Abcam). Образцы и стандарты для построения калибровочной кривой добавляли на планшеты для ELISA и проводили анализ согласно протоколу производителя. Поглощение при 450 нм в каждой лунке планшета измеряли с помощью считывающего устройства для планшетов (BioTek), и концентрации секретированного антитела IgG2 против CD40 определяли путем интерполяции по калибровочной кривой (Фигура 2C). Антитело против CD40 продуцировалось и секретировалось из клеток, инфицированных NG-350, но не энаденотуциревом.

Взятые вместе, полученные данные свидетельствуют, что, несмотря на то, что NG-350 был способен продуцировать антитело против CD40, вирусная активность данного модифицированного вируса была в значительной степени нарушена. Вследствие этого проводили получение дополнительных характеристик вирусных частиц NG-350 (пример 3).

Пример 3: Исследование подлинности и анализ генома вируса NG-350

Анализ с помощью рестрикционных ферментов

Сначала подлинность базового материала вируса NG-350 исследовали путем анализа подлинности генома в анализе с помощью рестрикционных ферментов. Вирусные частицы NG-350 или энаденотуцирева (3,5 x 10^{11} в.ч.) разводили в ФБР до конечного объема 200 мкл. ДНК выделяли из вируса с применением набора QIAgen Minelute Virus Spin Kit согласно протоколу производителя. Контрольную ДНК готовили для анализа путем линеаризации плазмиды pNG-350 ферментом AscI в течение 2 ч, 37°C, а затем очищали

ДНК методом электрофореза в агарозном геле и выделяли из геля с помощью набора для выделения из геля QiaQuick (Qiagen). Очищенную контрольную ДНК или ДНК NG-350 расщепляли рестрикционным способом с применением комбинации рестрикционных ферментов, EcoRv/NheI (Фигура 3A) или отдельных рестрикционных ферментов, NcoI или FspI (Фигура 3B). Расщепленную ДНК разделяли методом электрофореза в агарозном геле и визуализировали с применением прибора для УФ-просвечивания. Расщепление с помощью FspI или EcoRV/NheI продемонстрировало дополнительную полосу в материале генома вируса NG-350, которая не была прогнозирована (Фигура 3, красные стрелки).

Анализ методом ПЦР

Затем подлинность генома оценивали с помощью анализа генома вируса методом ПЦР с применением 8 различных наборов праймеров-зондов, представленных в таблице **1:**

Набор праймеров	Прямой праймер	Обратный праймер
D	ACGGAACTTGTTACTACACAGC	CTTTCACAGTCCAACTGCTGC
1	AGCCGGAGAACAACTACAAGAC	CTTTCACAGTCCAACTGCTGC
2	CATCCAGATGACCCAGTCTCC	GGACAAACCACAACTAGAATGCAG
3	CATCCAGATGACCCAGTCTCC	CTTTCACAGTCCAACTGCTGC
4	AGCCGGAGAACAACTACAAGAC	GGACAAACCACAACTAGAATGCAG
5	CCTCAGTGAAGGTCTCCTGC	CTTTCACAGTCCAACTGCTGC
6	CCTCAGTGAAGGTCTCCTGC	GGACAAACCACAACTAGAATGCAG

Данные анализы ПЦР разрабатывали для определения того, присутствовал ли в базовом материале вируса геном более одного вида NG-350, и содержали ли данные виды трансгенную кассету антитела против CD40. Вирусные частицы NG-350 или энаденотуцирева (2 x 10^{10} в.ч.) разводили в ФБР до конечного объема 200 мкл. ДНК выделяли из вируса с применением набора QIAgen Minelute Virus Spin Kit согласно протоколу производителя. Контрольную ДНК готовили, как для анализа с помощью рестрикционных ферментов. Реакции ПЦР проводили с применением 1 мкл ДНК (100 нг/мкл) в объеме реакции 50 мкл, содержащем прямой и обратный праймер (2 мкМ) и мастер-микс высокой точности Phusion (NEB). Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в агарозном геле и визуализировали с применением прибора для УФ-просвечивания (Фигура 5A и 5B). Анализ с помощью набора праймеров D позволил выявить полосу ожидаемого размера 2920 п.о. в ДНК положительного контроля и в исследуемом образце NG-350. Однако исследуемый образец NG-350 дополнительно содержал второй продукт ПЦР размером ~800 п.о., который не наблюдался в ДНК плазмиды pNG-350-PSI-01, применявшейся для получения вируса NG-350. Анализ с помощью наборов праймеров 1 – 6 также продемонстрировал дополнительные контаминирующие полосы при применении наборов праймеров 5 и 6. Полученные данные свидетельствуют, что в базовом материале вируса NG-350 присутствовали два вида вируса, один из которых содержал полноразмерную трансгенную кассету против CD40, а второй содержал усеченную версию кассеты. Данное усечение подтверждали путем секвенирования контаминирующего продукта ПЦР.

Оптимизация трансгенной кассеты

Объяснением усечения, возникшего при амплификации вируса, была неожиданная нестабильность в трансгенной кассете, которая привела к рекомбинации между областью VH и полиA SV40 и, как следствие, – к утрате большей части кодирующей области антитела. Вследствие этого последовательность ДНК трансгенной кассеты необходимо было модифицировать для преодоления данной проблемы. По этой причине последовательность ДНК изменили, чтобы снизить гомологию с другими последовательностями кассеты и вируса, а также удалить минорные прямые и инвертированные повторы (данную процедуру проводила компания Oxford Genetics, Великобритания). Оптимизированную последовательность кассеты применяли для получения новой плазмиды pNG-350A согласно примеру 4.

Пример 4: Получение вирусов EnAd, экспрессирующих моноклональное антитело против CD40 (NG-350A)

Для получения генома NG-350A плазмиду, pNG-350A, получали путем прямой вставки кассеты, кодирующей: 5'-короткую последовательность акцептора сплайсинга (CAGG, SEQ ID NO.2); лидерную последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO. 3), цепь VH антитела против CD40 (SEQ ID NO. 4), константную область тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO. 5), высокоэффективный саморасщепляющийся пептид P2A (SEQ ID NO. 6), лидерную последовательность легкой цепи (SEQ ID NO. 7), цепь VL антитела против CD40 (SEQ ID NO. 8), константную область легкой цепи антитела (SEQ ID NO. 9) и поли(A)-«хвост» SV40 (SEQ ID NO.10), в плазмиду pEnAd2.4. Аминокислотная последовательность кодируемого NG-350A антитела против CD40 была идентична таковой, кодируемой в вирусе NG-350, и структура кассеты была идентичной (Фигура 1). Однако последовательность нуклеиновой кислоты трансгенной кассеты была модифицирована и в значительной степени отличалась от таковой NG-350 (SEQ ID NO.11).

Получение вируса и изучение его характеристик

Плазмиду pNG-350A линеаризовали с помощью рестрикционного расщепления ферментом AscI для получения генома вируса NG-350A (SEQ ID NO. 1). Вирус NG-350A амплифицировали и очищали согласно методам, описанным в примере 1.

Пример 5: Исследование подлинности вируса NG-350A методом ПЦР

Подлинность генома NG-350A подтверждали в анализе методом ПЦР с применением 2 наборов праймеров-зондов (таблица 2; D и K), которые позволили получить продукты, охватывающие трансгенную кассету. ДНК NG-350A и контрольную ДНК готовили согласно методам, подробно описанным в примере 3. Анализ методом ПЦР проводили с применением набора праймеров D и K согласно методам, подробно описанным в примере 3. Визуализация продуктов ПЦР продемонстрировала единичные продукты прогнозируемого размера (Фигура 6). Контаминирующие продукты не были обнаружены ни с одним из наборов праймеров.

Таблица 2. Наборы праймеров ПЦР для определения подлинности

Набор праймеров	Прямой праймер	Обратный праймер

D	ACGGAACTTGTTACTACACAGC	CTTTCACAGTCCAACTGCTGC
K	AGCCGGAGAACAACTACAAGAC	CTTTCACAGTCCAACTGCTGC

Пример 6: Репликация и онколитическая активность вируса NG-350A на клетках карциномы толстой кишки

Онколитическая активность вируса

Клетки карциномы толстой кишки HT-29 высевали на 96-луночных планшетах при плотности клеток 2,5e^4 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 ч, 37^{0}C, 5% CO_2, после чего клетки инфицировали вирусными частицами EnAd или NG-350A в диапазоне плотности инфекции 100 - 0,39 частиц на клетку (ч./кл.). Жизнеспособность клеток HT-29 оценивали с применением реактива Cell Titre 96 MTS (Promega: G3581) через 72 ч после инфекции. Количественное определение % выживаемости клеток при каждой плотности инфекции продемонстрировало, что, подобно EnAd, NG-350A демонстрировал мощную онколитическую активность в отношении клеток HT-29 (Фигура 7A).

Репликация вируса

Клетки карциномы легких (A549) или клетки карциномы толстой кишки (HCT-116) инфицировали в течение 24, 48, 72 или 96 ч 100 ч./кл. NG-350A или родительского вируса NG-350A, энаденотуцирева, либо оставляли неинфицированными. Клетки карциномы толстой кишки (HT-29) или клетки карциномы мочевого пузыря (HTB-5, HT-1197 и HT-1376) инфицировали в течение 24, 48, 72, 144 и 168 ч 100ч./кл. NG-350A или энаденотуцирева либо оставляли неинфицированными. В каждую временную точку супернатанты клеток собирали и осветляли центрифугированием в течение 5 мин., 1200 об./мин. ДНК выделяли из 10 мкл (HT-29, A549 или HCT-116) или 50 мкл (HTB-5, HT-1197 и HT-1376) супернатанта с применением набора DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) согласно протоколу производителя. Также готовили калибровочную кривую с применением вирусных частиц EnAd (2,5e^{10} – 2,5e^5 в.ч.) и выделяли с применением набора DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Каждый выделенный образец или стандарт для построения калибровочной кривой анализировали методом кПЦР с применением набора праймеров-зондов, специфичных к гену E3 энаденотуцирева.

Количественное определение числа обнаруженных геномов вируса на клетку продемонстрировало, что кинетика репликации вируса NG-350A и энаденотуцирева была

сопоставимой во всех исследованных линиях клеток и во всех проанализированных временных точках (Фигура 7 и Фигура 8). Геномы вируса не были обнаружены в неинфицированных клетках (данные не показаны).

Пример 7: Экспрессия антитела против CD40 в инфицированных NG-350A линиях клеток карциномы толстой кишки

ELISA с IgG2

Клетки A549, которые инфицировали в течение 24, 48 или 72 ч 100 ч./кл. EnAd, двумя различными партиями NG-350A (NG-350A B1 или NG-350A B2) или оставляли неинфицированными, применяли для анализа экспрессии антитела против CD40 методом ELISA с IgG2 (набор IgG2 Human SimpleStep ELISA Kit, ab202402, Abcam). Супернатанты культуры отбирали из каждой лунки и центрифугировали в течение 5 мин., 1200 об./мин. для удаления дебриса клеток. Осветленные супернатанты разводили в соотношении 1 к 2 в ФБР с 10% БСА. Калибровочную кривую и образцы отрицательного контроля готовили согласно протоколу производителя. Образцы и стандарты для построения калибровочной кривой добавляли на планшеты для ELISA и проводили анализ согласно протоколу производителя. Поглощение при 450 нм в каждой лунке планшета измеряли с помощью считывающего устройства для планшетов (BioTek), и концентрации секретированного антитела IgG2 против CD40 определяли путем интерполяции по калибровочной кривой (Фигура 9A и 9B).

Анализ связывания CD40 методом ELISA

Клетки A549, которые инфицировали в течение 24, 48 или 72 ч 100 ч./кл. EnAd, двумя различными партиями NG-350A (NG-350A B1 или NG-350A B2) или оставляли неинфицированными, применяли для анализа экспрессии антитела против CD40 с помощью анализа связывания CD40 методом ELISA.

Супернатанты культуры отбирали из каждой лунки и центрифугировали в течение 5 мин., 1200 об./мин. для удаления дебриса клеток. Планшеты для ELISA (96-лучночные микропланшеты A Nunc Immuno MaxiSorp) готовили путем сенсибилизации в течение ночи при температуре 4^{0}C CD40 человека (100 мкг/мл, R and D Systems, 1493-CD) в карбонатном/бикарбонатном буфере. Планшеты промывали между всеми последующими этапами связывания ФБР с 0,05% Твин 20. Планшеты блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре ФБР с 5% БСА.

Осветленные супернатанты после инфицирования разводили в ФБР с 5% БСА (в соотношении 1 к 2, 1 к 10 и 1 к 100). В данном анализе в качестве положительного контроля связывания CD40 человека с планшетом для ELISA использовали антитело против CD40 (BioLegend, 334308). Данное антитело готовили в ФБР с 5% БСА в концентрации 30 нг/мл. Все образцы вносили на сенсибилизированные CD40 планшеты и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем во все лунки наносили детектирующие антитела: конъюгированное с ПХ (пероксидазой хрена) антитело против IgG2-Fc человека (Abcam, ab97225) в случае супернатантов вируса либо АТ против IgG мыши (ПХ) (Abcam, ab6728) в случае антитела положительного контроля, в течение 1 ч при комнатной температуре. Обнаружение ПХ проводили с помощью раствора субстрата ПХ 3,3,5,5'-тетраметилэтилендиамина (TMB, Thermo-Fisher). Для остановки реакции использовали 1 M HCl, и развившуюся окраску измеряли при 450 нм на считывающем устройстве для планшетов. Поглощение при 450 нм откладывали на графике для EnAd, NG-350A и положительных контролей (Фигура 9C); было продемонстрировано специфичное связывание с CD40 секретированного антитела против CD40, которое присутствовало в супернатанте клеток, инфицированных NG-350A.

Пример 8: Репортерный анализ функциональной передачи сигналов CD40

Клетки A549, которые инфицировали в течение 24 или 48 ч 10 ч./кл. EnAd, NG-350A или в течение 48 ч NG-165 (вирусом, экспрессирующим контрольное антитело [против ФРЭС, фактора роста сосудистого эндотелия]) или оставляли неинфицированными, использовали для анализа функциональной активности антитела против CD40 с применением репортерных клеток CD40+ HEK-Blue, которые секретируют щелочную фосфатазу (Invivogen) в ответ на активацию посредством молекул CD40, экспрессированных на их мембране. После инфекции супернатанты культуры от клеток A549 отбирали из каждой лунки и центрифугировали в течение 5 мин., 1500 об./мин. для удаления дебриса клеток.

20 мкл супернатантов культуры разводили в 180 мкл культуральной среды и наносили на клетки Hek-Blue CD40 в течение 20 ч. В качестве положительного контроля готовили CD40L в концентрации 10 нг/мл в культуральной среде. Затем супернатанты от клеток HEK-Blue CD40 отбирали и осветляли центрифугированием. 40 мкл осветленного супернатанта анализировали в отношении активности щелочной фосфатазы путем инкубации в течение 1 ч при температуре 37 градусов с 160 мкл реактива Quanti-Blue.

Измеряли поглощение каждого образца при 620 нм с применением считывающего устройства для планшетов; было продемонстрировано, что супернатанты от клеток, инфицированных NG-350A, но не EnAd или NG-165, запускали продукцию SEAP в репортерных клетках HEK-Blue, экспрессирующих CD40 (Фиг. 10).

Пример 9: Селективная активность вируса NG-350A на линиях клеток карциномы

Клетки карциномы легких (A549), клетки карциномы толстой кишки (HCT-116) или клетки фибробластов легких (MRC-5), которые являются полупермиссивными в отношении активности вируса EnAd, применяли для демонстрации селективности вируса NG-350A в отношении раковых клеток. Линии клеток инфицировали в течение 72 ч 100 ч./кл. NG-350A или родительского вируса NG-350A, энаденотуцирева, либо оставляли неинфицированными.

В каждую временную точку супернатант культуры отбирали из каждой лунки и использовали для анализа репликации генома вируса методом кПЦР или экспрессии антитела против CD40 методом ELISA. Клетки, оставшиеся в лунке, анализировали в отношении экспрессии гена E3 вируса и трансгена методом ОТ-кПЦР (кПЦР с обратной транскрипцией).

Репликация вируса

Супернатанты клеток собирали и осветляли центрифугированием в течение 5 мин., 1200 об./мин. ДНК выделяли из 10 мкл (A549, HCT-116) или 100 мкл (MRC-5) супернатанта с применением набора для выделения ДНК Sigma Genelute согласно протоколу производителя. Также готовили и выделяли образцы для построения калибровочной кривой с применением вирусных частиц EnAd (2,5 e^{10} – 2,5 e^{5} в.ч.) с помощью набора Sigma Genelute. Каждый выделенный образец или стандарт для построения калибровочной кривой анализировали методом кПЦР с применением набора праймеров-зондов, специфичных к гену E3 энаденотуцирева.

Количественное определение числа обнаруженных геномов вируса на клетку продемонстрировало, что репликация вируса NG-350A и энаденотуцирева была обнаруживаемой на сравнимых уровнях в клетках A549 и HCT-116, но экспрессия в MRC-5 была значительно ниже, чем в линиях клеток карциномы (Фигура 11A). Геномы вируса не были обнаружены в неинфицированных клетках (данные не показаны).

Экспрессия антитела IgG2

Экспрессию антитела в супернатантах клеток оценивали методом ELISA с IgG2 (набор IgG2 Human SimpleStep ELISA Kit, ab202402, Abcam). Супернатанты культуры отбирали из каждой лунки и центрифугировали в течение 5 мин., 1200 об./мин. для удаления дебриса клеток. Осветленные супернатанты разводили в соотношении 1 к 2 в ФБР с 10% БСА. Калибровочную кривую и образцы отрицательного контроля готовили согласно протоколу производителя. Образцы и стандарты для построения калибровочной кривой добавляли на планшеты для ELISA и проводили анализ согласно протоколу производителя. Поглощение при 450 нм в каждой лунке планшета измеряли с помощью считывающего устройства для планшетов (BioTek), и концентрации секретированного антитела IgG2 против CD40 определяли путем интерполяции по калибровочной кривой (Фигура 11B).

Пример 10: Очистка антитела против CD40 из клеток, инфицированных NG-350A

Суспензию клеток HEK293 высевали в концентрации 1 x 10^6 клеток/мл в колбах Erlenmeyer и инфицировали 100 ч./кл. NG-350A. Через 72 ч к клеткам добавляли 5% ЭБС и коктейль ингибиторов протеаз (1:2000), и суспензию центрифугировали в течение 15 минут, 4600 об./мин. Супернатант аккуратно отбирали и фильтровали через мембрану из полых волокон с границей отсечения по молекулярной массе 500 кДа для отделения вирусных частиц NG-350A от антитела против CD40. Фильтрат после этапа фильтрации, который содержал антитело против CD40, пропускали через вторую мембрану из полых волокон с границей отсечения по молекулярной массе 30 кДа. Антитело против CD40 очищали из концентрата после второго этапа фильтрации на колонке с белком A с применением системы AKTA. Очищенное антитело стерилизовали путем фильтрации и хранили при температуре -80°C. Концентрацию очищенного антитела определяли методом ELISA с IgG2 с применением набора IgG2 Human SimpleStep ELISA Kit, ab202402, Abcam согласно протоколу производителя (Фигура 12).

Пример 11: Активность полученного из NG-350A антитела против CD40 и синергия с активностью вируса на первичных ДК (дендритных клетках) моноцитарного происхождения человека

МКПК (мононуклеарные клетки периферической крови) выделяли с помощью градиентного центрифугирования в фиколл-паке из конусов лейкоцитов NC24, полученных от Подразделения крови и трансплантации Национальной службы здравоохранения (NHS Blood and Transplant unit) в Оксфорде, Великобритания. CD14+ моноциты выделяли с применением набора CD14 MicroBeads kit (MiltenyiBiotec). Затем

моноциты подсчитывали, центрифугировали (300xg) и ресуспендировали в концентрации 5 x 10^5 клеток/мл в 10% культуральной среде RPMI с добавлением ГМ-КСФ (800 Ед./мл) и ИЛ-4 (500 Ед./мл). 40 мл суспензии моноцитов переносили в одну колбу T175.

Через 72 ч культивирования ДК моноцитарного происхождения (ДКмп) высевали при плотности 1 x 10^6 клеток на лунку в 24-луночных планшетах в 10% культуральной среде RPMI. Клетки обрабатывали 0,5 мкг/мл антитела против CD40 (очищенного из инфицированных вирусом клеток согласно примеру 10), EnAd (100 ч./кл.), CD40L человека или оставляли необработанными. Параллельно ДКмп обрабатывали очищенным антителом против CD40 (0,5 мкг/мл) и EnAd (100 ч./кл.). Затем планшеты инкубировали в течение 48 ч, после чего супернатант и клетки собирали.

Супернатанты и клетки отбирали из культуральных лунок и центрифугировали (300xg). Супернатант разводили в соотношении 1 к 2 в ФБР с 5% БСА и хранили для анализа методом ELISA. Осадки клеток промывали в 200 мкл ФБР, центрифугировали, затем ресуспендировали в 50 мкл ФБР, содержащего реактив LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (Life tech), в течение 15 минут при к.т. Клетки промывали один раз в буфере для FACs (1% ЭБС/ФБР), после чего окрашивали панелью напрямую конъюгированных антител: антителом против CD86, конъюгированным с BV421; антителом против CD54, конъюгированным с AF647, и антителом против HLA-DR, конъюгированным с PeCy5. Образец клеток от каждых условий кокультивирования также окрашивали соответствующими антителами изотипического контроля. Все окрашивания проводили в буфере для FACs в суммарном объеме 50 мкл/лунку в течение 15 минут, 4°C. Затем клетки дважды промывали буфером для FACs (200 мкл), после чего ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACs и анализировали методом проточной цитометрии (Attune).

Образцы супернатанта оттаивали и анализировали методом ELISA (IL-12 Quantikine ELISA, DP400, R и D systems) путем разведения и проведения анализа согласно протоколу производителя.

Обработка антителом против CD40, очищенным из инфицированных вирусом клеток, привела к увеличению процента ДКмп, экспрессирующих маркеры активации CD86, CD54 и HLA-DR, и к секреции ИЛ-12 p40 (Фигура 13 и Фигура 14). Комбинированная обработка ДКмп антителом против CD40 и вирусом EnAd привела к в значительной степени более мощной активации ДКмп по сравнению с обработкой АТ против CD40 или вирусом EnAd самими по себе.

Пример 12: Активность полученного из NG-350A антитела против CD40 и синергия с активностью вируса на первичных B-клетках человека

МКПК выделяли с помощью градиентного центрифугирования в фиколл-паке из конусов лейкоцитов NC24, полученных от Подразделения крови и трансплантации Национальной службы здравоохранения в Оксфорде, Великобритания. $CD19^+$ B-клетки выделяли с применением набора Pan B Cell Isolation Kit (MiltenyiBiotec). Затем B-клетки высевали при плотности 1 x 10^6 клеток на лунку в 24-луночных планшетах в 10% культуральной среде RPMI. Клетки обрабатывали увеличивающимися концентрациями очищенных трансгенных АТ против CD40, CD40L человека или оставляли необработанными. Затем планшеты инкубировали в течение 48 ч, после чего супернатант и клетки собирали.

Супернатанты и клетки отбирали из культуральных лунок и центрифугировали (300xg). Супернатант аккуратно отбирали, разводили в соотношении 1 к 2 в ФБР с 5% БСА и хранили для анализа методом ELISA. Осадки клеток промывали в 200 мкл ФБР, центрифугировали, затем ресуспендировали в 50 мкл ФБР, содержащего реактив LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (Life tech), в течение 15 минут при к.т. Клетки промывали один раз буфером для FACs, после чего окрашивали панелью напрямую конъюгированных антител: антителом против CD86, конъюгированным с BV421; антителом против CD54, конъюгированным с AF647; антителом против HLA-DR, конъюгированным с PeCy5, и антителом против CD80, конъюгированным с BV605. Образец клеток от каждого условия кокультивирования также окрашивали соответствующими антителами изотипического контроля. Все окрашивания проводили в буфере для FACs в суммарном объеме 50 мкл/лунку в течение 15 минут, 4°C. Затем клетки дважды промывали буфером для FACs (200 мкл), после чего ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACs и анализировали методом проточной цитометрии (Attune).

Обработка B-клеток антителом против CD40 во всех исследованных концентрациях привела к активации B-клеток, выраженной в увеличении процента B-клеток, экспрессирующих CD86, CD19 и CD80, и увеличении СИФ (средней интенсивности флуоресценции) HLA-DR на CD19+ клетках, по сравнению с необработанными B-клетками или B-клетками, обработанными изотипическим контролем (Фигура 15). Обработка антителом против CD40 также привела к активации B-клеток, выраженной в увеличении процента пролиферирующих клеток (Фигура 16). В значительной степени комбинация обработки B-клеток антителом против CD40 и вирусом EnAd привела к

увеличению % пролиферирующих В-клеток по сравнению с обработкой антителом или вирусом самими по себе (Фигура 16).

Пример 13: Активность полученного из NG-350A антитела против CD40 в отношение ДК моноцитарного происхождения человека

Опухолевые клетки A549 высевали в колбах T175 или колбах Hyperflask при плотности, соответственно, 10 x 10^6 или 50 x 10^6 клеток на колбу. Через 4 ч клетки инфицировали 10 вирусными частицами EnAd или NG-350A на клетку. Через 72 ч супернатанты собирали и обедняли вирусом с применением колонок для эксклюзионной хроматографии с границей отсечения 300 кДа. Затем обедненные вирусом супернатанты обогащали антителами с применением колонок для эксклюзионной хроматографии с границей отсечения 50 кДа. Данные обедненные вирусом обогащенные АТ фракции хранили при температуре -80°C. Титр АТ против CD40 определяли с применением ELISA с IgG2, и функциональность подтверждали с применением анализа на репортерных клетках HEK Blue, описанного в примере 8.

Дендритные клетки моноцитарного происхождения (ДКмп) для следующей группы исследований готовили по существу так же, как описано в примере 11. МКПК (донор 177) выделяли с помощью градиентного центрифугирования в фиколл-паке из конусов лейкоцитов NC24, полученных от Подразделения крови и трансплантации Национальной службы здравоохранения в Оксфорде, Великобритания. $CD14^+$ моноциты выделяли с применением набора CD14 MicroBeads kit (MiltenyiBiotec). Через 72 ч культивирования с ГМ-КСФ и ИЛ-4 ДКмп высевали при плотности 1,25 x 10^5 клеток на лунку в 48-луночных планшетах или 2,5 x 10^5 клеток на лунку в 24-луночных планшетах в 10% культуральной среде RPMI и инкубировали с супернатантами культуры, обедненными вирусом NG-350A или EnAd, описанными в разделе выше. Клетки окрашивали для анализа методом проточной цитометрии. Супернатанты применяли для анализа цитокинов с помощью панелей цитокиновых гранул (Legendplex, BioLegend).

Чтобы продемонстрировать связывание АТ против CD40 с CD40 на поверхности ДКмп, клетки обрабатывали увеличивающимися концентрациями обедненного вирусом, обогащенного АТ против CD40 супернатанта от клеток, инфицированных NG-350A (использовали различные разведения для обеспечения различных количеств антитела), или оставляли необработанными (среда). В качестве контроля, клетки также обрабатывали супернатантом, обедненным вирусом EnAd (dEnAd), в объемах, соответствующих таковым

для образцов, содержащих АТ против CD40 из NG-350A. Через 24 ч и 48 ч клетки собирали и окрашивали меченными флуоресцентной меткой антителами против CD40, после чего проводили анализ методом проточной цитометрии. Клетки сортировали на единичные (FSC (forward light scattering, прямое светорассеяние)-H по сравнению с FSC-A) живые клетки (отрицательные при окрашивании реактивом LIVE/DEAD® Fixable Aqua). На **Фигуре 17A** представлены репрезентативные результаты проточной цитометрии, полученные через 24 ч после обработки 1000 нг/мл АТ, на **Фигуре 17B** представлена экспрессия CD40 на ДКмп через 24 ч и 48 ч после обработки различными концентрациями обедненных вирусом супернатантов. При более высоких концентрациях антитела окрашивание CD40 методом FACS было снижено или отсутствовало, что отражает блокаду в результате связывания антитела против CD40 в супернатантах культуры, обедненных вирусом NG-350A.

Затем оценивали эффект обработки ТГ (трансгенным) АТ против CD40 (с применением обедненных вирусом супернатантов) в отношении повышающей регуляции маркера поверхности клетки на ДКмп. ДКмп обрабатывали увеличивающимися концентрациями очищенных ТГ АТ против CD40 или оставляли необработанными (среда). Клетки также обрабатывали супернатантом, обедненным вирусом EnAd (dEnAd), в объемах, соответствующих таковым для CD40. Через 24 ч и 48 ч клетки собирали и окрашивали антителами против маркеров поверхности CD54, CD83 и CD86, после чего проводили анализ методом проточной цитометрии. Клетки сортировали на единичные (FSC-H по сравнению с FSC-A) живые клетки (отрицательные при окрашивании реактивом LIVE/DEAD® Fixable Aqua). Репрезентативные результаты проточной цитометрии, полученные через 24 ч после обработки 1000 нг/мл АТ, представлены на Фигуре **18A** для ДКмп, полученных из МКПК от донора 177. На **Фигуре 18B** представлена экспрессия маркера активации на ДКмп от 4 различных доноров через 24 ч и 48 ч после обработки.

Затем оценивали эффекты ТГ АТ против CD40 в отношении продукции цитокинов ДКмп. ДКмп от четырех различных доноров обрабатывали увеличивающимися концентрациями обедненного вирусом супернатанта, содержащего АТ против CD40, или оставляли необработанными (среда). Клетки также обрабатывали обедненным вирусом EnAd супернатантом (dEnAd) в объемах, соответствующих таковым для CD40. Через 24 ч и 48 ч супернатанты собирали и анализировали в отношении секреции воспалительных цитокинов с применением иммуноанализа на основе гранул LEGENDplex™ (BioLegend). На **Фигуре 19** представлена селективная индукция ФНО□, ИЛ-6 и ИЛ-8.

Пример 14: Активность вируса NG-350A и супернатантов инфицированных вирусом опухолевых клеток, содержащих полученное из вируса антитело против CD40, в отношении активности первичных ДК моноцитарного происхождения человека

В исследовании, подобном исследованию, описанному в примере 13, клетки A549 высевали в колбах T25 при плотности 4 x 10^6 клеток. Через 4 ч клетки инфицировали 10 вирусными частицами EnAd или NG-350A на клетку. Через 72 ч супернатанты собирали и центрифугировали при 1600 об./мин. в течение 5 минут. В данном исследовании данные осветленные супернатанты хранили при температуре 37°C до использования (в течение 1 ч) вместо удаления вируса. Таким образом, супернатанты содержали продукты опухолевых клеток, инфицированных NG-350A (или контролем – EnAd), включая продукты вируса и трансгена антитела против CD40.

МКПК выделяли с помощью градиентного центрифугирования в фиколл-паке из конусов лейкоцитов NC24, полученных от Подразделения крови и трансплантации Национальной службы здравоохранения в Оксфорде, Великобритания. $CD14^+$ моноциты выделяли с применением набора CD14 MicroBeads kit (MiltenyiBiotec). Через 72 ч культивирования с ГМ-КСФ и ИЛ-4 ДКмп высевали при плотности 1,25 x 10^5 клеток на лунку в 48-луночных планшетах и обрабатывали супернатантами с вирусом EnAd и NG-350A при различных разведениях. Затем планшеты инкубировали в течение 24 ч и 48 ч, после чего супернатант и клетки собирали. Супернатанты центрифугировали, отделяли от осадка клеток и хранили при температуре -80°C. Клетки окрашивали для анализа методом проточной цитометрии. Супернатанты применяли для анализа цитокинов методом CBA.

Чтобы продемонстрировать связывание AT против CD40 с CD40 на поверхности ДКмп, клетки обрабатывали увеличивающимися концентрациями супернатантов от клеток, инфицированных NG-350A или EnAd (использовали различные разведения для обеспечения различных количеств антитела), или оставляли необработанными (среда). Через 24 ч и 48 ч клетки собирали и окрашивали меченными флуоресцентной меткой антителами против CD40, после чего проводили анализ методом проточной цитометрии. Клетки сортировали на единичные (FSC-H по сравнению с FSC-A) живые клетки (отрицательные при окрашивании реактивом LIVE/DEAD® Fixable Aqua). На **Фигуре 20** представлена экспрессия CD40 на ДКмп через 24 ч и 48 ч после обработки различными концентрациями супернатантов. При разведении супернатанта от опухолевых клеток, инфицированных NG-350A (но не EnAd), в соотношении 1:2 окрашивание CD40 методом

FACS было снижено или отсутствовало, что отражает блокаду в результате связывания антитела против CD40 в обработанных вирусом NG-350A супернатантах культуры.

Затем оценивали эффект супернатанта опухолевых клеток, обработанных вирусом NG-350A, в отношении повышающей регуляции маркера поверхности клетки на ДКмп от двух доноров (177 и 179). ДКмп обрабатывали разведенными супернатантами с вирусом EnAd или NG-350A либо оставляли необработанными (среда). Через 24 ч и 48 ч клетки собирали и окрашивали антителами против CD86, CD54 и CD83, после чего проводили анализ методом проточной цитометрии. Клетки сортировали на единичные (FSC-H по сравнению с FSC-A) живые клетки (отрицательные при окрашивании реактивом LIVE/DEAD® Fixable Aqua). Результаты на **Фигуре 21** демонстрируют, что NG-350A селективно повышающе регулировал все три маркера активации ДКмп.

Затем оценивали эффекты супернатанта вируса NG-350A в отношении продукции цитокинов ДКмп. ДКмп от двух доноров (177 и 179) обрабатывали разведенными супернатантами опухолевых клеток, обработанных вирусом EnAd или NG-350A, или оставляли необработанными (среда). Через 24 ч и 48 ч супернатанты собирали и анализировали в отношении секреции воспалительных цитокинов с применением иммуноанализа на основе гранул LEGENDplex™ (BioLegend). Результаты на **Фигуре 22** демонстрируют селективную повышающую регуляцию ФНО□, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-28 и ИЛ-29 супернатантами клеток, обработанных NG-350A.

Пример 15: Активность полученного из NG-350A антитела против CD40 в отношении первичных B-клеток человека

МКПК выделяли с помощью градиентного центрифугирования в фиколл-паке из конусов лейкоцитов NC24, полученных от Подразделения крови и трансплантации Национальной службы здравоохранения в Оксфорде, Великобритания. B-клетки выделяли с применением набора Pan B Cell Isolation Kit (MiltenyiBiotec). Клетки высевали при плотности 1,25 x 10^5 клеток на лунку в 48-луночных планшетах в 10% культуральной среде RPMI. Клетки обрабатывали различными концентрациями супернатанта от клеток, инфицированных NG-350A, обедненного вирусом, обогащенного АТ против CD40, описанного в примере 13, или оставляли необработанными. В качестве контроля B-клетки также обрабатывали супернатантом вируса, обедненным вирусом EnAd. Затем планшеты инкубировали в течение 24 ч и 48 ч, после чего клетки собирали. Клетки окрашивали антителами против CD23, CD54, CD86 и HLA-DR, после чего проводили анализ методом проточной

цитометрии. Клетки сортировали на единичные (FSC-H по сравнению с FSC-A) живые клетки (отрицательные при окрашивании реактивом LIVE/DEAD® Fixable Aqua). На **Фигуре 23** представлена селективная повышающая регуляция всех четырех маркеров поверхности (CD23, CD54, CD86 и HLA-DR) на B-клетках от 3 различных доноров (177, 178, 179) супернатантами, обедненными вирусом NG-350A, содержащими антитело против CD40.

Пример 16: Активность вируса NG-350A и супернатантов инфицированных вирусом опухолевых клеток, содержащих полученное из вируса антитело против CD40, в отношении активности первичных B-клеток человека

МКПК выделяли с помощью градиентного центрифугирования в фиколл-паке из конусов лейкоцитов NC24, полученных от Подразделения крови и трансплантации Национальной службы здравоохранения в Оксфорде, Великобритания. B-клетки выделяли с применением набора Pan B Cell Isolation Kit (MiltenyiBiotec). Клетки высевали при плотности 1,25 x 10^5 клеток на лунку в 48-луночных планшетах и обрабатывали различными разведениями образцов тех же супернатантов вируса EnAd и NG-350A, описанных в примере 14. Затем планшеты инкубировали в течение 24 ч и 48 ч, после чего клетки собирали и окрашивали антителами против CD23, CD54, CD86 и HLA-DR, а потом проводили анализ методом проточной цитометрии. Клетки сортировали на единичные (FSC-H по сравнению с FSC-A) живые клетки (отрицательные при окрашивании реактивом LIVE/DEAD® Fixable Aqua). На **Фигуре 24** представлена селективная повышающая регуляция всех четырех маркеров (CD23, CD54, CD86 и HLA-DR) на B-клетках от 3 различных доноров (177, 178, 179) вирусом и супернатантами от инфицированных NG-350A опухолевых клеток, содержащими антитело против CD40.

Пример 17:

В другом исследовании активность NG-350A оценивали на диапазоне различных линий опухолевых клеток, охватывающих шесть типов рака (толстой и прямой кишок, предстательной железы, поджелудочной железы, молочной железы, яичников и мочевого пузыря). Клетки инфицировали 1 или 100 частицами на клетку (ч./кл.) энаденотуцирева (EnAd) или NG-350A и культивировали в течение 3 - 11 дней и оценивали репликацию генома вируса, опосредованный вирусом онколизис, экспрессию трансгена вирусом (на уровне мРНК и белка) и функциональную экспрессию трансгена вирусом в

инфицированных NG-350A опухолевых клетках. Во всех экспериментах активность NG-350A сравнивали с таковой EnAd. Клетки A549 (немелкоклеточной карциномы легких) применяли в качестве положительного контроля, а клетки CT26 (опухоли толстой кишки мыши) – в качестве отрицательного контроля.

Репликация генома вируса

Линии опухолевых клеток культивировали в колбах объемом 175 см^2 в DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением L-глутамина, заменимых аминокислот, пирувата натрия и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) (среда роста). Перед использованием клетки проверяли с применением микроскопа, чтобы подтвердить конфлюэнтность 60 – 80%. Затем клетки промывали ФБР и добавляли 0,25% трипсин-EDTA, чтобы отсоединить клетки от дна колбы. Клетки инкубировали в течение 2 – 10 минут при температуре 37°C, 5% CO_2 до отсоединения клеток, после чего трипсин деактивировали с применением среды роста. Суспензию клеток перемешивали и центрифугировали при 300g в течение 5 минут. Супернатант отбрасывали, и осадок клеток ресуспендировали в 10 мл среды для анализа; среде DMEM, как описано выше, с добавлением 2% (вместо 10%) ЭБС. Клетки подсчитывали, и суспензию клеток разводили с применением среды для анализа для получения концентрации 5 x 10^5 клеток/мл, 100 мкл которой высевали в 96-луночных планшетах с плоским дном (каждую линию клеток высевали в две лунки на вирус и 2 лунки на неинфицированный контроль (НИК) на планшет - для каждой временной точки использовали один планшет). Образцы для EnAd и НИК высевали (и инфицировали) на одной серии планшетов, и образцы для NG-350A и НИК высевали (и инфицировали) на другой серии планшетов. Планшеты инкубировали при температуре 37°C, 5% CO_2, после чего инокулировали через 4 – 6 часов после высевания клеток.

По прошествии данного времени вирусы EnAd и NG-350A разводили в среде для анализа для получения концентрации 5 x 10^5 вирусных частиц/мл, 100 мкл полученного раствора добавляли в каждую соответствующую лунку клеток (каждый вирус добавляли к каждой линии клеток в двух повторах на каждом планшете). Это привело к инокуляции 1 ч./кл. EnAd или 1 ч./кл. NG-350A. В лунки в двух повторах для анализа каждой линии клеток (НИК) на каждом планшете также добавляли 100 мкл среды вместо добавления вируса.

Через 20 часов после инокуляции среду отбирали от клеток и заменяли на 200 мкл свежей среды для анализа. Затем планшеты инкубировали при температуре 37°C, 5% CO_2 в

течение 3, 4, 8 или 11 дней после инокуляции. Если клетки подлежали инкубации в течение 8 или более дней, их подкармливали 50 мкл среды для анализа через 4 дня после инокуляции.

Сбор ДНК: После инкубации среду отбирали от клеток и центрифугировали в 96-луночных планшетах с V-образным дном. Затем супернатант переносили в свежие 96-луночные планшеты с плоским дном и хранили при температуре -80°C. После этого в исходные планшеты клеток добавляли 200 мкл 1 x буфера Reporter Lysis Buffer (RLB) и хранили при температуре -80°C.

Получение калибровочной кривой: Базовый материал EnAd разводили до концентрации от $1,25 \times 10^{11}$ до $1,25 \times 10^{6}$ вирусных частиц/мл, после чего выделяли ДНК с помощью набора Qiagen DNeasy 96 kit согласно протоколу производителя (выделяли 200 мкл каждого образца калибровочной кривой, и очищенную ДНК элюировали в объеме 200 мкл). Затем очищенную ДНК разделяли на аликвоты и хранили при температуре -20°C до использования на каждом планшете для кПЦР. 2 мкл данных образцов калибровочной кривой применяли в каждой реакции кПЦР, что эквивалентно $2,5 \times 10^{3}$ – $2,5 \times 10^{8}$ геномов на лунку кПЦР.

Выделение ДНК: исследуемые образцы супернатанта и лизата оттаивали перед выделением ДНК с помощью набора Qiagen DNeasy 96 kit согласно протоколу производителя (выделяли 50 мкл исследуемых образцов, и очищенную ДНК элюировали в объеме 200 мкл). Контроль выделения 1 x RLB выделяли на каждом планшете.

Репликацию генома вируса оценивали методом кПЦР лизатов и супернатантов (C/H) клеток с применением набора праймеров-зондов E3, как изложено в примере 6. Зависимость от времени для образцов лизата и супернатанта клеток от 10 исследуемых линий опухолевых клеток, а также положительных (A549) клеток откладывали на графике в зависимости от типа опухоли (толстой и прямой кишок, HT-29 и HCT-116; предстательной железы, DU145; поджелудочной железы, BxPC-3; молочной железы, MBA-MB-453; яичников, PA-1 и Caov-3; мочевого пузыря, RT24, T24 и UM-UC-3) на **Фигуре 25 A-F**. Клетки отрицательного контроля (CT26 мыши) являлись отрицательными, и данные результаты не откладывали на графике. Геномы вируса, обнаруженные в клетках, инфицированных EnAd, представлены пунктирными линиями, а геномы вируса, обнаруженные в клетках, инфицированных NG-350A, представлены сплошными линиями. Полученные данные демонстрируют, что NG-350A реплицирует свою геномную ДНК

сопоставимо с родительским вирусом EnAd во всем диапазоне различных типов клеток карциномы.

Для оценки онколитических эффектов NG-350A четыре линии опухолевых клеток инокулировали 100 ч./кл. EnAd, 100 ч./кл. NG-350A, средой для анализа самой по себе (неинфицированный контроль) или 4% Твин (лизированные). Рост и жизнеспособность клеток контролировали с помощью анализатора клеток в реальном времени (Real Time Cell Analzyer, RTCA) xCELLigence до тех пор, пока не наблюдался 50% лизис клеток, инокулированных вирусом. Индекс клеток (ИК) на протяжении всех временных точек рассчитывали с помощью программного обеспечения xIMT, и определяли среднее значение и С.О. (стандартное отклонение) для неинфицированных, EnAd, NG-350A и лизированных образов в трех повторах; среднее значение откладывали на графике, а С.О. представляли в виде планок погрешности. Чертежи кривых, полученных на анализаторе xCELLigence, для неинфицированного контроля, клеток, инокулированных EnAd и NG-350A, и лизированных клеток, представлены на Фигуре **26**. Клетки высевали во временную точку 0 часов и инфицировали через 24 часа после высевания (во временную точку, отмеченную на каждом графике стрелкой). Линии опухолевых клеток представлены в виде одной линии клеток на график: толстой и прямой кишок (HT-29 и HCT-116), предстательной железы (BxPC-3) и молочной железы (MDA-MB-453). NG-350A продемонстрировал сопоставимую онколитическую активность с родительским вирусом EnAd.

Экспрессию мРНК трансгена против CD40 также оценивали в лизатах, отобранных в различные моменты времени из линий опухолевых клеток, инфицированных NG-350A. Те же 10 исследуемых линий опухолевых клеток, которые использовали для части данного исследования, посвященной репликации генома, а также линии клеток положительного (A549) и отрицательного (CT26) контроля, инокулировали 1 ч./кл. EnAd, 1 ч./кл. NG-350A или средой для анализа самой по себе (неинфицированный контроль). В различные моменты времени (3, 4, 8 и 11 дней) после инокуляции лизаты клеток собирали, после чего проводили выделение ДНК и очистку ДНКазой. Затем проводили одноэтапную ОТ-кПЦР с применением набора праймеров/зондов, специфичных к CD40. Синтетические олигонуклеотиды РНК, соответствующие смысловой цепи против CD40, применяли для получения калибровочной кривой, с помощью которой рассчитывали количество РНК исследуемых образцов. Среднее количество РНК для каждого из трех повторов неинфицированного контроля вычитали в качестве значения фона из соответствующих индивидуальных значений для EnAd и NG-350A. Затем рассчитывали число копий мРНК

против CD40 на клетку и определяли среднее значение для двух EnAd и двух NG-350A ОТ-кПЦР в трех повторах. После этого рассчитывали среднее значение и С.О. для данных значений в двух повторах для каждой линии клеток в каждую временную точку (n=2, за исключением образца BxPC-3 в день 8, для которого n=1). Среднее значение откладывали на графике, и полученные графики представлены на **Фигуре 27**; С.О. представлено в виде планок погрешности. Клетки, инокулированные EnAd, продемонстрировали незначительный ответ, причем среднее значение геномов на клетку, рассчитанное из биологических повторов, варьировало от 0×10^0 до $6{,}26 \times 10^0$ среди всех временных точек и линий клеток. В связи с этим данные для EnAd не откладывали на графике. Для образцов неинфицированного контроля среднее число копий трансгена против CD40 на клетку, которое рассчитывали из биологических повторов, варьировало от $0{,}00 \times 10^0$ до $9{,}09 \times 10^0$. На графике представлена экспрессия трансгена против CD40 на линиях опухолевых клеток толстой и прямой кишок (A), предстательной железы, поджелудочной железы и молочной железы (B), яичников (C) и мочевого пузыря (D). Инфекция NG-350A привела к экспрессии мРНК трансгена против CD40 на всех линиях опухолевых клеток человека с различиями в кинетике, наблюдавшимися для различных клеток.

Для оценки экспрессии трансгенного белка IgG2 измеряли продукцию IgG2 человека (изотип тяжелой цепи антитела против CD40, кодируемого NG-350A) различными линиями опухолевых клеток, инфицированных NG-350A. Шесть исследуемых линий опухолевых клеток, а также линии клеток положительного (A549) и отрицательного (CT26) контроля, инокулировали 1 ч./кл. NG-350A, 1 ч./кл. EnAd или средой для анализа самой по себе (неинфицированный контроль). В различные моменты времени (3, 4, 8 и 11 дней) после инокуляции супернатант собирали и хранили при температуре -80°C до использования. Супернатант от инокулированных NG-350A исследуемых линий клеток и клеток A549 разводили в соотношении1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80. Супернатант от всех неинфицированных контрольных образцов, клеток, инфицированных EnAd, и клеток CT26, инфицированных NG-350A, разводили только в соотношении 1:2. Затем проводили анализ *in vitro* с помощью набора IgG2 Human SimpleStep ELISA Kit, (Abcam) согласно протоколу производителя. Очищенный белок IgG2 человека (поставляется в наборе для ELISA) применяли для получения калибровочной кривой, с помощью которой определяли концентрацию белка IgG2 в образцах (нг/мл). Затем рассчитывали количество белка IgG2 на 1×10^6 клеток (нг/1×10^6 клеток). Среднее значение и С.О. определяли из средних значений ELISA в двух повторах, которые определяли по калибровочной кривой. Среднее значение откладывали на графике, и полученные графики представлены на **Фигуре 28**;

С.О. представлено в виде планок погрешности. Вычитание фона с применением образцов неинфицированного контроля не проводили, поскольку для каждой линии клеток и каждой временной точки данные образцы не продемонстрировали ответа (0 x 10^0 нг/1 x 10^6 клеток). Клетки, инокулированные EnAd, также не продемонстрировали ответа, вследствие этого данные для EnAd не откладывали на графике. Продукцию антитела IgG2 обнаруживали на всех линиях клеток, инфицированных NG-350A.

Репортерный анализ HEK-Blue передачи сигналов CD40, описанный в примере 8, применяли для исследования функциональности антитела, продуцированного различными линиями опухолевых клеток, инфицированных NG-350A. Шесть исследуемых линий опухолевых клеток, а также линии клеток положительного (A549) и отрицательного (CT26) контроля, инокулировали 1 ч./кл. EnAd, 1 ч./кл. NG-348 или средой для анализа самой по себе (НИК). Через 8 или 11 дней после инокуляции супернатант собирали. Затем супернатант инкубировали с клетками HEK-Blue в течение 20 – 24 часов. После этого супернатант отбирали от обработанных клеток HEK-Blue, добавляли к реактиву Quanti-Blue и инкубировали в течение 1 часа, после чего проводили считывание оптической плотности (о.п.) на приборе SpectraMax i3x для считывания поглощения при 620 нм. Среднее значение оптической плотности для каждого из двух повторов анализа НИК вычитали из соответствующих индивидуальных значений EnAd и NG-350A, получая оценку активности передачи сигналов CD40 под действием антител в супернатантах инфицированных опухолевых клеток. Затем получали среднее значение для анализа EnAd и NG-350A после вычитания фона НИК в двух повторах, что позволило получить 2 значения для каждой линии клеток (на условие), соответствующие каждому повтору высевания и инокуляции Затем определяли среднее значение и стандартное отклонение (С.О.) для данных повторов, которые представлены в таблице **3.**

Таблица 3 Функциональная активность антитела против CD40 в супернатантах от инфицированных NG-350A опухолевых клеток (репортерный анализ HEk-Blue)

Общая характеристика функции трансгена NG-350A (антитела против CD40), обнаруженной с помощью анализа HEK-Blue		
Тип рака	**Линия клеток**	**Активность SEAP (Оптическая плотность при 620 нм)**

		NG-350A		EnAd	
		Среднее значение	**С.О.**	**Среднее значение**	**С.О.**
Положительный контроль	A549	1,0600	0,0933	0,1488	0,0124
Отрицательный контроль	CT26	0,0000	0,0103	0,0017	0,0088
Толстой и прямой кишок	HT-29	0,7175	0,0212	0,0650	0,0021
Предстательной железы	DU145	0,5555	0,0276	0,0910	0,0120
Поджелудочной железы	BxPC-3	0,7118	0,2054	0,0428	0,0088
Молочной железы	MDA-MB-453	0,8578	0,1439	0,1033	0,0011
Яичников	Caov-3	0,0273	0,0293	0,0198	0,0124
Мочевого пузыря	RT4	0,3653	0,0209	0,0470	0,0085

Пример 18

В следующей серии экспериментов опосредованные вирусными частицами эффекты вируса NG-350A *in vivo* наблюдали и сравнивали с эффектами EnAd после однократного или многократного внутривенного введения доз на мышах. Самкам мышей CD-1 в.в. инъецировали контроль-наполнитель либо 2,2 x 10^{10} частиц EnAd или NG-350A. У мышей отбирали кровь из сердца через 6 часов, 24 часа, 48 часов или 7 дней после инъекции, кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом и обрабатывали для выделения плазмы. Образцы плазмы исследовали в анализах ELISA для обнаружения острых ответов цитокинов на вирусные частицы Данные, представленные на Фигуре **29,** представляют собой 3 – 6 мышей на группу. Уровни MCP-1 (Фигура **29A**), ИЛ-6 (Фигура **29B**) и ФНО□ (Фигура **29C**), стимулированные введением доз NG-350A, были подобны таковым для EnAd.

Сплошные черные линии представляют собой среднее значение. Базовая линия представляет собой среднее значение группы контроля-наполнителя + 3 x С.О.

Другие аликвоты образцов плазмы исследовали в отношении уровней аланинаминотрансферазы (ALT) как показателя острой гепатотоксичности. Образцы плазмы анализировали с применением набора для колориметрического ферментативного анализа ALT по конечной точке. Данные, представленные на Фигуре **30,** представляют собой 3 – 6 мышей на группу. Сплошные черные линии представляют собой среднее значение. Базовая линия представляет собой среднее значение группы контроля-наполнителя + 3 x С.О. Уровни ALT варьировали между различными мышами, но NG-350A и EnAd вызывали подобные профили ответа.

Следующим группам самок мышей CD-1 в.в. инъецировали ФБР в день 1 либо 2,2 x 10^{10} вирусных частиц EnAd или NG-350A в дни 1, 3 и 5. У мышей, получавших ФБР, отбирали кровь из сердца через 6 часов после введения доз. У мышей, получавших вирус, отбирали кровь из боковой хвостовой вены и с помощью пункции сердца через 6 часов и 24 часа (соответственно) после первой дозы либо с помощью пункции сердца через 6 часов, 24 часа или 7 дней после третьей дозы. Образцы плазмы исследовали в анализах ELISA для обнаружения острых ответов цитокинов на вирусные частицы. Данные, представленные на Фигуре **31,** представляют собой 3 – 6 мышей на группу. Уровни MCP-1 (Фигура **31A**) и ИЛ-6 (Фигура **31B**), стимулированные введением доз NG-350A, были подобны таковым для EnAd. Сплошные черные линии представляют собой среднее значение. Базовая линия представляет собой среднее значение группы контроля-наполнителя + 3 x С.О.

Пример 19

Фармакокинетику NG-350A в крови сравнивали с энаденотуцировом (EnAd) после введения каждой из трех внутривенных (в.в.) доз 2,2 x 10^{10} вирусных частиц в дни 1, 3 и 5 на иммунокомпетентных мышах CD-1.Самкам мышей CD-1 в.в. инъецировали 2,2 x 10^{10} вирусных частиц EnAd или NG-350A в дни 1, 3 и 5. После каждой дозы у группы из 4 мышей, получавших каждый вирус, отбирали кровь через 1, 2, 3, 5, 7, 10 и 60 минут после введения доз. ДНК выделяли и анализировали методом кПЦР, направленным на ген E3 вируса, общий для EnAd и NG-350A. Данные, представленные на Фигуре **32,** представляют собой 4 мыши на группу + С.О. Значения, которые оказывались ниже предела количественного определения анализа, исключали. Данные после 7 минут на графике не откладывали, поскольку они систематически оказывались ниже предела количественного

определения анализа. NG-350A продемонстрировал сопоставимый профиль фармакокинетики с таковым EnAd.

Пример 20

Биораспределение вируса оценивали после введения доз мышам с NG-350A путем измерения восстановления живого вируса из тканей после однократного внутривенного введения дозы. Самкам мышей CD-1 в.в. инъецировали контроль-наполнитель или 2,2 x 10^{10} частиц NG-350A. Группам мышей проводили эвтаназию через 6 часов, 24 часа, 8 дней или 28 дней после введения доз, и печень, легкие и селезенки отбирали и немедленно замораживали на сухом льду. Затем образцы оттаивали, гомогенизировали в сохраняющем белок буфере для лизиса, лизат разводили и добавляли к конфлюэнтным монослоям A549; использовали гомогенат ткани с добавлением NG-350A для каждого органа в качестве положительного контроля и отрицательный контроль. Монослои культивировали в течение 96 часов, после чего фиксировали и проводили анализ иммуноокрашивания с применением антитела против гексона аденовируса. Данные представлены на **Фигуре 33** в виде фотографий образца из каждой лунки. Гексон-положительные клетки окрашивались коричневым цветом (на Фигуре показаны в виде темно-серого цвета). Живой вирус не был обнаружен в печени, легких или селезенке мышей (первичные очаги биораспределения вируса у мышей) позднее 24 часов.

Пример 21

В данной серии исследований оценивали активность вируса NG-350A *in vivo* на иммунодефицитных мышах, несущих ксенотрансплантат опухоли человека.

Репликацию вируса оценивали на линии клеток подкожной опухоли легких A549 после трех в.в. инъекций или одной дробной внутриопухолевой (в.о.) дозы. Самкам мышей SCID подкожно имплантировали опухолевые клетки A549 в бок и в.о. или в.в. инъецировали вирус или контроль, когда опухоли достигали размера по меньшей мере 50 мм^3. Мышам, которые получали дозы в.о., инъецировали две инъекции ФБР по 10 мкл либо 2,2 x 10^9 вирусных частиц EnAd или NG-350A в пространственно разделенные области опухоли суммарной дозой 20 мкл / 4,4 x 10^9 вирусных частиц. Мышам, которые получали дозы в.в., инъецировали 100 мкл ФБР либо 2,2 x 10^9 вирусных частиц EnAd или NG-350A в дни 1, 3 и 5 суммарной дозой 300 мкл / 6,6 x 10^9 вирусных частиц. Опухоли отбирали от мышей после эвтаназии через 7 или 21 дней после введения доз и замораживали. Затем опухоли гомогенизировали, выделяли ДНК и анализировали методом кПЦР с применением

праймеров и зондов, направленных на область вируса E3, общую для EnAd и NG-350A. Данные, представленные на Фигуре **34 A и B,** представляют собой 2 – 4 мыши на группу +/- С.О. NG-350A продемонстрировал сопоставимую с EnAd репликацию генома на ксенотрансплантатах опухоли A549 после в.о. (Фигура **34A**) или в.в. (Фигура **34B**) введения доз.

Данный эксперимент также повторяли на второй ксенотрансплантатной модели опухоли с применением линии раковых клеток толстой и прямой кишок HCT-116. Самкам мышей SCID подкожно имплантировали опухолевые клетки HCT116 в бок и в.о. или в.в. инъецировали вирус или контроль, когда опухоли достигали размера по меньшей мере 50 мм^3. Мышам, которые получали дозы в.о., инъецировали две инъекции по 10 мкл либо 2,2 x 10^9 вирусных частиц EnAd или NG-350A в пространственно разделенные области опухоли суммарной дозой 20 мкл / 4,4 x 10^9 вирусных частиц. Мышам, которые получали дозы в.в., инъецировали 100 мкл ФБР либо 2,2 x 10^9 вирусных частиц EnAd или NG-350A в дни 1, 3 и 5 суммарной дозой 300 мкл / 6,6 x 10^9 вирусных частиц. Опухоли отбирали от мышей после эвтаназии через 7 или 21 дней после введения доз и замораживали. Затем опухоли гомогенизировали, выделяли ДНК и анализировали методом кПЦР с применением праймеров и зондов, направленных на область E3 вируса, общую для EnAd и NG-350A. Данные, представленные на Фигуре 34 C и D, представляют собой 2 – 4 мыши на группу +/- С.О. NG-350A продемонстрировал сопоставимую репликацию генома в ксенотрансплантатах опухоли HCT-116 с таковой EnAd после в.о. (Фигура **34C**) или в.в. (Фигура **34D**) введения доз.

В аналогичных экспериментах с подкожными ксенотрансплантами опухолей A549 и HCT-116 на мышах SCID измеряли экспрессию РНК вируса в опухолях. Самкам мышей SCID подкожно имплантировали опухолевые клетки A549 или HCT-116 в бок и в.о. или в.в. инъецировали вирус или контроль, когда опухоли достигали размера по меньшей мере 50 мм^3. Мышам, которые получали дозы в.о., инъецировали две инъекции ФБР по 10 мкл либо 2,2 x 10^9 вирусных частиц EnAd или NG-350A в пространственно разделенные области опухоли суммарной дозой 20 мкл / 4,4 x 10^9 вирусных частиц. Мышам, которые получали дозы в.в., инъецировали 100 мкл ФБР либо 2,2 x 10^9 вирусных частиц EnAd или NG-350A в дни 1, 3 и 5 суммарной дозой 300 мкл / 6,6 x 10^9 вирусных частиц. Опухоли отбирали от мышей после эвтаназии через 7 дней после введения доз и замораживали. Затем опухоли гомогенизировали, выделяли РНК и анализировали методом ОТ-кПЦР с применением праймеров и зондов, направленных на мРНК E3 вируса, общую для EnAd и NG-350A. Данные, представленные на Фигуре **35,** представляют собой 3 – 4 мыши на группу. Черные

линии представляют собой среднее значение. A549 в.о. (Фигура **35A**), в.в. (Фигура **35B**), HCT-116 в.о. (Фигура **35C**) и HCT-116 в.в. (Фигура **35D**) демонстрировали сопоставимую экспрессию мРНК E3 вируса после введения доз NG-350A или EnAd.

Уровни **экспрессии мРНК трансгена** антитела против CD40 **также измеряли в тех же образцах РНК от подкожных ксенотрансплантатов опухоли A549 и HCT-116.** РНК анализировали методом ОТ-кПЦР с применением праймеров и зондов, направленных на мРНК трансгена антитела против CD40. Данные, представленные на Фигуре 36, представляют собой 3 – 4 мыши на группу. Черные линии представляют собой среднее значение. Экспрессия мРНК трансгена антитела против CD40 легко определялась только в опухолях, обработанных NG-350A. A549 в.о. (Фигура **36A**), в.в. (Фигура **36B**), HCT-116 в.о. (Фигура **36C**) и HCT-116 в.в. (Фигура **36D**)

Уровни белка антитела против CD40 также измеряли в лизатах опухоли и сыворотке от мышей, несущих опухоли A549, с применением ELISA с IgG2. Данные, представленные на Фигуре **37,** демонстрируют селективное обнаружение антитела после введения NG-350A, в.о. (A) или в.в. (B), с более высокими уровнями в опухолях, чем в крови.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO. 4 – последовательность аминокислот цепи VH антитела против CD40

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGT
NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO. 5 – последовательность аминокислот константной области тяжелой цепи антитела

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV
LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 8 – последовательность аминокислот цепи VL антитела против CD40

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO. 9 – последовательность аминокислот константной области легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 12 –последовательность нуклеиновых кислот трансгенной кассеты NG-350A

GCGATCGCCAGGCCCACCATGGACTGGACCTGGCGCATCCTGTTCTTGGTGGCAGC
TGCTACGGGAGCTCATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCCGGCGCTGAGGTGAAGA
AACCCGGGGCTTCAGTCAAAGTCAGCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTTACTGGC
TATTACATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCCGGGACAGGGTCTGGAATGGATGGGATG
GATCAATCCGGACAGCGGCGGGACCAATTACGCACAAAAGTTCCAAGGCCGCGTG
ACGATGACCCGGGACACTTCGATCTCAACCGCCTACATGGAGCTGAACCGCCTGAG
GTCGGATGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTCGCGACCAACCCCTGGGGTACTGCA
CCAACGGAGTGTGTTCATACTTCGACTACTGGGGCCAAGGCACGCTGGTCACTGTG
TCATCGGCGTCCACTAAGGGCCCGTCGGTCTTCCCACTAGCTCCGTGCTCGCGGTCG
ACTTCGGAATCAACTGCGGCACTCGGATGCCTTGTCAAGGACTACTTCCCAGAACC
CGTGACCGTCTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACGAGCGGTGTCCACACTTTCCCGG
CGGTGCTGCAGTCATCGGGGCTATACAGCCTGAGCAGCGTGGTTACTGTGCCGTCA
TCAAACTTCGGGACCCAGACTTACACTTGCAATGTGGACCACAAGCCGTCAAATAC
CAAAGTGGACAAGACTGTGGAACGCAAATGTTGCGTGGAATGCCCTCCGTGCCCGG
CCCCCCCAGTCGCTGGCCCATCCGTGTTCCTCTTCCCTCCGAAGCCAAAAGACACTC
TGATGATTTCGAGAACTCCGGAGGTCACTTGCGTGGTGGTCGACGTGTCGCACGAG
GATCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGAGTGGAGGTGCACAATGCCAA
GACCAAGCCGCGCGAAGAACAATTCAACTCCACCTTTCGGGTCGTGTCCGTGCTGA
CCGTGGTACACCAAGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAATGCAAGGTGAGCAA
CAAGGGGCTGCCGGCTCCAATCGAAAAGACCATCTCAAAGACTAAGGGGCAACCT
CGCGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCTCCAAGCAGGGAGGAAATGACCAAAAACC
AGGTGAGCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTTTACCCCAGCGACATCGCCGTCGAG
TGGGAAAGCAACGGACAACCCGAGAACAACTACAAGACCACTCCGCCCATGCTGG
ACTCCGACGGGTCATTTTTCCTGTACTCAAAGCTGACTGTGGACAAGTCCCGGTGGC
AGCAAGGTAACGTGTTCTCCTGCTCGGTGATGCACGAAGCTTTGCACAACCACTAC
ACTCAAAAGTCACTTTCCTTGTCACCGGGCAAGGGGTCGGGCGCCACTAACTTTTCC

TTGCTCAAGCAGGCGGGCGATGTGGAGGAGAATCCGGGCCCGCGCCTCCCGGCGCA
ACTGCTGGGCCTCCTCCTCCTCTGGTTTCCCGGCTCCCGCTGTGACATCCAGATGAC
TCAGTCGCCCAGCTCCGTGTCCGCATCGGTGGGGGACAGAGTCACCATCACCTGCA
GAGCTTCACAAGGGATCTATTCCTGGCTGGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAG
GCCCCCAACCTCCTGATTTACACCGCATCGACTCTCCAGTCAGGCGTGCCATCCCGG
TTCTCAGGGTCCGGCTCCGGAACCGACTTCACTCTGACTATCAGCTCCCTGCAACCA
GAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAGCAGGCAAACATCTTTCCGCTAACTTTCGGC
GGAGGCACGAAGGTGGAGATCAAGAGAACCGTGGCGGCCCCTTCCGTCTTCATCTT
CCCACCGTCAGACGAACAACTCAAATCCGGTACCGCCTCCGTCGTGTGCCTGCTCA
ATAACTTCTATCCACGCGAGGCCAAGGTCCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAG
TCCGGAAACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAACAGGATTCCAAGGACAGCACTTACTC
GCTCTCAAGCACCCTCACCCTGTCGAAGGCGGATTACGAGAAGCACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTGACTCATCAAGGACTCTCATCACCGGTAACTAAGAGCTTCAATCGC
GGAGAATGCTAGGCTAGCTTGACTGACTGAGATACAGCGTACCTTCAGCTCACAGA
CATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAA
AATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTG
CAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGG
AGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTCCTGCAGG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Онколитический вирус (например, компетентный по репликации вирус), который содержит трансгенную кассету, кодирующую антитело против CD40 или связывающий фрагмент указанного антитела, причем указанная трансгенная кассета содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 12, или последовательность, идентичную указанной последовательности по меньшей мере на 95% (например, идентичную указанной последовательности на 96, 97, 98 или 99%), в частности, кассету с последовательностью SEQ ID NO: 12.

2. Онколитический вирус по п. 1, отличающийся тем, что указанный вирус выбран из аденовируса, вируса простого герпеса, реовируса, вируса кори, вируса болезни Ньюкасла, вируса Сенека-Валли, вируса везикулярного стоматита, полиовируса, энтеровируса ECHO, вируса Коксаки и вируса оспoвакцины, в частности, аденовируса.

3. Онколитический вирус по пп. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный вирус выбран из группы, состоящей из энаденотуцирева, талимогена лахерпарепвека, RIGVIR, Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12, Каватака™, CG0070, DNX-2401, G207, HF10, Имлигика®, JX-594, MG1-MA3, MV-NIS, OBP-301, Реолизина®, Toca 511, в частности, энаденотуцирева.

4. Онколитический вирус по любому из пп. 1 – 3, отличающийся тем, что указанный вирус содержит SEQ ID NO: 1 или последовательность, идентичную указанной последовательности по меньшей мере на 95% (например, идентичную указанной последовательности на 96, 97, 98 или 99%), такую как содержащую SEQ ID NO: 1.

5. Онколитический вирус по п. 4, который состоит из SEQ ID NO: 1.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая вирус по любому из пп. 1 – 5 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

7. Онколитический вирус по любому из пп. 1 – 5 или фармацевтическая композиция по п. 6 для применения при лечении.

8. Онколитический вирус по любому из пп. 1 – 5 или фармацевтическая композиция по п. 6 для применения при лечении рака, резистентности к инсулину, ожирения и/или иммунодефицита.

9. Применение по п. 6, отличающееся тем, что указанные вирус или композиция предназначены для применения при лечении рака, например, для лечения рака, экспрессирующего CD40 (такого как рак с повышенным уровнем экспрессии CD40).

10. Комбинированная терапия (например, для применения при лечении рака), включающая вирус по любому из пп. 1 – 5 или композицию по п. 6 и дополнительную противораковую терапию.

11. Комбинированная терапия по п. 10, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой химиотерапию.

12. Комбинированная терапия по п. 10 или 11, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой ингибитор контрольной точки.

13. Комбинированная терапия по п. 12, отличающаяся тем, что указанная противораковая терапия выбрана из группы, включающей ингибитор PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор CTLA-4, ингибитор TIM-3, ингибитор LAG-3, ингибитор TIGIT, ингибитор B7-H3 (CD276), ингибитор B7-H4 (B7S1), ингибитор B7H7 (HHLA2), ингибитор CD96, ингибитор VISTA и комбинацию двух или более указанных ингибиторов.

14. Комбинированная терапия по п. 13, отличающаяся тем, что указанный ингибитор представляет собой антитело или связывающий фрагмент указанного антитела.

15. Комбинированная терапия по любому из пп. 10 – 14, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой агонист костимуляторного пути.

16. Комбинированная терапия по п. 15, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия выбрана из группы, включающей агонист CD27, агонист CD28, агонист ICOS, агонист TMIGD2 (IGPR-1/CD28H), агонист

CD226, агонист OX40, агонист 4-1BB и комбинацию двух или более указанных агонистов.

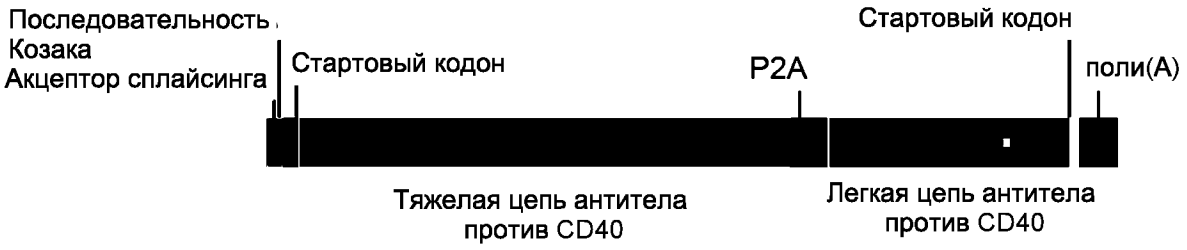
17. Комбинированная терапия по п. 14, отличающаяся тем, что указанная терапия представляет собой антитело или связывающий фрагмент указанного антитела.

18. Комбинированная терапия по любому из пп. 8 – 15, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия активирует иммунные ответы или отменяет супрессию иммунных ответов, например, выбранных из ИЛ-10, ФРОβ, ингибиторов IDO и комбинации двух или более указанных молекул.

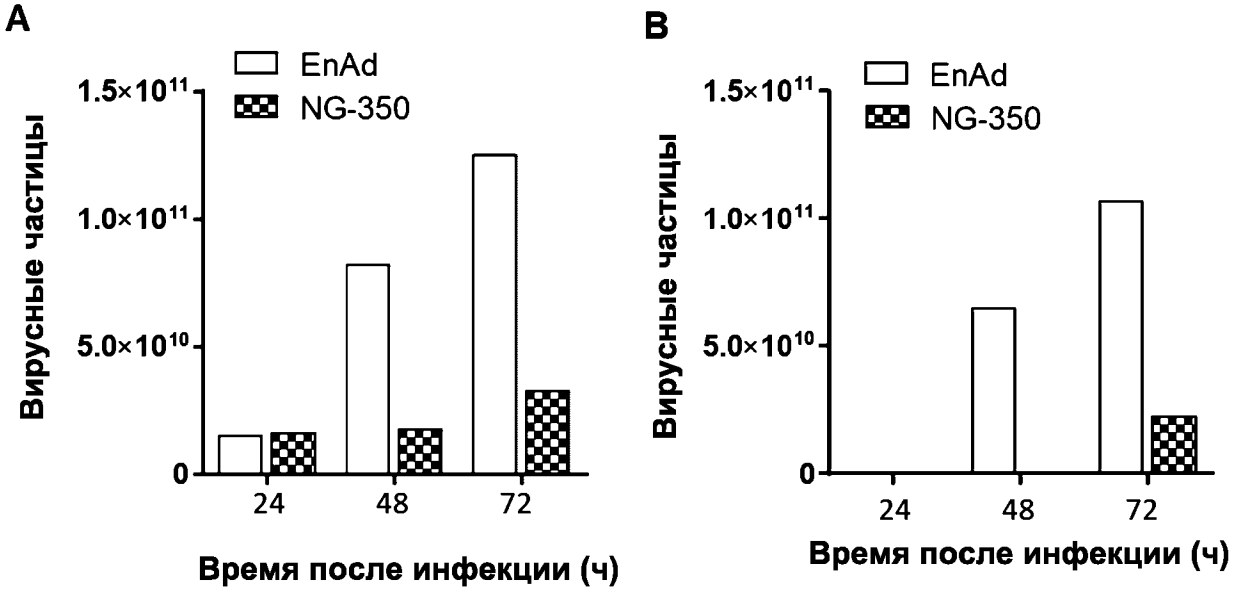
19. Комбинированная терапия по любому из пп. 10 – 18, отличающаяся тем, что указанная дополнительная противораковая терапия представляет собой онколитический вирус, например, компетентный по репликации онколитический вирус, такой как аденовирус, в частности, аденовирус группы B.

20. Комбинированная терапия по п. 19, отличающаяся тем, что указанный онколитический вирус кодирует терапевтический ген, кодирующий материал, выбранный из группы, состоящей из последовательности РНКи, антитела или связывающего фрагмента указанного антитела, хемокинов, цитокинов, иммуномодулятора и ферментов.

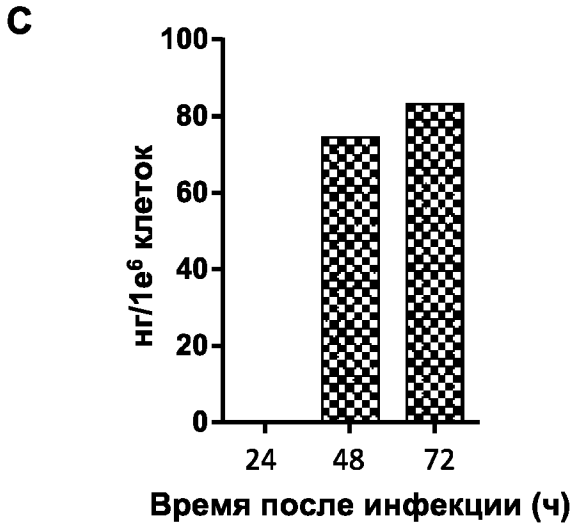
Фигура 1



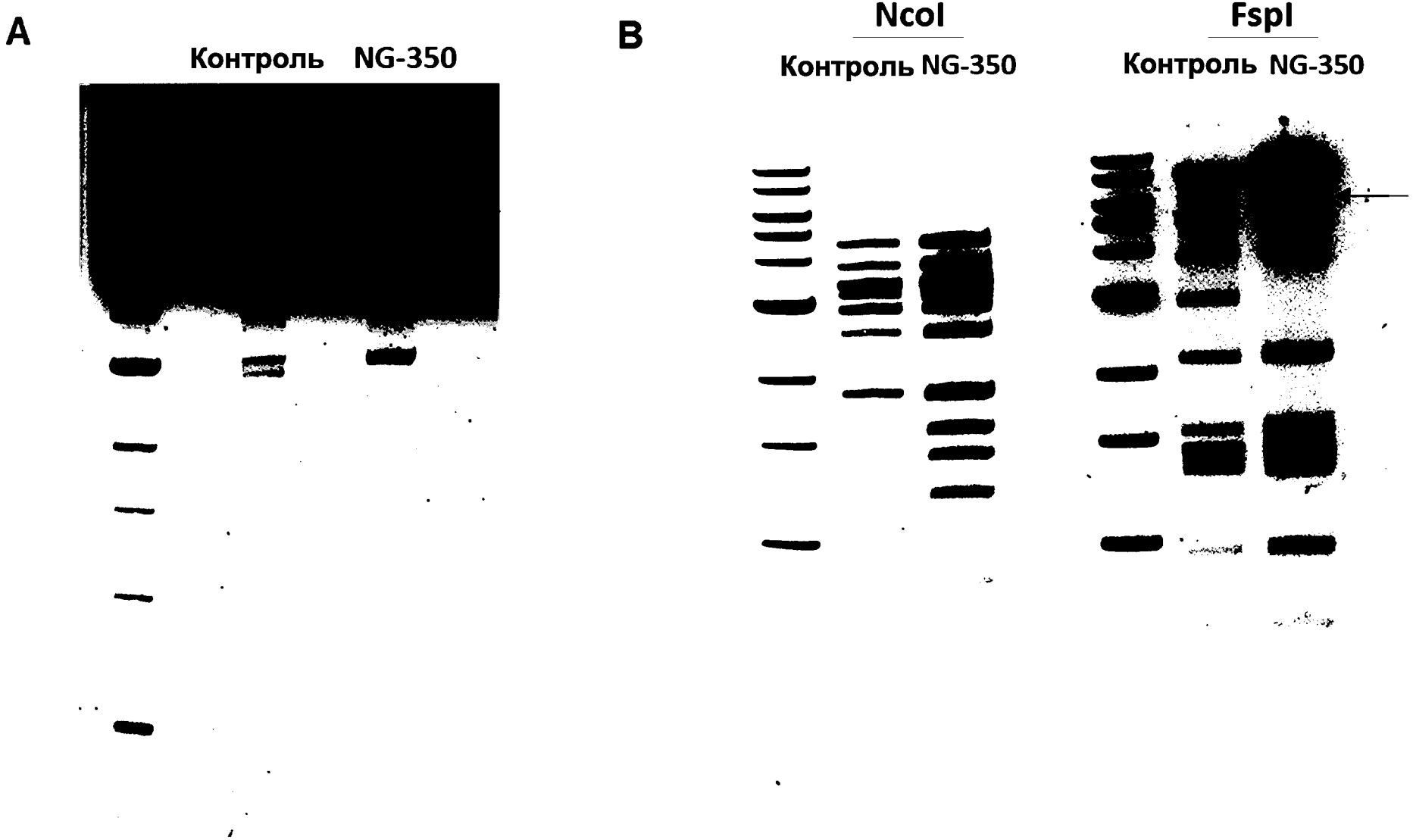
Фигура 2 Суммарная продукция вируса (A) и вирус в супернатанте (B)



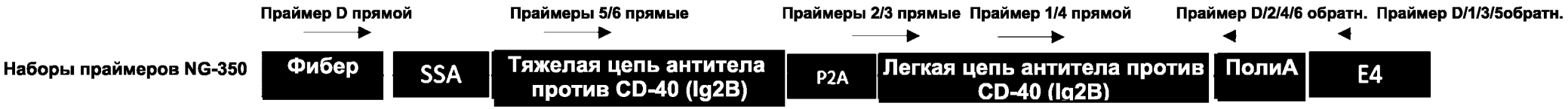
Концентрация секретированного антитела



Фигура 3 Рестрикционное расщепление NG-350



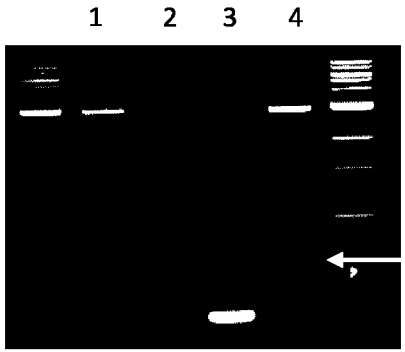
Фигура 4 Подробная информация о праймерах представлена в таблице 1 описания



Фигура 5 Анализ продуктов ПЦР методом гель-электрофореза

A

Набор праймеров D



№ образца	Описание образца
1	Контрольная ДНК плазмиды pNG-350-PSI-01
2	Отр. контроль (не содерж. нуклеазы вода)
3	Контроль – энаденотуцирев
4	NG-350

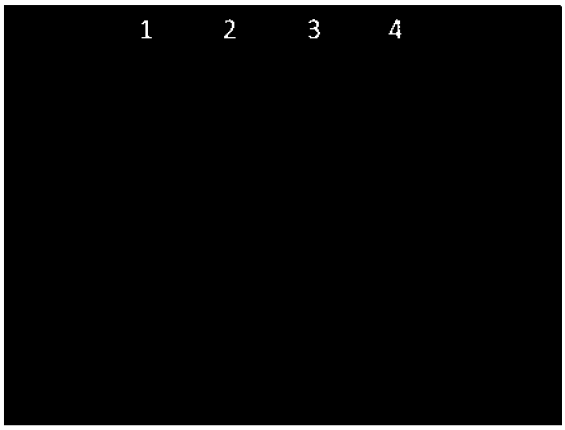
B

№ образца	Описание образца
1	Набор праймеров 1 (1465 п.о.)
2	Набор праймеров 2 (735 п.о.)
3	Набор праймеров 3 (1155 п.о.)
4	Набор праймеров 4 (1046 п.о.)
5	Набор праймеров 5 (2590 п.о.)
6	Набор праймеров 6 (2171 п.о.)

Фигура 6 Продукты ПЦР

A

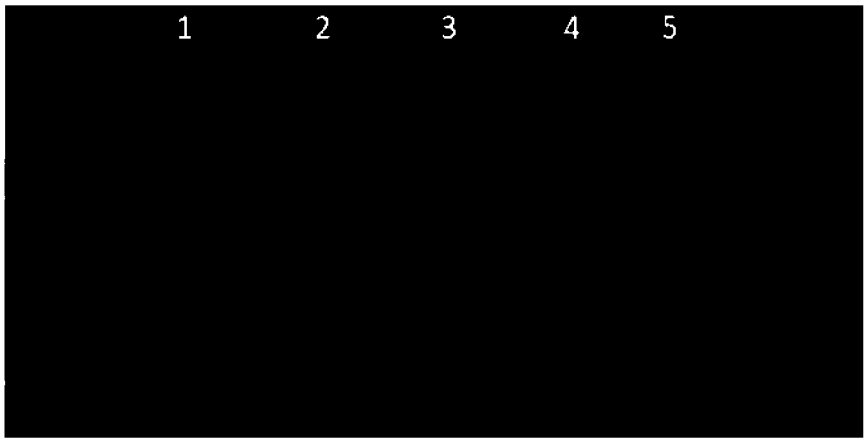
Набор праймеров D



№ образца	Описание образца
1	pNG-350A-PSI-01 (ДНК плазмиды)
2	Отрицательный контроль (вода)
3	энаденотуцирев
4	NG-350A

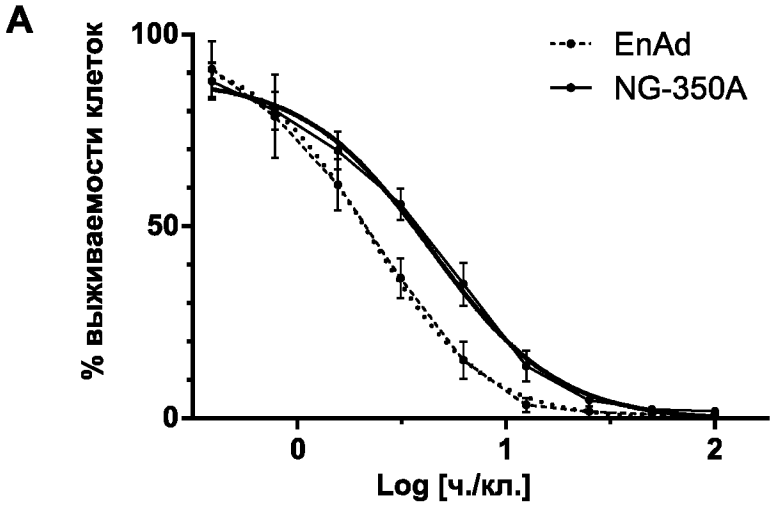
B

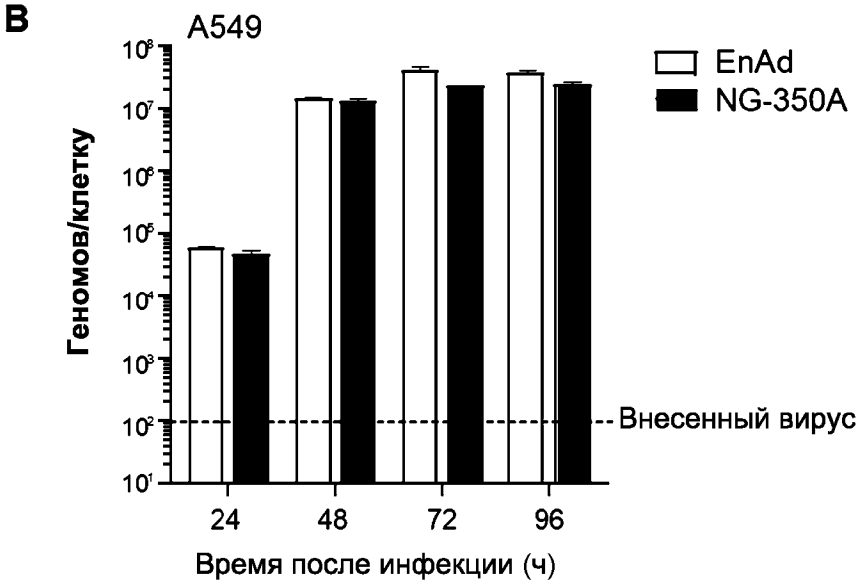
Набор праймеров K

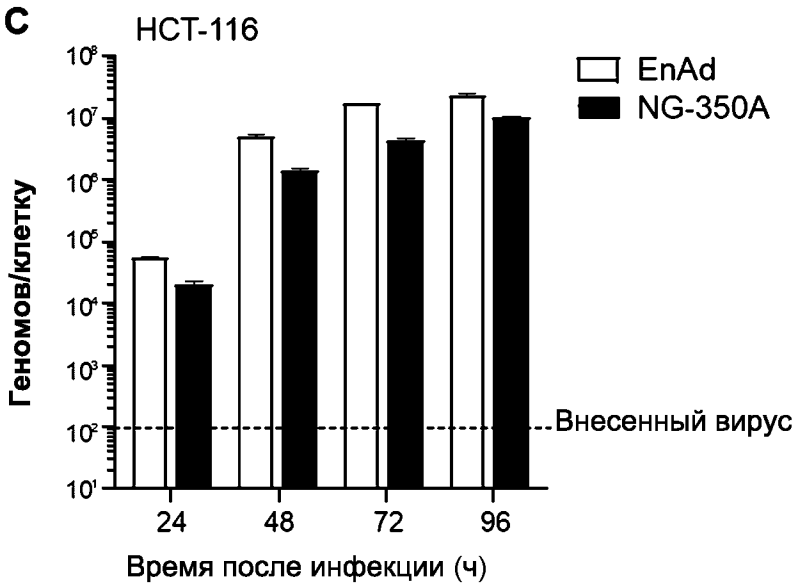


№ образца	Описание образца
1	pNG-350A-PSI-01 (ДНК плазмиды)
2	Отрицат. контроль (не содержащая нуклеазы вода)
3	EnAd (исследование Ark, анализ 1)
4	NG-350A
5	NG-350A

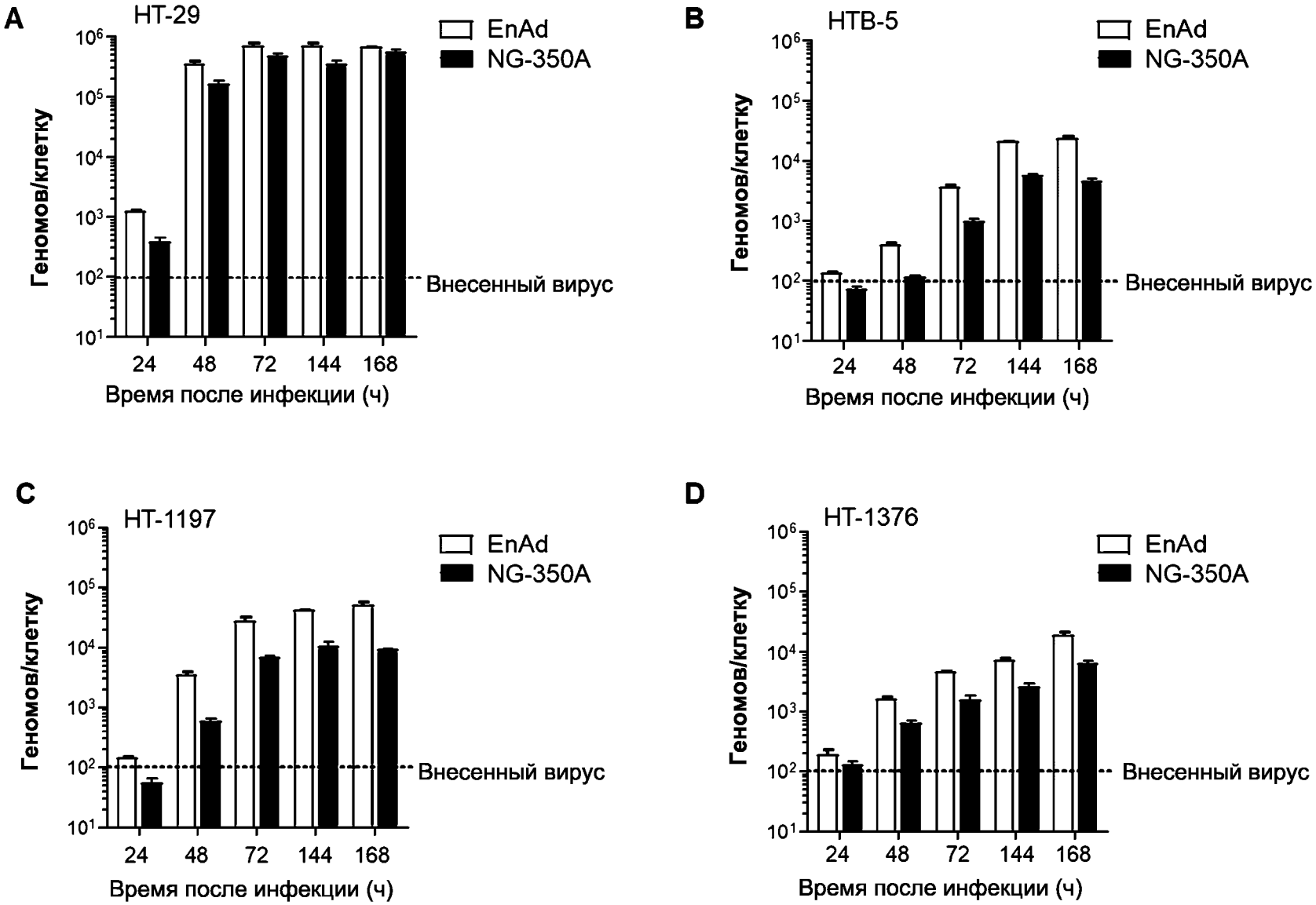
Фигура 7


A
% выживаемости клеток
100
50
0
0
1
2
Log [ч./кл.]
EnAd
NG-350A

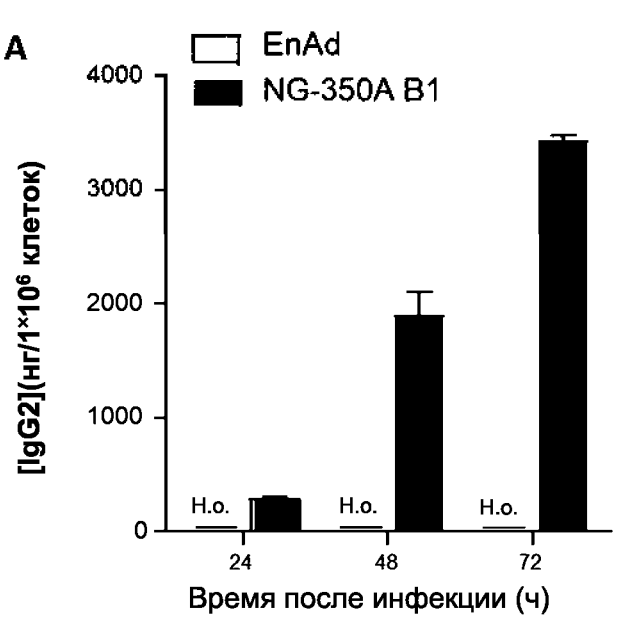

B
A549
Геномов/клетку
EnAd
NG-350A
Внесенный вирус
24
48
72
96
Время после инфекции (ч)

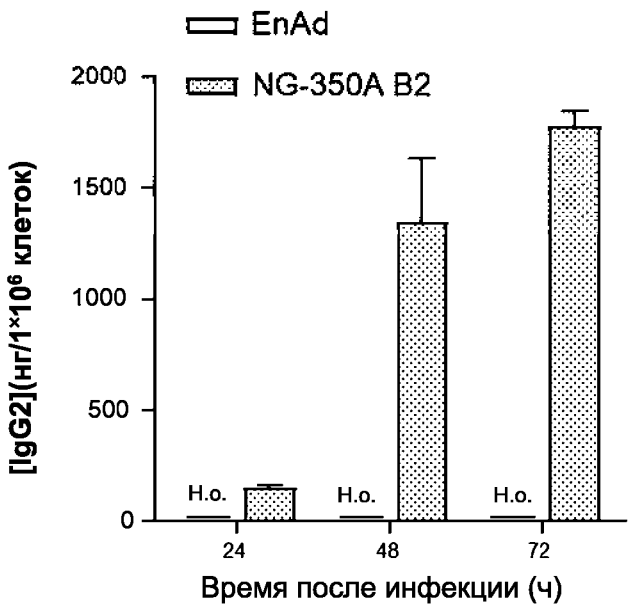

C
HCT-116
Геномов/клетку
EnAd
NG-350A
Внесенный вирус
24
48
72
96
Время после инфекции (ч)

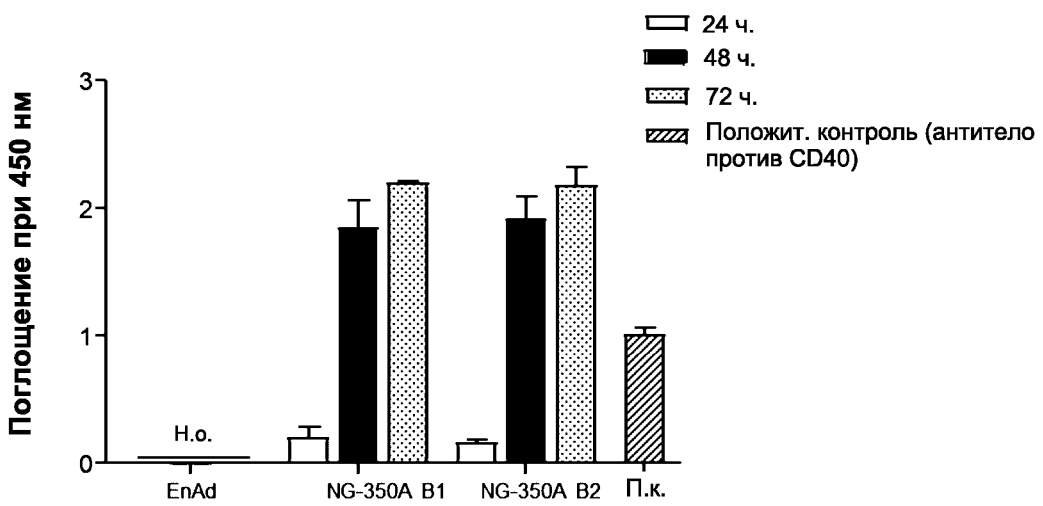
Фигура 8


A
HT-29
EnAd
NG-350A
Геномов/клетку
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
Внесенный вирус
24
48
72
144
168
Время после инфекции (ч)
B
HTB-5
EnAd
NG-350A
Геномов/клетку
Внесенный вирус
Время после инфекции (ч)
C
HT-1197
EnAd
NG-350A
Геномов/клетку
Внесенный вирус
Время после инфекции (ч)
D
HT-1376
EnAd
NG-350A
Геномов/клетку
Внесенный вирус
Время после инфекции (ч)

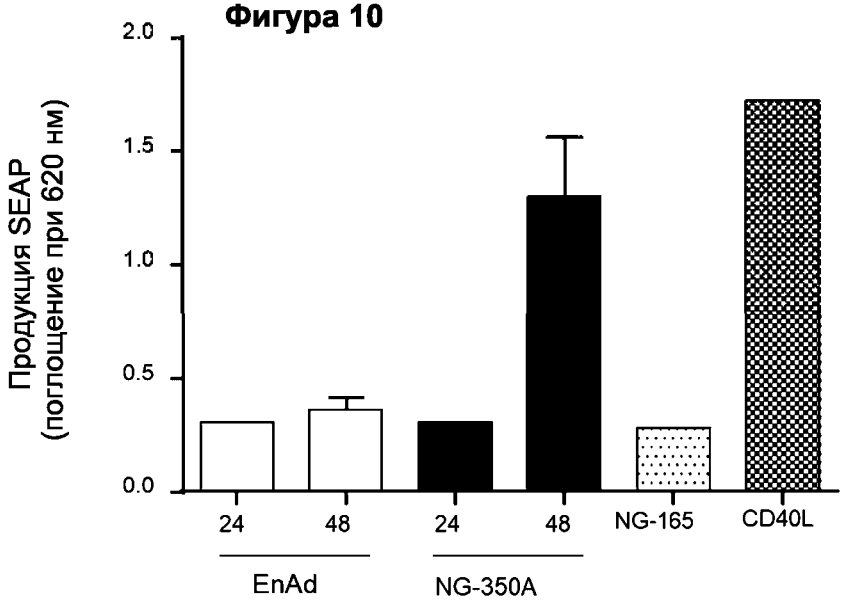
Фигура 9


A
EnAd
NG-350A B1
[IgG2](нг/1×10⁶ клеток)
4000
3000
2000
1000
0
Н.о.
Н.о.
Н.о.
24
48
72
Время после инфекции (ч)

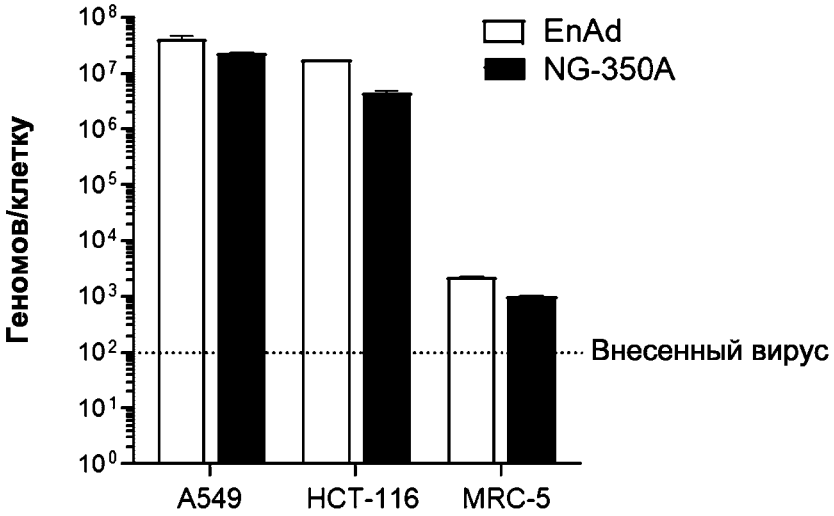

B
EnAd
NG-350A B2
[IgG2](нг/1×10⁶ клеток)
2000
1500
1000
500
0
Н.о.
Н.о.
Н.о.
24
48
72
Время после инфекции (ч)


C
24 ч.
48 ч.
72 ч.
Положит. контроль (антитело против CD40)
Поглощение при 450 нм
3
2
1
0
Н.о.
EnAd
NG-350A B1
NG-350A B2
П.к.

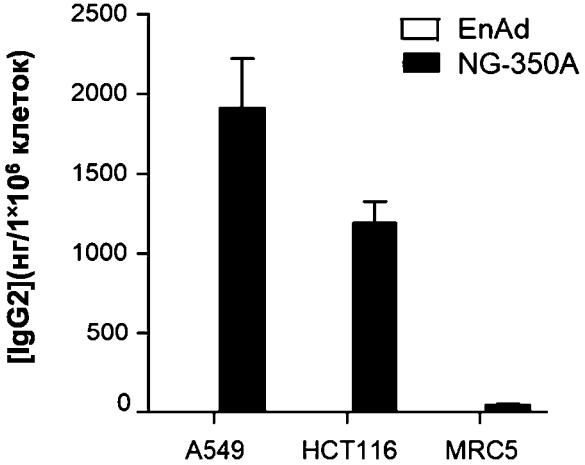
Фигура 10



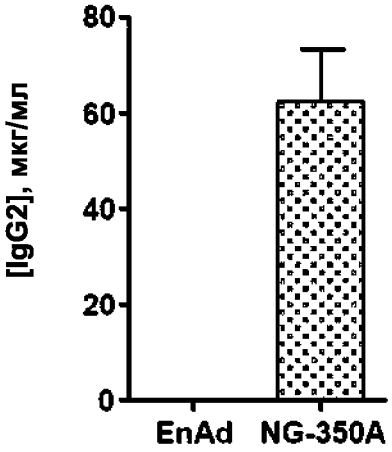
Фигура 11A



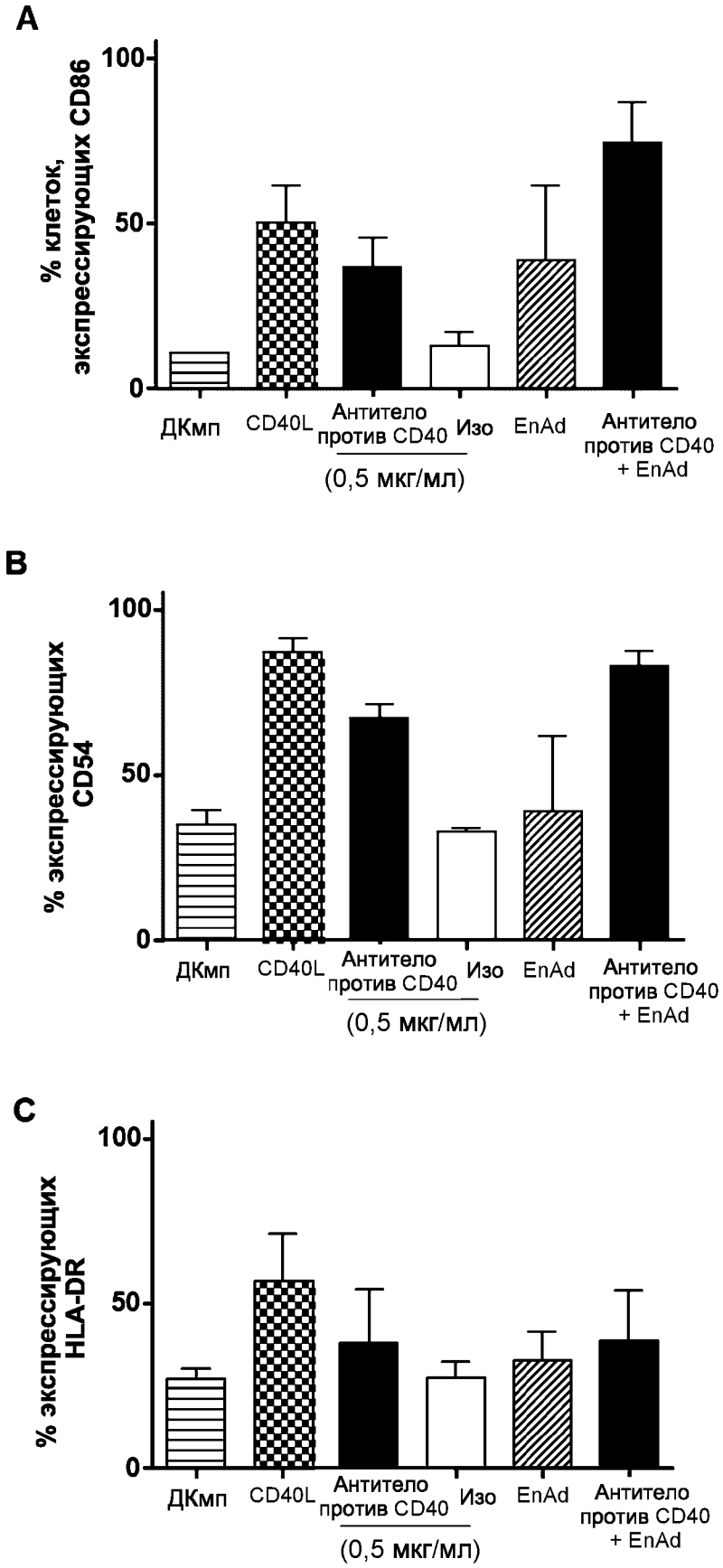
Фигура 11B



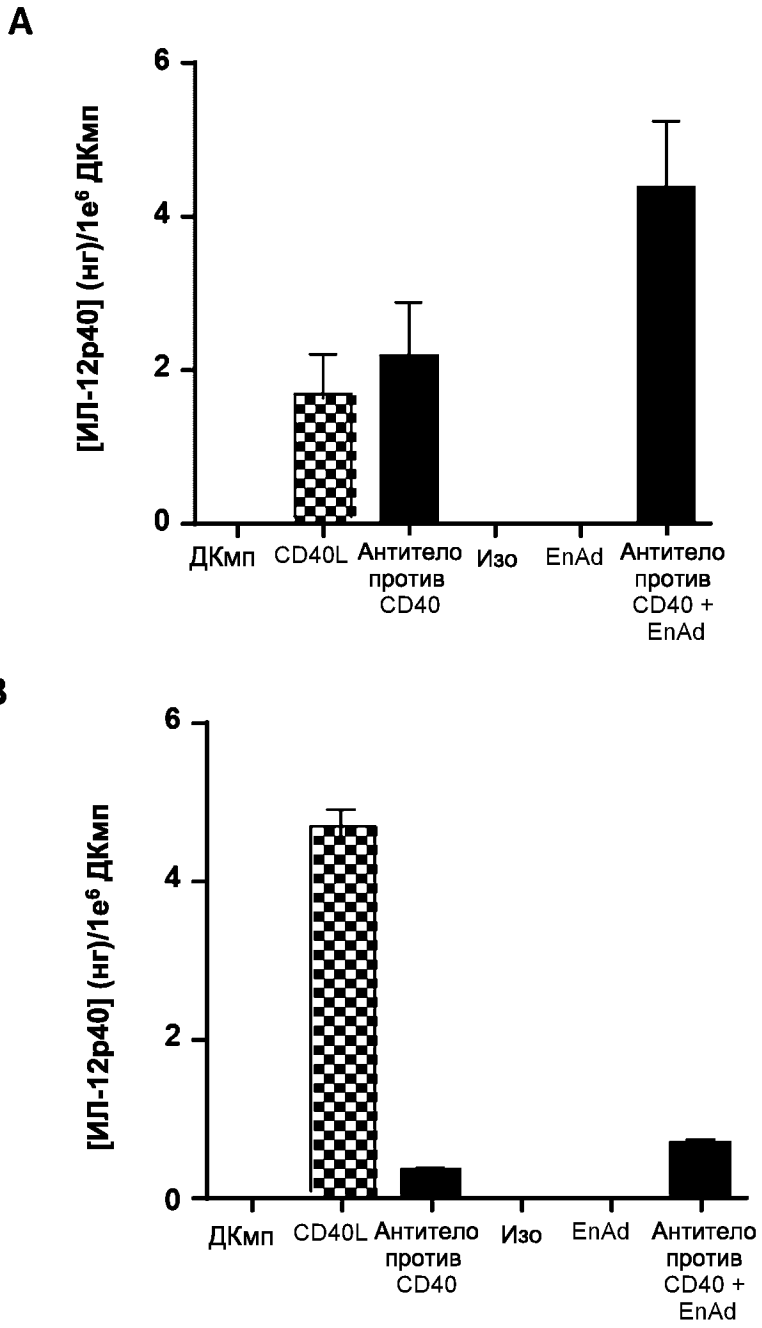
Фигура 12



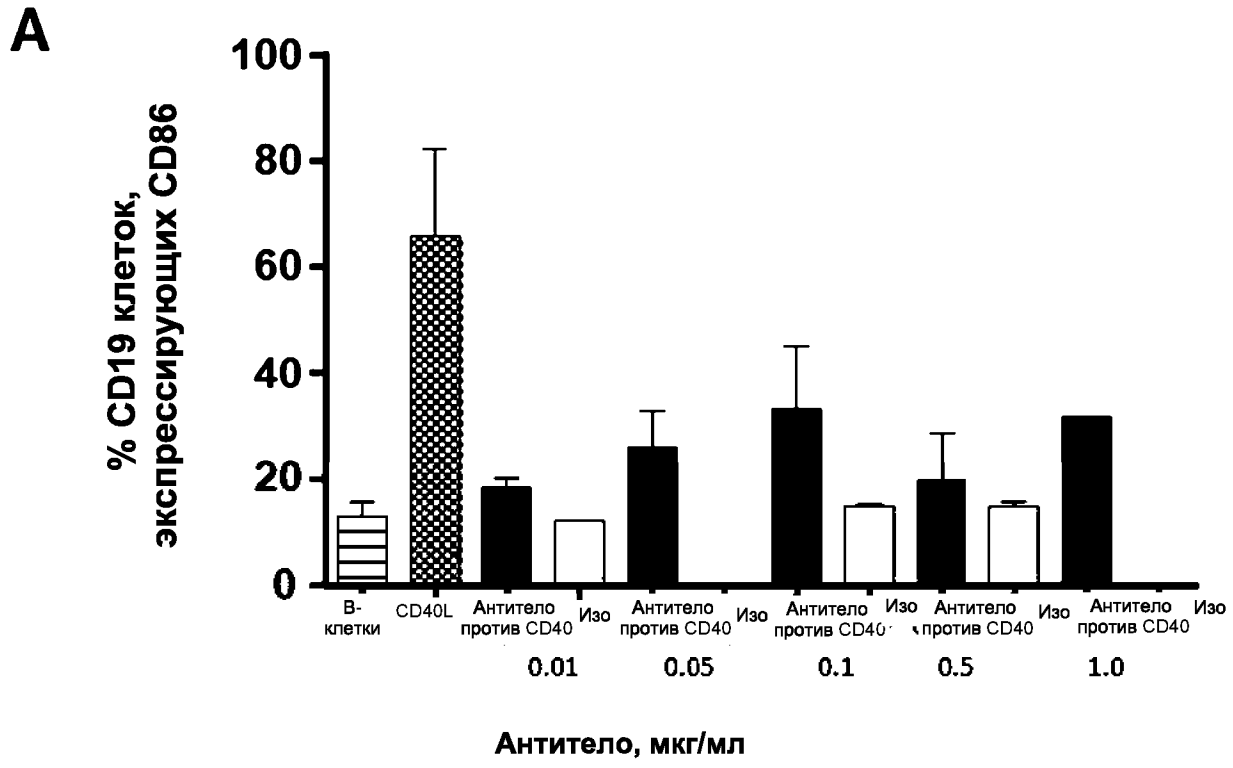
Фигура 13

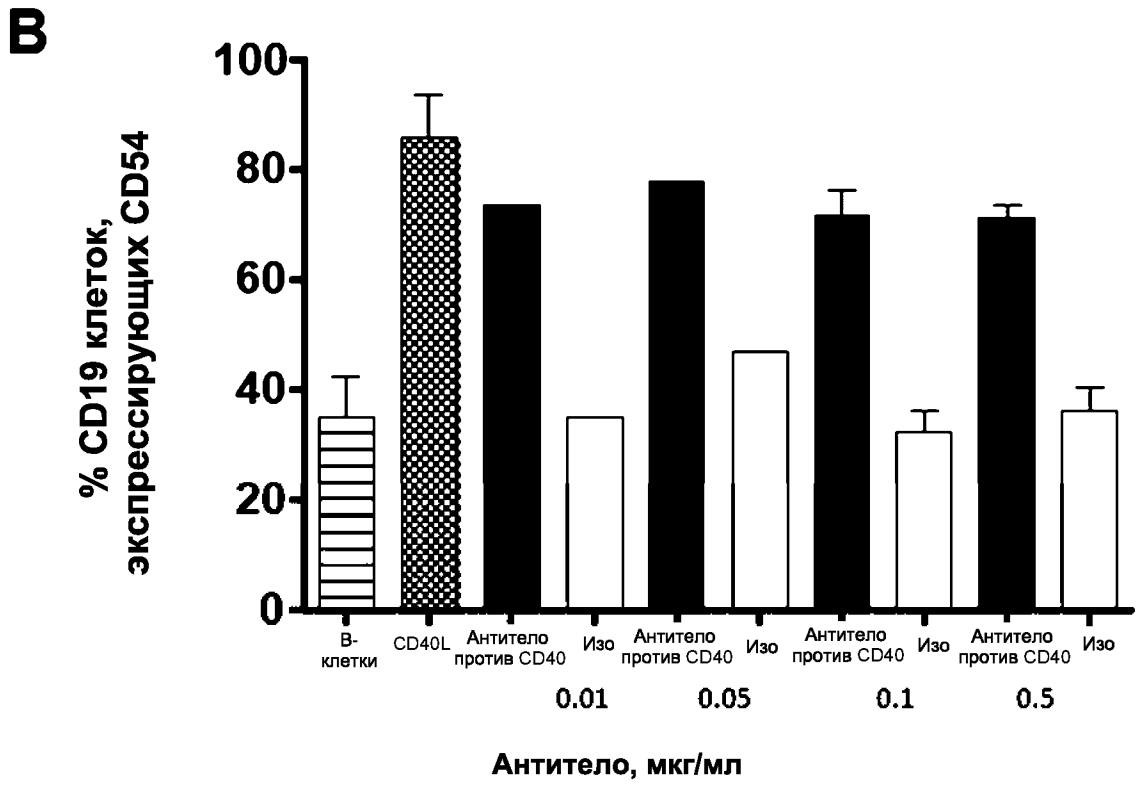

A
% клеток, экспрессирующих CD86
100
50
0
ДКмп
CD40L
Антитело против CD40
Изо
EnAd
Антитело против CD40 + EnAd
(0,5 мкг/мл)
B
% экспрессирующих CD54
100
50
0
ДКмп
CD40L
Антитело против CD40
Изо
EnAd
Антитело против CD40 + EnAd
(0,5 мкг/мл)
C
% экспрессирующих HLA-DR
100
50
0
ДКмп
CD40L
Антитело против CD40
Изо
EnAd
Антитело против CD40 + EnAd
(0,5 мкг/мл)

Фигура 14


A
[ИЛ-12p40] (нг)/1e6 ДКмп
6
4
2
0
ДКмп
CD40L
Антитело против CD40
Изо
EnAd
Антитело против CD40 + EnAd
B
[ИЛ-12p40] (нг)/1e6 ДКмп
6
4
2
0
ДКмп
CD40L
Антитело против CD40
Изо
EnAd
Антитело против CD40 + EnAd

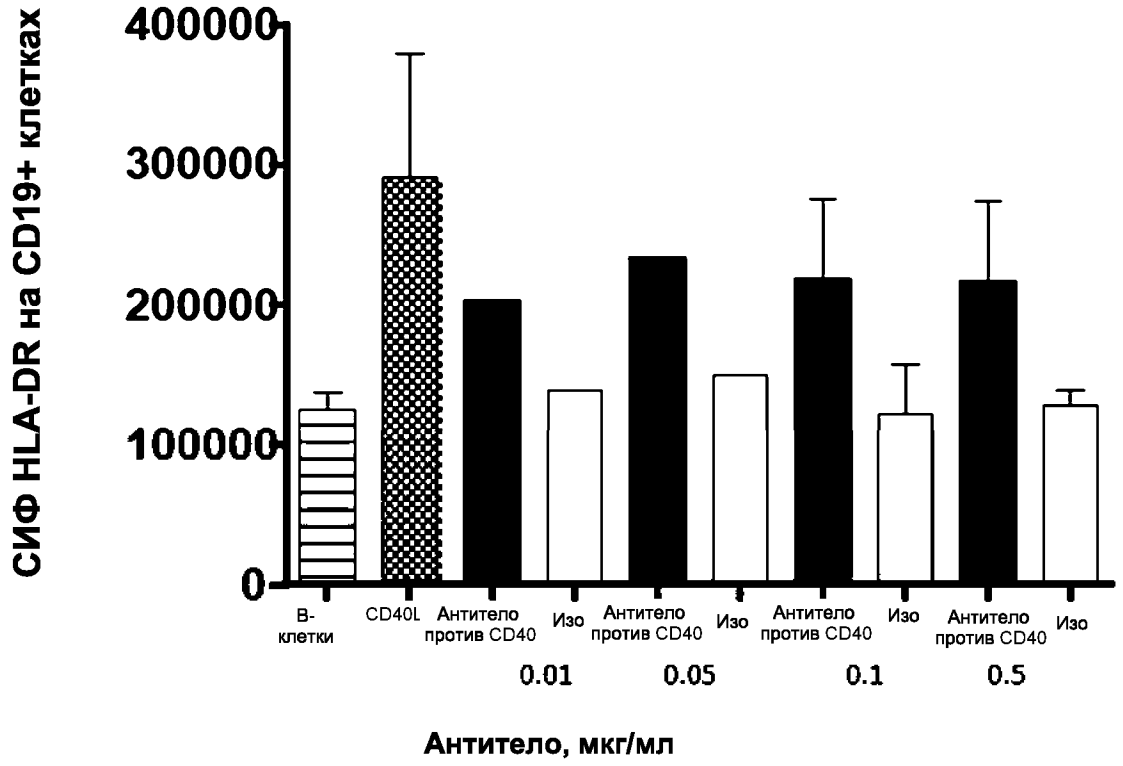
Фигура 15


A
% CD19 клеток, экспрессирующих CD86
100
80
60
40
20
0
В-клетки
CD40L
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
0.01
0.05
0.1
0.5
1.0
Антитело, мкг/мл

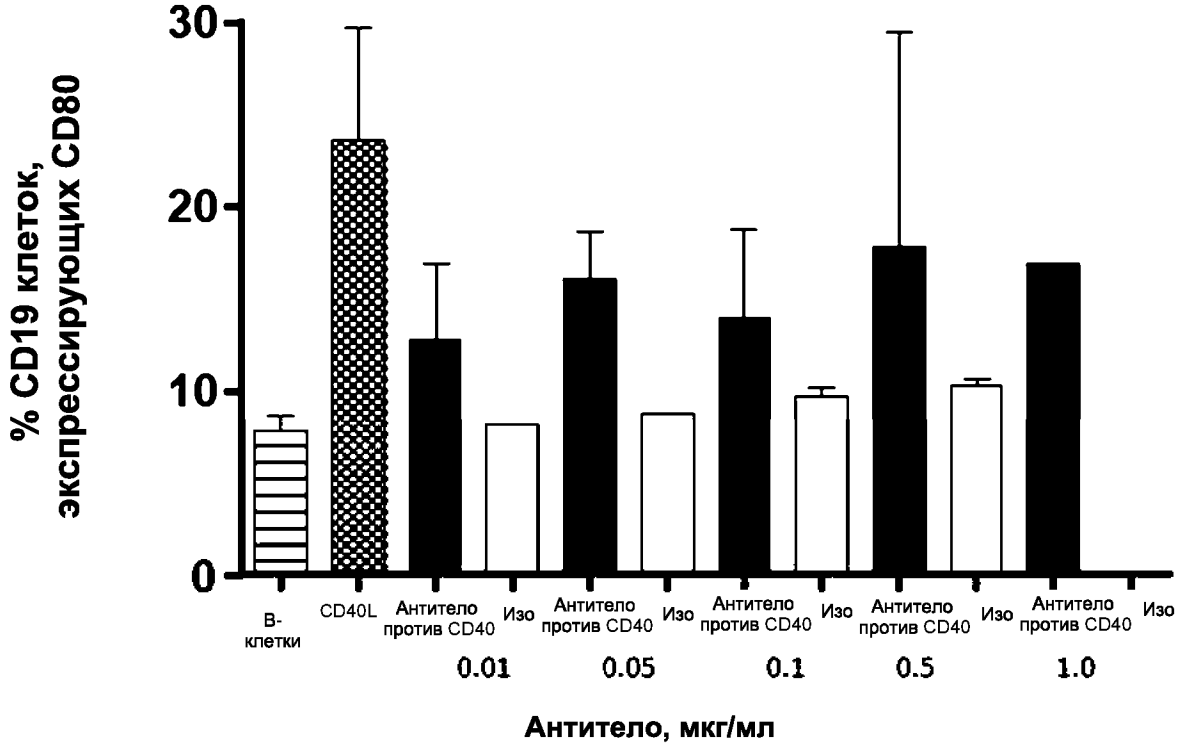

B
% CD19 клеток, экспрессирующих CD54
100
80
60
40
20
0
В-клетки
CD40L
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
0.01
0.05
0.1
0.5
Антитело, мкг/мл

Фигура 15

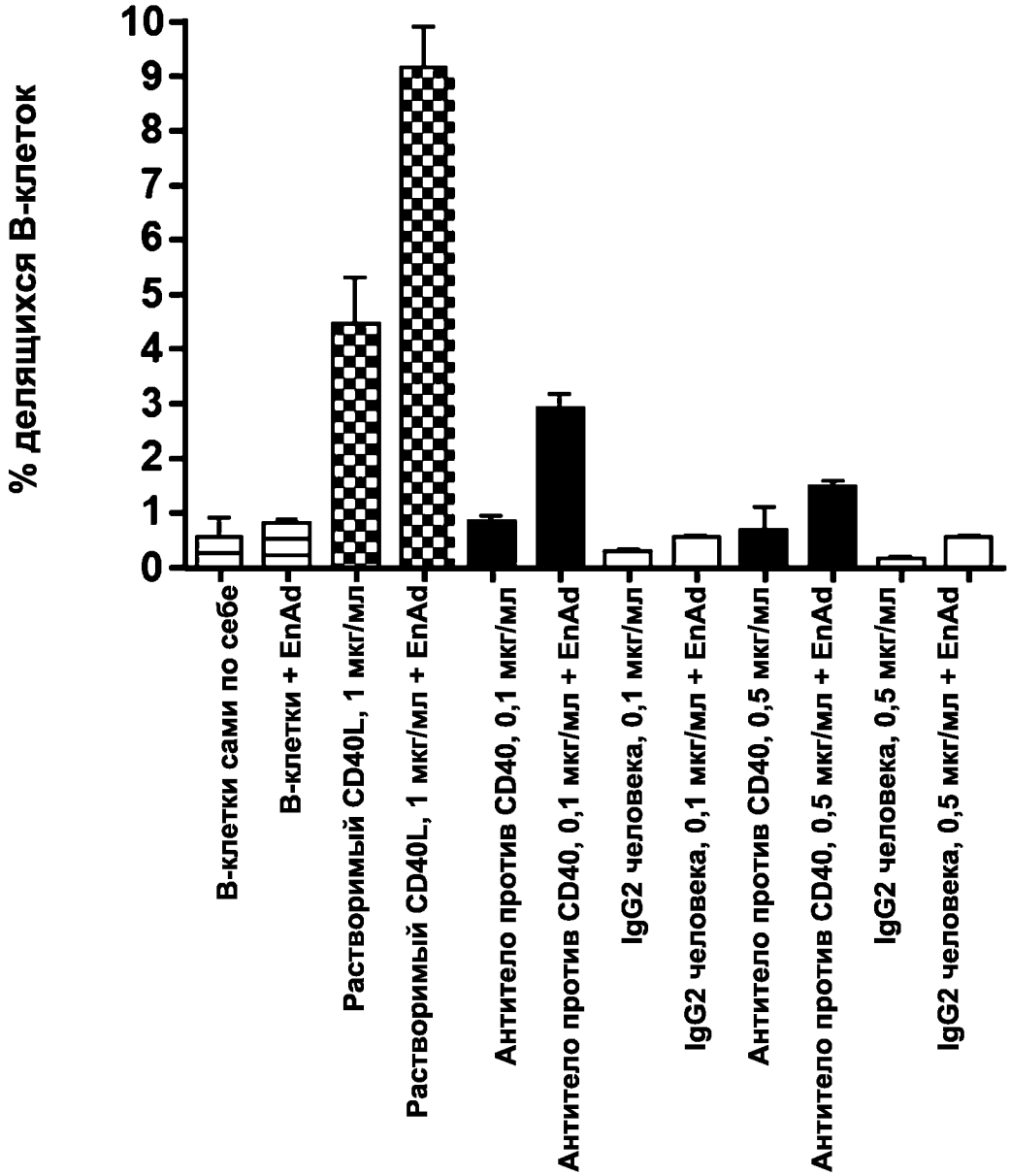
C


СИФ HLA-DR на CD19+ клетках
400000
300000
200000
100000
0
В-клетки
CD40L
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
0.01
0.05
0.1
0.5
Антитело, мкг/мл

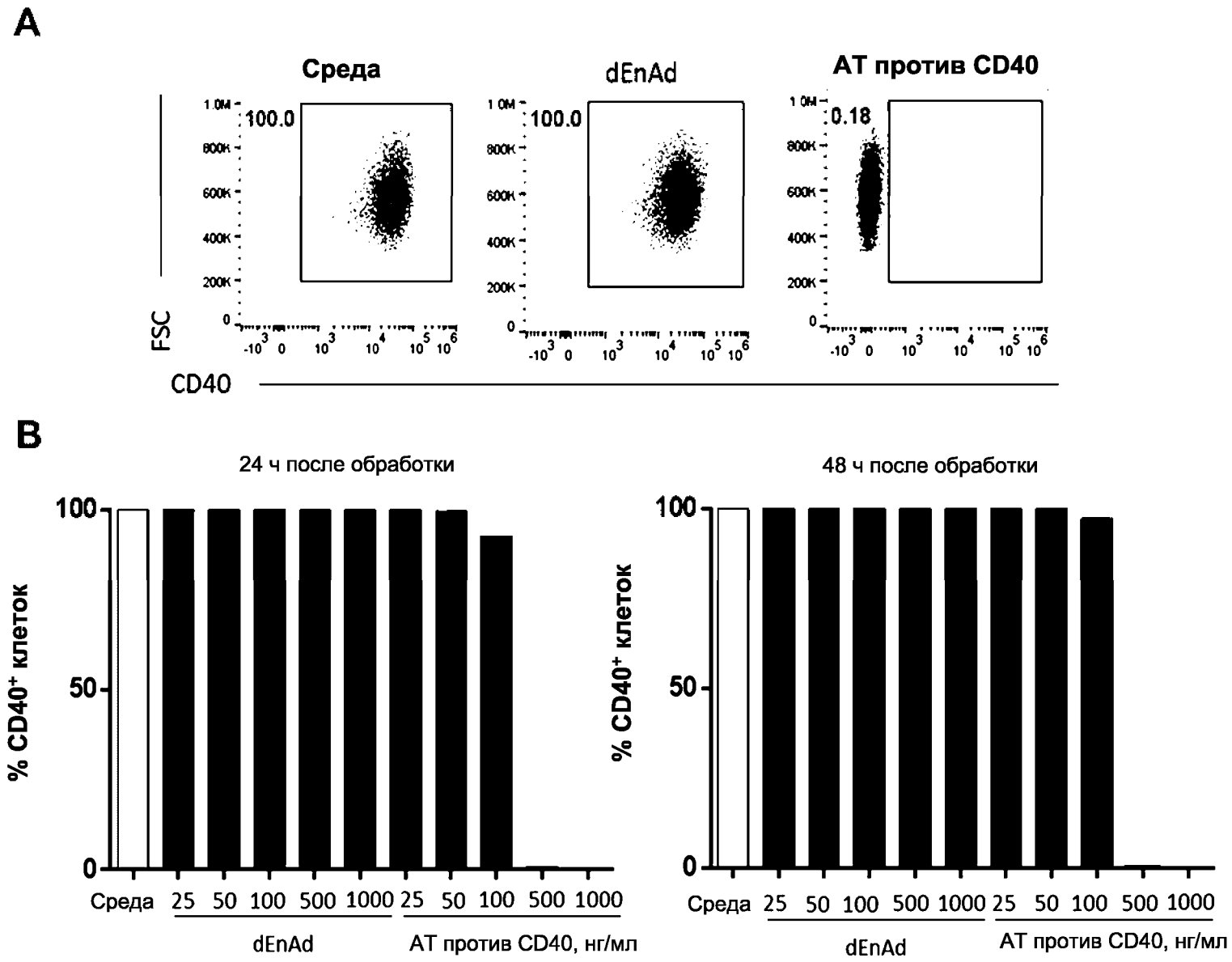
D


% CD19 клеток, экспрессирующих CD80
30
20
10
0
В-клетки
CD40L
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
Антитело против CD40
Изо
0.01
0.05
0.1
0.5
1.0
Антитело, мкг/мл

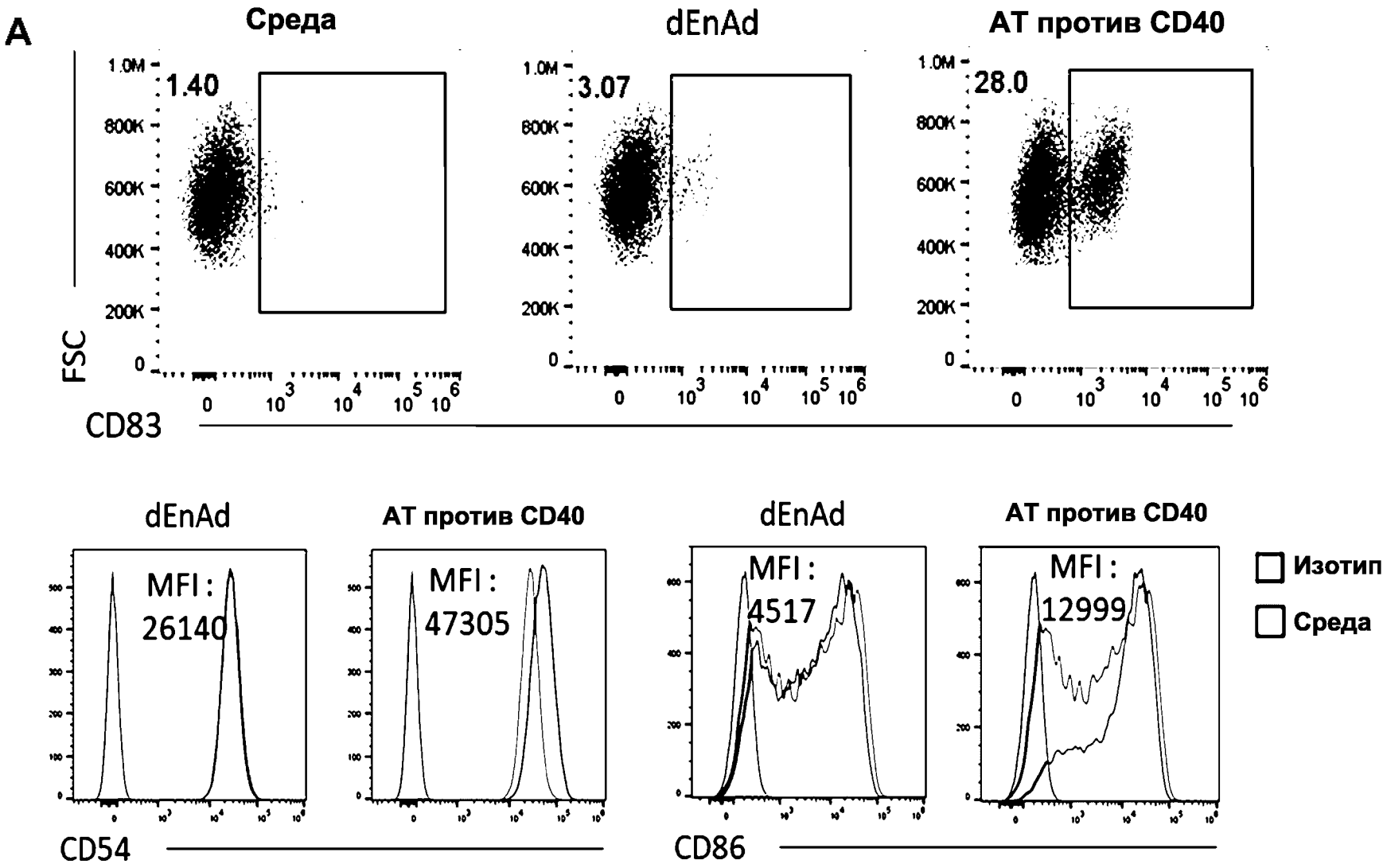
Фигура 16


% делящихся В-клеток
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
В-клетки сами по себе
В-клетки + EnAd
Растворимый CD40L, 1 мкг/мл
Растворимый CD40L, 1 мкг/мл + EnAd
Антитело против CD40, 0,1 мкг/мл
Антитело против CD40, 0,1 мкг/мл + EnAd
IgG2 человека, 0,1 мкг/мл
IgG2 человека, 0,1 мкг/мл + EnAd
Антитело против CD40, 0,5 мкг/мл
Антитело против CD40, 0,5 мкг/мл + EnAd
IgG2 человека, 0,5 мкг/мл
IgG2 человека, 0,5 мкг/мл + EnAd

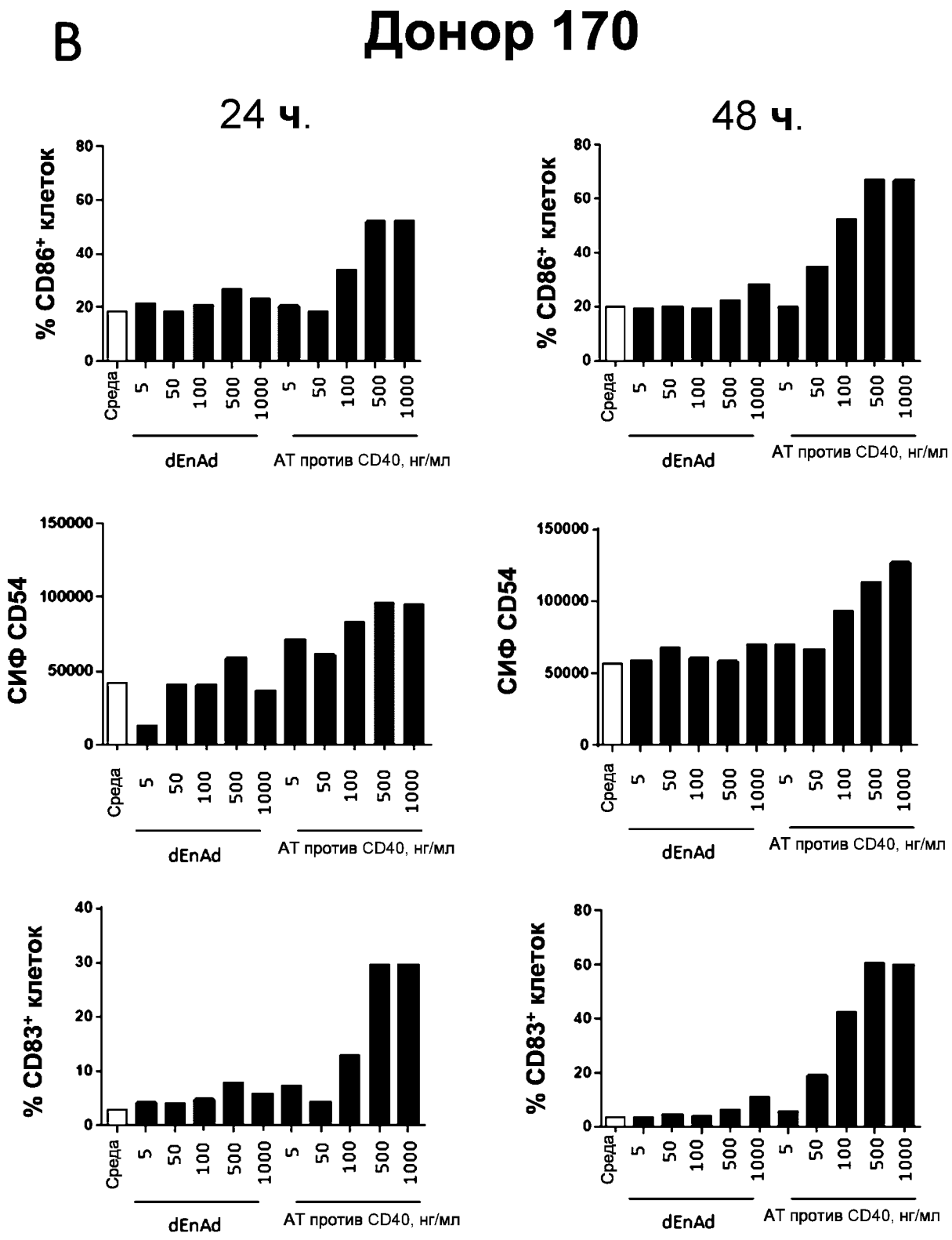
Фигура 17


A
Среда
dEnAd
АТ против CD40
100.0
100.0
0.18
FSC
CD40
B
24 ч после обработки
48 ч после обработки
% CD40⁺ клеток
100
50
0
Среда 25 50 100 500 1000 25 50 100 500 1000
dEnAd
АТ против CD40, нг/мл

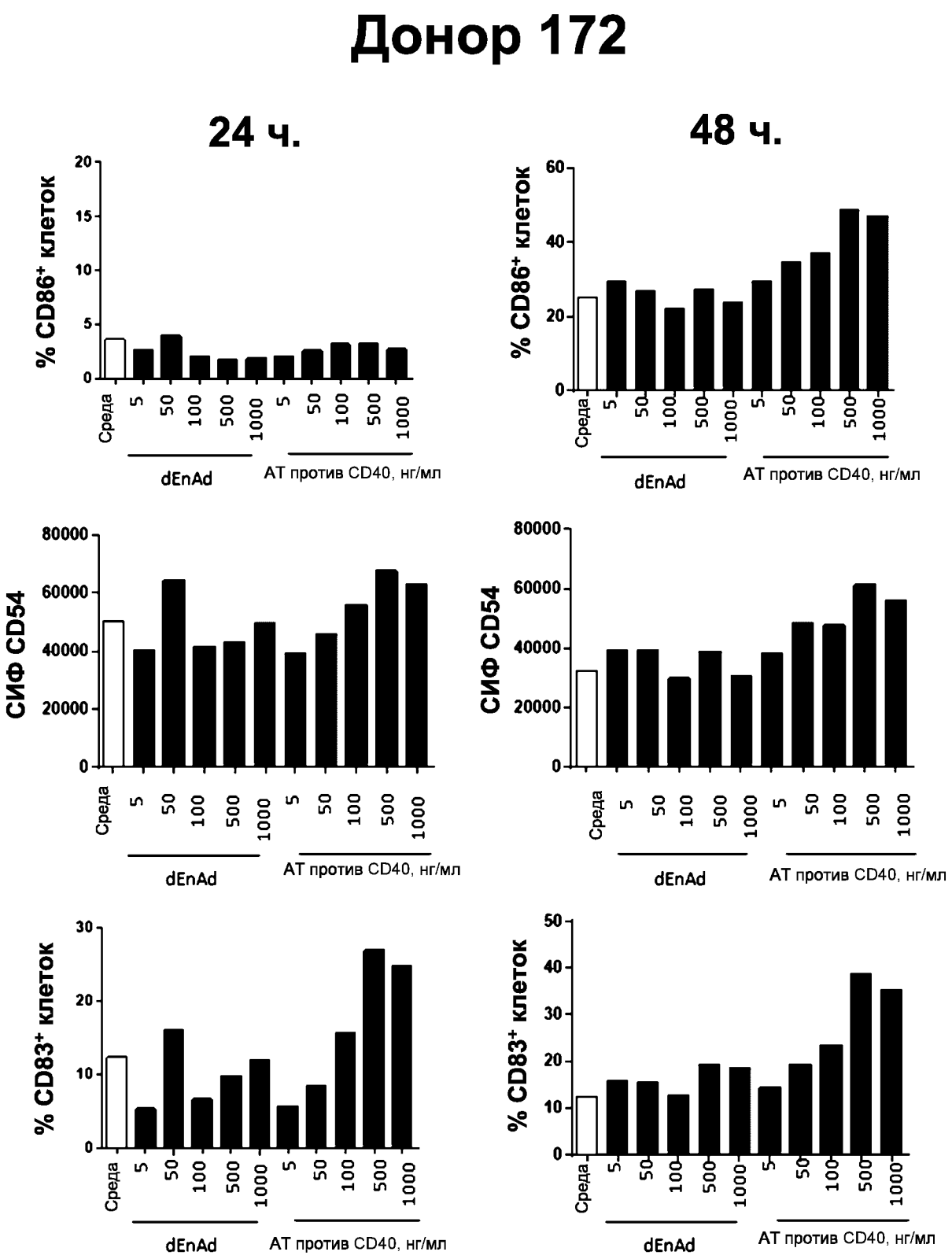
Фигура 18


A
Среда
dEnAd
AT против CD40
1.40
3.07
28.0
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
FSC
CD83
dEnAd
AT против CD40
dEnAd
AT против CD40
MFI : 26140
MFI : 47305
MFI : 4517
MFI : 12999
CD54
CD86
Изотип
Среда

Фигура 18

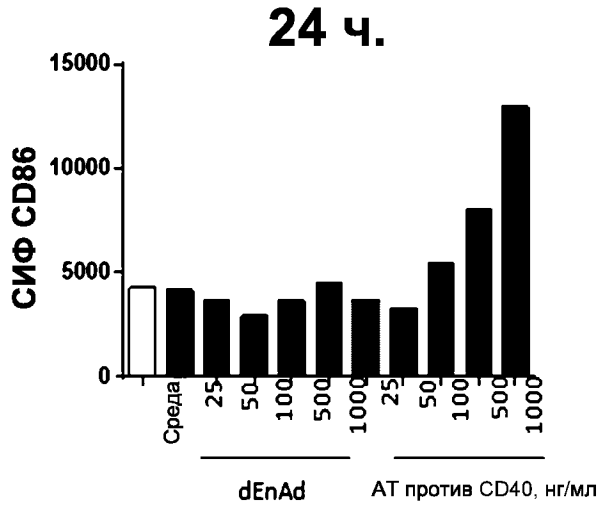

B
Донор 170
24 ч.
48 ч.
% CD86⁺ клеток
СИФ CD54
% CD83⁺ клеток
Среда
5
50
100
500
1000
dEnAd
АТ против CD40, нг/мл

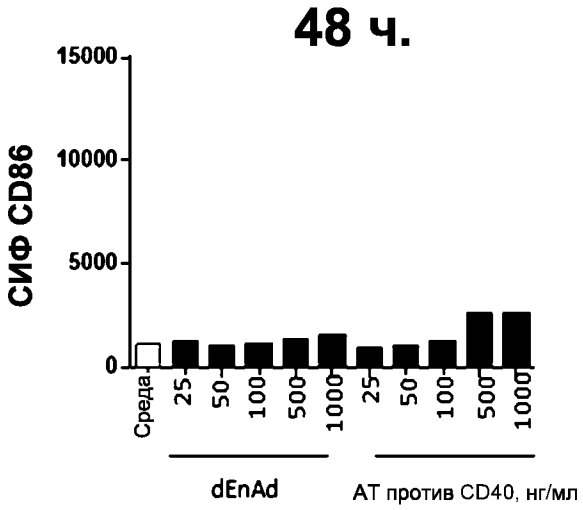
Фигура 18C

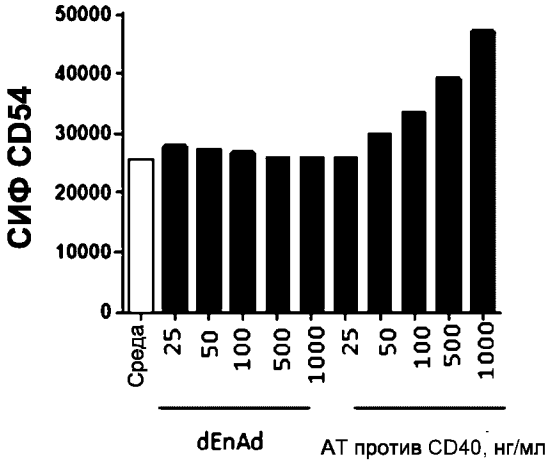

Донор 172
24 ч.
48 ч.
% CD86⁺ клеток
СИФ CD54
% CD83⁺ клеток
Среда
5
50
100
500
1000
dEnAd
АТ против CD40, нг/мл

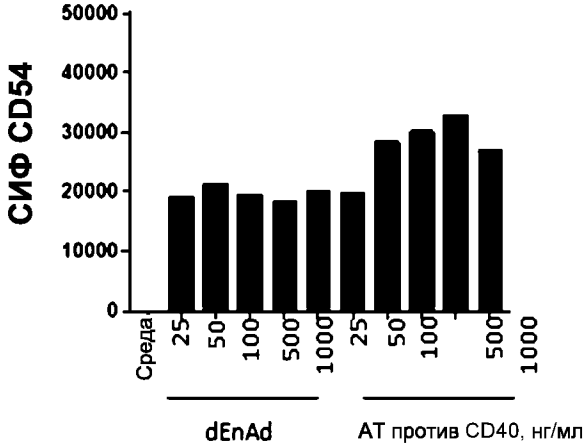
Фигура 18D

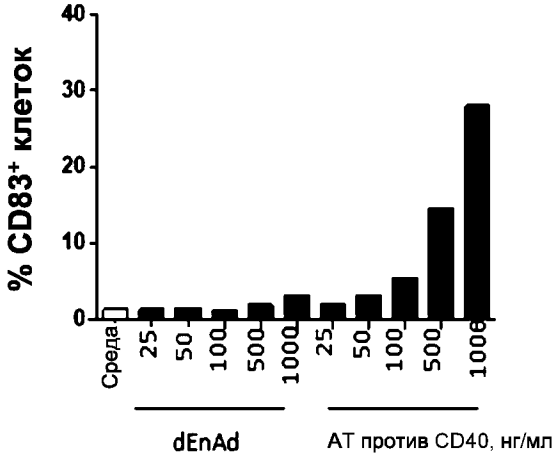
Донор 177

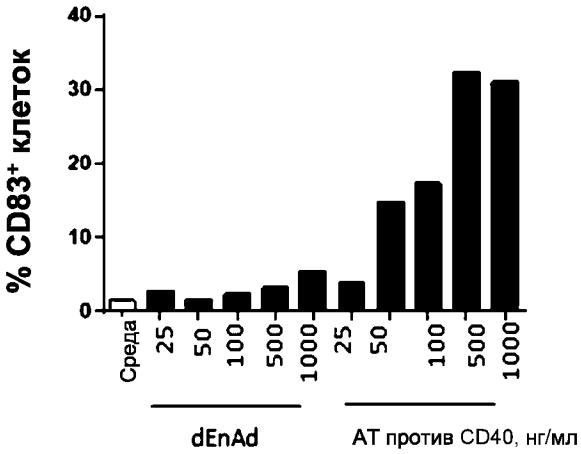




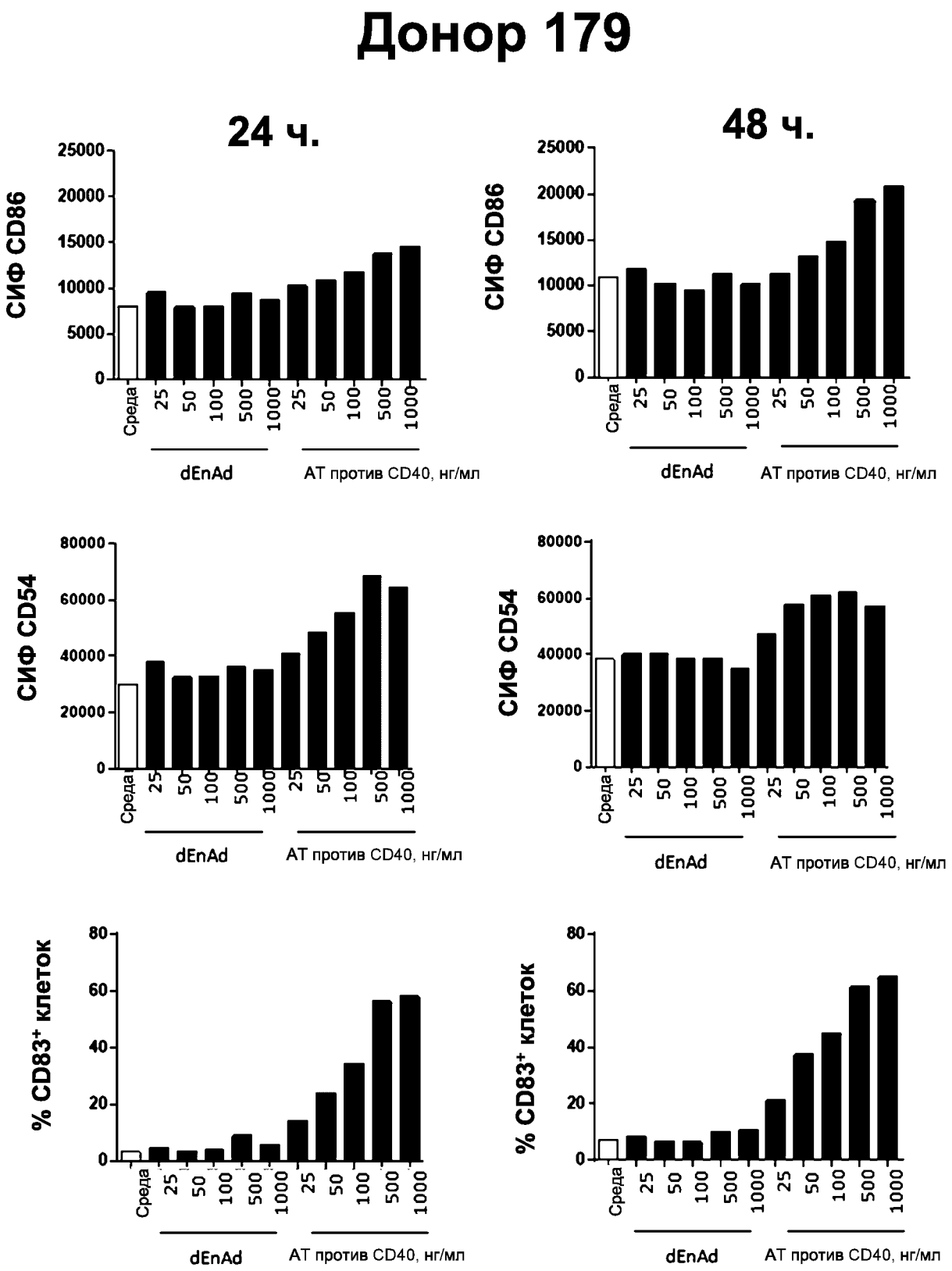




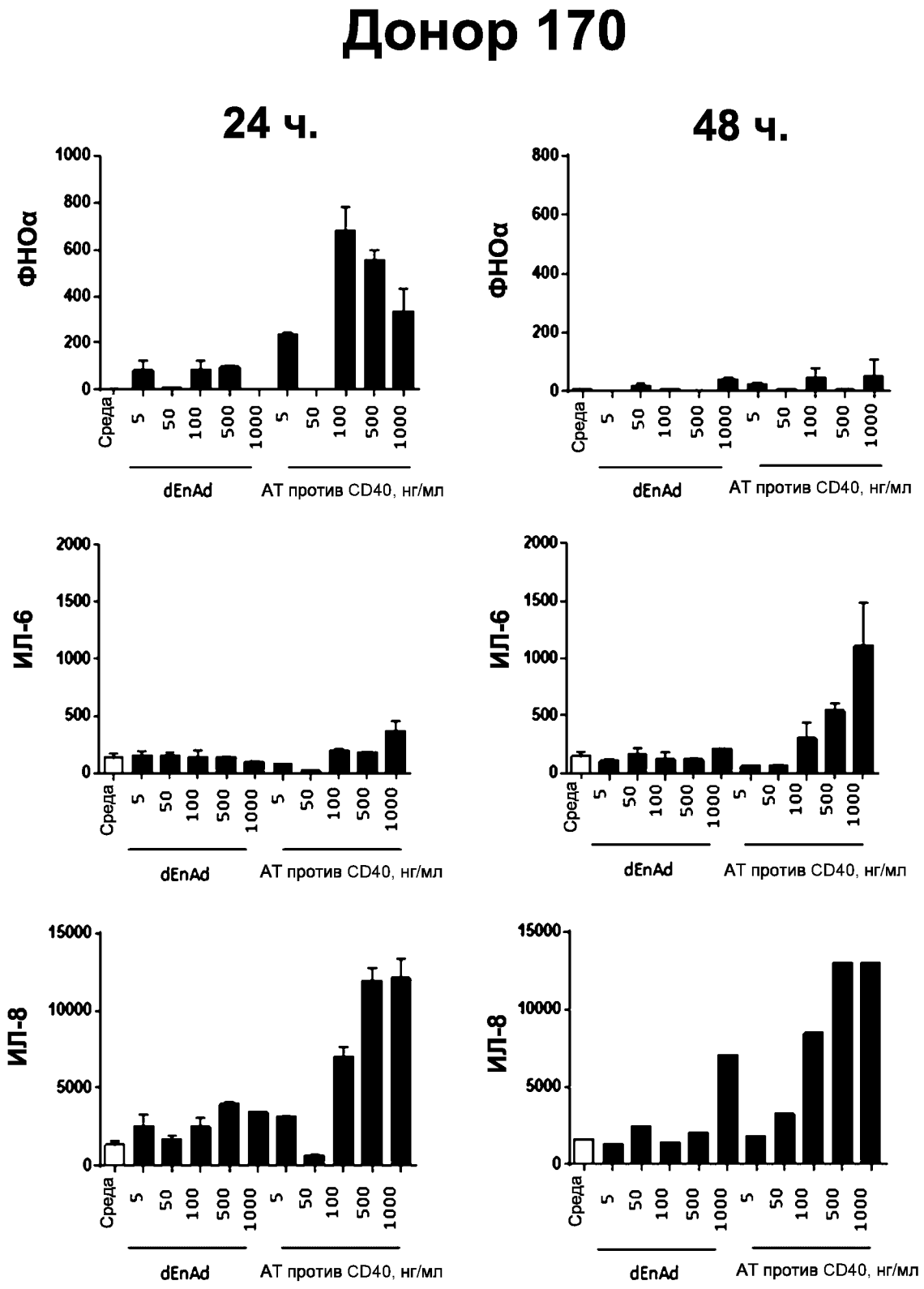




Фигура 18E

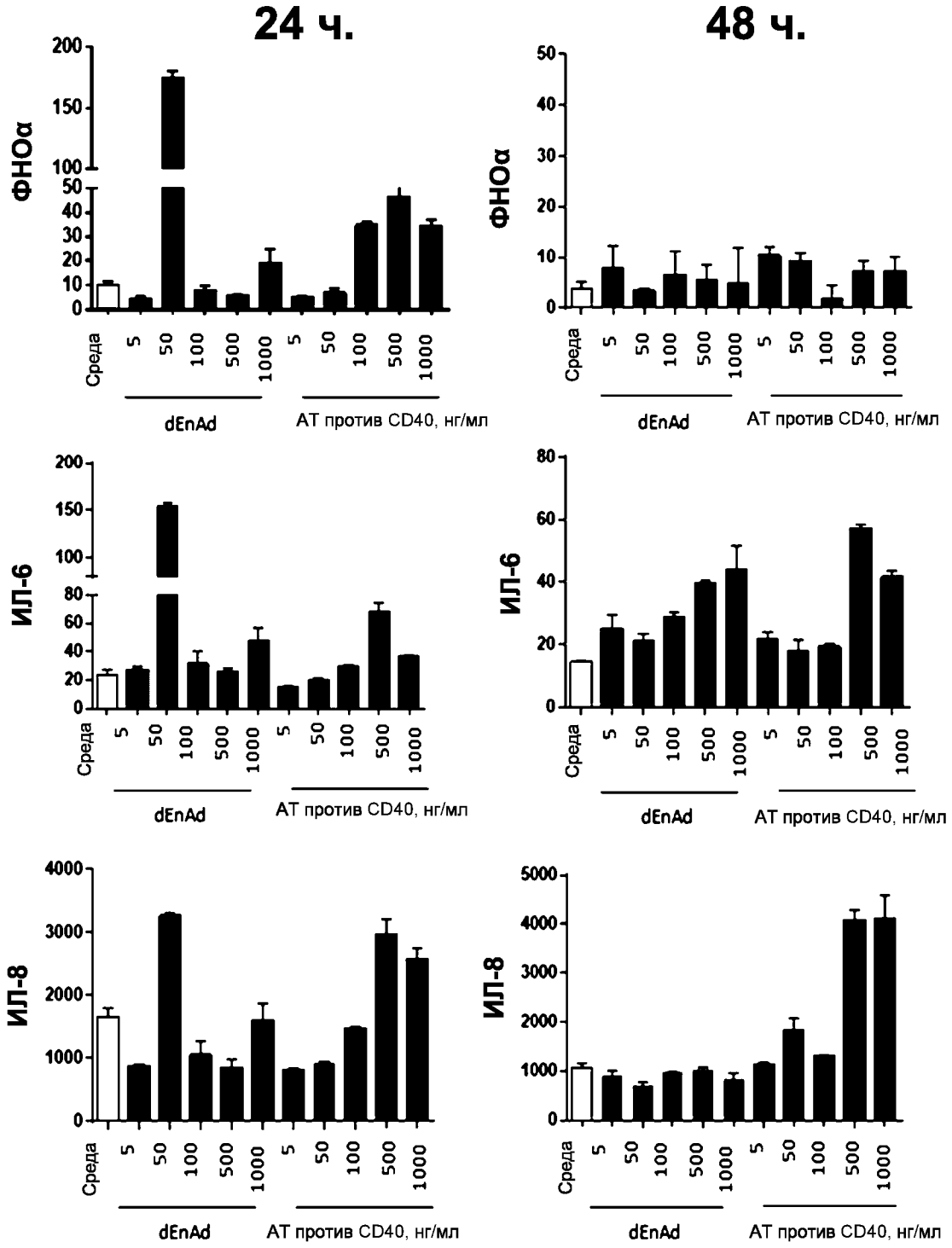

Донор 179
24 ч.
48 ч.
СИФ CD86
СИФ CD54
% CD83+ клеток
Среда
25
50
100
500
1000
dEnAd
АТ против CD40, нг/мл

Фигура 19A


Донор 170
24 ч.
48 ч.
ФНОα
ИЛ-6
ИЛ-8
Среда
5
50
100
500
1000
dEnAd
АТ против CD40, нг/мл

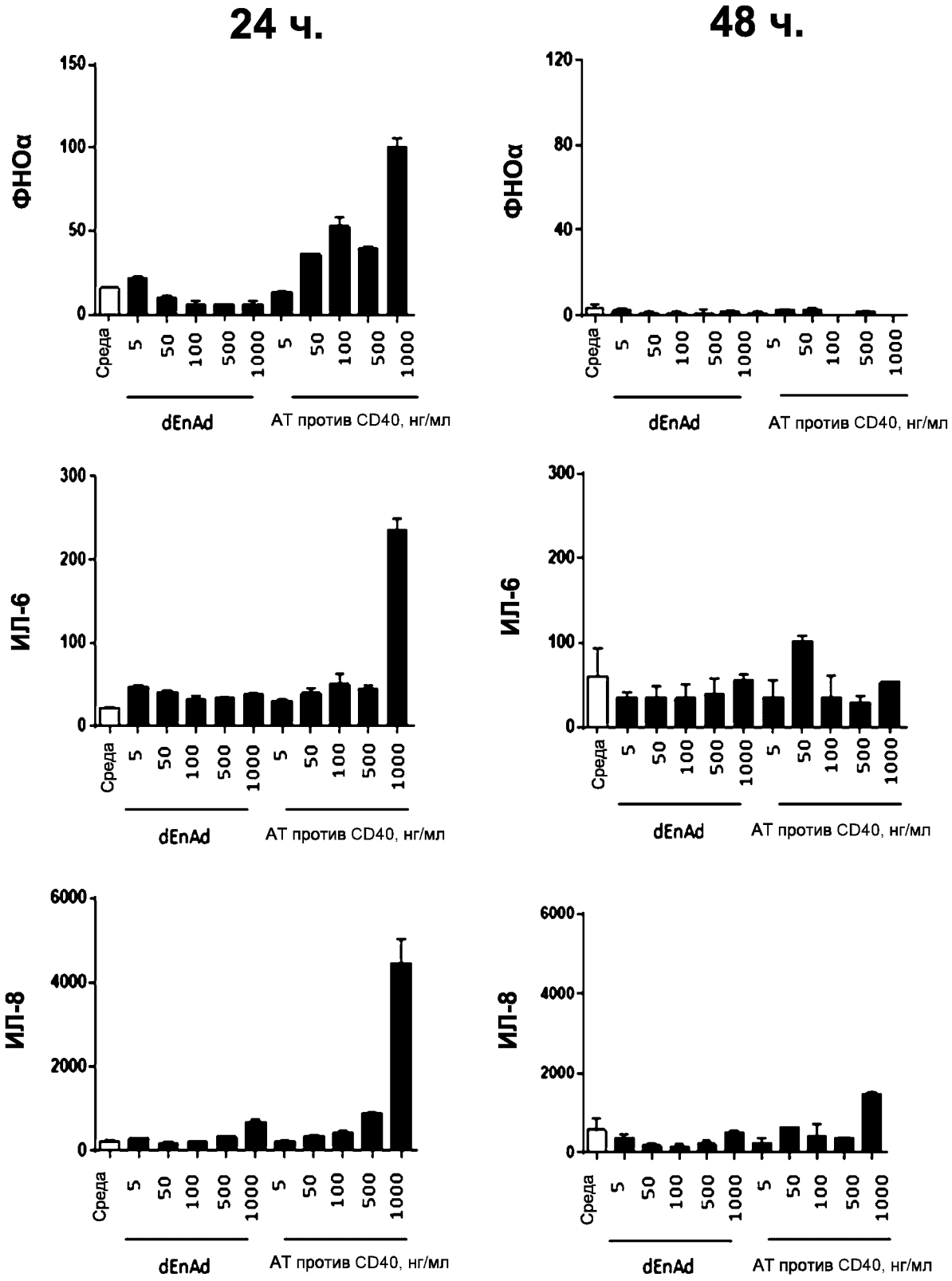
Фигура 19B

Донор 172



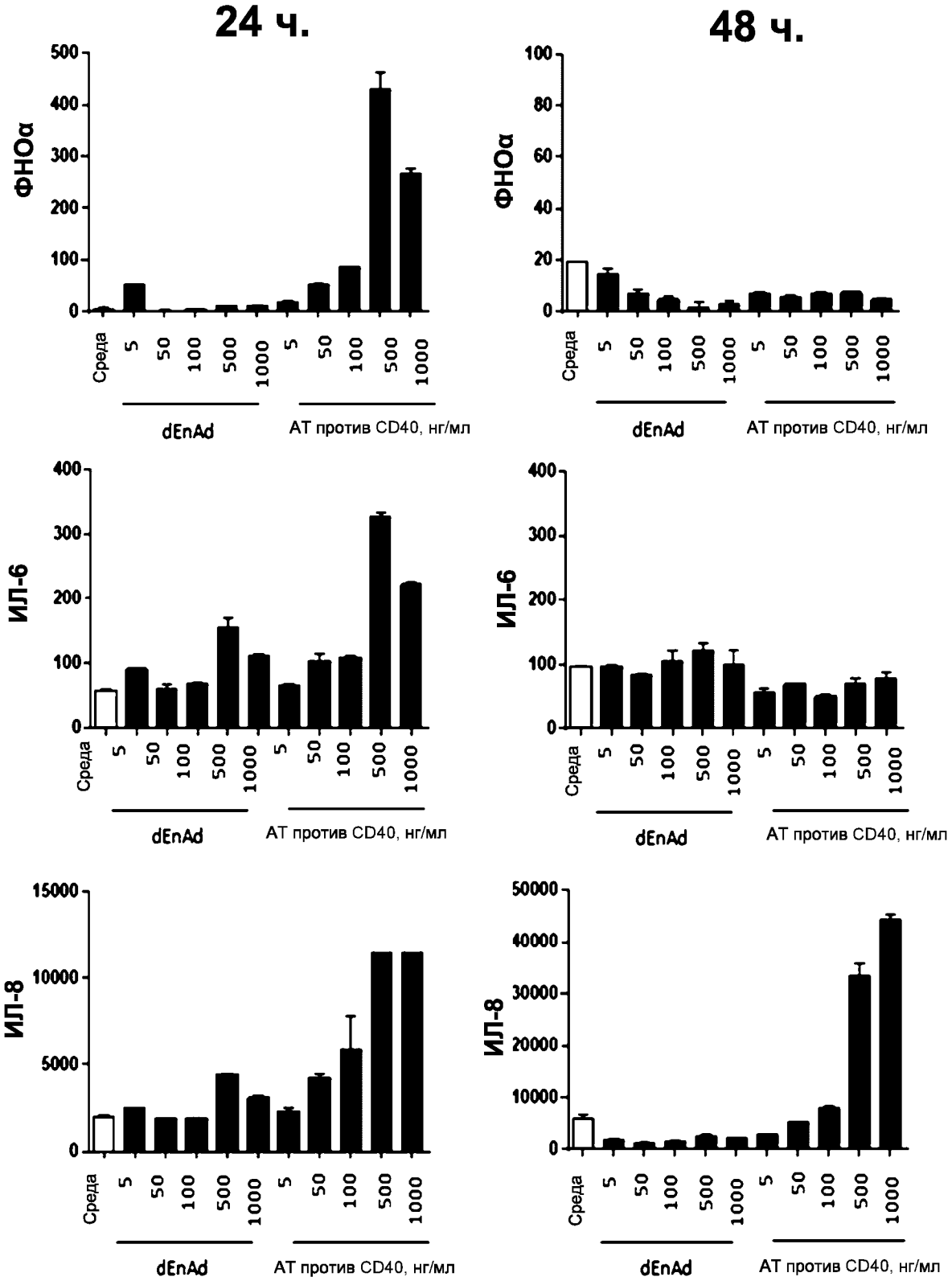
Фигура 19C

Донор 177

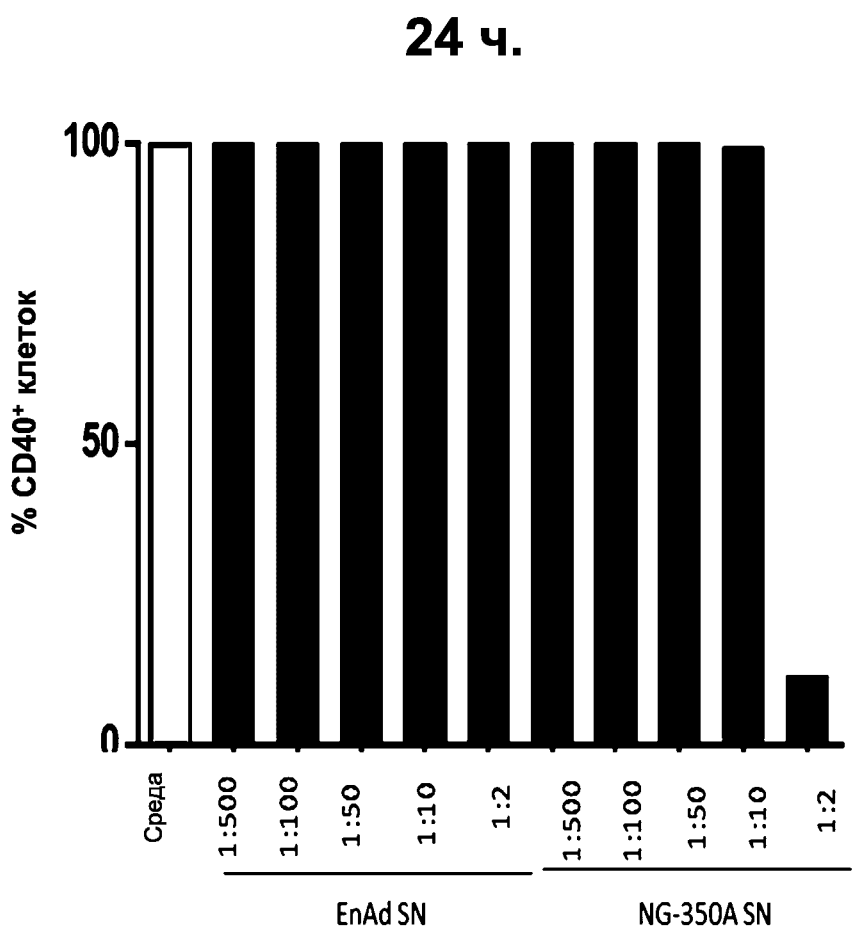


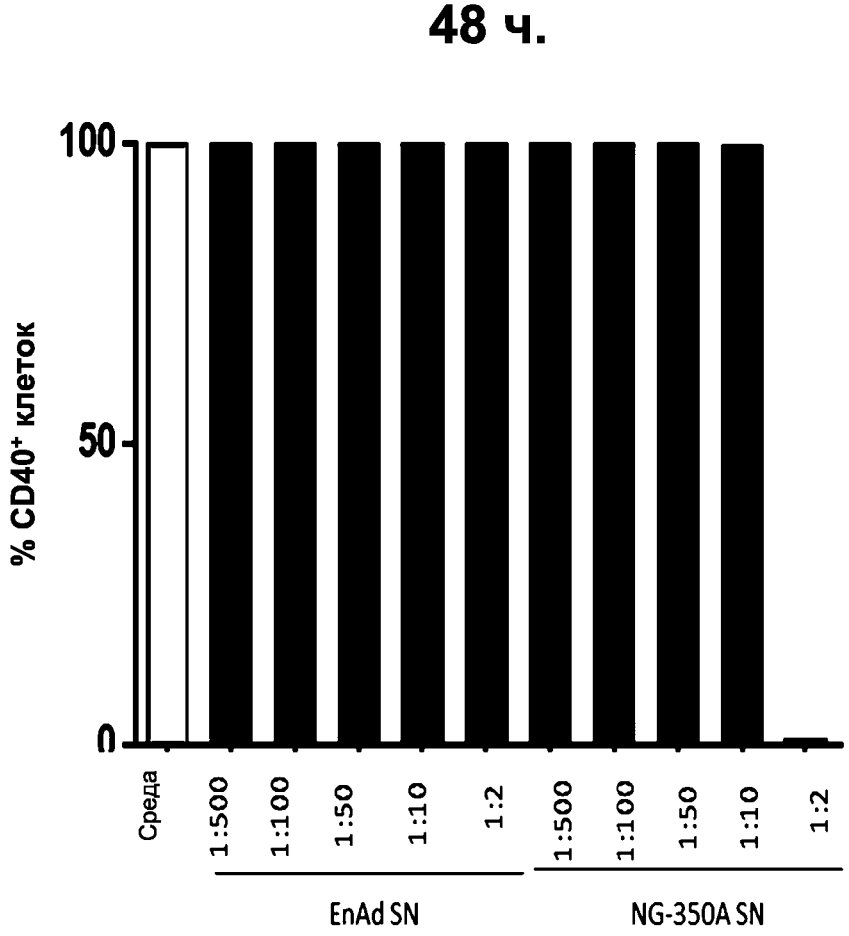
Фигура 19D

Донор 179

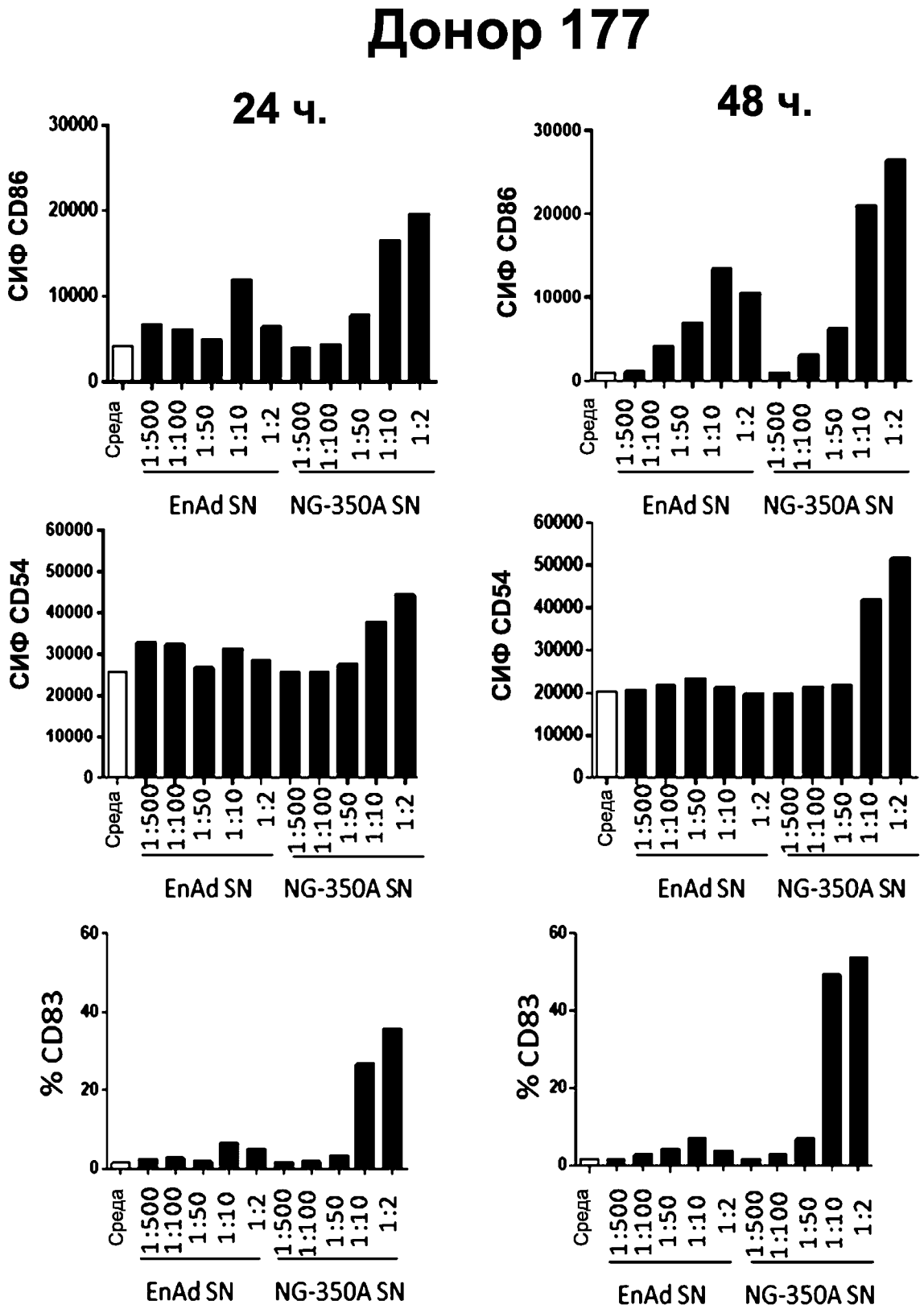


Фигура 20

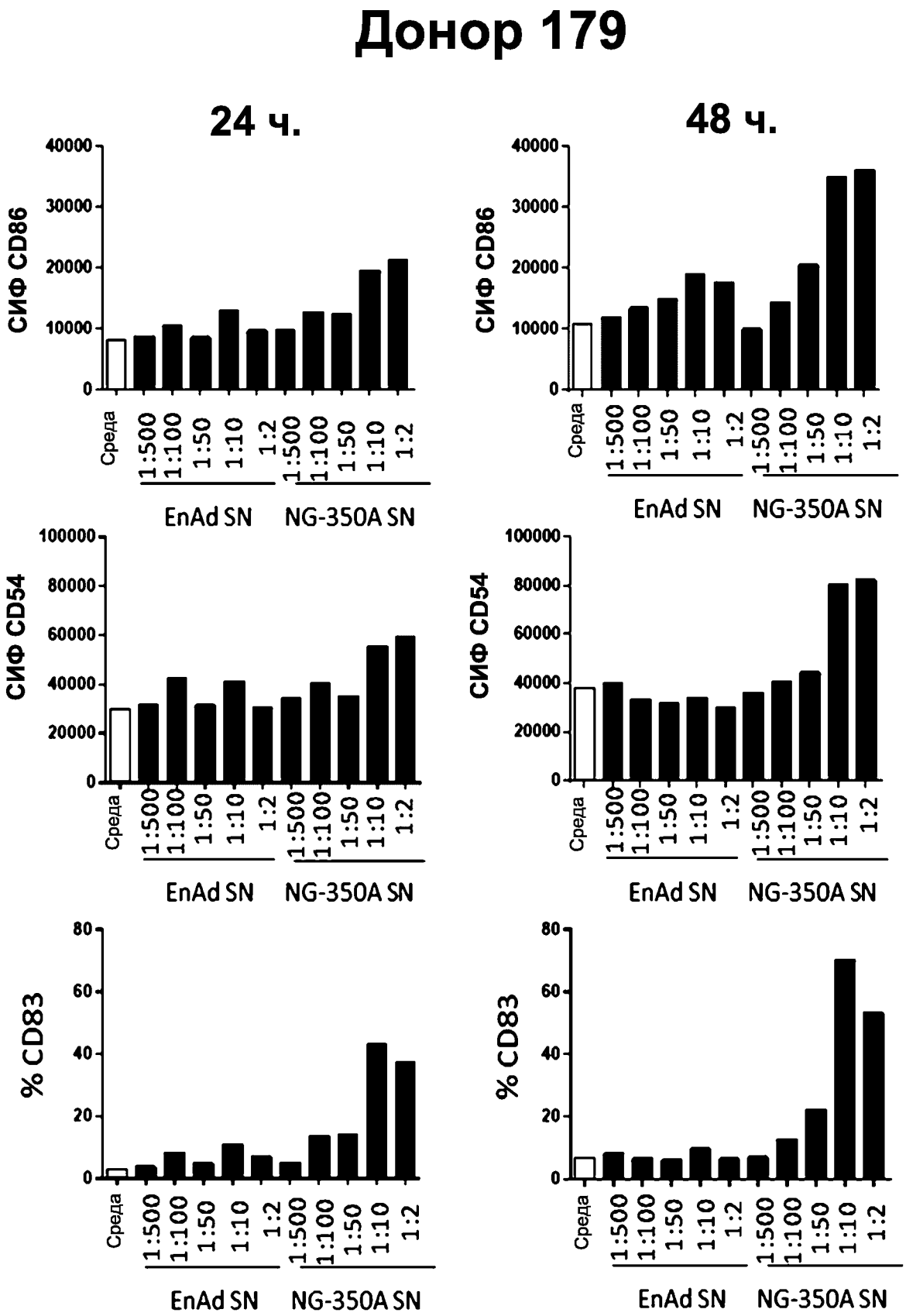

24 ч.
% CD40⁺ клеток
100
50
0
Среда
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
EnAd SN
NG-350A SN


48 ч.
% CD40⁺ клеток
100
50
0
Среда
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
EnAd SN
NG-350A SN

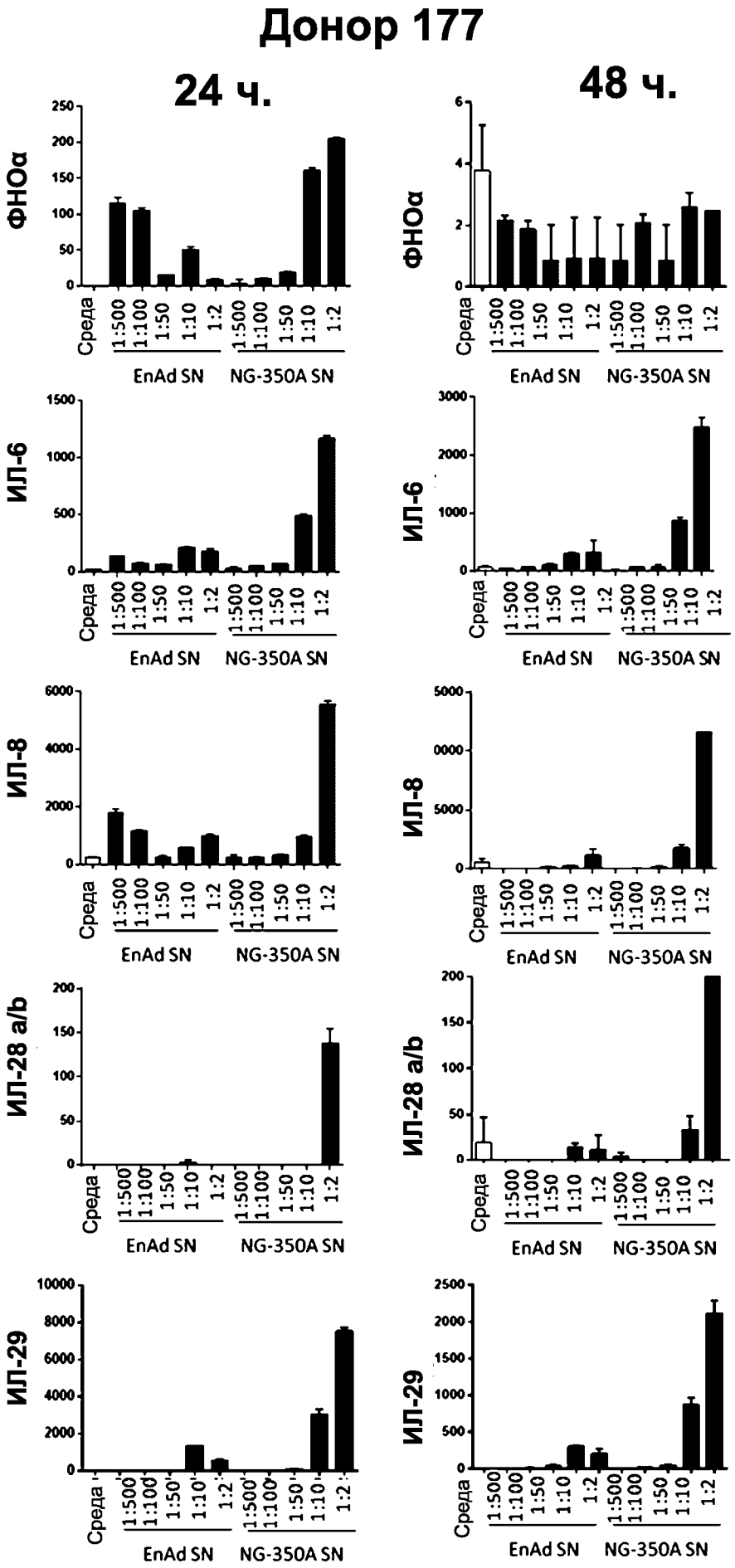
Фигура 21A


Донор 177
24 ч.
48 ч.
СИФ CD86
СИФ CD54
% CD83
Среда
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
EnAd SN
NG-350A SN

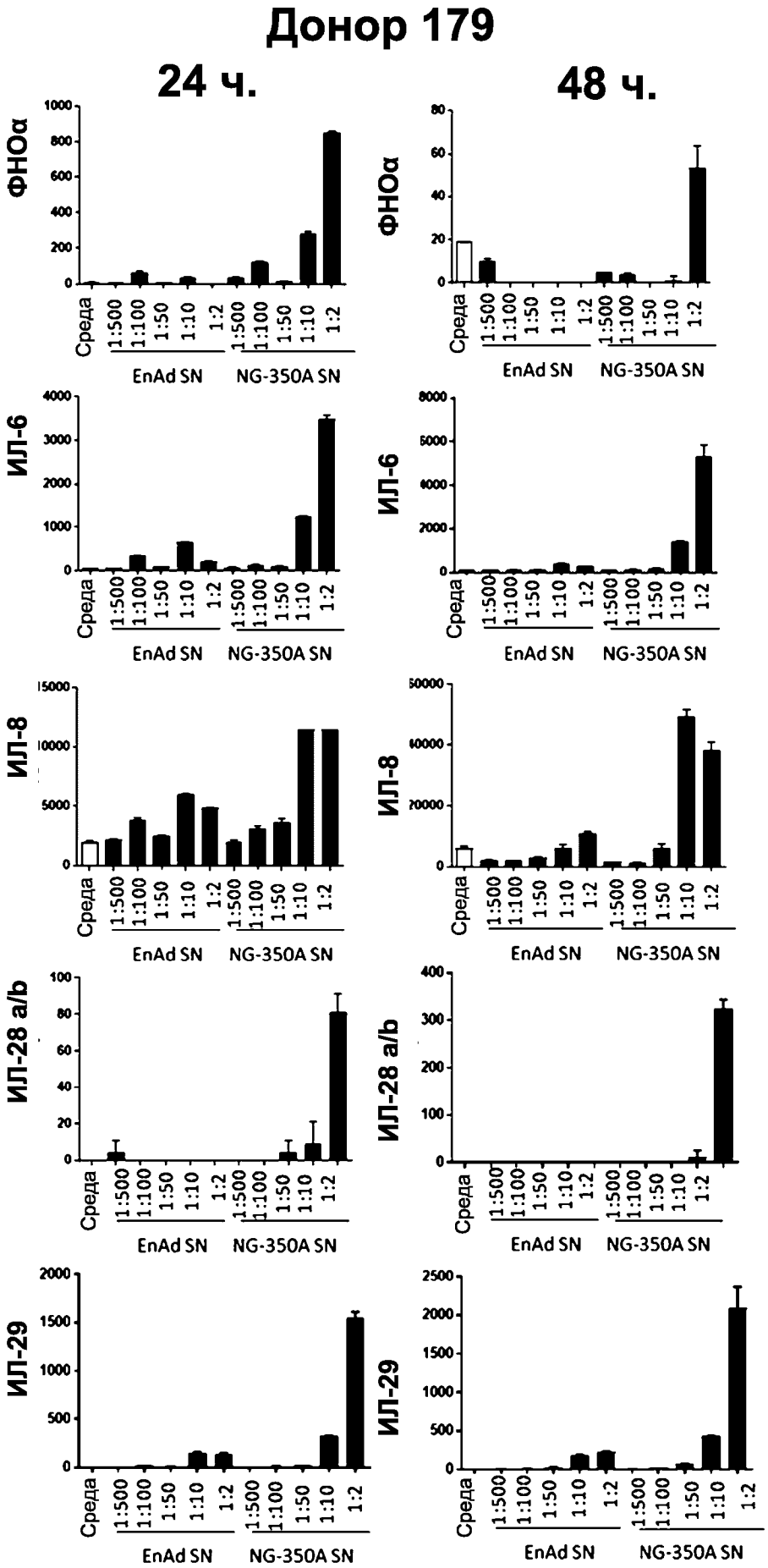
Фигура 21B


Донор 179
24 ч.
48 ч.
СИФ CD86
СИФ CD54
% CD83
Среда
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
EnAd SN
NG-350A SN

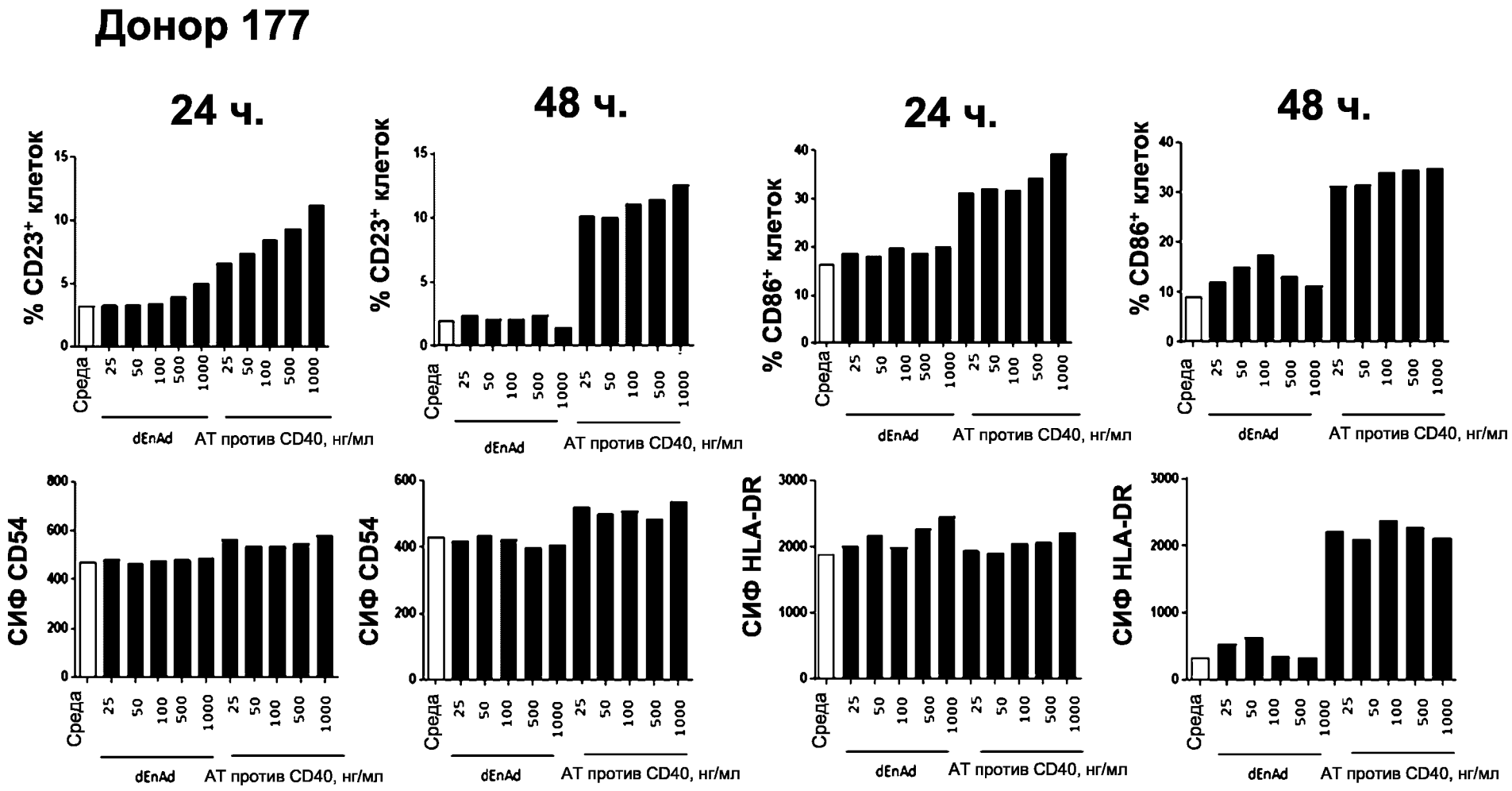
Фигура 22A


Донор 177
24 ч.
48 ч.
ФНОα
ИЛ-6
ИЛ-8
ИЛ-28 a/b
ИЛ-29
Среда
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
EnAd SN
NG-350A SN

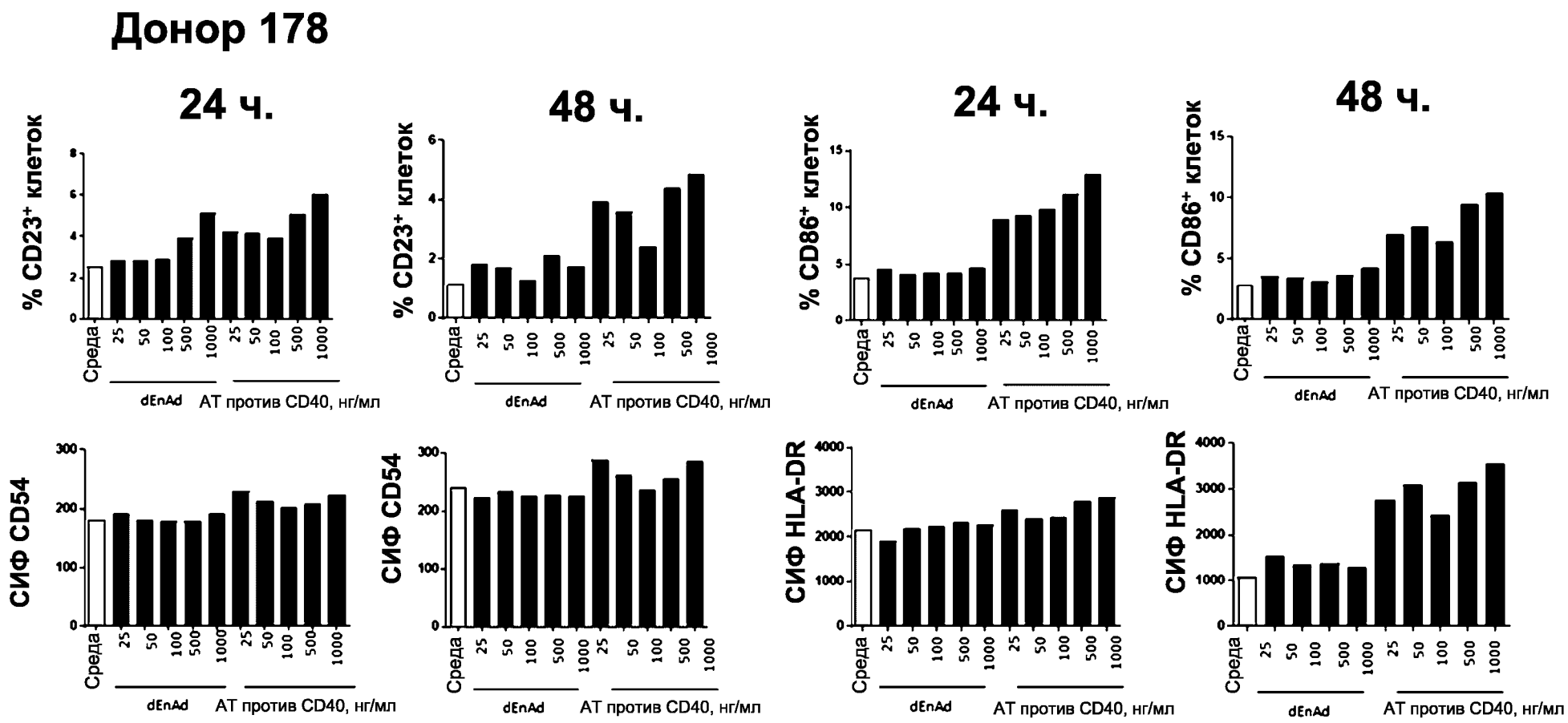
Фигура 22B


Донор 179
24 ч.
48 ч.
ФНОα
ИЛ-6
ИЛ-8
ИЛ-28 a/b
ИЛ-29
Среда
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
EnAd SN
NG-350A SN

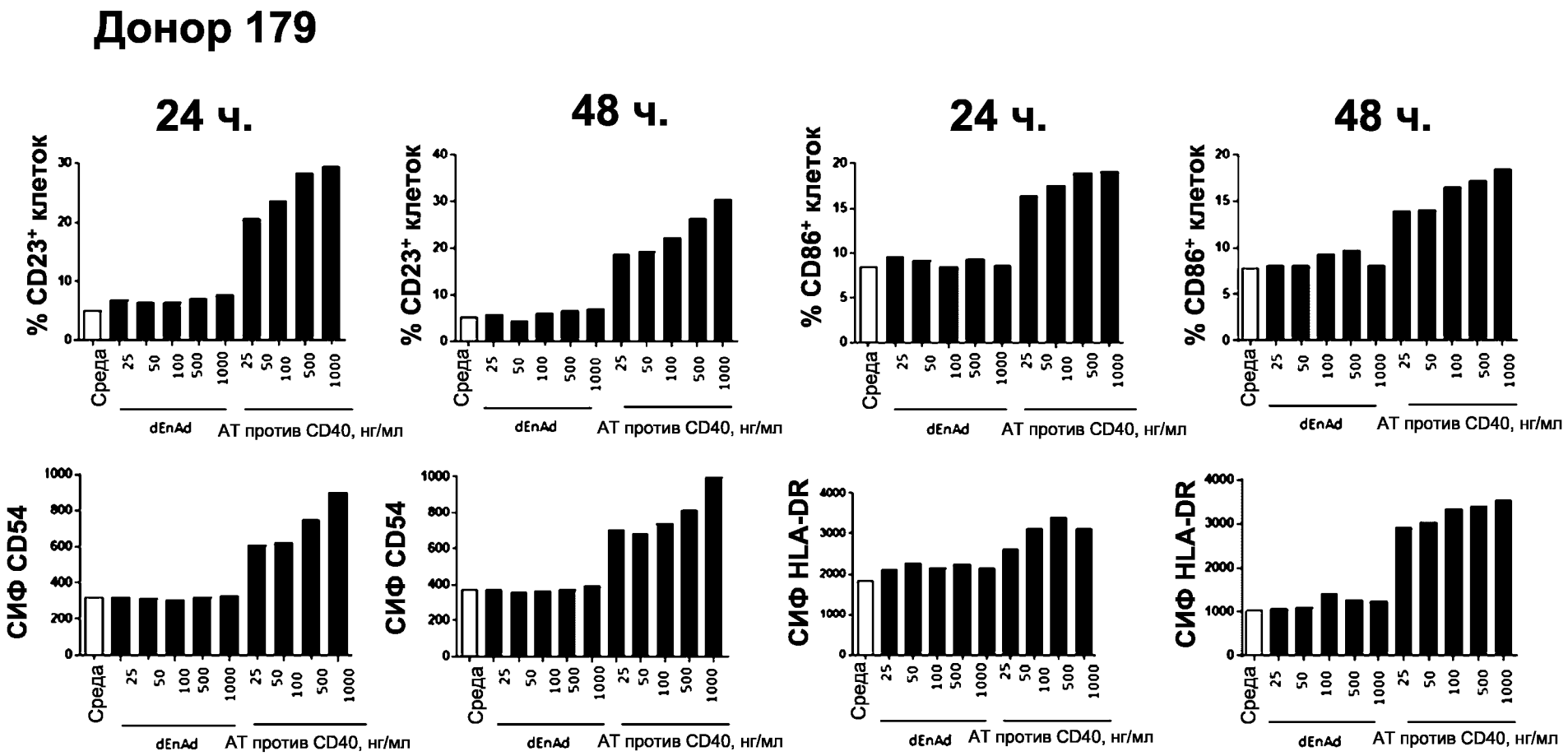
Фигура 23А


Донор 177
24 ч.
48 ч.
24 ч.
48 ч.
% CD23+ клеток
% CD23+ клеток
% CD86+ клеток
% CD86+ клеток
СИФ CD54
СИФ CD54
СИФ HLA-DR
СИФ HLA-DR
Среда
25
50
100
500
1000
dEnAd
АТ против CD40, нг/мл

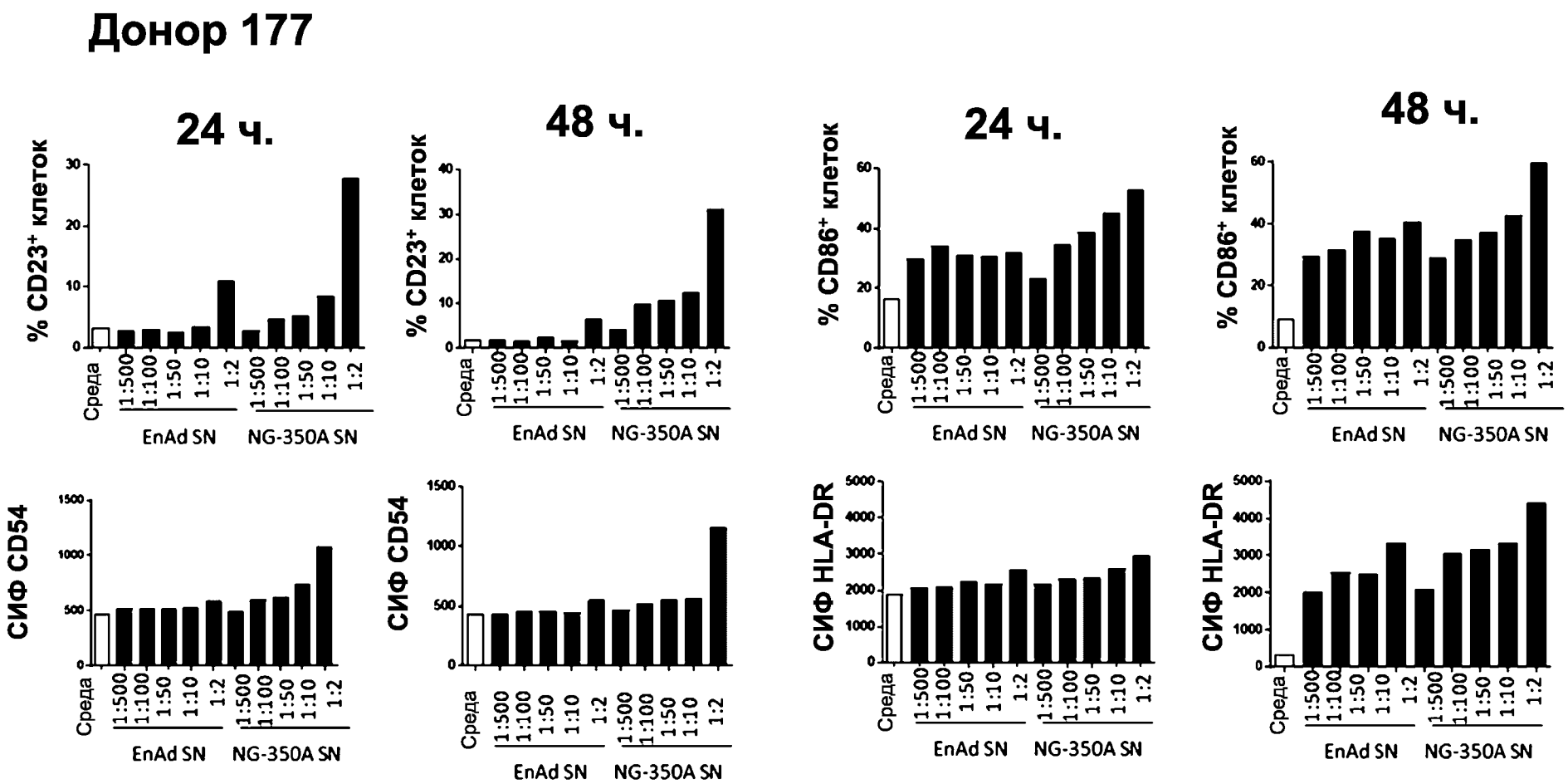
Фигура 23B


Донор 178
24 ч.
48 ч.
24 ч.
48 ч.
% CD23+ клеток
% CD23+ клеток
% CD86+ клеток
% CD86+ клеток
СИФ CD54
СИФ CD54
СИФ HLA-DR
СИФ HLA-DR
Среда
25
50
100
500
1000
dEnAd
АТ против CD40, нг/мл

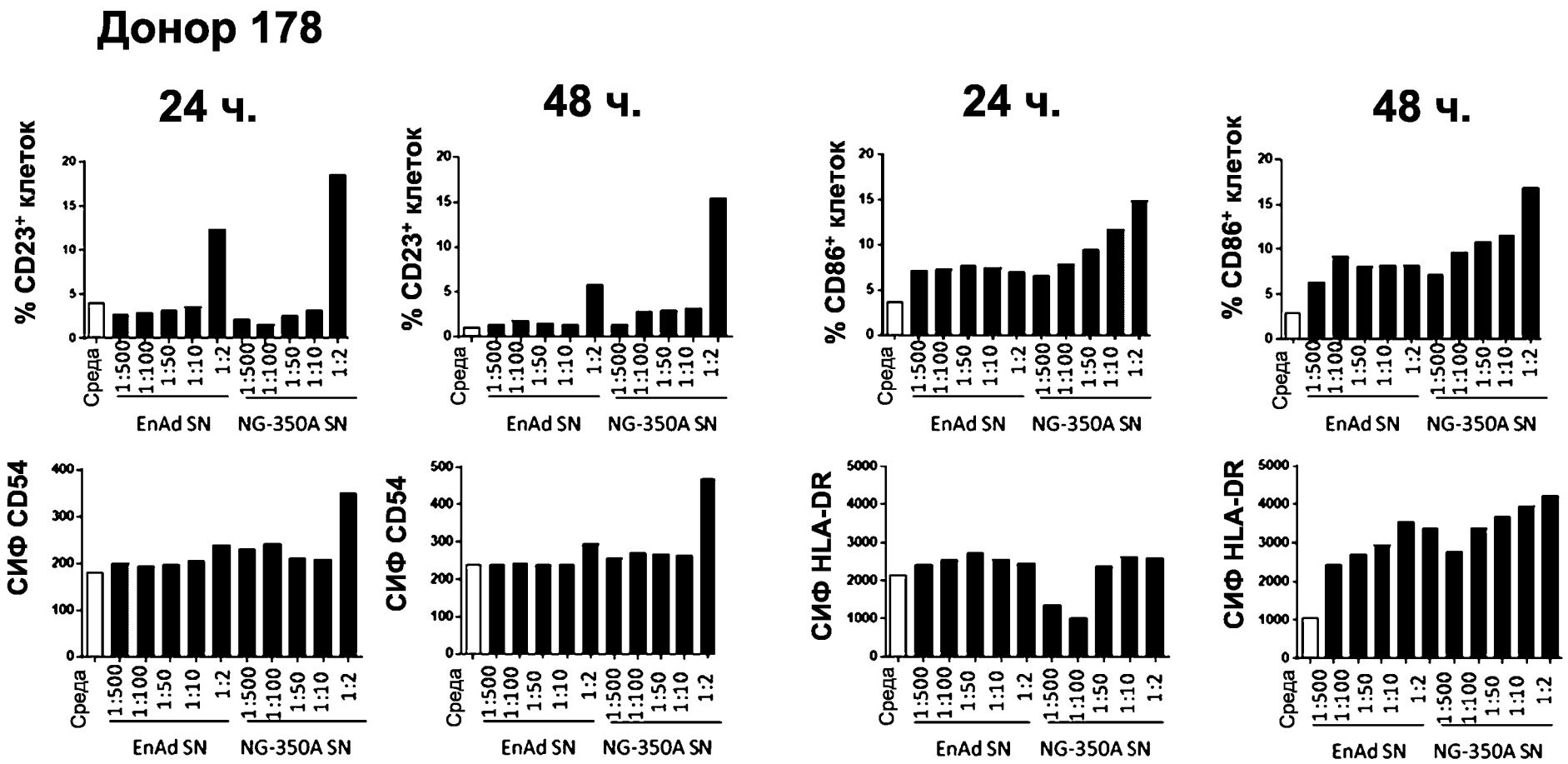
Фигура 23C


Донор 179
24 ч.
48 ч.
24 ч.
48 ч.
% CD23⁺ клеток
% CD23⁺ клеток
% CD86⁺ клеток
% CD86⁺ клеток
СИФ CD54
СИФ CD54
СИФ HLA-DR
СИФ HLA-DR
Среда
25
50
100
500
1000
dEnAd
АТ против CD40, нг/мл

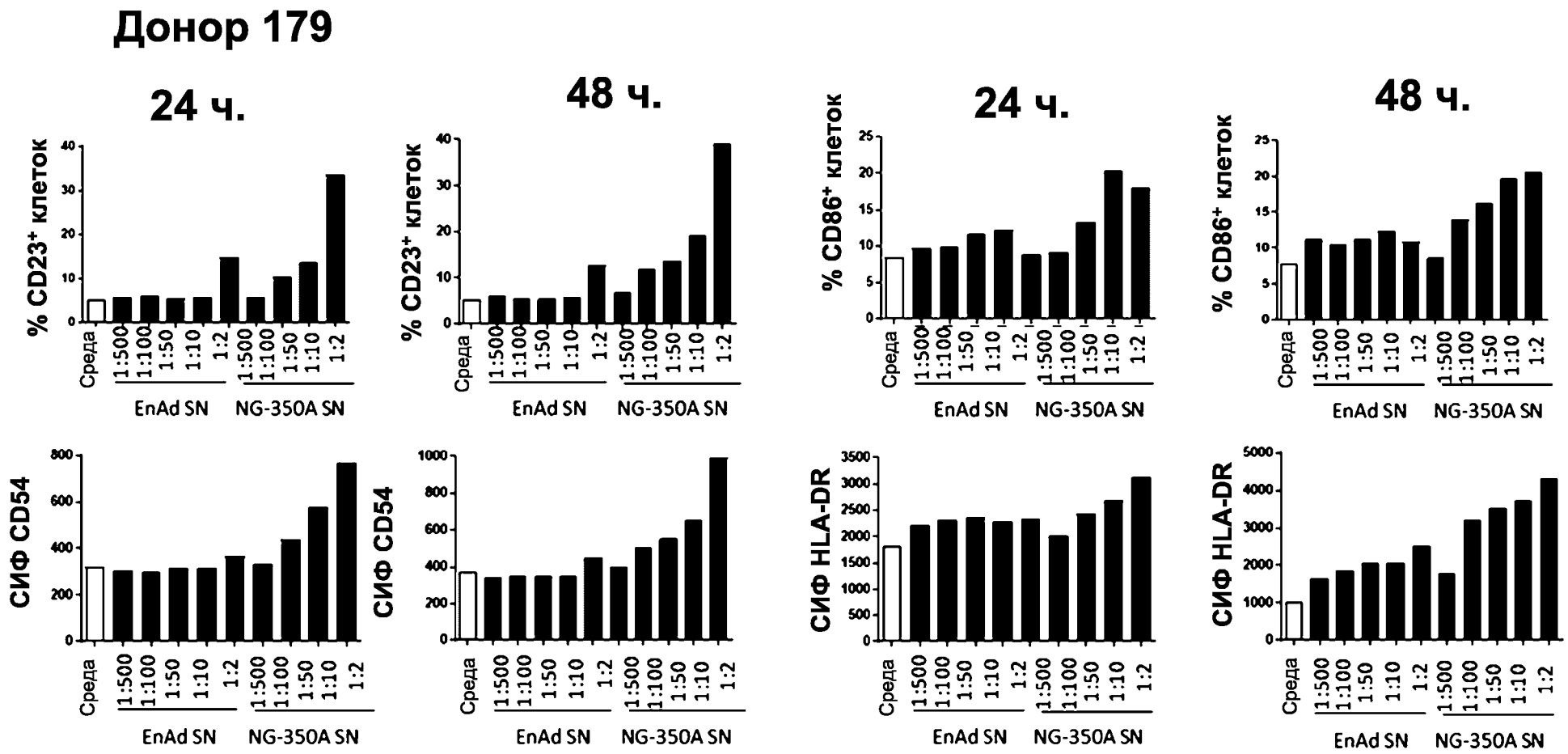
Фигура 24А


Донор 177
24 ч.
48 ч.
24 ч.
48 ч.
% CD23+ клеток
% CD86+ клеток
СИФ CD54
СИФ HLA-DR
Среда
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
EnAd SN
NG-350A SN

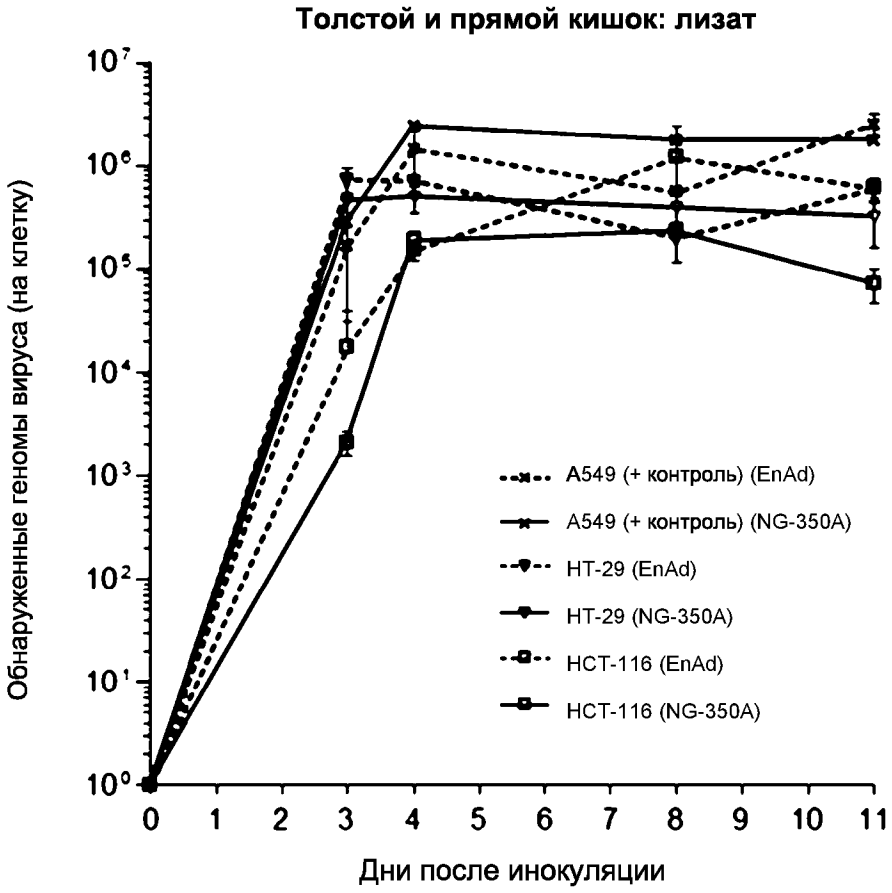
Фигура 24B

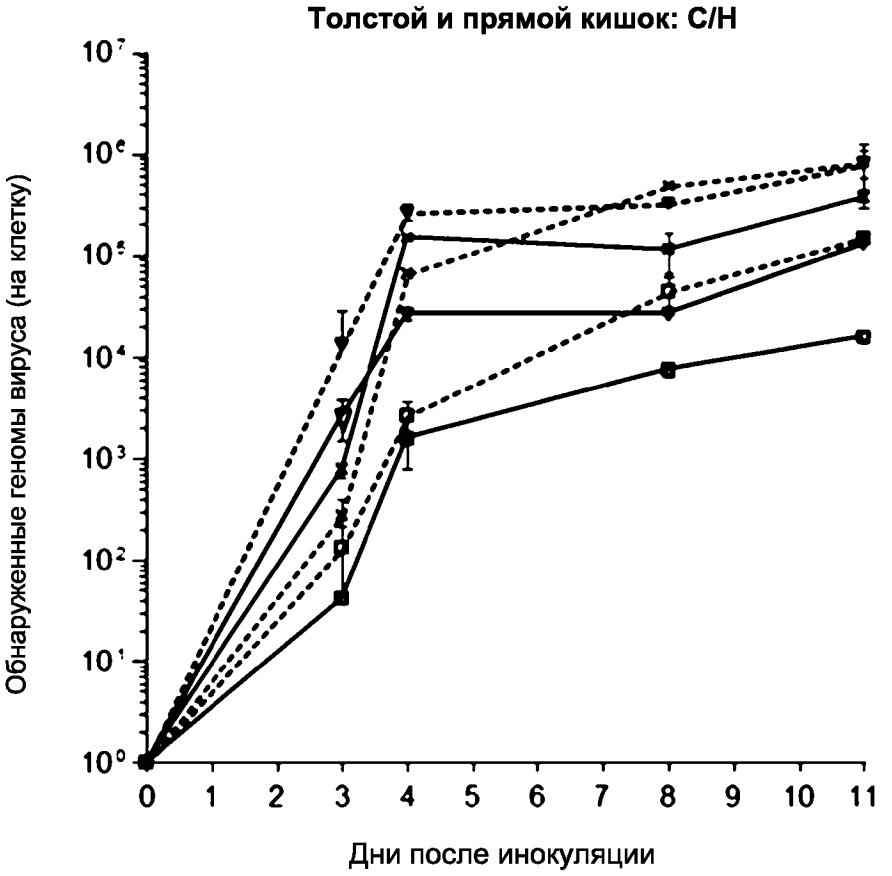

Донор 178
24 ч.
48 ч.
24 ч.
48 ч.
% CD23+ клеток
% CD23+ клеток
% CD86+ клеток
% CD86+ клеток
СИФ CD54
СИФ CD54
СИФ HLA-DR
СИФ HLA-DR
Среда
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
EnAd SN
NG-350A SN

Фигура 24C

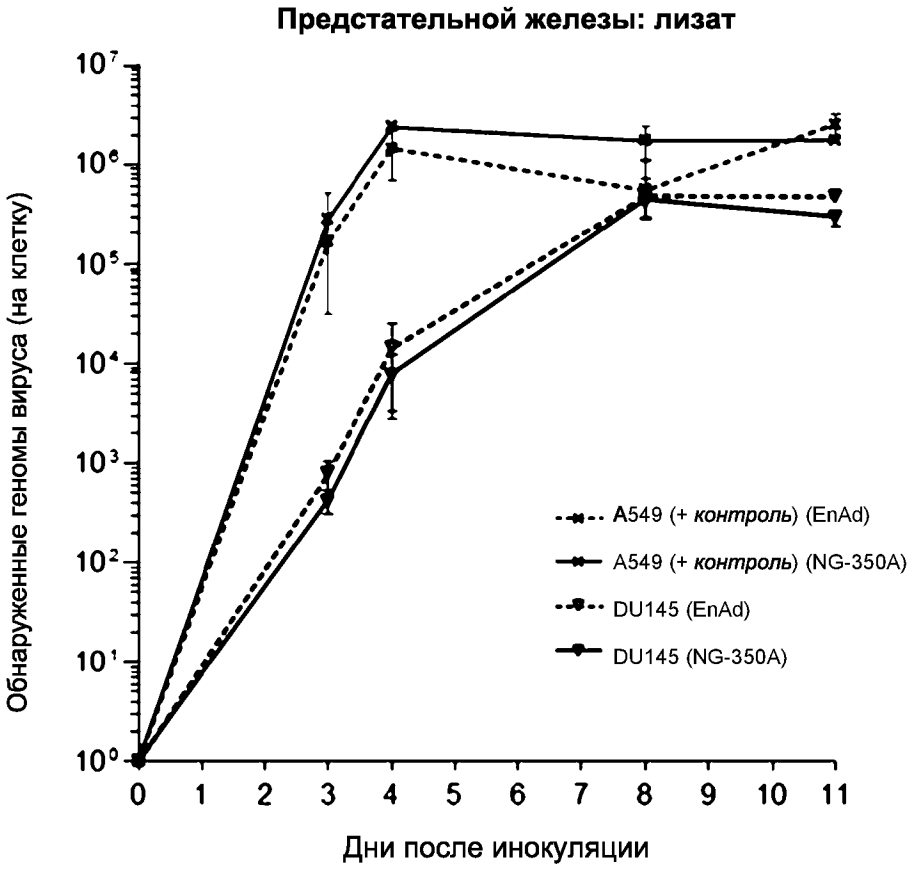

Донор 179
24 ч.
48 ч.
24 ч.
48 ч.
% CD23+ клеток
% CD23+ клеток
% CD86+ клеток
% CD86+ клеток
СИФ CD54
СИФ CD54
СИФ HLA-DR
СИФ HLA-DR
Среда
1:500
1:100
1:50
1:10
1:2
EnAd SN
NG-350A SN

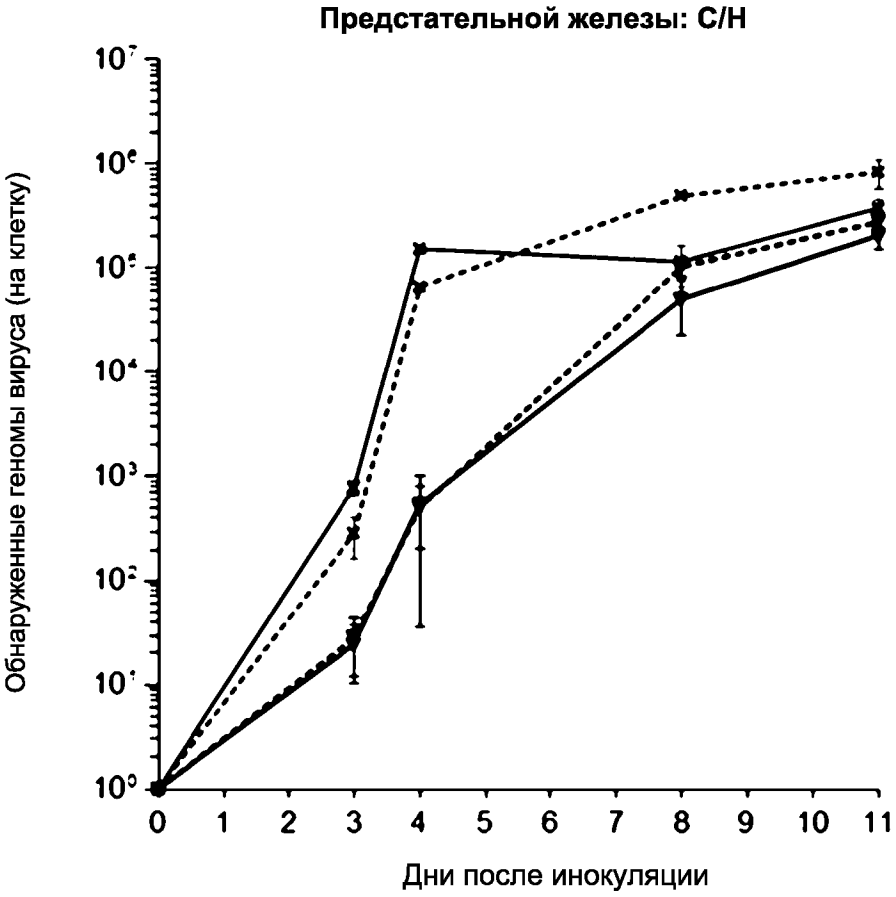
Фигура 25A


Толстой и прямой кишок: лизат
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
Дни после инокуляции
A549 (+ контроль) (EnAd)
A549 (+ контроль) (NG-350A)
HT-29 (EnAd)
HT-29 (NG-350A)
HCT-116 (EnAd)
HCT-116 (NG-350A)

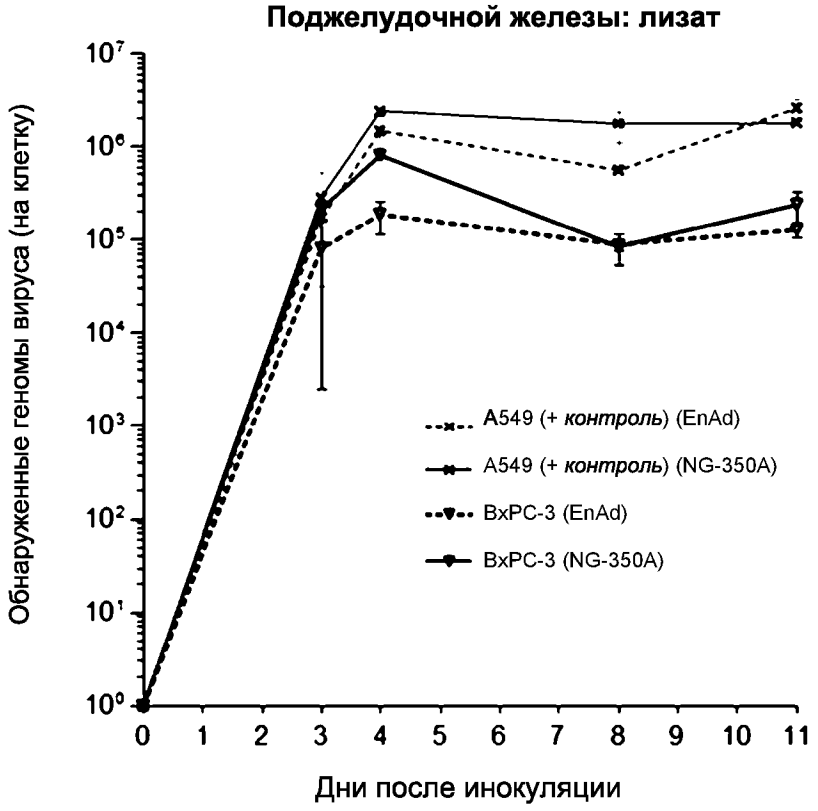

Толстой и прямой кишок: С/Н
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
Дни после инокуляции

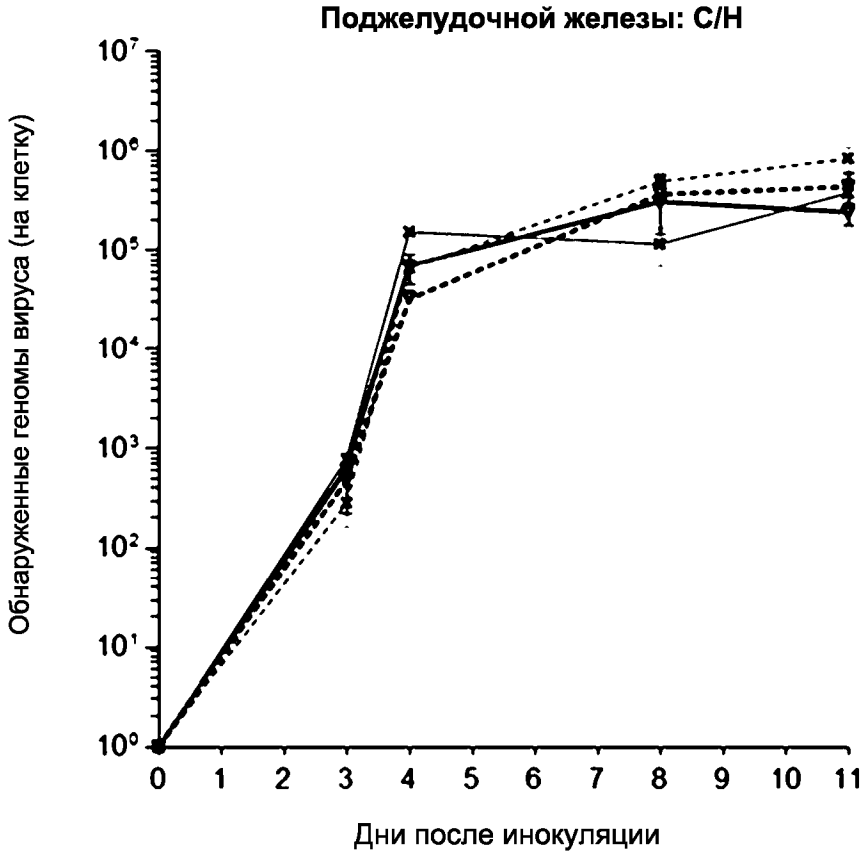
Фигура 25B


Предстательной железы: лизат
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции
A549 (+ *контроль*) (EnAd)
A549 (+ *контроль*) (NG-350A)
DU145 (EnAd)
DU145 (NG-350A)

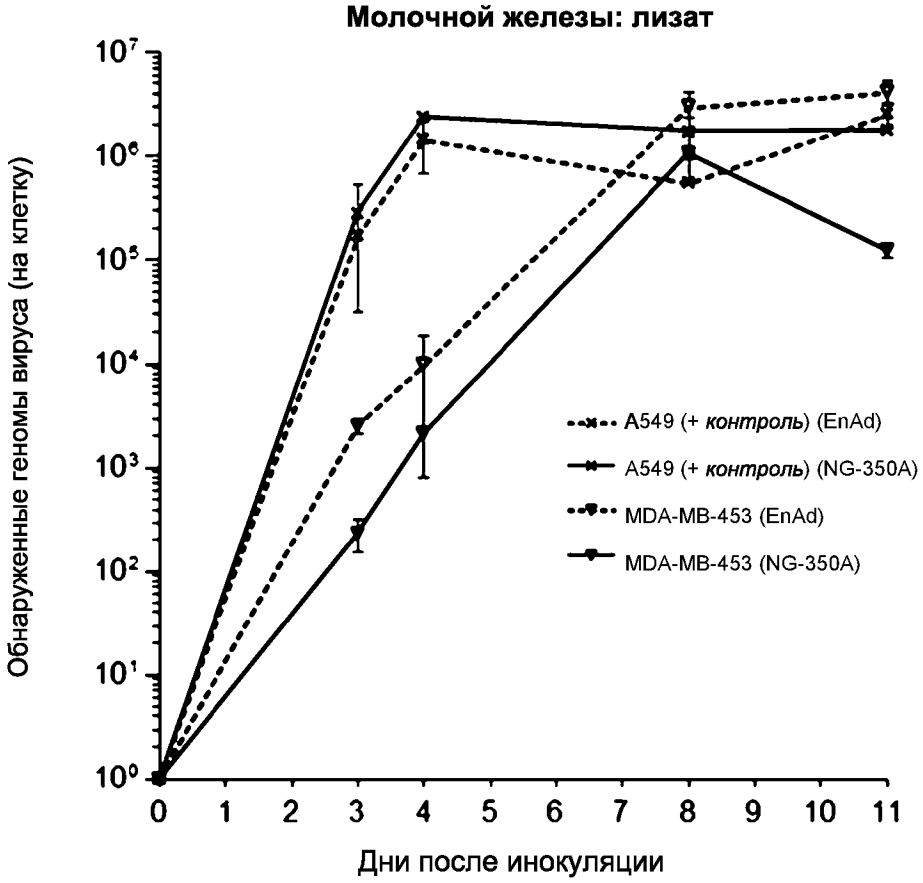

Предстательной железы: С/Н
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции

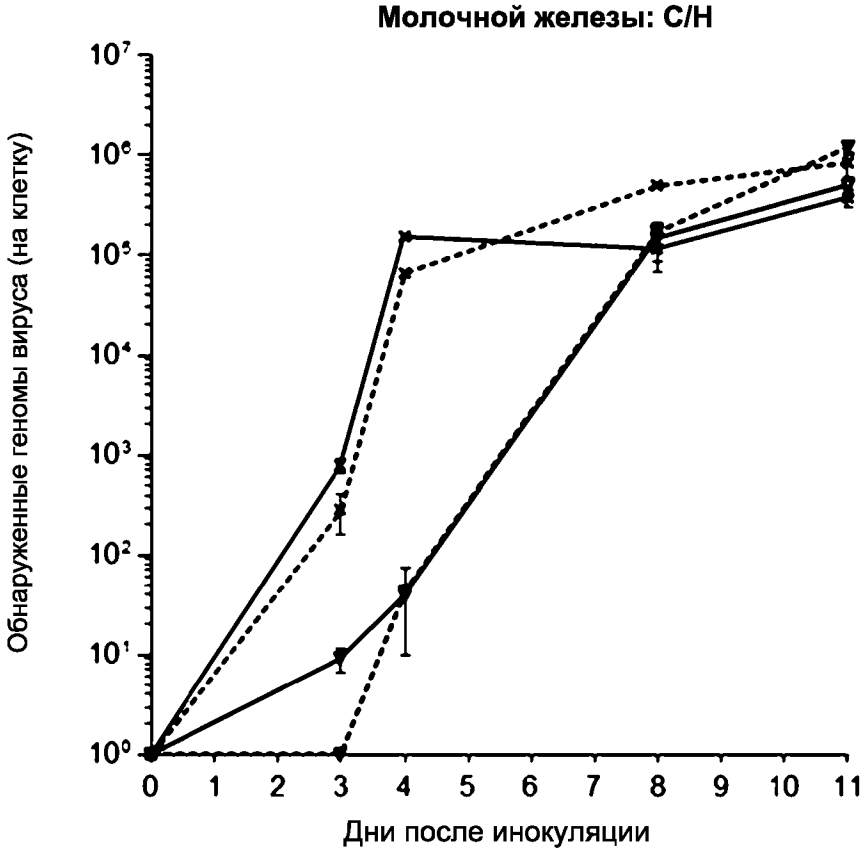
Фигура 25C


Поджелудочной железы: лизат
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции
A549 (+ контроль) (EnAd)
A549 (+ контроль) (NG-350A)
BxPC-3 (EnAd)
BxPC-3 (NG-350A)

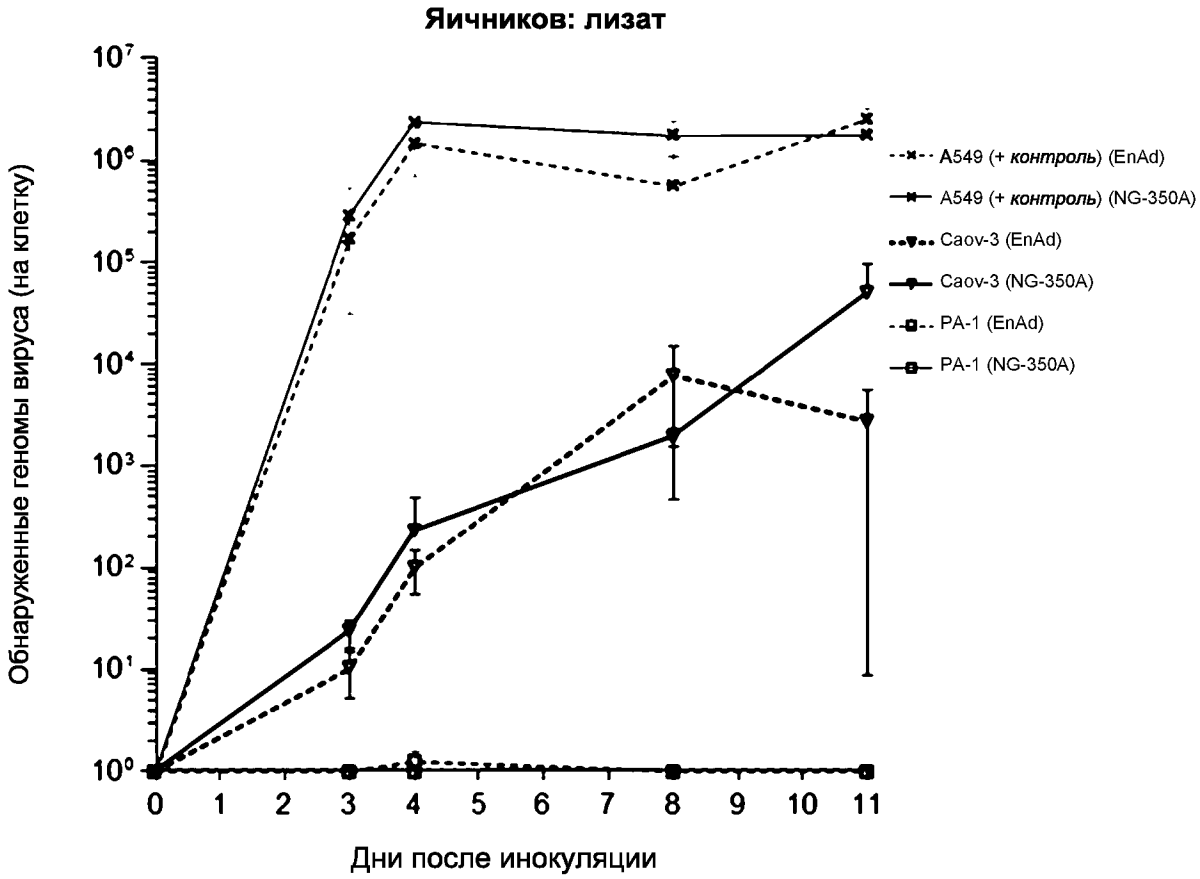

Поджелудочной железы: C/H
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции

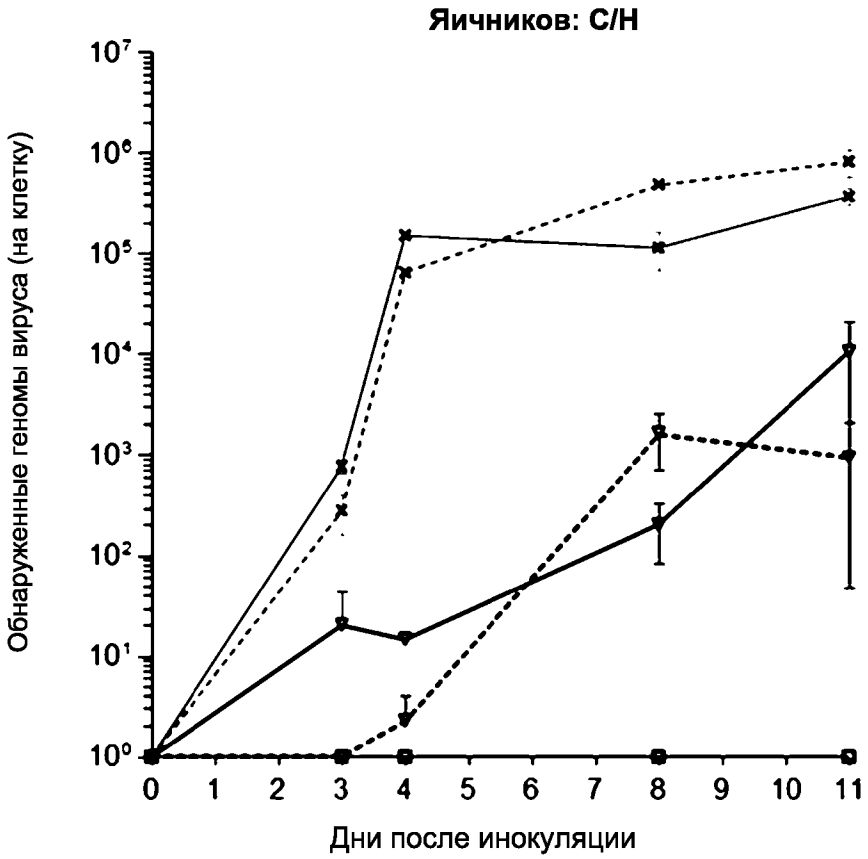
Фигура 25D


Молочной железы: лизат
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции
A549 (+ *контроль*) (EnAd)
A549 (+ *контроль*) (NG-350A)
MDA-MB-453 (EnAd)
MDA-MB-453 (NG-350A)

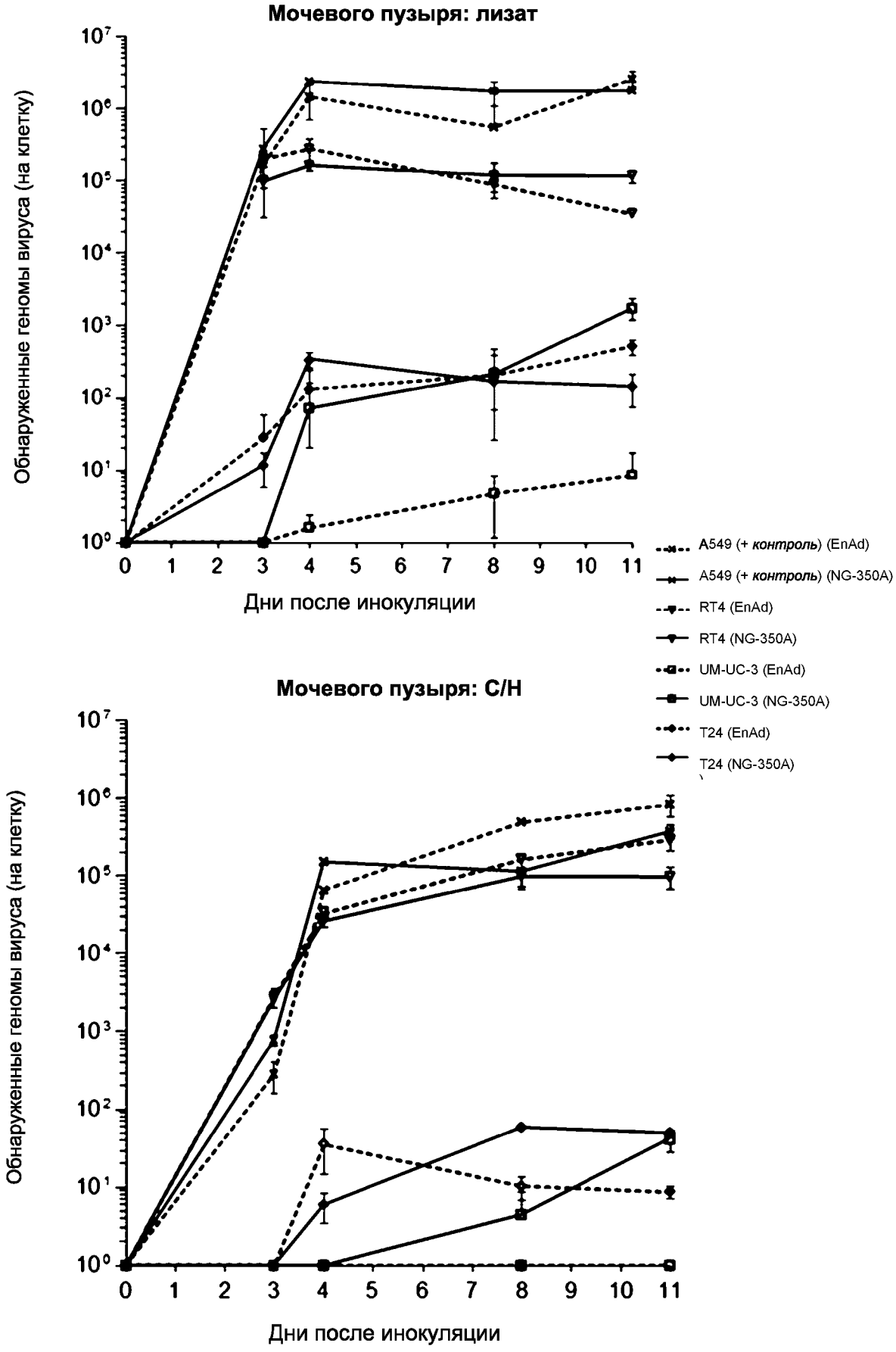

Молочной железы: C/H
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции

Фигура 25E

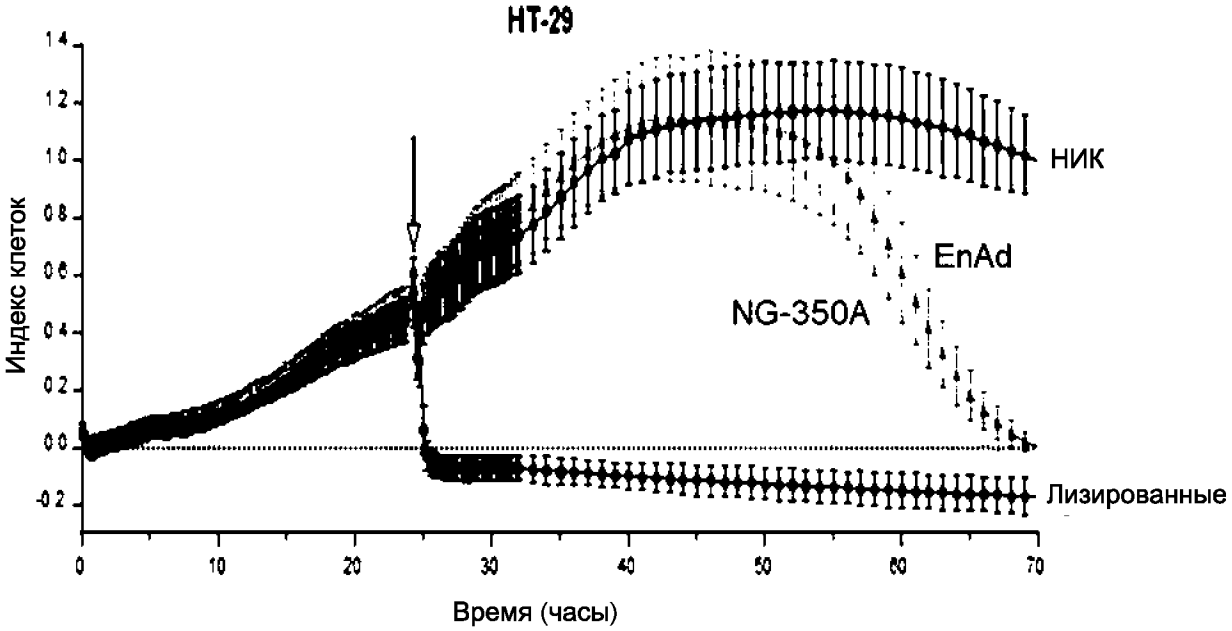

Яичников: лизат
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции
A549 (+ контроль) (EnAd)
A549 (+ контроль) (NG-350A)
Caov-3 (EnAd)
Caov-3 (NG-350A)
PA-1 (EnAd)
PA-1 (NG-350A)

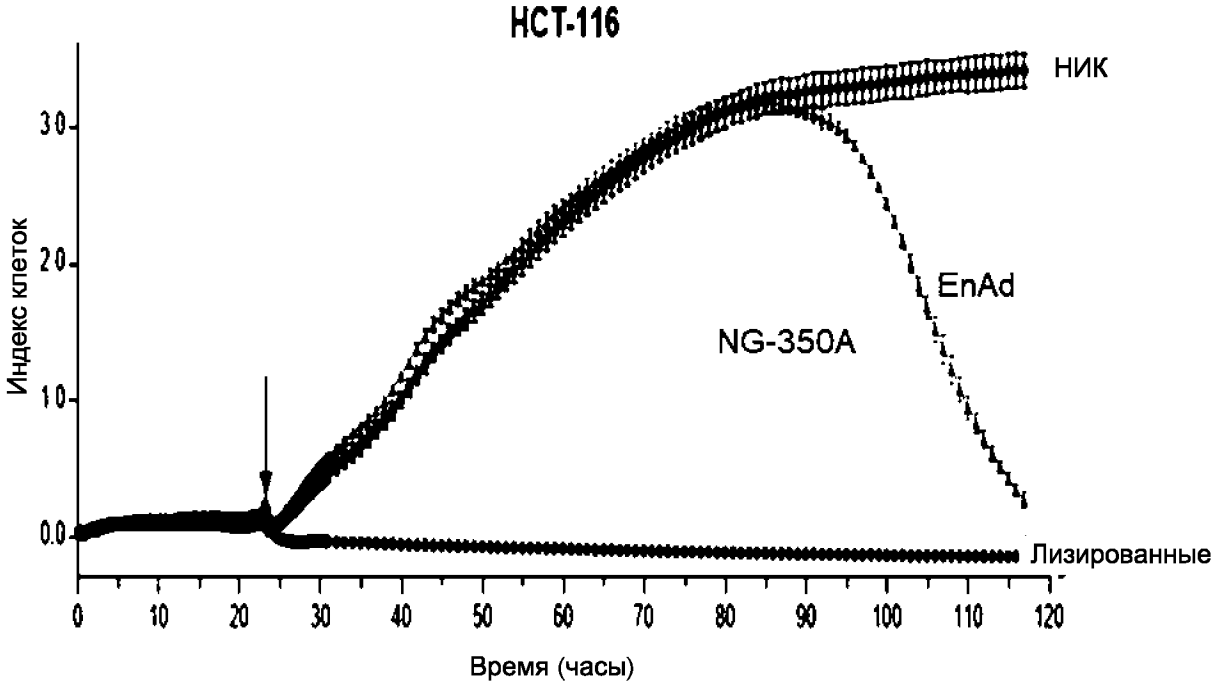

Яичников: С/Н
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции

Фигура 25F

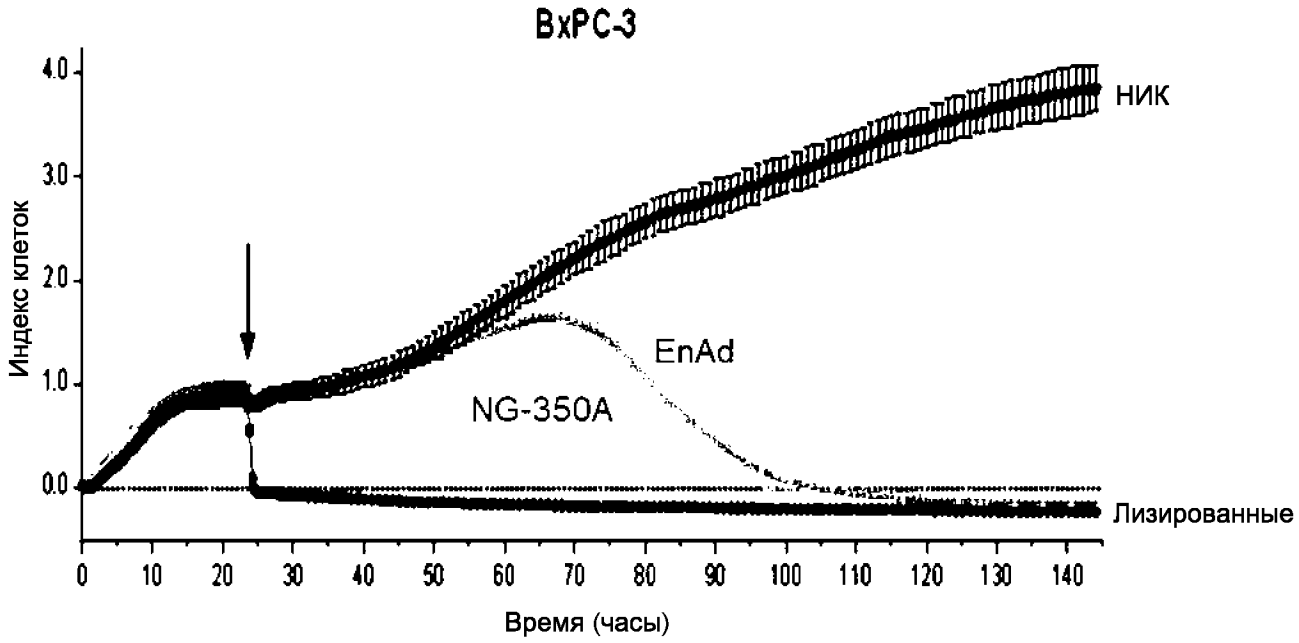

Мочевого пузыря: лизат
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
Дни после инокуляции
A549 (+ контроль) (EnAd)
A549 (+ контроль) (NG-350A)
RT4 (EnAd)
RT4 (NG-350A)
UM-UC-3 (EnAd)
UM-UC-3 (NG-350A)
T24 (EnAd)
T24 (NG-350A)
Мочевого пузыря: C/H
Обнаруженные геномы вируса (на клетку)
Дни после инокуляции

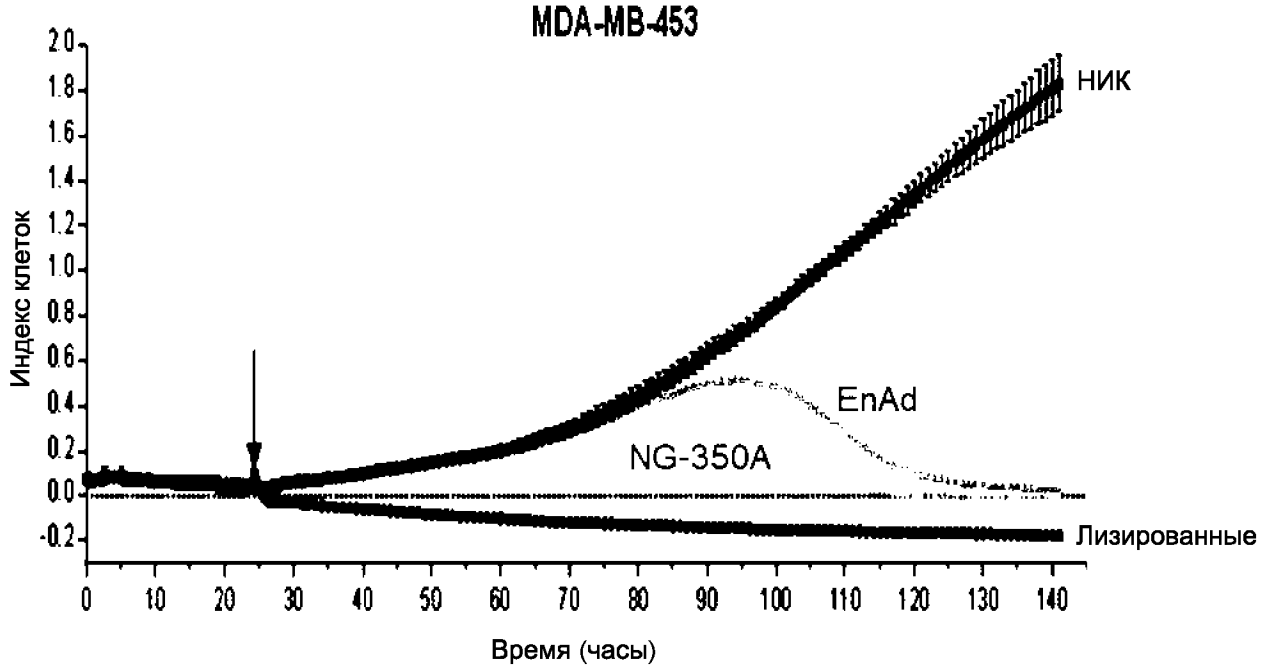
Фигура 26A


HT-29
Индекс клеток
Время (часы)
НИК
EnAd
NG-350A
Лизированные


HCT-116
Индекс клеток
Время (часы)
НИК
EnAd
NG-350A
Лизированные

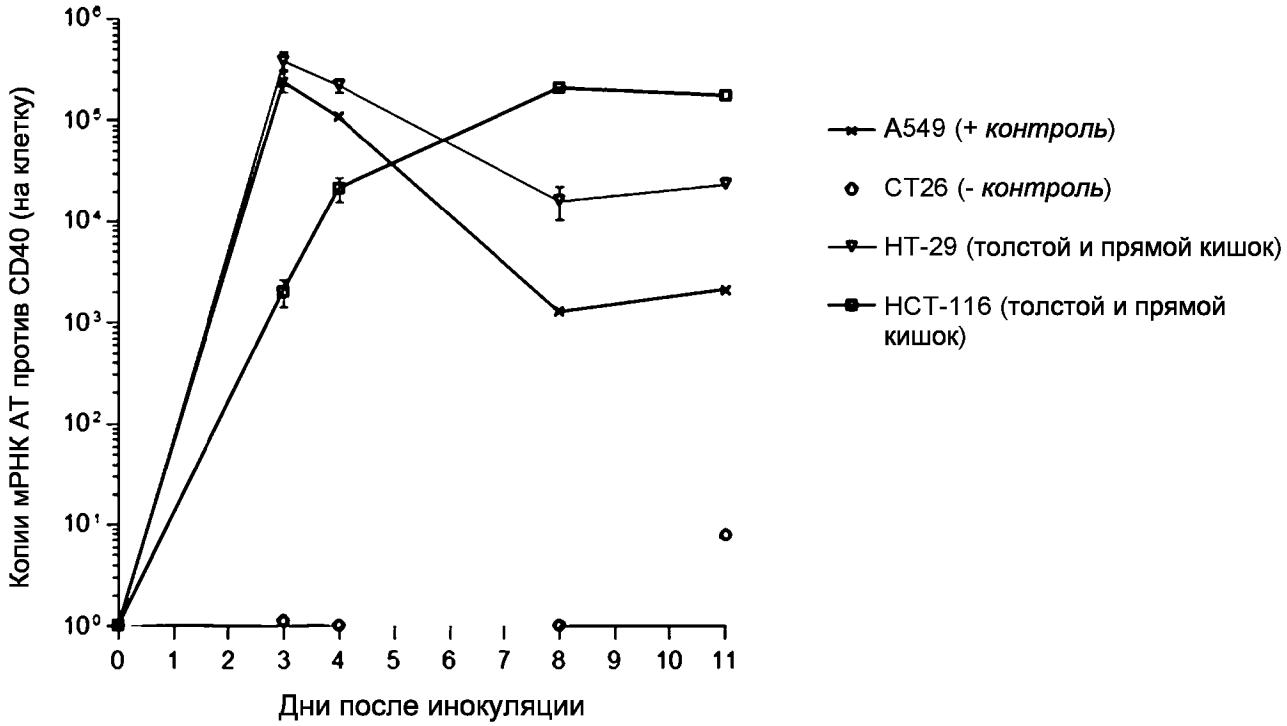
Фигура 26B


BxPC-3
Индекс клеток
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
НИК
EnAd
NG-350A
Лизированные
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
Время (часы)

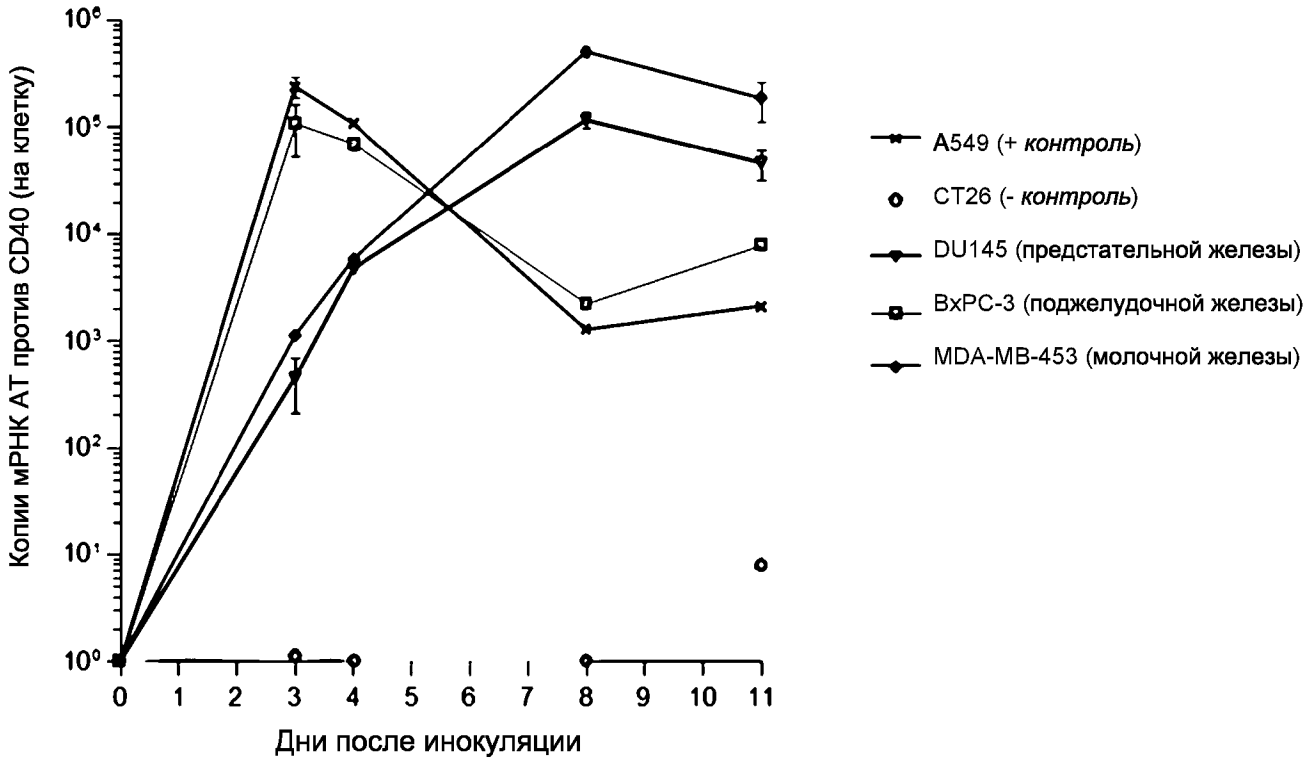

MDA-MB-453
Индекс клеток
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
НИК
EnAd
NG-350A
Лизированные
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
Время (часы)

Фигура 27

A

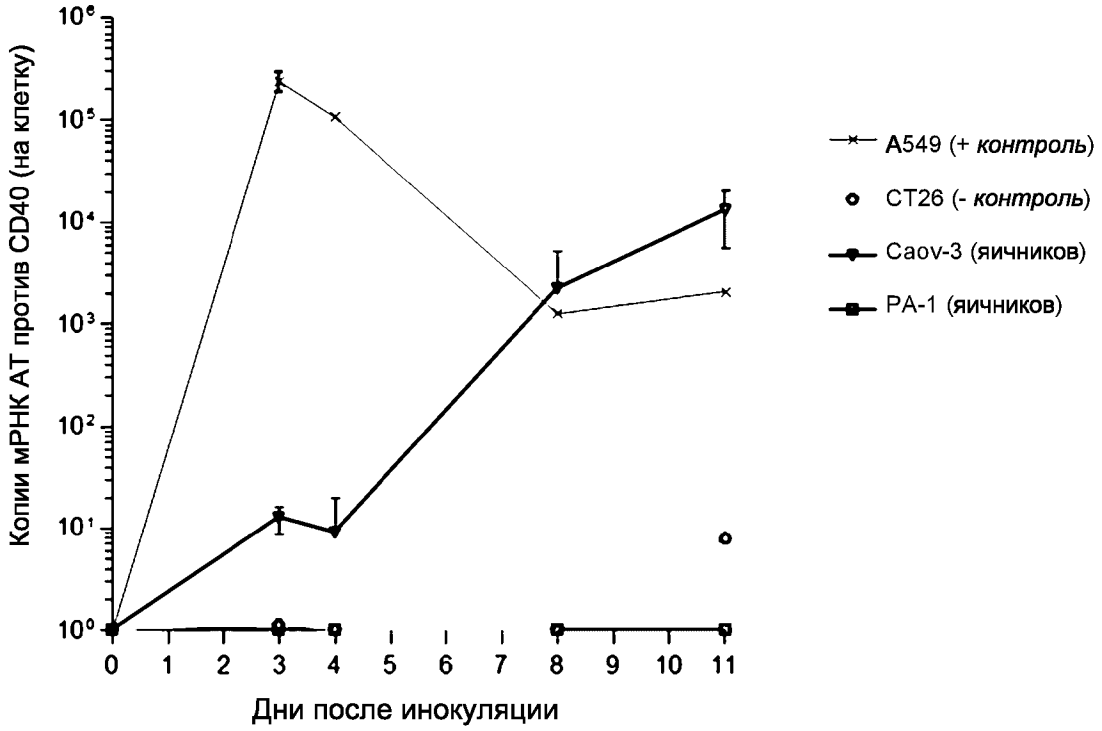

Копии мРНК АТ против CD40 (на клетку)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции
A549 (+ *контроль*)
CT26 (- *контроль*)
HT-29 (толстой и прямой кишок)
HCT-116 (толстой и прямой кишок)

B

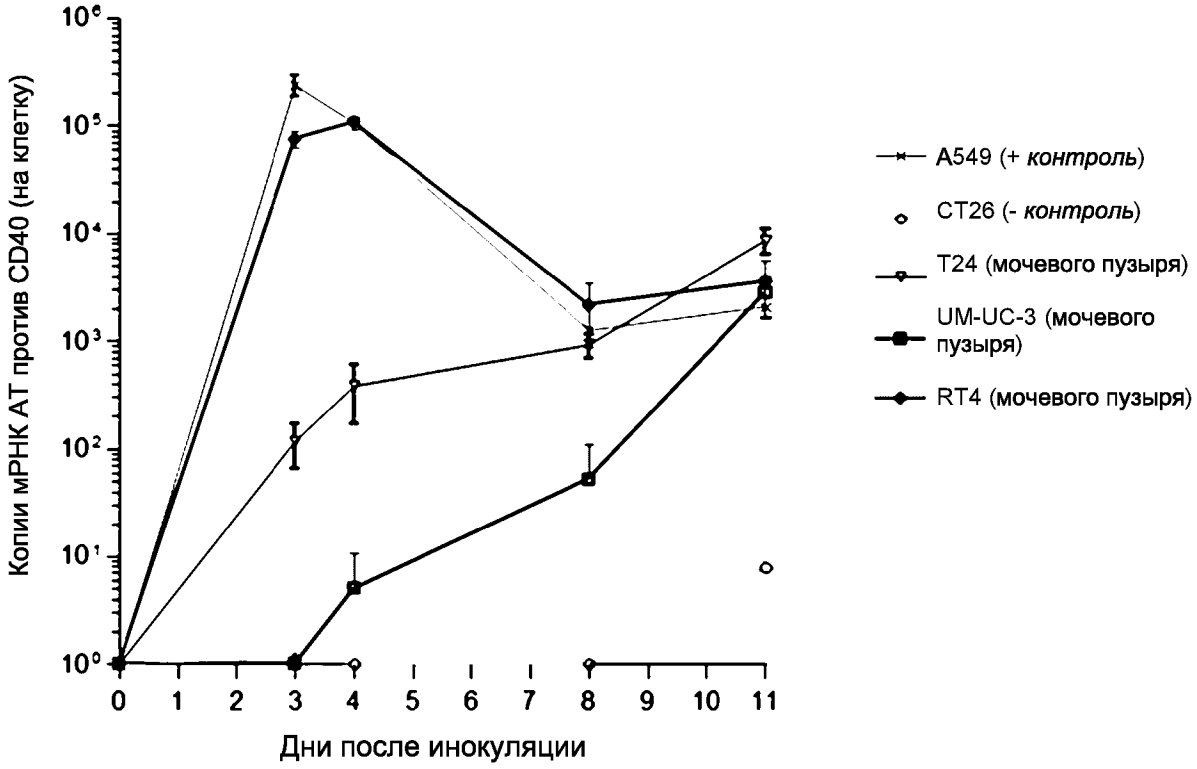

Копии мРНК АТ против CD40 (на клетку)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Дни после инокуляции
A549 (+ *контроль*)
CT26 (- *контроль*)
DU145 (предстательной железы)
BxPC-3 (поджелудочной железы)
MDA-MB-453 (молочной железы)

Фигура 27 (продолж.)

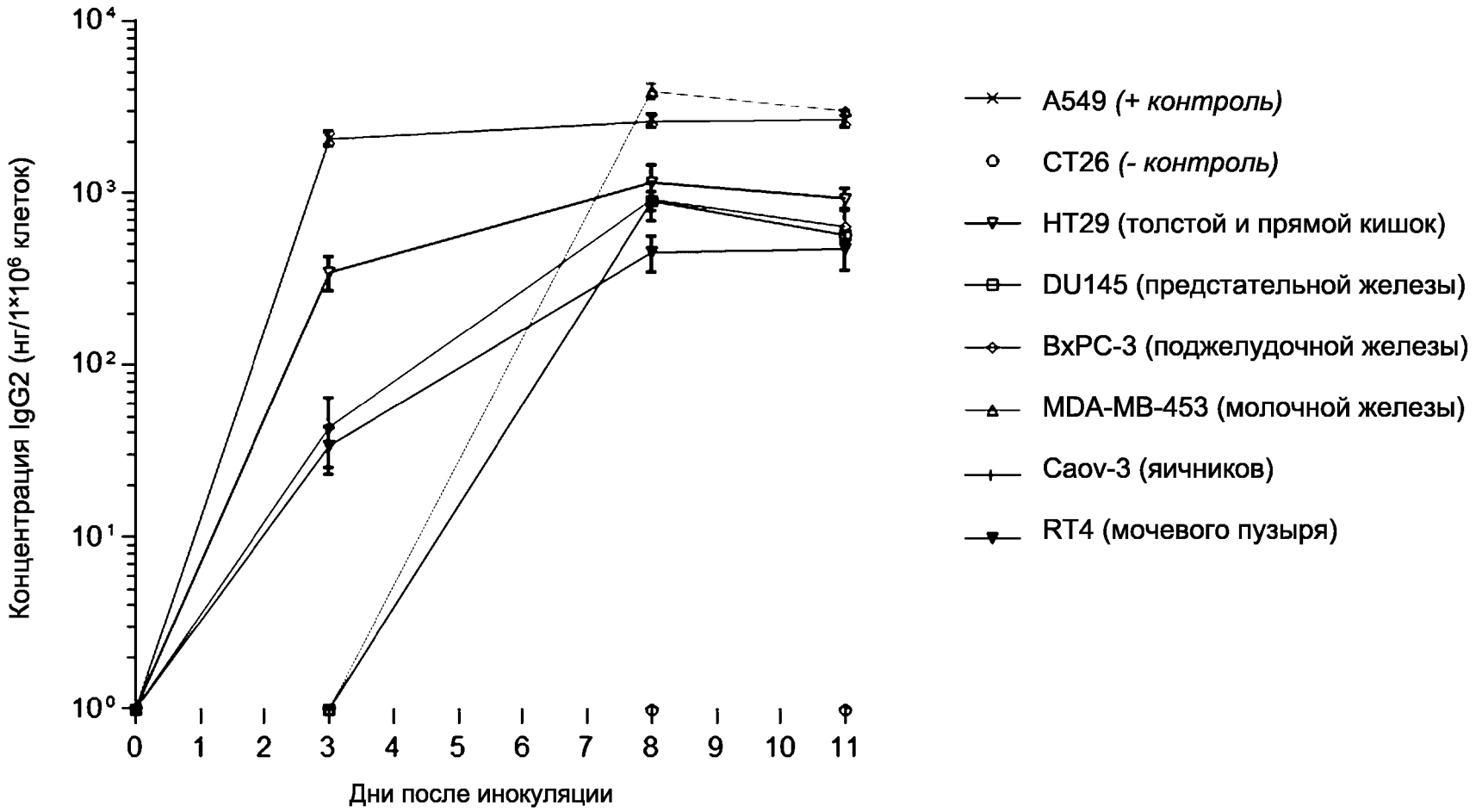
C



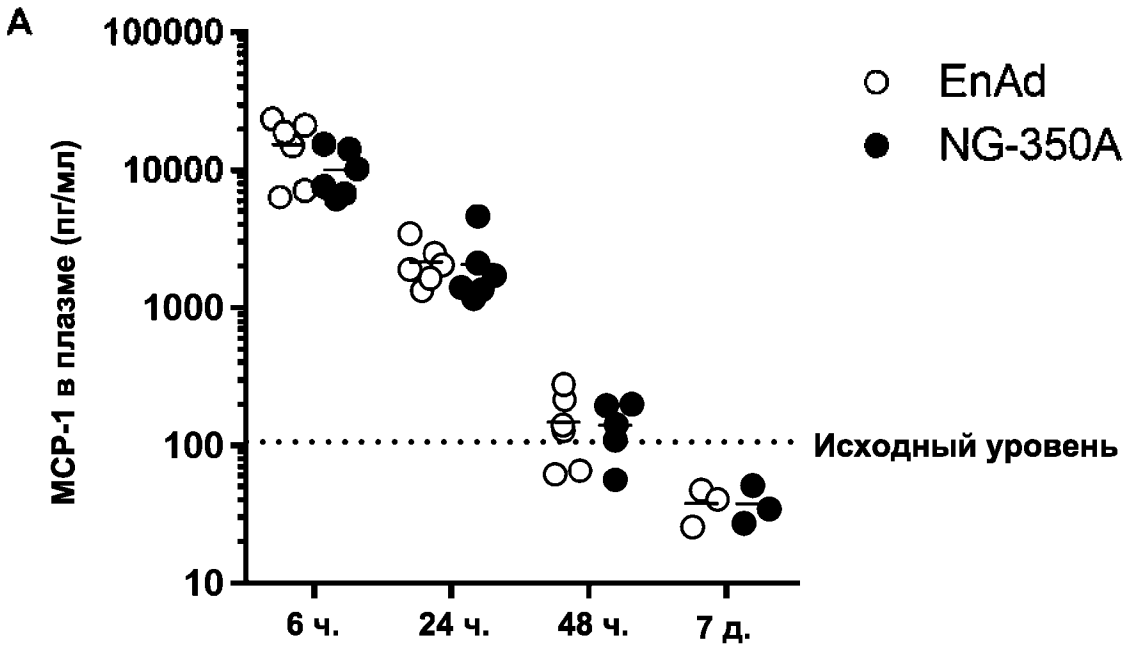
D

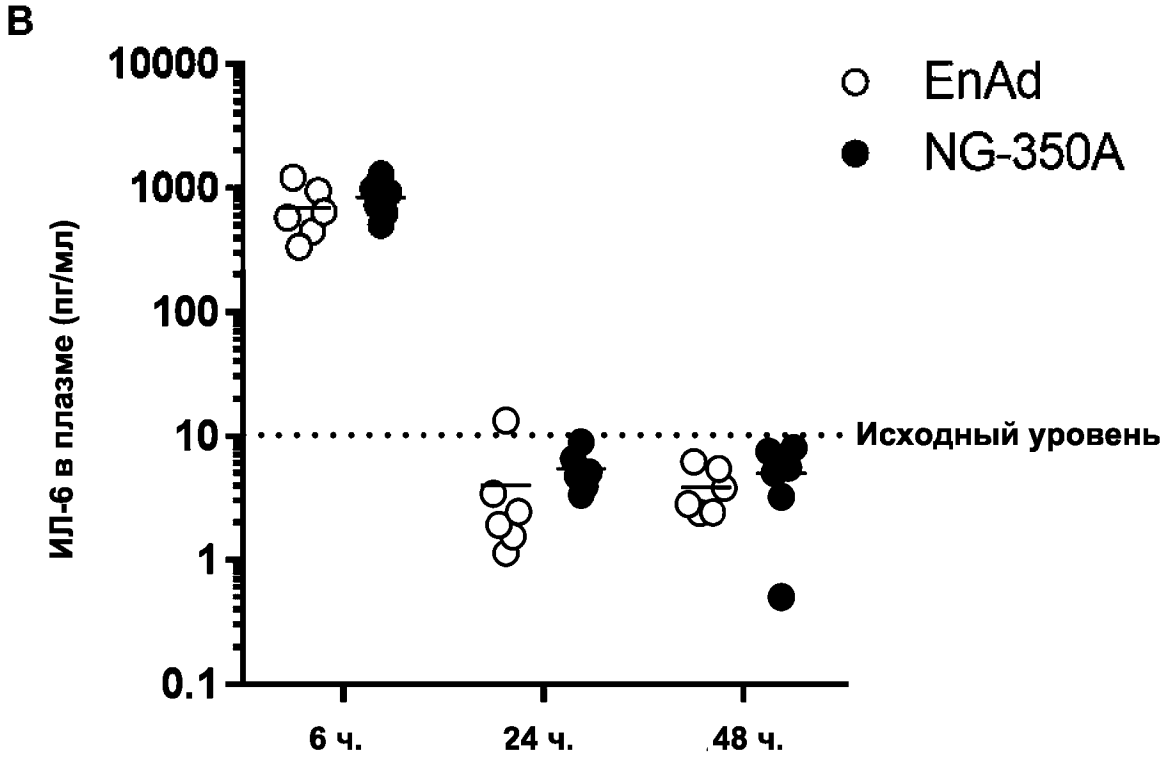


Фигура 28

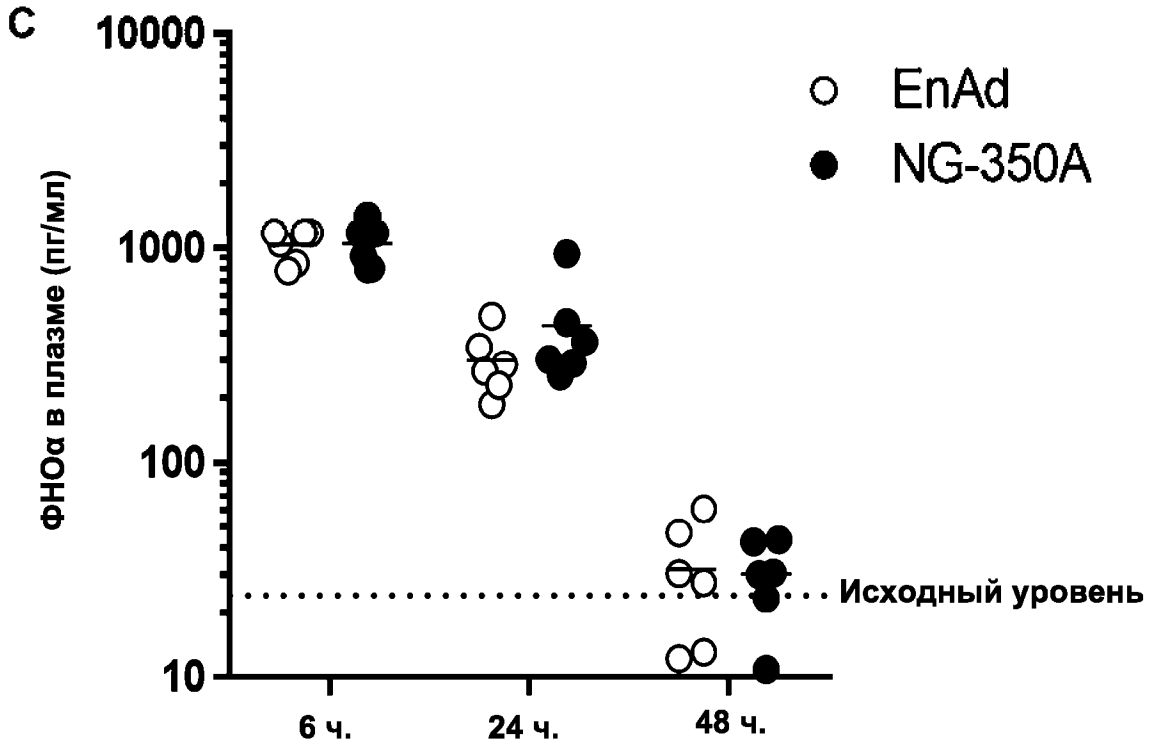

Концентрация IgG2 (нг/1×10⁶ клеток)
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
Дни после инокуляции
A549 (+ контроль)
CT26 (- контроль)
HT29 (толстой и прямой кишок)
DU145 (предстательной железы)
BxPC-3 (поджелудочной железы)
MDA-MB-453 (молочной железы)
Caov-3 (яичников)
RT4 (мочевого пузыря)

Фигура 29

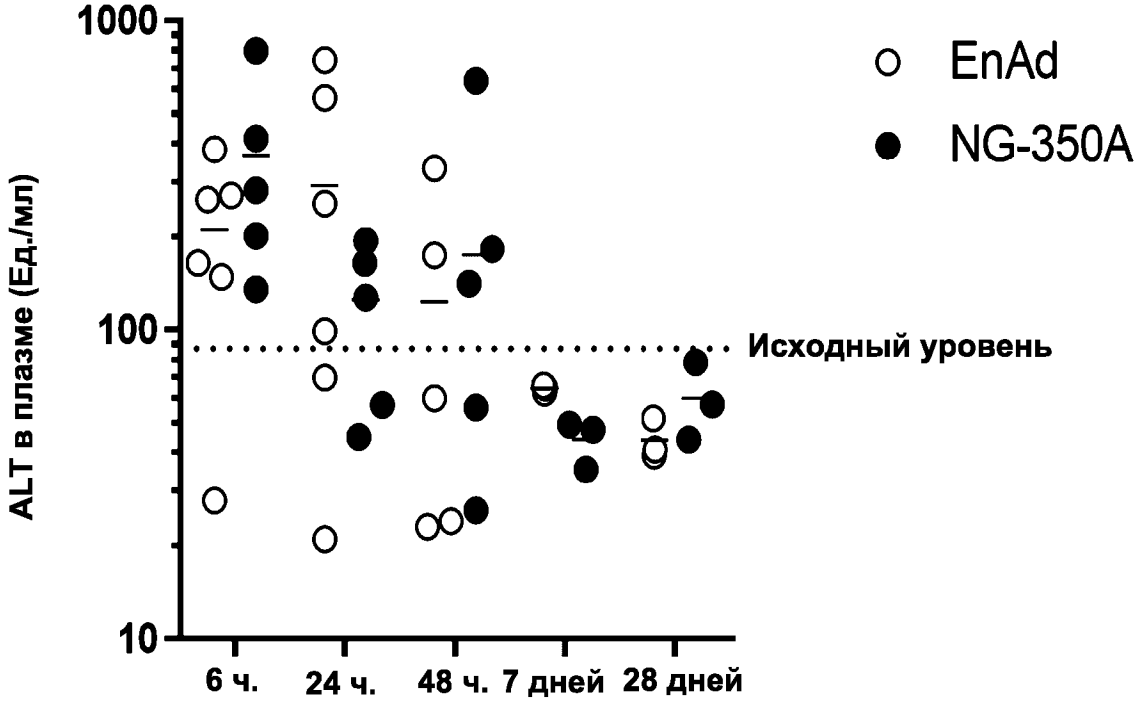

A
100000
10000
1000
100
10
MCP-1 в плазме (пг/мл)
EnAd
NG-350A
Исходный уровень
6 ч.
24 ч.
48 ч.
7 д.


B
10000
1000
100
10
1
0.1
ИЛ-6 в плазме (пг/мл)
EnAd
NG-350A
Исходный уровень
6 ч.
24 ч.
48 ч.

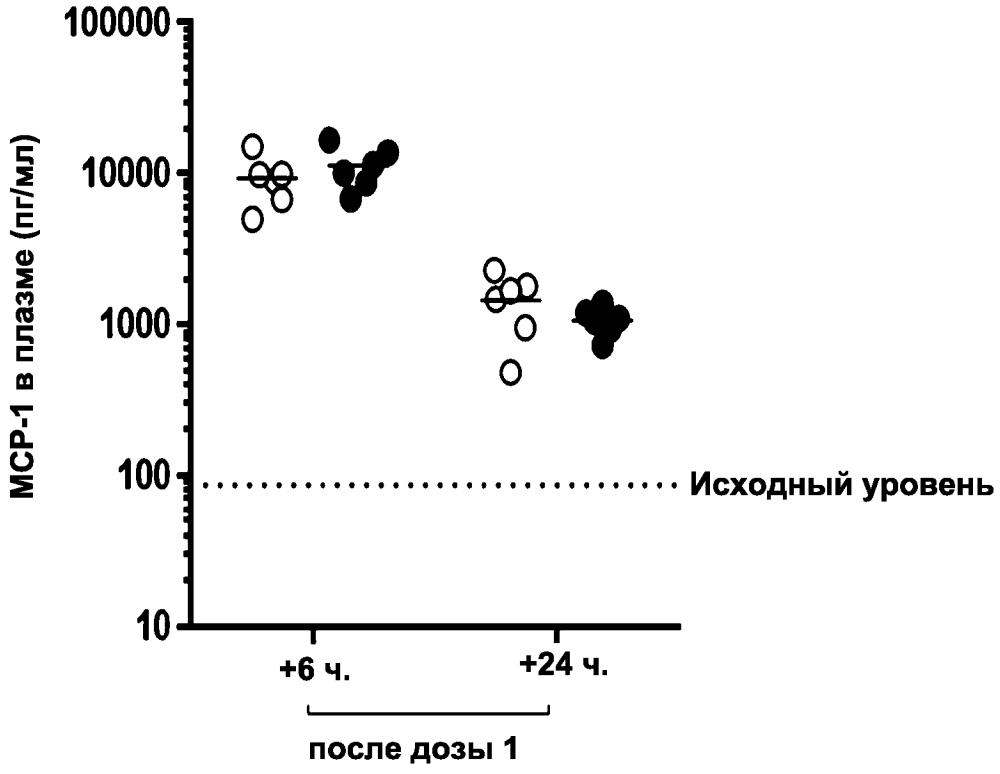
Фигура 29 (продолж.)

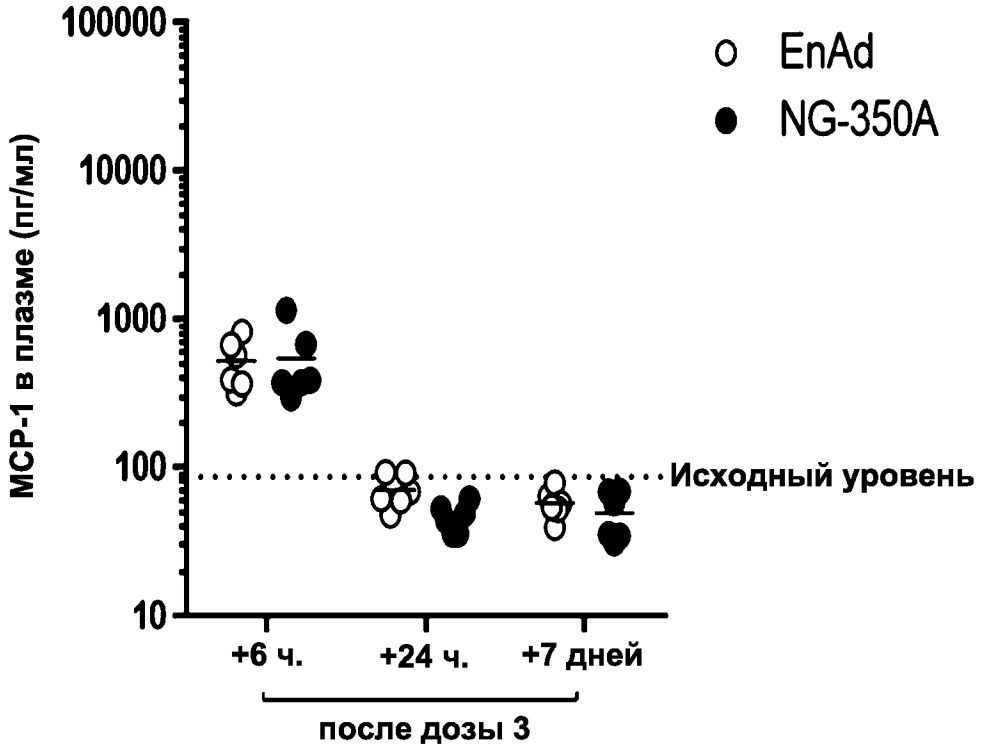


Фигура 30

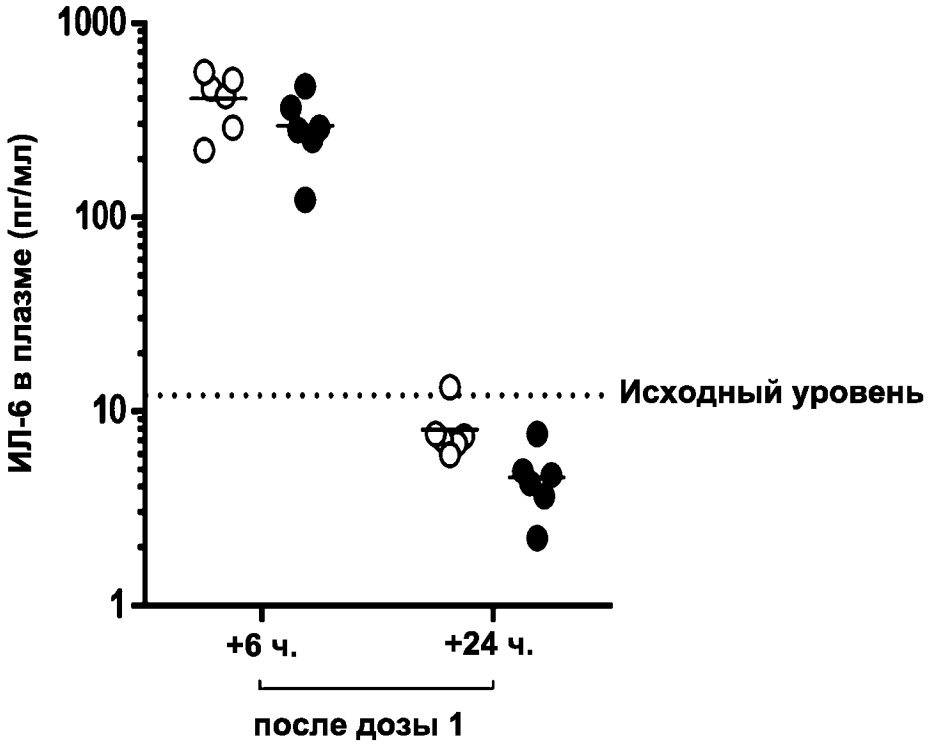


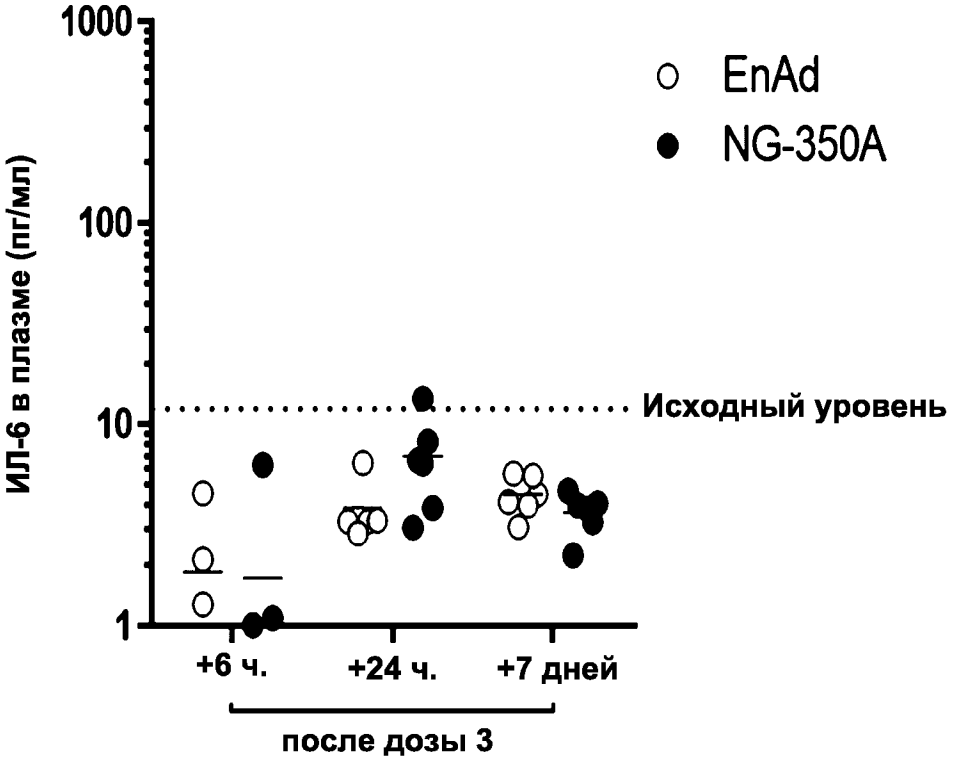
Фигура 31A


100000
10000
1000
100
10
MCP-1 в плазме (пг/мл)
Исходный уровень
+6 ч.
+24 ч.
после дозы 1

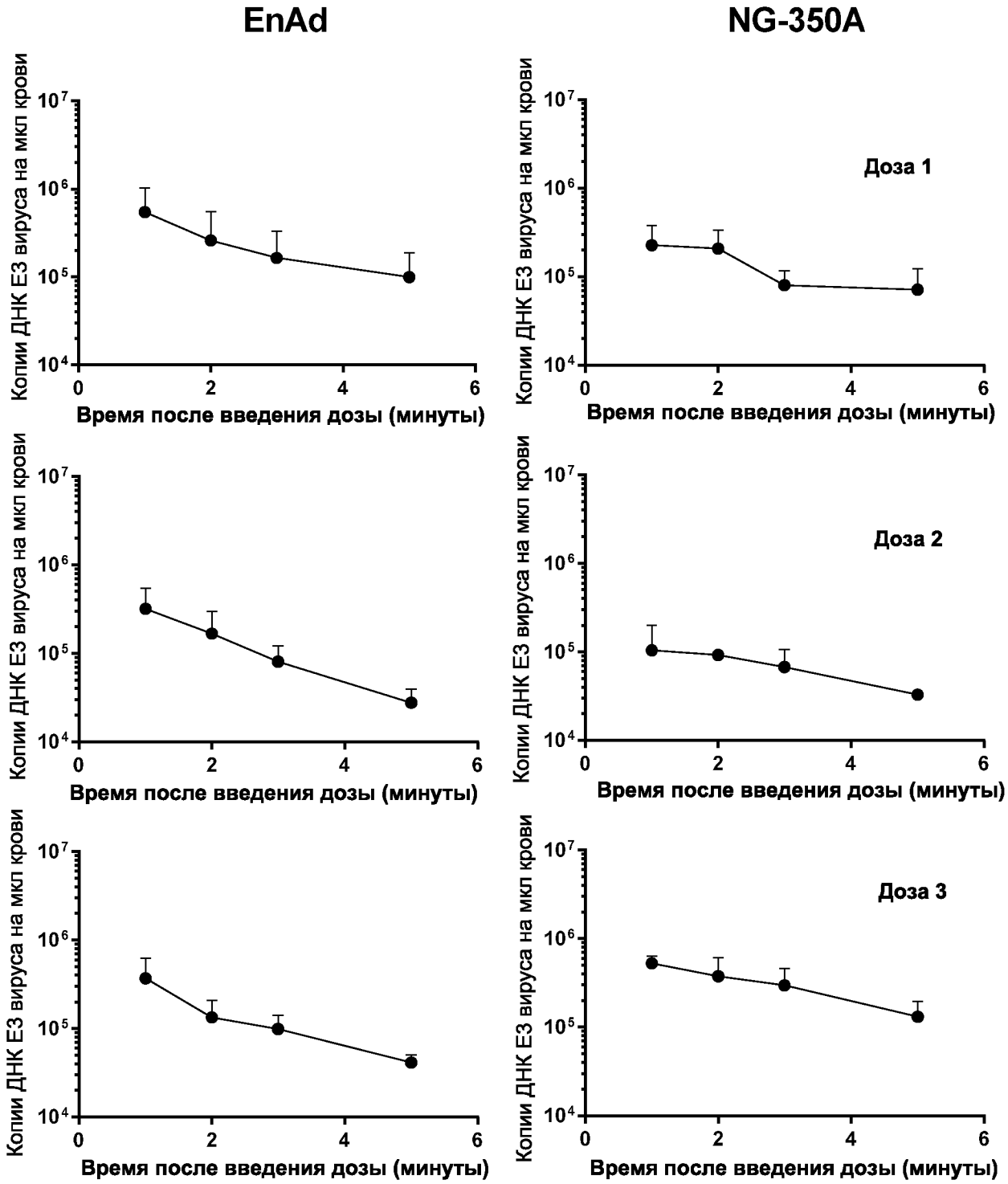

100000
10000
1000
100
10
MCP-1 в плазме (пг/мл)
EnAd
NG-350A
Исходный уровень
+6 ч.
+24 ч.
+7 дней
после дозы 3

Фигура 31B

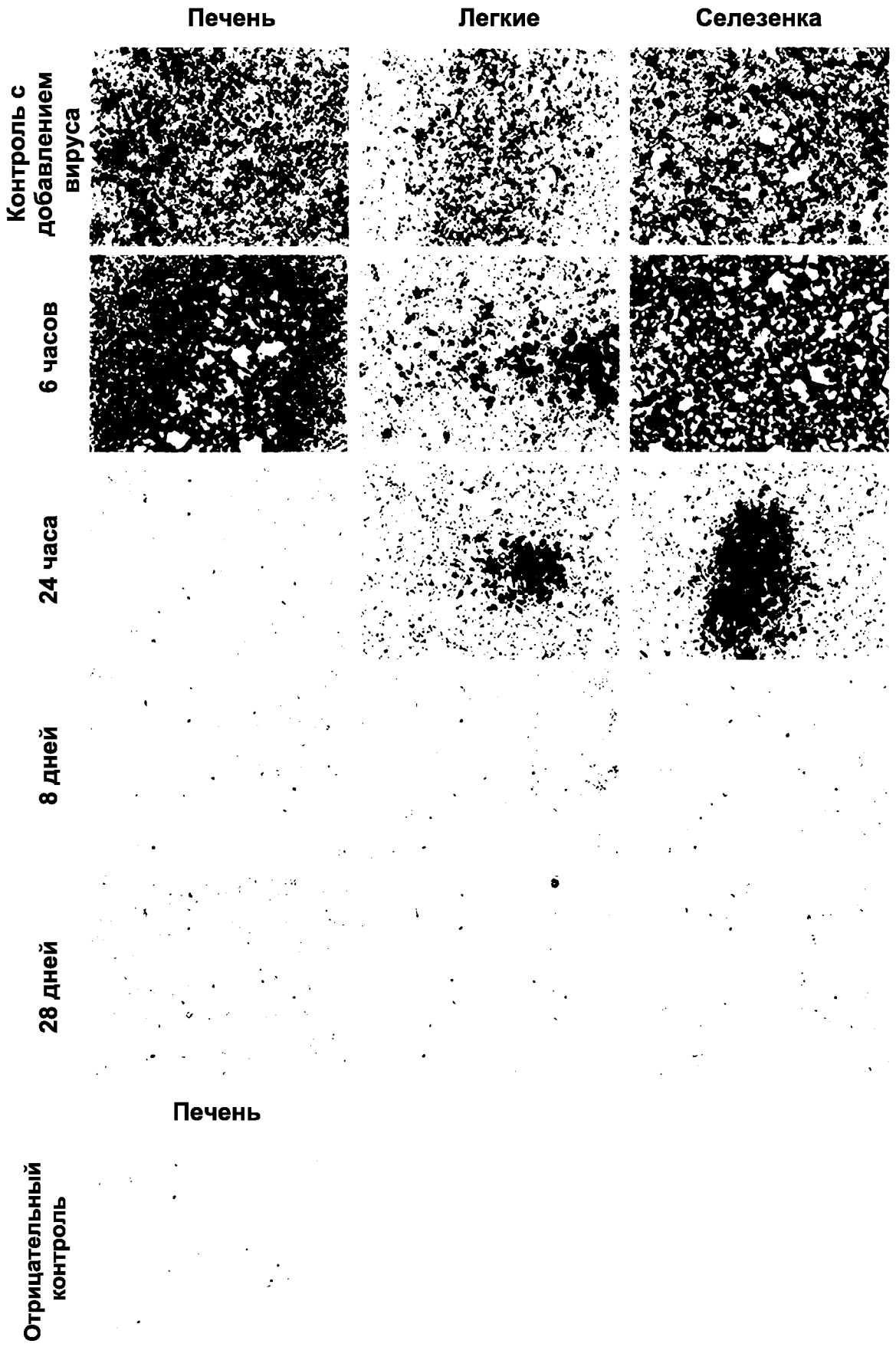

1000
100
10
1
ИЛ-6 в плазме (пг/мл)
Исходный уровень
+6 ч.
+24 ч.
после дозы 1


1000
100
10
1
ИЛ-6 в плазме (пг/мл)
EnAd
NG-350A
Исходный уровень
+6 ч.
+24 ч.
+7 дней
после дозы 3

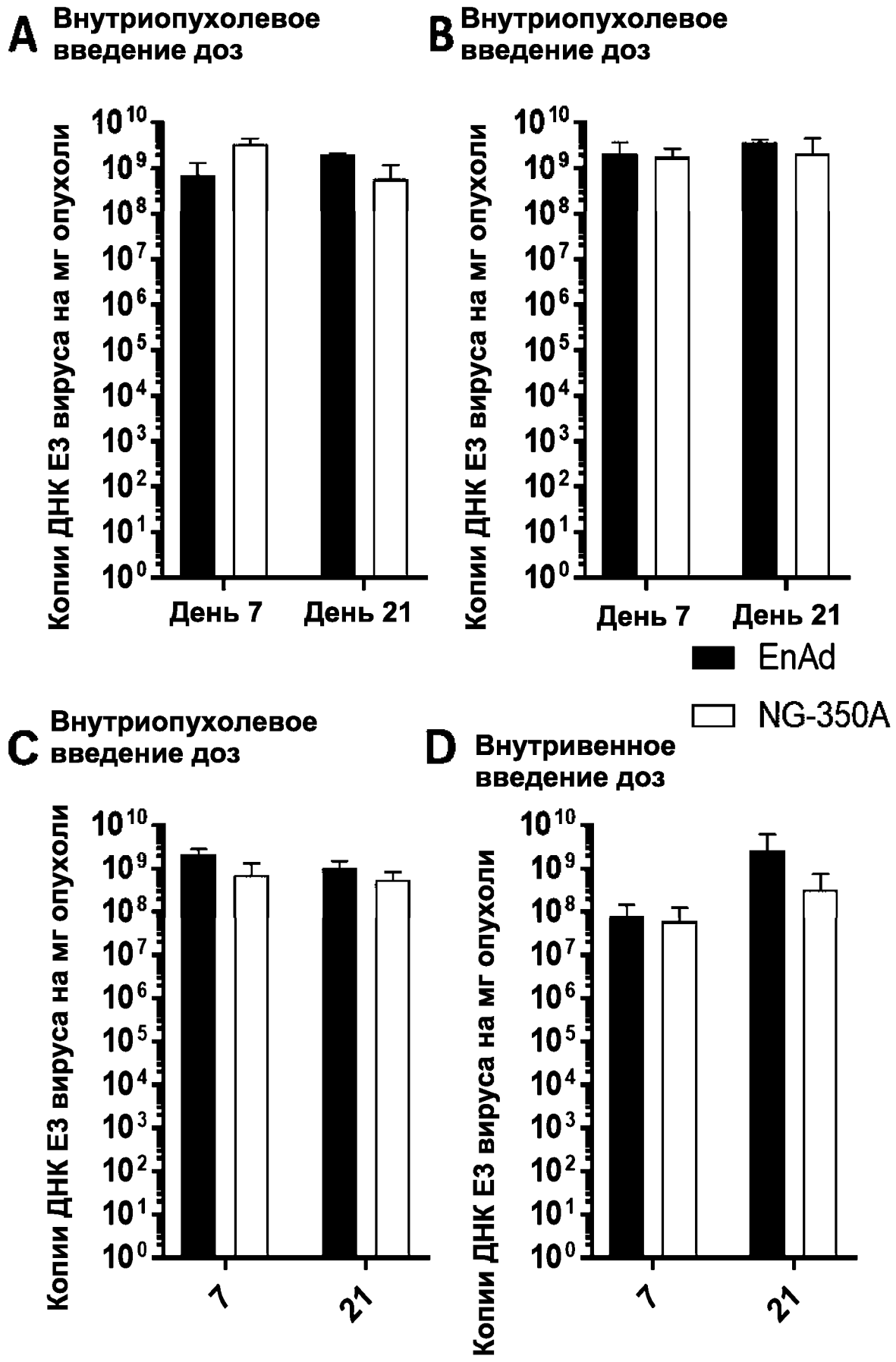
Фигура 32


EnAd
NG-350A
Копии ДНК Е3 вируса на мкл крови
10^7
10^6
10^5
10^4
0
2
4
6
Время после введения дозы (минуты)
Доза 1
Доза 2
Доза 3

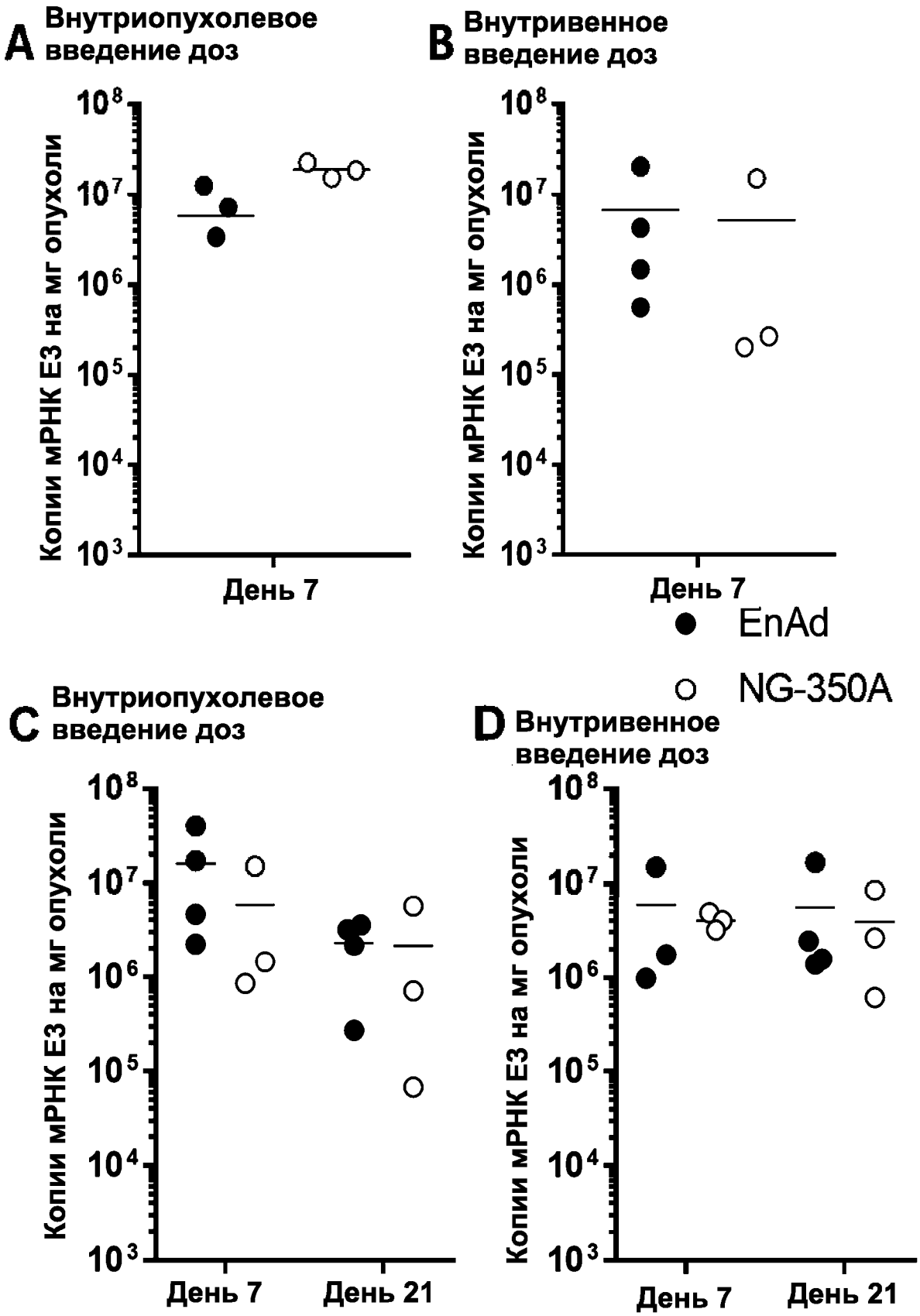
Фигура 33


Печень
Легкие
Селезенка
Контроль с добавлением вируса
6 часов
24 часа
8 дней
28 дней
Печень
Отрицательный контроль

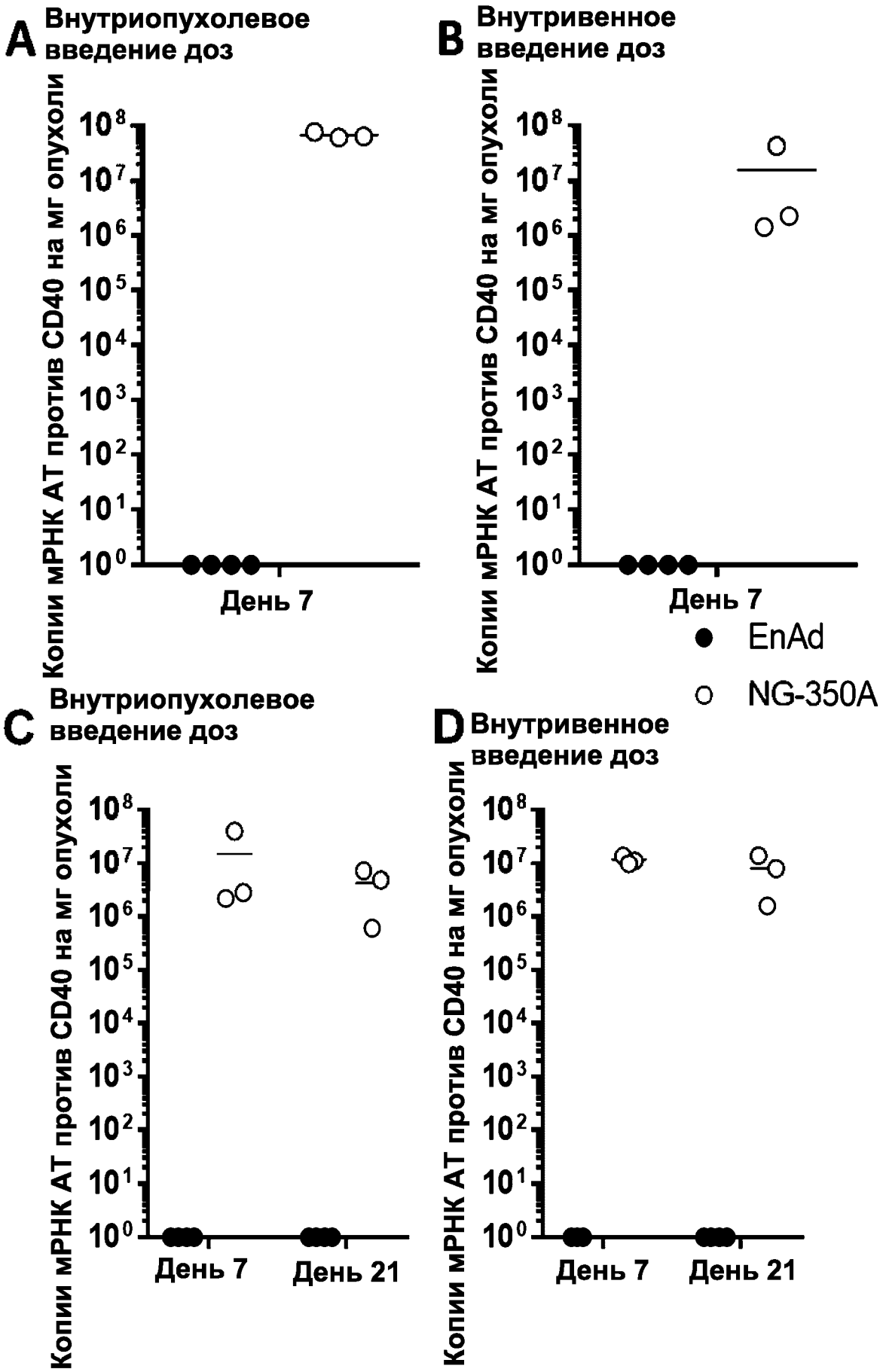
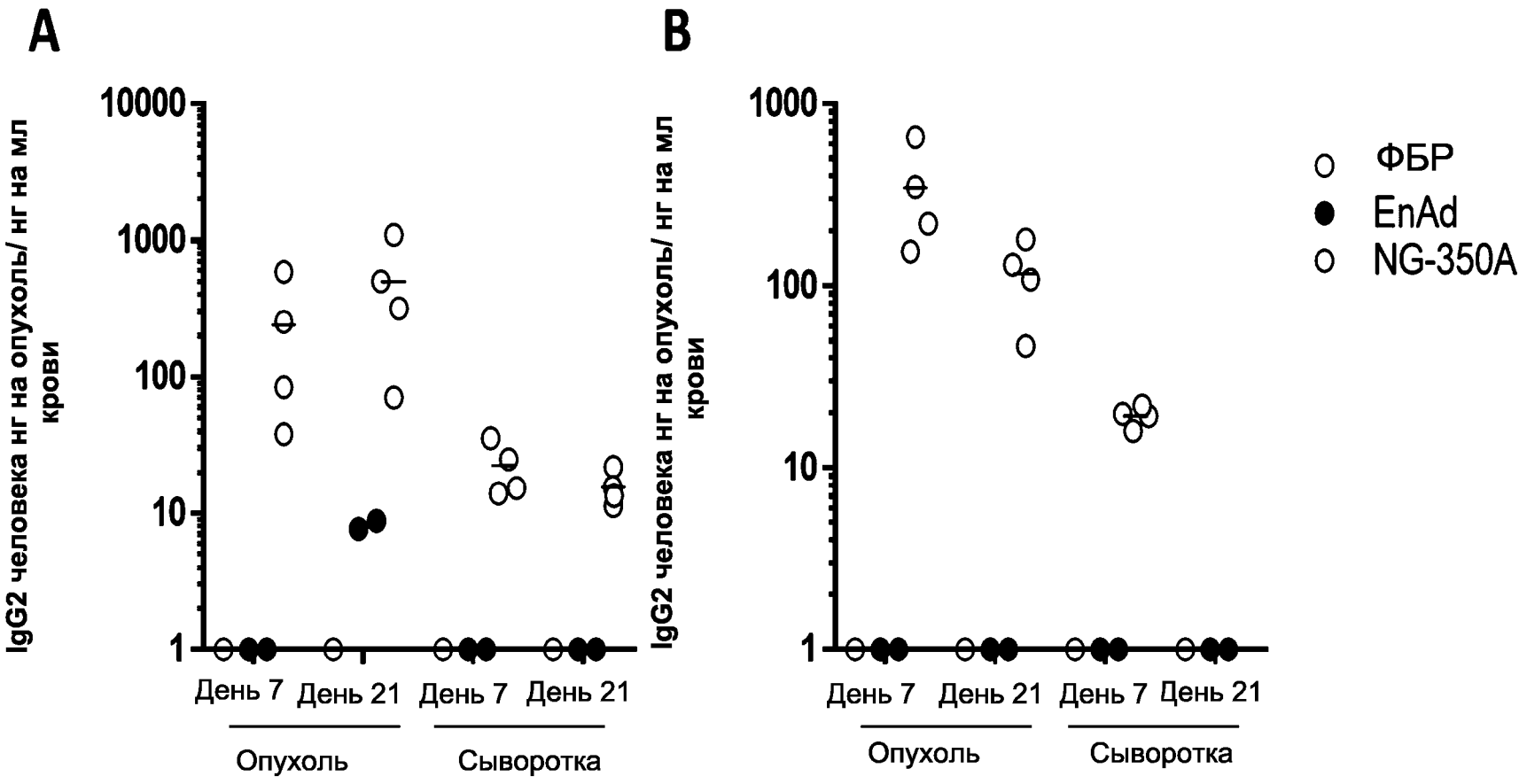
Фигура 34


A
Внутриопухолевое введение доз
B
Внутриопухолевое введение доз
C
Внутриопухолевое введение доз
D
Внутривенное введение доз
Копии ДНК E3 вируса на мг опухоли
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
10^{2}
10^{1}
10^{0}
День 7
День 21
7
21
EnAd
NG-350A

Фигура 35


A
Внутриопухолевое введение доз
B
Внутривенное введение доз
C
Внутриопухолевое введение доз
D
Внутривенное введение доз
Копии мРНК E3 на мг опухоли
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
День 7
День 21
EnAd
NG-350A

Фигура 36


A
Внутриопухолевое введение доз
B
Внутривенное введение доз
C
Внутриопухолевое введение доз
D
Внутривенное введение доз
Копии мРНК АТ против CD40 на мг опухоли
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
День 7
День 21
EnAd
NG-350A

Фигура 37 **Обнаружение белка агонистического антитела против CD40 в подкожных опухолях A549 после трех в.в. инъекций или одной дробной в.о. дозы**