

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992863** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.06

(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)
A61K 35/15 (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.06.14

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ С ПОМОЩЬЮ ВИРУСА ДЕНГЕ И ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

(31) **62/520,345**

(32) **2017.06.15**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/037616**

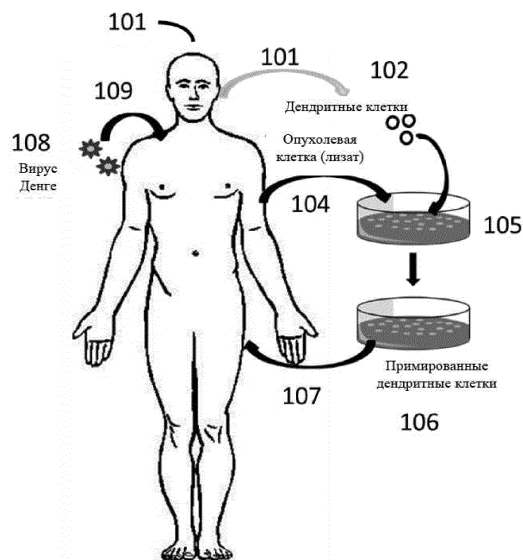
(87) **WO 2018/232166 2018.12.20**

(71) Заявитель:
**ПРАЙМВАКС ИММУНО-
ОНКОЛОДЖИ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
Лайдэй Брюс У., Чэнь Тони (US)

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Глухарёва А.О., Лыу
Т.Н., Угрюмов В.М., Христофоров
А.А., Гизатуллина Е.М., Гизатуллин
Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Лебедев
В.В., Парамонова К.В. (RU)**

(57) В настоящем документе описаны композиции и способы лечения заболевания, в частности меланомы, с помощью вируса Денге и, необязательно, примированных дендритных клеток, распознающих опухолевый антиген. Описаны протоколы лизиса, при этом лизис не приводит к полному или не особо полному лизису клеток для обеспечения сохранения молекул клеточной поверхности в погруженном в клеточную поверхность состоянии. Предложены также нелетальные штаммы вируса Денге для терапевтических целей.



201992863

A1

A1

201992863

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ С ПОМОЩЬЮ ВИРУСА ДЕНГЕ И ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Описание

Ссылка на родственную заявку

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет и преимущество в соответствии с заявкой на выдачу патента США № 62/520345, поданной 15 июня 2017 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Перечень последовательностей

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 14 июня 2018 года, имеет имя 48253-707_601_SL.txt и имеет размер 45748 байтов.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0003] Иммунотерапия, в отличие от цитотоксических лекарственных средств, облучения и хирургии, стимулирует иммунную систему распознавать и уничтожать опухолевые клетки. Были предприняты многочисленные попытки стимулировать иммунную систему на распознавание и уничтожение опухолевых клеток. Они были реализованы с ограниченным успехом из-за самоидентификации пептидов, выбранных в качестве мишени для иммунотерапии, отсутствия иммунной активации, нежелательных явлений и/или механизмов уклонения опухоли от иммунитета.

[0004] Способность современных методов клеточной терапии, например, методов терапии с применением дендритных клеток, индуцировать стойкие полные ответы у пациентов с поздними стадиями рака является низкой (5-10% при большинстве иммуногенных типов рака, ниже при других). Зачастую методы терапии с применением дендритных клеток дают результаты, которые меньше, чем требуется, из-за низкой активации (например, недостаточного количества иммунных клеток для надлежащего уничтожения всех раковых клеток), низкого целенаправленного воздействия (например, уничтожаются здоровые клетки и/или не уничтожаются опухолевые клетки) или иммуносупрессированного опухолевого микроокружения, что ограничивает эффективность лекарственного средства. Таким образом, существует потребность в улучшенных методах иммунотерапии для лечения рака.

[0005] Опухоли из-за их высоких митотических и клеточных метаболических процессов зачастую испытывают дефицит кислорода. Этот дефицит кислорода приводит к более широкому использованию анаэробных путей для продуцирования аденозинтрифосфата (АТФ), что приводит в результате к повышению уровней лактата и снижению pH в цитоплазме и ядре. Таким образом, существует потребность в целенаправленном воздействии и искоренении таких опухолевых участков с низкой перфузией и высокой генетической пластичностью.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0006] Предусмотрены способы лечения или уменьшения меланомы, включающие: введение вируса Денге нуждающемуся в этом субъекту, причем у субъекта есть меланома; и введение примированных дендритных клеток субъекту, причем примированные дендритные клетки получены путем приведения в контакт дендритных клеток с опухолевым антигеном. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых меланома представляет собой запущенную меланому. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых меланома является запущенной и находится на стадии III или стадии IV. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, включающие получение дендритных клеток от субъекта по меньшей мере за неделю до введения дозы вируса Денге. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге вводят в количестве от 10^4 БОЕ до 10^8 БОЕ. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге вводят в количестве от 10^5 БОЕ до 10^7 БОЕ. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге вводят в концентрации от 10000 БОЕ/мл до 90000 БОЕ/мл. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге вводят в концентрации около 30000 БОЕ/мл. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, включающие введение примированных дендритных клеток через 4-10 дней после введения дозы вируса Денге. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге вводят подкожно. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге вводят посредством внутриопухолевой инъекции. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, включающие введение примированных дендритных клеток, когда у субъекта имеется лихорадочный симптом. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, включающие введение примированных дендритных клеток, когда температура у субъекта достигла 101°F . Кроме того, в настоящем документе представлены способы, включающие введение первой аликвоты примированных дендритных клеток

субъекту в первый раз и второй аликвоты примированных дендритных клеток во второй раз. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых первый и второй раз разделены сроком до 30 дней. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых первый и второй раз разделены сроком, составляющим около 3 дней. Кроме того, представлены способы, при которых количество примированных дендритных клеток в первой аликвоте примированных дендритных клеток составляет от 10^4 до 10^8 клеток. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых общее количество примированных дендритных клеток в каждой из первой аликвоты примированных дендритных клеток и второй аликвоты примированных дендритных клеток составляет от 10^6 клеток до 10^9 клеток. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых дендритные клетки являются аллогенными для субъекта. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых дендритные клетки являются аутологичными для субъекта. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, включающие получение дендритных клеток от субъекта. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, включающие приведение дендритных клеток в контакт с опухолевым лизатом от субъекта. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых примированные дендритные клетки продуцируют по меньшей мере около 16 нг/мл IL-12p70. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых примированные дендритные клетки продуцируют по меньшей мере около 29 нг/мл IL-12p70. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге относится к серотипу 1, 2, 3, 4 или 5. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге представляет собой DENV2 № 1710. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге представляет собой DENV1 № 45AZ5. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых вирус Денге представляет собой S16803, HON 1991 C, HON 1991 D, HON 1991 B, HON 1991 A, SAL 1987, TRI 1981, PR 1969, IND 1957, TRI 1953, TSV01, DS09-280106, DS31-291005, 1349, GD01/03, 44, 43, China 04, FJ11/99, FJ-10, QHD13CAIQ, CO/BID-V3358, FJ/UH21/1971, GU/BID-V2950, American Asian, GWL18, IN/BID-V2961, Od2112, RR44, 1392, 1016DN, 1017DN, 1070DN, 98900663DHF, BA05i, 1022DN, NGC, Pak-L-2011, Pak-K-2009, Pak-M-2011, PakL-2013, Pak—L-2011, Pak-L-2010, Pak-L-2008, PE/NFI1159, PE/IQA 2080, SG/D2Y98P-PP1, SG/05K3295DK1, LK/BID/V2421, LK/BID-V2422, LK/BID-V2416, 1222-DF-06, TW/BID-V5056, TH/BID-V3357, US/BID-V5412, US/BID-V5055, IQT1797, VN/BID-V735, US/Hawaii/1944, CH53489 или 341750.

[0007] В настоящем документе представлены способы лечения или уменьшения меланомы, включающие введение DENV1 № 45AZ5 нуждающемуся в этом субъекту,

причем у субъекта есть меланома; получение дендритных клеток от субъекта; приведение дендритных клеток в контакт с опухолевым антигеном от субъекта с получением примированных дендритных клеток; и введение примированных дендритных клеток субъекту. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых меланома представляет собой запущенную меланому. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых меланома является запущенной и находится на стадии III или стадии IV. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых DENV1 № 45AZ5 вводят в количестве от 10^4 БОЕ до 10^8 БОЕ. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых DENV1 № 45AZ5 вводят в количестве от 10^5 БОЕ до 10^7 БОЕ. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых DENV1 № 45AZ5 вводят в концентрации, составляющей от 10000 БОЕ/мл до 90000 БОЕ/мл. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых DENV1 № 45AZ5 вводят в концентрации, составляющей около 30000 БОЕ/мл.

[0008] В настоящем документе представлены способы лечения или уменьшения меланомы, включающие введение DENV2 № 1710 нуждающемуся в этом субъекту, причем у субъекта есть меланома; получение дендритных клеток от субъекта; приведение дендритных клеток в контакт с опухолевым антигеном от субъекта с получением примированных дендритных клеток; и введение примированных дендритных клеток субъекту. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых меланома представляет собой запущенную меланому. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых меланома является запущенной и находится на стадии III или стадии IV. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых DENV2 № 1710 вводят в количестве от 10^4 БОЕ до 10^8 БОЕ. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых DENV2 № 1710 вводят в количестве от 10^5 БОЕ до 10^7 БОЕ. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых DENV2 № 1710 вводят в концентрации, составляющей от 10000 БОЕ/мл до 90000 БОЕ/мл. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, при которых DENV2 № 1710 вводят в концентрации, составляющей около 30000 БОЕ/мл.

Краткое описание чертежей

[0009] На **фиг. 1** изображен иллюстративный способ лечения с помощью вируса Денге и дендритных клеток.

[0010] На **фиг. 2** представлен график соответствия количества метастаз в легких из клеток меланомы у мышей при различных условиях лечения. Схематическими столбцами показано среднее количество метастаз в легких для каждого условия.

[0011] На **фиг. 3** представлен график соответствия количества метастаз в легких из клеток меланомы у мышей при различных условиях лечения. Схематическими столбцами показано среднее количество метастаз в легких для каждого условия.

[0012] На **фиг. 4** представлен график данных проточной цитометрии, подтверждающих выделение CD14+ моноцитов.

[0013] На **фиг. 5** представлен график данных по экспрессии белка для IL-12p70, экспрессируемого клетками DC, полученными раскрытыми в настоящем документе способами, относительно данных у DC, полученных способами сравнения.

[0014] На **фиг. 6** представлен график цитотоксичности супернатанта, индуцированного вирусом Денге, на линии клеток меланомы (клетки FEMX) в присутствии цитотоксических Т-лимфоцитов. По оси Y представлен процент гибели клеток относительно общего количества клеток.

[0015] На **фиг. 7** представлен график цитотоксичности супернатанта, индуцированного вирусом Денге, на линии клеток меланомы (клетки 624.28) в присутствии цитотоксических Т-лимфоцитов. По оси Y представлен процент гибели клеток относительно общего количества клеток.

[0016] На **фиг. 8** представлен график цитотоксичности супернатанта, индуцированного вирусом Денге, и натуральных киллеров на линии клеток меланомы (клетки FEMX). По оси Y представлен процент гибели клеток относительно общего количества клеток.

[0017] На **фиг. 9** представлен график цитотоксичности супернатанта, индуцированного вирусом Денге, и натуральных киллеров на линии клеток меланомы (клетки FEMX). По оси Y представлен процент гибели клеток относительно общего количества клеток.

[0018] На **фиг. 10** представлен график индуцированных посредством DV супернатантов, которые являются цитотоксичными для клеток линии клеток меланомы 624.28 в отсутствие цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) или натуральных киллеров (NK). По оси Y представлен процент гибели клеток относительно общего количества клеток.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

[0019] В настоящем раскрытии различные варианты осуществления представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона дано просто для удобства и краткости, и его не следует рассматривать как жесткое ограничение объема

любых вариантов осуществления. Соответственно, следует считать, что при описании диапазона конкретно раскрыты все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона до десятой доли нижнего предела, если контекст явно не предписывает иное. Например, описание такого диапазона, как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрытые такие поддиапазоны, как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные значения в этом диапазоне, например, 1,1, 2, 2,3, 5 и 5,9. Это применимо независимо от широты диапазона. Верхний и нижний пределы этих промежуточных диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, а также охватываются настоящим изобретением, за исключением любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один из пределов или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение, если контекст явно не предписывает иное.

[0020] Применяемая в контексте настоящего документа терминология предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения какого-либо варианта осуществления. Применяемые в контексте настоящего документа формы единственного числа понимают также как включающие формы множественного числа, если контекст явно не предписывает иное. Дополнительно следует понимать, что термины «содержит» и/или «содержащий» при применении в настоящем описании указывают на наличие заявленных признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов и/или компонентов, но не исключают наличия или добавление одного или нескольких других признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов, компонентов и/или их групп. Применяемый в контексте настоящего документа термин «и/или» включает все без исключения комбинации одного или нескольких связанных перечисленных элементов.

[0021] Если специально не указано или не очевидно из контекста, применяемый в настоящем документе термин «приблизительно» в отношении числа или диапазона чисел означает указанное число и числа $\pm 10\%$ от него или на 10% ниже нижнего указанного предела и на 10% выше указанного верхнего предела для значений, указанных для данного диапазона.

[0022] Применяемый в контексте настоящего документа термин «субъект» включает млекопитающих. К млекопитающим относятся крысы, мыши, не относящиеся к человеку приматы и приматы, включая людей.

Противораковая терапия

[0023] В настоящем документе представлены композиции и их применения, причем композиции содержат вирус Денге, присутствующий в количестве, эффективном для лечения или уменьшения рака у нуждающегося в этом субъекта. Применение вируса Денге, который описан в настоящем документе, включает терапевтическое введение вируса Денге для лечения различных состояний, таких как рак, у субъекта. Кроме того, в настоящем документе представлены способы лечения рака путем введения субъекту эффективного количества вируса Денге, причем вирус Денге способен лечить, стабилизировать или уменьшать рак у подвергаемого лечению субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение. Кроме того, предложена композиция, содержащая вирус Денге, которую также можно применять в качестве адъюванта для противораковой терапии. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге является частью комбинированной терапии для лечения рака. Терапию вирусом Денге проводят в сочетании с различными противораковыми терапиями, такими как терапии, которые сочетают физиологические (гипертермическое снижение перфузии опухолей), иммунологические (активация эффекторных клеток адаптивной и врожденной иммунной системы) и индуцирующие апоптоз пути (sTRAIL) для уничтожения или стабилизации роста опухолевых клеток.

Вирусы Денге

[0024] Вирус Денге полезен для композиций и способов, описанных в настоящем документе, поскольку первичные инфекции характеризуются более низкой смертностью, чем обычная простуда, но также обеспечивают повышенную проницаемость капилляров и продуцирование цитокинов, помимо других признаков. В настоящем документе представлены композиции для лечения рака, причем композиция содержит вирус Денге в количестве, эффективном для уменьшения или снижения степени рака у нуждающегося в этом субъекта. (**Фиг. 1**) Также в настоящем документе представлены способы лечения рака, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества вируса Денге для уменьшения или снижения степени рака. В настоящем документе также представлены способы стабилизации рака, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества вируса Денге для стабилизации или контроля роста рака. Вирусы Денге относятся к *Arboviruses* и передаются исключительно комарами видов *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*. Вирус имеет сложный жизненный цикл с участием неопознанного резервуара лесных млекопитающих (возможно, приматов) и людей-хозяев. Самка комара получает высасываемую кровь от инфицированного человека, вирус размножается до высокого инфекционного титра (10^5 /мл) в клетках эпителия кишечника, а затем передается другому человеку, когда комар вытаскивает свой стилет с помощью

противодавления после повторного высасывания крови. Эпидемии Денге ежегодно поражают 50 миллионов человек, при этом несколько тысяч человек умирают, обычно это дети с недостаточным лечением шока, связанного со вторичной инфекцией.

[0025] Геном вируса Денге кодирует структурные белки, капсидный белок С, мембранный белок М, белок оболочки Е и неструктурные белки NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b и NS5. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге является живым штаммом вируса Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге является аттенуированным штаммом вируса Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге является ослабленным штаммом вируса Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге выбран из следующих серотипов вируса Денге: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 и DENV-5 и их комбинации. В настоящем документе представлены способы и композиция для комбинированной терапии, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту вируса Денге (DV) и дендритных клеток (DC), примированных для целенаправленного воздействия на опухолевые клетки.

[0026] Вирусы Денге представляют собой вирусы, содержащие плюс-цепь РНК, из семейства тогавирусов, подсемейства Flaviviridae (группы В). Вирус имеет икосаэдрическую геометрию и составляет примерно 40-45 нанометров в диаметре. Геном из 11000 оснований кодирует белок нуклеокапсида (NC), белок слияния с мембраной prM, гликопротеин оболочки (Е) и 5 неструктурных белков NS1-NS5. Белок NC образует вирусное ядро с шипами оболочки, прикрепленными через комплекс prM. Гликопротеин Е является заметной мишенью для нейтрализующих антител, а белки NS-3 и NS-4 являются заметными мишенями для CD4+ и CD8+ CTL.

[0027] Вирусы Денге составляют пять различных серотипов, т. е. DENV-1 - DENV-5. Серотипы 2 и 4 перекрестно нейтрализуются IgG, и типы 1 и 3 также перекрестно нейтрализуются. Тем не менее, иммунитет не является полным, и Денге уникален среди вирусных инфекций тем, что последующее заражение не перекрестно нейтрализующимся серотипом несет повышенный риск смертности из-за шокового синдрома от иммунной гиперактивации. В некоторых случаях можно использовать нелетальную форму вируса Денге. Иллюстративные нелетальные вирусы Денге могут относиться к серотипу 1, 2, 3, 4 или 5. Например, нелетальный вирус Денге может быть выбран из **Таблицы 1**. Например, вирус Денге может быть от около 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или вплоть до около 100% идентичным по гомологии последовательностей или структурной гомологии с любым штаммом из **Таблицы 1**.

Таблица 1. Нелетальные штаммы вируса Денге

Серотип	Штамм
I	45AZ5
II	1710
II	S16803
II	HON 1991 C
II	HON 1991 D
II	HON 1991 B
II	HON 1991 A
II	SAL 1987
II	TRI 1981
II	PR 1969
II	IND 1957
II	TRI 1953
II	TSV01
II	DS09-280106
II	DS31-291005
II	1349
II	GD01/03
II	44
II	43
II	China 04
II	FJ11/99
II	FJ-10
II	QHD13CAIQ
II	CO/BID-V3358
II	FJ/UH21/1971
II	GU/BID-V2950
II	American Asian
II	GWL18
II	IN/BID-V2961
II	Od2112
II	RR44
II	1392

Серотип	Штамм
II	1016DN
II	1017DN
II	1070DN
II	98900663DHF
II	BA05i
II	1022DN
II	NGC
II	Pak-L-2011
II	Pak-K-2009
II	Pak-M-2011
II	PakL-2013
II	Pak—L-2011
II	Pak-L-2010
II	Pak-L-2008
II	PE/NFI1159
II	PE/IQA 2080
II	SG/D2Y98P-PP1
II	SG/05K3295DK1
II	LK/BID/V2421
II	LK/BID-V2422
II	LK/BID-V2416
II	1222-DF-06
II	TW/BID-V5056
II	TH/BID-V3357
II	US/BID-V5412
II	US/BID-V5055
II	IQT1797
II	VN/BID-V735
II	US/Hawaii/1944
III	CH53489
IV	341750

[0028] В настоящем документе представлены композиции и способы с применением еще одного штамма вируса Денге, причем композиция содержит штамм вируса Денге серотипа 1, 2, 3, 4 или 5. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге принадлежит к серотипу 1. В некоторых случаях DV является штаммом 45AZ5. Соответствующая геному 45AZ5 ДНК и последовательность белка представлены в **Таблице 2.**

Таблица 2. ДНК и аминокислотная последовательность штамма 45AZ5 DV

SEQ ID NO:	Последовательность
8	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTTCGAATCGGAAGCTTGCTTAAC GTAGTTCTAACAGTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAA AAGACGGGTCGACCGTCTTTCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCGCGTGTCAAC TGTTTCACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAAAGGATTGCTTTCAGGCCAAGGACCCA TGAAATTGGTGATGGCTTTTATAGCATTTCCTAAGATTTCTAGCCATACCTCCAACAG CAGGAATTTTGGCTAGATGGGGCTCATTCAAGAAGAATGGAGCGATCAAAGTGTTA CGGGGTTTCAAGAAAGAAATCTCAAACATGTTGAACATAATGAACAGGAGGAAAA GATCTGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCACAGCCCTGGCGTTCCATCTGACCA CCCGAGGGGGAGAGCCGCACATGATAGTTAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAAATCACT TTTGTTTAAGACCTCTGCAGGTGTCAACATGTGCACCCTTATTGCAATGGATTGTTGGG AGAGTTATGTGAGGACACAATGACCTACAAATGCCCCGGATCACTGAGACGGAA CCAGATGACGTTGACTGTTGGTGCAATGCCACGGAGACATGGGTGACCTATGGAAC ATGTTCTCAAACCTGGTGAACACCGACGAGACAAACGTTCCGTCGCACTGGCACCAC ACGTAGGGCTTGGTCTAGAAACAAGAACCGAAACGTGGATGTCCTCTGAAGGCGC TTGGAACAAATACAAAAAGTGGAGACCTGGGCTCTGAGACACCCAGGATTACG GTGATAGCCCTTTTCTAGCACATGCCATAGGAACATCCATCACCCAGAAAGGGAT CATTTTTATTTTGCTGATGCTGGTAACTCCATCCATGGCCATGCGGTGCGTGGGAAT AGGCAACAGAGACTTCGTGGAAGGACTGTGAGGAGCTACGTGGGTGGATGTGGTA CTGGAGCATGGAAGTTGCGTCACTACCATGGCAAAAGACAAACCAACACTGGACA TTGAACTCTTGAAGACGGAGGTCACAAACCCTGCCGTCTGCGCAAACTGTGCATT GAAGCTAAAATATCAAACACCACCACCGATTTCGAGATGTCCAACACAAGGAGAAG CCACGCTGGTGGAAGAACAGGACACGAACCTTTGTGTGTCGACGAACGTTTCGTGGAC AGAGGCTGGGGCAATGGTTGTGGGCTATTTCGAAAAGGTAGCTTAATAACGTGTGC TAAGTTTAAGTGTGTGACAAAACCTGGAAGGAAAGATAGTCCAATATGAAAACCTTA AAATATTCAGTGATAGTCACCGTACACACTGGAGACCAGCACCAAGTTGGAAATG AGACCACAGAACATGGAACAACCTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCCACGTCGGA AATACAGCTGACAGACTACGGAGCTTAACATTGGATTGTTACCTAGAACAGGGC TAGACTTTAATGAGATGGTGTTGTTGACAATGAAAAAAAATCATGGCTCGTCCAC AAACAATGGTTTCTAGACTTACCACTGCCTTGGACCTCGGGGGCTTCAACATCCCA AGAGACTTGGAATAGACAAGACTTGCTGGTCACATTTAAGACAGCTCATGCAAAA

AAGCAGGAAGTAGTCGTAAGGATCACAAGAAGGAGCAATGCACACTGCGTTGA
 CTGGAGCGACAGAAATCCAAACGTCTGGAACGACAACAATTTTTGCAGGACACCT
 GAAATGCAGATTAAAAATGGATAAACTGATTTTAAAAGGGATGTCATATGTAATGT
 GCACAGGGTCATTCAAGTTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAAGTGT
 TCTAGTGCAGGTAAATACGAAGGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCCCTCTCGT
 CCAAGATGAGAAGGGAGTAACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCCAACCCCAT
 AGTCACTGACAAAGAAAAACAGTCAACATTGAAGCGGAGCCACCTTTTGGTGAG
 AGCTACATTGTGGTAGGAGCAGGTGAAAAAGCTTTGAAACTAAGCTGGTTCAGA
 AGGGAAGCAGTATAGGGAATAATGTTTGAAGCAACTGCCCGTGGAGCACGAAGGAT
 GGCCATCCTGGGAGACACTGCATGGGACTTCGGTTCTATAGGAGGGGTGTTACGT
 CTGTGGGAAACTGATACACCAGATTTTTGGGACTGCGTATGGAGTTTTGTTACAGC
 GGTGTTTCTTGGACCATGAAGATAGGAATAGGGATTCTGCTGACATGGCTAGGATT
 AAACCAAGGAGCACGTCCCTTTCAATGACGTGTATCGCAGTTGGCATGGTCACAC
 TGTACCTAGGAGTCATGGTTCAGGCGGACTCGGGATGTGTAATCAACTGGAAAGGC
 AGAGAACTCAAATGTGGAAGCGGCATTTTTGTACCAATGAAGTCCACACCTGGAC
 AGAGCAATATAAATTCCAGGCCGACTCCCTAAGAGACTATCAGCGGCCATTGGGA
 AGGCATGGGAGGAGGGTGTGTGTGGAATTCGATCAGCCACTCGTCTCGAGAACATC
 ATGTGGAAGCAAATATCAAATGAATTAACCACATCTTACTTGAAAATGACATGAA
 ATTTACAGTGGTCGTAGGAGACGTTAGTGGAATCTTGCCCCAAGGAAAGAAAATG
 ATTAGGCCACAACCCATGGAACACAAATACTCGTGGAAGAGCTGGGGAAAAGCCA
 AAATCATAGGAGCAGATGTACAGAATACCACCTTCATCATCGACGGCCCAAACACC
 CCAGAATGCCCTGATAACCAAAGAGCATGGAACATTTGGGAAGTTGAAGACTATG
 GATTTGGAATTTTCACGACAAACATATGGTTGAAATTGCGTGACTCCTACACTCAA
 GTGTGTGACCACCGGCTAATGTCAGCTGCCATCAAGGATAGCAAAGCAGTCCATGC
 TGACATGGGGTACTGGATAGAAAGTGAAAAGAACGAGACTTGGAAGTTGGCAAGA
 GCCTCCTTCATAGAAGTTAAGACATGCATCTGGCCAAAATCCCACACTCTATGGAG
 CAATGGAGTCCTGGAAGTGAGATGATAATCCCAAAGATATATGGAGGACCAATA
 TCTCAGCACAACTACAGACCAGGATATTTACACAAACAGCAGGGCCGTGGCACTT
 GGGCAAGTTAGAACTAGATTTTGAATTTATGTGAAGGTACCACTGTTGTTGTGGATG
 AACATTGTGGAATCGAGGACCATCTCTTAGAACCACAACAGTCACAGGAAAGAC
 AATCCATGAATGGTGCTGTAGATCTTGCACGTTACCCCCCTACGTTTCAAAGGAG
 AAGACGGGTGCTGGTACGGCATGGAATCAGACCAGTCAAGGAGAAGGAAGAGA
 ACCTAGTTAAGTCAATGGTCTCTGCAGGGTCAGGAGAAGTGGACAGTTTTTCACTA
 GGACTGCTATGCATATCAATAATGATCGAAGAGGTAATGAGATCCAGATGGAGCA
 GAAAAATGCTGATGACTGGAACATTGGCTGTGTTCTCCTTCTCACAATGGGACAA
 TTGACATGGAATGATCTGATCAGGCTATGTATCATGGTTGGAGCCAACGCTTCAGA
 CAAGATGGGGATGGGAACAACGTACCTAGCTTTGATGGCCACTTTCAGAATGAGAC
 CAATGTTTCGAGTCGGGCTACTGTTTCGAGATTAACATCTAGAGAAGTTCTTCTTC
 TTACAGTTGGATTGAGTCTGGTGGCATCTGTAGAACTACCAAATTCCTTAGAGGAG
 CTAGGGGATGGACTTGCAATGGGCATCATGATGTTGAAATTAAGTACTGACTGATTTTCA
 GTCACATCAGCTATGGGCTACCTTGCTGTCTTTAACATTTGTCAAAACAACCTTTTTTC
 ATTGCACTATGCATGGAAGACAATGGCTATGATACTGTCAATTGTATCTCTCTTCCC

TTTATGCCTGTCCACGACTTCTCAAAAAACAACATGGCTTCCGGTGTGCTGGGATC
 TCTTGATGCAAACCACTAACCATGTTTCTTATAACAGAAAAAATACTGGGGAA
 GGAAAAGCTGGCCTCTCAATGAAGGAATTATGGCTGTTGGAATAGTTAGCATTCTT
 CTAAGTTCACCTTCTCAAGAATGATGTGCCACTAGCTGGCCCACTAATAGCTGGAGG
 CATGCTAATAGCATGTTATGTCATATCTGGAAGCTCGGCCGATTTATCACTGGAGA
 AAGCGGCTGAGGTCTCCTGGGAAGAAGAAGCAGAACACTCTGGTGCCTCACACAA
 CATACTAGTGGAGGTCCAAGATGATGGAACCATGAAGATAAAGGATGAAGAGAGA
 GATGACACACTCACCATTCTCCTCAAAGCAACTCTGCTAGCAATCTCAGGGGTATA
 CCAATGTCAATACCGGCGACCCTCTTTGTGTGGTATTTTTGGCAGAAAAAGAAAC
 AGAGATCAGGAGTGCTATGGGACACACCCAGCCCTCCAGAAGTGGAAAGAGCAGT
 CCTTGATGATGGCATTATATAGAATTCTCCAAAGAGGATTGTTGGGCAGGTCTCAAG
 TAGGAGTAGGAGTTTTTCAAGAAGGCGTGTTCCACACAATGTGGCACGTCACCAGG
 GGAGCTGTCCTCATGTACCAAGGGAAGAGACTGGAACCAAGTTGGGCCAGTGTC
 AAAAAGACTTGATCTCATATGGAGGAGGTTGGAGGTTTCAAGGATCCTGGAACGC
 GGGAGAAGAAGTGCAGGTGATTGCTGTTGAACCGGGGAAGAACCCCAAAAATGTA
 CAGACAGCGCCGGGTACCTTCAAGACCCCTGAAGGCGAAGTTGGAGCCATAGCTCT
 AGACTTTAAACCCGGCACATCTGGATCTCCTATCGTGAACAGAGAGGGAAAAATA
 GTAGGTCTTTATGGAAATGGAGTGGTGACAACAAGTGGTACCTACGTCAGTGCCAT
 AGCTCAAGCTAAAGCATCACAAGAAGGGCCTCTACCAGAGATTGAGGACGAGGTG
 TTTAGGAAAAGAACTTAACAATAATGGACCTACATCCAGGATCGGGAAAAACAA
 GAAGATACCTTCCAGCCATAGTCCGTGAGGCCATAAAAAGAAAGCTGCGCACGCT
 AGTCTTAGCTCCCACAAGAGTTGTGCTTCTGAAATGGCAGAGGCGCTCAAGGGAA
 TGCCAATAAGGTATCAGACAACAGCAGTGAAGAGTGAACACACGGGAAAGGAGAT
 AGTTGACCTTATGTGTCACGCCACTTCACTATGCGTCTCCTGTCTCCTGTGAGAGT
 TCCCAATTATAATATGATTATCATGGATGAAGCACATTTTACCGATCCAGCCAGCA
 TAGCAGCCAGAGGGTATATCTCAACCCGAGTGGGTATGGGTGAAGCAGCTGCGATT
 TTCATGACAGCCACTCCCCCGGATCGGTGGAGGCCTTTCCACAGAGCAATGCAGT
 TATCCAAGATGAGGAAAGAGACATTCTGAAAGATCATGGAATCAGGCTATGAC
 TGGATCACTGATTCCCAGGTAAAACAGTCTGGTTTGTTCACAGCATCAAATCAGG
 AAATGACATTGCCAACTGTTTAAGAAAGAATGGGAAACGGGTGGTCCAATTGAGC
 AGAAAACTTTTGACACTGAGTACCAGAAAACAAAAATAACGACTGGGACTATG
 TTGTCACAACAGACATATCCGAAATGGGAGCAAACCTCCGAGCCGACAGGGTAAT
 AGACCCGAGGCGGTGCCTGAAACCGGTAATACTAAAAGATGGCCCAGAGCGTGTC
 ATTCTAGCCGGACCGATGCCAGTGAAGTGTGGCTAGCGCCGCCAGAGGAGAGGAA
 GAATTGGAAGGAACCAAAATAAGGAAGGCGATCAGTATATTTACATGGGACAGCC
 TCTAAACAATGATGAGGACCACGCCATTGGACAGAAGCAAAAATGCTCCTTGAC
 AACATAAACACACCAGAAGGGATTATCCCAGCCCTCTTTGAGCCGGAGAGAGAAA
 AGAGTGCAGCAATAGACGGGAATACAGACTACGGGGTGAAGCGAGGAAAACGTT
 CGTGGAGCTCATGAGAAGAGGAGATCTACCTGTCTGGCTATCCTACAAAGTTGCCT
 CAGAAGGCTTCCAGTACTCCGACAGAAGGTGGTGCTTTGATGGGGAAAGGAACAA
 CCAGGTGTTGGAGGAGAACATGGACGTGGAGATCTGGACAAAAGAAGGAGAAAG
 AAAGAACTACGACCCCGCTGGCTGGATGCCAGAACATACTCTGACCCACTGGCTC

TGC GCGAATTCAAAGAGTTCGCAGCAGGAAGAAGAAGCGTCTCAGGTGACCTAAT
 ATTAGAAATAGGGAAACTTCCACAACATTTAACGCAAAGGGCCCAGAACGCCTTG
 GACAATCTGGTTATGTTGCACAACTCTGAACAAGGAGGAAAAGCCTATAGACACG
 CCATGGAAGAACTACCAGACACCATAGAAACGTTAATGCTCCTAGCTTTGATAGCT
 GTGCTGACTGGTGGAGTGACGTTGTTCTTCCTATCAGGAAGGGGTCTAGGAAAAAC
 ATCCATTGGCCTACTCTGCGTGATTGCCTCAAGTGCAGTGTTATGGATGGCCAGTGT
 GGAACCCCATTTGGATAGCGGCCTCTATCATACTGGAGTTCTTTCTGATGGTGTGCT
 TATTCCAGAGCCGGACAGACAGCGCACTCCACAAGACAACCAGCTAGCATAACGTG
 GTGATAGGTCTGTTATTCATGATATTGACAGTGGCAGCCAATGAGATGGGATTACT
 GGAAACCACAAAGAAGGACCTGGGGATTGGTCATGCAGCTGCTGAAAACCACCAT
 CATGCTGCAATGCTGGACGTAGACCTACATCCAGCTTCAGCCTGGACTCTCTATGC
 AGTGGCCACAACAATTATCACTCCCATGATGAGACACACAATTGAAAACACAACG
 GCAAATATTTCCCTGACAGCTATTGCAAACCAGGCAGCTATATTGATGGGACTTGA
 CAAGGGATGGCCAATATCAAAGATGGACATAGGAGTTCCACTTCTCGCCTTGGGGT
 GCTATTCTCAGGTGAACCCGCTGACGCTGACAGCGGCGGTATTGATGCTAGTGGCT
 CATTATGCCATAATTGGACCCGGACTGCAAGCAAAAGCTACTAGAGAAGCTCAAA
 AAAGGACAGCAGCCGGAATAATGAAAAACCCAACTGTGACGGGATCGTTGCAAT
 AGATTTGGACCCTGTGGTTTACGATGCAAAATTTGAAAAACAGCTAGGCCAAATAA
 TGTTGTTGATACTTTGCACATCACAGATCCTCCTGATGCGGACCACATGGGCCTTGT
 GTGAATCCATCACACTAGCCACTGGACCTCTGACTACGCTTTGGGAGGGATCTCCA
 GGAAAATTCTGGAACACCACGATAGCGGTGTCCATGGCAAACATTTTTAGGGGAA
 GTTATCTAGCAGGAGCAGGTCTGGCCTTTTCATTAATGAAATCTCTAGGAGGAGGT
 AGGAGAGGCACGGGAGCCCAAGGGGAAACACTGGGAGAAAAATGGAAAAGACAG
 CTAAACCAATTGAGCAAGTCAGAATTC AACACTTACAAAAGGAGTGGGATTATAG
 AGGTGGATAGATCTGAAGCCAAAGAGGGGTAAAAAGAGGAGAAACGACTAAAC
 ACGCAGTGTGAGAGGAACGGCCAAACTGAGGTGGTTTGTGGAGAGGAACCTTGT
 GAAACCAGAAGGGAAAGTCATAGACCTCGGTTGTGGAAGAGGTGGCTGGTCATAT
 TATTGCGCTGGGCTGAAGAAAGTCACAGAAGTGAAAGGATACACGAAAGGAGGAC
 CTGGACATGAGGAACCAATCCCAATGGCAACCTATGGATGGAACCTAGTAAAGCT
 ATACTCCGGGAAAGATGTATTCTTTACACCACCTGAGAAATGTGACACCCTCTTGT
 GTGATATTGGTGAGTCCTCTCCGAACCCAACTATAGAAGAAGGAAGAACGTTACGT
 GTTCTAAAGATGGTGGAACCATGGCTCAGAGGAAACCAATTTTGCATAAAAATTCT
 AAATCCCTATATGCCGAGTGTGGTAGAACTTTGGAGCAAATGCAAAGAAAACAT
 GGAGGAATGCTAGTGCGAAATCCACTCTCAAGAACTCCACTCATGAAATGTACTG
 GGTTTCATGTGGAACAGGAAACATTGTGTCAGCAGTAAACATGACATCTAGAATGC
 TGCTAAATCGATTCACAATGGCTCACAGGAAGCCAACATATGAAAGAGACGTGGA
 CTTAGGCGCTGGAACAAGACATGTGGCAGTAGAACCAGAGGTGGCCAACCTAGAT
 ATCATTGGCCAGAGGATAGAGAATATAAAAAATGAACACAAATCAACATGGCATT
 ATGATGAGGACAATCCATACAAAACATGGGCCTATCATGGATCATATGAGGTCAA
 GCCATCAGGATCAGCCTCATCCATGGTCAATGGTGTGGTGAGACTGCTAACC AAAC
 CATGGGATGTCATTCCCATGGTCACACAAATAGCCATGACTGACACCACACCCTTT
 GGACAACAGAGGGTGTTTAAAGAGAAAGTTGACACGCGTACACCAAAAGCGAAAC

	GAGGCACAGCACAAATTATGGAGGTGACAGCCAGGTGGTTATGGGGTTTTCTCTCT AGAAACAAAAAACCCAGAATCTGCACAAGAGAGGAGTTCACAAGAAAAGTCAGGT CAAACGCAGCTATTGGAGCAGTGTTTCGTTGATGAAAATCAATGGAAGTCAGCAAA AGAGGCAGTGGAAGATGAACGGTCTGAGGACCTTGTGCACAGAGAGAGGGAGCTT CATAACAAGGAAAATGTGCCACGTGTGTCTACAACATGATGGGAAAGAGAGAGA AAAAATTAGGAGAGTTCGGAAAGGCAAAAGGAAGTCGCGCAATATGGTACATGTG GTTGGGAGCGCGCTTTTTAGAGTTTGAAGCCCTTGGTTTCATGAATGAAGATCACT GGTTCAGCAGAGAGAATTCAGTCAGTGGAGTGGAAAGGAGAAGGACTCCACAACT TGGATACATACTCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGGAAATATGTATGCAGAT GACACAGCCGGATGGGACACAAGAATAACAGAGGATGATCTTCAGAATGAGGCCA AAATCACTGACATCATGGAACCTGAACATGCCCTATTGGCCACGTCAATCTTTAAG CTAACCTACCAAAACAAGGTAGTAAGGGTGCAGAGACCAGCGAAAAATGGAACCG TGATGGATGTCATATCCAGACGTGACCAGAGAGGAAGTGGACAGGTTGGAACCTA TGGCTTAAACACCTTCACCAACATGGAGGCCCACTAATAAGACAAATGGAGTCTG AGGGAATCTTTTCACCCAGCGAATTGGAAACCCCAATCTAGCCGAAAGAGTCCTC GACTGGTTGAAAAACATGGCACCGAGAGGCTGAAAAGAATGGCAATCAGTGGAG ATGACTGTGTGGTGAACCAATCGATGACAGATTTGCAACAGCCTTAACAGCTTTG AATGACATGGGAAAGGTAAGAAAAGACATACCGCAATGGGAACCTTCAAAGGAT GGAATGATTGGCAACAAGTGCCTTTCTGTTACACCATTTCACCAGCTGATTATGA AGGATGGGAGGGAGATAGTGGTGCCATGCCGCAACCAAGATGAACTTGTAGGTAG GGCCAGAGTATCACAAGGCGCCGGATGGAGCTTGAGAGAACTGCATGCCTAGGC AAGTCATATGCACAAATGTGGCAGCTGATGTACTTCCACAGGAGAGACTTGAGATT AGCGGCTAATGCTATCTGTTACGCCGTTCCAGTTGATTGGGTCCCAACCAGCCGCA CCACCTGGTCGATCCATGCCACCATCAATGGATGACAACAGAAGACATGTTGTCA GTGTGGAATAGGGTTTGGATAGAGGAAAACCCATGGATGGAGGACAAGACTCATG TGTCCAGTTGGGAAGACGTTCCATACCTAGGAAAAAGGGAAGATCAATGGTGTGG TTCCCTAATAGGCTTAACAGCACGAGCCACCTGGGCCACCAACATACAAGTGGCCA TAAACCAAGTGAGAAGGCTCATTGGGAATGAGAATTATCTAGACTTCATGACATCA ATGAAGAGATTCAAAAACGAGAGTGATCCCGAAGGGGCACTCTGGTAAGCCAACT CATTACAAAATAAAGGAAAATAAAAAATCAAACAAGGCAAGAAGTCAGGCCGG ATTAAGCCATAGCACGGTAAGAGCTATGCTGCCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTA AAATGAAGTCAGGCCGAAAGGCCACGGTTCGAGCAAGCCGTGCTGCCTGTAGCTCC ATCGTGGGGATGTAAAAACCCGGGAGGCTGCAAACCATGGAAGCTGTACGCATGG GGTAGCAGACTAGTGGTTAGAGGAGACCCCTCCCAAGACACAACGCAGCAGCGGG GCCCCAACACCAGGGGAAGCTGTACCCTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGA CCCCCGCACAAACAACAACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGC TGTCTCTACAGCATCATTCCAGGCACAGAACGCCAAAAAATGGAATGGTGCTGTTG AATCAACAGGTTCT
9	MNNQRKKTGRPSFNMLKRARNRVSTVSQLAKRFSKGLLSGQGPMKLVMAFIAFLRFL AIPPTAGILARWGSFKKNGAIKVLGRGFKKEISNMLNIMNRRKRSVTMLLMLLPTALAFH LTTRGGEPHMIVSKQERGKSLFKTSAGVNMCTLIAMD LGELCEDTMTYKCPRITETEP DDVDCWCNATETWVTYGTCSQTGEHRRDKRSVALAPHVGLGLETRTETWMSSEGAW

KQIQKVETWALRHPGFTVIALFLAHAIGTSITQKGIFILLMLVTPSMAMRCVGIGNRDF
 VEGLSGATWVDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRKLCIEAKISNTTT
 DSRCPQTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGSGLITCAKFKCVTKLEGK
 IVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSP
 RTGLDFNEMVLLTMKKKSWLVHKQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFKTA
 HAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTTIFAGHLKCRLKMDKLILKGMSYV
 MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTQNGRLITANPIVT
 DKEKPVNIEAEPFGESEYIVVGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMFEATARGARRMAILGD
 TAWDFGSIGGVFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSTSLSM
 TCIAVGMVTLYLGVMVQADSGCVINWKGRELKCGSGIFVTNEVHTWTEQYKFQADSP
 KRLSAAIGKAWEEGVCGIRSATRLNIMWKQISNELNHILLENDMKFTVVVGDVSGIL
 AQGKKMIRPQPMCHKYSWKSWSGKAKIIGADVQNTTFIIDGPNTPECPDNQRAWNIWE
 VEDYGFIFTTNIWLKLRDSYTQVCDHRLMSAAIKDSKAVHADMGYWIESEKNETWK
 LARASFIEVKTCIWPKSHTLWSNGVLESEMIIPKIYGGPISQHNYPGYFTQTAGPWHLG
 KLELDFDLCEGTTVVVDEHCGNRGPSLRTTTVTGKTIHEWCCRSCSLPPLRFKGEDGC
 WYGMEIRPVKEKEENLVKSMVSAGSGEVDSESLGLLCISIMIEEVMRSRWSRKMLMTG
 TLAVFLLLTMGQLTWNDLIRLCIMVGANASDKMGMGTTYLALMATFRMRPMFAVGL
 LFRRLTSREVLLTVGLSLVASVELPNSLEELGDGLAMGIMMLKLLTDFQSHQLWATL
 LSLTFVKTTFSLHYAWKTMAMILSIVSLFPLCLSTTSQKTTWLPVLLGSLGCKPLTMFLI
 TENKIWGRKSWPLNEGIMAVGIVSILLSLLKNDVPLAGPLIAGGMLIACYVISGSSADL
 SLEKAAEVSWEIEAEHSGASHNILVEVQDDGTMKIKDEERDDTLTILLKATLLAISGVY
 PMSIPATLFWVYFWQKKKQKRSGLWDTSPPEVERAVLDDGIYRILQRGLLGRSQVGV
 GVFQEGVFHTMWHVTRGAVLMYQGRLEPSWASVKKDLISYGGGWRFQGSWNAGE
 EVQVIAVEPGKNPKNVQTAPGTFKTPEGEVGAIALDFKPGTSGSPVNRREGKIVGLYGN
 GVVTTSGTYVSAIAQAKASQEGPLPEIEDEVFRKRNLTIMDLHPGSGKTRRYLPAIVRE
 AIKRKLRTLVLAPTRVVASMAEALKGMPIRYQTTAVKSEHTGKEIVDLMCHATFTMR
 LLSPVRVPNYNMIIMDEAHFTDPASIAARGYISTRVGMGEAAAIFMTATPPGSVEAFPQ
 SNAVIQDEERDIPERSWNSGYDWITDFPGKTVWFVPSIKSGNDIANCLRKNKRVVQLS
 RKTFTDEYQKTKNNDWDYVVTDDISEMGANFRADRIDPRRCLKPVLKDGPERVILA
 GPMPTVASAAQRRGRIGRNQNKEGDQYIYMGQPLNNDHHAHWTEAKMLLDNINT
 PEGIIPALFEPEREKSAIDGEYRLRGEARKTFVELMRRGDLPVWLSYKVASEGFQYSD
 RRWCDFGERNNQVLEENMDVEIWTKEGERKKLRPRWLDARTYSDPLALREFKEFAAG
 RRSVSGDLILEIGKLPQHLTQRAQNALDNLVMLHNSEQGGKAYRHAMEELPDTIETLM
 LLALIAVLTGGVTLFFLSGRGLGKTSIGLLCVIASSALLWMASVEPHWIAASIILEFFLM
 VLLIPEPDRQRTPDNQLAYVVIGLLFMILTVAANEMGLLETTKKDLGIGHAAAENHH
 HAAMLVDLHPASAWTLYAVATTIITPMMRHTIENTTANISLTAIANQAAILMGLDKG
 WPISKMDIGVPLLALGCYSQVNPLTLTAAVLMLVAHYAIIGPGLQAKATREAQKRTAA
 GIMKNPTVDGIVAILDLPVVYDAKFEKQLGQIMLLILCTSQILLMRTTWALCESITLATG
 PLTTLWEGSPGKFWNTTIAVSMANIFRGSYLAGAGLAFSLMKSLGGRRGTGAQGETL
 GEKWKRQLNQLSKSEFNTYKRSGLIEVDRSEAKEGLKRGETTKHAVSRGTAKLRWFVE
 RNLVKPEGKVIDLGCGRGGWSYYCAGLKKVTEVKGYTKGGPGHEEPIPMATYGWNL
 VKLYSGKDVFFTPPEKCDTLLCDIGESSPNPTIEEGRTLRLVKMVEPWLRGNQFCIKILN

	PYMPSSVETLEQMQRKHGGMLVRNPLSRNSTHEMYWVSCGTGNIVSAVNMTSRMLL NRFTMAHRKPTYERDVDLGAGTRHVAVEPEVANLDIIGQRIENIKNEHKSTWHYDEDN PYKTWAYHGSYEVKPSGSASSMVNGVVRLLTCPWDVIPMVTQIAMTDTTPFGQQRVF KEKVDTRTPKAKRGTAQIMEVTARWLWGFLSRNKKPRICTREEFTRKVRSNAAIGAVF VDENQWNSAKEAVEDERFWDLVHRERELHKQGKCATCVYNMMGKREKKLGEFGKA KGSRAIWYMWLGARFLEFEALGFMNEDHWFSRENSLSGVEGEGLHKLGYILRDISKIP GGNMYADDTAGWDTRITEDDLQNEAKITDIMEPEHALLATSIFKLTYQNKVVRVQRPA KNGTVMVISRRDQRGSGQVGTYGLNTFTNMEAQLIRQMESEGIFSPSELETPNLAERV LDWLKKHGTERRLKRMAISGDDCVVKPIDDRFATALTALNDMGKVRKDIPQWEPKSG WNDWQQVPFCSHHFHQLIMKDGREIVVPCRNQDELVGRARVSQGAGWSLRETACLG KSYAQMWQLMYFHRRDLRLAANAICSAVPVDWVPTSRTTWSIHANNQWMTTEDMLS VWNRVWIEENPW MEDKTHVSSWEDVPYLGKREDQWCGSLIGLTARATWATNIQVAI NQVRRLIGNENYLD FMTSMKRFKNESDPEGALW
--	--

[0029] В соответствии с некоторыми вариантами, DV относится к серотипу 2. В соответствии с некоторыми вариантами серотип 2 DV представляет собой штамм DENV-2 № 1710. Штамм DENV-2 № 1710 получен из образца, взятого в Пуэрто-Рико в 1985 году, и охарактеризован как тип А по результатам специфичного для сайта рестрикции RT-PCR-анализа с применением 4 праймеров (см. **Таблицу 3**), специфичных к генному участку оболочки. См. Harris et al., Virology 253, 86-95 (1999). Специфичная для сайта рестрикции RT-PCR с этими праймерами дает продукты амплификации длиной 582 пары оснований, 754 пары оснований и, возможно, 676 пар оснований. Штамм DENV-2 № 1710 занесен в базу данных CDC под номером 555. См. Harris (1999). Штамм DENV-2 № 1710 был выделен во время эпидемии в Пуэрто-Рико. Эта вспышка имела 9540 подозреваемых случаев заболевания DV, при этом были подозреваемые случаи, но не было подтвержденных случаев смерти от вируса, что указывает на то, что токсичность штамма DENV-2 № 1710 очень низкая и поэтому подходит для описанных в настоящем документе способов.

Таблица 3. Последовательность и положение праймеров для амплификации вирусов DENV-2

Праймер	Последовательность	Положение в геноме	Цепь
RSS1	5'-GGATCCCAAGAAGGGGCCAT-3' (SEQ ID NO: 3)	1696-1715	+
RSS2	5'-GGCAGCTCCATAGATTGCT-3' (SEQ ID NO: 4)	2277-2259	-
RSS3	5'-GGTGTGCTGCAGATGGAA-3' (SEQ ID NO: 5)	1524-1542	+

RSS4	5'-GTGTCACAGACAGTGAGGT-3' (SEQ ID NO: 6)	2371-2353	-
------	--	-----------	---

[0030] В настоящем документе описаны преимущественные характеристики DV для применения в качестве эффективного иммуностимулятора при различных видах противораковой иммунотерапии. DV имеет аффинность к незрелым В-лимфоцитам и антигенпрезентирующим клеткам (APC) по линии дифференцировки в моноциты/макрофаги и дендритные клетки (DC). Уникальным признаком DV является то, что первичные инфекции приводят к активации ответа T_H1 -типа с участием $CD4^+$ и $CD8^+$ хелперов и цитотоксических эффекторных CTL. Инфицируя, но не уничтожая APC, DV активирует экспрессию CD80 и CD83, что приводит к формированию профиля провоспалительных цитокинов T_H1 . Первичные инфекции DV индуцируют ответ типа T_H1 с активированными $CD4^+$ и $CD8^+$ эффекторными Т-клетками, а также клетками LAK. Этот тип ответа наблюдают у пациентов с полными ответами на противораковую иммунотерапию (см. **Таблицу 4**).

Таблица 4. Механизмы уклонения опухоли от иммунитета и инфекция DV

Уклонение от иммунитета	Контратака Денге
Низкие уровни МНС на опухолевых клетках препятствуют распознаванию CTL	Высокий уровень интерферона- γ повышает уровни МНС путем активации экспрессии гена МНС
Точечные мутации в опухолевых пептидах предотвращают связывание TCR	Клетки LAK/CIK нацелены на «сбежавшие» опухолевые клетки, экспрессирующие aberrantные пептиды или МНС
В опухолевых сосудах отсутствуют факторы для прикрепления и направленной миграции CTL	H_i [TNF- α] восстанавливает пробелы путем изменения PECAM-1, восстанавливает экспрессию ICAM-1/VCAM-1 и P и E-селектины
FasL может уничтожать Fas^+ CTL путем запуска апоптоза	H_i [IL-6, 15] защищает Fas^+ CTL путем активации продуцирования лиганда FLIP

Уклонение от иммунитета	Контратака Денге
HLA-G защищает от NK-клеток	Н _i [IL-2,7,12,15] увеличивают активацию NK
Стромальные барьеры ингибируют CTL	Н _i [IFN-γ] активирует макрофаги до M ₁
Миелоидные супрессорные клетки (MDSC)	iNKT-клетки могут уменьшать уровень MDSC
CTL, инактивированные TGF-β	Цитокины T _H 1 реактивируют толерантные CTL
Опухолевый PI-9 блокирует уничтожение CTL	Экспрессия Н _i [CD8] и ICAM-1 может восстанавливать низкоавидное распознавание и лизис CTL путем стабилизации слабых взаимодействий между TCR и MHC + аутологичным пептидом
Т-регуляторные клетки блокируют CTL	Н _i CD4 ^{Хелперные} клетки преодолевают CD4 ^{Регуляторные} клетки

[0031] При первичных инфекциях смертность от DV очень низкая (1 на 61000 случаев тропической болезни Мэнсона). Вирус заражает, но не уничтожает APC линии дифференцировки в моноциты-макрофаги и дендритные клетки. Эти инфицированные APC затем запускают цитокиновый каскад провоспалительных (TNF-альфа и IL-1 бета) факторов и типов T_H1 (IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 и IL-21). Эти цитокины приводят к сильной активации системы как адаптивной (CTL), так и врожденной (NK) иммунной системы. После 3-5-дневного инкубационного периода температура поднимается до 39,5-40,5°C и остается повышенной в течение 4-5 дней. Пациент испытывает сильную головную боль, боль в суставах, недомогание и чувствительность к свету. К 3-му дню лихорадки появляется сыпь, покрывающая грудь, а иногда и ноги, и руки. С клинической точки зрения инфекции Денге приводят в результате к снижению количества тромбоцитов, приводящему к кровотечению, которое варьирует от незначительного до угрожающего жизни в случае шокового синдрома. При надлежащем поддерживающем уходе, основанном на разумном контроле жидкостей, восстановление завершается в 99% случаев.

[0032] В настоящем документе представлены композиции и способы уменьшения количества раковых клеток у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение вируса

Денге, причем способ обеспечивает уменьшение количества раковых клеток у субъекта по меньшей мере около на 40%. В соответствии с некоторыми вариантами, в настоящем документе представлены раскрываемые способы и композиции для уменьшения количества раковых клеток у субъекта по меньшей мере около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%.

Фармацевтические композиции

[0033] В настоящем документе представлены композиции, содержащие эффективное количество вируса Денге (DV), для уменьшения количества раковых клеток у нуждающегося в этом субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество составляет около 10^5 бляшкообразующих единиц (БОЕ). В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество DV составляет от около 10000 до около 90000 БОЕ, от около 20000 до около 60000 БОЕ, от около 50000 до около 80000 БОЕ. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество DV составляет более, чем около 40000 БОЕ или составляет более, чем около 30000 БОЕ. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество DV составляет менее, чем около 90000 БОЕ, менее, чем около 30000 БОЕ или менее, чем около 20000 БОЕ. DV может представлять собой штамм, описанный в **Таблице 1**.

[0034] В настоящем документе представлены композиции, содержащие эффективное количество вируса Денге, подходящее для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина в крови субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина в образце сыворотки субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для значительного повышения уровня по меньшей мере одного цитокина. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 2% до около 20000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 50% до около 20000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для

повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 100% до около 20000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 100% до около 15000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 100% до около 14000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 50% до около 15000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 50% до около 14000%.

[0035] В настоящем документе представлены композиции, содержащие количество вируса Денге, подходящее для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, по меньшей мере один цитокин представляет собой интерлейкин (IL). В соответствии с некоторыми вариантами, по меньшей мере один цитокин представляет собой интерферон (IFN). В соответствии с некоторыми вариантами, по меньшей мере один цитокин представляет собой интерлейкин. В соответствии с некоторыми вариантами, по меньшей мере один цитокин выбран из фактора некроза опухоли (TNF)-альфа, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, индуцируемого интерфероном-гамма белка 10 (IP-10), IL-12, IL-2R, IL-7, IL-15, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень TNF-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень TNF-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 300%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень TNF-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 240%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 800%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 420%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-бета повышается на величину, составляющую от около 50% до около 20000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-бета повышается на величину, составляющую от около 50% до около 14000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-гамма повышается на величину,

составляющую от около 50% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-гамма повышается на величину, составляющую от около 50% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IP-10 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 8000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IP-10 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 5000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IP-10 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 4000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-12 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-12 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-12 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 80%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-15 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-15 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-15 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-7 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 1000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-7 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 1000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-7 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень GM-CSF повышается на величину, составляющую от около 50% до около 1000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень GM-CSF повышается на величину, составляющую от около 50% до около 400%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень GM-CSF повышается на величину, составляющую от около 50% до около 350%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-12R повышается на величину, составляющую от около 20% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-12R повышается на величину, составляющую от около 20% до около 150%.

[0036] В настоящем документе представлены композиции, содержащие эффективное количество вируса Денге (DV), причем эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии белка в опухолевой клетке. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии белка, экспрессируемого на опухолевой клетке. В соответствии с некоторыми вариантами, белком является белок контрольной точки. В соответствии с некоторыми вариантами, это делает опухолевую

клетку более хорошей целью для ингибиторов контрольных точек. В соответствии с некоторыми вариантами, белок контрольной точки является лигандом запрограммированной смерти 1 (PD-L1). В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию PD-L1 на величину, составляющую от около 10% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию PD-L1 на величину, составляющую от около 10% до около 20%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии комплекса белков, экспрессируемых на опухолевой клетке. В соответствии с некоторыми вариантами, комплексом является главный комплекс гистосовместимости (МНС). В соответствии с некоторыми вариантами, МНС является МНС класса I. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию МНС на величину, составляющую от около 10% до около 60%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию МНС на величину, составляющую от около 10% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию МНС на величину, составляющую от около 10% до около 150%.

[0037] В настоящем документе представлены композиции, содержащие эффективное количество вируса Денге (DV) для уменьшения количества раковых клеток у нуждающегося в этом субъекта, причем эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии белка на иммунците субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии белка в иммунците. В соответствии с некоторыми вариантами, иммунцит является Т-клеткой. В соответствии с некоторыми вариантами, белок является молекулой межклеточной адгезии (например, соединяет две клетки вместе). В соответствии с некоторыми вариантами, молекула межклеточной адгезии является молекулой межклеточной адгезии 1 (ICAM-1). В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию ICAM-1 на величину, составляющую от около 10% до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию ICAM-1 на величину, составляющую от около 10% до около 300%. В настоящем документе представлены композиции, содержащие эффективное количество вируса Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе композиции содержат сахар. В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе композиции содержат поверхностно-активное вещество. В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе композиции содержат белок. В соответствии с

некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе композиции содержат соль. В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе композиции содержат неионогенное поверхностно-активное вещество, невосстанавливающийся сахар, соль, белок-носитель или их комбинацию.

[0038] В настоящем документе представлены композиции, содержащие эффективное количество вируса Денге для уменьшения количества раковых клеток у нуждающегося в этом субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит неионогенное поверхностно-активное вещество. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является неионогенным детергентом. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, содержащим гидрофобную цепь. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, содержащим полиоксиэтилен. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, содержащим полиоксипропилен. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, содержащим блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, которое действует как стабилизатор клеточной мембраны. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, которое защищает от сдвиговой деформации клеточной мембраны. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, которое действует как пеногаситель. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество содержит плуроник F-68. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество фактически состоит из плуроника F-68. Дополнительные неограничивающие примеры неионогенных поверхностно-активных веществ, предусмотренных для применения в раскрываемых в настоящем документе композициях, включают алкилполиглицозид, цетомакрогол 1000, цетостеариловый спирт, цетиловый спирт, кокамид DEA, кокамид MEA, децилглюкозид, децилполиглюкозу, глицеролмоностеарат, IGEPAL CA-630, изоцетет-20, лаурилглюкозид, мальтозиды, монолаурил, микосубтилин, узкодиапазонный этоксилат, нонидет P-40, ноноксинол-9, ноноксинолы, NP-40, простой монододециловый эфир октаэтиленгликоля, N-октил-бета-d-тиоглюкопиранозид, октилглюкозид, олеиловый спирт, PEG-10-подсолнечниковые глицериды, простой монододециловый эфир пентаэтиленгликоля, полидоканоловый полуксамер, полуксамер 407, полиэтоксилированный жирный амин,

полиглицеринполирицинолеат, полисорбат, полисорбат 20, полисорбат 80, сорбитан, сорбитана монолаурат, сорбитана моностеарат, сорбитана тристеарат, стеариловый спирт, сурфактин, тритон X-100 и твин 80, а также их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,01% масса/объем до около 10% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1% масса/объем до около 5% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 1% масса/объем до около 5% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в концентрации, составляющей около 2% масса/объем.

[0039] В настоящем документе представлены композиции, содержащие количество вируса Денге, достаточное для уменьшения количества раковых клеток у нуждающегося в этом субъекта, и невосстанавливающийся сахар. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар является сахаром, способным задерживать молекулы воды. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар действует как криопротектор, защищающий жизнеспособность вируса Денге в ходе заморозки и оттаивания. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар содержит дисахарид. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар содержит альфа, альфа-1, 1-глюкозидную связь между двумя альфа-глюкозными звеньями. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар фактически состоит из дисахарида. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар содержит трегалозу. Трегалоза также известна как α -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 1)- α -D-глюкопиранозид, микоза и тремалоза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, невосстанавливающийся сахар фактически состоит из трегалозы. В соответствии с некоторыми вариантами, трегалоза представляет собой альфа-трегалозу. В соответствии с некоторыми вариантами, трегалоза представляет собой D-(+)-трегалозы дегидрат. В соответствии с некоторыми вариантами, трегалоза имеет химическую формулу $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 5% масса/объем до около 25% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 1% масса/объем до около 10% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар присутствует в композиции в

концентрации, составляющей от около 10% масса/объем до около 20% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар присутствует в композиции в концентрации, составляющей около 15% масса/объем.

[0040] В настоящем документе представлены композиции, содержащие эффективное количество вируса Денге для уменьшения количества раковых клеток у нуждающегося в этом субъекта и белок-носитель. Белок-носитель может функционировать как носитель или стабилизатор для стероидов, жирных кислот или гормонов. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель представляет собой белок, способный стабилизировать вирусную оболочку в условиях хранения (например, ниже комнатной температуры). В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель представляет собой растворимый мономерный белок. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель представляет собой альбумин. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель является белком человека, обеспечивающим, чтобы раскрываемые в настоящем документе композиции были совместимы со стандартом протокола надлежащего производства (GMP). В соответствии с некоторыми вариантами белок-носитель представляет собой альбумин человека. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1% масса/объем до около 10% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 1% масса/объем до около 5% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель присутствует в композиции в концентрации, составляющей около 2% масса/объем.

[0041] В настоящем документе представлены композиции, содержащие эффективное количество вируса Денге для уменьшения количества раковых клеток у нуждающегося в этом субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит соль. В соответствии с некоторыми вариантами, соль представляет собой соль кальция, магния, калия, натрия, бора. В соответствии с некоторыми вариантами, соль представляет собой соль фосфорной кислоты, соль соляной кислоты, соль серной кислоты или соль двухромовой кислоты. В соответствии с некоторыми вариантами, соль представляет собой кальция хлорид. В соответствии с некоторыми вариантами, соль представляет собой магния хлорид. В соответствии с некоторыми вариантами, композиции содержат кальция хлорид и магния хлорид. В соответствии с некоторыми вариантами, соль присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1 мМ до около 10 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами, соль присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1 мМ до около 5 мМ. В соответствии с некоторыми

вариантами, соль присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1 мМ до около 2 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами, соль присутствует в композиции в концентрации, составляющей около 1 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами, композиции содержат кальция хлорид и магния хлорид, причем кальция хлорид присутствует в композиции в количестве от около 0,1 мМ до около 10 мМ, а магния хлорид присутствует в композиции в количестве от около 0,1 мМ до около 10 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами, композиции содержат кальция хлорид и магния хлорид, причем кальция хлорид присутствует в композиции в количестве около 1 мМ, а магния хлорид присутствует в композиции в количестве около 1 мМ.

[0042] В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе композиции и способы позволяют модифицировать экспрессию генов в клетках субъекта. Иллюстративная модификация экспрессии генов может заключаться в повышении или понижении экспрессии. Экспрессию генов в клетках субъекта можно повысить путем инфекции DV, включая без ограничения IL-1-бета, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IFN-альфа, IFN- гамма, TNF-альфа, TNF-бета, GM-CSF, антиген CD8, ICOSLG, CCL3, CCL5, TRAIL, IP10, GNLY, GZMA, HLA-DRA, HLA-DP-альфа 1, HLA-DP-бета 1 и ZAP70. Повышенные уровни белков, соответствующих этим генам, можно наблюдать в жидкостях кровотока субъекта. Уровни могут быть повышены по меньшей мере в 2 раза. Уровни могут быть повышены в 2-1000 раз. Уровни могут быть повышены в 2-100 раз. Уровни могут быть повышены в 2-10 раз. Путем инфекции DV можно повысить типы клеток субъекта, которому вводят DV, в том числе без ограничения CD8+CD44+62L- клеток, CD4+CD44+CD62L^{lo} клеток, HLA-DR+ CD8+ клеток, Tia-1 CD8+ клеток, VLA-4 CD8+ клеток, ICAM-1 CD8+ клеток и LFA-1 CD8+ клеток. В соответствии с некоторыми вариантами, во время инфекции DV иммунной системой высвобождается TNF-α. TNFα представляет собой воспалительный цитокин с плейотропными эффектами, включая прямое уничтожение опухолевых клеток с участием TRAIL (индуцирующий апоптоз лиганд TNF).

[0043] В соответствии с некоторыми вариантами, DV индуцирует высокие уровни растворимого TRAIL (sTRAIL) из ряда клеток, включая γСТСТ, активированные макрофаги M1 и плазмцитоидные DC (pDC). В соответствии с некоторыми вариантами, DV активирует IFNβ, многофункциональный цитокин с 10-кратно более высокой аффинностью к тому же рецептору, что и IFNα. IFNβ обладает сходными противовирусными свойствами в супрессировании транскрипции вирусной РНК, но гораздо более эффективен, чем IFNα, в индукции апоптоза у опухолевых клеток. Оксид азота и IFNβ могут действовать синергетически во время инфекции Денге. Эти молекулы могут функционировать в

тандеме, преодолевая устойчивость к апоптозу, опосредованному высокими уровнями sTRAIL, индуцированному макрофагами M₁, pDC и $\delta\gamma$ CTL.

[0044] В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, которые могут необязательно содержать один штамм вируса Денге. В некоторых случаях можно использовать около 1, 2, 3, 4, 5 или более штаммов вируса Денге как часть описываемых в настоящем документе способа или композиции. В соответствии с некоторыми вариантами, фармацевтические композиции содержат по меньшей мере часть вируса Денге. Часть вируса Денге может быть частью, достаточной для вызова иммунного ответа у субъекта, получающего фармацевтическую композицию. Композиции могут дополнительно содержать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей, вспомогательных веществ или сред. К фармацевтически приемлемым солям, вспомогательным веществам или средам для применения в настоящих фармацевтических композициях относятся носители, вспомогательные вещества, разбавители, антиоксиданты, консерванты, красители, ароматизаторы и разбавляющие средства, эмульгаторы, суспендирующие средства, растворители, наполнители, объемообразующие средства, буферы, среды для доставки, тонизирующие средства, сорастворители, смачивающие средства, комплексообразующие средства, буферизирующие средства, противомикробные средства и поверхностно-активные вещества.

[0045] В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе носители содержат нейтральный солевой буферный раствор. Фармацевтические композиции могут включать антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, низкомолекулярные полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатообразующие средства, такие как EDTA, сахарные спирты, такие как маннит или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как твин, плуроники или полиэтиленгликоль (PEG). Также в качестве примера, подходящие к средствам, повышающим тоничность, относятся галогениды щелочных металлов (предпочтительно хлорид натрия или калия), маннит, сорбит и др. К подходящим консервантам относятся хлорид бензалкония, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота и др. В качестве консерванта также можно применять перекись водорода. К подходящим сорастворителям относятся глицерин, пропиленгликоль и PEG. К подходящим комплексообразующим средствам относятся кофеин, поливинилпирролидон, бета-

циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин. К подходящим поверхностно-активным веществам или смачивающим средствам относятся сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 80, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал и др. Буферы могут представлять собой традиционные буферы, такие как ацетатный, боратный, цитратный, фосфатный, бикарбонатный или на основе трис-HCl. Ацетатный буфер может иметь pH около 4-5,5, а трис-буфер может иметь pH около 7-8,5.

[0046] В настоящем документе представлены композиции, которые содержат вирус Денге, причем композиция имеет жидкую форму, лиофилизированную форму или сублимированную форму и может включать один или несколько лиопротекторов, вспомогательных веществ, поверхностно-активных веществ, высокомолекулярных структурных добавок и/или объемообразующих средств. В соответствии с некоторыми вариантами, включен лиопротектор, который представляет собой невосстанавливающийся сахар, такой как сахароза, лактоза или трегалоза. Обычно включаемое количество лиопротектора является таким, чтобы после ресуспендирования полученный состав был изотоническим, хотя также могут быть пригодны и гипертонические или слегка гипотонические составы. Кроме того, количество лиопротектора должно быть достаточным для предотвращения неприемлемой степени разрушения и/или агрегации вируса при лиофилизации. Иллюстративные концентрации лиопротекторов для сахаров (например, сахарозы, лактозы, трегалозы) в предварительно лиофилизированном составе составляют от около 10 mM до около 400 mM.

[0047] В настоящем документе представлены композиции, которые содержат раскрываемый в настоящем документе вирус Денге, причем композиции пригодны для инъекции или инфузии. Иллюстративные композиции пригодны для инъекции или инфузии животному любым путем, доступным для специалиста в настоящей области техники, таким как внутрисуставной, подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутримозговой (внутрипаренхиматозный), внутрицеребровентрикулярный, внутримышечный, внутриглазной, внутриартериальный или внутрилегочный пути. Парентеральный состав, как правило, будет представлять собой стерильный апиrogenный изотонический водный раствор, необязательно содержащий фармацевтически приемлемые консерванты.

[0048] Устройства для инъекции описанного в настоящем документе вируса Денге могут быть выполнены с возможностью подкожной инъекции. В соответствии с некоторыми вариантами, устройство не выполнено с возможностью внутрикожной инъекции. Устройство может иметь размер иглы от 30 до 19 калибра по шкале ISO. Устройство может иметь размер иглы от 27 до 19 калибра по шкале ISO. Устройство может

иметь размер иглы от 24 до 19 калибра по шкале ISO. Устройство может иметь размер иглы от 23 до 19 калибра по шкале ISO. Устройство может иметь размер иглы от 22 до 19 калибра по шкале ISO. Устройство может иметь размер иглы от 21 до 19 калибра по шкале ISO. Устройство может иметь длину иглы от 3/8 до 3/4 дюйма. Устройство может иметь длину иглы от 1/2 до 5/8 дюйма. Иглу можно вводить под углом от 45 градусов до 90 градусов для подкожной инъекции. Место инъекции может быть в дельтовидной мышце руки или в мышце бедра.

[0049] В настоящем документе раскрыты способы получения и хранения DV. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 0,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 1,0 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 1,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 2,0 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 2,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 3,0 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 3,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 4,0 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 4,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 5,0 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 5,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 6,0 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 6,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 7,0 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 7,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 8,0 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 8,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 9,0 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 9,5 мл емкости. В соответствии с некоторыми вариантами, DV хранят в 10 мл емкости. Иллюстративные емкости включают без ограничения бутылку, флакон, банку или шприц.

[0050] В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, которые содержат описываемый в настоящем документе вирус Денге и неводный растворитель. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. К водным носителям относятся вода, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевой раствор и буферные среды. К парентеральным средам относятся раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстроза и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. К внутривенным средам относятся жидкие и питательные подкрепители,

подкрепители электролитов, такие как подкрепители на основе раствора Рингера с декстрозой, и др. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразующие средства, инертные газы и др.

[0051] В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, которые содержат раскрываемый в настоящем документе вирус Денге, причем фармацевтическая композиция составлена для ингаляции, например, в виде сухого порошка. Подходящие и/или предпочтительные фармацевтические составы можно определить в свете настоящего изобретения и общих сведений о технологии приготовления составов в зависимости от предполагаемого пути введения, формата доставки и требуемой дозировки. Независимо от способа введения, эффективную дозу можно рассчитать по массе тела пациента, площади поверхности его тела или размеру его органа. Дополнительное уточнение результатов расчетов для определения подходящей дозировки для лечения, включающего каждый из описываемых в настоящем документе составов, является стандартной практикой в настоящей области техники и находится в объеме задач, стандартно выполняемых в настоящей области техники. Подходящие дозировки можно определить с использованием соответствующих данных зависимости дозы от ответа.

Способы введения

[0052] В настоящем документе представлены способы, включающие введение вируса Денге нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус представлен в водной форме. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус лиофилизирован, и его ресуспендируют в водном растворе (например, физиологическом растворе). В соответствии с некоторыми вариантами, вирус вводят путем, выбранным из подкожной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрикожной инъекции, чрескожного введения, внутривенного («i.v.») введения, интраназального введения, внутрилимфатической инъекции и перорального введения. В соответствии с некоторыми вариантами, субъекту вводят инфузией вирус с помощью внутрилимфатического микрокатетера.

[0053] В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе способы предусматривают введение вируса Денге дозой, составляющей объемом около 0,5 мл в количестве 10^6 БОЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами, доза составляет от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^8 БОЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами, доза составляет от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^6 БОЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами, доза составляет от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^4 БОЕ/мл, от

около 10^4 БОЕ/мл до около 10^6 БОЕ/мл, от около 10^6 БОЕ/мл до около 10^8 БОЕ/мл или от около 10^8 БОЕ/мл до около 10^{10} БОЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами, доза составляет от около 10^1 БОЕ/мл, 10^2 БОЕ/мл, 10^3 БОЕ/мл, 10^4 БОЕ/мл, 10^5 БОЕ/мл, 10^6 БОЕ/мл, 10^7 БОЕ/мл, 10^8 БОЕ/мл или до около 10^9 БОЕ/мл. В соответствии с некоторыми вариантами, описанная в настоящем документе доза находится в объеме около 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,2 мл или 0,3 мл. В соответствии с некоторыми вариантами, доза находится в объеме от около 0,01 мл до около 0,03 мл, от около 0,01 мл до около 0,1 мл, от 0,03 мл до около 0,05 мл, от 0,05 мл до около 0,07 мл, от 0,07 мл до около 0,09 мл, от 0,1 мл до около 0,2 мл, от 0,2 мл до около 0,4 мл, от 0,4 мл до около 0,6 мл.

[0054] В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе способы предусматривают введение вируса Денге дозой объемом около 0,5 мл в количестве 10^6 БОЕ/мл в сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, доза составляет от около 10^3 БОЕ/мл/сутки до около 10^8 БОЕ/мл/сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, доза составляет от около 10^3 БОЕ/мл/сутки до около 10^6 БОЕ/мл/сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе способы предусматривают введение вируса Денге несколькими дозами объемом около 0,5 мл в количестве 10^6 БОЕ/мл в сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^8 БОЕ/мл более одного раза в сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^6 БОЕ/мл более одного раза в сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^8 БОЕ/мл от одного до пяти раз в сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^6 БОЕ/мл от одного до пяти раз в сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^8 БОЕ/мл от одного до трех раз в сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^6 БОЕ/мл от одного до трех раз в сутки.

[0055] В настоящем документе представлены способы, включающие введение композиции, содержащей вирус Денге, нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит сахар. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит поверхностно-активное вещество. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит белок. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит соль. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит неионогенное поверхностно-активное вещество,

невосстанавливающийся сахар, соль, белок-носитель или их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит неионогенное поверхностно-активное вещество. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является неионогенным детергентом. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, содержащим гидрофобную цепь. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, содержащим полиоксиэтилен. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, содержащим полиоксипропилен. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, содержащим блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, которое действует как стабилизатор клеточной мембраны. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, которое защищает от сдвиговой деформации клеточной мембраны. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество является средством, которое действует как пеногаситель. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество содержит плуроник F-68. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество фактически состоит из плуроника F-68. Дополнительные неограничивающие примеры неионогенных поверхностно-активных веществ, предусмотренных для применения в раскрываемых в настоящем документе композициях, включают алкилполиглюкозид, цетомакрогол 1000, цетостеариловый спирт, цетиловый спирт, кокамид DEA, кокамид MEA, децилглюкозид, децилполиглюкозу, глицеролмоностеарат, IGEPAL CA-630, изоцетет-20, лаурилглюкозид, мальтозиды, монолаурил, микосубтилин, узкодиапазонный этоксилат, нонидет P-40, ноноксинол-9, ноноксинолы, NP-40, простой монододециловый эфир октаэтиленгликоля, N-октил-бета-d-тиоглюкопиранозид, октилглюкозид, олеиловый спирт, PEG-10-подсолнечниковые глицериды, простой монододециловый эфир пентаэтиленгликоля, полидоканоловый полуксамер, полуксамер 407, полиэтоксифирированный жирный амин, полиглицеринполирицинолеат, полисорбат, полисорбат 20, полисорбат 80, сорбитан, сорбитана монолаурат, сорбитана моностеарат, сорбитана тристеарат, стеариловый спирт, сурфактин, тритон X-100 и твин 80, а также их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,01% масса/объем до около 10% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами,

неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1% масса/объем до около 5% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 1% масса/объем до около 5% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в композиции в концентрации, составляющей около 2% масса/объем.

[0056] В настоящем документе представлены способы, включающие введение композиции, содержащей вирус Денге, нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит невосстанавливающийся сахар. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар является сахаром, способным задерживать молекулы воды. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар действует как криопротектор, защищающий жизнеспособность вируса Денге в ходе заморозки и оттаивания. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар содержит дисахарид. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар содержит альфа, альфа-1, 1-глюкозидную связь между двумя альфа-глюкозными звеньями. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар фактически состоит из дисахарида. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар содержит трегалозу. Трегалоза также известна как α -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 1)- α -D-глюкопиранозид, микоза и тремалоза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, невосстанавливающийся сахар фактически состоит из трегалозы. В соответствии с некоторыми вариантами, трегалоза представляет собой альфа-трегалозу. В соответствии с некоторыми вариантами, трегалоза представляет собой D-(+)-трегалозы дегидрат. В соответствии с некоторыми вариантами, трегалоза имеет химическую формулу $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 5% масса/объем до около 25% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 1% масса/объем до около 10% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 10% масса/объем до около 20% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, невосстанавливающийся сахар присутствует в композиции в концентрации, составляющей около 15% масса/объем.

[0057] В настоящем документе представлены способы, включающие введение композиции, содержащей вирус Денге, нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, композиция содержит белок-носитель. Белок-носитель может функционировать как носитель или стабилизатор для стероидов, жирных кислот или гормонов. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель представляет собой белок, способный стабилизировать вирусную оболочку в условиях хранения (например, ниже комнатной температуры). В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель представляет собой растворимый мономерный белок. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель представляет собой альбумин. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель является белком человека, обеспечивающим, чтобы раскрываемые в настоящем документе композиции были совместимы со стандартом протокола надлежащего производства (GMP). В соответствии с некоторыми вариантами белок-носитель представляет собой альбумин человека. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1% масса/объем до около 10% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 1% масса/объем до около 5% масса/объем. В соответствии с некоторыми вариантами, белок-носитель присутствует в композиции в концентрации, составляющей около 2% масса/объем.

[0058] В настоящем документе представлены способы, включающие введение композиции, содержащей вирус Денге, нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, соль представляет собой соль кальция, магния, калия, натрия, бора. В соответствии с некоторыми вариантами, соль представляет собой соль фосфорной кислоты, соль соляной кислоты, соль серной кислоты или соль двуххромовой кислоты. В соответствии с некоторыми вариантами, соль представляет собой кальция хлорид. В соответствии с некоторыми вариантами, соль представляет собой магния хлорид. В соответствии с некоторыми вариантами, композиции содержат кальция хлорид и магния хлорид. В соответствии с некоторыми вариантами, соль присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1 мМ до около 10 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами, соль присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1 мМ до около 5 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами, соль присутствует в композиции в концентрации, составляющей от около 0,1 мМ до около 2 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами, соль присутствует в композиции в концентрации, составляющей около 1 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами, композиции содержат кальция хлорид и магния хлорид, причем кальция хлорид

присутствует в композиции в количестве от около 0,1 мМ до около 10 мМ, а магния хлорид присутствует в композиции в количестве от около 0,1 мМ до около 10 мМ. В соответствии с некоторыми вариантами, композиции содержат кальция хлорид и магния хлорид, причем кальция хлорид присутствует в композиции в количестве около 1 мМ, а магния хлорид присутствует в композиции в количестве около 1 мМ.

[0059] В настоящем документе представлены способы, включающие введение эффективного количества раскрытого в настоящем документе вируса Денге нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина в крови субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина в образце сыворотки субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для значительного повышения уровня по меньшей мере одного цитокина. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 2% до около 20000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 50% до около 20000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 100% до около 20000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 100% до около 15000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 100% до около 14000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 50% до около 15000%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина на величину, составляющую от около 50% до около 14000%.

[0060] В настоящем документе представлены способы, включающие введение эффективного количества раскрытого в настоящем документе вируса Денге нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, по меньшей мере один цитокин представляет собой интерлейкин (IL). В соответствии с некоторыми вариантами, по меньшей мере один цитокин представляет собой интерферон (IFN). В соответствии с некоторыми вариантами, по меньшей мере один цитокин представляет собой интерлейкин. В соответствии с некоторыми вариантами, по меньшей мере один цитокин выбран из фактора некроза опухоли (TNF)-альфа, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, индуцируемого интерфероном-гамма белка 10 (IP-10), IL-12, IL-2R, IL-7, IL-15, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень TNF-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень TNF-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 300%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень TNF-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 240%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 800%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-альфа повышается на величину, составляющую от около 50% до около 420%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-бета повышается на величину, составляющую от около 50% до около 20000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-бета повышается на величину, составляющую от около 50% до около 14000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-гамма повышается на величину, составляющую от около 50% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IFN-гамма повышается на величину, составляющую от около 50% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IP-10 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 8000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IP-10 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 5000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IP-10 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 4000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-12 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-12 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами,

уровень IL-12 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 80%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-15 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-15 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-15 повышается на величину, составляющую от около 20% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-7 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 1000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-7 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 1000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень IL-7 повышается на величину, составляющую от около 50% до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень GM-CSF повышается на величину, составляющую от около 50% до около 1000%. В соответствии с некоторыми вариантами, уровень GM-CSF повышается на величину, составляющую от около 50% до около 400%. В соответствии с некоторыми вариантами уровень GM-CSF повышается на величину, составляющую от около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340% до около 350%. В соответствии с некоторыми вариантами уровень IL-12R повышается на величину, составляющую от около 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% до около 200%. В соответствии с некоторыми вариантами уровень IL-12R повышается на величину, составляющую от около 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% до около 200%. В настоящем документе представлены способы, предусматривающие введение эффективного количества раскрытого в настоящем документе вируса Денге нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня по меньшей мере одного цитокина у субъекта.

[0061] В настоящем документе представлены способы, предусматривающие введение эффективного количества раскрытого в настоящем документе вируса Денге нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии белка в опухолевой клетке. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии белка, экспрессируемого на опухолевой клетке. В соответствии с некоторыми вариантами, белком является белок контрольной точки. В соответствии с некоторыми вариантами, это делает

опухолевую клетку более хорошей целью для ингибиторов контрольных точек. В соответствии с некоторыми вариантами, белок контрольной точки является лигандом запрограммированной смерти 1 (PD-L1). В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию PD-L1 на величину, составляющую от около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию PD-L1 на величину, составляющую от около 10% до около 20%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии комплекса белков, экспрессируемых на опухолевой клетке. В соответствии с некоторыми вариантами, комплексом является главный комплекс гистосовместимости (МНС). В соответствии с некоторыми вариантами, МНС является МНС класса I. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию МНС на величину, составляющую от около 10%, 20%, 30%, 40%, 50% до около 60%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию МНС на величину, составляющую от около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% до около 100%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию МНС на величину, составляющую от около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% до около 150%.

[0062] В настоящем документе представлены способы, включающие введение эффективного количества раскрытого в настоящем документе вируса Денге нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии белка на клетке крови, такой как лимфоцит, у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения экспрессии белка на клетке из кровотока субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, клетка крови или клетка из кровотока представляет собой Т-клетку. В соответствии с некоторыми вариантами, белок является молекулой межклеточной адгезии (например, соединяет две клетки вместе). В соответствии с некоторыми вариантами, молекула межклеточной адгезии является молекулой межклеточной адгезии 1 (ICAM-1). В соответствии с некоторыми вариантами, ICAM-1 экспрессируется эндотелиальными клетками и клетками иммунной системы, такими как лимфоциты. Экспрессию ICAM-1 на Т-клетке можно повысить с помощью введения вируса Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию ICAM-1 в иммунocyte на величину, составляющую от около 10% до около 500%. В соответствии с некоторыми

вариантами, экспрессия ICAM-1 составляет от около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490% или до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию ICAM-1 на величину, составляющую от около 10% до около 300%. В соответствии с некоторыми вариантами, ICAM-1 экспрессируется опухолевыми клетками. Экспрессию ICAM-1 на опухолевых клетках можно повысить с помощью введения вируса Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию ICAM-1 в опухолевой клетке на величину, составляющую от около 10% до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, экспрессия ICAM-1 составляет от около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490% или до около 500%. В соответствии с некоторыми вариантами, эффективное количество повышает экспрессию ICAM-1 на величину, составляющую от около 10% до около 300%. Уровень экспрессии можно измерить с помощью *in vitro* анализа, такого как проточная цитометрия.

[0063] В настоящем документе может быть представлен способ лечения рака путем введения вируса Денге для повышения экспрессии ICAM-1 в иммунците или опухолевой клетке. Повышенная или постоянная экспрессия ICAM-1 может способствовать улучшению межклеточного взаимодействия. Межклеточное взаимодействие может привести к усилению связывания иммунцита с раковой клеткой.

Комбинированная доставка

[0064] В настоящем документе представлены композиции и способы, при которых вакцинацию дендритными клетками комбинируют с адьювантным эффектом штамма вируса Денге (DV) для преодоления механизмов уклонения от иммунной системы опухоли и уменьшения количества опухолевых клеток. Описанные в настоящем документе способы можно применять для лечения субъекта от рака путем получения дендритных клеток и опухолевых клеток от субъекта, воздействия на дендритные клетки опухолевыми клетками или лизатом опухолевых клеток, также называемым «импульсной обработкой» дендритных клеток, с получением примированных (или «активированных») дендритных клеток, доставки полученных примированных и целенаправленно воздействующих на опухоль дендритных клеток субъекту после того, как у субъекта была простимулирована его/ее

иммунная система с помощью DV (см., например, **фиг. 1**). Необязательно, для импульсной обработки дендритных клеток можно применять опухолевый антиген, полученный не от субъекта.

[0065] В настоящем документе представлены способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающие получение дендритных клеток (DC), инкубирование DC по меньшей мере с одним антигеном опухолевой клетки, введение штамма вируса Денге серотипа 2 типа субъекту и введение DC субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, штамм вируса Денге серотипа 2 типа представляет собой DENV-2 № 1710. В соответствии с некоторыми вариантами, дендритные клетки являются аутологическими дендритными клетками. В соответствии с некоторыми вариантами, дендритные клетки являются аллогенными дендритными клетками. В соответствии с некоторыми вариантами, инкубирование DC по меньшей мере одним с опухолевым антигеном предусматривает инкубирование DC с опухолевой клеткой. В соответствии с некоторыми вариантами, инкубирование DC по меньшей мере одним с опухолевым антигеном предусматривает инкубирование DC с лизатом опухолевых клеток.

[0066] Раскрываемый в настоящем документе вирус Денге и дендритные клетки вводят нуждающемуся в этом субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, способы дополнительно предусматривают введение раскрываемых в настоящем документе примированных дендритных клеток. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге изначально вводят по меньшей мере за 24 часа до введения дендритных клеток. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге изначально вводят за период, составляющий от около 12 часов до около 96 часов, до введения дендритных клеток. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге изначально вводят за период, составляющий от около 24 часов до около 72 часов, до введения примированных дендритных клеток. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге изначально вводят за период, составляющий от 1 суток до 4 суток, до введения примированных дендритных клеток. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге вводят лишь один раз. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге вводят более одного раза. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге вводят только до получения дендритных клеток. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге вводят после получения примированных дендритных клеток. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге вводят до и после получения примированных дендритных клеток.

[0067] В соответствии с некоторыми вариантами, успешное инфицирование или успешную иммунизацию субъекта вирусом Денге подтверждают по развитию гипертермии или лихорадки. В соответствии с некоторыми вариантами, успешное инфицирование или

успешную иммунизацию субъекта вирусом Денге подтверждают по наличию или повышению уровня циркулирующих цитокинов в крови/плазме субъекта. Цитокины могут включать без ограничения интерлейкин-2, интерлейкин-7, интерлейкин-12, интерлейкин-15, интерлейкин-2R, TNF-альфа, IP-10, GM-CSF, интерферон-альфа, интерферон-бета и интерферон-гамма.

[0068] В настоящем документе представлены способы, включающие введение, в соответствии с некоторыми вариантами, примированных дендритных клеток нуждающемуся в этом субъекту лишь один раз. В соответствии с некоторыми вариантами, примированные дендритные клетки вводят более одного раза. В соответствии с некоторыми вариантами, примированные дендритные клетки вводят первый раз и второй раз, причем первый раз и второй раз разделены около 1 сутками, около 2 сутками, около 3 сутками, около 4 сутками, около 5 сутками или около 6 сутками, около 8 сутками, около 10 сутками, около 12 сутками, около 18 сутками, около 20 сутками, около 25 сутками, около 30 сутками, около 35 сутками, около 40 сутками, около 45 сутками, около 50 сутками, около 60 сутками, около 100 сутками, около 1 годом, около 2 годами и любой их комбинацией. В соответствии с некоторыми вариантами, первый раз и второй раз разделены около 1 недель, около 2 неделями, около 3 неделями или около месяцем. В соответствии с некоторыми вариантами, первый раз и второй раз разделены периодом, превышающим месяц. В соответствии с некоторыми вариантами, первый раз и второй раз разделены периодом, не превышающим 12 месяцев. В соответствии с некоторыми вариантами, первый раз и второй раз разделены периодом, превышающим 12 месяцев.

[0069] В соответствии с некоторыми вариантами, примированные дендритные клетки вводят после того, как у субъекта была замечена лихорадка. В соответствии с некоторыми вариантами, примированные дендритные клетки вводят после того, как температура субъекта повысилась до диапазона, составляющего от около 37,5°C до около 42°C. В соответствии с некоторыми вариантами, примированные дендритные клетки вводят после того, как температура субъекта повысилась до диапазона, составляющего от около 38°C до около 42°C. В соответствии с некоторыми вариантами, примированные дендритные клетки вводят после того, как температура субъекта повысилась по меньшей мере до около 38,5°C. В соответствии с некоторыми вариантами, примированные дендритные клетки вводят после того, как температура субъекта повысилась до 38,5°C. В соответствии с некоторыми вариантами, примированные дендритных клеток вводят субъекту после того, как температура субъекта достигает 38 градусов по Цельсию или выше. В соответствии с некоторыми вариантами, температуру субъекта измеряют тимпанальным или пероральным способом.

Способы введения и оценка лечения меланомы

[0070] В настоящем документе представлены способы, включающие введение вируса Денге субъекту с меланомой. В соответствии с некоторыми вариантами, вирус Денге принадлежит к штамму DV-2 № 1710. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, включающие введение раскрываемых в настоящем документе примированных дендритных клеток субъекту с меланомой. Также в настоящем документе представлены способы, включающие введение вируса Денге и дендритных клеток, раскрываемых в настоящем документе, субъекту с меланомой. В соответствии с некоторыми вариантами, меланома представляет собой запущенную меланому. В соответствии с некоторыми вариантами, субъект имеет неоперабельную меланому III стадии. В соответствии с некоторыми вариантами, субъект имеет неоперабельную меланому IV стадии. В соответствии с некоторыми вариантами, субъект имеет измеряемую меланому (например, опухоль, которую можно измерить в двух размерностях). В настоящем документе дополнительно описаны типы и стадии меланомы.

[0071] В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают получение образца опухоли от субъекта с меланомой. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают приготовление опухолевого лизата из образца опухоли. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают приведение дендритных клеток в контакт с опухолевым лизатом для примирования дендритных клеток к меланомным клеткам субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, дендритные клетки являются аллогенными для субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, дендритные клетки являются аутологичными для субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают осуществление лейкофереза на крови от субъекта для получения дендритной клетки, аутологичной для субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, в которых способы предусматривают введение дендритных клеток и вируса Денге, лейкоферез можно осуществлять перед заражением субъекта вирусом Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, лейкоферез осуществляют по меньшей мере за одну неделю до заражения вирусом Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, лейкоферез осуществляют около за период, составляющий от около одной недели до около четырех недель, до заражения субъекта вирусом Денге.

[0072] В соответствии с некоторыми способами, способы предусматривают физическую нагрузку субъекта перед лейкоферезом. В соответствии с некоторыми способами, способы предусматривают физическую нагрузку субъекта за период, составляющий от около 5 часов до около 15 минут, до лейкофереза. В соответствии с

некоторыми способами, способы предусматривают физическую нагрузку субъекта за период, составляющий от около 1 часа до около 15 минут, до лейкофереза. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают физическую нагрузку субъекта за 30 минут до лейкофереза. В соответствии с некоторыми вариантами, физическая нагрузка предусматривает активность, которая повышает сердечный ритм у субъекта по меньшей мере на около 50%. В соответствии с некоторыми вариантами, физическая нагрузка предусматривает активность, которая повышает сердечный ритм у субъекта по меньшей мере на около 65%. В соответствии с некоторыми вариантами, физическая нагрузка предусматривает активность, которая повышает сердечный ритм у субъекта по меньшей мере на около 80%. В соответствии с некоторыми вариантами, физическая нагрузка предусматривает активность, которая повышает сердечный ритм у субъекта на величину, составляющую по меньшей мере от около 50% по меньшей мере до около 80%. В соответствии с некоторыми вариантами, физическая нагрузка повышает количество получаемых дендритных клеток.

[0073] В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы вируса Денге, причем доза составляет около 10^3 БОЕ вируса Денге на инъекцию. В соответствии с некоторыми вариантами, дозу повышают (например, у субъекта не развивается лихорадка Денге). В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы вируса Денге, причем доза составляет около 10^4 БОЕ вируса Денге на инъекцию. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы вируса Денге, причем доза составляет около 10^5 БОЕ вируса Денге на инъекцию. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы вируса Денге, причем доза составляет около 10^6 БОЕ вируса Денге на инъекцию. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы вируса Денге, причем доза составляет около 10^7 БОЕ вируса Денге на инъекцию. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение от около 10^3 БОЕ вируса Денге до 10^7 БОЕ вируса Денге за дозу.

[0074] В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы в объеме, составляющем около 500 микролитров. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы в объеме, составляющем от около 100 микролитров до около 1000 микролитров. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы около один раз в сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы около три раза в сутки. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы от около трех раз в сутки до около пяти раз в сутки. В соответствии с

некоторыми вариантами, способы предусматривают введение дозы от трех раз в сутки до пяти раз в сутки.

[0075] В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение вируса Денге посредством подкожной инъекции. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение вируса Денге посредством внутриопухолевой инъекции. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают введение вируса Денге посредством внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции или внутривенной инъекции.

[0076] После инъекции вирусом пациентам предписывают перорально измерять температуру 3 раза в сутки. При появлении температуры, превышающей 101°F (38,5°C) (через 5-8 дней после инъекции), пациенты получают назначение на первую инфузию DC.

[0077] Все пациенты также получают аутологичные дендритные клетки, подвергнутые импульсной обработке аутологичным опухолевым лизатом.

[0078] Примерно $3,0 \times 10^7$ DC, подвергнутые импульсной обработке опухолевым лизатом (TL-DC), нагревают до 37°C на водяной бане и вводят инфузией внутривенно в течение 30 минут в 0,9% растворе NaCl для инъекций при поступлении с лихорадочными симптомами. Через 48 часов вводят внутривенно вторую аликвоту $3,0 \times 10^7$ TL-DC в течение 30 минут одновременно с 0,9% NaCl для инъекций. Необязательно, оставшуюся аликвоту подвергнутых импульсной обработке лизатом DC (6×10^7) вводят на 3-й день после проявления лихорадочных симптомов. Внутривенный путь обеспечивает простой способ доставки большого количества DC к органам, таким как печень и белая пульпа селезенки, но для оптимальных ответов CTL необходима среда с цитокинами TH1. Таким образом, первую инфузию DC проводят при начальном проявлении лихорадочных симптомов с целью использования повышающихся уровней цитокинов TH1. Вторую дозу вводят примерно 48 часов спустя для обеспечения второй волны CTL, прежде чем цитокиновый ответ сместится к TH2, с целью предотвращения токсично-шоковой величины ответа. Необязательно, антигистамин вводят субъекту за 30 минут до инфузий TL-DC с целью снижения риска инфузионной реакции на DMSO. Альтернативно, клетки промывают на месте для удаления DMSO перед переносом в инфузионный мешок II класса.

[0079] Полное физическое обследование (включая показатели жизненно важных функций, вес), оценку статуса работоспособности (т. е. ECOG или индекс Карновского) и лабораторные исследования безопасности проводят на исходном уровне и еженедельно. Начиная с недели 4, иммунологический контроль и наблюдение будут проводить каждые 2 недели до недели 12. Начиная с недели 12-24 пациентов оценивают каждые 3 недели. После недели 24 последующее наблюдение будут проводить каждые 12 недель до

задокументированного прогрессирования заболевания у пациентов со стабильным заболеванием или ответом.

[0080] В соответствии с некоторыми вариантами, СТ- или PET-сканирования проводят с интервалами от 3 до 12 недель для определения противоопухолевой активности. СТ-сканирования включают сканирования грудной, брюшной и тазовой областей. В некоторых случаях, СТ- или PET-сканирования проводят с интервалами 8 недель для определения противоопухолевой активности. Альтернативно или дополнительно изучают характеристики биомаркеров заболевания или противоопухолевой активности. Характеристика биомаркеров заболевания или противоопухолевой активности включает измерение титров антител, нейтрализующих вирус Денге, проведение анализа опухолевых клеток в кровотоке (СТС), проведение анализа ДНК меланомы в кровотоке и иммунофенотипирование Т-клеток/секвенирование TCR, детектирование антител к ядерным компонентам и измерения уровней ревматоидного фактора. В зависимости от размера и количества опухолей проводят биопсии, в том числе пункционные биопсии. Традиционная гистология с HE позволяет детектировать опухолевые клетки, подвергающиеся клеточной гибели, и опухоли, инфильтрованные воспалительными нейтрофилами или лимфоцитами.

[0081] В настоящем документе представлены способы получения раскрываемых в настоящем документе примированных дендритных клеток (DC). Кроме того, в настоящем документе представлены способы воздействия на примированные дендритные клетки антигенами, связанных с болезненным состоянием, например, опухолевыми антигенами, в результате чего примированные дендритные клетки способны индуцировать специфические и стойкие ответы цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTL) в отношении раковых клеток. Кроме того, в настоящем документе представлены способы введения таких DC субъекту для лечения нарушения, связанного с таким болезненным состоянием. В соответствии с некоторыми вариантами, нарушением является рак. В соответствии с некоторыми вариантами, нарушение представляет собой аутоиммунное нарушение, например, ревматоидный артрит и рассеянный склероз. В соответствии с некоторыми вариантами, нарушение представляет собой инфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) или синдром приобретенного иммунодефицита. В соответствии с некоторыми вариантами, субъекту вводят вирус Денге до введения примированных DC.

Способы выделения и примирования дендритных клеток (DC)

[0082] В настоящем документе представлены способы, которые предусматривают примирование дендритных клеток, причем примирование дендритных клеток

предусматривает приведение дендритных клеток в контакт с одним или несколькими опухолевыми антигенами, которые присутствуют на целевых раковых клетках. В некоторых случаях дендритные клетки примиряют только опухолевым антигеном, причем опухолевый антиген был синтезирован, выделен или очищен. Альтернативно или дополнительно, дендритные клетки примиряют лизатом опухолевых клеток, причем лизат опухолевых клеток содержит опухолевый антиген. В некоторых случаях дендритную клетку примиряют цельной раковой клеткой, экспрессирующей опухолевый антиген. Затем дендритную клетку вводят субъекту, где она будет презентировать опухолевый антиген для CTL и, таким образом, подготавливать CTL к распознаванию и уничтожению целевых раковых клеток.

[0083] В настоящем документе представлены способы, которые ограничивают воздействие на дендритные клетки полимерами, присутствующих в материале пластиковой емкости. Например, в случае мягких пластиковых пакетов полимеры могут выщелачиваться в раствор среды и влиять на активность DC. Вместо этого, дендритные клетки можно культивировать, хранить и транспортировать в твердой емкости, такой как полистирольный планшет для культивирования тканей. Это позволяет избежать снижения иммуностимулирующей активности дендритных клеток, которое может быть вызвано воздействием полимеров, содержащихся в мягких пластиковых пакетах. Например, эти полимеры могут снижать количество IL-12, продуцируемого дендритными клетками, тем самым снижая их способность индуцировать стойкий ответ CTL. Из приведенных в настоящем документе примеры видно, что примированные дендритные клетки, полученные способами, раскрытыми в настоящем документе, способны секретировать по меньшей мере 18 пг/мл IL-12p70, тогда как дендритные клетки, полученные стандартными способами, обычно продуцируют лишь 4-6 пг/мл IL-12p70.

[0084] В соответствии с некоторыми вариантами, желательно или преимущественно примировать дендритные клетки опухолевым лизатом. В частности, раскрываемые в настоящем документе способы предусматривают использование протокола мягкого лизиса клеток, который позволяет сохранить целостность опухолевого антигена. Такой мягкий лизис можно осуществить путем воздействия на опухолевые или раковые клетки раствором гипохлорита кальция или натрия в течение не более, чем около 30-60 минут. Аналогично, любые опухолевые клетки, применяемые для примирования дендритных клеток, подвергают мягкому разделению, например, с помощью системы Miltenyi GentleMACS или тому подобного.

[0085] В настоящем документе представлены примированные дендритные клетки, полученные раскрываемыми в настоящем документе способами, причем способы

предусматривают введение примированных дендритных клеток субъекту вместе со средством, которое стимулирует иммунную систему субъекта. Комбинация примированных дендритных клеток с вирусной инфекцией обеспечивает эффективное лечение с минимальным количеством введений, возможно, всего лишь однократным, что позволяет избежать проблем, связанных с соблюдением субъектом режима терапии. Примированные дендритные клетки могут быть аутологичными, что означает, что они получены от собственных клеток субъекта, или аллогенными, полученными от другого субъекта со сходным типом ткани.

[0086] В настоящем документе представлены способы, которые предусматривают примирование DC и введение примированных DC нуждающемуся в этом субъекту, при этом DC индуцируют ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), что приводит в результате к формированию цитотоксичности в отношении целевых клеток. DC могут включать аллогенные дендритные клетки или аутологичные дендритные клетки. В соответствии с некоторыми вариантами, описанные в настоящем документе способы предусматривают введение аллогенных примированных дендритных клеток субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами, описанные в настоящем документе способы предусматривают введение аутологичных примированных дендритных клеток субъекту. Раскрываемые в настоящем документе способы, включающие введение примированных DC субъекту, в настоящем документе могут называться «вакцинацией дендритными клетками».

[0087] В соответствии с некоторыми вариантами, описанные в настоящем документе способы предусматривают получение дендритных клеток из CD34⁺ клеток-предшественников в костном мозге. В соответствии с некоторыми вариантами, описанные в настоящем документе способы предусматривают получение дендритных клеток из CD1⁺ CD14⁺ незрелых моноцитов в периферической крови. В соответствии с некоторыми вариантами, получение дендритных клеток предусматривает лейкофerez. В соответствии с некоторыми вариантами, лейкофerez предусматривает забор единицы крови у субъекта или донора, отделение ряда компонентов крови: эритроцитов, тромбоцитов и большинства факторов плазмы, которые возвращают субъекту, при этом остаются лейкоциты. В соответствии с некоторыми вариантами, описанные в настоящем документе способы предусматривают тестирование лейкоцитов на стерильность, транспортировку или хранение их в прохладных условиях (4°C) и/или переработку DC из продукта афerezа.

[0088] В настоящем документе представлены способы получения DC, причем способы предусматривают отделение моноцитов в единице крови от других лейкоцитов, включая без ограничения Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, эозинофилов и базофилов. Это

можно осуществить с помощью иммуномагнитного отбора или с помощью адгезивных свойств. Иммуномагнитный отбор предусматривает приведение в контакт лейкоцитов из единицы крови со стерильной пластиковой колонкой с пластиковыми микроносителями, покрытыми антителами к иммуноцитам, в качестве неограничивающего примера, к поверхностным белкам CD: (CD4, CD8, CD56 и т. д.). Нежелательные (отличные от моноцитов) клетки будут прилипать к микроносителям, что позволяет просеивать и собирать моноциты. При положительном отборе магнитные микроносители могут быть покрыты антителами к CD1 и/или CD14 для захвата моноцитов, магнит размещают напротив колонки, а нежелательные клетки вымывают из колонки солевым буферным раствором или средой для поддержания жизнеспособности клеток. Затем моноциты смывают с микроносителей и собирают на следующей стадии. При адгезивном отборе используют свойства моноцитов прилипать к определенным поверхностям для их отделения путем пропускания продукта афереза вниз по наклоненной колонке.

[0089] В настоящем документе представлены способы сбора клеток, которые могут предусматривать сбор лишь нескольких тысяч моноцитов из единицы крови. В случае используемых в настоящее время способов иммунотерапии обычно необходимы дозы DC в диапазоне 50 миллионов. Таким образом, раскрываемые в настоящем документе способы могут предусматривать увеличение в количестве моноцитов, а также любых их предшественники и любых клеток, дифференцированных из них (например, DC). Увеличение в количестве клеток может предусматривать приведение клеток в контакт с такими факторами, как факторы роста, колониестимулирующие факторы, цитокины или любые другие индуцирующие пролиферацию или рост факторы, а также с их комбинацией. В качестве неограничивающего примера, для осуществления увеличения в количестве DC можно применять рекомбинантные факторы роста человека: rhu -интерлейкин-4 (IL-4) и rhu -гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Кроме того, IL-4 и GM-CSF могут быть необходимы для развития зрелых DC из моноцитов, которые обладают слабой антиген-поглощающей и CTL-стимулирующей способностью по сравнению со зрелыми DC. Таким образом, IL-4 и GM-CSF могут увеличить количество и развитие маркеров зрелых DC. Маркеры DC могут включать без ограничения CD11, CD80 и CD83, а также повышенную экспрессию комплексов МНС как I класса (для презентирования коротких пептидов CD8⁺ клеткам), так и II класса (для презентирования более длинных пептидов CD4⁺ Т-хелперам). При увеличении в количестве клеток можно получить десятки миллионов зрелых DC за около 2 дня. При увеличении в количестве клеток можно получить десятки миллионов зрелых DC за около 3 дня. При увеличении в количестве клеток можно получить десятки миллионов зрелых DC за около 4 дня. При

увеличении в количестве клеток можно получить десятки миллионов зрелых DC за около 5 дней, или при увеличении в количестве клеток можно получить десятки миллионов зрелых DC за около одну неделю.

[0090] В соответствии с некоторыми вариантами, описанные в настоящем документе способы предусматривают импульсную обработку DC или приведение DC в контакт с пептидами/антигенами, опухолевыми клетками, поддерживающими опухоль клетками, лизатом опухолевых клеток и/или лизатом поддерживающих опухоль клеток. Применяемый в контексте настоящего документа термин «импульсная обработка» обычно относится к многократному приведению DC в контакт через один или несколько интервалов, и он может быть использован взаимозаменяемо с термином «приведение в контакт», если не указано иное. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают импульсную обработку DC или приведение DC в контакт с пептидом, который связывает молекулы МНС I класса («пептид МНС I класса»). В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают импульсную обработку DC или приведение DC в контакт с пептидом, который связывает молекулы МНС II класса («пептиды МНС II класса»). В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают импульсную обработку DC или приведение DC в контакт с пептидами МНС I класса и пептидами МНС II класса. В соответствии с некоторыми вариантами, импульсная обработка или приведение в контакт делают DC компетентными для примирования CTL и нацеливания CTL на опухоли. В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают импульсную обработку DC или приведение DC в контакт с произведенными/синтетическими пептидами I класса и/или II класса. В соответствии с некоторыми вариантами, производят пептиды I класса и/или II класса, затем их добавляют в среду с DC, необязательно в количествах, измеряемых на уровне микрограмм или менее. В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают применение пептидов II класса для получения устойчивого иммунного ответа. В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают секвенирование ДНК или РНК пептида (т. е. опухолевого антигена) и/или применение электропорации для вставки ДНК или РНК в DC для запуска процессирования антигена. В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы не нуждаются в сингенности DC по HLA. В соответствии с некоторыми вариантами, пептид или его часть представлена аминокислотной последовательностью, выбранной из EGSRNQDWL (SEQ ID NO: 1), (TAYRYHLL) (SEQ ID NO: 2) или их комбинации.

[0091] В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе пептиды являются пептидами I класса. Пептиды I класса можно произвести, а затем добавить в среду с DC в количествах, измеряемых на уровне микрограмм. Однако эта методика является дорогостоящей, поскольку пептиды необходимо приводить в сингенность с типом HLA субъекта, и если у опухолевой клетки не присутствует такой антиген, она может избежать детекции и лизиса. Отсутствие пептидов II класса для активации CD4⁺ способствует быстрому снижению эффективности иммунного ответа. Другие способы могут предусматривать секвенирование РНК распространенных опухолевых антигенов с последующим применением электропорации для вставки РНК в DC для запуска процессирования антигена. Этот способ не нуждается в сингенности по HLA и предусматривает применение пептидов II класса для устойчивого иммунного ответа. Однако секвенирование РНК может быть технически сложным и может представлять лишь ограниченное количество антигенов из тысяч потенциальных генных продуктов. По этим причинам аутологичные цельные опухолевые клетки или их лизат обладают преимуществами низкой стоимости, легкости получения путем биопсии (достаточно 1-2 г) и содержат полный набор потенциальных антигенов для широкого и глубокого иммунного ответа.

[0092] В настоящем документе представлены способы примирования дендритных клеток, включающие получение цельных опухолевых клеток и/или их лизатов. Опухолевые клетки можно уничтожить облучением или другими способами и приготовить из них лизат различными способами. В соответствии с некоторыми вариантами, лизирование опухолевых клеток не включает циклы расщепления трипсиновым ферментом и замораживания-оттаивания, которые являются простыми и быстрыми, но могут повредить содержащиеся в клетках чувствительные пептиды. Раскрываемые в настоящем документе способы могут предусматривать использование автоматизированного клеточного процессора, (например, системы Miltenyi GentleMACS), который позволяет вручную измельчить образец, суспендировать в PBS-растворе, а затем с помощью роторной системы под управлением предварительно подобранного тканеспецифического программного обеспечения отделить опухолевые клетки. Суспензию отдельных клеток можно подвергнуть мембранному лизису с минимальным повреждением опухолевых пептидов.

[0093] В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают приведение дендритных клеток в контакт с аутологичными опухолевыми клетками или их лизатами. В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают приведение дендритных клеток в контакт с аутологичными цельными опухолевыми клетками

(например, опухолевыми клетками и поддерживающими опухоль клетками) или их лизатами, которые содержат полный набор потенциальных антигенов для широкого и глубокого иммунного ответа. Описываемые в настоящем документе способы примирования дендритных клеток могут предусматривать приведение дендритных клеток в контакт с лизатом опухолевых клеток, содержащим апоптотические или некротические тельца. В соответствии с дополнительными вариантами, лизат опухолевых клеток содержит опухолевые антигены из микроокружения опухолевых клеток, такие как белки внеклеточного матрикса.

[0094] В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают приведение DC в контакт с усиливающим средством, которое будет усиливать примирование, пролиферацию или жизнеспособность DC. В качестве неограничивающего примера, усиливающее средство можно выбрать из лимфокинов, монокинов, цитокинов, факторов роста, клеток, клеточных фрагментов, (небелковых) малых молекул, антител, фрагментов антител, нуклеиновых кислот и их комбинаций.

[0095] В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы получения клеток и антигенов для примирования DC предусматривают превращение целевых клеток (например, раковых клеток) в неспособные к делению клетки. Например, способы могут предусматривать обработку клеток митомицином C или облучением, что делает клетки неспособными к клеточному делению. Сюда можно отнести клетки, которые добавляют в качестве усиливающих средств, или клетки, применяемые для импульсной обработки DC (например, опухолевые клетки).

[0096] В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают импульсную обработку DC длительностью от около 1 часа до около 24 часов. В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают импульсную обработку DC длительностью от около 12 часов до около 48 часов. В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают импульсную обработку DC длительностью от около 8 часов до около 24 часов. В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают импульсную обработку DC в течение около 18 часов. Импульсная обработка может предусматривать приведение DC в контакт по меньшей мере один раз с пептидами/антигенами, опухолевыми клетками, поддерживающими опухоль клетками, лизатом опухолевых клеток и/или лизатом поддерживающих опухоль клеток. Импульсная обработка может предусматривать приведение DC в контакт по меньшей мере два раза с

пептидами/антигенами, опухолевыми клетками, поддерживающими опухоль клетками, лизатом опухолевых клеток и/или лизатом поддерживающих опухоль клеток. Импульсная обработка может предусматривать приведение DC в контакт по меньшей мере три раза с пептидами/антигенами, опухолевыми клетками, поддерживающими опухоль клетками, лизатом опухолевых клеток и/или лизатом поддерживающих опухоль клеток. Импульсная обработка может предусматривать приведение DC в контакт менее чем два раза, менее чем три раза, менее чем четыре раза, менее чем пять раз или менее чем 10 раз с пептидами/антигенами, опухолевыми клетками, поддерживающими опухоль клетками, лизатом опухолевых клеток и/или лизатом поддерживающих опухоль клеток. Импульсная обработка может включать добавление пептидов/антигенов, опухолевых клеток, поддерживающих опухоль клеток, лизата опухолевых клеток и/или лизата поддерживающих опухоль клеток к DC более одного раза, так чтобы пептиды/антигены, опухолевые клетки, поддерживающие опухоль клетки, лизат опухолевых клеток и/или лизат поддерживающих опухоль клеток накапливались в среде для культивирования DC. Импульсная обработка может включать промывание клеток или удаление среды для культивирования DC между одной или несколькими импульсными обработками.

[0097] В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают приведение DC в контакт с описываемым в настоящем документе средством для созревания для усиления, завершения или окончания созревания DC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, средство для созревания также действует как «сигнал опасности». Без этого сигнала опасности опухолевый антиген может индуцировать продуцирование или активность у Treg, что в конечном итоге приведет к снижению активности CTL. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, средство для созревания/сигнал опасности представляет собой воспалительный сигнал. Воспалительный сигнал также может называться медиатором воспаления. К медиаторам воспаления можно отнести цитокины, а также другие факторы (например, хемокины, молекулы адгезии и т. д.), которые специалистами в настоящей области техники не могут быть классифицированы как цитокины, но которые прямо или опосредованно влияют на воспаление. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, медиатор воспаления выбирают из хемокина, цитокина, патогена, непептидной малой молекулы, соединения, антитела, пептида, его фрагментов, их частей и их комбинаций. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, воспалительный сигнал представляет собой модулятор рецептора распознавания структур (PRR) или его пути.

[0098] В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе воспалительные сигналы выбирают из интерферона, модулятора передачи сигналов toll-подобного рецептора и их комбинаций. В качестве неограничивающего примера, интерферон может представлять собой интерферон-гамма. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, воспалительный сигнал представляет собой модулятор сигнального пути toll-подобного рецептора.

[0099] В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе воспалительные сигналы представляют собой регуляторы сигнального пути toll-подобного рецептора (TLR). В качестве неограничивающего примера, регулятор сигнального пути toll-подобного рецептора может представлять собой липополисахарид (LPS), полисахарид из бактериальных клеточных стенок. В соответствии с некоторыми вариантами, регулятор сигнального пути toll-подобного рецептора можно выбрать из регулятора сигнального пути toll-подобного рецептора, который регулирует TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 и TLR 10. Регулятор сигнального пути toll-подобного рецептора может представлять собой лиганд, связывающий белок, антитело, агонист или антагонист TLR. Регулятор сигнального пути toll-подобного рецептора можно выбрать из пептида, белка, клеточного фрагмента, компонента клеточной стенки, липопротеина, пептидогликана, полисахарида, моносахарида и низкомолекулярного соединения. Регулятор сигнального пути toll-подобного рецептора может быть частью клетки животного, клетки растения, бактериальной клетки, дрожжевой клетки, грибковой клетки и их комбинаций. Регулятор сигнального пути toll-подобного рецептора может быть регулятором сигнального пути TLR2. В качестве неограничивающего примера, регулятор сигнального пути TLR2 может представлять собой липотейхоевую кислоту, MALP-2, MALP-4, OspA, порин, LcrV, липоманнан, якорь GPI, лизофосфатидилсерин, липофосфогликан, гликофосфатидилинозитол, зимозан, hsp60 и гемагглютинин. Регулятор сигнального пути toll-подобного рецептора может быть регулятором сигнального пути TLR4. В качестве неограничивающего примера, регулятор сигнального пути TLR4 может представлять собой бупренорфин, карбамазепин, этанол, фентанил, леворфанол, LPS, метадон, морфин, окскарбазепин, оксикодон, петидин и глюкуронооксиломаннан. Регулятор сигнального пути toll-подобного рецептора может быть регулятором сигнального пути TLR7. В качестве неограничивающего примера, регулятор сигнального пути TLR7 может представлять собой одноцепочечную РНК или соединение имидазохинолина. Регулятор сигнального пути toll-подобного рецептора может быть регулятором сигнального пути TLR8. В качестве неограничивающего примера, регулятор сигнального пути TLR8 может представлять собой одноцепочечную РНК, олигонуклеотид с высоким содержанием G или

соединение имидазохинолина. Соединение имидазохинолина может представлять собой R848. После воздействия воспалительным сигналом DC могут активировать продуцирование своих маркеров активации CD80/CD83+, увеличить продуцирование IL-12p70 для индукции ответа CTL 1-го типа и стать устойчивыми к дальнейшему поглощению и процессингу антигена.

[00100] В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы предусматривают приведение DC в контакт с описываемым в настоящем документе средством для созревания для усиления, завершения или окончания созревания DC. В соответствии с некоторыми вариантами, средство для завершения созревания DC содержит LPS бактериальной клеточной стенки. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания содержат IFN-гамма. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания содержат R848. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания содержат CD40L. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания включают комбинацию по меньшей мере любых двух средств, выбранных из LPS бактериальной клеточной стенки, IFN-гамма, R848 и CD40L. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания включают комбинацию по меньшей мере любых трех средств, выбранных из LPS бактериальной клеточной стенки, IFN-гамма, R848 и CD40L. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания включают LPS бактериальной клеточной стенки, IFN-гамма, R848, CD40L или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания вводят одновременно. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания вводят последовательно. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания вводят последовательно, начиная с того, что сначала вводят LPS. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания вводят последовательно, начиная с того, что сначала вводят IFN-гамма. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания вводят последовательно, начиная с того, что сначала вводят R848. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания вводят последовательно, начиная с того, что одновременно сначала вводят LPS и IFN-гамма. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания вводят последовательно, при этом сначала одновременно вводят LPS и IFN-гамма с последующим введением R848, CD40L или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания вводят последовательно, при этом сначала одновременно вводят LPS и IFN-гамма с последующим введением R848. В соответствии с некоторыми вариантами, средства для созревания вводят последовательно, при этом сначала одновременно вводят LPS

бактериальной клеточной стенки и IFN-гамма с последующим введением R848, а затем CD40L.

[00101] В настоящем документе представлены способы получения описываемых в настоящем документе примированных дендритных клеток, причем способы предусматривают приведение примированных дендритных клеток в контакт с интерфероном-гамма. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией интерферона-гамма, выбранной из следующих диапазонов: от около 100 ед./мл до около 10000 ед./мл, от около 500 ед./мл до около 5000 ед./мл и от около 500 ед./мл до около 2000 ед./мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией интерферона-гамма, составляющей около 500 ед./мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией интерферона-гамма, составляющей около 1000 ед./мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией интерферона-гамма, составляющей около 2000 ед./мл.

[00102] В соответствии с некоторыми вариантами, способы получения описываемых в настоящем документе примированных дендритных клеток могут предусматривать приведение примированных дендритных клеток в контакт с таким агонистом TLR8, как R848. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией R848, выбранной из следующих диапазонов: от около 0,1 мкг/мл до около 50 мкг/мл, от около 1 мкг/мл до около 20 мкг/мл и от около 1 мкг/мл до около 10 мкг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией R848, составляющей около 1 мкг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией R848, составляющей около 5 мкг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией R848, составляющей около 10 мкг/мл.

[00103] В соответствии с некоторыми вариантами, способы получения описываемых в настоящем документе примированных дендритных клеток могут

предусматривать приведение примированных дендритных клеток в контакт с липополисахаридом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией липополисахарида, выбранной из следующих диапазонов: от около 1 нг/мл до около 100 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 50 нг/мл и от около 1 нг/мл до около 25 нг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией липополисахарида, составляющей около 5 нг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией липополисахарида, составляющей около 10 нг/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают культивирование примированных дендритных клеток в культуральной среде с концентрацией липополисахарида, составляющей около 15 нг/мл.

[00104] В настоящем документе представлены способы, которые предусматривают тестирование на стерильность, специфичность и жизнеспособность примированных DC, полученных в соответствии с раскрываемыми в настоящем документе способами. Тестирование можно проводить перед транспортировкой или хранением DC. Тестирование можно проводить после транспортировки или хранения DC. Способы могут предусматривать измерение уровня экспрессии IL-12p70 у DC либо на уровне РНК, либо на уровне белка. IL-12p70 является независимым прогностическим фактором клинического ответа, который тестировали во многих исследованиях, проведенных за последние два десятилетия, причем в некоторых из них степень ответа составляла примерно 40%. Уровень экспрессии IL-12p70 у примированных DC, полученных в соответствии с раскрываемыми в настоящем документе способами, может быть по меньшей мере около в два раза выше, чем у примированных DC, полученных/хранимых/транспортируемых традиционными способами. Уровень экспрессии IL-12p70 у примированных DC, полученных в соответствии с раскрываемыми в настоящем документе способами, может быть по меньшей мере около в два раза выше, чем у примированных DC, полученных/хранимых/транспортируемых традиционными способами («традиционных примированных DC»). Уровень экспрессии IL-12p70 у примированных DC может быть по меньшей мере около на 10%, по меньшей мере около на 20%, по меньшей мере около на 30%, по меньшей мере около на 40%, по меньшей мере около на 50%, по меньшей мере около на 60%, по меньшей мере около на 70%, по меньшей мере около на 80%, по меньшей мере около на 90% или по меньшей мере около на 100% выше, чем у традиционных

примированных DC. Уровень экспрессии IL-12p70 у примированных DC может быть по меньшей мере около в три раза выше, чем у традиционных примированных DC. Уровень экспрессии IL-12p70 у примированных DC может быть по меньшей мере около в четыре раза выше, чем у традиционных примированных DC. Уровень экспрессии IL-12p70 у примированных DC, полученных в соответствии с описываемыми в настоящем документе способами, может быть от около в два раза до около в двадцать раз выше, чем у традиционных примированных DC.

[00105] В настоящем документе представлены способы получения дендритных клеток, которые продуцируют более 166 нг/мл IL-12p70. Также в настоящем документе представлены дендритные клетки, которые продуцируют более 2010 нг/мл IL-12p70. DC по настоящей заявке могут продуцировать по меньшей мере около 1510 нг/мл, по меньшей мере около 12 нг/мл, по меньшей мере около 1914 нг/мл, по меньшей мере около 16 нг/мл, по меньшей мере около 18 нг/мл, по меньшей мере около 20 нг/мл, по меньшей мере около 22 нг/мл, по меньшей мере около 24 нг/мл, по меньшей мере около 26 нг/мл, по меньшей мере около 28 нг/мл, по меньшей мере около 29 нг/мл или по меньшей мере около 30 нг/мл. DC по настоящей заявке могут продуцировать от около 20 нг до около 30 нг/мл. DC по настоящей заявке могут продуцировать от около 20 нг до около 29 нг/мл. DC по настоящей заявке могут продуцировать от около 15 нг/мл до по меньшей мере около 29 нг/мл.

Ответ CTL

[00106] В настоящем документе представлены способы получения описываемых в настоящем документе DC, включающие тестирование способности DC индуцировать ответ CTL. Измерение уровня ответа CTL может предусматривать измерение цитокинов или медиаторов воспаления в крови, сыворотке или плазме, полученных от субъекта. Измерение уровня ответа CTL может предусматривать измерение изменения уровня цитокина или медиатора воспаления в крови, сыворотке или плазме, полученных от субъекта. Измерение уровня ответа CTL может предусматривать измерение продуцирования цитокина или медиатора воспаления *in vitro*. К цитокинам и медиаторам воспаления можно отнести интерлейкины, ингибирующие миграцию белки, моноцитарные хемотаксические белки, моноцитарные хемоаттрактивные белки, интерфероны, факторы некроза опухоли, колониестимулирующие факторы (CSF), макрофагальные белки воспаления, монокины, хемокины, хемокиновые лиганды (CCL) и содержащие мотив C-X-C хемокины (CXCL) и их рецепторы. К цитокинам и медиаторам воспаления относятся без ограничения интерлейкин 1 бета (IL-1b), интерлейкин 2 (IL-2), интерлейкин 4 (IL-4),

интерлейкин 5 (IL-5), интерлейкин 7 (IL-7), интерлейкин 8 (IL-8), интерлейкин 10 (IL-10), интерлейкин 13 (IL-13), интерлейкин 6 (IL-6), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), интерлейкин 17 (IL-17), RANTES, эотаксин, макрофагальный белок воспаления 1 альфа (MIP-1a), макрофагальный белок воспаления 1 бета (MIP-1b), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), моноцитарный хемоаттрактивный белок-1 (MCP-1), интерферон альфа (IFN α), интерферон гамма (IFN γ), рецептор интерлейкина 1 альфа (IL-1Ra), рецептор интерлейкина 2 (IL-2R), фактор некроза опухоли альфа (TNF α), индуцируемый интерфероном гамма белок (IP-10) и монокин, индуцируемый гамма-интерфероном (MIG). Ответ CTL можно измерить по экспрессии генов ответов опухоли (MxA и т. д.), что делает возможным высокую степень цитолиза раковых клеток (превращая «холодные» опухоли в «горячие») и стимуляцию дальнейшего уменьшения опухолевой массы у не дававших ответ пациентов или у пациентов с низким уровнем ответа.

Твердая поверхность

[00107] В настоящем документе представлены способы получения описываемых в настоящем документе DC, включающие культивирование DC на твердой поверхности. Применяемый в настоящем документе «твердая поверхность», как правило, относится к стандартному пластиковому планшету или колбе для культивирования тканей (например, к планшету из полистирола). Раскрываемые в настоящем документе способы предусматривают культивирование DC на твердой поверхности, к которой могут прирастать DC. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, твердая поверхность покрыта белком, пептидом, молекулой внеклеточного матрикса, полимером или их комбинацией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, твердая поверхность не имеет покрытия (например, DC прирастают непосредственно на твердую пластиковую поверхность). Твердую поверхность противопоставляют пакету для культивирования мягких тканей, также известному как пакеты для дифференцировки клеток. Пакеты для культивирования мягких тканей могут представлять собой пакеты, содержащие полимеры или химические вещества (например, фталаты), которые уменьшают способность DC к ответу 1-го типа. Пакеты для культивирования мягких тканей могут представлять собой пакеты, содержащие полимеры или химические вещества, которые вызывают нейтральный ответ 0-го типа у DC, что делает DC функционально инертными. Пакеты для культивирования мягких тканей могут представлять собой пакеты, содержащие полимер, выбранный из полиэтилена, фторированного этиленпропилена

(FEP), гексафторпропилена, тетрафторэтилена, политетрафторэтилена и их сополимеров и их комбинаций.

[00108] В настоящем документе представлены способы получения описываемых в настоящем документе DC, включающие перенос DC в контейнер для хранения. Контейнер для хранения также может представлять собой контейнер для транспортировки. Контейнер для хранения может быть выбран из гибкой или мягкой емкости или поверхности (например, пакета) или твердой емкости или поверхности (например, колбы или планшета). Контейнер для хранения может включать твердую пластиковую поверхность. Контейнер для хранения может фактически состоять из твердой пластиковой поверхности. Контейнер для хранения может состоять из твердой пластиковой поверхности. Контейнер для хранения может включать поверхность, отличную от пластиковой (например, стеклянную). Контейнер для хранения может фактически состоять из отличной от пластиковой поверхности. Контейнер для хранения может состоять из отличной от пластиковой поверхности. Контейнер для хранения может не содержать никаких полимеров, которые поглощались бы клетками, хранящимися в контейнере для хранения, и/или индуцировали ответ у них. Контейнер для хранения может не содержать или фактически не содержать полимеры, которые индуцируют у незрелых DC нейтральный ответ или ответ 0-го типа. Нейтральный ответ может характеризоваться низкой экспрессией IL-12p70. Контейнер для хранения может фактически не содержать никаких полимеров, которые поглощались бы клетками, хранящимися в контейнере для хранения, и/или индуцировали ответ у них. Фактически не содержать может означать, что контейнер для хранения по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% не содержит никаких полимеров, которые поглощались бы клетками, хранящимися в контейнере для хранения, и/или индуцировали ответ у них. Фактически не содержать может означать, что контейнер для хранения по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8% или по меньшей мере на 99,9% не содержит никаких полимеров, которые поглощались бы клетками, хранящимися в контейнере для хранения, и/или индуцировали ответ у них.

[00109] В соответствии с некоторыми вариантами, контейнеры для хранения включают внутреннюю поверхность, причем внутренняя поверхность представляет собой поверхность контейнера для хранения, которая контактирует с хранящимися в нем клетками. Внутренняя поверхность может состоять из твердой пластиковой поверхности. Внутренняя поверхность может быть стеклянной. Внутренняя поверхность может быть лишена каких-либо полимеров, которые поглощались бы клетками, хранящимися в контейнере для хранения, и/или индуцировали ответ у них. Внутренняя поверхность может

быть выполнена из полимеров, которые не поглощаются незрелыми DC или какими-либо клетками, хранящимися в контейнере для хранения. Внутренняя поверхность может не содержать никаких полимеров, которые поглощались бы клетками, хранящимися в контейнере для хранения, и/или индуцировали ответ у них. Внутренняя поверхность может фактически не содержать никаких полимеров, которые поглощались бы клетками, хранящимися в контейнере для хранения, и/или индуцировали ответ у них. Внутренняя поверхность может по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% не содержать никаких полимеров, которые поглощались бы клетками, хранящимися в контейнере для хранения, и/или индуцировали ответ у них после внесения клеток и среды для хранения. Внутренняя поверхность может по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8% или по меньшей мере на 99,9% не содержать никаких полимеров, которые поглощались бы клетками, хранящимися в контейнере для хранения, и/или индуцировали ответ у них после внесения клеток и среды для хранения. Внутренняя поверхность может не содержать или фактически не содержать полимеры, которые индуцируют у незрелых DC нейтральный ответ или ответ 0-го типа. Нейтральный ответ может характеризоваться низкой экспрессией IL-12p70.

[00110] В настоящем документе представлены способы хранения DC, полученных с помощью описанных в настоящем документе способов, причем контейнеры для хранения подходят для замораживания при -70°C в жидком N_2 , хранении до 1 года и транспортировки в клинику для применения. Способы могут предусматривать хранение и/или доставку зрелых DC, незрелых DC, моноцитов или крови в контейнере для хранения. Способы могут предусматривать доставку клеток, охлажденных в течение ночи. Способы могут предусматривать оттаивание или нагревание клеток до 37°C (например, в теплой водяной бане).

Способы выделения и лизирования опухолевых клеток

[00111] В настоящем документе представлены способы лечения субъекта, включающие введение DC, полученных с помощью раскрываемых в настоящем документе способов, для целенаправленного воздействия на опухолевые клетки. В соответствии с некоторыми вариантами, DC примиряют опухолевыми клетками, полученными от субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами, опухолевые клетки представляют собой выделенные клетки, полученные из опухолевого микроокружения субъекта, которое называют в настоящем документе поддерживающими опухоль клетками. В соответствии с некоторыми вариантами, дендритные клетки подвергают воздействию / импульсной

обработке опухолевыми клетками, поддерживающими опухоль клетками и/или их пептидами, с тем чтобы дендритные клетки в будущем целенаправленно воздействовали на рост и метастазирование опухолевых клеток и/или поддерживающих опухоль клеток (например, эндотелиальных клеток, клеток сосудов, иммунцитов и т. д.). В соответствии с некоторыми вариантами, пептиды/антигены из опухолевых клеток и поддерживающих опухоль клеток индуцируют дендритные клетки или цитотоксические лимфоциты с рецепторами к пептидам/антигенам как на опухолевых клетках, так и на поддерживающих опухоль клетках, что приводит в результате к нацеливанию дендритных клеток или цитотоксических лимфоцитов на опухолевое микроокружение, а не только на опухолевые клетки. В соответствии с некоторыми вариантами, опухолевые клетки и/или поддерживающие опухоль клетки получают из биоптата опухолевой ткани. В соответствии с некоторыми вариантами, биоптат содержит клетки, выбранные из опухолевых клеток, адипоцитов, фибробластов, эндотелиальных клеток, инфильтрирующих иммунцитов и их комбинаций. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, способы предусматривают увеличение в количестве опухолевых клеток с целью получения достаточного количества опухолевых клеток, лизатов опухолевых клеток или антигенов опухолевых клеток для эффективного примирования/импульсной обработки DC. Размножение может предусматривать пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*.

[00112] В настоящем документе представлены способы активации раскрываемых в настоящем документе DC для целенаправленного воздействия на опухолевые клетки, причем DC активируют лизированными опухолевыми клетками и/или поддерживающими опухоль клетками и окружающим внеклеточным матриксом. В соответствии с некоторыми вариантами, лизирование предусматривает приведение в контакт опухолевых клеток и/или поддерживающих опухоль клеток с NH_4Cl -раствором ферментов для устранения эритроцитов. В соответствии с некоторыми вариантами, лизирование предусматривает приведение в контакт опухолевых клеток и/или поддерживающих опухоль клеток с раствором хлорноватистой кислоты для индукции гибели иммуногенных клеток. В соответствии с некоторыми вариантами, клетки лизируют достаточно мягко, чтобы не разрушить пептиды. В соответствии с некоторыми вариантами, клетки лизируют для получения апоптотических или некротических телец. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают лизирование опухолевых клеток и/или поддерживающих опухоль клеток с помощью ферментативного раствора. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают лизирование опухолевых клеток и/или поддерживающих опухоль клеток с помощью не содержащего пероксид раствора или с помощью раствора с низким содержанием пероксида.

[00113] В настоящем документе представлены способы активации раскрываемых в настоящем документе DC, включающие лизирование опухолевых клеток раствором гипохлорита (HOCL). В соответствии с некоторыми вариантами, раствор гипохлорита содержит хлорит натрия. В соответствии с некоторыми вариантами, раствор гипохлорита содержит хлорит кальция. В соответствии с некоторыми вариантами, концентрация гипохлорита в среде, в которой суспендированы опухолевые клетки, составляет около 10 мкМ, около 20 мкМ, около 30 мкМ, около 40 мкМ, около 50 мкМ, около 60 мкМ, около 70 мкМ, около 80 мкМ, около 90 мкМ или около 100 мкМ.

[00114] В настоящем документе представлены способы активации DC, полученных согласно описываемым в настоящем документе способам, причем такие способы предусматривают лизирование опухолевых клеток и/или поддерживающих опухоль клеток с помощью раствора детергента перед приведением в контакт с DC. В соответствии с некоторыми вариантами, детергент выбран без ограничения из тритона X-100, тритона X-114, NP-40, Brij-35, Brij-58, твина 20, твина 80, октилглюкозида, октилтиоглюкозида, SDS, CHAPS и CHAPSO. В соответствии с некоторыми вариантами, раствор детергента очищен от пероксидов и других примесей. В соответствии с некоторыми вариантами, детергент составляет около от 0,1 об. % до около 10 об. % раствора детергента. В соответствии с некоторыми вариантами, детергент составляет около от 0,1 об. % до около 5 об. % раствора детергента. В соответствии с некоторыми вариантами, детергент составляет около от 0,5 об. % до около 5 об. % раствора детергента. В соответствии с некоторыми вариантами, детергент составляет около от 1 об. % до около 10 об. % раствора детергента. В соответствии с некоторыми вариантами, детергент составляет около от 1 об. % до около 5 об. % раствора детергента. В соответствии с некоторыми вариантами, способы предусматривают лизирование клеток без встряхивания, перемешивания вихревым способом, замораживания, оттаивания, сдвигового давления, обработки ультразвуком и/или нагревания клеток.

[00115] В соответствии с некоторыми вариантами, описываемые в настоящем документе способы лизиса клеток дополнительно предусматривают остановку или нейтрализацию лизиса. Например, для нейтрализации лизиса клетки можно промыть солевым буферным раствором (фосфатно-солевым буферным раствором или сбалансированным солевым раствором Хэнка).

Наборы

[00116] В настоящем документе могут быть раскрыты наборы, содержащие композиции. В настоящем документе также могут быть раскрыты наборы для лечения или

предупреждения развития рака, патогенной инфекции или иммунного нарушения. В некоторых случаях набор может включать терапевтическую или профилактическую композицию, содержащую эффективное количество композиции с вирусом Денге в стандартной лекарственной форме. В некоторых случаях набор содержит стерильную емкость, которая может содержать терапевтическую композицию с вирусом Денге; такими емкостями могут быть коробки, ампулы, бутылки, флаконы, пробирки, колбы, пакеты, мешки, блистерные упаковки или другие подходящие формы емкостей, известные в настоящей области техники. Такие емкости могут быть выполнены из пластика, стекла, ламинированной бумаги, металлической фольги или других материалов, подходящих для хранения медикаментов. В некоторых случаях набор может включать клетки, такие как дендритные клетки, в количестве от около 1×10^4 клеток до около 1×10^{12} клеток. В некоторых случаях набор может включать по меньшей мере около 1×10^5 клеток, по меньшей мере около 1×10^6 клеток, по меньшей мере около 1×10^7 клеток, по меньшей мере около 4×10^7 клеток, по меньшей мере около 5×10^7 клеток, по меньшей мере около 6×10^7 клеток, по меньшей мере около 6×10^7 клеток, по меньшей мере около 8×10^7 клеток, по меньшей мере около 9×10^7 клеток, по меньшей мере около 1×10^8 клеток, по меньшей мере около 2×10^8 клеток, по меньшей мере около 3×10^8 клеток, по меньшей мере около 4×10^8 клеток, по меньшей мере около 5×10^8 клеток, по меньшей мере около 6×10^8 клеток, по меньшей мере около 6×10^8 клеток, по меньшей мере около 8×10^8 клеток, по меньшей мере около 9×10^8 клеток, по меньшей мере около 1×10^9 клеток, по меньшей мере около 2×10^9 клеток, по меньшей мере около 3×10^9 клеток, по меньшей мере около 4×10^9 клеток, по меньшей мере около 5×10^9 клеток, по меньшей мере около 6×10^9 клеток, по меньшей мере около 6×10^9 клеток, по меньшей мере около 8×10^9 клеток, по меньшей мере около 9×10^9 клеток, по меньшей мере около 1×10^{10} клеток, по меньшей мере около 2×10^{10} клеток, по меньшей мере около 3×10^{10} клеток, по меньшей мере около 4×10^{10} клеток, по меньшей мере около 5×10^{10} клеток, по меньшей мере около 6×10^{10} клеток, по меньшей мере около 6×10^{10} клеток, по меньшей мере около 8×10^{10} клеток, по меньшей мере около 9×10^{10} клеток, по меньшей мере около 1×10^{11} клеток, по меньшей мере около 2×10^{11} клеток, по меньшей мере около 3×10^{11} клеток, по меньшей мере около 4×10^{11} клеток, по меньшей мере около 5×10^{11} клеток, по меньшей мере около 6×10^{11} клеток, по меньшей мере около 6×10^{11} клеток, по меньшей мере около 8×10^{11} клеток, по меньшей мере около 9×10^{11} клеток или по меньшей мере около 1×10^{12} клеток. Например, в набор может быть включено около 5×10^{10} клеток. В другом примере набор может включать 3×10^6 клеток; клетки можно размножить до около 5×10^{10} клеток и ввести субъекту. Такие наборы могут дополнительно включать инструкции по их применению.

Фармацевтические композиции

[00117] В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество раскрываемого в настоящем документе вируса Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, фармацевтические композиции содержат более одного штамма вируса Денге. В соответствии с некоторыми вариантами, фармацевтические композиции содержат по меньшей мере часть вируса Денге. Часть вируса Денге может быть частью, достаточной для вызова иммунного ответа у субъекта, получающего фармацевтическую композицию. Композиции могут дополнительно содержать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей, вспомогательных веществ или сред. К фармацевтически приемлемым солям, вспомогательным веществам или средам для применения в настоящих фармацевтических композициях относятся носители, вспомогательные вещества, разбавители, антиоксиданты, консерванты, красители, ароматизаторы и разбавляющие средства, эмульгаторы, суспендирующие средства, растворители, наполнители, объемообразующие средства, буферы, среды для доставки, тонирующие средства, сорастворители, смачивающие средства, комплексообразующие средства, буферизирующие средства, противомикробные средства и поверхностно-активные вещества.

[00118] В соответствии с некоторыми вариантами, раскрываемые в настоящем документе носители содержат нейтральный солевой буферный раствор. Фармацевтические композиции могут включать антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, низкомолекулярные полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатообразующие средства, такие как EDTA, сахарные спирты, такие как маннит или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как твин, плуроники или полиэтиленгликоль (PEG). Также в качестве примера, подходящие к средствам, повышающим тоничность, относятся галогениды щелочных металлов (предпочтительно хлорид натрия или калия), маннит, сорбит и др. К подходящим консервантам относятся хлорид бензалкония, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота и др. В качестве консерванта также можно применять перекись водорода. К подходящим сорастворителям относятся глицерин, пропиленгликоль и PEG. К подходящим комплексообразующим средствам относятся кофеин, поливинилпирролидон, бета-

циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин. К подходящим поверхностно-активным веществам или смачивающим средствам относятся сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 80, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал и др. Буферы могут представлять собой традиционные буферы, такие как ацетатный, боратный, цитратный, фосфатный, бикарбонатный или на основе трис-HCl. Ацетатный буфер может иметь pH около 4-5,5, а трис-буфер может иметь pH около 7-8,5.

[00119] В настоящем документе представлены композиции, которые содержат вирус Денге, причем композиция имеет жидкую форму, лиофилизированную форму или сублимированную форму и может включать один или несколько лиопротекторов, вспомогательных веществ, поверхностно-активных веществ, высокомолекулярных структурных добавок и/или объемообразующих средств. В соответствии с некоторыми вариантами, включен лиопротектор, который представляет собой невосстанавливающийся сахар, такой как сахароза, лактоза или трегалоза. Обычно включаемое количество лиопротектора является таким, чтобы после ресуспендирования полученный состав был изотоническим, хотя также могут быть пригодны и гипертонические или слегка гипотонические составы. Кроме того, количество лиопротектора должно быть достаточным для предотвращения неприемлемой степени разрушения и/или агрегации вируса при лиофилизации. Иллюстративные концентрации лиопротекторов для сахаров (например, сахарозы, лактозы, трегалозы) в предварительно лиофилизированном составе составляют от около 10 mM до около 400 mM.

[00120] В настоящем документе представлены композиции, которые содержат раскрываемый в настоящем документе вирус Денге, причем композиции пригодны для инъекции или инфузии. Иллюстративные композиции пригодны для инъекции или инфузии животному любым путем, доступным для специалиста в настоящей области техники, таким как внутрисуставной, подкожный, внутриопухолевый, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутримозговой (внутрипаренхиматозный), внутрицеребровентрикулярный, внутримышечный, внутриглазной, внутриартериальный или внутрилегочный пути. Парентеральный состав, как правило, будет представлять собой стерильный апиrogenный изотонический водный раствор, необязательно содержащий фармацевтически приемлемые консерванты.

[00121] В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, которые содержат описываемый в настоящем документе вирус Денге и неводный растворитель. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. К водным носителям относятся вода,

спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевой раствор и забуференные среды. К парентеральным средам относятся раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстроза и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. К внутривенным средам относятся жидкие и питательные подкрепители, подкрепители электролитов, такие как подкрепители на основе раствора Рингера с декстрозой, и др. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразующие средства, инертные газы и др.

[00122] В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, которые содержат раскрываемый в настоящем документе вирус Денге, причем фармацевтическая композиция составлена для ингаляции, например, в виде сухого порошка. Подходящие и/или предпочтительные фармацевтические составы можно определить в свете настоящего изобретения и общих сведений о технологии приготовления составов в зависимости от предполагаемого пути введения, формата доставки и требуемой дозировки. Независимо от способа введения, эффективную дозу можно рассчитать по массе тела пациента, площади поверхности его тела или размеру его органа. Дополнительное уточнение результатов расчетов для определения подходящей дозировки для лечения, включающего каждый из описываемых в настоящем документе составов, является стандартной практикой в настоящей области техники и находится в объеме задач, стандартно выполняемых в настоящей области техники. Подходящие дозировки можно определить с использованием соответствующих данных зависимости дозы от ответа.

Примеры

Пример 1. Получение и импульсная обработка мышинных дендритных клеток (DC)

[00123] Для получения зрелых DC из костного мозга мыши использовали способ, описанный у Lutz M., et. al. (J.Immunol.Methods 223:77-92, 1999). Суспензии костного мозга инкубировали в течение 10 дней в чашках Петри в среде с добавлением рекомбинантного мышинного GM-CSF. Собирали неприкрепившиеся клетки, их центрифугировали и ресуспендировали в среде, содержащей GM-CSF и липополисахарид. Два дня спустя собирали DC и их жизнеспособность определяли по вытеснению трипанового синего. Степень чистоты DC определяли с помощью анализа проточной цитометрией. DC подвергали импульсной обработке в течение 18 часов синтетическими пептидами в количестве 10 мкг/мл. Спустя 18 часов инкубации DC собирали, дважды

промывали в HBSS и ресуспендировали в HESS для дополнительного анализа (см. Примеры 2 и 3).

Пример 2. Вирус Денге и дендритные клетки для лечения меланомы на первой мышинной модели

[00124] Проводили анализ на мышинной модели для наблюдения за результатами комбинированного целенаправленного воздействия на раковые клетки с использованием штамма вируса Денге (DV) и дендритных клеток (DC), примированных опухолевым антигеном. Мышам C57BL/6 DV инокулировали 0,05 мл вируса Денге (DEN-2, штамм № 1710) в количестве 1×10^6 или 1×10^7 БОЕ/мл путем инъекции в основание хвоста. Рекомбинантный мышинный IL-2 (Genzyme) и IFN-гамма (Sigma Pharmaceuticals) вводили путем внутривенной инфузии в количестве 2000 (rIL-2) и 500 мкл (rIFN-гамма) в дни 5, 10, 15 и 20 после введения вируса Денге (DEN-2, штамм № 1710, запись в базе данных CDC № 555, предоставленный доктором Duane Gubler). Через семь дней после введения вируса Денге мышей C57BL/6 иммунизировали мышинными DC, которые были инкубированы с 2 пептидами по отдельности и введены внутривенной инъекцией. Пептиды были синтезированными. В качестве контроля применяли рестриктированный по H-2b пептид из овальбумина (OVA-8), SIINFEKL (SEQ ID NO: 7). Для импульсной обработки мышинных DC применяли ассоциированные с меланомой B16, рестриктированные по H-2b пептиды, полученные из антигенов gp100/pmel17 (EGSRNQDWL (SEQ ID NO: 1)) и из TRP-1/75 (TAYRYHLL (SEQ ID NO: 2)) (подробности см. в Примере 1). Проводили две дополнительные иммунизации посредством DC с 14-дневными интервалами. Через три дня после последней инфузии DC мышей заражали 5×10^4 жизнеспособными клетками меланомы B16 внутривенно в боковую хвостовую вену, а затем отслеживали их выживание, которое регистрировали как процент выживших животных с течением времени (в днях) после инъекции опухолевых клеток. Данные регистрировали от пяти или более мышей/группа (см. **Таблицу 5** и **фиг. 2**).

Таблица 5.

Условие	Группа	ИН мышь	Количество метастаз легких	Среднее
DV 10^6 БОЕ/мл + 2×10^6 DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	2	II-2-1	55	

DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	2	II-2-2	68	
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	2	II-2-3	57	
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	2	II-2-4	62	
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	2	II-2-5	52	58,8
Без DV + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	1	II-1-1	58	
Без DV + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	1	II-1-2	62	
Без DV + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	1	II-1-3	66	
Без DV + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	1	II-1-4	72	
Без DV + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	1	II-1-5	60	63,6

[00125] Количество метастаз в легких, наблюдаемое у мышей, которым вводили в группе 2 (DC, примированные штаммом № 1710 вируса Денге серотипа 2 и опухолевым пептидом), было на 7,5% ниже, чем у контрольных мышей в группе 1, которым вводили DC, примированные опухолевым пептидом без вируса Денге.

Пример 3. Вирус Денге и дендритные клетки для лечения меланомы на второй мышинной модели

[00126] Проводили анализ на мышинной модели для наблюдения за результатами комбинированного целенаправленного воздействия на раковые клетки с использованием штамма вируса Денге (DV) и DC, примированных опухолевым антигеном. Мышам вводили цитокины для параллельного ответа на DV, наблюдаемого у людей.

[00127] Опухоли создавали у мышей с применением линии клеток мышинной меланомы B16, рестриктированных по H-2b (ATCC № CRL-6322). Пептиды (ассоциированные с меланомой B16, рестриктированные по H-2b пептиды, полученные из антигенов gp100/pmel17 и из TRP-1/gp75), применяемые для импульсной обработки дендритных клеток, были синтезированными. Дендритные клетки получали из костного мозга мыши в соответствии со способами, описанными у Lutz et al. (J. Immunol. Methods 223:77-92, 1999).

[00128] В день 0 мыши получали 5×10^4 жизнеспособных клеток меланомы B16 внутривенно в боковую хвостовую вену для создания метастазов в легких. На день 7 мышам инокулировали 0,05 мл вируса Денге (штамм DEN-2 № 1710, запись в базе данных CDC № 555) в количестве 1×10^6 или 1×10^7 БОЕ/мл путем инъекции в основание хвоста. Рекомбинантный мышинный IL-2 (Genzyme) и IFN-гамма (Sigma Pharmaceuticals) вводили путем внутривенной инфузии в количестве 2000 ME (rIL-2) и 500 ME (rIFN-гамма) с 5-дневными интервалами после введения вируса Денге (штамм DEN-2 № 1710). В дни 21, 35 и 49 мышинные DC инкубировали с 2 пептидами по отдельности и вводили их внутривенно за 2 последовательных введения в один и тот же день, соблюдая соответствие пути и графику введения субъектам (для дополнительной информации см. Пример 2). Контрольные группы мышей не получали вирус Денге или дендритные клетки, подвергнутые импульсной обработке рестриктированным по H-2b пептидом из овальбумина (OVA-8), SIINFELK (SEQ ID NO: 7). Группы обработки и контрольные группы приведены в **Таблице 6**.

Таблица 6. Экспериментальные группы для тестирования эффектов вируса Денге и DC на метастазирование меланомы в легкие

Вирус Денге	Кол-во дендритных клеток и тип пептида
Группа А	
10^6 БОЕ/мл	10^6 клеток DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/pmel17 (EGSRNQDWL) (SEQ ID NO:1)

Вирус Денге	Кол-во дендритных клеток и тип пептида
	10 ⁶ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке посредством TRP-1/gp75 (TAYRYHLL) (SEQ ID NO: 2)
Всего	2×10 ⁶ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке пептидом/мышь
Группа В	
10 ⁶ БОЕ/мл	10 ⁷ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/pme117 (EGSRNQDWL) (SEQ ID NO:1)
	10 ⁷ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке посредством TRP-1/gp75 (TAYRYHLL) (SEQ ID NO: 2)
Всего	2×10 ⁷ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке пептидом/мышь
Группа С - контроль	
Нет	10 ⁶ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/pme117 (EGSRNQDWL) (SEQ ID NO:1)
	10 ⁶ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке посредством TRP-1/gp75 (TAYRYHLL) (SEQ ID NO: 2)
Всего	2×10 ⁶ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке пептидом/мышь
Группа D - контроль	
10 ⁶ БОЕ/мл	10 ⁶ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке посредством OVA (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 7)
	10 ⁶ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке посредством OVA (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 7)
Всего	2×10 ⁶ клеток DC, подвергнутых импульсной обработке пептидом/мышь

[00129] В день 90 животных умерщвляли и подсчитывали колонии опухолей в легких. Метастазы в легких подсчитывали слепым, кодированным способом после инсуффляции и фиксации легких с помощью раствора Фекетта. Данные регистрировали как среднее количество метастаз; четыре мыши/группа (см. **Таблицу 7** и **фиг. 3**). Проводили гистопатологический анализ следующих основных систем органов: головной мозг, сердце, легкие, печень, почки, селезенка и половые железы (данные не показаны).

Таблица 7. Результаты тестирования эффектов вируса Денге и DC на метастазирование меланомы в легкие

Условие	Группа	ИН мыши	Количество метастаз легкого	Среднее
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	A	III-1-1	82	
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	A	III-1-2	87	
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	A	III-1-3	78	
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	A	III-1-4	72	
				79,75
DV10 ⁷ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	B	III-2-1	87	
DV10 ⁷ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	B	III-2-2	77	
DV10 ⁷ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	B	III-2-3	92	

Условие	Группа	ИН мыши	Количество метастаз легкого	Среднее
DV10 ⁷ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	B	III-2-4	85	
				85,25
Без вируса Денге + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	C	III-3-1	97	
Без вируса Денге + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	C	III-3-2	94	
Без вируса Денге + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	C	III-3-3	88	
Без вируса Денге + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством gp100/TRP2	C	III-3-4	91	
				92,5
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством OV	D	III-4-1	180	
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством OV	D	III-4-2	174	
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством OV	D	III-4-3	165	

Условие	Группа	ИН мыши	Количество метастаз легкого	Среднее
DV10 ⁶ БОЕ/мл + 2×10 ⁶ DC, подвергнутых импульсной обработке посредством OV	D	III-4-4	177	
				174

[00130] Количество метастаз в легких, наблюдаемое у мышей в группе С (которым вводили DC, примированные опухолевым антигеном, но не вирусом), было на 47% меньше, чем в контрольной группе D (которым вводили DENV-2 № 1710 и DC, подвергнутые воздействию контрольного пептида). Количество метастаз в легких, наблюдаемое у мышей в группе С (которым вводили DENV-2 № 1710 и примированные опухолевым антигеном DC), было на 54% меньше, чем в контрольной группе D (которым вводили DENV-2 № 1710 и DC, подвергнутые воздействию контрольного пептида). Количество метастаз в легких, наблюдаемое у мышей в группе В (которым вводили DENV-2 № 1710 и примированные опухолевым антигеном DC), было на 51% меньше, чем в контрольной группе D (которым вводили DENV-2 № 1710 и DC, подвергнутые воздействию контрольного пептида). Среднее уменьшение в группах А и В по сравнению с группой D составляло 52,8%.

Пример 4. Получение и скрининг вируса Денге

[00131] Создавали главный банк клеток с проверенными и сертифицированными клеточными линиями от Vero (клетки почек африканской зеленой мартышки) и тестировали его на отсутствие каких-либо примесей и побочных организмов. Линии Vero применяются Всемирными организациями здравоохранения для получения ряда вирусных вакцин. Вирус Денге пассировали в валидированную линию Vero, полученную из главного банка клеток и заданную в качестве рабочего банка клеток в соответствии с руководствами, созданными Центром биологии FDA (CBER). Два штамма вируса Денге 2-го типа (DENV-2 № 1584 и DENV-2 № 1710) из первоначального фонда для размножения вносили в клетки Vero из WCB в MOI 10⁻⁵.

[00132] Первую покровную среду объемом 4 мл, содержащую 1% агарозы SeaKem LE (FMC BioProducts, Рокленд, Мэн) в питательной среде (0,165% гидролизата лактальбумина [Difco Laboratories, Детройт, Мичиган.]), 0,033% дрожжевого экстракта [Difco], сбалансированный солевой раствор Эрла, 25 мг гентамицина сульфата

[BioWhittaker, Уолкерсвилл, Мэриленд] и 1,0 мг амфотерицина В [Fungizone; ER Squibb & Sons, Принстон, Нью-Джерси] на литр и 2% FBS), вносили после адсорбции 200 мл инокулята вируса за 1,5 ч при 37°C. После инкубации при 37°C в течение 7 дней добавляли второй 2-мл слой, содержащий дополнительно 80 мг нейтрального красного витального красителя (GIBCO-BRL, Гейтерсберг, Мэриленд) на мл. Бляшки подсчитывали через 8-11 дней после инфицирования.

[00133] Анализ бляшек проводили на конечных вирусных культурах. Титр DNV-2 № 1584 составлял около $5E+06$ БОЕ/мл, а титр DENV-2 № 1710 составлял $3,5E+06$ БОЕ/мл по результатам оценки с помощью анализов на бляшках. В случае вируса Денге 2 (DNV-2; № 1584) из ATCC наблюдали явный цитопатический эффект у клеток Vero через 5 дней после инфицирования, при этом клетки Vero внешне имели изменение морфологии через 11 дней после инфицирования слепым пассажем № 2 (вирусом № 1710). (Данные не показаны) Было показано, что вирус DENV-2 № 1710 был гораздо менее цитопатическим, чем штамм DNV-2 № 1584.

Пример 5. Анализ уничтожения рака подвергнутыми импульсной обработке DC с и без DV

[00134] В контрольной группе нормальные инфильтрирующие лимфоциты человека (TIL) непосредственно наносили на клетки FEMX меланомы человека. Т-клеточные рецепторы приводили в сингенность с линией клеток меланомы FEMX посредством HLA A2.1+. В группе обработки TIL человека подвергали воздействию супернатантов DV, содержащих интерфероны и интерлейкины. Подвергнутые воздействию TIL + супернатанты DV помещали в культуру с опухолевыми клетками FEMX. Обе группы оставляли для уничтожения раковых клеток на 4 часа в соотношении 5 Т-клеток к 1 опухолевой клетке (100000 клеток к 20000 клеток). Выжившие опухолевые клетки затем с помощью проточной цитометрии подсчитывали как % исходных клеток. Из результатов, представленных в **Таблице 8**, видно, что DV индуцировал 35% дополнительное уничтожение раковых клеток помимо противоракового ответа с помощью подвергнутых импульсной обработке DC.

Таблица 8. Усиление противораковой активности подвергнутых импульсной обработке DC с помощью DV

	%FL2-A-	% FL2-A+ (% апоптотических клеток)
CTL	86,1%	13,9%

CTL + супернатанты DV	81,2%	18,8%
--------------------------	-------	-------

Пример 6. Выделение дендритных клеток человека и их импульсная обработка антигенами лизата меланомы

[00135] В следующем примере продемонстрировано создание высокочистой популяции CD11a⁺ зрелых DC, характеризующихся высоким уровнем экспрессии человеческого IL-12p70, из чистых выделенных CD14⁺ моноцитов, а также примирование DC лизатом клеток меланомы, причем весь процесс осуществляли менее чем за одну неделю. Клетки культивировали на твердых пластиковых планшетах без использования мягких пластиковых пакетов.

[00136] CD14⁺ моноциты выделяли и анализировали в отношении экспрессии CD14, CD15, CD45 и 7AAD. После цикла анализа 90,25 % вводимых клеток были CD14⁺ (см. **фиг. 4**). CD14⁺ клетки обрабатывали посредством GM-CSF и IL-4 через 24 часа после посева для получения незрелых дендритных клеток.

Клетки меланомы FEMX из Института рака Провиденса были получены в день анализа, и их ресуспендировали, подсчитали и высевали. Затем клетки меланомы обрабатывали раствором гипохлорита кальция. Альтернативно, клетки обрабатывали раствором хлорита натрия. К незрелым DC добавляли лизат клеток меланомы и средства для созревания: IFN-гамма (1000 ед./мл), R848 (5 мкг/мл), LPS (10 нг/мл) и CD40L (1 мкг/мл). Что касается сроков, LPS вводили на ранних этапах, а впоследствии вводили IFN-гамма и R848. CD40L вводили последним в процессе созревания.

[00137] Собирали супернатант из зрелых DC для тестирования на микоплазмы и эндотоксин через 22 часа после импульсной обработки лизатом клеток меланомы и через 18 часов после добавления средств для созревания. Никаких организмов или роста не наблюдали. Кроме того, использовали ИФА для тестирования уровней IL-12p70, показателя активности DC, с использованием 13 разведений супернатанта среды для культивирования DC. Концентрация IL-12p70 составляла 19 $\pm$ 4 нг/мл, в отличие от промышленного стандарта, составлявшего 4-6 нг/мл. На **фиг. 5** показано продуцирование IL-12p70 у DC относительно продуцирования нескольких компараторов. Эти способы с использованием компараторов предусматривают взаимодействие клеток с мягкими пластиковыми пакетами, лизис клеток растворами, отличными от раствора хлорита и без применения комбинации LPS, IFN-гамма и R848 для зрелых клеток. Повторные эксперименты с применением раствора HOCL вместо порошка HOCL для стадии лизиса давали концентрацию IL-12p70 до 29 нг/мл.

[00138] Клетки дополнительно замораживали, а затем оттаивали при 4°C для тестирования количества клеток и жизнеспособности после замораживания и оттаивания. Данные измерения проводили около через 16, 18, 20 и 22 ч после начала оттаивания. Дополнительный сбор не подвергнутых импульсной обработке DC тестировали в исследовании влияния криоконсервации и наблюдали жизнеспособность на уровне 80%, что превышало промышленный стандарт, имевших жизнеспособность 70%. Жизнеспособность до криоконсервации составляла 85-89%.

Пример 7. Индукция продуцирования цитокинов у лейкоцитов человека вирусом Денге

[00139] Лейкоциты человека (WBC), в том числе моноциты, дендритные клетки и Т-лимфоциты, инфицировали либо вирусом-пустышкой, либо вирусом Денге (DENV-2 № 1710) в трех различных множественностях заражения (MOI): MOI 0,1, MOI 0,5 и MOI 2, в момент времени = 0. Через 48, 72 и 96 ч после инфицирования измеряли уровни (пг/мл) различных цитокинов. Обработки проводили в трех повторностях. В **таблицах 9-12** показаны результаты для каждого момента времени. (М= пустышка. 0,1, 0,5 и 2 обозначают MOI). Рассчитывали средние для трех повторностей изменение между пустышкой и вирусом Денге в протестированных MOI, и они показаны в процентах в **таблице 9**. Из результатов данного эксперимента и повторных экспериментов было видно, что DV индуцировали 70-4000% увеличение уровня таких цитокинов, как GM-CSF, IL-7 и IP-10, по сравнению с вирусом-пустышкой.

Таблица 9. Уровни цитокинов, продуцируемые человеческими WBC, через 48 ч после инфицирования вирусом Денге, измеренные в пикограммах/миллилитр

	М	М	М	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5	2	2	2
IL-1b	15	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7
IL-10	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	4	4
IL-13	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
IL-6	12	7	9	941	874	788	8,08 e+03	8,64 e+03	10,0 e+03	11,2 e+03	11,2 e+03	11,2 e+03
IL-12	19	12	13	14	15	15	17	20	19	28	25	25

	M	M	M	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5	2	2	2
Rantes	12	11	11	14	16	18	32	56	64	152	135	148
CCL-11	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
IL-17	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
MIP-1a	123	110	109	183	166	219	212	309	328	261	264	259
GM-CSF	5	5	5	5	5	5	5	6	7	22	20	21
MIP-1b	83	78	82	123	111	118	145	152	142	163	149	155
MCP-1	1,77 e+03	1,48 e+03	1,87 e+03	12,6 e+03	10,4 e+03	9,95 e+03	21,8 e+03	23,4 e+03	24,2 e+03	32,0 e+03	32,0 e+03	32,0 e+03
IL-15	33	33	33	33	33	33	33	33	33	68	63	60
IL-5	8	8	8	8	8	8	16	18	18	21	21	20
IFN-g	5	5	5	6	6	6	8	8	8	10	9	10
IFN-a	16	12	12	37	35	33	47	50	47	67	68	71
IL-1Ra	3,37 e+03	2,84 e+03	3,59 e+03	4,99 e+03	4,39 e+03	4,30 e+03	4,55 e+03	4,88 e+03	5,14 e+03	4,13 e+03	3,42 e+03	3,82 e+03
TNF-a	6	6	6	8	8	8	16	13	11	21	21	19
IL-2	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
IL-7	16	8	11	31	27	26	51	49	47	53	55	54
IP-10	4	4	4	23	15	18	39	46	39	218	128	147
IL-2R	31	31	31	54	47	52	57	69	69	79	76	79
MIG	38	32	39	29	26	26	26	31	28	23	22	27

[illegible]

[illegible]

	M	M	M	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5	2	2	2
IL-6	9	9	9	834	734	771	7026	7,47 e+03	7,65 e+03	11,2 e+03	11,2 e+03	11,2 e+03
IL-12	14	13	13	16	14	14	16	14	16	16	20	20
Rante s	11	11	11	11	11	11	11	11	11	37	70	68
CCL- 11	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
IL-17	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
MIP- 1a	98	89	119	73	103	122	79	77	85	60	108	106
GM- CSF	5	5	5	5	5	5	5	5	5	12	14	15
MIP- 1b	82	78	99	63	89	99	85	83	89	67	72	76
MCP- 1	8,19 e+03	7,61 e+03	7,10 e+03	32,0 e+03	25,3 e+03	25,6 e+03	32,0 e+03	32,0 e+03	32,0 e+03	32,0 e+03	32,0 e+03	32,0 e+03
IL-15	33	33	33	33	33	33	33	33	33	49	43	52
IL-5	8	8	8	8	8	8	15	16	16	20	19	18
IFN-g	6	6	7	8	7	6	7	7	7	7	7	7
IFN-a	27	29	27	52	47	44	56	58	65	64	64	67
IL- 1Ra	10,9 e+03	10,9 e+03	10,2 e+03	11,0 e+03	9,57 e+03	9,56 e+03	7,63 e+03	7,80 e+03	8,27 e+03	5,49 e+03	4,22 e+03	4,45 e+03
TNF- a	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
IL-2	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
IL-7	8	8	8	21	18	14	33	37	48	50	45	44

	M	M	M	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5	2	2	2
IP-10	4	4	4	29	11	11	29	28	33	134	101	104
IL-2R	25	23	28	39	36	42	39	42	59	52	49	57
MIG	39	40	39	39	24	26	19	22	24	20	17	18
IL-4	23	23	23	23	23	23	25	24	25	27	27	28
IL-8	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03	17,8 e+03

Таблица 12. Относительные изменения уровня цитокинов у WBC между инфицированием пустышкой и инфицированием вирусом Денге

	MOI 0,1			MOI 0,5			MOI 2		
	48 ч	72 ч	96 ч	48 ч	72 ч	96 ч	48 ч	72 ч	96 ч
IL-1b	-33%	0%	0%	-33%	0%	6%	-22%	11%	11%
IL-10	0%	0%	8%	8%	17%	42%	8%	17%	25%
IL-13	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
IL-6	9,20 E+03 %	9,73 E+03 %	8,56 E+03 %	95,4 E+03 %	10,1 E+04 %	8,19 E+03 %	12,02 E+04 %	16,04 E+04 %	12,46 E+04 %
IL-12	0%	12%	10%	27%	41%	15%	77%	74%	40%
Rantes	41%	0%	0%	347%	27%	0%	1179%	436%	430%
CCL-11	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
IL-17	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
MIP-1a	66%	10%	-3%	148%	16%	-21%	129%	1%	-10%

[illegible]

Пример 8. Дополнительные протоколы получения вирусов

[00140] В дополнение к способам из Примера 4 клетки Vero и FRhL инфицировали, используя разведения супернатанта из слепого пассажа № 2, соответственно DENV-2 № 1710, DNV-2 № 1584 и 45AZ5. Для увеличения чувствительности детекции разрабатывали иммунофлуоресцентное окрашивание для детекции вируса в клетках, инфицированных супернатантом из слепого пассажа № 2.

[00141] Для концентрирования вируса при необходимости использовали ультрацентрифугирование. После подтверждения титра вируса конечный продукт фильтровали для удаления какого-либо клеточного дебриса, проверяли на отсутствие каких-либо побочных организмов и после выпуска конечной партии разливали в бутылки по 5 мл и хранили при 4°C до готовности к отправке и применению.

Пример 9. Сбор РВМС от доноров

[00142] Доноров (либо аутологических, либо HLA-сингенных аллогенных) подвергали процедуре лейкофереза, проводимой в учреждении с обученным персоналом и соответствующим оборудованием. После завершения афереза эритроциты, тромбоциты и белки плазмы возвращали донору. Продукт афереза тестировали на месте (тест окрашивания по Граму и *Limulus Amoeba Lysis* [ЛАЛ-тест]) на наличие бактериального обсеменения. После пассивирования емкость для сбора (с прикрепленной небольшой емкостью для тестируемого образца) помечали штрих-кодом с информацией о доноре и помещали в одобренную емкость для транспортировки, которая соответствовала требованиям FDA и DOT для хранения и транспортировки неинфекционных биологических материалов. Емкость для транспортировки упаковывали с охлаждающим элементом (например, твердым CO₂, жидким N₂) и мониторами температуры. Емкость для транспортировки представляла собой твердую пластиковую колбу. Курьер доставлял емкость в течение 24 часов на предприятие-изготовитель, сертифицированное по стандартам GMP.

Пример 10. Получение и применение дендритных клеток, подвергнутых импульсной обработке опухолевыми антигенами

[00143] Моноциты отделяли от других собранных лейкоцитов (например, Т-клеток, В-клеток, НК-клеток, эозинофилов и базофилов). Это осуществляли с помощью *иммуномагнитного отбора* или, альтернативно, с помощью адгезионных свойств. Иммуномагнитный отбор предусматривает переливание лейкоцитов в стерильную

пластиковую колонку с пластиковыми микроносителями, покрытыми антителами к поверхностным белкам CD иммуноцитов: (CD4/CD8/CD56 и т. д.).

[00144] Примером набора для иммуномагнитного отбора является набор EasySep Monocyte Enrichment, доступный от Stem Cell Technologies (Ванкувер, Британская Колумбия, Канада, www.stemcell.com). Для применения набора EasySep продукт афереза суспендировали в стерильном PBS и выливали в пластиковую колонку EasySep, содержащую комплексы тетрамерных антител с мышиными антителами к человеческому CD2, CD3, CD16, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123 и гликофору А. После инкубации в течение 10 минут добавляли магнитные частицы EasySep. Клетки, прикрепившиеся к микроносителям, удаляли с помощью электромагнитной сортировки. Магнит инвертировали и искомую фракцию клеток (моноцитов) выливали в стерильную полистирольную колбу для дополнительной обработки. Альтернативно, в анализе отбора с положительной адгезией магнитные микроносители, покрытые CD1+/CD14+ антителами, смешивали с моноцитами, размещали магнит напротив колонки и несвязавшиеся клетки вымывали из колонки PBS-раствором. Затем моноциты смывали с микроносителей. При отборе с положительной адгезией свойства моноцитов прилипать к определенным поверхностям используют для их отделения путем пропускания продукт афереза вниз по наклонной колонке.

[00145] Альтернативно, из клеток костного мозга удаляли лимфоциты и положительные по классу МНС клетки с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) с моноклональными антителами к CD3, CD4 и CD8. Оставшиеся клетки культивировали в течение ночи при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в базальной среде для культивирования клеток, дополненной человеческой сывороткой группы АВ. Человеческая сыворотка группы АВ была выбрана потому, что она позволяет расти клеткам с большей скоростью, чем другие типы сыворотки, а бессывороточная среда позволяет получить DC с гораздо более низкой способностью стимулировать Т-клетки. Через 24 часа клетки повторно высевали и культивировали в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и рекомбинантного IL-4 в количестве 900 ед./мл. Через 3-4 дня среды заменяли свежими цитокин-содержащими средами.

[00146] Альтернативно, дендритные клетки кожи (DDC) получали с помощью следующих способов: Кератомы от здоровых людей-добровольцев инкубировали в растворе бактериальных протеаз диспазы 2-го типа в конечной концентрации 1,2 ед./мл в RPMI 1640 в течение 1 часа при 37°C. После периода инкубации эпидермис и дерма легко отделялись. Слои эпидермиса и дермы затем нарезали на маленькие (1-10 мм) кусочки после нескольких промывок с помощью PBS, и помещали в RPMI 1640 с добавлением 10%

фетальной бычьей сыворотки (FBS), и помещали в 10-сантиметровые планшеты для культивирования тканей. Через 2-3 дня кусочки ткани удаляли, а среду собирали. Клетки, мигрирующие из срезов ткани в среду, осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 1-2 мл свежей среды и окрашивали трипановым синим. Дополнительное увеличение содержания достигали путем разделения на метризамидовом градиенте. Клетки наслаивали на 3-мл колонки с гипертоническим 14,5% метризамидом и осаждали при 650 g в течение 10 минут при комнатной температуре. Находящиеся в интерфазе клетки с низкой плотностью собирали и промывали за две последовательные менее гипертонические промывки (RPMI 1640 с 10% FBS и 40 mM NaCl) для возвращения клеток в изотоническое состояние.

[00147] При сборе моноцитов их количество могло составлять всего несколько тысяч. Для увеличения количества DC до диапазона 50 млн в многоступенчатом протоколе использовали следующие рекомбинантные человеческие (rhu) факторы роста: rhu-интерлейкин-4 (IL-4) и *rhu*-гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). После добавления IL-4 и GM-CSF оценивали количество клеток и увеличение их количества, а также развитие маркеров зрелых DC: (CD11⁺, CD80⁺, CD83⁺), а также повышенную экспрессию комплексов МНС как I класса (для презентирования коротких пептидов CD8⁺ клеткам), так и II класса (для презентирования более длинных пептидов CD4⁺ Т-хелперам). Примерно через 3-4 дня измеряли количество зрелых DC. Например, обогащенную моноцитами фракцию помещали в клеточную фабрику Nuclon-Coated Cell Factory (Thermoscientific) с бессывороточной средой для DC (CellGro, Inc.), дополненной 2% человеческой сывороткой группы АВ стандарта GMP, 500 ME/мл (примерно 50 нг/мл) *rhuIL-4* (CellGenix), при этом через первые 24 часа добавляли 500 ME/мл (примерно 50 нг/мл) *rhuGM-CSF* (CellGenix). Конечный продукт составлял примерно 1 л от общего объема среды. Приблизительно через 72 часа культивирования популяцию незрелых DC оценивали по следующим маркерам: CD1⁺ CD11⁺ CD14⁺.

Пример 11. Импульсная обработка дендритных клеток

[00148] Для высококачественных DC применяли разнообразные источники опухолевых антигенов: пептиды, лизат из аутологичных опухолей, цельные опухолевые клетки и РНК, кодирующую конкретные опухолевые антигены. Биоптат, полученный с помощью эксцизионной биопсии, или образец крови, содержащий лейкозные или лимфомные клетки, получали хирургическим путем или взятием крови с последующим магнитным отбором для получения лейкозных/лимфомных клеток. После получения опухолевых клеток их помечали штрих-кодом и отправляли в одобренных емкостях,

аналогичных тем, которые были описаны ранее для афереза, в стандартизированное согласно GMP учреждение. После проведения тестов на бактериальное обсеменение образцы можно заморозить при -70°C .

[00149] Лизат цельных аутологических опухолевых клеток получали несколькими способами. Для получения лизата образец опухоли можно повторно подогреть до около 35°C с помощью водяной бани или другой процедуры. Разработка автоматизированных клеточных процессоров, подобных системе Miltenyi GentleMACS, позволяет вручную измельчить образец, суспендировать в PBS-растворе, а затем с помощью роторной системы под управлением предварительно подобранного тканеспецифического программного обеспечения отделить опухолевые клетки. Клетки добавляли в смесь ферментов перед переносом в диссоциатор Miltenyi GentleMACS. Суспензию отдельных клеток можно подвергнуть мембранному лизису с минимальным повреждением опухолевых пептидов, используя раствор гипохлорита, который уничтожит все остаточные опухолевые клетки, нейтрализует цитокины dTh2 , повысит иммуногенность до превосходной аффинности, авидности и активации CTL. После добавления гипохлорита планшеты для культивирования инкубировали при 37°C в течение 1 часа при аккуратном перемешивании вручную через 30 минут для диспергирования гипохлорита. Клетки дважды промывали для нейтрализации реакции лизирования (например, HBSS). Обработанные гипохлоритом клетки можно было подвергнуть последующим циклам замораживания-оттаивания. Альтернативно, из образца не отделяли опухолевые клетки. Вместо этого образец оставляли с содержанием опухолевых клеток и поддерживающих клеток (например, клеток из опухолевого микроокружения). Клетки лизировали гипохлоритом кальция для удаления эритроцитов и получения апоптотических и некротических телец без разрушения пептидов, необходимых для индукции CTL.

[00150] На третий день после получения незрелых DC добавляли лизат из GentleMACS. Незрелые DC совместно культивировали с опухолевым лизатом в течение примерно 16 часов. Последняя стадия заключалась в созревании с воспалительным сигналом. LPS клинической степени чистоты (60 ME/мл) (R&D Invivogen) и интерферон-гамма (2000 ME/мл, примерно 100 нг/мл) (R&D Systems) добавляли в колбу и инкубировали в течение примерно 12 часов для созревания подвергнутых импульсной обработке DC. После воздействия посредством LPS DC оценивали в отношении индукции продуцирования CD80/CD83^{+} маркеров активации и увеличения продуцирования IL-12p70. Процесс тестирования на этой стадии включал следующие признаки: стерильность (как описано ранее), жизнеспособность (% жизнеспособных клеток по вытеснению красителя

трипанового синего) и специфичность (% DC, измеренный с помощью проточной цитометрии CD11c).

[00151] После окончательного тестирования на стерильность, специфичность и жизнеспособность DC переносили в твердые пластиковые емкости, пригодные для замораживания при -130°C в паровой фазе N_2 , хранения до 1 года и транспортировки в клинику для использования. Емкости транспортировали замороженными в течение ночи, затем нагревали до 37°C в сухой бане перед одновременным внутривенным введением с 0,9% раствором NaCl в течение 30 минут.

Пример 12. Комбинированная доставка для лечения рака

[00152] Введение вируса Денге производили аналогично введению других вирусных вакцин. У субъекта брали область кожи в области плеча (дельтовидная), очищенную спиртом, затем под кожу вводили 0,5 мл вируса для имитации укуса комара. После того, как у субъекта температура достигала $38,5^{\circ}\text{C}$, через 2-3 дня после инъекции DV, субъекту вводили внутрилимфатический микрокатетер с подвергнутыми импульсной обработке (примированными) дендритными клетками. Инъекции повторяли до тех пор, пока субъект не достигал отрицательного по заболеванию статуса. Штаммом DV в этом примере был DENV-1 № 45AZ5 или DENV-2 № 1710. При инфузиях DC применяли клетки, полученные в Примере 6.

Пример 13. Анализ цитотоксичности вируса Денге в линиях раковых клеток

[00153] Каждую из двух различных линий раковых клеток, FEMX и 624.28, по отдельности культивировали совместно с CTL либо в присутствии, либо в отсутствие супернатанта DV (MOI 2) в течение шести часов и гибель клеток количественно анализировали для каждого набора условий с помощью анализа высвобождения LDH. Супернатант DV получали после инфицирования WBC вирусом Денге способом, описанным в Примере 7. Супернатант DV почти удваивал способность CTL уничтожать клетки FEMX: 51% клеток FEMX были уничтожены CTL в присутствии супернатанта-пустышки, и 91% клеток FEMX были уничтожены CTL в присутствии супернатанта DV. Супернатант DV резко увеличивал способность CTL уничтожать клетки 624.28: 5% клеток 624.28 были уничтожены CTL в присутствии супернатанта-пустышки, и 51% клеток 624.28 были уничтожены CTL в присутствии супернатанта DV. См. **фиг. 6** и **фиг. 7**.

Пример 14. Анализ активации вирусом Денге целенаправленного воздействия натуральных киллеров на раковые клетки

[00154] Эталонном для уничтожения НК-клеток в промышленности являются опухоли K562, поскольку они не сингенны по антигенам. Было показано, что лечение вирусом Денге стимулирует НК-клетки уничтожать около 100% K562 (данные не показаны).

[00155] Опухоли FEMX и 624.28 обычно гораздо хуже уничтожаются НК-клетками. Клетки 624.28 являются типичными меланомными клетками на поздних стадиях рака, при этом при высоком содержании HLA они уничтожаются атакой CTL. Клетки FEMX представляют собой меланомные клетки с нормальной экспрессией HLA A2, который является ингибитором лизиса клетками NK-92. Таким образом, ожидали, что клетки FEMX будут устойчивы к атаке NK.

[00156] Линии раковых клеток FEMX и 624.28 отдельно культивировали с НК-клетками либо в присутствии, либо в отсутствие супернатанта DV и гибель клеток определяли количественно при каждом условии. Вирус Денге удваивал способность НК-клеток уменьшать количество раковых клеток, приводя к >85% разрушению за 10 часов. Кроме того, комбинация DV и дендритных клеток обеспечивала уничтожение более 90% за 10 часов. См. **фиг. 8** и **фиг. 9**.

[00157] Наблюдали высокий лизис DV-активированными НК в отношении клеток 624.28 и клеток FEMX. НК-клетки уничтожали 33% клеток 624.28 в присутствии супернатанта-пустышки и 86% клеток 624.28 в присутствии супернатанта DV. НК-клетки уничтожали 48% клеток FEMX в присутствии супернатанта-пустышки и 88% клеток FEMX в присутствии супернатанта DV.

Пример 15. Индуцированные вирусом Денге супернатанты из WBC

[00158] Супернатант DV получали после инфицирования WBC вирусом Денге согласно описанному в Примере 7. Линию меланомных клеток 624.28 подвергали воздействию только супернатанта DV (MOI 2) в течение шести часов и измеряли цитотоксичность. В качестве контроля клетки 624.28 подвергали воздействию только цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) или супернатанта вируса-пустышки. На **фиг. 10** показаны результаты этого эксперимента. Обработка клеток 624.28 супернатантами DV приводила к гибели около 66% клеток только с супернатантом DV.

Пример 16. Вирус Денге и дендритные клетки для лечения меланомы

[00159] На мышинной модели испытывали штамм вируса Денге (DV) (DENV-2 № 1710 или DENV-1 № 45AZ5) и дендритные клетки, примированные опухолевым антигеном (DC). Мышам C57BL/6 инокулировали 0,05 мл DV в количестве 1×10^6 или 1×10^7 БОЕ/мл путем инъекции в хвостовую вену. Рекомбинантный мышинный IL-2 (Genzyme) и IFN-гамма (Sigma Pharmaceuticals) вводили путем внутривенной инфузии в количестве 2000 (rIL-2) и 500 мкл (rIFN-гамма) в дни 5, 10, 15 и 20 после введения DV. Через семь дней после введения DV мышей C57BL/6 иммунизировали мышинными DC, которые были инкубированы с 2 пептидами по отдельности и введены внутривенной инъекцией. Пептиды были синтезированными. В качестве контроля применяли рестриктированный по H-2b пептид из овальбумина (OVA-8), SIINFELK (SEQ ID NO: 7). Для импульсной обработки мышинных DC применяли ассоциированные с меланомой B16, рестриктированные по H-2b пептиды, полученные из антигенов gp100/pmel17 (EGSRNQDWL (SEQ ID NO: 1)) и из TRP-1/75 (TAYRYHLL (SEQ ID NO: 2)) (подробности см. в Примере 1). Проводили две дополнительные иммунизации посредством DC с 14-дневными интервалами. Через три дня после последней инфузии DC мышей заражали 5×10^4 жизнеспособными клетками меланомы B16 внутривенно в боковую хвостовую вену, а затем отслеживали их выживание, которое регистрировали как процент выживших животных с течением времени (в днях) после инъекции опухолевых клеток.

[00160] Несмотря на то, что в настоящем документе были продемонстрированы и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены лишь в качестве примера. Специалистам в настоящей области техники после этого станут очевидны многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от сути настоящего изобретения. Следует понимать, что при реализации на практике настоящего изобретения можно использовать различные альтернативы описанным в настоящем документе вариантам осуществления настоящего изобретения. Подразумевают, что приведенная далее формула изобретения определяет объем настоящим изобретения и что таким образом охватываются способы и структуры в объеме пунктов данной формулы изобретения и их эквивалентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или уменьшения меланомы, включающий:
 - a) введение вируса Денге нуждающемуся в этом субъекту, причем у субъекта есть меланома; и
 - b) введение примированных дендритных клеток субъекту, причем примированные дендритные клетки получены путем приведения в контакт дендритных клеток с опухолевым антигеном.
2. Способ по п. 1, причем меланома представляет собой запущенную меланому.
3. Способ по п. 1, причем меланома является запущенной и находится на стадии III или стадии IV.
4. Способ по п. 1, включающий получение дендритных клеток от субъекта по меньшей мере за неделю до введения дозы вируса Денге.
5. Способ по п. 1, причем вирус Денге вводят в количестве от 10^4 БОЕ до 10^8 БОЕ.
6. Способ по п. 1, причем вирус Денге вводят в количестве от 10^5 БОЕ до 10^7 БОЕ.
7. Способ по п. 1, причем вирус Денге вводят в концентрации, составляющей от 10000 БОЕ/мл до 90000 БОЕ/мл.
8. Способ по п. 1, причем вирус Денге вводят в концентрации, составляющей около 30000 БОЕ/мл.
9. Способ по п. 1, включающий введение примированных дендритных клеток через 4-10 дней после введения дозы вируса Денге.
10. Способ по п. 1, причем вирус Денге вводят подкожно.
11. Способ по п. 1, причем вирус Денге вводят посредством внутриопухолевой инъекции.
12. Способ по п. 1, включающий введение примированных дендритных клеток, когда у субъекта имеется лихорадочный симптом.
13. Способ по п. 1, включающий введение примированных дендритных клеток, когда температура у субъекта достигла 101°F .
14. Способ по п. 1, включающий введение первой аликвоты примированных дендритных клеток субъекту в первый раз и второй аликвоты примированных дендритных клеток во второй раз.
15. Способ по п. 12, причем первый и второй раз разделены сроком до 30 дней.
16. Способ по п. 12, причем первый и второй раз разделены сроком, составляющим около 3 дней.

17. Способ по п. 12, причем количество примированных дендритных клеток в первой аликвоте примированных дендритных клеток составляет от 10^4 до 10^8 клеток.

18. Способ по п. 12, причем общее количество примированных дендритных клеток в каждой из первой аликвоты примированных дендритных клеток и второй аликвоты примированных дендритных клеток составляет от 10^6 клеток до 10^9 клеток.

19. Способ по п. 1, причем дендритные клетки являются аллогенными для субъекта.

20. Способ по п. 1, причем дендритные клетки являются аутологичными для субъекта.

21. Способ по п. 1, включающий получение дендритных клеток от субъекта.

22. Способ по п. 1, включающий приведение дендритных клеток в контакт с опухолевым лизатом от субъекта.

23. Способ по п. 1, причем примированные дендритные клетки продуцируют по меньшей мере около 16 нг/мл IL-12p70.

24. Способ по п. 1, причем примированные дендритные клетки продуцируют по меньшей мере около 29 нг/мл IL-12p70.

25. Способ по п. 1, причем вирус Денге относится к серотипу 1, 2, 3, 4 или 5.

26. Способ по п. 1, причем вирус Денге представляет собой DENV2 № 1710.

27. Способ по п. 1, причем вирус Денге представляет собой DENV1 № 45AZ5.

28. Способ по п. 1, причем вирус Денге представляет собой S16803, HON 1991 C, HON 1991 D, HON 1991 B, HON 1991 A, SAL 1987, TRI 1981, PR 1969, IND 1957, TRI 1953, TSV01, DS09-280106, DS31-291005, 1349, GD01/03, 44, 43, China 04, FJ11/99, FJ-10, QHD13CAIQ, CO/BID-V3358, FJ/UH21/1971, GU/BID-V2950, American Asian, GWL18, IN/BID-V2961, Od2112, RR44, 1392, 1016DN, 1017DN, 1070DN, 98900663DHF, BA05i, 1022DN, NGC, Pak-L-2011, Pak-K-2009, Pak-M-2011, PakL-2013, Pak—L-2011, Pak-L-2010, Pak-L-2008, PE/NFI1159, PE/IQA 2080, SG/D2Y98P-PP1, SG/05K3295DK1, LK/BID/V2421, LK/BID-V2422, LK/BID-V2416, 1222-DF-06, TW/BID-V5056, TH/BID-V3357, US/BID-V5412, US/BID-V5055, IQT1797, VN/BID-V735, US/Hawaii/1944, CH53489 или 341750.

29. Способ лечения или уменьшения меланомы, включающий:

a) введение DENV1 № 45AZ5 нуждающемуся в этом субъекту, причем у субъекта есть меланома;

b) получение дендритных клеток от субъекта;

c) приведение дендритных клеток в контакт с опухолевым антигеном от субъекта с получением примированных дендритных клеток; и

d) введение примированных дендритных клеток субъекту.

30. Способ по п. 29, причем меланома представляет собой запущенную меланому.

31. Способ по п. 29, причем меланома является запущенной и находится на стадии III или стадии IV.

32. Способ по п. 29, причем DENV1 № 45AZ5 вводят в количестве от 10^4 БОЕ до 10^8 БОЕ.

33. Способ по п. 29, причем DENV1 № 45AZ5 вводят в количестве от 10^5 БОЕ до 10^7 БОЕ.

34. Способ по п. 29, причем DENV1 № 45AZ5 вводят в концентрации, составляющей от 10000 БОЕ/мл до 90000 БОЕ/мл.

35. Способ по п. 29, причем DENV1 № 45AZ5 вводят в концентрации, составляющей около 30000 БОЕ/мл.

36. Способ лечения или уменьшения меланомы, включающий:

а) введение DENV2 № 1710 нуждающемуся в этом субъекту, причем у субъекта есть меланома;

б) получение дендритных клеток от субъекта;

с) приведение дендритных клеток в контакт с опухолевым антигеном от субъекта с получением примированных дендритных клеток; и

д) введение примированных дендритных клеток субъекту.

37. Способ по п. 36, причем меланома представляет собой запущенную меланому.

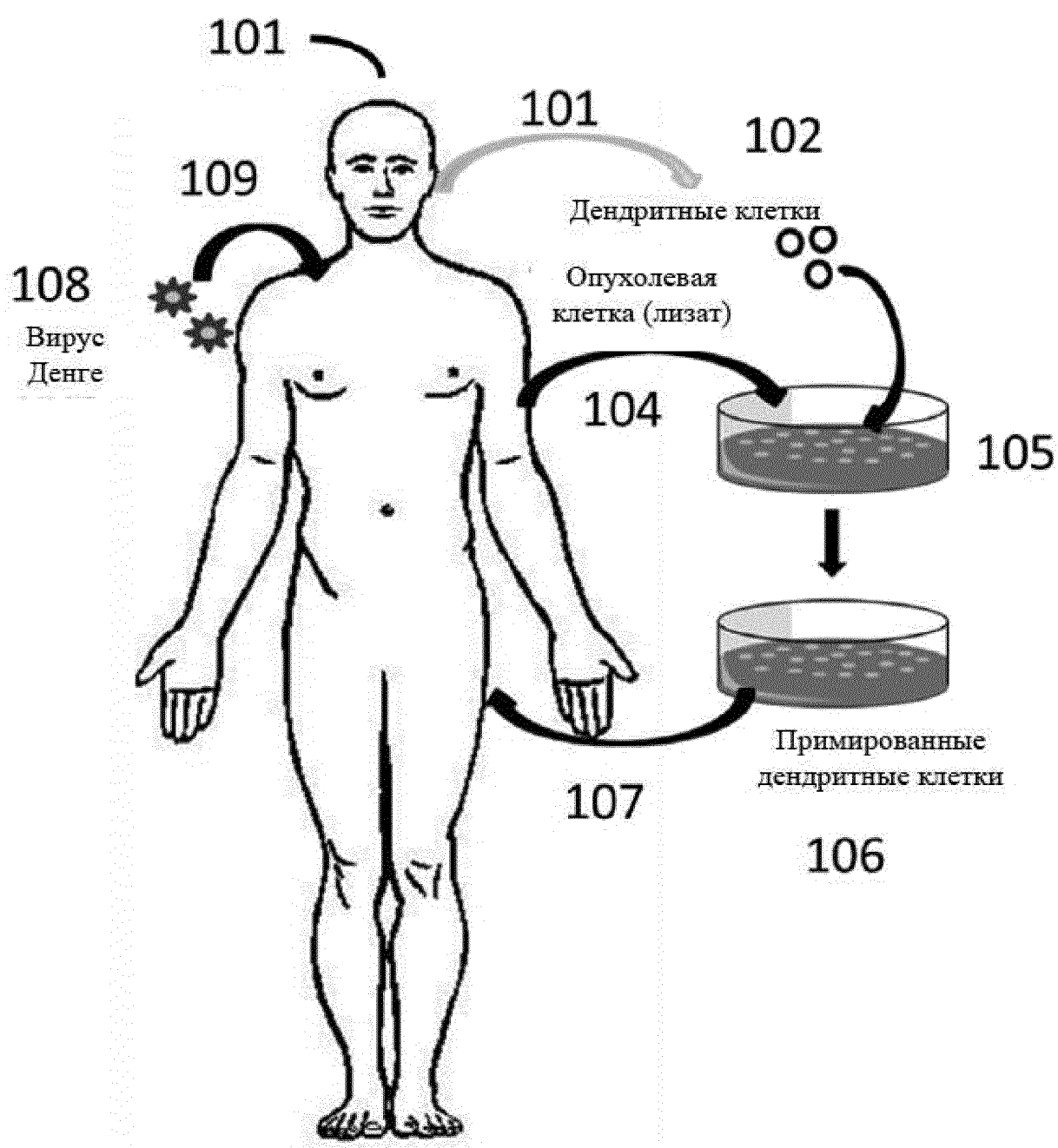
38. Способ по п. 36, причем меланома является запущенной и находится на стадии III или стадии IV.

39. Способ по п. 36, причем DENV2 № 1710 вводят в количестве от 10^4 БОЕ до 10^8 БОЕ.

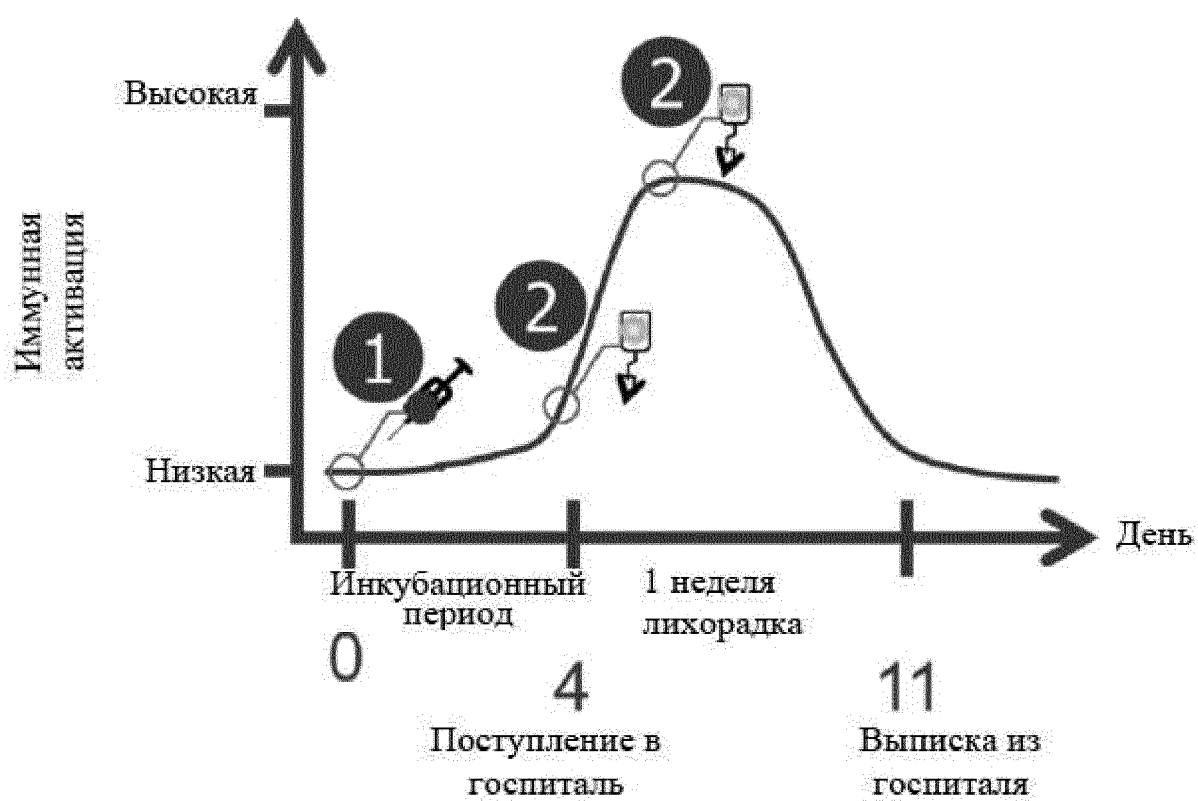
40. Способ по п. 36, причем DENV2 № 1710 вводят в количестве от 10^5 БОЕ до 10^7 БОЕ.

41. Способ по п. 36, причем DENV2 № 1710 вводят в концентрации, составляющей от 10000 БОЕ/мл до 90000 БОЕ/мл.

42. Способ по п. 36, причем DENV2 № 1710 вводят в концентрации, составляющей около 30000 БОЕ/мл.

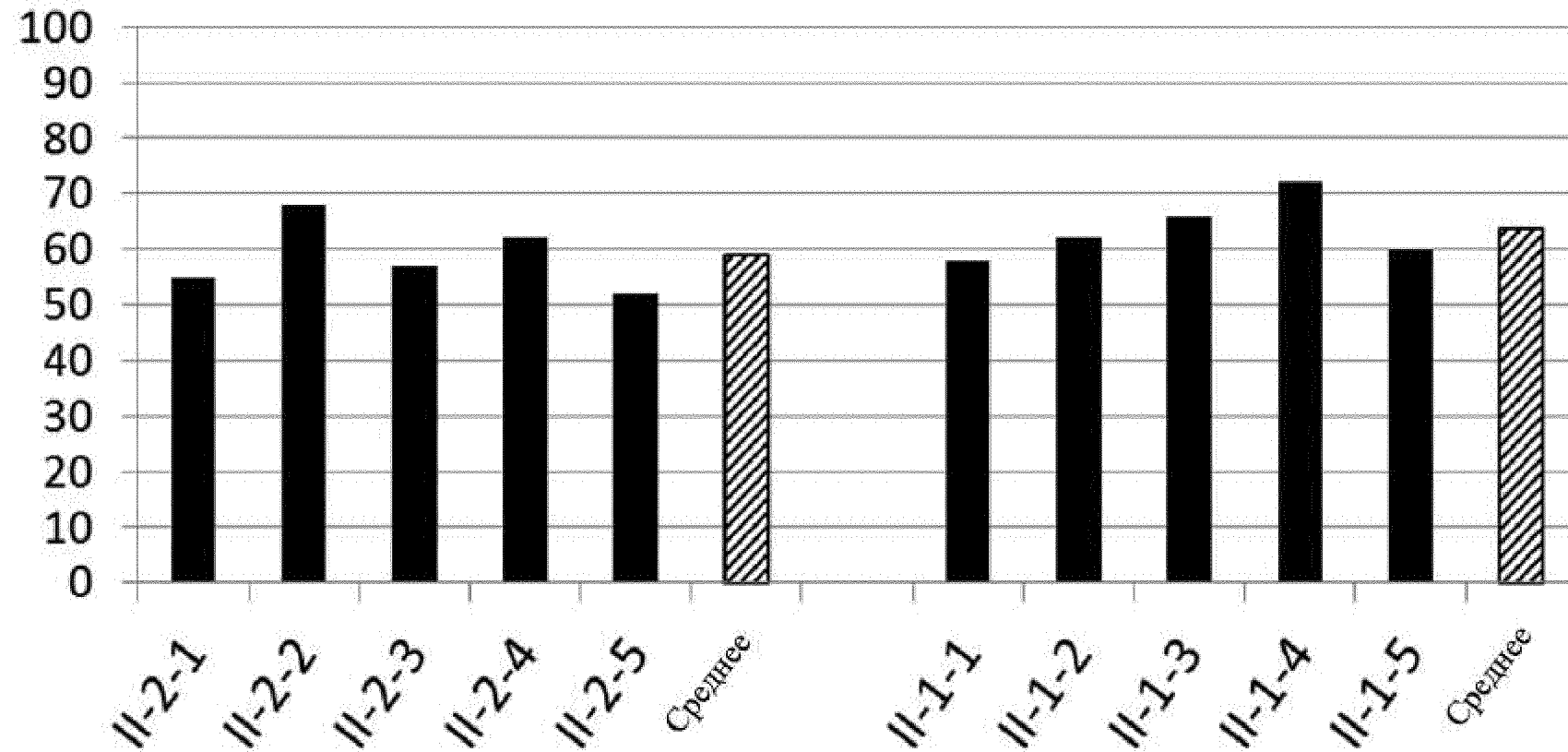


Фиг. 1

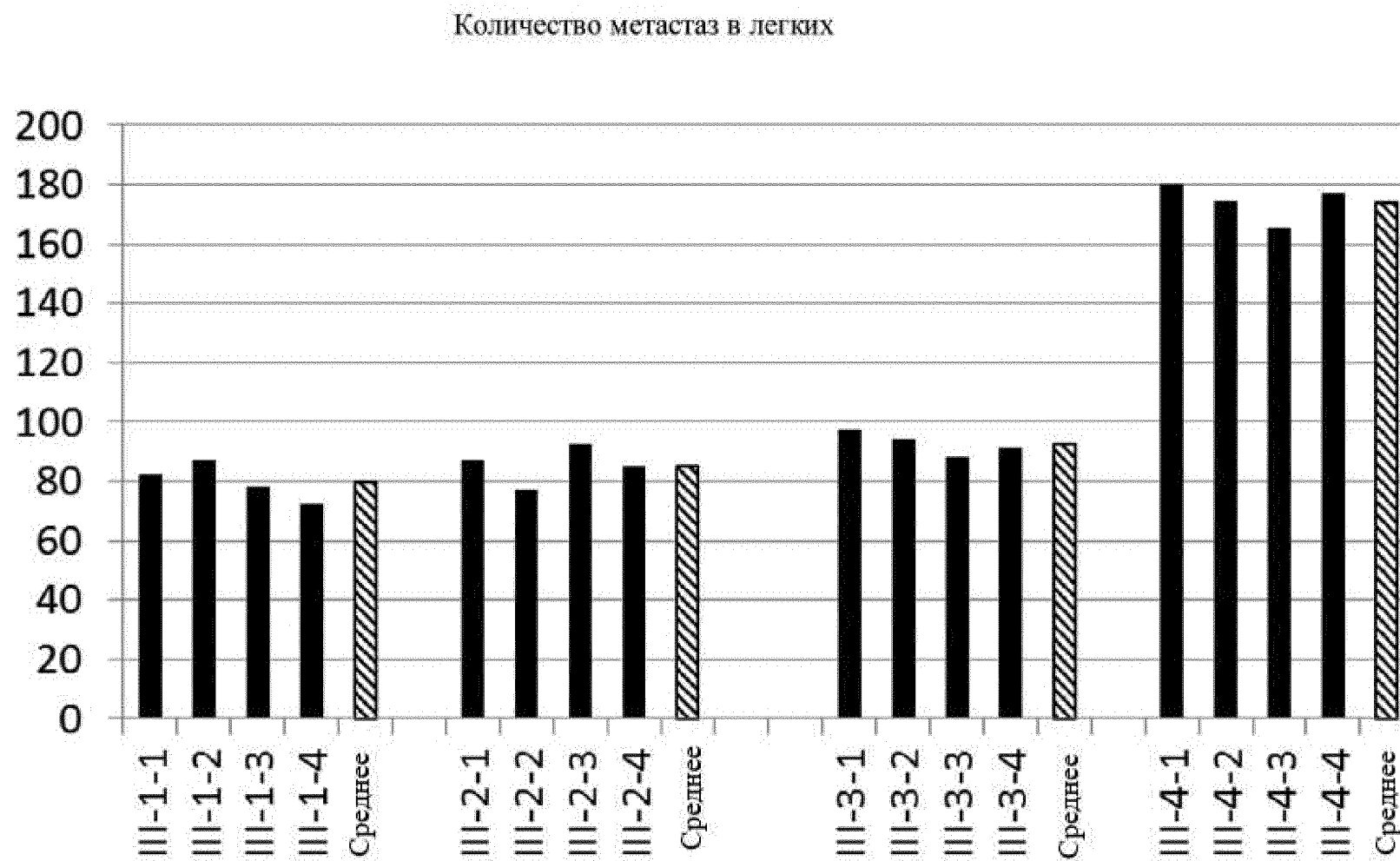


Фиг. 2

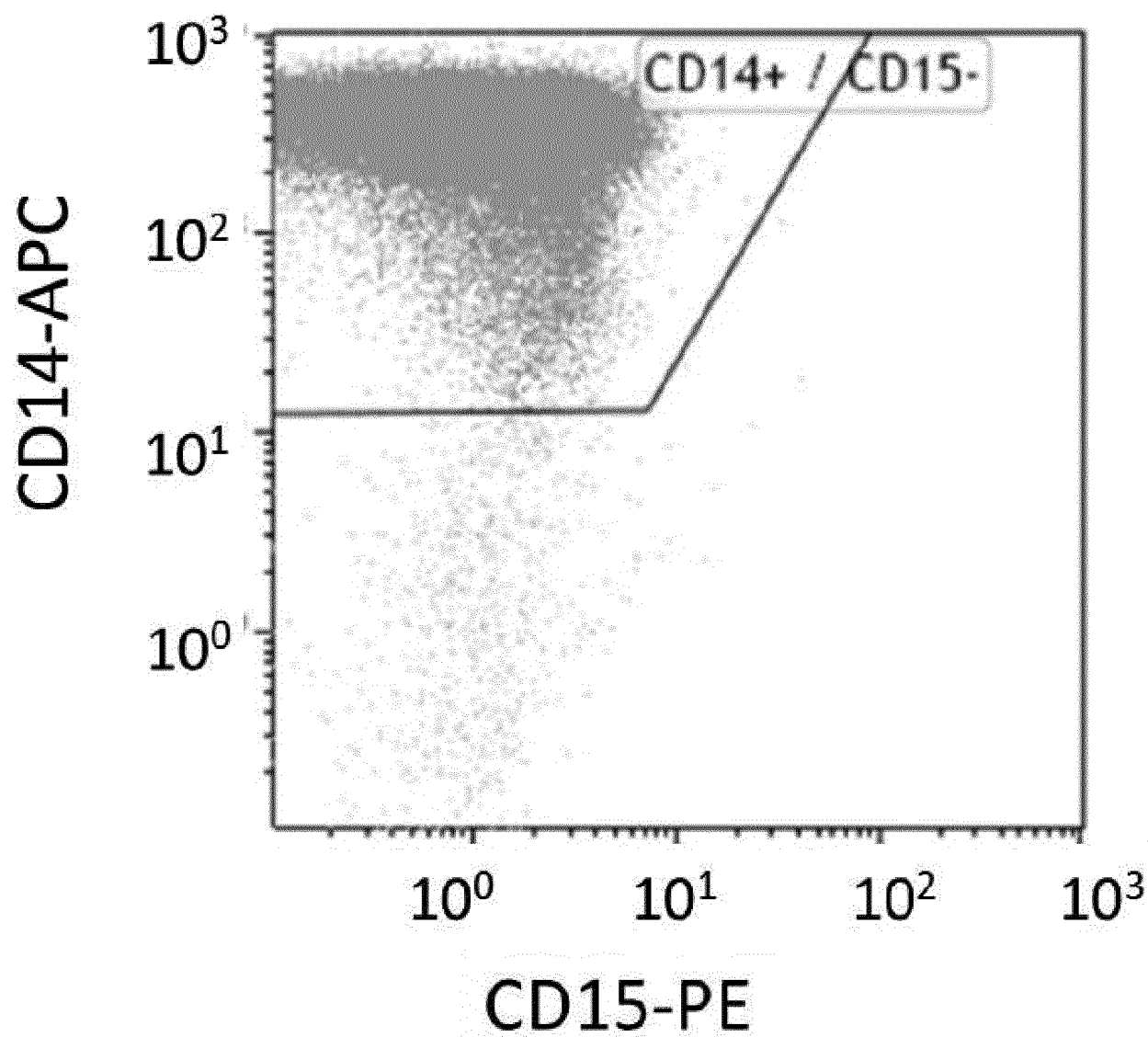
Количество метастаз в легких



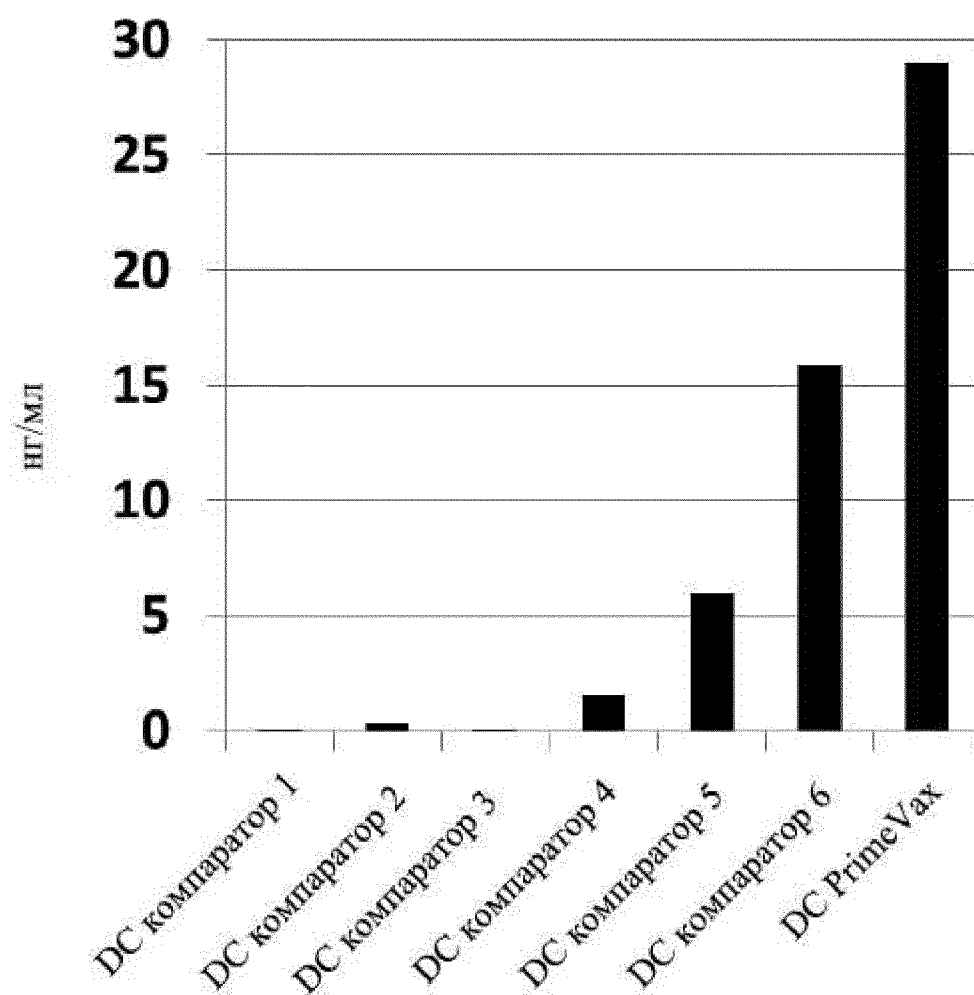
Фиг. 3

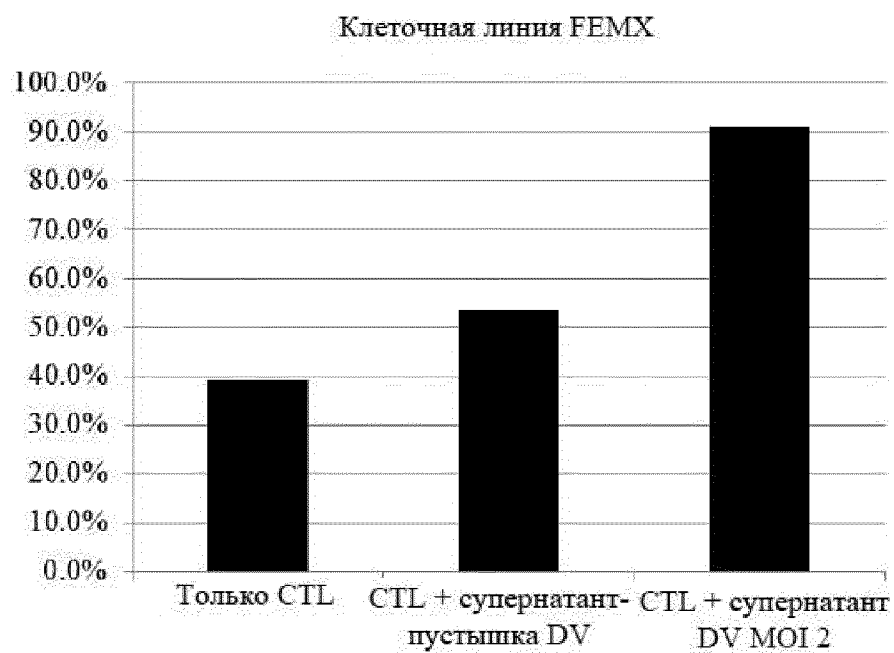


Фиг. 4

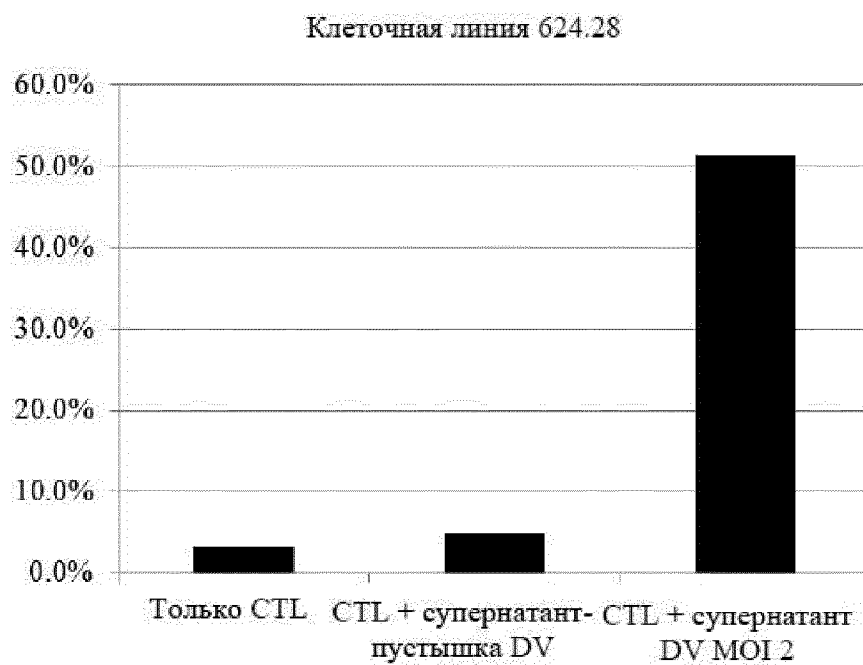


Фиг. 5

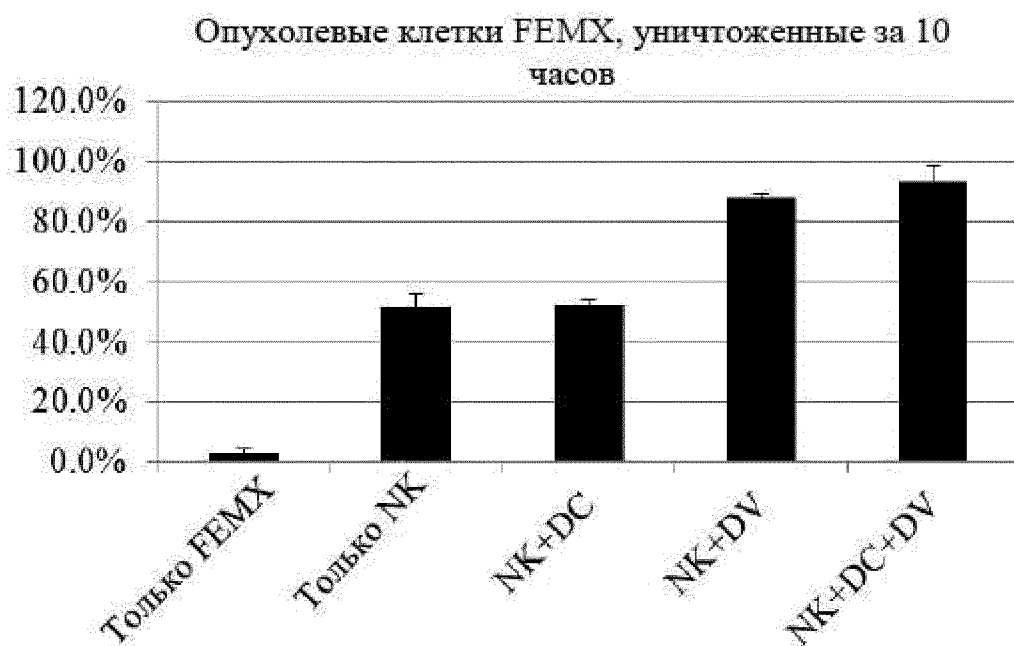
**Фиг. 6**



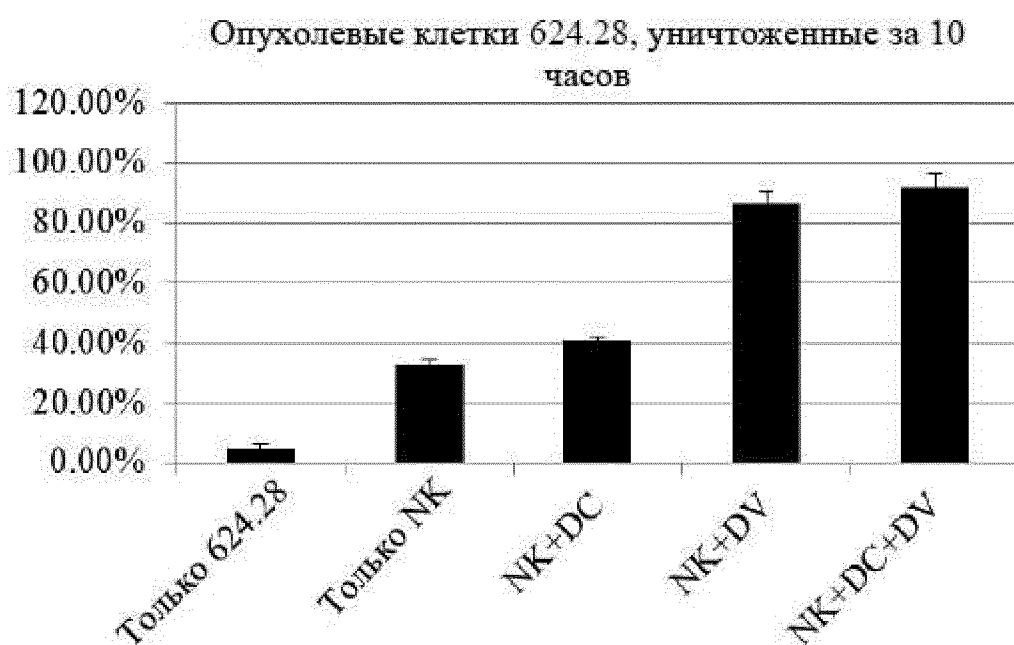
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10