

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038981**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.17

(21) Номер заявки
201591740

(22) Дата подачи заявки
2014.03.04

(51) Int. Cl. *A61K 39/17* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(54) ВИРУСЫ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/782,994**

(32) **2013.03.14**

(33) **US**

(43) **2016.06.30**

(86) **PCT/US2014/020299**

(87) **WO 2014/158811 2014.10.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИКАН СКУЛ ОФ МЕДСИН ЭТ
МАУНТ СИНАЙ; МЕМОРИАЛ
СЛОАН КЕТТЕРИНГ КЭНСЕР
СЕНТЕР (US)**

(72) Изобретатель:
**Пейлиз Питер, Гастрия-Састре
Адо́льфо, Зама́рин Дми́трий, Эллисон
Дже́ймс, Волчо́к Дже́дд Д. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A1-20120058141
US-A1-20110189189**

(57) В патенте описаны гибридные вирусы болезни Ньюкасла, сконструированные таким образом, что они экспрессируют агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, и композиции, содержащие такие вирусы. Также описаны гибридные вирусы болезни Ньюкасла, сконструированные таким образом, что они экспрессируют антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, и композиции, содержащие такие вирусы. Эти гибридные вирусы болезни Ньюкасла и композиции пригодны для лечения рака. Кроме того описаны способы лечения рака, включающие введение вирусов болезни Ньюкасла в комбинации с агонистом костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагонистом ингибирующего сигнала иммунной клетки.

B1**038981****038981****B1**

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 61/782994, поданной 14 марта 2013 года, которая полностью включена в настоящую заявку путем ссылки.

Настоящее изобретение отчасти было создано при поддержке правительственных грантов 5T32CA009207-35 и NNSN26620070010C от Национальных институтов здравоохранения США. Правительство США имеет определенные права на это изобретение.

1. Введение

В патенте описаны гибридные вирусы болезни Ньюкасла, сконструированные таким образом, что они экспрессируют агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, и композиции, содержащие такие вирусы. Также в настоящей заявке описаны гибридные вирусы болезни Ньюкасла, сконструированные таким образом, что они экспрессируют антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, и композиции, содержащие такие вирусы. Эти гибридные вирусы болезни Ньюкасла и композиции пригодны для лечения рака. Кроме того, в настоящей заявке описаны способы лечения рака, включающие введение вирусов болезни Ньюкасла в комбинации с агонистом костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагонистом ингибирующего сигнала иммунной клетки.

2. Уровень техники

Вирус болезни Ньюкасла (NDV) относится к роду *Avulavirus* семейства *Paramyxoviridae* (Alexander, DJ (1988). *Newcastle disease, Newcastle disease virus - an avian paramyxovirus*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, pp 1-22). NDV обладает одноцепочечным РНК геномом с антисмысловой последовательностью и не подвергается рекомбинации с геномом хозяина или другими вирусами (Alexander, DJ (1988). *Newcastle disease, Newcastle disease virus - an avian paramyxovirus*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, pp 1-22). Геномная РНК содержит гены в порядке 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', более подробно описанные ниже. Два дополнительных белка V и W продуцируются NDV на матрице гена Р в результате трансляции альтернативных мРНК, которые синтезируются путем редактирования РНК. Геномная РНК также содержит лидерную последовательность на 3'-конце.

Структурные элементы вириона включают вирусную оболочку, которая представляет собой липидный бислой, образуемый из клеточной цитоплазматической мембраны. Гликопротеин гемагглютини-нейраминидаза (HN) выступает из оболочки, позволяя вирусу обладать как гемагглютининовой (например, рецепторсвязывающей/фузогенной), так и нейраминидазной активностью. Гликопротеин слияния (F), который также взаимодействует с вирусной мембраной, сначала синтезируется в виде неактивного предшественника, а затем посттрансляционно расщепляется с образованием двух полипептидов, связанных дисульфидной связью. Активный белок F участвует в проникновении NDV в клетки хозяина, облегчая слияние вирусной оболочки с цитоплазматической мембраной клетки хозяина. Матриксный белок (М) принимает участие в сборке вируса и взаимодействует как с вирусной мембраной, так и с нуклеокапсидными белками.

Основной белковой субъединицей нуклеокапсида является нуклеокапсидный белок (NP), который придает капсиду спиралевидную симметрию. С нуклеокапсидом связаны белки Р и L. Считается, что фосфопротеин (Р), который подвергается фосфорилированию, играет регуляторную роль в транскрипции, и также может быть вовлечен в метилирование, фосфорилирование и полиаденилирование. Ген L, который кодирует РНК-зависимую РНК полимеразу, необходим для синтеза вирусной РНК вместе с белком Р. Белок L, который занимает почти половину кодирующей емкости вирусного генома, является самым большим из вирусных белков и играет важную роль, как в транскрипции, так и в репликации. Было показано, что белок V ингибирует интерферон-альфа и способствует вирулентности NDV (Huang et al. (2003). *Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an Alpha Interferon Antagonist*. *Journal of Virology* 77: 8676-8685).

Сообщалось, что встречающийся в природе NDV является эффективным онколитическим агентом в различных животных моделях опухолей (Sinkovics, JG, and Horvath, JC (2000). *Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains*. *J Clin Virol* 16: 1-15; Zamarin et al., 2009; *Mol Ther* 17: 697; Elankumaran et al, 2010; *J Virol* 84: 3835; Schirmacher et al, 2009; *Methods Mol Biol* 542: 565; Bart et al, 1973; *Nat New Biol* 245: 229). Встречающиеся в природе штаммы NDV использовались в нескольких клинических испытаниях для лечения находящихся на поздних стадиях раковых опухолей человека (Sinkovics, JG, and Horvath, JC (2000). *Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains*. *J Clin Virol* 16: 1-15; Lorence et al. (2007). *Phase I clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus*. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 157-167; Hotte et al. (2007). *An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701*. *Clin Cancer Res* 13: 977-985; Freeman et al. (2006). *Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme*. *Mol Ther* 13: 221-228; Pecora et al. (2002). *Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers*. *J Clin Oncol* 20: 2251-2266; Csatory et al. (2004). *MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas*. *J Neurooncol* 67: 83-93). Однако успех от применения встречающихся в природе штаммов NDV для лечения находящихся на поздних стадиях раковых опухолей человека в этих клинических исследованиях был лишь незначительным (Hotte et al. (2007). *An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701*. *Clin Cancer Res* 13: 977-985; Freeman et al. (2006). *Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme*. *Mol Ther* 13: 221-228; Pecora et al. (2002). *Phase I*

trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. J Clin Oncol 20: 2251-2266). Таким образом, сохраняется потребность в основанной на NDV терапии, пригодной для лечения рака, особенно рака на поздней стадии.

3. Сущность изобретения

В одном аспекте в настоящем описании предложены гибридные вирусы болезни Ньюкасла (NDV), сконструированные таким образом, что они экспрессируют агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки. В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, где этот агонист экспрессируется. В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, где этот агонист экспрессируется.

В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и мутированный белок F, который делает NDV высоко фузогенным, где агонист и мутированный белок F экспрессируются. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и мутированный белок F с мутированным сайтом расщепления, где агонист и мутированный белок F экспрессируются. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридные NDV, экспрессирующие мутированный белок F, обладают повышенной фузогенной активностью по сравнению с соответствующим вирусом, экспрессирующим такой же белок F, но без мутаций в сайте расщепления. В другом конкретном варианте осуществления изобретения модифицированный белок F включен в вирион.

В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки и мутированный белок F, который делает NDV высоко фузогенным, где антагонист и мутированный белок F экспрессируются. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки и мутированный белок F с мутированным сайтом расщепления, где антагонист и мутированный белок F экспрессируются. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридные NDV, экспрессирующие мутированный белок F, обладают повышенной фузогенной активностью по сравнению с соответствующим вирусом, экспрессирующим такой же белок F, но без мутаций в сайте расщепления. В другом конкретном варианте осуществления изобретения модифицированный белок F включен в вирион.

В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и цитокин (например, интерлейкин (IL)-2), где агонист и цитокин экспрессируются. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, цитокин (например, IL-2) и мутированный белок F, который делает NDV высоко фузогенным, где агонист, цитокин и мутированный белок F экспрессируются. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, цитокин (например, IL-2) и мутированный белок F с мутированным сайтом расщепления, где агонист, цитокин и мутированный белок F экспрессируются. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридные NDV, экспрессирующие мутированный белок F с мутированным сайтом расщепления, являются высоко фузогенными. В другом конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион.

В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки и цитокин (например, IL-2), где антагонист и цитокин экспрессируются. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, цитокин (например, IL-2) и мутированный белок F, который делает NDV высоко фузогенным, где антагонист, цитокин и мутированный белок F экспрессируются. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, цитокин (например, IL-2) и мутированный белок F с мутированным сайтом расщепления, где антагонист, цитокин и мутированный белок F экспрессируются. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридные NDV, экспрессирующие мутированный белок F с мутированным сайтом расщепления, являются высоко фузогенными. В другом конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки представляет собой агонист костимулирующего рецептора, экспрессируемого иммун-

ной клеткой. Конкретные примеры костимулирующих рецепторов включают глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR), индуцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS или CD278), OX40 (CD134), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), CD40, CD226, молекулу цитотоксических и регуляторных Т-клеток (CRTAM), рецептор смерти 3 (DR3), рецептор лимфотоксина-бета (LTBR), трансмембранный активатор и партнер CAML (TACI), рецептор фактора активации В-клеток (BAFFR) и белок созревания В-клеток (BCMA). В конкретном варианте осуществления изобретения агонист костимулирующего рецептора, экспрессируемого иммунной клеткой, представляет собой антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) или лиганд, который специфично связывается с костимулирующим рецептором. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой фрагмент scFv. В конкретном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой биспецифичное антитело, которое связывается с двумя рецепторами на иммунной клетке. В одном варианте осуществления изобретения биспецифичное антитело связывается с рецептором на иммунной клетке и другим рецептором на раковой клетке. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд или антитело представляет собой гибридный белок, содержащий белок F NDV или его фрагмент, или белок HN NDV или его фрагмент. Способы получения таких гибридных белков известны из уровня техники. См., например, публикацию заявки на патент США № 2012-0122185, раскрытие которой включено в настоящую заявку путем ссылки полностью. См., также работы Park et al., PNAS 2006; 103: 8203-8 и Murawski et al, J Virol 2010; 84: 1110-23, раскрытие которых включено в настоящую заявку путем ссылки полностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд или антитело экспрессируется в виде гибридного белка F или слитого белка F NDV, где гибридный белок F или слитый белок F NDV содержит цитоплазматический и трансмембранный домены или их фрагменты гликопротеина F NDV, и внеклеточный домен содержит лиганд или антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд экспрессируется в виде гибридного белка HN или слитого белка HN NDV, где гибридный белок HN или слитый белок HN NDV содержит трансмембранный и внеклеточный домены или их фрагменты гликопротеина HN NDV, и внеклеточный домен содержит лиганд или антитело. В конкретном варианте осуществления изобретения лиганд или антитело экспрессируется в виде гибридного белка, как описано ниже в разделе 7 в примере 2.

В конкретном варианте осуществления изобретения антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки представляет собой антагонист ингибиторного рецептора, экспрессируемого иммунной клеткой. Конкретные примеры ингибиторных рецепторов включают антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4 или CD52), белок программируемой клеточной смерти 1 (PD1 или CD279), аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров (KIR), ген активации лимфоцитов 3 (LAG3), Т-клеточный мембранный белок 3 (TIM3), рецептор аденозина A2a (A2aR), Т-клеточный иммунорецептор с иммуноглобулиновым и ITIM доменами (TIGIT), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1) и CD160. В конкретном варианте осуществления изобретения антагонист ингибиторного рецептора, экспрессируемого иммунной клеткой, представляет собой антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), который специфично связывается с костимулирующим рецептором. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой фрагмент scFv. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антагонист ингибиторного рецептора представляет собой растворимый рецептор или антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), который специфично связывается с лигандом ингибиторного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой гибридный белок, содержащий белок F NDV или его фрагмент, или белок HN NDV или его фрагмент. См., например, публикацию заявки на Патент США № 2012-0122185, работы Park et al., PNAS 2006; 103: 8203-8 и Murawski et al, J Virol 2010; 84: 1110-23, каждая из которых включена в настоящую заявку путем ссылки полностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело экспрессируется в виде гибридного белка F или слитого белка F NDV, где гибридный белок F или слитый белок F NDV содержит цитоплазматический и трансмембранный домены или их фрагменты гликопротеина F NDV, и внеклеточный домен содержит антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело экспрессируется в виде гибридного белка HN или слитого белка HN NDV, где гибридный белок HN или слитый белок HN NDV содержит трансмембранный и внутриклеточный домены или их фрагменты гликопротеина HN NDV, и внеклеточный домен содержит антитело.

В другом аспекте в настоящем описании предложены способы размножения описанных в настоящем описании NDV (например, описанных в настоящем описании гибридных NDV). Описанные в настоящем описании NDV (например, описанные в настоящем описании гибридные NDV) могут быть размножены в любых клетках, субъектах, тканях или органах, восприимчивых к инфекции NDV. В одном варианте осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV (например, описанные в настоящем описании гибридные NDV) могут быть размножены в клеточной линии. В другом варианте

осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV (например, описанные в настоящем описании гибридные NDV) могут быть размножены в раковых клетках. В другом варианте осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV (например, описанные в настоящем описании гибридные NDV) могут быть размножены в эмбрионированном яйце. В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложены изолированные клетки, такни или органы, инфицированные описанным в настоящем описании NDV (например, описанным в настоящем описании гибридным NDV). См., например, Раздел 5.4 ниже, где приводятся примеры клеток, животных и яиц, которые инфицируют описанным в настоящем описании NDV (например, описанным в настоящем описании гибридным NDV). В конкретных вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложены изолированные раковые клетки, инфицированные описанным в настоящем описании NDV (например, описанным в настоящем описании гибридным NDV). В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложены клеточные линии, инфицированные описанным в настоящем описании NDV (например, описанным в настоящем описании гибридным NDV). В других вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложены эмбрионированные яйца, инфицированные описанным в настоящем описании NDV (например, описанным в настоящем описании гибридными NDV).

В другом аспекте в настоящем описании предложены композиции, содержащие описанный в настоящем описании NDV (например, описанный в настоящем описании гибридный NDV). В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие описанный в настоящем описании NDV (например, описанный в настоящем описании гибридный NDV) и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие раковые клетки, инфицированные описанным в настоящем описании NDV (например, описанным в настоящем описании гибридным NDV), и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретных вариантах осуществления изобретения раковые клетки перед введением в фармацевтическую композицию обрабатывают гамма-излучением. В конкретных вариантах осуществления изобретения раковые клетки обрабатывают гамма-излучением перед инфицированием NDV (например, гибридным NDV). В других конкретных вариантах осуществления изобретения раковые клетки обрабатывают гамма-излучением после инфицирования NDV (например, гибридным NDV). В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие белковый концентрат из лизированных раковых клеток, инфицированных NDV, (например, раковых клеток, инфицированных гибридным NDV), и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте в настоящем описании предложены способы получения фармацевтических композиций, содержащих описанный в настоящем описании NDV (например, описанный в настоящем описании гибридный NDV). В одном варианте осуществления изобретения способ получения фармацевтических композиций включает: (a) размножение описанного в настоящем описании NDV (например, описанного в настоящем описании гибридного NDV) в клеточной линии, которая восприимчива к инфекции NDV; и (b) сбор потомства вируса, где вирус выращивается до достаточных количеств и в подходящих условиях, которые обеспечивают чистоту вируса от контаминации, так что потомство вируса пригодно для включения его в рецептуру фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления изобретения способ получения фармацевтических композиций включает: (a) размножение описанного в настоящем описании NDV (например, описанного в настоящем описании гибридного NDV) в эмбрионированном яйце; и (b) сбор потомства вируса, где вирус выращивается до достаточных количеств и в подходящих условиях, которые обеспечивают чистоту вируса от контаминации, так что потомство вируса пригодно для включения его в рецептуру фармацевтической композиции.

В другом аспекте в настоящем описании предложены способы лечения рака с использованием описанного в настоящем описании гибридного NDV (например, гибридного NDV, описанного ниже в разделе 5.2) или композиции, содержащей такой гибридный NDV. В конкретном варианте осуществления изобретения способ лечения рака включает инфицирование раковой клетки у субъекта описанным в настоящем описании гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным ниже в разделе 5.2) или его композицией. В другом варианте осуществления изобретения способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом субъекту описанного в настоящем описании гибридного NDV (например, гибридного NDV, описанного ниже в разделе 5.2) или его композиции. В конкретных вариантах осуществления изобретения эффективное количество описанного в настоящем описании гибридного NDV (например, гибридного NDV, описанного ниже в разделе 5.2) или композиции, содержащей эффективное количество описанного в настоящем описании гибридного NDV, вводится субъекту для лечения рака. В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный NDV содержит геном, этот геном содержит агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки (например, агонист костимулирующего рецептора иммунной клетки) и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки (например, антагонист ингибиторного рецептора иммунной клетки). В некоторых вариантах осуществления изобретения геном NDV также содержит мутированный белок F. В некоторых вариантах осуществления изобретения два или более гибридных NDV вводятся субъекту для лечения рака.

В другом варианте осуществления изобретения способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом субъекту раковых клеток, инфицированных описанным в настоящем описании гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным ниже в разделе 5.2), или их композиции. В конкретных вариантах осуществления изобретения раковые клетки обрабатывают гамма-излучением перед введением их субъекту или включением в состав композиции. В другом варианте осуществления изобретения способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом субъекту белкового концентрата или фрагментов цитоплазматической мембраны раковых клеток, инфицированных гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным ниже в разделе 5.2), или их композиции. В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный NDV содержит геном, этот геном содержит агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки (например, агонист костимулирующего рецептора иммунной клетки) и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки (например, антагонист ингибиторного рецептора иммунной клетки). В некоторых вариантах осуществления изобретения геном NDV также содержит мутированный белок F.

В другом аспекте в настоящем описании предложены способы лечения рака с использованием описанного в настоящем описании NDV (например, гибридного NDV, такого как описан ниже в разделе 5.2) или композиции, содержащей такой NDV, в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии. В одном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту описанного в настоящем описании NDV (например, гибридного NDV, такого как описан ниже в разделе 5.2) и одного или нескольких других видов терапии. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту эффективного количества описанного в настоящем описании NDV или композиции, содержащей эффективное количество описанного в настоящем описании NDV, и одного или нескольких других видов терапии. NDV и один или несколько других видов терапии могут вводиться субъекту одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV и один или несколько других видов терапии вводятся в составе одной композиции. В других вариантах осуществления изобретения NDV и один или несколько других видов терапии вводятся в составе различных композиций. NDV и один или несколько других видов терапии могут вводиться субъекту одним и тем же или различными путями введения.

Любой тип или штамм NDV может использоваться в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, включая без ограничений встречающиеся в природе штаммы, варианты или мутанты, мутагенизированные вирусы, реассортанты и/или генноинженерные вирусы. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии, представляет собой встречающийся в природе штамм. В другом варианте осуществления изобретения NDV, используемый в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии, представляет собой гибридный NDV. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV содержит упакованный геном, этот геном содержит цитокин (например, IL-2, IL-7, IL-15, IL-17 или IL-21). В конкретных вариантах осуществления изобретения этот цитокин экспрессируется клетками, инфицированными гибридным NDV. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV содержит упакованный геном, этот геном содержит опухолевый антиген. В конкретных вариантах осуществления изобретения этот опухолевый антиген экспрессируется клетками, инфицированными гибридным NDV. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV содержит упакованный геном, этот геном содержит проапоптозную молекулу или антиапоптозную молекулу. В конкретных вариантах осуществления изобретения этот проапоптозная молекула или антиапоптозная молекула экспрессируется клетками, инфицированными гибридным NDV.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV содержит упакованный геном, этот геном содержит агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки (например, агонист костимулирующего рецептора иммунной клетки) и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки (например, антагонист ингибиторного рецептора иммунной клетки). В конкретных вариантах осуществления изобретения агонист и/или антагонист экспрессируются клетками, инфицированными гибридным NDV. В некоторых вариантах осуществления изобретения геном NDV также содержит мутированный белок F. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько других видов терапии, используемых в комбинации с описанным в настоящем описании NDV, представляют собой один или несколько других видов терапии, описанных ниже в разделе 5.6.4. В конкретных вариантах осуществления один или несколько других видов терапии, используемых в комбинации с описанным в настоящем описании NDV, представляют собой агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки (см., например, раздел 5.6.4.1 ниже). Примеры агонистов костимулирующего сигнала иммунной клетки и антагонистов ингибирующего сигнала иммунной клетки приведены, например, ниже в разделе 5.2.1. В конкретном варианте осуществления изобретения антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки представляет собой анти-CTLA-4-антитело, описанное ниже в разделах 6 и 7. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки представляет собой анти-PD-1-антитело или анти-PD-L1-антитело, описанные ниже в разделе 7. В другом конкретном варианте осуществления изобре-

ния агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки представляет собой лиганд ICOS, описанный ниже в разделах 6 и 7.

3.1. Терминология

Используемый в настоящем описании термин "примерно" или "приблизительно", когда он употребляется по отношению к числовому значению, относится к любому числу, отличающемуся от этого числового значения на 1,5-10%.

Используемый в настоящем описании термин "агонист(ы)" относится к молекуле(ам), которая связывается с другой молекулой и вызывает биологическую реакцию. В конкретном варианте осуществления изобретения агонист представляет собой молекулу, которая связывается с рецептором на клетке и запускает один или несколько путей передачи сигнала. Например, агонист включает антитело или лиганд, который связывается с рецептором на клетке и активирует один или несколько путей передачи сигнала. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или лиганд связываются с рецептором на клетке и активирует один или несколько путей передачи сигнала. В других вариантах осуществления изобретения агонист облегчает взаимодействие нативного лиганда с нативным рецептором.

Используемый в настоящем описании термин "антагонист(ы)" относится к молекуле(ам), которая ингибирует действие другой молекулы, но сама по себе не вызывает биологическую реакцию. В конкретном варианте осуществления изобретения антагонист представляет собой молекулу, которая связывается с рецептором на клетке и блокирует или тормозит биологическую активность агониста. Например, антагонист включает антитело или лиганд, который связывается с рецептором на клетке и блокирует или замедляет связывание нативного лиганда с клеткой, не вызывая активации одного или нескольких путей передачи сигнала. Другой пример антагониста включает антитело или растворимый рецептор, который конкурирует с нативным рецептором на клетках за связывание с нативным лигандом, и таким образом блокирует или тормозит активацию одного или нескольких путей передачи сигнала, возникающую при связывании нативного рецептора с нативным лигандом.

Используемые в настоящем описании термины "антитело" и "антитела" относятся к молекулам, которые содержат антигенсвязывающий сайт, например, иммуноглобулины. Антитела включают без ограничений моноклональные антитела биспецифичные антитела, мультиспецифичные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, синтетические антитела, гибридные антитела, поликлональные антитела, однодоменные антитела, камелизированные антитела, одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, связанные дисульфидной связью биспецифичные Fv-фрагменты (sdFv), внутриклеточные антитела и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id и анти-анти-Id антитела к антителам) и эпитопсвязывающие фрагменты любого из вышеуказанных антител. В частности, антитела включают молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулинов. Молекулы иммуноглобулинов могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. В конкретном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело или фрагмент scFv. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело или фрагмент scFv. В других конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой биспецифичное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифичное антитело специфично связывается с костимулирующим рецептором иммунной клетки или ингибиторным рецептором иммунной клетки и рецептором на раковой клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифичное антитело специфично связывается с двумя рецепторами на иммунных клетках, например, двумя костимулирующими рецепторами на иммунных клетках, двумя ингибиторными рецепторами на иммунных клетках, или одним костимулирующим рецептором на иммунных клетках и одним ингибиторным рецептором на иммунных клетках.

Используемый в настоящем описании термин "производное" в отношении белков или полипептидов относится к (a) полипептиду, который по меньшей мере на 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, или от 40 до 65%, от 50 до 90%, от 65 до 90%, от 70 до 90%, от 75 до 95%, от 80 до 95% или от 85 до 99% идентичен нативному полипептиду; (b) полипептиду, кодируемому последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, или от 40 до 65%, от 50 до 90%, от 65 до 90%, от 70 до 90%, от 75 до 95%, от 80 до 95% или от 85 до 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей нативный полипептид; (c) полипептиду, который содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более, или от 2 до 5, от 2 до 10, от 5 до 10, от 5 до 15, от 5 до 20, от 10 до 15 или от 15 до 20 аминокислотных мутаций (т.е., вставок, делеций и/или замен) по сравнению с нативным полипептидом; (d) полипептиду, кодируемому последовательностью нуклеиновой кислоты, которая может гибридизоваться в условиях гибридизации высокой, средней или обычной жесткости с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей нативный полипептид; (e) полипептиду, кодируемому последовательностью нуклеиновой кислоты, которая может гибридизоваться в условиях гибридизации высокой, средней или обычной жесткости с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей фрагмент нативного полипептида, со-

стоящий по меньшей мере из 10 следующих друг за другом аминокислот, по меньшей мере из 12 следующих друг за другом аминокислот, по меньшей мере из 15 следующих друг за другом аминокислот, по меньшей мере из 20 следующих друг за другом аминокислот, по меньшей мере из 30 следующих друг за другом аминокислот, по меньшей мере из 40 следующих друг за другом аминокислот, по меньшей мере из 50 следующих друг за другом аминокислот, по меньшей мере из 75 следующих друг за другом аминокислот по меньшей мере из 100 следующих друг за другом аминокислот, по меньшей мере из 125 следующих друг за другом аминокислот, по меньшей мере из 150 следующих друг за другом аминокислот или от 10 до 20, от 20 до 50, от 25 до 75, от 25 до 100, от 25 до 150, от 50 до 75, от 50 до 100, от 75 до 100, от 50 до 150, от 75 до 150, от 100 до 150 или от 100 до 200 следующих друг за другом аминокислот; или (f) фрагменту нативного полипептида. Производные также включают полипептид, который содержит аминокислотную последовательность встречающейся в природе зрелой формы полипептида млекопитающих и аминокислотную последовательность гетерологичного сигнального пептида. Кроме того, производные включают полипептиды, которые были химически модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгилирования, фосфорилирования, амидирования, получения производных при помощи известных защищающих/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другой белковой молекулой и т.п. Кроме того, производные включают полипептиды, содержащие одну или несколько неклассических аминокислот. В одном варианте осуществления изобретения производное является выделенным. В конкретных вариантах осуществления изобретения производное сохраняет одну или несколько функций того нативного полипептида, из которого оно было получено.

Процент идентичности может быть определен любым способом, известным специалисту в данной области техники. В конкретном варианте осуществления изобретения процент идентичности определяют при помощи программы "Best Fit" или "Gap", входящей в пакет программ для анализа последовательностей (Version 10; Genetics Computer Group, Inc., University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wisconsin). Информация, касающаяся условий гибридизации (например, условий высокой, средней и обычной жесткости), была опубликована, см., например, публикацию заявки на Патент США № US2005/0048549 (например, параграфы 72-73).

Используемый в настоящем описании термин "фрагмент" в отношении фрагмента белкового агента (например, белка) относится к фрагменту, который состоит из 8 или более следующих друг за другом аминокислот, 10 или более следующих друг за другом аминокислот, 15 или более следующих друг за другом аминокислот, 20 или более следующих друг за другом аминокислот, 25 или более следующих друг за другом аминокислот, 50 или более следующих друг за другом аминокислот, 75 или более следующих друг за другом аминокислот, 100 или более следующих друг за другом аминокислот, 150 или более следующих друг за другом аминокислот, 200 или более следующих друг за другом аминокислот, или количество аминокислот в котором находится в диапазоне от 10 до 300 следующих друг за другом аминокислот, от 10 до 200 следующих друг за другом аминокислот, от 10 до 250 следующих друг за другом аминокислот, от 10 до 150 следующих друг за другом аминокислот, от 10 до 100 следующих друг за другом аминокислот, от 10 до 50 следующих друг за другом аминокислот, от 50 до 100 следующих друг за другом аминокислот, от 50 до 150 следующих друг за другом аминокислот, от 50 до 200 следующих друг за другом аминокислот, от 50 до 250 следующих друг за другом аминокислот, от 50 до 300 следующих друг за другом аминокислот, от 25 до 50 следующих друг за другом аминокислот, от 25 до 75 следующих друг за другом аминокислот, от 25 до 100 следующих друг за другом аминокислот или от 75 до 100 следующих друг за другом аминокислот белкового агента. В конкретном варианте осуществления изобретения фрагмент белкового агента сохраняет одну или несколько функций белкового агента, другими словами, он является функциональным фрагментом. Например, фрагмент белкового агента сохраняет способность взаимодействовать с другим белком и/или индуцировать, усиливать или активировать один или несколько путей передачи сигнала.

Используемый в настоящем описании термин "функциональный фрагмент" в отношении белкового агента относится к части белкового агента, которая сохраняет одну или несколько активностей или функций белкового агента. Например, функциональный фрагмент ингибиторного рецептора может сохранять способность связываться с одним или несколькими из его лигандов. Функциональный фрагмент лиганда костимулирующего рецептора может сохранять способность связываться с рецептором и/или индуцировать, усиливать или активировать один или несколько путей передачи сигнала, опосредуемых связыванием лиганда со своим костимулирующим рецептором.

Используемый в настоящем описании термин "гетерологичный" относится к чему-либо не встречающемуся в природе, что связано (например, кодируется и/или экспрессируется геномом) с встречающимся в природе NDV.

Используемый в настоящем описании термин "пожилой человек" относится к человеку, имеющему возраст 65 лет или старше.

Используемый в настоящем описании термин "взрослый человек" относится к человеку, имеющему возраст 18 лет или старше.

Используемый в настоящем описании термин "ребенок" относится к человеку, имеющему возраст

от 1 года до 18 лет.

Используемый в настоящем описании термин "маленький ребенок" относится к человеку, имеющему возраст от 1 года до 3 лет.

Используемый в настоящем описании термин "младенец" относится к новорожденному человеку и человеку, находящемуся в возрасте до 1 года.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используемые в настоящем описании термины "высоко фузогенный" и "повышенная фузогенная активность" и тому подобное относятся к увеличению способности NDV образовывать синцитии, включающие большое количество клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки, инфицированные описанным в настоящем описании NDV, который сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F, обладают повышенной способностью образовывать синцитии, по сравнению с клетками, инфицированными исходным вирусом, из которого этот вирус был получен, где исходный вирус имеет немутированный белок F. В другом конкретном варианте осуществления изобретения на от примерно 10% до примерно 25%, от примерно 25% до примерно 50%, от примерно 25% до примерно 75%, от примерно 50% до примерно 75%, от примерно 50% до примерно 95% или от примерно 75% до примерно 99%, или примерно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% больше клеток, инфицированных описанным в настоящем описании NDV, который сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F, образуют синцитии, по сравнению с количеством образующих синцитии клеток, инфицированных исходным вирусом, из которого гибридный вирус был получен, где исходный вирус имеет немутированный белок F. В некоторых вариантах осуществления изобретения количественный анализ синцитиев проводят при помощи микроскопии путем подсчета количества ядер на синцитий через определенный период времени (например, от примерно 8 ч до примерно 12 ч, от примерно 12 ч до примерно 24 ч, от примерно 24 ч до примерно 36 ч или от примерно 36 ч до примерно 48 ч).

Используемый в настоящем описании термин "антагонист интерферона" относится к агенту, который уменьшает или ингибирует клеточный иммунный ответ, происходящий с участием интерферона. В одном варианте осуществления изобретения антагонист интерферона представляет собой белковый агент, который уменьшает или ингибирует клеточный иммунный ответ, происходящий с участием интерферона. В конкретном варианте осуществления изобретения антагонист интерферона представляет собой вирусный белок или полипептид, который уменьшает или ингибирует клеточный ответ, происходящий с участием интерферона.

В конкретном варианте осуществления изобретения антагонист интерферона представляет собой агент, который уменьшает или ингибирует экспрессию и/или активность интерферона. В одном варианте осуществления изобретения антагонист интерферона уменьшает или ингибирует экспрессию и/или активность IFN типа I. В другом варианте осуществления изобретения антагонист интерферона уменьшает или ингибирует экспрессию и/или активность IFN типа II. В другом варианте осуществления изобретения антагонист интерферона уменьшает или ингибирует экспрессию и/или активность IFN типа III. В конкретном варианте осуществления изобретения антагонист интерферона уменьшает или ингибирует экспрессию и/или активность или IFN- α , или IFN- β , или их обоих. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антагонист интерферона уменьшает или ингибирует экспрессию и/или активность IFN- γ . В другом варианте осуществления изобретения антагонист интерферона уменьшает или ингибирует экспрессию и/или активность одного, двух или всех из IFN- α , IFN- β и IFN- γ .

В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия и/или активность IFN- α , IFN- β и/или IFN- γ в эмбрионированном яйце или клетке уменьшается антагонистом интерферона от приблизительно 1 до приблизительно 100 раз, от приблизительно 5 до приблизительно 80 раз, от приблизительно 20 до приблизительно 80 раз, от приблизительно 1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 40 до приблизительно 80 раз, или в 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз, по сравнению с экспрессией и/или активностью IFN- α , IFN- β и/или IFN- γ в контрольных эмбрионированном яйце или клетке, не экспрессирующих или не контактирующих с таким антагонистом интерферона, при измерении способами, описанными в настоящем описании или известными специалисту в данной области техники. В других вариантах осуществления изобретения экспрессия и/или активность IFN- α , IFN- β и/или IFN- γ в эмбрионированном яйце или клетке уменьшается антагонистом интерферона на по меньшей мере от 20 до 25%, по меньшей мере от 25 до 30%, по меньшей мере от 30 до 35%, по меньшей мере от 35 до 40%, по меньшей мере от 40 до 45%, по меньшей мере от 45 до 50%, по меньшей мере от 50 до 55%, по меньшей мере от 55 до 60%, по меньшей мере от 60 до 65%, по меньшей мере от 65 до 70%, по меньшей мере от 70 до 75%, по меньшей мере от 75 до 80%, по меньшей мере от 80 до 85%, по меньшей мере от 85 до 90%, по меньшей мере от 90 до 95%, по меньшей мере от 95 до 99% или на 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, или 99% по сравнению с экспрессией и/или активностью IFN- α , IFN- β и/или IFN- γ в контрольных эмбрионированном яйце или клетке, не экспрессирующих или не контактирующих с таким антагонистом интерферона, при измерении способами, описанными в настоящем описании или известными специалисту в данной области техники.

Используемые в настоящем описании термины "NDV-дефицитные системы" или "NDV-дефицитные субстраты" относятся к системам, например, клеткам, клеточным линиям, и животным, таким как мыши, куры, индейки, кролики, крысы, лошади и т.п., которые не продуцируют один, два или более типов IFN, или не продуцируют никакой из типов IFN, или продуцируют низкие уровни одного, двух, или более типов IFN, или продуцируют низкие уровни любого IFN (т.е., уменьшение экспрессии любого IFN на 5-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% или более по сравнению с NDV-компетентными системами в тех же условиях), не отвечают или отвечают менее эффективно на один, два или более типов IFN, или не отвечают на любой из типов IFN, имеют задержанный ответ на один, два или более типов IFN, и/или являются дефицитными по активности антивирусных генов, индуцируемой одним, двумя или более типами IFN, или индуцируемой IFN любого типа.

Используемые в настоящем описании термины "иммуноспецифично связывается", "иммуноспецифично распознает", "специфично связывается" и "специфично распознает" являются аналогичными по отношению к антителам и относятся к молекулам, которые специфично связываются с антигеном (например, эпитопом или иммунным комплексом), что понятно специалисту в данной области техники. Молекула, которая специфично связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами с более низкой аффинностью, определяемой, например, методами иммуноанализа (например, ELISA), поверхностного плазмонного резонанса (например, BIAcore®), анализа кинетического исключения (например, при помощи прибора KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID)), или другими методами анализа, известными из уровня техники. В конкретном варианте осуществления изобретения молекулы, которые специфично связываются с антигеном, связываются с антигеном с константой диссоциации (т.е. K_a), которая по меньшей мере на 2 log, 2,5 log, 3 log, 3,5 log, 4 log или более log больше, чем K_a при связывании этих молекул с другим антигеном. В другом конкретном варианте осуществления изобретения молекулы, которые специфично связываются с антигеном, не реагируют перекрестно с другими белками.

Используемый в настоящем описании термин "моноклональное антитело" является термином из данной области техники и, как правило, относится к антителу, полученному из популяции гомогенных или практически гомогенных антител, и каждое моноклональное антитело, как правило, будет распознавать один эпитоп (например, один конформационный эпитоп) антигена.

Используемый в настоящем описании термин "множественность заражения" или "MOI" означает среднее количество вируса на инфицированную клетку. MOI определяют путем деления количества добавленного вируса (добавленные мл $\times$ БОЕ) на количество добавленных клеток (добавленные мл $\times$ клетки/мл).

Используемый в настоящем описании термин "нативный лиганд" относится к любому природному лиганду, который связывается с природным рецептором. В конкретном варианте осуществления изобретения лиганд представляет собой лиганд млекопитающих. В другом конкретном варианте осуществления изобретения лиганд представляет собой лиганд человека.

Используемый в настоящем описании термин "нативный полипептид(ы)" по отношению к белкам или полипептидам относится к любой природной аминокислотной последовательности, включая незрелые или предшественники и зрелые формы белка. В конкретных вариантах осуществления изобретения нативный полипептид представляет собой белок или полипептид человека.

Используемый в настоящем описании термин "нативный рецептор" относится к любому природному рецептору, который связывается с природным лигандом. В конкретном варианте осуществления изобретения рецептор представляет собой рецептор млекопитающих. В другом конкретном варианте осуществления изобретения рецептор представляет собой рецептор человека.

Используемые в настоящем описании термины "субъект" или "пациент" являются взаимозаменяемыми. Используемые в настоящем описании термины "субъект" и "субъекты" относятся к животному. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой млекопитающее, включая неprimатов (например, верблюд, осел, зебра, корова, лошадь, кошка, собака, крыса и мышь) и приматов (например, не человекообразная обезьяна, шимпанзе и человек). В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой не являющееся человеком млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой домашнее животное (например, собака или кошка) или сельскохозяйственное животное (например, лошадь, свинья или корова). В других вариантах осуществления изобретения субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления изобретения млекопитающее (например, человек) имеет возраст от 0 до 6 месяцев, от 6 до 12 месяцев, от 1 до 5 лет, от 5 до 10 лет, от 15 до 20 лет, от 20 до 25 лет, от 25 до 30 лет, от 30 до 35 лет, от 35 до 40 лет, от 40 до 45 лет, от 45 до 50 лет, от 50 до 55 лет, от 55 до 60 лет, от 60 до 65 лет, от 65 до 70 лет, от 70 до 75 лет, от 75 до 80 лет, от 80 до 85 лет, от 85 до 90 лет, от 90 до 95 лет или от 95 до 100 лет. В конкретных вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой животное, которое не является птицей.

Используемые в настоящем описании термины "лечить" и "лечение", употребляемые по отношению к введению терапии, относятся к лечению/терапии, от которого субъект получает благотворный эффект,

такой как уменьшение, снижение, аттенуация, ослабление, стабилизация, ремиссия, подавление, ингибирование или угнетение развития или прогрессирования рака или его симптомов. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение/терапия, которое получает субъект, приводит по меньшей мере к одному или нескольким из следующих эффектов:

- (i) уменьшение или облегчение степени тяжести рака и/или связанного с ним симптома;
- (ii) уменьшение продолжительности симптома, связанного с раком;
- (iii) предотвращение рецидива симптома, связанного с раком;
- (iv) обратное развитие рака и/или связанного с ним симптома;
- (v) уменьшение потребности субъекта в госпитализации;
- (vi) сокращение продолжительности госпитализации;
- (vii) повышение выживаемости субъекта;
- (viii) подавление прогрессирования рака и/или связанного с ним симптома;
- (ix) усиление или повышение терапевтического эффекта другой терапии;
- (x) уменьшение или устранение популяции раковых клеток;
- (xi) замедление роста опухоли или новообразования;
- (xii) уменьшение размера опухоли;
- (xiii) уменьшение опухолеобразования;
- (xiv) ликвидация, удаление или контроль первичного, местнораспространенного и/или метастатического рака;
- (xv) уменьшение количества и размера метастаз;
- (xvi) снижение смертности;
- (xvii) повышение коэффициента дожития пациентов после излечения их от рака;
- (xviii) увеличение продолжительности безрецидивного периода жизни;
- (xix) увеличения количества пациентов, находящихся в стадии ремиссии;
- (xx) уменьшение частоты госпитализации;
- (xxi) поддержание размера опухоли и не допущение увеличения размера опухоли или увеличение опухоли в размере менее чем на 5 или 10% после проведения терапии, при измерении стандартными способами, доступными специалисту в данной области техники, таким как МРТ, рентгенография и компьютерная аксиальная томография;
- (xxii) предотвращение развития или возникновения рака и/или связанного с ним симптома;
- (xxiii) увеличение продолжительности ремиссии у пациентов;
- (xxiv) уменьшение количества симптомов, связанных с раком;
- (xxv) увеличение бессимптомного периода жизни у раковых пациентов;
- (xxvi) и/или ограничение или уменьшение метастаз.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение/терапия, которое получает субъект, не приводит к излечению рака, но предотвращает прогрессирование или ухудшение течения заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение/терапия, которое получает субъект, не предотвращает возникновение/развитие рака, но может предотвращать появление симптомов рака.

Используемый в настоящем описании термин "в комбинации", когда он относится к введению терапии(ий) субъекту, относится к применению более чем одной терапии. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором терапии вводятся субъекту. Первая терапия может вводиться до (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно с, или после (например, через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения субъекту второй терапии.

Используемые в настоящем описании термины "терапии" и "терапия" могут относиться к любому протоколу(ам), способу(ам) и/или агенту(ам), которые могут применяться для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения термины "терапии" и "терапия" относятся к биологической терапии, поддерживающей терапии, гормональной терапии, химиотерапии, иммунотерапии и/или другим видам терапии, применимым для лечения рака. В конкретных вариантах осуществления изобретения терапия включает вспомогательную терапию. Например, применение терапии совместно с лекарственной терапией, биологической терапией, хирургическим вмешательством и/или поддерживающей терапией. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин "терапия" относится к описанному в настоящем описании гибриднему NDV. В других вариантах осуществления изобретения термин "терапия" относится к агенту, который не является гибридным NDV.

4. Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Инфекция NDV активирует экспрессию MHC I, MHC II и ICAM-1 на поверхности *in vitro* инфицированных клеток B16-F10 (24 часа после инфицирования).

Фиг. 2A-2E. Внутриопухолевое лечение NDV приводит к инфильтрации макрофагами, NK-клетками, CD8 и CD4⁺ эффекторными клетками и снижает частоту регуляторных Т-клеток (Treg). А) Общая схема эксперимента. В) Общее количество CD45⁺ инфильтратов. С) Общее количество инфильт-

рирующих иммунных клеток. D) Репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии соответствующих CD4 FoxP3+ и FoxP3- субпопуляций. E) Соотношения Teff/Treg и CD8/Treg.

Фиг. 3A-3C. Терапия NDV оказывает благоприятное влияние на опухолевое микроокружение отдаленных опухолей. A) Репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии соответствующих CD4 FoxP3+ и FoxP3- субпопуляций. B) Абсолютное количество CD4 эффекторных, Treg и CD8 клеток на грамм опухоли. C) Соотношения Teff/Treg и CD8/Treg.

Фиг. 4A-4C. Лимфоциты, инфильтрирующие отдаленные опухоли стимулируют экспрессию маркеров активации, лизиса и пролиферации. Соответствующие диаграммы экспрессии в CD4 эффекторных клетках (слева) и соответствующее процентное содержание в CD4 эффекторных клетках, CD8, Treg (справа) показаны для A) CD44, B) гранзима B, и C) Ki-67.

Фиг. 5A-5D. Монотерапия NDV задерживает рост отдаленных опухолей и обеспечивает некоторую защиту от повторного развития опухоли. Двусторонние боковые опухоли получали, как показано на фиг. 2A, и животных лечили и оценивали их выживаемость. A) Рост правых боковых опухолей (подвергавшихся лечению). B) Рост левых боковых опухолей (не подвергавшихся лечению). C) Общая выживаемость. Числа в прямоугольниках показывают процент животных, не имеющих опухолей. D) Выживаемость у животных, излеченных от B6-F10 меланомы при помощи NDV и повторно зараженных клетками меланомы B6-F10 на 75 день. Репрезентативные результаты для двух различных экспериментов с 10 мышами в группе.

Фиг. 6A-6B. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты как из подвергавшихся лечению, так и из не подвергавшихся лечению опухолей активируют CTLA-4 в ответ на терапию NDV. A) Репрезентативные точечные диаграммы экспрессии CTLA-4 в CD8, CD4 эффекторах и Tregs в правых (подвергавшихся лечению) опухолях. B) Репрезентативные точечные диаграммы экспрессии CTLA-4 в CD8, CD4 эффекторах и Tregs в левых (не подвергавшихся лечению) опухолях.

Фиг. 7A-7C. Комбинированная терапия NDV и блокаторами CTLA-4 усиливает противоопухолевый эффект в инъецированных и отдаленных опухолях. Двусторонние боковые опухоли B16 получали и животных лечили, как показано на фиг. 2A, с применением и без применения анти-CTLA-4-антител 9H10. A) Рост подвергавшихся лечению опухолей. B) Рост отдаленных опухолей. Числа в прямоугольниках показывают процент мышей, не имеющих опухолей. C) Долгосрочная выживаемость. Репрезентативные результаты для двух различных экспериментов с 10 мышами в группе.

Фиг. 8. Комбинированная терапия NDV и анти-CTLA-4-антителами является системно эффективной против не чувствительных к вирусу опухолей предстательной железы TRAMP. Правые (день 12) и левые (день 3) боковые опухоли получали и животных лечили NDV, как показано на фиг. 2A, с применением и без применения системных анти-CTLA-4-антител. Показан рост левых боковых (не подвергавшихся лечению) опухолей. Числа в прямоугольниках показывают процент животных, не имеющих опухолей.

Фиг. 9A-9C. Инфекция NDV активирует экспрессию PD-L1 в опухолях B16-F10. A) Экспрессия PD-L1 на поверхности клеток B16-F10, инфицированных NDV через 24 ч. B) Экспрессия PD-L1 на поверхности клеток B16-F10, обработанных УФ-инактивированным супернатантом из инфицированных клеток B16-F10. C) Активация PD-L1 на поверхности опухолевых клеток, выделенных из инфицированных и отдаленных опухолей, полученных от животных, которых лечили как показано на фиг. 2A (2 левых изображения - репрезентативные диаграммы проточной цитометрии, правое изображение - вычисленные средние значения для 5 мышей в группе).

Фиг. 10A-10F. Комбинированная терапия NDV и анти-PD-1-антителами является системно эффективной против меланомы B16 и приводит к повышенной инфильтрации Т-клеток с повышенной экспрессией маркеров активации. A) Общая выживаемость. Животных лечили, как показано на фиг. 2A, с применением и без применения анти-PD-1-антител. B) Абсолютное количество CD45, CD3, CD8 и CD4 эффекторных клеток в опухолях. C) Относительное процентное содержание регуляторных Т-клеток в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах. D-E) Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты из отдаленных опухолей выделяли и окрашивали для определения экспрессии ICOS (D) и гранзима B (E). (F) Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты повторно стимулировали дендритными клетками, нагруженными опухолевыми лизатами, и оценивали экспрессию IFN-гамма при помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов.

Фиг. 11. Комбинированная терапия NDV и CTLA-4 вызывает активацию ICOS и CD4 эффекторных клеток в отдаленных опухолях и дренирующих опухоль лимфатических узлах (TDLN).

Фиг. 12A-12D. Получение и *in vitro* оценка вируса NDV-ICOSL. A) Схема конструкции вирусного генома. B) Экспрессия ICOSL на поверхности клеток B16-F10, инфицированных в течение 24 ч (репрезентативная гистограмма слева и средние значения для 3 образцов из группы справа). C) Цитолитическая активность NDV в инфицированных клетках B16-F10, определенная при помощи анализа ЛДГ. D) Репликация рекомбинантного NDV в клетках B16-F10.

Фиг. 13A-13C. Комбинированная терапия NDV-mICOSL и анти-CTLA-4-антителами защищает мышей от контралатерального заражения опухолью и приводит к долгосрочному выживанию животных. Животных заражали большей дозой опухоли и лечили NDV, как показано на фиг. 2A, с применением и

без применения системных анти-CTLA-4-антител. Показан рост левых боковых (не инъецированных) опухолей. В) Долгосрочная выживаемость. Числа в прямоугольниках показывают процент животных, защищенных от опухолей. Объединенные данные для 3 различных экспериментов по 5-10 мышей в группе. С) У мышей, получавших комбинированную терапию, на бывших местах опухоли развилось витилиго, но не системно.

Фиг. 14А-14В. Комбинированная терапия NDV-mICOSL и анти-CTLA-4-антителами защищает мышей от контралатерального заражения опухолью и приводит к долгосрочному выживанию животных в модели карциномы толстой кишки CT26. Животных заражали большей дозой опухоли и лечили NDV, как показано на фиг. 2А, с применением и без применения системных анти-CTLA-4-антител. Показан рост левых боковых (не инъецированных) опухолей. Числа в прямоугольниках показывают процент животных, защищенных от опухолей. В) Долгосрочная выживаемость. Репрезентативный эксперимент с 5-10 мышами в группе (А) и объединенные данные для 2 различных экспериментов по 5-10 мышей в группе (В).

Фиг. 15А-15С. Лечение NDV приводит к инфильтрации отдаленной опухоли B16 макрофагами, NK-клетками, CD8+ и CD4+ эффекторными клетками и снижает частоту Treg. А) Общее количество CD45+, CD3+, CD8+, CD4+ FoxP3- (Teff), и CD4+ FoxP3+ (Treg) инфильтратов. В) Соотношения Teff/Treg и CD8/Treg. С) Общее количество макрофагов, NK и NKT клеток инфильтратов.

Фиг. 16А-16В. Лимфоциты, инфильтрирующие отдаленные опухоли B16 усиливают экспрессию маркеров активации, лизиса и пролиферации. Соответствующие диаграммы экспрессии Ki-67, гранзима В (GrB) и ICOS (А) и соответствующее процентное содержание в CD4 эффекторных клетках и CD8 клетках (В).

Фиг. 17. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты от подвергшихся лечению животных секретируют IFN-гамма в ответ на стимуляцию ДК, нагруженными лизатами B16-F10. Показаны репрезентативные точечные диаграммы.

Фиг. 18А-18В. Животные, получавшие комбинированную терапию, защищены от повторного заражения опухолью. А) меланома B16-F10, повторное заражение через 120 дней 1×10^5 клеток. В) Карцинома толстой кишки CT26, повторное заражение через 90 дней 1×10^6 клеток. Репрезентативные результаты для двух различных экспериментов с 10 мышами в группе.

Фиг. 19А-19В. Рекомбинантный гибридный белок ICOSL-F эффективно экспрессируется на поверхности. А) Схематическое изображение гибридного белка. В) Экспрессия гибридного белка слияния ICOSL-F на поверхности трансфицированных клеток.

Фиг. 20А-20Д. Инфекция NDV ограничена инъецированной опухолью. А) Рекомбинантный NDV-Fluc вводили внутрь опухоли (IT) или внутривенно (IV) животным линии Balb/C, имеющим опухоли CT26, и получали изображения в течение последующих 72 ч. В) NDV-Fluc вводили мышам линии C57BL/6, имеющим двусторонние меланомы B16-F10, и наблюдали животных в течение 120 ч. Показаны репрезентативные люминесцентные изображения. С) Количественное определение люминесценции от области опухоли, нормированное по фоновой люминесценции. Д) Площадь под кривой (AUC), вычисленная для данных, показанных на графиках (С). Данные представляют собой репрезентативные результаты от 1 до 3 независимых экспериментов с 3-5 мышами в группе. *** $p < 0,001$.

Фиг. 21А-21F. Инфекция NDV увеличивает инфильтрацию опухоли лейкоцитами в опухолях, инъецированных вирусом. Животных лечили по схеме, изображенной на фиг. 22А. Опухоли вырезали на 15-й день, и TIL метили и анализировали при помощи проточной цитометрии. А) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания опухоль-инфильтрирующих CD45+ и CD3+ клеток. В) Абсолютное количество CD45+ клеток на грамм опухоли. С) Абсолютное количество врожденных иммунных клеток на грамм опухоли. Д) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания CD4+FoxP3+(Treg) и CD4+FoxP3- (Tconv) клеток. Е) Абсолютные количества обычных и регуляторных CD4+ клеток и CD8+ клеток на грамм опухоли. F) Вычисленные соотношения Tconv/Treg и CD8+/Treg для опухолей. Данные представляют собой объединенные результаты 3 независимых экспериментов с 3-5 мышами в группе. Показано среднее значение $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 22А-22М. Инфекция NDV увеличивает инфильтрацию лейкоцитами отдаленных опухолей и замедляет рост опухоли. А) Схема лечения. В) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания опухоль-инфильтрирующих CD45+ и CD3+ клеток. С) Абсолютное количество CD45+ клеток на грамм опухоли. Д) Абсолютное количество врожденных иммунных клеток на грамм опухоли. Е) Гистологические срезы опухолей, полученные из отдаленных опухолей, окрашивали гематоксилином-эозином (верхние изображения) или метили для визуализации CD3 и FoxP3 (нижние изображения), и анализировали при помощи микроскопии. Области, обозначенные стрелками, показывают области некроза и воспалительных инфильтратов. Масштабные полоски равны 200 мкм. F) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания CD4+FoxP3+ (Treg) и CD4+FoxP3- (Tconv) клеток. G) Абсолютные количества обычных и регуляторных CD4+ клеток и CD8+ клеток на грамм опухоли, вычисленные по данным проточной цитометрии. H) Относительное процент-

ное содержание Treg из CD45+ клеток I) Вычисленные соотношения Tconv/Treg и CD8+/Treg. (J, K) Активация ICOS, гранзима B, и Ki-67 в опухоль-инфильтрирующих Tconv (J) и CD8+ клетках (K). L) Рост инфицированных NDV и отдаленных опухолей. (M) Общая выживаемость животных. Данные представляют собой объединенные результаты 3 (B-K) или 2 (L-M) независимых экспериментов с 3-5 животными в группе. Показано среднее значение $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 23A-23E. Терапия NDV увеличивает инфильтрацию лимфоцитами отдаленных опухолей в модели двусторонней меланомы подушечки лапы. Животных, имеющих двустороннюю меланому подушечки лапы, лечили по схеме, изображенной фиг. 22A. Отдаленные опухоли вырезали на 15-й день, и TIL метили и анализировали при помощи проточной цитометрии. A) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания опухоль-инфильтрирующих CD45+ и CD3+ клеток. B) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания CD4+FoxP3+ и CD4+FoxP3- клеток. C) Абсолютные количества обычных и регуляторных CD4+ клеток и CD8+ клеток на грамм опухоли. D, E) Активация ICOS, гранзима B, и Ki-67 в опухоль-инфильтрирующих CD8+ (D) и Tconv (E) лимфоцитах. Данные представляют собой репрезентативные результаты 1 из 2 независимых экспериментов с 5 мышами в группе. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 24A-24I. NDV вызывает инфильтрацию адоптивно перенесенных опухоль-специфичных лимфоцитов и способствует воспалению опухоли. A) Схема лечения. B) Репрезентативные люминесцентные изображения животных, подвергшихся лечению NDV и адоптивно перенесенными Trp1-Fluc лимфоцитами. C).

Количественное определение среднего значения люминесценции от области опухоли. D) Площадь под кривой (AUC), вычисленная для данных, показанных на графиках (C). E) Абсолютное количество Pmel лимфоцитов из отдаленных опухолей, вычисленное по данным проточной цитометрии. F) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания CD45+ и CD3+ клеток, инфильтрирующих отдаленные опухоли у животных, получавших лечение по схеме, показанной на изображении (A). G) Схема эксперимента по переливанию сыворотки от животных, которым в опухоль вводили одну инъекцию NDV или PBS. H) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания CD45+ и CD3+ клеток, инфильтрирующих инъецированные сывороткой опухоли. I) Абсолютные количества указанных клеточных субпопуляций в инъецированных сывороткой опухолях, вычисленные по данным проточной цитометрии. Данные для изображений B-E являются данными 1 из 3 экспериментов с 4-5 животными в группе. Данные для изображений G-I являются объединенными данными для 2 независимых экспериментов с 5 животными в группе. Показано среднее значение $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 25. Внутриопуховое введение NDV обеспечивает защиту при повторном заражении опухолью. Животным с излеченной при помощи NDV меланомой B16-F10, на 75-й день инъекционно вводили 1×10^5 клеток меланомы B16-F10, наблюдали рост опухоли и умерщвляли животных, когда размер опухоли достигал 1000 мм³. Показана общая выживаемость животных. Данные представляют собой обобщенные результаты 1 из 2 независимых экспериментов с 10 животными в группе. **** $p < 0,0001$.

Фиг. 26A-26B. Опухоль-инфильтрирующие CD8+ лимфоциты активируют CTLA-4 в ответ на терапию NDV. Репрезентативные точечные диаграммы (слева) и обобщенные результаты (справа) экспрессии CTLA-4 в CD8+ клетках в обработанных NDV (A) и отдаленных (B) опухолях. Репрезентативные результаты 1 из 3 экспериментов с 3 мышами в группе. * $p < 0,05$.

Фиг. 27A-27K. NDV и блокаторы CTLA-4 взаимно усиливают отторжение локальных и отдаленных опухолей. A) Схема лечения. B) Рост обработанных вирусом (правых боковых) опухолей B16-F10. C) Рост отдаленных (левых боковых) опухолей B16-F10. D) Долгосрочная выживаемость в модели B16-F10. E) Выжившим животным на 90-й день инъекционно вводили в правый бок 1×10^5 клеток B16-F10, и наблюдали за выживаемостью. Данные представляют собой объединенные результаты 3 экспериментов с 6-11 животными в группе. F) Рост обработанных вирусом (правых боковых) и отдаленных (левых боковых) опухолей TRAMP C2. G) Долгосрочная выживаемость в модели TRAMP C2 H) In vitro чувствительность клеток B16-F10 и TRAMP C2 к опосредованному NDV лизису при различной множественности заражения (MOI). I-K) Активация MHC I, MHC II, CD80 и CD86 в клетках B16-F10 и TRAMP C2, инфицированных NDV. Показаны репрезентативные диаграммы проточной цитометрии клеток B16-F10 (I) и вычисленные средние значения медианной интенсивности флуоресценции (MFI) для клеток B16-F10 (J) и TRAMP C2 (K). Показано среднее значение $\pm$ SEM. Данные представляют собой результаты 1 из 3 (B-E) или 1 из 2 (F, G) независимых экспериментов с 5-10 животными в группе. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 28A-28E. Системный противоопухолевый эффект ограничивается инъецируемым типом опухоли. A) Животным однократно в правый бок инъекционно вводили меланому B16-F10, карциному толстой кишки MC38 или PBS, и в левый бок клетки B16-F10, и лечили, как показано на схеме. B, C) Рост отдаленных опухолей (B) и общая выживаемость (C) животных, получивших в правый бок B16-F10, или не получивших в правый бок никаких опухолей. Данные представляют собой репрезентативные результаты 1 из 2 независимых экспериментов с 5-10 животными в группе. D, E) Рост отдаленных опухолей (D)

и общая выживаемость животных, получивших в правый бок опухоли B16-F10 или MC38. Данные представляют собой репрезентативные результаты 1 из 2 независимых экспериментов с 10 животными в группе. $^{**}p<0,01$, $^{***}p<0,0001$.

Фиг. 29А-29Е. Комбинированная терапия NDV и анти-CTLA-4-антителами усиливает инфильтрацию опухоли врожденными и адаптивными иммунными клетками. Животные получали комбинированную терапию по схеме, показанной на фиг. 27А. Опухоли вырезали на 15-й день и анализировали на наличие инфильтрирующих иммунных клеток при помощи проточной цитометрии. А) Абсолютное количество CD45+ клеток на грамм опухоли. В) Абсолютное количество CD11b+ и NK1.1+ клеток на грамм опухоли. С) Абсолютные количества обычных и регуляторных CD4+ клеток и CD8+ клеток на грамм опухоли. D) Относительное процентное содержание Treg в CD45+ клетках. Е) Вычисленные соотношения Tconv/Treg и CD8+/Treg. Данные представляют собой объединенные результаты 4 независимых экспериментов с 3-5 мышами в группе. $^{*}p<0,05$, $^{**}p<0,01$, $^{***}p<0,001$, $^{****}p<0,0001$.

Фиг. 30А-30J. Комбинированная терапия NDV и блокаторами CTLA-4 вызывает воспалительные изменения в отдаленных опухолях. Животных лечили по схеме, изображенной на фиг. 27А. Опухоли вырезали на 15-й день и анализировали на наличие инфильтрирующих иммунных клеток. А) Гистологические срезы отдаленных опухолей окрашивали гематоксилином-эозином (верхние изображения) или CD3 и FoxP3 (нижние изображения), и анализировали при помощи световой и флуоресцентной микроскопии, соответственно. Области, обозначенные стрелками, показывают области некроза и воспалительных инфильтратов. Масштабные полоски равны 200 мкм. В) Абсолютное количество опухолеинфильтрирующих CD45+ и CD3+ клеток на грамм опухоли, вычисленное по данным проточной цитометрии. С) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания опухолеинфильтрирующих CD4+ и CD8+ клеток в популяции CD45+ клеток. D) Абсолютные количества Tconv, Treg и CD8+ клеток на грамм опухоли. Е) Относительное процентное содержание опухолеинфильтрирующих Treg в CD45+ клетках. F) Вычисленные соотношения Tconv/Treg и CD8+/Treg. G-I) Активация ICOS, гранзима В и Ki-67 в опухолеинфильтрирующих CD8+ и Tconv лимфоцитах. Показаны репрезентативные диаграммы проточной цитометрии (верхние изображения) и обобщенные результаты (нижние изображения). TIL повторно стимулировали ДК, активированными опухолевыми лизатами B16-F10, и синтез IFN γ определяли при помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов. Показаны репрезентативные диаграммы проточной цитометрии (левое изображение) и обобщенные результаты (правое изображение). Данные представляют собой обобщенные результаты 5 (А-І) или 2 (J) независимых экспериментов с 3-5 животными в группе. Показано среднее значение $\pm$ SEM. $^{*}p<0,05$, $^{**}p<0,01$, $^{***}p<0,001$, $^{****}p<0,0001$.

Фиг. 31. Антитела к CD8, CD4 и NK1.1 элиминируют соответствующие клетки in vivo. Истошающие антитела инъекционно вводили, как описано ниже в части "Материалы и Методы" в разделе 7.1. Образцы крови отбирали на 5-й день и обрабатывали при помощи проточной цитометрии CD4+, CD8+ и NK клеток с не реагирующими перекрестно антителами. Положительное окрашивание показано горизонтальными линиями. Показаны репрезентативные диаграммы для 1 из 2 независимых экспериментов с 5 мышами в группе.

Фиг. 32А-32F. Противоопухолевая активность комбинированной терапии NDV зависит от CD8+ и NK клеток и интерферонов типа I и типа II. А-С) Животных лечили, как показано на фиг. 27А, с применением или без применения антител к CD4+, CD8+, NK клеткам или IFN γ . А) Рост инъецированных опухолей. В) Рост отдаленных опухолей. С) Долгосрочная выживаемость. D-F) IFNAR-/- или аналогичного возраста C57BL/6 мышей лечили, как показано на фиг. 3А, и наблюдали за ростом опухолей. D) Рост инъецированных опухолей. Е) Рост отдаленных опухолей. F) Долгосрочная выживаемость. Данные на всех изображениях представляют собой объединенные результаты 2 независимых экспериментов с 3-10 животными в группе. $^{*}p<0,05$, $^{**}p<0,01$, $^{***}p<0,001$, $^{****}p<0,0001$.

Фиг. 33А-33В. Терапия NDV приводит к активации PD-L1 на опухолях и опухолеинфильтрирующих лейкоцитах. А) Экспрессия PD-L1 на клетках B16-F10, инфицированных in vitro (левое изображение) и in vivo, в инъецированных вирусом и отдаленных опухолях. Слева репрезентативные гистограммы проточной цитометрии, справа средние значения медианной интенсивности флуоресценции (MFI) для экспрессии PD-L1 в клетках B16-F10 из опухолей. В) Экспрессия PD-L1 на поверхности опухолеинфильтрирующих лейкоцитов, выделенных из отдаленных опухолей. Слева: репрезентативные гистограммы проточной цитометрии, справа: вычисленные средние MFI для каждой клеточной субпопуляции.

Фиг. 34А-34D. Комбинированная терапия NDV с антителами, блокирующими PD-1, приводит к повышению противоопухолевой эффективности в модели двусторонней боковой меланомы B16. А) Схема лечения. В) Рост правой боковой (инъецированной NDV) опухоли. С) Рост левой боковой (отдаленной) опухоли. D) Общая выживаемость.

Фиг. 35А-35D. Комбинированная терапия NDV с антителами, блокирующими PD-1L, приводит к повышению противоопухолевой эффективности в модели двусторонней боковой меланомы B16. А) Схема лечения. В) Рост правой боковой (инъецированной NDV) опухоли. С) Рост левой боковой (отдален-

ной) опухоли. D) Общая выживаемость.

Фиг. 36А-36Е. Комбинированная терапия NDV и анти-PD-1-антителами приводит к повышенной инфильтрации отдаленной опухоли эффекторными, но не регуляторными Т-клетками. А) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания CD4⁺ и CD8⁺ клеток в опухолях. В) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания Tconv (CD4⁺FoxP3⁻) и Treg (CD4⁺FoxP3⁺) клеток. Абсолютное количество CD45⁺ клеток на грамм опухоли. С) Абсолютное количество врожденных иммунных клеток на грамм опухоли. D). Е) Абсолютное количество субпопуляций Т-клеток на грамм опухоли, вычисленное по данным проточной цитометрии. D) Относительное процентное содержание Tregs из CD4⁺ Т-клеток. Е) Вычисленные соотношения Tconv/Treg и CD8/Treg.

Фиг. 37А-37В. TIL из отдаленных опухолей у животных, получавших комбинированную терапию NDV и анти-PD-1-антителами, активируют экспрессию маркеров лизиса и пролиферации. А) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии для процентного содержания Tconv и CD8⁺ клеток, положительных по гранзиму В и Ki67. В) Процентное содержание Tconv и CD8⁺ клеток, положительных по гранзиму В и Ki67.

Фиг. 38А-38С. NDV вызывает иммунную инфильтрацию опухоли и активацию ICOS на CD4 и CD8 клетках в инъецированных вирусом и отдаленных опухолях. А) Схема лечения. В) Экспрессия ICOS на опухоль-инфильтрирующих CD4⁺FoxP3⁻ и CD8⁺ клетках, выделенных из инъецированных NDV (правых боковых) опухолей. Показаны репрезентативные диаграммы проточной цитометрии (вверху) и значения медианной интенсивности флуоресценции (MFI) (внизу). С) Экспрессия ICOS на опухоль-инфильтрирующих CD4⁺FoxP3⁻ и CD8⁺ клетках, выделенных из отдаленных (левых боковых) опухолей. Показаны репрезентативные диаграммы проточной цитометрии (вверху) и значения медианной интенсивности флуоресценции (MFI) (внизу).

Фиг. 39А-39D. Получение и *in vitro* оценка вируса NDV-ICOSL. А) Схема конструкции вирусного генома. В) Экспрессия ICOSL на поверхности клеток B16-F10, инфицированных в течение 24 часов (репрезентативная гистограмма слева и средние значения для 3 образцов из группы справа). С) Цитолитическая активность NDV в инфицированных клетках B16-F10, определенная при помощи анализа ЛДГ. D) Репликация рекомбинантного NDV в клетках B16-F10.

Фиг. 40А-40F. Вирус NDV-ICOSL вызывает замедление роста отдаленных опухолей и индуцирует повышенную инфильтрацию опухоли лимфоцитами. Двусторонние боковые опухоли B16-F10 получали, как описано выше, и животных лечили 4 внутриопухолевыми инъекциями указанного вируса в правую опухоль. А) Рост инъецированных вирусом опухолей. В) Рост отдаленных опухолей. С) Общая выживаемость. D) Абсолютное количество опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов в правых (инъецированных вирусом) опухолях. Е) Абсолютное количество опухоль-инфильтрирующих лейкоцитов в левых (отдаленных) опухолях. F) Относительное процентное содержание Tregs в отдаленных опухолях.

Фиг. 41А-41Е. Комбинированная терапия NDV-ICOSL и блокаторами CTLA-4 вызывает отторжение инъецированных и отдаленных опухолей в модели B16-F10 и обеспечивает защиту при повторном заражении опухолью. А) Схема лечения. В) Рост инъецированных вирусом (правых) опухолей. С) Рост отдаленных (левых) опухолей. D) Общая выживаемость. Е) Выжившим животным на 90-й день повторно вводили в правый бок 2×10^5 клеток B16-F10, и наблюдали за выживаемостью.

Фиг. 42А-42Е. Комбинированная терапия NDV-ICOSL и блокаторами CTLA-4 вызывает отторжение инъецированных и отдаленных опухолей в модели CT26. А) Схема лечения. В) Рост инъецированных вирусом (правых) опухолей. С) Рост отдаленных (левых) опухолей. D) Общая выживаемость. Е) Выжившим животным на 90-й день повторно вводили в правый бок 1×10^6 клеток CT26, и наблюдали за выживаемостью.

Фиг. 43А-43J. Комбинированная терапия NDV-ICOSL и анти-CTLA-4-антителами приводит к усилению инфильтрации опухоли врожденными и адаптивными иммунными клетками. Животных, имевших двусторонние боковые опухоли, лечили в соответствии со схемой, показанной на фиг. 41А. Животных умерщвляли на 15-й день, и отдаленные опухоли извлекали для дальнейшего анализа на наличие TIL. А) Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии, показывающие содержание CD45⁺ и CD3⁺ клеток в общей клеточной популяции. Абсолютное количество CD45⁺ (В), CD11b⁺ (С) и NK1.1⁺ клеток (D) на грамм опухоли, вычисленное по данным проточной цитометрии. Е) Абсолютные количества опухоль-инфильтрирующих CD3⁺, CD8⁺, CD4⁺FoxP3⁻ (CD4eff) и CD4⁺FoxP3⁺ (Treg) на грамм опухоли. F) Относительное процентное содержание Treg во всех CD45⁺ клетках G) Вычисленные соотношения эффектор/Treg. H, I, J) Относительное процентное содержание опухоль-инфильтрирующих CD8⁺, CD4⁺ эффекторных клеток, положительных по ICOS, гранзиму В и Ki67, соответственно.

Фиг. 44А-44С. Схематическое изображение дополнительно полученного рекомбинантного вируса NDV, экспрессирующего гибридный и нативный иммуностимулирующие белки. А) Схема строения гибридных белков суперсемейства рецепторов TNF (GITRL, 0X4OL, 4-1BBL, CD4 0L), слитых с HN NDV внутриклеточной и трансмембранной областью HN на N-конце (верхнее изображение). На нижнем изображении показана схема строения гибридных белков суперсемейства рецепторов иммуноглобулинов с анти-CD28scfv и ICOSL внеклеточными доменами, слитыми с внутриклеточной и трансмембранной об-

ластью F на С-конце. В) Длина внутриклеточного-трансмембранного (HN и F) и внеклеточного доменов каждого из описанных гибридных белков. С) Схематическое изображение области вставки трансгена и список всех рекомбинантных NDV, экспрессирующих иммуностимулирующие лиганды, получаемые при помощи этой стратегии.

Фиг. 45А-45С. Подтверждение выделения рекомбинантных NDV. А) Реакция гемагглютинации, показывающая положительную гемагглютинирующую активность в лунках для NDV-HN-GITRL, NDV-aCD28scfv-F, NDV-HN-OX40L, NDV-HN-CD40L, NDV-IL15 и NDV-IL21. В) Расположение праймеров для подтверждения генной вставки в выделенных вирусах при помощи ОТ-ПЦР. С) ОТ-ПЦР РНК, выделенной из выделенных вирусов.

Фиг. 46. Клетки B16-F10, инфицированные рекомбинантными NDV, экспрессируют лиганды на поверхности. Клетки B16-F10 инфицировали указанными рекомбинантными NDV с MOI, равной 2, и, спустя 18 часов, анализировали экспрессию лигандов на поверхности при помощи проточной цитометрии. Показаны репрезентативные диаграммы проточной цитометрии.

Фиг. 47. NDV-HN-4-1BBL вызывает увеличение иммунной инфильтрации отдаленных опухолей. Животным, имеющим двусторонние боковые меланомы B16, путем внутриопухолевой инъекции в один бок вводили указанный вирус, как описано выше. После 3 процедур животных умерщвляли, и опухоль-инфильтрирующие лимфоциты из отдаленных опухолей анализировали при помощи проточной цитометрии. Показано общее количество опухоль-инфильтрирующих CD3, CD4+FoxP3+ (Treg), CD4+FoxP3- (Tconv), CD8, NK и CD11b+ клеток на грамм опухоли.

5. Подробное описание изобретения

В одном аспекте в настоящем описании предложены гибридные вирусы болезни Ньюкасла (NDV), сконструированные таким образом, что они экспрессируют агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки. В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, где этот агонист экспрессируется. В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие упакованный геном, который кодирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, где этот агонист экспрессируется.

В другом аспекте в настоящем описании предложены способы размножения описанных в настоящем описании NDV (например, описанных в настоящем описании гибридных NDV). Описанные в настоящем описании NDV (например, описанные в настоящем описании гибридные NDV) могут быть размножены в любых клетках, субъектах, тканях, органах или животных, восприимчивых к инфекции NDV.

В другом аспекте в настоящем описании предложены композиции, содержащие описанный в настоящем описании NDV (например, описанный в настоящем описании гибридный NDV). В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие описанный в настоящем описании NDV (например, описанный в настоящем описании гибридный NDV) и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие раковые клетки, инфицированные описанным в настоящем описании NDV (например, описанным в настоящем описании гибридным NDV), и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены фармацевтические композиции, содержащие белковый концентрат из лизированных раковых клеток, инфицированных NDV, (например, раковых клеток, инфицированных гибридным NDV), и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте в настоящем описании предложены способы получения фармацевтических композиций, содержащих описанный в настоящем описании NDV (например, описанный в настоящем описании гибридный NDV). В одном варианте осуществления изобретения способ получения фармацевтических композиций включает: (а) размножение описанного в настоящем описании NDV (например, описанного в настоящем описании гибридного NDV) в клеточной линии, которая восприимчива к инфекции NDV; и (b) сбор потомства вируса, где вирус выращивается до достаточных количеств и в подходящих условиях, которые обеспечивают чистоту вируса от контаминации, так что потомство вируса пригодно для включения его в рецептуру фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления изобретения способ получения фармацевтических композиций включает: (а) размножение описанного в настоящем описании NDV (например, описанного в настоящем описании гибридного NDV) в эмбрионированном яйце; и (b) сбор потомства вируса, где вирус выращивается до достаточных количеств и в подходящих условиях, которые обеспечивают чистоту вируса от контаминации, так что потомство вируса пригодно для включения его в рецептуру фармацевтической композиции.

В другом аспекте в настоящем описании предложены способы лечения рака с использованием описанного в настоящем описании гибридного NDV (например, гибридного NDV, описанного ниже в разделе 5.2) или композиции, содержащей такой гибридный NDV. В конкретном варианте осуществления изобретения способ лечения рака включает инфицирование раковой клетки у субъекта описанным в настоящем описании гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным ниже в разделе 5.2) или его композицией. В другом варианте осуществления изобретения способ лечения рака включает введение

нуждающемуся в этом субъекту описанного в настоящем описании гибридного NDV (например, гибридного NDV, описанного ниже в разделе 5.2) или его композиции. В конкретных вариантах осуществления изобретения эффективное количество описанного в настоящем описании гибридного NDV (например, гибридного NDV, описанного ниже в разделе 5.2) или композиции, содержащей эффективное количество описанного в настоящем описании гибридного NDV, вводится субъекту для лечения рака. В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный NDV содержит геном, этот геном содержит агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки (например, агонист костимулирующего рецептора иммунной клетки) и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки (например, антагонист ингибиторного рецептора иммунной клетки), где агонист и/или антагонист экспрессируются NDV. В некоторых вариантах осуществления изобретения геном NDV также содержит мутированный белок F. В некоторых вариантах осуществления изобретения два или более гибридных NDV вводятся субъекту для лечения рака.

В другом варианте осуществления изобретения способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом субъекту раковых клеток, инфицированных описанным в настоящем описании гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным ниже в разделе 5.2), или их композиции. В конкретных вариантах осуществления изобретения раковые клетки обрабатывают гамма-излучением перед введением их субъекту или включением в состав композиции. В другом варианте осуществления изобретения способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом субъекту белкового концентрата или фрагментов цитоплазматической мембраны раковых клеток, инфицированных гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным ниже в разделе 5.2), или их композиции. В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный NDV содержит упакованный геном, этот геном содержит агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки (например, агонист костимулирующего рецептора иммунной клетки) и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки (например, антагонист ингибиторного рецептора иммунной клетки), где агонист и/или антагонист экспрессируются NDV. В некоторых вариантах осуществления изобретения геном NDV также содержит мутированный белок F, который экспрессируется NDV.

В другом аспекте в настоящем описании предложены способы лечения рака с использованием описанного в настоящем описании NDV (например, гибридного NDV, такого как описан ниже в разделе 5.2) или композиции, содержащей такой NDV, в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии. В одном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту описанного в настоящем описании NDV (например, гибридного NDV, такого как описан ниже в разделе 5.2) и одного или нескольких других видов терапии. В другом варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту эффективного количества описанного в настоящем описании NDV или композиции, содержащей эффективное количество описанного в настоящем описании NDV, и одного или нескольких других видов терапии. NDV и один или несколько других видов терапии могут вводиться субъекту одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV и один или несколько других видов терапии вводятся в составе одной композиции. В других вариантах осуществления изобретения NDV и один или несколько других видов терапии вводятся в составе различных композиций. NDV и один или несколько других видов терапии могут вводиться субъекту одним и тем же или различными путями введения.

Любой тип или штамм NDV может использоваться в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, включая без ограничений встречающиеся в природе штаммы, варианты или мутанты, мутагенизированные вирусы, реассортанты и/или генноинженерные вирусы. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии, представляет собой встречающийся в природе штамм. В другом варианте осуществления изобретения NDV, используемый в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии, представляет собой гибридный NDV. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV содержит упакованный геном, этот геном содержит цитокин (например, IL-2, IL-7, IL-15, IL-17 или IL-21). В конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV содержит упакованный геном, этот геном содержит опухолевый антиген. В конкретных вариантах осуществления изобретения этот опухолевый антиген экспрессируется клетками, инфицированными гибридным NDV. В другом конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV содержит упакованный геном, этот геном содержит проапоптозную молекулу (например, Bax, Bak, Bad, BID, Bcl-xS, Bim, Noxa, Puma, AIF, FasL и TRAIL) или антиапоптозную молекулу (например, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 и XIAP). В конкретных вариантах осуществления изобретения этот проапоптозная молекула или антиапоптозная молекула экспрессируется клетками, инфицированными гибридным NDV. В другом конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV содержит упакованный геном, этот геном содержит агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки (например, агонист костимулирующего рецептора иммунной клетки) и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки (например, антагонист ингибиторного рецептора иммунной клетки). В конкретных вариантах осуществления изобретения агонист и/или антагонист экспрессируются клетками, инфицированными гибридным NDV. В некоторых вариантах осуществления

изобретения геном NDV также содержит мутированный белок F, опухолевый антиген, гетерологичный антагонист интерферона, проапоптозную молекулу и/или антиапоптозную молекулу. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько других видов терапии, используемых в комбинации с описанным в настоящем описании NDV, представляют собой один или несколько других видов терапии, описанных ниже в разделе 5.6.4. В конкретных вариантах осуществления один или несколько других видов терапии, используемых в комбинации с описанным в настоящем описании NDV, представляют собой агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки. Примеры агонистов костимулирующего сигнала иммунной клетки и антагонистов ингибирующего сигнала иммунной клетки приведены, например, ниже в разделе 5.2.1. В конкретном варианте осуществления изобретения антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки представляет собой анти-CTLA-4-антитело, описанное ниже в разделе 6. В другом конкретном варианте осуществления изобретения агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки представляет собой лиганд ICOS, описанный ниже в разд. 6.

5.1. Вирус болезни Ньюкасла

Любой тип или штамм NDV может использоваться в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, включая без ограничений встречающиеся в природе штаммы, варианты или мутанты, мутагенизированные вирусы, реассортанты и/или генноинженерные вирусы. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой встречающийся в природе штамм. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV представляет собой литический штамм. В других вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой нелитический штамм. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой лентогенный штамм. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV представляет собой мезогенный штамм. В других вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой велоогенный штамм. Конкретные примеры штаммов NDV включают без ограничений штамм 73-T, штамм NDV HUI, штамм Ulster, штамм MTH-68, штамм Italien, штамм Hickman, штамм PV701, штамм Hitchner B1 (см., например, Genbank No. AF309418 или NC_002617), штамм La Sota (см., например, Genbank No. AY845400), штамм YG97, штамм MET95, штамм Roakin и штамм F48E9. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой штамм Hitchner B1. В другом конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой штамм B1, зарегистрированный в Genbank под номерами No. AF309418 или NC_002617. В другом конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой NDV, депонированный в коллекции ATCC под номером No. VR2239. В другом конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой штамм La Sota.

В других конкретных вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, является непатогенным для птиц при оценке по методике, известной специалисту в данной области техники. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в комбинированной терапии, является непатогенным при оценке методом интракраниальной инъекции вируса 1-дневным цыплятам, где развитие болезни и смерть происходят в течение 8 суток. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, имеет индекс интракраниальной патогенности менее 0,7, менее 0,6, менее 0,5, менее 0,4, менее 0,3, менее 0,2 или менее 0,1. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, имеет индекс интракраниальной патогенности равный нулю.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой мезогенный штамм, который был генетически модифицирован таким образом, чтобы не являться патогенным для птиц, при оценке по методикам, известным специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой велоогенный штамм, который был генетически модифицирован таким образом, чтобы не являться патогенным для птиц, при оценке по методикам, известным специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, экспрессирует мутированный белок F. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, экспрессирующий мутированный белок F, является высоко фузогенным и способен образовывать синцитии. В другом конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион.

В одном варианте осуществления изобретения геном NDV, используемого в раскрытой в настоя-

шем описании комбинированной терапии, сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F с мутированным сайтом расщепления. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F, в котором сайт расщепления белка F изменен таким образом, чтобы синтезировать многоосновную аминокислотную последовательность, позволяющую белку быть расщепленным внутриклеточными протеазами, что обеспечивает более эффективное проникновение вируса в клетку и образование синцитиев. В другом конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F, в котором сайт расщепления белка F заменен сайтом, содержащим один или два дополнительных остатка аргинина, что позволяет мутантному сайту расщепления быть активированным повсеместно экспрессируемыми протеазами семейства фурина. Конкретные примеры NDV, экспрессирующих такой мутированный белок F, включают без ограничений rNDV/F2aa и rNDV/F3aa. Для описания мутаций, введенных в белок F NDV с целью получения мутированного белка F с мутированным сайтом расщепления, см., например, работу Park et al. (2006) Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease. PNAS USA 103: 8203-2808, которая полностью включена в настоящую заявку путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A. В конкретных вариантах осуществления изобретения L289A мутированный белок F имеет один, два или три остатка аргинина в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является белком из другого типа или штамма NDV, отличного от основного NDV. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является дополнительным белком к белку F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F заменяет собой белок F основного NDV.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, является аттенуированным, в результате чего NDV остается по меньшей мере частично инфекционным, и может реплицироваться *in vivo*, но образует только низкие титры, вызывающие инфекцию на субклиническом уровне, который не является патогенным (см., например, Khatrar et al, 2009, J. Virol. 83: 7779-7782). В конкретном варианте осуществления изобретения NDV аттенуируют путем делеции белка V. Такой аттенуированный NDV может оказаться особенно подходящим для вариантов осуществления изобретения, в которых вирус вводится субъекту, чтобы действовать в качестве иммуногена, например, живой вакцины. Вирусы могут быть аттенуированы любым способом известным из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, не содержит последовательность, кодирующую белок V NDV. В других вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, экспрессирует мутированный белок V. Примеры мутированных белков V см., например, в работе Elankumaran et al, 2010, J. Virol. 84(8): 3835-3844, которая полностью включена в настоящую заявку путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения мезогенный или велогенный штамм NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, экспрессирует мутированный белок V, такой как описан в работе Elankumaran et al, 2010, J. Virol. 84(8): 3835-3844.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой NDV, раскрытый Патенте США № 7442379, Патенте США № 6451323 или Патенте США № 6146642, которые полностью включены в настоящую заявку путем ссылки. В конкретных вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, генетически модифицирован таким образом, что он кодирует и экспрессирует герерологичный пептид или белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой гибридный NDV, известный специалисту в данной области техники, или раскрытый в настоящем описании гибридный NDV (см., например, раздел 2.5., ниже). В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой гибридный NDV, содержащий геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует опухолевый антиген (примеры опухолевых антигенов см. ниже). В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой гибридный NDV, содержащий геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует гетерологичный антагонист интерферона (примеры гетерологичных антагонистов интерферона см. ниже). В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой гибридный NDV, раскрытый в заявке на патент США № 2012/0058141, которая полностью включена в настоящую заявку путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой гибридный NDV, раскрытый в заявке

на патент США № 2012/0122185, которая полностью включена в настоящую заявку путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой гибридный NDV, содержащий геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует цитокин, такой как, например, IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, IFN-гамма, GM-CSF и TNF-альфа. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой гибридный NDV, содержащий геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует IL-2, IL-15 или IL-21. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой гибридный NDV, содержащий геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует цитокин, как описано ниже в разделе 7, пример 2.

5.2. Гибридный вирус болезни Ньюкасла

В одном аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или натуральная клетка-киллер (NK). В некоторых вариантах осуществления изобретения агонист и/или антагонист включен в вирион. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка. В другом конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка. Другими словами, NDV служит "основой", которая сконструирована, чтобы экспрессировать агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки такой как, например, Т-лимфоцит или натуральная клетка-киллер (NK). Конкретные примеры агонистов костимулирующих сигналов, а также конкретные примеры антагонистов ингибирующего сигнала иммунной клетки, приведены ниже.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и мутированный белок F. В одном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и мутированный белок F. В другом варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и мутированный белок F. В конкретном варианте осуществления мутированный белок F, является высоко фузогенным и способен образовывать синцитии. В другом конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион. В некоторых вариантах осуществления изобретения геном NDV, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, содержит последовательность, кодирующую белок V NDV.

В одном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и мутированный белок F с мутированным сайтом расщепления. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F, в котором сайт расщепления белка F изменен таким образом, чтобы синтезировать многоосновную аминокислотную последовательность, позволяющую белку быть расщепленным внутриклеточными протеазами, что обеспечивает более эффективное проникновение вируса в клетку и образование синцитиев. В другом конкретном варианте осуществления изобретения NDV сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F, в котором сайт расщепления белка F заменен сайтом, содержащим один или два дополнительных остатка аргинина, что позволяет мутантному сайту расщепления быть активированным повсеместно экспрессируемыми протеазами семейства фурина. Конкретные примеры NDV, экспрессирующих такой мутированный белок F, включают без ограничений rNDV/F2aa и rNDV/F3aa. Для описания мутаций, введенных в белок F NDV с целью получения мутированного белка F с мутированным сайтом расщепления, см., например, работы Park et al. (2006) Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease. PNAS USA 103: 8203-2808, которая полностью включена в настоящую заявку путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридный NDV сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является белком из другого типа или штамма NDV, отличного от основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения L289A мутированный белок F имеет один, два или три остатка аргинина в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является дополнительным белком к белку F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F

заменяет собой белок F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион.

В некоторых вариантах осуществления изобретения геном NDV, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, содержит последовательность, кодирующую мутированный белок V NDV, например, раскрытую в Elankumaran et al, 2010, J. Virol. 84(8): 3835-3844. В других вариантах осуществления изобретения геном NDV, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, не содержит последовательность, кодирующую мутированный белок V NDV. В некоторых вариантах осуществления изобретения исходной основой гибридного NDV является мезогенный или велогенный штамм NDV, сконструированный таким образом, что он экспрессирует мутированный белок V, такой как описан в работе Elankumaran et al, 2010, J. Virol. 84(8): 3835-3844.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и цитокин. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и цитокин. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и цитокин. Конкретные примеры цитокинов включают без ограничений интерлейкин (IL)-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, интерферон (IFN)-гамма, GM-CSF и фактор некроза опухолей (TNF)-альфа.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, мутированный белок F и цитокин (например, IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, IFN-гамма, GM-CSF и TNF-альфа). В конкретном варианте осуществления мутированный белок F, является высоко фузогенным. В конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F имеет мутированный сайт расщепления (такой как описано в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления мутированный белок F содержит аминокислотную мутацию L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридный NDV сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является белком из другого типа или штамма NDV, отличного от основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения L289A мутированный белок F имеет один, два или три остатка аргинина в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является дополнительным белком к белку F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F заменяет собой белок F основного NDV. В конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион.

В некоторых аспектах в настоящем описании предложен гибридный NDV, содержащий геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует цитокин, такой как, например, IL-7, IL-15, IL-21 или другой цитокин, описанный в настоящем описании или известный специалисту в данной области техники. Примеры гибридных NDV, сконструированных таким образом, чтобы экспрессировать цитокины, а также способов получения таких гибридных NDV см., например, в разделе 7.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует (i) агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки и (ii) опухолевый антиген. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и опухолевый антиген. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и опухолевый антиген.

Опухолевые антигены включают опухолеассоциированные антигены и опухолеспецифичные антигены. Конкретные примеры опухолевых антигенов включают без ограничений MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-ацетилглюкозаминилтрансфераза-V, p-15, gp100, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), тирозиназа, циклин-зависимая киназа 4, β -катенин, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, папилломавирус человека-E6, папилломавирус человека E7, CD20, раково-эмбриональный антиген (РЭА), рецептор эпидермального фактора роста, MUC-1, каспаза-8, CD5, муцин-1, Lewisx, CA-125, p185HER2, IL-2R, Fas- α , танасцин, антигены, ассоциированные с металлопротеиназой, и CAMPATH-1. Другие примеры включают без ограничений антиген KS 1/4 панкарцином, антиген карциномы яичника (CA125), простатическую кислотную фосфатазу, простатоспецифический антиген, меланомаассоциированный антиген p97, антиген

меланомы gp75, высокомолекулярный массы антиген меланомы (HMW-MAA), простатоспецифический мембранный антиген, РЭА, полиморфный эпителиальный муциновый антиген, глобулярный антиген молочного жира, колоректальные опухолессоциированные антигены (такие как: РЭА, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, CTA-1 и LEA), антигена-38.13 лимфомы Беркитта, CD19, антиген CD20 В-лимфомы, CD33, меланомаспецифичные антигены (такие как, ганглиозид GD2, ганглиозид GD3, ганглиозид GM2, ганглиозид GM3), опухолеспецифические трансплантационные антигены (ОСТА) (такие как антигены вирусно-индуцируемых опухолей, включая Т-антиген опухолевых ДНК вирусов и антигены оболочки опухолевых РНК вирусов), онкофетальный антиген-альфа-фетопротейн, такой как РЭА толстой кишки, онкофетальный антиген опухоли мочевого пузыря, дифференцировочный антиген (такой как, антиген L6 и L20 карциномы легких человека), антигены фибросаркомы, антиген Т-клеточного лейкоза Gr37, неогликопротеин, сфинголипиды, антигены рака молочной железы (такие как, EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), антиген HER2 (p185.sup.HER2) и эпитоп HER2/neu), полиморфный эпителиальный муцин (РЕМ), злокачественный лимфоцитарный антиген человека АРО-1, дифференцировочный антиген (такой как антиген I, обнаруженный в фетальных эритроцитах, первичной эндодерме, антиген I, обнаруженный в зрелых эритроцитах, предимплантационных эмбрионах, I(Ma), обнаруженный в аденокарциноме желудка, M18, M39, обнаруженные в эпителии молочной железы, SSEA-1, обнаруженный в миелоидных клетках, VEP8, VEP9, My1, VIM-D5, D.sub.156-22, обнаруженные в клетках колоректального рака, TRA-1-85 (группа крови H), C14, обнаруженный в аденокарциноме толстой кишки, F3, обнаруженный в аденокарциноме легких, АН6, обнаруженный в клетках рак желудка, Y гаптен, Le.sup.y, обнаруженный в клетках эмбриональной карциномы, TL5 (группа крови A), рецептор ЭФР, обнаруженный в клетках A431, серия E1 (группа крови B), обнаружена при раке поджелудочной железы, FC10.2, обнаруженный в клетках эмбриональной карциномы, антиген аденокарциномы желудка, CO-514 (группа крови Le^a) обнаруженный в клетках аденокарциномы, NS-10, обнаруженный в клетках аденокарциномы, CO-43 (группа крови Le^b), G49, обнаруженный в рецепторе ЭФР клеток A431, MH2 (группа крови ALe^b/Le^y), обнаруженный в клетках аденокарциномы толстой кишки, 19,9 обнаруженный в муцине при раке толстой кишки, раке желудка, T₅A₇, обнаруженный в миелоидных клетках, R₂₄, обнаруженный в клетках меланомы, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, и M1:22:25:8, обнаруженные в клетках эмбриональной карциномы и SSEA-3 и SSEA-4, обнаруженные в эмбрионов на стадии от 4 до 8 клеток), пептид из Т-клеточного рецептора при кожной Т-клеточной лимфоме, С-реактивный белок (CRP), раковый антиген 50 (CA-50), раковый антиген 15-3 (CA15-3), связанные с раком молочной железы, раковый антиген 19 (CA-19) и раковый антиген 242, связанный с раком органов желудочно-кишечного тракта, карциномный антиген (CAA), хромогранин А, антигена эпителиального муцина (MC5), специфичный эпителиальный антиген человека (E1A), антиген Lea, антиген меланомы, меланомаассоциированные антигены 100, 25 и 150, муциноподобный карциномаассоциированный антиген, белок, связанный со множественной лекарственной устойчивостью (MRPm6), белок, связанный со множественной лекарственной устойчивостью (MRP41), белок онкогена Neu (C-erbB-2), нейрон-специфическая енолаза (NSE), Р-гликопротеин (генный продукт mdr1), антиген, связанный со множественной лекарственной устойчивостью, p170, антиген, связанный со множественной лекарственной устойчивостью, простатоспецифический антиген (PSA), CD56, и NCAM.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, мутированный белок F и опухолевый антиген. В конкретном варианте осуществления мутированный белок F, является высоко фузогенным. В конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F имеет мутированный сайт расщепления (такой как описано в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления мутированный белок F содержит аминокислотную мутацию L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридный NDV сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является белком из другого типа или штамма NDV, отличного от основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения L289A мутированный белок F имеет один, два или три остатка аргинина в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является дополнительным белком к белку F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F заменяет собой белок F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует (i) агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки и (ii) гетерологичный антагонист интерферона. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и гетерологичный антагонист интерферона. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и гетерологичный антагонист интерферона. Примеры гибридного NDV, сконструированного таким образом, чтобы экспрессиро-

вать гетерологичные антагонисты интерферона см., например, в публикации заявки на патент США № 2012-0058141, которая включена в настоящую заявку путем ссылки.

Антагонисты интерферона могут быть идентифицированы с помощью любого метода, известного специалисту в данной области техники, включая, например, методы, описанные в патентах США №№ 6635416; 7060430 и 7442527, которые полностью включены в настоящую заявку путем ссылки. В конкретном варианте осуществления изобретения гетерологичный антагонист интерферона представляет собой вирусный белок. Такие вирусные белки могут быть получены или выделены из любого вируса, и этот вирус может инфицировать любые виды (например, вирус может инфицировать человека или не являющихся человеком млекопитающих). Примеры гетерологичных антагонистов интерферона включают без ограничений белок W вируса Нипах, белок V вируса Нипах, белок VP35 вируса Эбола, белок E3L вируса коровьей оспы, белок NS1 вируса гриппа, белок NS2 респираторно-синцитиального вируса (RSV), белок ICP34.5 вируса простого герпеса (HSV) типа 1, протеаза NS3-4 вируса гепатита С, доминантно-негативный клеточные белки, которые блокируют индукцию или ответ врожденного иммунитета (например, STAT1, MyD88, IKK и TBK) и клеточные регуляторы врожденного иммунного ответа (например, белки SOCS, белки PIAS, белки CYLD, белок Ikb, белок Atg5, белок Pin1, белок IRAK-M и UBP43). Дополнительную информацию о гетерологичных антагонистах интерферона см., например, в публикации заявки на патент США № 2012-0058141, которая полностью включена в настоящую заявку путем ссылки.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, мутированный белок F и гетерологичный антагонист интерферона. В конкретном варианте осуществления мутированный белок F, является высоко фузогенным. В конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F имеет мутированный сайт расщепления (такой как описано в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления мутированный белок F содержит аминокислотную мутацию L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридный NDV сконструирован таким образом, чтобы экспресировать мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является белком из другого типа или штамма NDV, отличного от основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения L2 8 9A мутированный белок F имеет один, два или три остатка аргинина в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является дополнительным белком к белку F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F заменяет собой белок F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и проапоптотную молекулу. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и проапоптотную молекулу. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и проапоптотную молекулу. Конкретные примеры проапоптотных молекул включают без ограничений Bax, Bak, Bad, BID, Bcl-xS, Bim, Noxa, Puma, AIF, FasL и TRAIL.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, мутированный белок F и проапоптотную молекулу. В конкретном варианте осуществления мутированный белок F, является высоко фузогенным. В конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F имеет мутированный сайт расщепления (такой как описано в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления мутированный белок F содержит аминокислотную мутацию L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридный NDV сконструирован таким образом, чтобы экспресировать мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является белком из другого типа или штамма NDV, отличного от основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения L289A мутированный белок F имеет один, два или три остатка аргинина в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является дополнительным белком к белку F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F заменяет собой белок F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста

ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и антиапоптозную молекулу. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и антиапоптозную молекулу. В конкретном варианте осуществления изобретения геном NDV сконструирован таким образом, что он экспрессирует антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и антиапоптозную молекулу. Конкретные примеры антиапоптозных молекул включают без ограничений Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 и XIAP.

В другом аспекте в настоящем описании описаны гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует агониста костимулирующего сигнала и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, мутированный белок F и антиапоптозную молекулу. В конкретном варианте осуществления мутированный белок F, является высоко фузогенным. В конкретном варианте осуществления изобретения мутированный белок F имеет мутированный сайт расщепления (такой как описано в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления мутированный белок F содержит аминокислотную мутацию L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридный NDV сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является белком из другого типа или штамма NDV, отличного от основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения L289A мутированный белок F имеет один, два или три остатка аргинина в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутированный белок F является дополнительным белком к белку F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F заменяет собой белок F основного NDV. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутированный белок F включен в вирион.

В некоторых аспектах в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует проапоптозную молекулу. В некоторых аспектах в настоящем описании предложены гибридные NDV, содержащие геном, сконструированный таким образом, что он экспрессирует антиапоптозную молекулу. Примеры проапоптозных молекул и антиапоптозных молекул приведены в настоящем описании.

Любой тип или штамм NDV может использоваться в качестве основы, которая сконструирована таким образом, чтобы экспрессировать агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и в некоторых вариантах осуществления изобретения сконструирована таким образом, чтобы экспрессировать цитокин, опухолевый антиген, гетерологичный антагонист интерферона, проапоптозную молекулу, антиапоптозную молекулу и/или мутированный белок F, включая без ограничений встречающиеся в природе штаммы, варианты или мутанты, мутагенизированные вирусы, реассортанты и/или генноинженерные вирусы. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой встречающийся в природе штамм. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, который служит основой для генноинженерных манипуляций, представляет собой литический штамм. В других вариантах осуществления изобретения NDV, который служит основой для генноинженерных манипуляций, представляет собой нелитический штамм. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, который служит основой для генноинженерных манипуляций, представляет собой лентогенный штамм. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV, который служит основой для генноинженерных манипуляций, представляет собой мезогенный штамм. В других вариантах осуществления изобретения NDV, который служит основой для генноинженерных манипуляций, представляет собой везогенный штамм. Конкретные примеры штаммов NDV включают без ограничений штамм 73-T, штамм NDV HUI, штамм Ulster, штамм MTH-68, штамм Italien, штамм Hickman, штамм PV701, штамм Hitchner B1, штамм La Sota (см., например, Genbank No. AY845400), штамм YG97, штамм MET95, штамм Roakin и штамм F48E9. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV, который служит основой для генноинженерных манипуляций, представляет собой штамм Hitchner B1. В другом конкретном варианте осуществления изобретения NDV, используемый в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии, представляет собой штамм B1, зарегистрированный в Genbank под номерами No. AF309418 или NC_002617. В другом конкретном варианте осуществления изобретения NDV, который служит основой для генноинженерных манипуляций, представляет собой NDV, депонированный в коллекции ATCC под номером No. VR2239. В другом конкретном варианте осуществления изобретения NDV, который служит основой для генноинженерных манипуляций, представляет собой штамм La Sota.

В некоторых вариантах осуществления изобретения желательна такая аттенуация или дополнительная аттенуация гибридного NDV, в результате которой гибридный NDV остается по меньшей мере частично инфекционным, и может реплицироваться *in vivo*, но образует только низкие титры, вызывающие инфекцию на субклиническом уровне, который не является патогенным (см., например, Khattar et al, 2009, J. Virol. 83: 7779-7782). В конкретном варианте осуществления изобретения NDV аттенуируют

путем делеции белка V. Такой аттенюированный гибридный NDV может оказаться особенно подходящим для вариантов осуществления изобретения, в которых вирус вводится субъекту, чтобы действовать в качестве иммуногена, например, живой вакцины. Вирусы могут быть аттенюированы любым способом известным из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV экспрессирует один, два, три или более или все из следующих и суицидальных генов: (1) агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки; (2) антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки; (3) цитокин; (4) опухолевый антиген; (5) гетерологичный антагонист интерферона; (6) проапоптозная молекула; (7) антиапоптозная молекула и/или (8) мутированный белок F. В конкретных вариантах осуществления изобретения, кроме экспрессии агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и в некоторых вариантах осуществления изобретения мутированного белка F и цитокина, гибридный NDV сконструирован таким образом, чтобы экспрессировать суицидальный ген (например, тимидинкиназу) или другую молекулу, которая ингибирует репликацию или функционирование NDV (ген, который делает NDV чувствительным к антибиотикам или противовирусному агенту). В некоторых вариантах осуществления изобретения, кроме экспрессии агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки такой как, например, Т-лимфоцит или NK-клетка, и в некоторых вариантах осуществления изобретения мутированного белка F и цитокина, гибридный NDV сконструирован таким образом, чтобы кодировать сайты-мишени для тканеспецифичных молекул микроРНК (миРНК) (например, сайты-мишени для miR-21, miR-184, miR-133a/133b, miR-137, и/или miR-193a молекул микроРНК).

В некоторых вариантах осуществления изобретения тропизм гибридного NDV является измененным. В конкретном варианте осуществления изобретения тропизм вируса изменяют путем модификации сайта расщепления белка F, таким образом, чтобы он распознавался тканеспецифичными или опухолевоспецифичными протеазами, таким как матриксные металлопротеиназы (ММР) и урокиназа. В других вариантах осуществления изобретения тропизм вируса изменяют путем введения сайтов-мишеней для тканеспецифичных молекул микроРНК. В конкретных вариантах осуществления изобретения белок HN NDV модифицируют таким образом, чтобы он распознавался опухолевоспецифичным рецептором.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько из следующих генов экспрессируются гибридным NDV в виде гибридного белка или слитого белка: (1) агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки; (2) антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки; (3) цитокин; (4) опухолевый антиген; (5) гетерологичный антагонист интерферона; (6) проапоптозная молекула; (7) антиапоптозная молекула и/или (8) мутированный белок F. В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный белок или слитый белок содержит трансмембранный и цитоплазматический домены или их фрагменты белка F NDV или белка HN NDV, и внеклеточный домен, который содержит одну из молекул, упомянутых в предыдущем предложении. Описание таких гибридных белков или слитых белков см. в заявке на патент США № 2012-0122185 и публикации Международной заявки № WO 2007/064802, которые включены в настоящую заявку путем ссылки.

В описанных в настоящем описании вариантах осуществления изобретения агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной может быть встроен в геном основного NDV между двумя транскрипционными единицами. В конкретном варианте осуществления изобретения агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной встроен в геном основного NDV между транскрипционными единицами М и Р или между транскрипционными единицами HN и L. В соответствии с другими описанными в настоящем описании вариантами осуществления изобретения цитокин, опухолевый антиген, гетерологичный антагонист интерферона, проапоптозная молекула, антиапоптозная молекула и/или мутированный белок F встроены в геном основного NDV между двумя или более транскрипционными единицами (например, между транскрипционными единицами М и Р или между транскрипционными единицами HN и L).

5.2.1. Агенты, стимулирующие иммунные клетки

Описанные в настоящем описании гибридные NDV могут быть сконструированы, чтобы экспрессировать любой агонист костимулирующего сигнала и/или любой антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки такой как, например, Т-лимфоцит, NK-клетка или антигенпрезентирующая клетка (например, дендритная клетка или макрофаг), известный специалисту в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления изобретения агонист и/или антагонист представляет собой агонист человеческого костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагонист человеческого ингибирующего сигнала иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения агонист костимулирующего сигнала представляет собой агонист костимулирующей молекулы (например, костимулирующего рецептора), находящейся на иммунных клетках, таких как, например, Т-лимфоциты (например, CD4+ или CD8+ Т-лимфоциты), NK-клетки и/или антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки или макрофаги). Конкретные примеры костимулирующих молекул включают глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR), индуцируемый Т-клеточный костимуля-

тор (ICOS или CD278), OX40 (CD134), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), CD40, лимфотоксин альфа (LT альфа), LIGHT (гомолог лимфотоксина, имеющий индуцибельную экспрессию и конкурирующий с гликопротеином D вируса простого герпеса за связывание с рецептором HVEM, экспрессируемым Т-лимфоцитами), CD226, молекула цитотоксических и регуляторных Т-клеток (CRTAM), рецептор смерти 3 (DR3), рецептор лимфотоксина-бета (LTBR), трансмембранный активатор и партнер CAML (TACI), рецептор фактора активации В-клеток (BAFFR) и белок созревания В-клеток (BCMA). В конкретных вариантах осуществления изобретения агонист представляет собой агонист человеческого костимулирующего рецептора иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения агонист костимулирующего рецептора не является агонистом ICOS. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист представляет собой антагонист ингибирующей молекулы (например, ингибиторного рецептора), находящейся на иммунных клетках, таких как, например, Т-лимфоциты (например, CD4+ или CD8+ Т-лимфоциты), NK-клетки и/или антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки или макрофаги). Конкретные примеры ингибирующих молекул включают антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4 или CD52), белок программируемой клеточной смерти 1 (PD1 или CD279), аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров (KIR), ген активации лимфоцитов 3 (LAG3), Т-клеточный мембранный белок 3 (TIM3), рецептор аденозина A2a (A2aR), Т-клеточный иммунорецептор с иммуноглобулиновым и ITIM доменами (TIGIT), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1) и CD160. В конкретных вариантах осуществления изобретения антагонист представляет собой антагонист человеческого ингибиторного рецептора иммунной клетки.

В конкретном варианте осуществления изобретения агонист костимулирующего рецептора представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с костимулирующим рецептором. Конкретные примеры костимулирующих рецепторов включают GITR, ICOS, OX40, CD27, CD28, 4-1BB, CD40, LT альфа, LIGHT, CD226, CRTAM, DR3, LTBR, TACI, BAFFR и BCMA. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. В других конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой фрагмент scFv. В конкретном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой биспецифичное антитело, которое связывается с двумя рецепторами на иммунной клетке. В других вариантах осуществления изобретения биспецифичное антитело связывается с рецептором на иммунной клетке и другим рецептором на раковой клетке. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело экспрессируется в виде гибридного белка с белком F NDV или его фрагментом, или с белком HN NDV или его фрагментом. Описание получения гибридного F и гибридного HN белков см., например, в публикации заявки на патент США № 2012/0122185, которая включена в настоящую заявку путем ссылки. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридный белок представляет собой гибридный белок F, описанный ниже в разделах 6 и/или 7. Методики, описанные ниже для получения гибридного белка ICOSL-F и гибридного белка CD28-F, могут быть использованы для получения других гибридных белков F или гибридных белков HN.

В другом варианте осуществления изобретения агонист костимулирующего рецептора представляет собой лиганд костимулирующего рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд представляет собой фрагмент нативного лиганда. Конкретные примеры нативных лигандов включают ICOSL, B7RP1, CD137L, OX40L, CD70, медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), CD80 и CD86. Нуклеотидные последовательности, кодирующие нативные лиганды, а также аминокислотные последовательности нативных лигандов, хорошо известны из уровня техники. Например, нуклеотидные и аминокислотные последовательности следующих лигандов могут быть найдены в базе данных GenBank под следующими регистрационными номерами: B7RP1 (также известный как ICOSL) - человеческий: NM_015259.4, NP_056074.1 мышинный: NM_015790.3, NP_056605.1; CD137L человеческий: NM_003811.3, NP_003802.1, мышинный: NM_009404.3, NP_033430.1; OX40L - человеческий: NM_003326.3, NP_003317.1, мышинный: NM_009452.2, NP_033478.1; CD70 - человеческий: NM_001252.3, NP_001243.1, мышинный: NM_011617.2, AAD00274.1; CD80 - человеческий: NM_005191.3, NP_005182.1, мышинный: NM_009855.2, NP_033985.3; и CD86 - человеческий: NM_005191.3, CAG46642.1, мышинный: NM_019388.3, NP_062261.3. В других вариантах осуществления изобретения лиганд представляет собой производное нативного лиганда. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере часть нативного лиганда или производного нативного лиганда, которая специфично связывается с костимулирующим рецептором, и гетерологичную аминокислотную последовательность. В конкретных вариантах осуществления изобретения слитый белок содержит по меньшей мере часть нативного лиганда или производного нативного лиганда, которая специфично связывается с костимулирующим рецептором, и Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент. Примером слитого лигандного белка является лиганд 4-1BB, слитый с Fc-фрагментом иммуноглобулина (описан в Messek M et al., J Immunother. 2011 34: 175-82). В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд экспрессируется в виде гибридного белка с белком F NDV или его фрагментом, или с белком HN NDV или его фрагментом. В конкретном варианте осуществления изобретения

белок представляет собой гибридный белок HN, описанный ниже в разделе 7. Методики, описанные ниже для получения гибридного белка HN-GITRL, гибридного белка HN-OX40-L, гибридного белка HN-4-1BBL и/или гибридного белка HN-CD4 0L, могут быть использованы для получения других гибридных белков F или гибридных белков HN.

В другом варианте осуществления изобретения антагонист ингибиторного рецептора представляет собой антитело (или антигенсвязывающий фрагмент) или растворимый рецептор, которые специфично связываются с нативным лигандом ингибиторного рецептора и блокируют связывание нативного лиганда с ингибиторным рецептором и передачу ингибирующего сигнала(ов). Конкретные примеры нативных лигандов ингибиторных рецепторов включают PDL-1, PDL-2, B7-H3, B7-H4, HVEM, Gal9 и аденозин. Конкретные примеры ингибиторных рецепторов, которые связываются с нативными лигандами включают CTLA-4, PD-1, BTLA, KIR, LAG3, TIM3 и A2aR.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антагонист ингибиторного рецептора представляет собой растворимый рецептор, который специфично связывается с нативным лигандом ингибиторного рецептора и блокируют связывание нативного лиганда с ингибиторным рецептором и передачу ингибирующего сигнала(ов). В некоторых вариантах осуществления изобретения растворимый рецептор представляет собой фрагмент нативного ингибиторного рецептора или фрагмент производного нативного ингибиторного рецептора, который специфично связывается с нативным лигандом (например, внеклеточный домен нативного ингибиторного рецептора или производного нативного ингибиторного рецептора). В некоторых вариантах осуществления изобретения растворимый рецептор представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере часть нативного ингибиторного рецептора или производного нативного ингибиторного рецептора (например, внеклеточный домен нативного ингибиторного рецептора или производного нативного ингибиторного рецептора) и гетерологичную аминокислотную последовательность. В конкретных вариантах осуществления изобретения слитый белок содержит по меньшей мере часть нативного ингибиторного рецептора или производного нативного ингибиторного рецептора и Fc-фрагмент иммуноглобулина или его фрагмент. Примером белка, слитого с растворимым рецептором, является слитый белок LAG3-Ig (описанный в Huard B et al, Eur J Immunol. 1995 25:2718-21).

В конкретных вариантах осуществления изобретения антагонист ингибиторного рецептора представляет собой антитело (или антигенсвязывающий фрагмент), которое специфично связывается с нативным лигандом ингибиторного рецептора и блокируют связывание нативного лиганда с ингибиторным рецептором и передачу ингибирующего сигнала(ов). В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. В других конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой фрагмент scFv. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. Конкретным примером антитела, специфичного по отношению к ингибиторному лиганду, является анти-PD-L1 антитело (Iwai Y, et al. PNAS 2002; 99: 12293-12297).

В другом варианте осуществления изобретения антагонист ингибиторного рецептора представляет собой антитело (или антигенсвязывающий фрагмент) или лиганд, которые связываются с ингибиторным рецептором, но не осуществляют передачу ингибирующего сигнала(ов). Конкретные примеры ингибиторных рецепторов включают CTLA-4, PD1, BTLA, KIR, LAG3, TIM3 и A2aR. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. В других конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой фрагмент scFv. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело. Конкретным примером антитела, специфичного по отношению к ингибиторному рецептору, является анти-CTLA-4 антитело (Leach DR, et al. Science 1996; 271: 1734-1736). Другим примером антитела, специфичного по отношению к ингибиторному рецептору, является анти-PD-1 антитело (Toralian SL, NEJM 2012; 28: 3167-75).

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV сконструирован так, чтобы экспрессировать антагониста CTLA-4, такого как, например, ипилимумаб или тремелидумаб. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV сконструирован так, чтобы экспрессировать антагониста PD1, такого как, например, MDX-1106 (BMS-936558), MK3475, CT-011, AMP-224 или MDX-1105. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV сконструирован так, чтобы экспрессировать антагониста LAG3, такого как, например, IMP321. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV сконструирован так, чтобы экспрессировать антитело (например, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или фрагмент scFv), которое связывается с B7-H3, таким как, например, MGA271. В конкретных вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV сконструирован так, чтобы экспрессировать агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, описанного ниже в раздел 6 и/или разделе 7. В конкретных вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV сконструирован так, чтобы экспрессировать анти-CD28 scvFv, ICOSL, CD40L, OX40L, CD137L, GITRL и/или CD70.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агонист костимулирующего сигнала иммунной

ной клетки и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки индуцирует, активирует и/или усиливает одну или несколько иммунных активностей, функций или реакций. Одна или несколько иммунных активностей, функций или реакций могут представлять собой, например, образование антител (гуморальный ответ) или клеточный иммунный ответ, например, секреция цитокинов (например, интерферона-гамма), активность клеток-хелперов или клеточную цитотоксичность. В одном варианте осуществления изобретения экспрессия маркеров активации на иммунных клетках (например, CD44, гранзима или Ki-67), экспрессия костимуляторного рецептора на иммунных клетках (например, ICOS, CD28, OX40 или CD27), экспрессия лиганда костимуляторного рецептора (например, B7HRP1, CD80, CD86, OX40L или CD70), секреция цитокинов, инфильтрация опухоли иммунными клетками (например, Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами и/или NK-клетками), синтез антител, эффекторная функция, активация Т-клеток, дифференцировка Т-клеток, пролиферация Т-клеток, дифференцировка В-клеток, пролиферация В-клеток и/или пролиферация NK-клеток индуцируются, активируются и/или усиливаются после контакта с агонистом костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагонистом ингибирующего сигнала иммунной клетки. В другом варианте осуществления изобретения инфильтрация в опухоль и пролиферация супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC), инфильтрация в опухоль, активация и пролиферация Treg, количество MDSC и Treg в периферической крови ингибируются после контакта с агонистом костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагонистом ингибирующего сигнала иммунной клетки.

5.3. Конструирование NDV

Описанные в настоящем описании NDV могут быть получены при помощи технологии обратной генетики. Технология обратной генетики включает приготовление синтетических рекомбинантных вирусных РНК, содержащих некодирующие области отрицательной цепи, вирусной РНК, которая является необходимой для распознавания вирусными полимеразми и для сигналов упаковки, необходимых для получения зрелого вириона. Рекомбинантные РНК синтезируют на рекомбинантной ДНК-матрице и инкубируют *in vitro* с очищенным вирусным полимеразным комплексом для получения рекомбинантных рибонуклеопротеинов (РНП), которые могут быть использованы для трансфекции клеток. Более эффективная трансфекция происходит, если белки вирусных полимераз присутствуют во время транскрипции синтетических РНК как *in vitro*, так и *in vivo*. Синтетические рекомбинантные РНП могут быть сохранены в инфекционных вирусных частицах. Вышеупомянутые методики описаны в следующих документах: патент США № 5166057, выдан 24 ноября 1992; патент США № 5854037, выдан 29 декабря 1998; патент США № 6146642, выдан 14 ноября 2000; публикация Европейского патента EP0702085A1, опубликована 20 февраля 1996; заявка на патент США № 09/152 845; публикации Международных патентных заявок РСТ WO97/12032, опубликована 3 апреля 1997; WO96/34625, опубликована 7 ноября 1996; публикация Европейского патента EP0780475; WO99/02657, опубликована 21 января 1999; WO98/53078, опубликована 26 ноября 1998; WO98/02530, опубликована 22 января 1998; WO99/15672, опубликована 1 апреля 1999; WO98/13501 опубликована 2 апреля 1998; WO97/06270, опубликована 20 февраля 1997; и EPO 780475A1, опубликована 25 июня 1997, каждый из этих документов полностью включен в настоящую заявку путем ссылки.

Плазмидная технология без использования вируса-помощника также может быть использована для конструирования описанного в настоящем описании NDV. В кратком изложении, получали полную кДНК NDV (например, штамма Hitchner B1), встраивали в плазмидный вектор и при помощи генноинженерных манипуляций в него вводили уникальный сайт рестрикции между двумя транскрипционными единицами (например, генами Р и М NDV; или генами HN и L NDV). Нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичную аминокислотную последовательность (например, нуклеотидная последовательность, кодирующая агонист костимулирующего сигнала и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки), может быть встроена в вирусный геном в этот уникальный сайт рестрикции. В альтернативном варианте нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичную аминокислотную последовательность (например, нуклеотидная последовательность, кодирующая агонист костимулирующего сигнала и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки), может быть встроена в транскрипционную единицу NDV, при условии, что эта вставка не повлияет на способность вируса инфицировать и реплицироваться. Один сегмент располагается между промотором Т7 и рибозимом вируса гепатита дельта для получения точного отрицательного транскрипта с Т7 полимеразы. Плазмидный вектор и экспрессионные векторы, содержащие необходимые вирусные белки, трансфицируют в клетки, что приводит к получению рекомбинантных вирусных частиц (см., например, Международную публикацию No.WO01/04333; Патенты США №№ 7442379, 6146642, 6649372, 6544785 и 7384774; работы Swayne et al. (2003). Avian Dis. 47: 1047-1050; и Swayne et al. (2001). J. Virol. 11868-11873, все они полностью включены в настоящую заявку путем ссылки).

Методики получения гибридного NDV, экспрессирующего антитело, известны из уровня техники. Описание получения рекомбинантного NDV, экспрессирующего полноразмерный IgG с двух трансгенов см., например, в Punier et al., Gene Ther. 15 (5): 371-283 (2008).

Бицистронные методы получения нескольких белков с одной мРНК известны специалисту в данной области техники. Бицистронные методы позволяют встраивать кодирующие последовательности не-

скольких белков в одну мРНК путем использования последовательностей IRES. Последовательности IRES управляют внутренней посадкой рибосом на молекулу РНК и обеспечивают дальнейшую трансляцию кэп-независимым образом. В кратком изложении, кодирующая область одного белка встраивается в ОРС второго белка. Эта вставка фланкируется последовательностями IRES и нетранслируемого сигнала, необходимыми для правильной экспрессии и/или функционирования. Вставка не должна разрушать открытую рамку считывания, сигналы полиаденилирования или транскрипционные промоторы второго белка (см., например, работы Garcia-Sastre et al., 1994, J. Virol. 68: 6254-6261 и Garcia-Sastre et al., 1994 Dev. Biol. Stand. 82: 237-246, каждая из которых полностью включена в настоящую заявку путем ссылки).

5.4. Размножение NDV

Описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть размножены в любом субстрате, который обеспечивает рост вируса до титров, которые позволяют использовать описанные в настоящем описании вирусы. В одном варианте осуществления изобретения субстрат обеспечивает рост описанных в настоящем описании NDV (например, гибридных NDV) до титров, сравнимых с теми, которые определены для соответствующих вирусов дикого типа (WT).

Описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут выращиваться в клетках (например, клетках птиц, клетках кур и т.п.), которые восприимчивы к инфекции этими вирусами, эмбрионированных яйцах (например, куриных яйцах или перепелиных яйцах) или животных (например, птицах). Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники. В конкретном варианте осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть размножены в раковых клетках, например, клетках карциномы (например, клетках рака молочной железы и клетках рака предстательной железы), клетках саркомы, лейкозных клетках, клетках лимфомы и клетках герминогенных опухолей (например, клетках рака яичка и клетках рака яичников). В другом конкретном варианте осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть размножены в клеточных линиях, например, линиях раковых клеток, таких как клетки HeLa, клетки MCF7, клетки THP-1, клетки U87, клетки DU145, клетки Lncap и клетки T47D. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки или клеточные линии (например, раковые клетки или линии раковых клеток) получены из организма человека и/или имеют человеческое происхождение. В другом варианте осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть размножены в куриных клетках или эмбрионированных яйцах. Примеры куриных клеток включают без ограничений фибробласты куриных эмбрионов и клетки почки куриных эмбрионов. В конкретном варианте осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть размножены в клетках Vero. В другом конкретном варианте осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть размножены в раковых клетках при помощи способов, описанных ниже в разделе 6 и/или в разделе 7. В другом конкретном варианте осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть размножены в куриных яйцах или перепелиных яйцах. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании вирус NDV (например, гибридный NDV) сначала размножают в эмбрионированных яйцах, а затем размножают в клетках (например, в клеточной линии).

Описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть размножены в эмбрионированных яйцах, например, в возрасте от 6 до 14 дней, от 6 до 12 дней, от 6 до 10 дней, от 6 до 9 дней, от 6 до 8 дней или от 10 до 12 дней. Для размножения описанных в настоящем описании NDV (например, гибридных NDV) могут быть использованы молодые или незрелые эмбрионированные яйца. Незрелые эмбрионированные яйца включают яйца возрастом менее десяти дней, например, яйца в возрасте от 6 до 9 дней или от 6 до 8 дней, которые являются IFN-дефицитными. Незрелые эмбрионированные яйца также включают яйца, которые искусственно имитируют незрелые яйца в возрасте десять дней и менее в результате изменений условий роста, например, изменение температуры инкубации; обработка лекарственным препаратом; или другие изменения, которые приводят к тому, что яйцо задерживается в развитии, так что его система IFN является не полностью развитой по сравнению с яйцами возрастом от десяти до двенадцати дней. Описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть размножены в различных местах эмбрионированного яйца, например, в аллантоисной полости. Подробное обсуждение выращивания и размножения вирусов см., например, в патенте США № 6852522 и Патенте США № 7494808, оба из которых полностью включены в настоящую заявку путем ссылки.

Для выделения вируса, описанные в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) могут быть выделены из культуры клеток и отделены от клеточных компонентов при помощи, как правило, хорошо известных способов очистки, например, таких как градиентное центрифугирование и колоночная хроматография, и затем при необходимости могут быть при помощи способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например, анализа бляшкообразования.

5.5. Композиции и способы введения

Настоящее изобретение относится к применению описанных в настоящем описании NDV (например, гибридных NDV) в композициях. Также настоящее изобретение относится к применению в компо-

зиях фрагментов цитоплазматической мембраны инфицированных NDV клеток или целых раковых клеток, инфицированных NDV. В конкретном варианте осуществления изобретения композиции представляют собой фармацевтические композиции, такие как иммуногенные препараты (например, вакцинные препараты). Эти композиции могут применяться в способах лечения рака.

В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит описанный в настоящем описании NDV (например, гибридные NDV) в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько дополнительных профилактических или терапевтических агентов, таких как описано ниже в разделе 5.6.4. В конкретном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит эффективное количество описанного в настоящем описании NDV (например, гибридных NDV) и, в некоторых случаях, один или несколько дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) является единственным активным ингредиентом, входящим в состав фармацевтической композиции.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция (например, онколитическая вакцина) содержит белковый концентрат или препарат фрагментов цитоплазматической мембраны из клеток, инфицированных NDV, в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько дополнительных профилактических или терапевтических агентов, таких как описано ниже в разделе 5.6.4. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция (например, цельноклеточная вакцина) содержит раковые клетки, инфицированные NDV, в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько дополнительных профилактических или терапевтических агентов, таких как описано ниже в разделе 5.6.4.

Предложенные в настоящем описании фармацевтические композиции могут находиться в любой форме, которая позволяет вводить эти композиции субъекту. В конкретном варианте осуществления изобретения фармацевтические композиции являются пригодными для введения животному и/или человеку. Используемый в настоящем описании термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный контролирующим органом федерального правительства или правительства штата, или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной Фармакопее для применения у животных и в частности у людей. Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или наполнителю, с которыми вводится фармацевтическая композиция. Растворы хлорида натрия и водные растворы декстрозы и глицерина могут использоваться в качестве жидких носителей, в частности для инъекционных растворов. Подходящие вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеролмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" автор E.W. Martin. Препарат должен соответствовать способу введения.

В конкретном варианте осуществления изобретения фармацевтические композиции имеют такую рецептуру, чтобы быть пригодными для введения субъекту предполагаемым способом. Например, фармацевтическая композиция может иметь рецептуру, пригодную для парентерального, внутривенного, внутриартериального, внутриплеврального, ингаляционного, внутрибрюшинного, перорального, внутрикожного, колоректального, внутричерепного и внутриопухового введения. В конкретном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция может иметь рецептуру, пригодную для внутривенного, внутриартериального, перорального, внутрибрюшинного, интраназального, интритрахиального, внутриплеврального, внутричерепного, подкожного, внутримышечного, местного, легочного или внутриопухового введения.

5.6. Противораковое применение и другие применения

В одном аспекте описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) может применяться в лечении рака. В одном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены способы лечения рака, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту описанного в настоящем описании гибридного NDV (например, гибридного NDV, описанного выше в разделе 5.2) или его композиции. В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложен способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества описанного в настоящем описании гибридного NDV (например, гибридного NDV, описанного выше в разделе 5.2) или его композиции.

В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, или его композиция вводится субъекту для лечения рака. В других конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, или его композиция вводится субъекту для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экс-

прессировать агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и мутированный белок F, или его композиция вводится субъекту для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки и мутированный белок F, или его композиция вводится субъекту для лечения рака.

Описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина, используемые в способах лечения рака, могут применяться в качестве любой линии терапии (например, первой, второй, третьей, четвертой или пятой линии терапии).

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) является единственным активным ингредиентом, вводимым для лечения рака. В конкретных вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) является единственным активным ингредиентом в композиции, вводимой для лечения рака.

Описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) или его композиция может вводиться субъекту местно или системно. Например, гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) или его композиция может вводиться субъекту парентерально (например, внутривенно, внутриартериально или подкожно), внутрь опухоли, внутриплеврально, интраназально, внутрибрюшинно, интракраниально, перорально, ректально, путем ингаляции, внутримышечно, местно или внутрикожно. В конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV вводят через печеночную артерию, например, при помощи инъекции в печеночную артерию, которая может быть выполнена при помощи интервенционной радиологии или путем установки насоса для внутриартериального вливания. В другом конкретном варианте осуществления изобретения гибридный NDV вводят во время операции, лапароскопически, или эндоскопически. В конкретном варианте осуществления изобретения, внутрибрюшинное введение гибридного NDV выполняется путем прямой инъекции, инфузии через катетер, или инъекции во время лапароскопии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные в настоящем описании способы включают лечение рака, для которого ни применимо никакое другое лечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) или его композиция вводится субъекту для лечения рака в качестве альтернативы другим общепринятым способам лечения.

В одном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложен способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом субъекту описанного в настоящем описании гибридного NDV (например, гибридного NDV, описанного выше в разделе 5.2) или его композиции и одной или нескольких дополнительных терапий, таких как описано ниже в разделе 5.6.4. В конкретном варианте осуществления изобретения одна или несколько терапий вводятся субъекту в комбинации с описанным в настоящем описании гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным выше в разделе 5.2) или его композицией для лечения рака. В конкретном варианте осуществления изобретения дополнительные терапии применяются в настоящее время, применялись, или известно, что они применимы для лечения рака. В другом варианте осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) или его композиция вводится субъекту в комбинации с поддерживающей терапией, болеутоляющей терапией или другой терапией, которая не оказывает терапевтического эффекта на течение рака. В конкретном варианте осуществления изобретения одна или несколько дополнительных терапий, вводимых в комбинации с описанным в настоящем описании гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным выше в разделе 5.2), представляют собой одну или несколько терапий, описанных ниже в разделе 5.6.4.1. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) и одну или несколько дополнительных терапий вводят в составе одной и той же композиции. В других вариантах осуществления изобретения гибридный NDV и одну или несколько дополнительных терапий вводят в составе различных композиций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения два, три или несколько NDV (включая один, два или несколько описанных в настоящем описании гибридных NDV, таких как один, два или несколько гибридных NDV, описанных выше в разделе 5.2) вводятся субъекту для лечения рака. Второй или последующие гибридные NDV, используемые в соответствии с описанными в настоящем описании способами, предусматривающими введение двух трех или нескольких NDV субъекту для лечения рака, могут представлять собой встречающиеся в природе гибридные NDV или генноинженерные гибридные NDV, сконструированные таким образом, чтобы экспрессировать гетерологичную аминокислотную последовательность (например, цитокин). Первый и второй гибридные NDV могут являться частью одной и той же фармацевтической композиции или различных фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый гибридный NDV и второй гибридный NDV вводятся одним и тем же путем введения (например, оба вводятся внутрь опухоли или внутривенно). В других вариантах осуществления изобретения первый гибридный NDV и второй гибридный NDV вводятся разными путями вве-

дения (например, один вводится внутрь опухоли, а другой вводится внутривенно).

В конкретных вариантах осуществления изобретения первый гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, вводится пациенту для лечения рака в комбинации со вторым гибридным NDV, сконструированным таким образом, чтобы экспрессировать антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки. В других конкретных вариантах осуществления изобретения первый гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, вводится в комбинации со вторым гибридным NDV, сконструированным таким образом, чтобы экспрессировать один, два или несколько из следующих продуктов: цитокин (например, IL-2), гетерологичный антагонист интерферона, опухолевый антиген, проапоптозную молекулу и/или антиапоптозную молекулу. В конкретном варианте осуществления изобретения первый гибридный NDV, второй гибридный NDV или оба этих вируса экспрессируют мутированный белок F, который повышает фузогенную активность гибридного NDV. В другом конкретном варианте осуществления изобретения первый гибридный NDV, второй гибридный NDV или оба этих вируса экспрессируют мутированный белок F с мутацией в сайте расщепления (такой, как описано в настоящем описании).

В конкретных вариантах осуществления изобретения первая композиция (например, фармацевтическая композиция), содержащая первый гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки, вводится пациенту для лечения рака в комбинации со второй композицией (например, фармацевтической композицией), содержащей второй гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки. В других конкретных вариантах осуществления изобретения первая композиция (например, фармацевтическая композиция), содержащая первый гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать агониста костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или антагониста ингибирующего сигнала иммунной клетки, вводится в комбинации со второй композицией (например, фармацевтической композицией), содержащей второй гибридный NDV, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать один, два или несколько из следующих продуктов: цитокин (например, IL-2), гетерологичный антагонист интерферона, опухолевый антиген, проапоптозную молекулу и/или антиапоптозную молекулу. В конкретном варианте осуществления изобретения первый гибридный NDV, второй гибридный NDV или оба этих вируса экспрессируют мутированный белок F, который повышает фузогенную активность гибридного NDV. В другом конкретном варианте осуществления изобретения первый гибридный NDV, второй гибридный NDV или оба этих вируса экспрессируют мутированный белок F с мутацией в сайте расщепления (такой, как описано в настоящем описании).

В другом аспекте описанный в настоящем описании NDV (например, NDV, описанный выше в разделе 5.1) может применяться в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, таким как описаны в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4 (например, ниже в разделе 5.6.4.1), для лечения рака. В одном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены способы лечения рака, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту описанного в настоящем описании NDV (например, NDV, описанного выше в разделе 5.1) или его композиции и одной или нескольких дополнительных терапий, например, описанных в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4 (например, ниже в разделе 5.6.4.1). В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложен способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества описанного в настоящем описании NDV (например, NDV, описанного выше в разделе 5.1) или его композиции и эффективного количества одной или нескольких дополнительных терапий, например, описанных в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4 (например, ниже в разделе 5.6.4.1). В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV (например, NDV, описанный выше в разделе 5.1) и одна или несколько дополнительных терапий, например, описанных в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4 (например, ниже в разделе 5.6.4.1), вводятся в составе одной и той же композиции. В других вариантах осуществления изобретения NDV (например, NDV, описанный выше в разделе 5.1) и одна или несколько дополнительных терапий вводятся в составе различных композиций.

NDV, используемый в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, может вводиться системно или местно. Например, NDV или его композиция может вводиться субъекту парентерально (например, внутривенно, внутриартериально или подкожно), внутрь опухоли, внутриплеврально, интраназально, внутривнутрибрюшинно, интракраниально, перорально, ректально, путем ингаляции, внутримышечно, местно или внутрикожно. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV вводят через печеночную артерию, например, при помощи инъекции в печеночную артерию, которая может быть выполнена при помощи интервенционной радиологии или путем установки насоса для внутриартериального вливания. В другом конкретном варианте осуществления изобретения NDV вводят во время операции, лапароскопически, или эндоскопически. В конкретном варианте осуществления изобретения, внутривнутрибрюшинное введение NDV выполняется путем прямой инъекции, инфузии через катетер, или инъекции во время лапароскопии.

Описанный в настоящем описании NDV (например, NDV, описанный выше в разделе 5.1) или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, например, описанными в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4, могут применяться в качестве любой линии терапии (например, первой, второй, третьей, четвертой или пятой линии терапии) для лечения рака в соответствии с описанным в настоящем описании способом.

В другом аспекте целые раковые клетки, инфицированные описанным в настоящем описании гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным выше в разделе 5.2), могут применяться для лечения рака. В конкретном варианте осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) может быть приведен в контакт с раковой клеткой или популяцией раковых клеток, и инфицированная раковая клетка или популяция раковых клеток может быть введена субъекту для лечения рака. В одном варианте осуществления изобретения раковые клетки обрабатывают гамма-излучением перед инфицированием описанным в настоящем описании гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным выше в разделе 5.2). В другом варианте осуществления изобретения раковые клетки обрабатывают гамма-излучением после инфицирования описанным в настоящем описании гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным выше в разделе 5.2). В конкретном варианте осуществления изобретения раковые клетки обрабатывают перед введением субъекту, в результате чего, раковые клетки не могут размножаться в организме субъекта. В конкретном варианте осуществления изобретения раковые клетки не могут размножаться в организме субъекта, и вирус не может инфицировать субъекта. В одном варианте осуществления изобретения раковые клетки перед введением субъекту обрабатывают гамма-излучением. В другом варианте осуществления изобретения раковые клетки перед введением субъекту обрабатывают ультразвуком. В другом варианте осуществления изобретения раковые клетки перед введением субъекту обрабатывают митомицином C. В другом варианте осуществления изобретения раковые клетки перед введением субъекту подвергают замораживанию и оттаиванию. В другом варианте осуществления изобретения раковые клетки перед введением субъекту подвергают тепловой обработке. Раковые клетки могут вводиться субъекту местно или системно. Например, раковые клетки могут вводиться субъекту парентерально (например, внутривенно, внутриартериально или подкожно), внутрь опухоли, интраназально, перорально, путем ингаляции, интритплеврально, местно или внутрикожно. В конкретном варианте осуществления изобретения раковые клетки вводятся субъекту внутрь опухоли или в кожу (например, внутрикожно). Используемые раковые клетки могут быть аутологичными или аллогенными. В конкретном варианте осуществления изобретения основа гибридного NDV представляет собой нелитический штамм. Раковые клетки могут вводиться субъекту отдельно или в комбинации с дополнительной терапией. Раковые клетки предпочтительно входят в состав фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковые клетки вводятся в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, например, описанными ниже в разделе 5.6.4. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковые клетки и одна или несколько дополнительных терапий вводятся в составе одной и той же композиции. В других вариантах осуществления изобретения раковые клетки и одна или несколько дополнительных терапий вводятся в составе различных композиций. В другом аспекте целые раковые клетки, инфицированные описанным в настоящем описании NDV (например, NDV, описанным выше в разделе 5.1), могут применяться для лечения рака в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, описанными в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4. В одном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены способы лечения рака, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту целых раковых клеток, инфицированных описанным в настоящем описании NDV (например, NDV, описанным выше в разделе 5.1), в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, описанными в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4. В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложен способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества целых раковых клеток, инфицированных описанным в настоящем описании NDV (например, NDV, описанным выше в разделе 5.1), в комбинации с эффективным количеством одной или нескольких дополнительных терапий, описанных в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4. В некоторых вариантах осуществления изобретения целые раковые клетки, инфицированные описанным в настоящем описании NDV (например, NDV, описанным выше в разделе 5.1), и одна или несколько дополнительных терапий, описанных в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4, вводятся в составе одной и той же композиции. В других вариантах осуществления изобретения целые раковые клетки, инфицированные описанным в настоящем описании NDV (например, NDV, описанным выше в разделе 5.1), и одна или несколько дополнительных терапий вводятся в составе различных композиций.

В другом аспекте белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны из лизированных раковых клеток, инфицированных гибридным NDV (например, гибридным NDV, описанным выше в разделе 5.2), могут быть использованы для лечения рака. В одном варианте осуществления изобретения препарат цитоплазматической мембраны, содержащий фрагменты из раковых клеток, инфицированных описанным в настоящем описании гибридным NDV, может применяться для лечения рака. В другом варианте осуществления изобретения белковый концентрат из раковых клеток, инфицированных описан-

ным в настоящем описании гибридным NDV, может применяться для лечения рака. Для получения белкового концентрата и препарата цитоплазматической мембраны могут использоваться методики, известные специалисту в данной области техники. В конкретном варианте осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанным выше в разделе 5.2) может быть приведен в контакт с раковой клеткой или популяцией раковых клеток, и инфицированная раковая клетка или популяция раковых клеток может быть лизирована с помощью методик, известных специалисту в данной области техники, для получения белкового концентрата или фрагментов цитоплазматической мембраны NDV-инфицированных раковых клеток, и белковый концентрат или фрагменты цитоплазматической мембраны NDV-инфицированных раковых клеток могут быть введены субъекту для лечения рака. Белковый концентрат или фрагменты цитоплазматической мембраны NDV-инфицированных раковых клеток могут вводиться субъекту местно или системно. Например, белковый концентрат или фрагменты цитоплазматической мембраны могут вводиться субъекту парентерально, внутрь опухоли, интраназально, внутривенно, перорально, путем ингаляции, местно или внутрикожно. В конкретном варианте осуществления изобретения такой белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны вводится субъекту внутрь опухоли или в кожу (например, внутрикожно). Раковые клетки, используемые для получения белкового концентрата или препарата цитоплазматической мембраны, могут быть аутологичными или аллогенными. В конкретном варианте осуществления изобретения основа гибридного NDV представляет собой литический штамм. Белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны могут вводиться субъекту отдельно или в комбинации с дополнительной терапией. Белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны предпочтительно входят в состав фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны вводятся в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, например, описанными ниже в разделе 5.6.4. (например, в разделе 5.6.4.1). В некоторых вариантах осуществления изобретения белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны и одна или несколько дополнительных терапий вводятся в составе одной и той же композиции. В других вариантах осуществления изобретения белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны и одна или несколько дополнительных терапий вводятся в составе различных композиций.

В другом аспекте белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны из лизированных раковых клеток, инфицированных NDV (например, NDV, описанным выше в разделе 5.1), могут быть использованы для лечения рака в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, например, описанными в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4 (например, в разделе 5.6.4.1). В одном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложены способы лечения рака, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту белкового концентрата или препарата цитоплазматической мембраны из лизированных раковых клеток, инфицированных NDV (например, NDV, описанным выше в разделе 5.1), в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, например, описанными в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4 (например, в разделе 5.6.4.1). В конкретном варианте осуществления изобретения в настоящем описании предложен способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества белкового концентрата или препарата цитоплазматической мембраны из лизированных раковых клеток, инфицированных NDV (например, NDV, описанным выше в разделе 5.1), в комбинации с эффективным количеством одной или нескольких дополнительных терапий, например, описанных в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4 (например, в разделе 5.6.4.1). В некоторых вариантах осуществления изобретения белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны и одна или несколько дополнительных терапий, например, описанных в настоящем описании ниже в разделе 5.6.4, вводятся в составе одной и той же композиции. В других вариантах осуществления изобретения белковый концентрат или препарат цитоплазматической мембраны и одна или несколько дополнительных терапий вводятся в составе различных композиций.

В другом аспекте описанные в настоящем описании гибридные NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) могут быть использованы для получения антител, которые могут применяться в диагностическом иммуноанализе, пассивной иммунотерапии и получении антиидиотипических антител. Например, описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2) может вводиться субъекту (например, мыши, крысе, свинье, лошади, ослу, птице или человеку) для получения антител, которые затем могут быть выделены и использованы, например, в диагностическом анализе, пассивной иммунотерапии и получении антиидиотипических антител. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV (например, NDV, описанный выше в разделе 5.1 или 5.2) вводится субъекту (например, мыши, крысе, свинье, лошади, ослу, птице или человеку) в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, например, описанными ниже в разделе 5.6.4, для получения антител, которые затем могут быть выделены и использованы, например, в диагностическом анализе, пассивной иммунотерапии и получении антиидиотипических антител. Полученные антитела могут быть выделены при помощи стандартных методик, известных из уровня техники (например, иммуноаффинной хроматографии, центрифугирова-

ния, осаждения, и т.п.) и использованы в диагностическом иммуноанализе, пассивной иммунотерапии и получении антиидиотипических антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, полученные от субъектов, которым вводили описанный в настоящем описании гибридный NDV (например, гибридный NDV, описанный выше в разделе 5.2), или полученные от субъектов, которым вводили описанный в настоящем описании NDV (например, NDV, описанный выше в разделе 5.1 или 5.2) в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, например, описанными ниже в разделе 5.6.4., применяются для оценки экспрессии белков NDV, гетерологичного пептида или белка, экспрессируемого гибридным NDV, и того и другого. Любая система иммунологического анализа, известная из уровня техники, может быть использована для этой цели, включая без ограничений системы конкурентного и неконкурентного анализа, использующие такие методики, как, в числе прочих, радиоиммуноанализ, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), "сэндвич" иммуноанализ, реакции преципитации, реакция диффузной преципитации в геле, иммунодиффузионный анализ, реакция агглютинации, реакция связывания комплемента, иммунорадиометрический анализ, флуоресцентный иммуноанализ, иммуноанализ белка А и иммуно-электрофоретический анализ.

5.6.1. Круг пациентов

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится субъекту, страдающему от ракового заболевания. В других вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится субъекту, предрасположенному или восприимчивому к раковому заболеванию. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится субъекту, у которого диагностировано раковое заболевание. Конкретные примеры типов ракового заболевания описаны в настоящем описании. В одном варианте осуществления изобретения субъект страдает метастатическим раком. В другом варианте осуществления изобретения субъект имеет раковое заболевание, находящееся в стадии 1, стадии 2, стадии 3 или стадии 4. В другом варианте осуществления изобретения субъект находится в стадии ремиссии. В еще одном варианте осуществления изобретения субъект имеет рецидив ракового заболевания.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится человеку, возраст которого составляет от 0 до 6 месяцев, от 6 до 12 месяцев, от 6 до 18 месяцев, от 18 до 36 месяцев, от 1 до 5 лет, от 5 до 10 лет, от 10 до 15 лет, от 15 до 20 лет, от 20 до 25 лет, от 25 до 30 лет, от 30 до 35 лет, от 35 до 40 лет, от 40 до 45 лет, от 45 до 50 лет, от 50 до 55 лет, от 55 до 60 лет, от 60 до 65 лет, от 65 до 70 лет, от 70 до 75 лет, от 75 до 80 лет, от 80 до 85 лет, от 85 до 90 лет, от 90 до 95 лет или от 95 до 100 лет. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится младенцу. В других вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится маленькому ребенку. В других вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится ребенку. В других вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится взрослому человеку. В еще других вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится пожилому человеку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится субъекту с нарушенным или ослабленным иммунитетом, или имеющему риск нарушения или ослабления иммунитета. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в

настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится субъекту, получающему иммуносупрессивную терапию или восстанавливающемуся после нее. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится субъекту, который страдает раковым заболеванием или имеет риск его развития. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект подвергается, будет подвергаться или подвергался хирургическому вмешательству, химиотерапии и/или лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент перенес хирургическую операцию по удалению опухоли или новообразования. В конкретных вариантах осуществления изобретения пациенту вводят NDV (например, гибридный NDV) или его композицию, описанную в настоящем описании онколизатную вакцину, или описанную в настоящем описании цельноклеточную вакцину, или описанную в настоящем описании комбинированную терапию, после хирургической операции по удалению опухоли или новообразования. В другом варианте осуществления изобретения пациенту вводят NDV (например, гибридный NDV) или его композицию, описанную в настоящем описании онколизатную вакцину, или описанную в настоящем описании цельноклеточную вакцину, или описанную в настоящем описании комбинированную терапию, до хирургической операции по удалению опухоли или новообразования. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится субъекту, который подвергается, будет подвергаться или подвергался пересадке тканей, пересадке органов или переливанию крови.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится пациенту, который был признан рефрактерным к другим видам терапии, кроме терапии гибридным NDV (например, гибридный NDV) или его композицией, онколизатной вакциной, цельноклеточной вакциной или комбинированной терапией, но больше не получает этих видов терапии. В конкретном варианте осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится пациенту, который был признан рефрактерным к химиотерапии. В одном варианте осуществления изобретения то, что рак является рефрактерным к терапии означает, что по меньшей мере некоторая значительная часть раковых клеток не уничтожается или их клеточное деление не подавляется. Определение того, являются ли раковые клетки рефрактерными к терапии, может быть проведено или *in vivo* или *in vitro* при помощи любого способа, известного из уровня техники для оценки действия терапии на раковые клетки, используя применимое в данной области техники значение термина "рефрактерный" в таком контексте. В конкретном варианте осуществления изобретения рефрактерный пациент является пациентом, рефрактерным к стандартной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент с раковым заболеванием является рефрактерным к терапии, когда опухоль или новообразование в значительной степени не ликвидируются и/или симптомы в значительной степени не облегчаются. Определение того, является ли пациент рефрактерным к терапии, может быть проведено или *in vivo* или *in vitro* при помощи любого способа, известного из уровня техники для оценки эффективности лечения рака, используя применимое в данной области техники значение термина "рефрактерный" в таком контексте.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент, подлежащий лечению в соответствии с описанными в настоящем описании способами, является пациентом, уже получающим в качестве лечения антибиотики, противовирусную, противогрибковую или другую биологическую терапию/иммунотерапию или противораковую терапию. Среди этих пациентов есть невосприимчивые пациенты и пациенты, которые слишком молоды для общепринятых видов терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, которому вводится NDV (например, гибридный NDV), описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия, не получал терапии до введения гибридного NDV или композиции, онколизатной вакцины или цельноклеточной вакцины или комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится пациенту для предотвращения появления рака у пациента, имеющего риск развития ракового заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения химические соединения вводятся пациенту, который является чувствительным к нежелательным побочным реакциям на общепринятые виды терапии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, которому вводится NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбини-

рованная терапия, не получал до этого никакой терапии. В других вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия вводится, который получал терапию до введения NDV (например, гибридного NDV) или его композиции, онколизатной вакцины, цельноклеточной вакцины или комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, которому вводится NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, или описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия, имел нежелательные побочные реакции на предшествующую терапию, или предшествующая терапия была прекращена из-за неприемлемого уровня токсичности для субъекта.

5.6.2. Дозы и частота введения

Количество NDV или его композиции, онколизатной вакцины или цельноклеточной вакцины, которое будет эффективным при лечении рака, будет зависеть от природы рака, способа введения, общего состояния здоровья пациента и т.д., и должно выбираться в соответствии с решением лечащего врача. Стандартные клинические методики, такие как *in vitro* анализ, при необходимости могут быть использованы для того, чтобы помочь определить оптимальные диапазоны доз. Однако подходящие диапазоны доз NDV для введения, как правило, составляют примерно 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} или 10^{12} БОЕ, и наиболее предпочтительно от примерно 10^4 до примерно 10^{12} , от 10^6 до 10^{12} , от 10^8 до 10^{12} , от 10^9 до 10^{12} или от 10^9 до 10^{11} , и они могут вводиться субъекту один, два, три, четыре или более раз с интервалами так часто, как это необходимо. Диапазоны доз онколизатных вакцин для введения могут включать 0,001 мг, 0,005 мг, 0,01 мг, 0,05 мг, 0,1 мг, 0,5 мг, 1,0 мг, 2,0 мг, 3,0 мг, 4,0 мг, 5,0 мг, 10,0 мг, от 0,001 мг до 10,0 мг, от 0,01 мг до 1,0 мг, от 0,1 мг до 1 мг и от 0,1 мг до 5,0 мг, и они могут вводиться субъекту один, два, три или более раз с интервалами так часто, как это необходимо. Диапазоны доз цельноклеточных вакцин для введения могут включать 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} или 10^{12} клеток, и они могут вводиться субъекту один, два, три или более раз с интервалами так часто, как это необходимо. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекту вводятся дозы NDV, онколизатных вакцин или цельноклеточных вакцин, аналогичные тем, которые в настоящее время используются в клинических испытаниях этих препаратов. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых зависимости "доза-эффект", полученных в экспериментах *in vitro* или тест-системах с животными моделями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV (например, гибридный NDV) или его композиция вводится субъекту в виде одной дозы с последующей второй дозой, спустя период времени от 1 до 6 недель, от 1 до 5 недель, от 1 до 4 недель, от 1 до 3 недель, от 1 до 2 недель. В соответствии с этими вариантами осуществления изобретения бустерное введение субъекту может быть осуществлено спустя 6-12 месяцев после второго введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводится субъекту в виде одной дозы с последующей второй дозой, спустя период времени от 1 до 6 недель, от 1 до 5 недель, от 1 до 4 недель, от 1 до 3 недель, от 1 до 2 недель.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение тех же самых NDV (например, гибридного NDV) или его композиции, онколизатной вакцины или цельноклеточной вакцины может быть повторено, и интервал между этими введениями может составлять по меньшей мере 1 день, 2 дня, 3 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 15 дней, 21 день, 28 дней, 30 дней, 45 дней, 2 месяца, 75 дней, 3 месяца или по меньшей мере 6 месяцев. В других вариантах осуществления изобретения введение тех же самых NDV (например, гибридного NDV) или его композиции, онколизатной вакцины или цельноклеточной вакцины может быть повторено, и интервал между этими введениями может составлять от 1 до 14 дней, от 1 до 7 дней, от 7 до 14 дней, от 1 до 30 дней, от 15 до 30 дней, от 15 до 45 дней, от 15 до 75 дней, от 15 до 90 дней, от 1 до 3 месяцев, от 3 до 6 месяцев, от 3 до 12 месяцев или от 6 до 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый NDV (например, первый гибридный NDV) или его композиция вводится субъекту с последующим введением второго NDV (например, второго гибридного NDV) или его композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения интервал между введениями первого и второго NDV (например, первого и второго гибридного NDV) или их композиций может составлять по меньшей мере 1 день, 2 дня, 3 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 15 дней, 21 день, 28 дней, 30 дней, 45 дней, 2 месяца, 75 дней, 3 месяца или по меньшей мере 6 месяцев. В других вариантах осуществления изобретения интервал между введениями первого и второго NDV (например, первого и второго гибридного NDV) или их композиций может составлять от 1 до 14 дней, от 1 до 7 дней, от 7 до 14 дней, от 1 до 30 дней, от 15 до 30 дней, от 15 до 45 дней, от 15 до 75 дней, от 15 до 90 дней, от 1 до 3 месяцев, от 3 до 6 месяцев, от 3 до 12 месяцев или от 6 до 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV или его композиция или онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводится субъекту в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями, описанными, например, ниже в разделе 5.6.4. Дозировка этих одной или не-

скольких дополнительных терапий будет зависеть от различных факторов, включая, например, терапию, природу рака, способ введения, общее состояние здоровья субъекта и т.д., и должна выбираться в соответствии с решением лечащего врача. В конкретных вариантах осуществления изобретения доза другой терапии, применяемая в соответствии со способами настоящего изобретения, является дозой и/или частотой введения терапии, рекомендованной для этой терапии при использовании ее в качестве единственного агента. В других вариантах осуществления изобретения доза другой терапии, применяемая в соответствии со способами настоящего изобретения, является меньшей, чем доза и/или частота введения терапии, рекомендованная для этой терапии при использовании ее в качестве единственного агента. Рекомендованные дозы одобренных терапий могут быть найдены в справочнике лекарственных средств.

В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV или его композиция или онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводится субъекту одновременно с введением одной или нескольких дополнительных терапий. В других вариантах осуществления изобретения NDV или его композиция или онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводится субъекту каждые 3-7 дней, 1-6 недель, 1-5 недель, 1-4 недели, 2-4 недели, 1-3 недели или 1-2 недели, и одна или несколько дополнительных терапий (например, описанных ниже в разделе 5.6.4.) вводится каждые 3-7 дней, 1-6 недель, 1-5 недель, 1-4 недели, 2-4 недели, 1-3 недели или 1-2 недели. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV или его композиция или онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводится субъекту каждые 1-2 недели, и одна или несколько дополнительных терапий (например, описанных ниже в разделе 5.6.4.) вводится каждые 2-4 недели. В некоторых вариантах осуществления изобретения NDV или его композиция или онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводится субъекту каждую неделю, и одна или несколько дополнительных терапий (например, описанных ниже в разделе 5.6.4.) вводится каждые 2 недели.

5.6.3. Виды рака

Конкретные примеры видов рака, которые можно лечить при помощи описанных в настоящем описании способов, включают без ограничений: лейкозы, такие как, но без ограничений, острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, такой как, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритроцитарный лейкозы и синдром миелодисплазии; хронические лейкозы, такие как, но без ограничений, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфолейкоз, лейкоз ворсистых клеток; истинная полицитемия; лимфомы, такие как, но без ограничений, болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома; множественные миеломы, такие как, но без ограничений, вялотекущая множественная миелома, несекреторная миелома, остеосклеротическая миелома, плазмноклеточный лейкоз, солитарная плазмоцитома и экстрамедуллярная плазмоцитома; макроглобулинемию Вальденстрема; моноклональную гаммапатию неясного генеза; доброкачественную моноклональную гаммапатию; болезнь тяжелых цепей; саркомы костной и соединительной ткани, такие как, но без ограничений, саркома кости, остеосаркома, хондросаркома, саркома Юинга, гигантоклеточная саркома, фибросаркомы кости, хордома, периостальная саркома, саркомы мягких тканей, ангиосаркома (гемангиосаркома), фибросаркома, саркома Капоши, лейомиосаркома, липосаркома, лимфангиосаркома, неврилеммома, рабдомиосаркома, синовиальная саркома; опухоли мозга, такие как, но без ограничений, глиома, астроцитома, глиома ствола головного мозга, эпендимомы, олигодендроглиомы, неглиальная опухоль, мультиформная глиобластома, неврилеммома слухового нерва, краниофарингиома, медуллобластома, менингиома, пинеоцитома, пинеобластома, первичная лимфома головного мозга; рак молочной железы, включая, но без ограничений, карциному из эпителия протоков, аденокарциному, лобулярную карциному, интрадуктальную карциному, медуллярный рак молочной железы, слизистый рак молочной железы, тубулярный рак молочной железы, папиллярный рак молочной железы, болезнь Педжета, и воспалительный рак молочной железы; рак надпочечников, такой как, но без ограничений, феохромоцитома и аденокортикальная карцинома; рак щитовидной железы, такой как, но без ограничений, папиллярный или фолликулярный рак щитовидной железы, медуллярный рак щитовидной железы и анапластический рак щитовидной железы; рак поджелудочной железы, такой как, но без ограничений, инсулинома, гастринома, глюкагонома, ВИПома, опухоль соматостатин-секретирующих клеток и карциноидная опухоль или опухоль островковых клеток; рак гипофиза, такой как, но без ограничений, болезнь Кушинга, опухоль пролактин-секретирующих клеток гипофиза, акромегалия и несахарный диабет; рака глаза, такой как, но без ограничений, меланомы глаза, такая как меланома радужки, хороидальная меланома и меланома ресничного тела и ретинобластома; вагинальный рак, такой как плоскоклеточная карцинома, аденокарцинома и меланома; рак вульвы, такой как плоскоклеточная карцинома, меланома, аденокарцинома, базальноклеточная карцинома, саркома и болезнь Паджета; рак шейки матки, такой как, но без ограничений, плоскоклеточная карцинома и аденокарцинома; рак матки, такой как, но без ограничений, карцинома эндометрия и саркомы матки; рак яичников, такой как, но без ограничений, карцинома эпителиалия яичников, опухоли, пограничная опухоль, герминогенная опухоль и стромальная опухоль; рака пищевода, такой как, но без ограничений, плоскоклеточный рак, аденокарцинома, аденокистозная карцинома, мукоэпидермоидная карцинома, аденосквамозная карцинома, саркома, меланома, плазмоцитома, бородавчатый рак, и овсяно-клеточный рак; рак желудка, такой как, но без ограничений, аденокарцинома, некротический (полиплоидный), язвенный, поверхностно распространяющийся, диф-

фузно распространяющийся рак, злокачественная лимфома, липосаркома, фибросаркома и карциносаркома; рак толстой кишки; рак прямой кишки; рак печени, такой как, но без ограничений, гепатоцеллюлярная карцинома и гепатобластома; рак желчного пузыря, такой как аденокарцинома; холангиокарциному, такую как, но без ограничений, папиллярная, нодулярная и диффузная холангиокарцинома; рак легких, такой как немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточная карцинома (эпидермоидная карцинома), аденокарцинома, крупноклеточная карцинома и мелкоклеточный рак легких; рака яичка, такой как, но без ограничений, герминома, семиномы, анапластическая, классическая (типичная), сперматоцитная, несемиомная, эмбриональная карцинома, тератоидная карцинома, хориокарцинома (опухоль желточного мешка), рак предстательной железы, такой как, но без ограничений, внутриэпителиальная неоплазия предстательной железы, аденокарцинома, лейомиосаркома и рабдомиосаркома; рак полового члена; рак ротовой полости, такой как, но без ограничений, плоскоклеточная карцинома; базальноклеточный рак; рак слюнных желез, такой как, но без ограничений, аденокарцинома, мукоэпидермоидная карцинома и аденокистозная карцинома; рак глотки, такой как, но без ограничений, плоскоклеточный рак и бородавчатый рак; рак кожи, такой как, но без ограничений, базальноклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома и меланома, поверхностная распространяющаяся меланома, нодулярная меланома, меланома типа злокачественного лентигио, акральная лентигинозная меланома; рака почки, такой как, но без ограничений, почечно-клеточная карцинома, аденокарцинома, гипернефрома, фибросаркома, переходноклеточный рак (почечной лоханки и/или мочеточника); опухоль Вильмса; рака мочевого пузыря, такой как, но без ограничений, переходно-клеточный рак, плоскоклеточный рак, аденокарцинома, карциносаркома. Кроме того, рак включает миксосаркому, остеогенную саркому, эндотелиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, слюниому, синовиому, гемангиобластому, эпителиальную карциному, цистаденокарциному, бронхогенную карциному, карциному потовых желез, карциному слюнных желез, папиллярную карциному и папиллярную аденокарциному (описание этих заболеваний см. в Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America).

В конкретном варианте осуществления изобретения описанный в настоящем описании гибридный NDV или его композиции, описанная в настоящем описании онколизатная вакцина, описанная в настоящем описании цельноклеточная вакцина, или описанная в настоящем описании комбинированная терапия применимы для лечения различных типов рака и заболеваний, связанных с нарушением пролиферации, включая, но без ограничений, следующие типы: карцинома, в том числе карцинома мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почки, печени, легких, яичников, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы и кожи; в том числе плоскоклеточная карцинома; гемопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, в том числе, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома Беркитта; гемопоэтические опухоли миелоидного происхождения, в том числе острый и хронический миелогенные лейкозы и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимального происхождения, в том числе фибросаркома и рабдомиосаркома; другие опухоли, включая меланому, семиному, тератокарциному, тератобластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, в том числе астроцитомы, нейробластома, глиома и шваннома; опухоли мезенхимального происхождения, в том числе фибросаркома, рабдомиосаркома и остеосаркома; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные в настоящем описании способы применяются для лечения видов рака, связанного с нарушением апоптоза. Такие виды рака могут включать, но без ограничений, фолликулярные лимфомы, карциномы с мутациями гена p53, гормонозависимые опухоли молочной железы, предстательной железы и яичников, и предраковые состояния, такие как семейный аденоматозный полипоз, и синдромы миелодисплазии. В конкретных вариантах осуществления изобретения описанные в настоящем описании способы применяются для лечения злокачественных или диспролиферативных изменений (таких как метаплазия и дисплазия) или гиперпролиферативных заболеваний кожи, легких, печени, костного мозга, желудка, толстой кишки, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, почек, поджелудочной железы, яичника и/или матки. В других конкретных вариантах осуществления изобретения описанные в настоящем описании способы применяются для лечения саркомы или меланомы.

В конкретном варианте осуществления изобретения рак, который лечат при помощи описанных в настоящем описании способов, представляет собой лейкоз, лимфому или миелому (например, множественную миелому). Конкретные примеры лейкоза и других гематологических типов рака, которые подлежат лечению в соответствии с описанными в настоящем описании способами, включают без ограничений острый лимфобластный лейкоз "ОЛЛ", острый лимфобластный В-клеточный лейкоз, острый лимфобластный Т-клеточный лейкоз, острый миелобластный лейкоз "ОМЛ", острый промиелоцитарный лейкоз "ОПЛ", острый монобластный лейкоз, острый эритроцитарный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз, острый нелимфоцитарный лейкоз, острый недифференцированный лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз "ХМЛ", хронический лимфоцитарный лейкоз

"ХЛЛ" и лейкоз ворсистых клеток.

Конкретные примеры лимфом, которые подлежат лечению в соответствии с описанными в настоящем описании способами, включают без ограничений лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и истинную полицитемию.

В другом варианте осуществления изобретения рак, который лечат при помощи описанных в настоящем описании способов, представляет собой солидную опухоль. Примеры солидных опухолей, которые подлежат лечению в соответствии с описанными в настоящем описании способами, включают без ограничений фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак почки, рак поджелудочной железы, рак кости, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, рак пищевода, рак желудка, рак ротовой полости, рак носовой полости, рак горла, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчного протока, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, рак яичка, карциному легкого, карциному мочевого пузыря, рак легких, эпителиальную карциному, глиому, глиобластому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, менингиому, рак кожи, меланому, нейробластому и ретинобластому. В другом варианте осуществления изобретения рак, который лечат при помощи описанных в настоящем описании способов, является метастатическим. В другом варианте осуществления изобретения рак, который лечат при помощи описанных в настоящем описании способов, является злокачественным.

В конкретном варианте осуществления изобретения рак, который лечат при помощи описанных в настоящем описании способов, представляет собой рак, который имеет плохой прогноз и/или слабо реагирует на применение традиционных видов терапии, таких как химиотерапия и облучение. В другом конкретном варианте осуществления изобретения рак, который лечат при помощи описанных в настоящем описании способов, представляет собой злокачественную меланому, злокачественную глиому, почечно-клеточную карциному, аденокарциномы поджелудочной железы, злокачественную плевральную мезотелиому, аденокарциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, анапластический рак щитовидной железы и плоскоклеточную карциному головы и шеи. В другом конкретном варианте осуществления изобретения рак, который лечат при помощи описанных в настоящем описании способов, представляет собой тип рака, описанный ниже в разделе 6 и/или разделе 7.

5.6.4. Дополнительные терапии

Дополнительные терапии, которые могут использоваться в комбинации с описанным в настоящем описании NDV или его композицией, онколизатной вакциной или цельноклеточной вакциной для лечения рака включают без ограничений малые молекулы, синтетические лекарственные препараты, пептиды (включая циклические пептиды), полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты (например, ДНК и РНК нуклеотиды, включая без ограничения антисмысловые нуклеотидные последовательности, тройные спирали, интерферирующие РНК и нуклеотидные последовательности, кодирующие биологически активные белки, полипептиды или пептиды), антитела, синтетические или природные неорганические молекулы, миметические агенты и синтетические или природные органические молекулы. В конкретном варианте осуществления изобретения дополнительная терапия представляет собой химиотерапевтический агент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина применяются в комбинации с лучевой терапией, включающей в себя рентгеновское излучение, гамма-излучение и другие источники излучения для разрушения раковых клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения лучевая терапия осуществляется в виде наружной дистанционной лучевой терапии или телетерапии, где излучение направлено из удаленного источника. В других вариантах осуществления изобретения лучевая терапия осуществляется в виде внутренней терапии или брахитерапии, где радиоактивный источник помещают внутри организма пациента вблизи раковых клеток и/или опухолевой массы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная противораковая вакцина применяются в комбинации с адоптивной Т-клеточной терапией. В конкретном варианте осуществления изобретения Т-клетки, используемые в адоптивной Т-клеточной терапии, представляют собой опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, которые были выделены у субъекта, и конкретная Т-клетка или клон была размножена для использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетки, используемые в адоптивной Т-клеточной терапии, представляют собой Т-клетки, полученные из крови пациента, после того как ему ввели противораковую вакцину, и размноженные *in vitro* перед использованием. В другом конкретном варианте осуществления изобретения Т-клетки, используемые в адоптивной Т-клеточной терапии, представляют собой Т-клетки, на которые воздействовали для того, чтобы они эффективно рас-

познавали и атаковали опухоли. В другом конкретном варианте осуществления изобретения Т-клетки, используемые в адоптивной Т-клеточной терапии, были генетически модифицированы таким образом, чтобы экспрессировать Т-клеточный рецептор, специфичный по отношению к опухолевому антигену, или гибридный антигенный рецептор (ГАР). В конкретном варианте осуществления изобретения используемая адоптивная Т-клеточная терапия является аналогичной той, которая описана ниже в разделе 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная противораковая вакцина применяются в комбинации с цитокином. В конкретном варианте осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная противораковая вакцина применяются в комбинации с интерфероном (например, IFN- γ).

Доступные в настоящее время противораковые терапии, их дозы, способы введения и показания к применению известны из уровня техники и были описаны в такой литературе, как Physician's Desk Reference (67th ed., 2013).

Конкретные примеры противораковых агентов, которые могут применяться в комбинации с описанным в настоящем описании NDV или его композицией, включают: гормональные агенты (например, ингибитор ароматазы, селективный модулятор рецептора эстрогена (SERM) и антагонист рецептора эстрогена), химиотерапевтические агенты (например, блокатор разборки микротрубочек, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы и агента, сшивающий или повреждающий ДНК), антиангиогенные агенты (например, антагонист VEGF, антагонист рецептора, антагонист интегрина, агент, воздействующий на сосуды (VTA)/агент, разрушающий сосуды на сосуды (VDA)), лучевая терапия и обычная хирургия.

Неограничивающие примеры гормональных агентов, которые могут применяться в комбинации с описанным в настоящем описании NDV или его композицией, включают ингибиторы ароматазы, SERMs и антагонисты рецептора эстрогена. Гормональные агенты, которые являются ингибиторами ароматазы, могут быть стероидными или нестероидными. Неограничивающие примеры нестероидных гормональных агентов включают летрозол, анастрозол, аминоглютетимид, фазлозол и ворозол. Неограничивающие примеры стероидных гормональных агентов включают аромазин (экземестан), форместан и тестолактон. Неограничивающие примеры гормональных агентов, которые являются SERMs, включают тамоксифен (фирменное/торговое наименование Nolvadex®), афимоксифен, арзоксифен, базедоксифен, кломифен, фемарелле, лазофоксифен, ормелоксифен, ралоксифен и торемифен. Неограничивающие примеры гормональных агентов, которые являются антагонистами рецептора эстрогена, включают фулвестрант. Другие гормональные агенты включают без ограничений абиратерон и лонаприсан.

Неограничивающие примеры химиотерапевтических агентов, которые могут применяться в комбинации с описанным в настоящем описании NDV или его композицией, онколизатной вакциной или цельноклеточной вакциной, включают блокатор разборки микротрубочек, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы и агента, сшивающий или повреждающий ДНК. Химиотерапевтические агенты, которые являются блокаторами разборки микротрубочек, включают без ограничений таксаны (например, паклитаксел (фирменное/торговое наименование TAXOL®), доцетаксел, абраксан, ларотаксел, ортатаксел и тезетаксел); эпотилоны (например, иксабепилон); и алкалоиды барвинка (например, винорелбин, винбластин, виндезин и винкристин (фирменное/торговое наименование ONCOVIN®)).

Химиотерапевтические агенты, которые являются антиметаболитами, включают без ограничений антиметаболиты фолиевой кислоты (например, метотрексат, аминоптерин, пеметрексед, ралтитрексед); пуриновые антиметаболиты (например, кладрибин, клофарабин, флударабин, меркаптопурин, пентостатин, тиогуанин); пиримидиновые антиметаболиты (например, 5-фторурацил, капецитабин, гемцитабин (GEMZAR®), цитарабин, децитабин, флоксурин, тегафур); и дезоксирибонуклеотидные антиметаболиты (например, гидроксимочевина).

Химиотерапевтические агенты, которые являются ингибиторами топоизомеразы, включают без ограничений ингибиторы топоизомеразы класса I (камптотека) (например, топотекан (фирменное/торговое наименование Hycamtin®) иринотекан, рубитекан и белотекан); ингибиторы топоизомеразы класса II (подофилл) (например, этопозид или VP-16, и тенипозид); антрациклины (например, доксорубин, эпирубин, Доксил, акларубин, амрубин, даунорубин, идарубин, пирарубин, валрубин и зорубин); и антрацендионы (например, митоксантрон и пиксантрон).

Химиотерапевтические агенты, которые являются сшивающими (или повреждающими) ДНК агентами, включают без ограничений алкилирующие агенты (например, циклофосфамид, мехлорэтамин, ифосфамид (фирменное/торговое наименование IFEX®), трофосфамид, хлорамбуцил, мелфалан, преднимустин, бендамустин, урамустин, эстрамустин, кармустин (фирменное/торговое наименование BiCNU®), ломустин, семустин, фотемустин, нимустин, ранимустин, стрептозоцин, бусульфид, манносульфид, тресульфид, карбоксон, N,N'-триэтилендиотрифосфамид, триазиквон, триэтиленмеламин); подобные алкилирующие агенты (например, карбоплатин (фирменное/торговое наименование PARAPLATIN®), цисплатин, оксалиплатин, неапластин, триплатин, тетранитрат, сатраплатин, пикоплатин); неклассические ДНК сшивающие агенты (например, прокарбазин, дакарбазин, темозоломид (фирменное/торговое наименование TEMODAR®), алтретамин, митобронитол); и интеркалирующие агенты (на-

пример, актиномицин, блеомицин, митомицин и пликамицин).

5.6.4.1. Иммуномодуляторы

В конкретных вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводятся субъекту в комбинации с одним или несколькими из следующих иммуномодуляторов: любой агонист костимулирующего сигнала иммунной клетки (такой как, например, Т-лимфоцит, НК-клетка или антигенпрезентирующая клетка (например, дендритная клетка или макрофаг) и/или антагонист ингибирующего сигнала иммунной клетки (такой как, например, Т-лимфоцит, НК-клетка или антигенпрезентирующая клетка (например, дендритная клетка или макрофаг), известные специалисту в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводятся субъекту в комбинации с одним или несколькими из агонистов костимулирующего сигнала иммунной клетки, описанных выше в разделе 5.2.1. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводятся субъекту в комбинации с одним или несколькими из антагонистов ингибирующего сигнала иммунной клетки, описанных выше в разделе 5.2.1. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV (например, гибридный NDV) или его композиция, онколизатная вакцина или цельноклеточная вакцина вводятся субъекту в комбинации с одним или несколькими из агонистов костимулирующего сигнала иммунной клетки и/или одним или несколькими из антагонистов ингибирующего сигнала иммунной клетки, описанных ниже в разделе 6 и/или разделе 7 (например, анти-CTLA-4 антитело, ICOS-L, анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело).

5.7. Методы биологического анализа

Анализ вируса *in vitro*.

Анализ вируса включает измерение измененной вирусной репликации (определяемой, например, образованием бляшек) или синтеза вирусных белков (определяемого, например, при помощи Вестерн-блоттинга) или вирусных РНК (определяемого, например, при помощи ОТ-ПЦР или Нозерн-блоттинга) в культурах клеток *in vitro*, при помощи методов, хорошо известных в данной области техники.

Рост описанных в настоящем описании NDV можно оценить, используя методы, известные в данной области техники или описанные в настоящем описании (например, в культуре клеток (например, в культурах клеток почки куриных эмбрионов или в культурах фибробластов куриных эмбрионов (CEF)). Титр вируса может быть определен путем инокуляции серийных разведений описанного в настоящем описании NDV в культуры клеток (клетки CEF, клетки MDCK, клетки EFK-2, клетки Vero, primary эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC), линия эпителиальных клеток человека H292 или клетки HeLa), куриные эмбрионы или живых животных (например, птиц). После инкубации вируса в течение определенного времени, вирус выделяют при помощи стандартных методов. Физическое количественное определение титра вируса может быть выполнено при помощи ПЦР, оптимизированной для вирусных супернатантов (Quinn & Trevor, 1997; Morgan et al, 1990), реакции гемагглютинации, инфицирующих доз для тканевой культуры (TCID₅₀) или инфицирующих доз для куриных эмбрионов (EID₅₀). Пример способа определения титра вируса приведен ниже в разделе 6 и разделе 7.

Включение нуклеотидных последовательностей, кодирующих гетерологичный пептид или белок (например, цитокин, мутированный белок F, мутированный белок V или сайт-мишень для мРНК), в геном описанного в настоящем описании гибридного NDV можно определить способом, известным в данной области техники или описанным в настоящем описании (например, в культуре клеток, животной модели или культуре вируса в эмбрионированном яйце). Например, вирусные частицы из культуры клеток аллантоидной жидкости оплодотворенного яйца могут быть очищены путем центрифугирования в градиенте сахарозы и затем проанализированы на наличие экспрессии слитых белков при помощи Вестерн-блоттинга, используя методы, известные в данной области техники.

Подходы, основанные на иммунофлуоресценции, также могут быть использованы для обнаружения вируса и оценки вирусного роста. Такие подходы хорошо известны специалистам в данной области техники, например, флуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия (см. раздел 6 и раздел 7, ниже).

Анализ антител.

Антитела, генерируемые описанными в настоящем описании NDV, могут быть охарактеризованы различными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники (например, ELISA, метод поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore), Вестерн-блоттинг, иммунофлуоресценция, иммуноокрашивание и/или реакция микронейтрализации). В частности, антитела, генерируемые описанными в настоящем описании гибридным NDV, могут быть проанализированы на способность специфично связываться с антигеном вируса или гетерологичным пептидом или белком. Такой анализ может быть проведен в растворе (например, Houghten, 1992, Bio/Techniques 13: 412 421), на гранулах (Lam, 1991, Nature 354: 82 84), на чипах (Fodor, 1993, Nature 364: 555 556), в бактериях (патент США № 5223409), на спорах (патенты США №№ 5571698; 5403484 и 5223409), на плазмидях (Cull et al, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865 1869) или на фарах (Scott and Smith, 1990, Science 249: 386 390; Cwirla et al, 1990, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-6382; и Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222:301-310) (каждый из этих документов полностью включен в настоящую заявку путем ссылки).

Антитела, генерируемые описанными в настоящем описании гибридным NDV, для которых было установлено, что они специфично связываются с антигеном вируса или гетерологичным пептидом или белком, могут быть проанализированы на их специфичность к указанному антигену вируса или гетерологичному пептиду или белку. Антитела могут быть проанализированы на специфичное связывание с антигеном вируса или гетерологичным пептидом или белком и на их перекрестное реагирование с другими антигенами при помощи способов, известных в данной области техники. Иммунологический анализ, который может быть использован для анализа специфичного связывания и перекрестного реагирования, включает без ограничений системы конкурентного и неконкурентного анализа, использующие такие методики, как, в числе прочих, Вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), "сэндвич" иммуноанализ, реакции иммунопреципитации, реакция диффузной преципитации в геле, иммунодиффузионный анализ, реакция агглютинации, реакция связывания компонента, иммунорадиометрический анализ, флуоресцентный иммуноанализ, иммуноанализ белка А. Такие виды анализа являются обычными и хорошо известны в данной области техники (см., например, работу Ausubel et al, eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, которая полностью включена в настоящую заявку путем ссылки).

Аффинность связывания антитела с антигеном и скорость диссоциации при взаимодействии антитела с антигеном могут быть определены при помощи анализа конкурентного связывания. В другом варианте, метод поверхностного плазмонного резонанса (например, кинетический анализ BIAcore) или анализ кинетического исключения KinExA (Blake, et al., Analytical Biochem., 1999, 272:123-134) могут быть использованы для определения скоростей связывания и диссоциации антител с антигенами описанных в настоящем описании гибридных NDV.

Анализ IFN.

Индукция и высвобождение IFN в ответ на описанный в настоящем описании NDV могут быть определены при помощи методов, известных специалисту в данной области техники или описанных в настоящем описании. Например, количество IFN, индуцируемого в клетках после инфицирования их описанным в настоящем описании NDV, может быть определено при помощи иммуноанализа (например, ELISA или Вестерн-блоттинга) для измерения экспрессии IFN или для измерения экспрессии белка, экспрессия которого индуцируется IFN. В другом варианте, количество индуцируемого IFN может быть измерено на уровне РНК при помощи таких методов анализа, как Нозерн-блоттинг и количественная ОТ-ПЦР, которые известны специалисту в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления изобретения количество высвобождаемого IFN может быть измерено при помощи анализа методом иммуноферментных пятен (ELISPOT) (см., например, методы, описанные ниже в разделе 6 и разделе 7). Кроме того, индукция и высвобождение цитокинов могут быть измерены, например, при помощи иммуноанализа или ELISPOT анализа на уровне белков и/или количественной ОТ-ПЦР или Нозерн-блоттинга на уровне РНК. Описание анализа с целью измерения индукции и высвобождения цитокинов см. ниже в разделе 6 и/или разделе 7.

Анализ маркеров активации.

Методы оценки экспрессии маркера активации, костимулирующей молекулы, лиганда или ингибирующей молекулы иммунными клетками известны специалисту в данной области техники. Например, экспрессия маркера активации, костимулирующей молекулы, лиганда или ингибирующей молекулы иммунной клеткой (например, Т-лимфоцитом или NK-клеткой) может быть оценена при помощи проточной цитометрии. В конкретном варианте осуществления изобретения методы, описанные ниже в разделе 6 и/или разделе 7, используются для оценки экспрессии маркера активации, костимулирующей молекулы, лиганда или ингибирующей молекулы иммунной клеткой.

Анализ инфильтрации иммунных клеток.

Методы оценки инфильтрации иммунных клеток известны специалисту в данной области техники. В конкретном варианте осуществления изобретения методы, описанные ниже в разделе 6 и/или разделе 7, используются для оценки инфильтрации иммунных клеток.

Исследование токсичности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные в настоящем описании NDV или их композиции, описанные в настоящем описании онколизатные вакцины, или описанные в настоящем описании цельноклеточные вакцины, или описанные в настоящем описании комбинированные терапии испытывались на цитотоксичность для клеточных линий млекопитающих, предпочтительно человека (см., например, анализ цитотоксичности, описанный ниже в разделе 6 и/или разделе 7). В некоторых вариантах осуществления изобретения цитотоксичность оценивают в одном или нескольких из следующих неограничивающих примеров клеточных линий: клеточная линия моноцитов человека U937; первичные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC); клеточная линия гепатобластомы человека Huh7; клетки HL60, клетки HT1080, НЕК 293Т и 293Н, MLPC; клеточные линии мезонефросы человека; клеточные линии меланомы человека, такие как SkMel2, SkMel-119 и SkMel-197; моноциты человека THP-1; клеточная линия HeLa; клеточные линии нейробластомы, такие как MC-IXC, SK-N-MC, SK-N-

MC, SK-N-DZ, SH-SY5Y и BE(2)-C. В некоторых вариантах осуществления изобретения для оценки цитотоксичности используется анализ ToxLite.

Многие виды анализа, хорошо известные в данной области техники, могут применяться для оценки жизнеспособности клеток или клеточных линий после их инфицирования описанным в настоящем описании NDV или его композицией, или после их обработки описанной в настоящем описании онколизатной вакциной, или описанной в настоящем описании цельноклеточной вакциной, или описанной в настоящем описании комбинированной терапией, и таким образом определяется цитотоксичность NDV или его композиции, онколизатной вакцины, цельноклеточной вакцины или комбинированной терапии. Например, пролиферацию клеток можно оценить путем измерения включения бромдезоксисуридина (BrdU), включения (³H) тимидина, путем прямого подсчета клеток или путем обнаружения изменений в транскрипции, трансляции или активности известных генов, таких как протоонкогены (например, *fos*, *myc*) или маркеры клеточного цикла (*Rb*, *cdc2*, циклин A, D1, D2, D3, E, и т.п.). Уровни таких белков и мРНК и активность могут быть определены любым способом, известным в данной области техники. Например, количественное определение белков может быть проведено при помощи известных методов иммунодиагностики, таких как ELISA, Вестерн-блоттинг или иммунопреципитация, с использованием антител, в том числе коммерчески доступных антител. Количественное определение мРНК может быть проведено при помощи методов, которые являются хорошо известными и стандартными для данной области техники, например, при помощи Нозерн-блоттинга, защиты от РНКазы или полимеразной цепной реакции, объединенной с обратной транскрипцией. Жизнеспособность клеток можно оценить при помощи окрашивания трипановым синим или другими маркерами клеточной гибели или жизнеспособности, известными в данной области техники. В конкретном варианте осуществления изобретения для определения жизнеспособности клеток измеряют уровень клеточного АТФ. В предпочтительном варианте осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV или его композиция, онколизатная вакцина, цельноклеточная вакцина или комбинированная терапия уничтожают раковые клетки, но не уничтожают здоровые (т.е. нераковые) клетки. В одном варианте осуществления изобретения описанный в настоящем описании NDV или его композиция, онколизатная вакцина, цельноклеточная вакцина или комбинированная терапия преимущественно уничтожают раковые клетки, но не уничтожают здоровые (т.е. нераковые) клетки.

В конкретных вариантах осуществления изобретения жизнеспособность клеток измеряют в трехдневный и семидневный периоды при помощи анализа, стандартного для данной области техники, такого как набор реагентов CellTiter-Glo (Promega), при помощи которого измеряют уровень внутриклеточного АТФ. Уменьшение клеточного АТФ указывает на цитотоксическое действие. В другом конкретном варианте осуществления изобретения жизнеспособность клеток измеряют при помощи анализа связывания нейтрального красного. В других вариантах осуществления изобретения визуальное наблюдение морфологических изменений может включать увеличение в размерах, грануляцию, клетки с неровными краями, пленочный внешний вид, округление, отсоединение от поверхности лунки или другие изменения.

Описанные в настоящем описании NDV или их композиции, онколизатные вакцины, цельноклеточные вакцины или комбинированные терапии могут быть испытаны на токсичность *in vivo* в животных моделях (см., например, животные модели, описанные ниже в разделе 6 и/или разделе 7). Например, описанные в настоящем описании животные модели и/или другие животные модели, известные из уровня техники, используемые для оценки действия химических соединений на раковые опухоли, также могут быть использованы для определения *in vivo* токсичности описанных в настоящем описании NDV или их композиций, онколизатных вакцин, цельноклеточных вакцин или комбинированных терапий. Например, животным вводят различные количества БОЕ описанного в настоящем описании NDV (например, гибридного NDV, описанного выше в разделе 5.2). Затем наблюдают за животными для выявления таких показателей, как смерть, потеря массы или неспособности набирать массу, и/или измеряют в сыворотке крови уровень маркеров, которые могут служить показателями повреждения тканей (например, уровень креатинфосфокиназы, как показатель общего повреждения тканей, уровень трансаминазы глутаминовой-щавелевой кислоты или трансаминазы пировиноградной кислоты, как показатель возможного повреждения печени). Кроме оценки токсичности различных доз, эти анализы *in vivo* могут быть адаптированы для оценки токсичности при различных способах и/или схемах введения.

Токсичность и/или эффективность описанного в настоящем описании NDV или его композиции, описанной в настоящем описании онколизатной вакцины, описанной в настоящем описании цельноклеточной вакцины или описанной в настоящем описании комбинированной терапии могут быть определены при помощи стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или на экспериментальных животных, например, путем определения LD50 (летальная доза для 50% популяции) или ED50 (терапевтически эффективная доза для 50% популяции). Соотношение доз при токсической и терапевтической эффектах представляет собой терапевтический индекс, и он может быть выражен как отношение LD50/ED50. Терапии, которые обладают большим терапевтическим индексом, являются предпочтительными. При этом терапии, обладающие токсичными побочными эффектами, можно применять, соблюдая меры предосторожности, которые заключаются в разработке таких систем доставки, которые направляют

такие терапии непосредственно к поврежденной ткани, для того чтобы минимизировать возможное повреждение нераковых клеток и тем самым уменьшить побочные эффекты.

Данные, полученные из анализов культур клеток и исследований, проведенных на животных, могут быть использованы для определения диапазона доз терапий при их введении субъектам. Дозы таких агентов находятся преимущественно в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED50 с незначительной или отсутствующей токсичностью. Доза может колебаться в этом диапазоне в зависимости от используемой лекарственной формы и применяемого способа введения. Для любой описанной в настоящем описании терапии терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена на основе анализа культуры клеток. Доза может быть определена на животных моделях для достижения диапазона концентраций, циркулирующих в плазме крови, который включает IC50 (т.е. концентрацию гибридного NDV, при которой достигается половина максимального ингибирования симптомов), определенную в культуре клеток. Такая информация может быть использована для более точного определения доз, используемых для введения субъектам. Уровни концентрации в плазме крови могут быть измерены, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Противораковые исследования.

Описанные в настоящем описании NDV или их композиции, описанные в настоящем описании онколизатные вакцины, описанные в настоящем описании цельноклеточные вакцины или описанные в настоящем описании комбинированные терапии могут быть поверены на наличие у них биологической активности с использованием животных моделей рака. Такие животные модельные системы включают без ограничений крыс, мышей, кур, коров, обезьян, свиней, собак, кроликов и т.п. В конкретном варианте осуществления изобретения противораковая активность описанного в настоящем описании NDV или комбинированной терапии оценивается на мышинной модели. Такие модельные системы широко используются и хорошо известны специалисту в данной области техники, например, мышинная модель ТКИН или трансгенные мыши.

Противораковая активность описанного в настоящем описании NDV или его композиции, описанной в настоящем описании онколизатной вакцины, описанной в настоящем описании цельноклеточной вакцины или описанной в настоящем описании комбинированной терапии может быть определена путем введения NDV или его композиции, онколизатной вакцины, цельноклеточной вакцины или комбинированной терапии животной модели и проверки того, NDV или его композиция, онколизатная вакцина, цельноклеточная вакцина или комбинированная терапия являются эффективными в уменьшении тяжести ракового заболевания, уменьшении симптомов ракового заболевания, уменьшении метастаз при раковом заболевании и/или уменьшении размера опухоли у указанной животной модели (см., например, раздел 6 и/или раздел 7, ниже). Примеры животных моделей раковых заболеваний в основном включают без ограничений спонтанно появляющиеся опухоли у животных-компаньонов (см., например, Vail & MacEwen, 2000, *Cancer Invest* 18(8): 781-92). Примеры животных моделей рака легкого включают без ограничений животные модели рака легкого, описанные в Zhang & Roth (1994, *In-vivo* 8(5): 755-69), и трансгенные мышинные модели с нарушенной функцией гена p53 (см., например, Morris et al, 1998, *J La State Med Soc* 150(4): 17 9-85). Пример животной модели рака молочной железы включает без ограничений трансгенную мышь со сверхэкспрессией циклина D1 (см., например, Hosokawa et al., 2001, *Transgenic Res* 10(5): 471-8). Пример животной модели рака толстой кишки включает без ограничений мышь с двойным нокаутом генов TCR b и p53 (см., например, Kado et al., 2001, *Cancer Res.* 61(6): 2395-8). Примеры животной модели рака поджелудочной железы включает без ограничений метастатическую модель мышинной панкреатической аденокарциномы PancO2 (см., например, Wang et al., 2001, *Int. J. Pancreatol.* 29(1): 37-46) и голых мышей с подкожными опухолями поджелудочной железы (см., например, Ghaneh et al, 2001, *Gene Ther.* 8(3): 199-208). Примеры животных моделей неходжкинской лимфомы включают без ограничений мышей с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью ("ТКИН") (см., например, Bryant et al, 2000, *Lab Invest* 80(4): 553-73) и трансгенных мышей IgHmu-HOX11 (см., например, Hough et al, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(23): 13853-8). Пример животной модели рака пищевода включает в себя без ограничений трансгенную мышь для онкогена E7 вируса папилломы человека типа 16 (см., например, Herber et al, 1996, *J. Virol.* 70(3): 1873-81). Примеры животных моделей колоректальной карциномы включают без ограничений мышинные модели Arc (см., например, Fodde & Smits, 2001, *Trends Mol Med* 7(8): 369 73 и Kuraguchi et al, 2000). В конкретных вариантах осуществления изобретения животные модели раковых заболеваний, описанные ниже в разделе 6 и/или разделе 7, используются для оценки эффективности NDV или его композиции, онколизатной вакцины, цельноклеточной вакцины или комбинированной терапии.

6. Пример 1

В этом примере показана терапевтическая эффективность терапии NDV в комбинации с модуляторами иммунных контрольных точек, которые являются иммуностимулирующими в лечении рака.

6.1. Материалы и методы.

Мыши.

Мышей линии BALB/c (в возрасте 6-8 недель) и мышей линии WT C57BL/6 приобретали у компании Jackson Laboratory. Всех мышей содержали в клетках Micro-Isolator® и обращались с ними в соот-

ветствии с нормативными требованиями Национального института здравоохранения США и Американской ассоциации по уходу за лабораторными животными. Все манипуляции и эксперименты с мышами, проводимые в этом исследовании, были одобрены Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных Мемориального онкологического центра Слоана-Кеттеринга.

Клеточные линии.

Мышиные клеточные линии меланомы (B16-F10) и карциномы толстой кишки (CT26 и MC38) поддерживали в среде RPMI с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и пенициллина со стрептомицином. Мышиную клеточную линию рака предстательной железы TRAMP-C2 поддерживали в среде DMEM с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (FCS; Mediatech, Inc.), 5% сыворотки Nu Serum IV (BD Biosciences) HEPES, 2-ME, пенициллин/стрептомицином, L-глутамина, 5 мкг/мл инсулина (Sigma) и 10 ммоль/л DHT (Sigma).

Антитела.

Терапевтические анти-CTLA-4 (клон 9H10), анти-PD-1 (клон RMP1-14) и анти-PD-L1 моноклональные антитела были произведены компанией BioXcell. Антитела, используемые в проточной цитометрии, были приобретены у компаний eBioscience, Biolegend, Invitrogen и BD Pharmingen.

Вирусы и клонирование.

Во всех экспериментах использовали рекомбинантный лентогенный штамм NDV LaSota. Для получения вируса NDV, экспрессирующего мышиный ICOSL, фрагмент ДНК, кодирующий мышиный ICOSL, фланкированный соответствующими NDV-специфичными сигналами транскрипции РНК, встраивали в сайт узнавания рестриктазы SacII, созданный между генами Р и М конструкции рТ7NDV/LS. Вирусы спасали из кДНК, используя ранее описанные способы, и секвенировали при помощи ПЦР с обратной транскрипцией для определения правильности вставки. Титры вирусов определяли путем серийных разведений и иммунофлуоресценции в клетках Vero. Рекомбинантную слитую конструкцию ICOSL-F получали путем ПЦР амплификации ДНК ICOSL, кодирующей внеклеточный домен (аминокислоты 1-277) с фланкирующими сайтами рестрикции EcoRI и MluI, и ДНК F NDV, кодирующей трансмембранный и внутриклеточный домены белка F (аминокислоты 501-554) с фланкирующими сайтами рестрикции MluI и XhoI. Полученные фрагменты ДНК вместе встраивали в вектор рCAGGS при помощи трехчастного лигирования.

Эксперименты по инфицированию *in vitro*.

Для оценки активации экспрессии МНС I, МНС II и ICAM-1 на поверхности клеток NDV, и для оценки поверхностной экспрессии трансгена ICOSL из вируса NDV-ICOSL, клетки B16-F10 инфицировали в трех повторностях в 6-луночных планшетах при MOI, равной 2. Через двадцать четыре часа клетки собирали путем механического соскабливания и обрабатывали для мечения поверхности и количественного определения при помощи проточной цитометрии. Для экспериментов по определению кривой роста вируса клетки B16-F10 инкубировали при комнатной температуре с вирусом в 6-луночных культуральных планшетах с указанной MOI в общем объеме 100 мкл. Через час после инкубации инфекционную среду удаляли с помощью аспиратора и инкубировали клетки при температуре 37°C в 1 мл среды DMEM с 10% куриной аллантоисной жидкостью. Через 24, 48 и 72 ч отбирали супернатант и определяли титры вируса, как описано выше. Для экспериментов по определению цитотоксичности *in vitro* инфицирование проводили аналогичным образом. Спустя 24, 48, 72 и 96 часов после инфицирования клетки промывали и инкубировали с 1% Тритон X-100 при температуре 37°C в течение 30 мин. Активность ЛДГ в лизатах определяли при помощи набора реагентов CytoTox 96 (Promega) по инструкции фирмы-производителя.

Эксперименты по выживаемости при заражении опухолью.

Модели с двусторонней боковой опухолью получали для оценки терапевтической эффективности как в инъекционной, так и в системной опухоли. Схемы лечения и дозы клеток были установлены для каждой модели опухоли таким образом, чтобы добиться 10-20% очищения опухоли NDV или анти-CTLA-4/анти-PD-1 антителом в качестве единственных агентов. Для экспериментов по оценке эффективности комбинированной терапии NDV дикого типа (NDV-WT) с блокаторами иммунных контрольных точек, опухоли B16F10 имплантировали путем внутрикожной инъекции 2×10^5 клеток B16F10 в правый бок в день 0 и 5×10^4 клеток в левый бок в день 4. В дни 7, 10, 13 и 16 мышам вводили 4 внутриопухолевые инъекции 2×10^7 БОЕ NDV в PBS в общем объеме 100 мкл. Одновременно, в дни 7, 10, 13 и 16 мышам вводили 4 внутрибрюшинных инъекции анти-CTLA-4 антитела (100 мкг) или анти-PD-1 антитела (250 мкг). Контрольные группы внутрибрюшинно получали соответствующую дозу изотипного антитела и внутриопухолевую инъекцию PBS. Размер опухоли и ее распространение наблюдали в течение времени, проводя измерения с помощью штангенциркуля.

В случае модели TRAMP-C2, 5×10^5 клеток имплантировали в правый бок в день 0, и 5×10^5 клеток имплантировали в левый бок в день 8. Лечебные инъекции проводили в дни 11, 14, 17 и 20 аналогично тому, как описано выше.

Для экспериментов по оценке эффективности рекомбинантного NDV, экспрессирующего ICOSL, (NDV-ICOSL), опухоли B16F10 имплантировали путем внутрикожной инъекции 2×10^5 клеток B16F10 в

правый бок в день 0 и 1×10^5 клеток в левый бок в день 4. Лечение осуществляли, как описано выше.

В случае модели CT26, опухоли имплантировали путем внутрикожной инъекции в правый бок 1×10^6 клеток CT26 в день 0, и 1×10^6 клеток в левый бок в день 2. Лечение осуществляли, как описано выше в дни 6, 9 и 12.

Выделение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов.

Опухоли B16F10 имплантировали путем внутрикожной инъекции 2×10^5 клеток B16F10 в правый бок в день 0 и 2×10^5 клеток в левый бок в день 4. В дни 7, 10 и 13 мышам вводили 3 внутриопухолевые инъекции 2×10^7 БОЕ NDV и внутривенно вводили 100 мкг анти-CTLA-4 антитела или 250 мкг анти-PD-1 антитела, где указано. В день 15 мышей умерщвляли путем ингаляции CO_2 . Опухоли и дренирующие опухоли лимфатические узлы удаляли при помощи пинцета и хирургических ножниц и взвешивали. Опухоли от каждой группы животных измельчали ножницами перед инкубацией с 1,67 ед. Вюнша/мл либеразы и 0,2 мг/мл ДНКазы в течение 30 мин при температуре 37°C . Опухоли гомогенизировали путем повторного пипетирования и фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм. Клеточные суспензии однократно промывали полной средой RPMI и очищали в градиенте фиколла для удаления мертвых клеток. Клетки из дренирующих опухолей лимфатических узлов выделяли путем протирания лимфатических узлов через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм.

Проточная цитометрия.

Клетки, выделенные из опухолей и дренирующих опухолей лимфатических узлов, обрабатывали для мечения поверхности наборами для окрашивания из нескольких антител к CD45, CD3, CD4, CD8, CD44, PD-1, ICOS, CD11c, CD19, NK1.1, CD11b, F4/80, Ly6C и Ly6G. Фиксирующий краситель для живых клеток eFluor780 (eBioscience) использовали для того, чтобы отличить живые клетки. Затем клетки пермеабилizировали при помощи фиксации для FoxP3 и набора реагентов для пермеабилизации (eBioscience) и окрашивали для выявления Ki-67, FoxP3, гранзима B, CTLA-4 и IFN-гамма. Данные получали при помощи проточного цитометра LSRII (BD Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения Flow Jo (Treestar).

Очистка и нагрузка ДК.

Селезенки не подвергавшихся экспериментальному воздействию мышей выделяли и обрабатывали 1,67 ед. Вюнша/мл либеразы и 0,2 мг/мл ДНКазы в течение 30 мин при температуре 37°C . Полученные клеточные суспензии фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм и однократно промывали полной средой RPMI. CD11c+ дендритные клетки очищали при помощи положительного отбора с использованием магнитных частиц Miltenyi. Выделенные дендритные клетки культивировали в течение ночи с рекомбинантным GM-CSF и опухолевыми лизатами B16-F10 и очищали в градиенте фиколла.

Анализ синтеза цитокинов.

Клеточные суспензии из опухолей и дренирующих опухолей лимфатических узлов объединяли и обогащали для увеличения содержания Т-клеток, используя набор реагентов для очистки Т-клеток Miltenyi. Выделенные Т-клетки подсчитывали и совместно культивировали в течение 8 часов с дендритными клетками, нагруженными опухолевыми лизатами B16-F10, в присутствии 20 Ед/мл IL-2 (R&D) плюс брeфeлдин А (BD Bioscience). После повторной стимуляции лимфоциты обрабатывали для анализа при помощи проточной цитометрии, как описано выше.

Статистика.

Данные анализировали при помощи двустороннего критерия Стьюдента, и $P < 0,05$ считали статистически значимым.

6.2 Результаты.

Для того чтобы охарактеризовать противоопухолевый иммунный ответ, индуцируемый вирусом болезни Ньюкасла (NDV), оценивали экспрессию молекул МНС I и МНС II, а также ICAM-1 на поверхности *in vitro* инфицированных клеток. Как показано на фиг. 1, NDV-инфекция клеток меланомы B16 активирует экспрессию молекул МНС класса I, и МНС класса II, а также молекулы адгезии ICAM-1, которые считаются важными для рекрутинга опухольспецифичных лимфоцитов и активации противоопухолевого иммунного ответа. Затем противоопухолевый иммунный ответ, индуцированный инфекцией NDV *in vivo*, оценивали в мышинной модели меланомы и создавали двустороннюю боковую модель, которая позволяла осуществлять наблюдение за реакциями, как в инъектированных вирусом опухолях, так и в отдаленных опухолях, в которые не вводили вирус. Как показано на фиг. 2, в инъектированных вирусом опухолях наблюдалась значительная инфильтрация иммунными клетками, таким как NK-клетки, макрофаги и CD8 и CD4 клетки, но не регуляторными Т-клетками. Так как часть этого иммунного ответа могла быть ответом на вирус, а не на опухоль, то оценивали иммунный ответ на опухоли, находящиеся на противоположном боку (фиг. 3). Примечательно, что эти опухоли продемонстрировали аналогичную степень увеличения инфильтрации CD8 и CD4 эффекторными клетками, но не регуляторными Т-клетками. Анализ этих клеток показал, что они стимулируют активацию, пролиферацию и экспрессию маркеров лизиса (фиг. 4). Монотерапия NDV эффективно задерживала рост обработанных опухолей (фиг. 5A), но лишь незначительно замедляла рост опухолей на противоположном боку (фиг. 5B). Однако мыши, которые излечились от опухолей, имели некоторую степень защиты при дополнительном заражении опухо-

лю (фиг. 5D), что свидетельствует о том, что терапия NDV может вызывать длительный иммунитет.

Далее проводили оценку того, могут ли дополнительные механизмы быть задействованы для усиления противоопухолевого эффекта, создаваемого NDV. Характеристика опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов как из инъецированных NDV, так и из неинъецированных опухолей, выявила активацию ингибиторного рецептора CTLA-4 на лимфоцитах (фиг. 6). Затем проводили оценку того, может ли ингибирование рецептора CTLA-4 приводить к улучшенной терапевтической эффективности NDV. Неожиданно комбинированная терапия привела к отторжению двусторонних опухолей у большинства животных, и этот эффект не наблюдался при применении каждой из этих терапий по отдельности (фиг. 7). Этот эффект наблюдался даже в случае использования модели аденокарциномы предстательной железы TRAMP, которая не является чувствительной к вирусной инфекции (фиг. 8). Эти результаты свидетельствуют о том, что минимальной вирусной репликации и возникающего в результате воспалительного ответа оказалось достаточно для создания защитного противоопухолевого иммунитета.

Для определения того, может ли воздействие на другие иммунные контрольные точки в комбинации с терапией NDV оказывать благотворным, оценивали эффект, оказываемый на путь PD-1 - PD-L1, после инфекции NDV. Как показано на фиг. 9, опухолевые клетки, инфицированные NDV, как *in vitro*, так и *in vivo*, имели активацию экспрессии ингибирующего лиганда PD-L1 на поверхности клеток. Этот эффект не был просто результатом непосредственной инъекции вируса, так как он также наблюдался, когда неинфицированные клетки обрабатывали УФ-инактивированными супернатантами из инфицированных вирусом клеток (фиг. 9B), а также в контралатеральных неинфицированных опухолях (фиг. 9C). Это побудило провести испытания комбинированной терапии NDV и анти-PD-1-антител. Как и в случае с блокатором CTLA-4, терапия NDV в комбинации с анти-PD-1-антителами в модели агрессивной меланомы B16 приводила к излечению большинства животных, этот эффект был связан с повышенной инфильтрацией опухоли активированными эффекторными лимфоцитами (фиг. 10).

На протяжении проводимых исследований терапевтическая эффективность комбинированной терапии снижалась при заражении опухолью в большем количестве. Затем проводили оценку маркеров активации, которые могли бы обеспечить лучший ответ и могли бы стать мишенью при дальнейшем повышении терапевтической эффективности. Анализ лимфоцитов, выделенных из опухолей и дренирующих опухоль лимфатических узлов, выявил экспрессию костимулирующей молекулы ICOS, как один из маркеров активации у подвергшихся лечению животных (фиг. 11). Ранее было показано, что активация экспрессии ICOS связана с более длительными терапевтическими ответами и повышенной выживаемостью у пациентов, получавших терапию анти-CTLA-4-антителами при злокачественной меланоме. Проводили оценку того, может ли внутриопухолевая экспрессия лиганда ICOS (ICOSL) дополнительно усилить терапевтический ответ при комбинированной терапии. Используя подходы обратной генетики для NDV, получили NDV, экспрессирующий мышинный ICOSL (NDV-ICOSL). *In vitro* характеристика этого вируса показала, что он обладает репликативными и литическими свойствами, аналогичными этим свойствам у исходного штамма NDV (фиг. 12). Однако при испытании *in vivo* с заражением опухолью B16 в большем количестве NDV-ICOSL показал значительное преимущество перед исходным вирусом NDV, при использовании в комбинации с блокатором CTLA-4, с долгосрочной выживаемостью у большинства получавших лечение животных (фиг. 13). Этот эффект не ограничивался меланомой B16 и был показан для карциномы толстой кишки CT26 у мышей линии Balb/C, свидетельствуя о том, что эта терапевтическая стратегия могла бы быть перенесена на различные типы опухолей (фиг. 14). Анализ опухолей B16 из получавших лечение животных показал их значительную инфильтрацию различными субтипами иммунных клеток, экспрессирующих маркеры активации (фиг. 15 и 16). Эти лимфоциты были опухольеспецифичными и демонстрировали секрецию IFN-гамма в ответ на стимуляцию дендритными клетками, нагруженными опухолевыми лизатами (фиг. 17). На заключительном этапе животных, излечившихся от своих опухолей B16 и CT26, повторно заражали опухолевыми клетками, и была показана полная защита от повторного заражения опухолью (фиг. 18).

Для дальнейшего улучшения экспрессии ICOSL в опухоли и встраивания лиганда в вирион, конструировали гибридный белок, состоящий из внеклеточного домена ICOSL (аминокислоты 1-277) и трансмембранного и внутриклеточного доменов белка F NDV (аминокислоты 501-554), (фиг. 19A). Трансфекция полученной конструкции в клетки B16-F10 приводила к повышенной экспрессии гибридного лиганда ICOSL-F на поверхности трансфицированных клеток, по сравнению с клетками, трансфицированными нативным ICOSL, что свидетельствует о том, что регуляторные механизмы, управляющие транспортом белка F NDV на поверхность, могут быть использованы для повышения поверхностной экспрессии иммуностимулирующих лигандов (фиг. 19B).

В целом, эти исследования показывают, что 1) комбинация NDV с антителами, регулирующими иммунные контрольные точки, может применяться в качестве стратегии по преодолению ограничений как терапии онколитическим вирусом, так и терапии антителами; и 2) экспрессия иммуностимулирующих лигандов NDV может дополнительно повысить терапевтическую эффективность этого вируса, особенно при использовании в комбинации с иммунорегуляторными антителами. Эти выводы имеют клиническое применение.

7. Пример 2

В этом примере показаны противоопухолевые иммунные реакции, вызываемые онколитическим NDV, и противоопухолевые иммунные реакции, вызываемые NDV в комбинации с блокаторами CTLA-4.

7.1 Материалы и методы.

Мыши.

Мышей линии Balb/C и мышей линии C57BL/6J приобретали у компании Jackson Laboratory. Мыши IFNAR^{-/-} на основе линии C57BL/6J были любезно предоставлены доктором Эриком Памером. Трансгенные мыши Pmel-1 и Trp-1 TCR были описаны (Overwijk et al, 2003, J. Exp. Med, 198: 568, Muransky et al, 2008, Blood 112: 362) и получены от Н Рестифо (National Cancer Institute, Bethesda, MD). Мышей Trp1 скрещивали с мышами CD2:люцифераза, полученными от Патрика Нью в MD Anderson Cancer Center (Houston, TX), для получения мышей Trp1 Люцифераза⁺ (Trp1-Fluc). Всех мышей содержали в клетках Micro-Isolator® и обращались с ними в соответствии с нормативными требованиями Национального института здравоохранения США и Американской ассоциации по уходу за лабораторными животными. Все манипуляции и эксперименты с мышами, проводимые в этом исследовании, были одобрены Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных Мемориального онкологического центра Слоана-Кеттеринга.

Клеточные линии.

Мышинные клеточные линии меланомы (B16-F10) и карциномы толстой кишки (CT26 и MC38) поддерживали в среде RPMI с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и пенициллина со стрептомицином. Мышиную клеточную линию рака предстательной железы TRAMP-C2 поддерживали в среде DMEM с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (FCS; Mediatech, Inc.), 5% сыворотки Nu Serum IV (BD Biosciences) HEPES, 2-ME, пенициллин/стрептомицина, L-глутамина, 5 мкг/мл инсулина (Sigma) и 10 ммоль/л DHT (Sigma). Антитела Терапевтические анти-CTLA-4 (клон 9H10), анти-PD-1 (клон RMP1-14), и анти-PD-L1 (клон 9G2), анти-CD8 (клон 2.43), анти-CD4 (клон GK1.5), анти-IFN-гамма (клон XMG1.2) и анти-NK1.1 (клон PK136) моноклональные антитела были произведены компанией BioXcell. Антитела, используемые в проточной цитометрии, были приобретены у компаний eBioscience, Biolegend, Invitrogen и BD Pharmingen.

Вирусы и клонирование.

Во всех экспериментах использовали рекомбинантный лентогенный штамм NDV LaSota. Для получения вируса NDV, экспрессирующего мышиный ICOSL, фрагмент ДНК, кодирующий мышиный ICOSL, фланкированный соответствующими NDV-специфичными сигналами транскрипции РНК, встраивали в сайт узнавания рестриктазы SacII, созданный между генами Р и М конструкции рТ7NDV/LS. Вирусы спасали из кДНК, используя ранее описанные способы, и секвенировали при помощи ПЦР с обратной транскрипцией для определения правильности вставки. Титры вирусов определяли путем серийных разведений и иммунофлуоресценции в клетках Vero. Рекомбинантную слитую конструкцию ICOSL-F получали путем ПЦР амплификации ДНК ICOSL, кодирующей внеклеточный домен (аминокислоты 1-277) с фланкирующими сайтами рестрикции EcoRI и MluI, и ДНК F NDV, кодирующей трансмембранный и внутриклеточный домены белка F (аминокислоты 501-554) с фланкирующими сайтами рестрикции MluI и XhoI. Полученные фрагменты ДНК вместе встраивали в вектор рCAGGS, при помощи трехчастного лигирования. Рекомбинантную слитую конструкцию анти-мышиный CD28scfv-F получали путем ПЦР амплификации кДНК, кодирующей анти-CD28scfv хомяка с фланкирующими сайтами рестрикции EcoRI и MluI, и ДНК F NDV, кодирующей трансмембранный и внутриклеточный домены белка F (аминокислоты 501-554) с фланкирующими сайтами рестрикции MluI и XhoI. Полученные фрагменты ДНК вместе встраивали в вектор рCAGGS при помощи трехчастного лигирования, и затем субклонировали в вектор рNVD между генами Р и М. Для получения рекомбинантных вирусов, экспрессирующих другие гибридные белки (HN-GITRL, HN-4-1BBL, HN-CD40L, HN-OX40L), кДНК, кодирующую внеклеточный домен каждого гена (фиг. 44), амплифицировали с генспецифичными праймерами с фланкирующими сайтами рестрикции EcoRI и MluI, и трансмембранный и внутриклеточный домен белка HN амплифицировали со специфичными праймерами с фланкирующими сайтами рестрикции MluI и XhoI. Полные гибридные гены вместе встраивали в вектор рCAGGS при помощи трехчастного лигирования, и затем субклонировали в вектор рNVD между генами Р и М. Подробная информация о каждой гибридной конструкции приведена на фиг. 44. Для получения рекомбинантного NDV, кодирующего мышиный IL-2, IL-15 и IL-21, кДНК каждого гена амплифицировали с генспецифичными праймерами с фланкирующими сайтами рестрикции SacII, и затем клонировали в вектор рNVD между генами Р и М. Вирусы спасали из кДНК, используя ранее описанные способы, и секвенировали при помощи ПЦР с обратной транскрипцией для определения правильности вставки. Титры вирусов определяли путем серийных разведений и иммунофлуоресценции в клетках Vero.

Эксперименты по инфицированию in vitro.

Для мечения поверхности клетки инфицировали в трех повторностях в 6-луночных планшетах при MOI, равной 2 (B16-F10), или MOI, равной 5 (TRAMP C2). Через двадцать четыре часа клетки собирали путем механического соскабливания и обрабатывали для мечения поверхности и количественного определения при помощи проточной цитометрии. Для экспериментов по определению цитотоксичности in

vitro клетки инфицировали с указанной MOI и инкубировали при температуре 37°C в бессывороточной среде в присутствии 250 нг/мл ТФХК трипсина. Спустя 24, 48, 72 и 96 часов после инфицирования клетки промывали и инкубировали с 1% Тритон X-100 при температуре 37°C в течение 30 мин. Активность ЛДГ в лизатах определяли при помощи набора реагентов CytoTox 96 (Promega) по инструкции фирмы-производителя.

Эксперименты по выживаемости при заражении опухолью.

Модели с двусторонней боковой опухолью получали для оценки терапевтической эффективности как в инъецированной, так и в системной опухоли. Схемы лечения и дозы клеток были установлены для каждой модели опухоли таким образом, чтобы добиться 10-20% очищения опухоли NDV или анти-CTLA-4/анти-PD-1 антителом в качестве единственных агентов. Для экспериментов по оценке эффективности комбинированной терапии NDV с анти-CTLA-4 антителом, опухоли B16F10 имплантировали путем внутрикожной инъекции 2×10^5 клеток B16F10 в правый бок в день 0 и 5×10^4 клеток в левый бок в день 4. В дни 7, 9, 11 и 13 мышам вводили внутриопухолевые инъекции 2×10^7 БОЕ NDV в PBS в общем объеме 100 мкл. Одновременно, в дни 7, 9, 11 и 13 мышам вводили внутрибрюшинные инъекции анти-CTLA-4 антитела (100 мкг), анти-PD-1 антитела (250 мкг) или анти-PD-L1 антитела (250 мкг). Контрольные группы внутрибрюшинно получали соответствующую дозу изотипного антитела и внутриопухолевую инъекцию PBS. Животных умерщвляли при признаках истощения или когда общий размер опухоли достигал 1000 мм³. Для элиминации иммунных клеток мышам внутрибрюшинно вводили 500 мкг моноклональных антител к CD8+, CD4+ , NK1.1 или IFN γ за один день перед и через два дня после заражения опухолью с последующей инъекцией по 250 мкг каждые 5 дней в течение эксперимента. В случае модели TRAMP-C2 1×10^6 клеток имплантировали в правый бок в день 0 и 5×10^5 клеток имплантировали в левый бок в день 4. Лечебные инъекции проводили в дни 7, 10, 13 и 16 аналогично тому, как описано выше. В случае модели CT26, опухоли имплантировали путем внутрикожной инъекции в правый бок 1×10^6 клеток CT26 в день 0, и 1×10^6 клеток в левый бок в день 2. Лечение осуществляли, как описано выше в дни 6, 9 и 12. Для экспериментов по оценке рекомбинантного NDV, экспрессирующего ICOSL, 4-1BBL, OX40L, CD40L, GITRL, анти-CD28scfv, IL-2, IL-15 и IL-21 (NDV-трансген), опухоли B16F10 имплантировали путем внутрикожной инъекции 2×10^5 клеток B16F10 в правый бок в день 0 и 1×10^5 клеток в левый бок в день 4. В дни 7, 9, 11 и 13 мышам вводили внутриопухолевые инъекции 2×10^7 БОЕ NDV в PBS в общем объеме 100 мкл. Одновременно, в дни 7, 9, 11 и 13 мышам вводили внутрибрюшинные инъекции анти-CTLA-4 антитела (100 мкг), анти-PD-1 антитела (250 мкг) или анти-PD-L1 антитела (250 мкг).

Выделение Trp1 и Pmel лимфоцитов и адоптивный перенос.

Селезенки и лимфатические узлы трансгенных мышей выделяли и протирали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм. CD4+ и CD8+ клетки очищали при помощи положительного отбора с использованием магнитных частиц Miltenyi.

Выделенные Trp1 и Pmel клетки вводили животным-реципиентам через хвостовую вену по указанной схеме в количестве $2,5 \times 10^4$ клеток на мышь и 1×10^6 клеток на мышь, соответственно.

Эксперименты по переносу сыворотки.

Имеющие опухоль группы мышей лечили путем введения им одной внутриопухолевой инъекции NDV в PBS. На четвертый день у них собирали кровь путем летального кровопускания и сыворотку крови отделяли путем центрифугирования. Образцы сыворотки от каждой группы объединяли и обрабатывали УФ в облучателе Stratalinker 1800 шестью импульсами УФ излучения с энергией 300 мДж/см², для того чтобы инактивировать вирус, который потенциально мог там находиться. 100 мкл неразбавленной сыворотки путем внутриопухолевой инъекции вводили имеющим опухоль B16-F10 мышам, ранее не подвергавшимся лечению, в общей сложности было сделано три инъекции в каждый последующий день. Опухоли удаляли через 3 дня после последней инъекции и обрабатывали для выделения опухолеинфильтрирующих лимфоцитов, как описано ниже.

Биолюминесцентная визуализация.

Визуализацию мышей проводили каждые 2-3 дня, начиная с шестого дня. Мышам ретроорбитально вводили 50 мкл раствора D-люциферина (Caliper Life Sciences) в PBS с концентрацией 40 мг/мл и немедленно проводили визуализацию при помощи системы визуализации IVIS (Caliper Life Sciences). Черно-белые фотографические изображения и биолюминесцентные цветные изображения совмещали наложением, используя программу для наложения The Living Image, версия 4.0 (Caliper Life Sciences). Исследуемую область выбирали вручную над опухолью, и площадь исследуемой области поддерживали постоянной.

Выделение опухолеинфильтрирующих лимфоцитов.

Опухоли B16-F10 имплантировали путем внутрикожной инъекции 2×10^5 клеток B16-F10 в правый бок в день 0 и 2×10^5 клеток в левый бок в день 4. В дни 7, 9 и 11 мышам вводили внутриопухолевые инъекции 2×10^7 БОЕ NDV и внутрибрюшинно вводили анти-CTLA-4 антитела или анти-PD-1 антитела, где указано. Небольшое количество животных, которые погибли от опухолевой нагрузки (всегда в не получавших лечение контрольных группах), или животных, которые полностью излечились от опухолей (всегда в получавших лечение группах), не использовали для анализа. В день 15 мышей умерщвляли, и опу-

холи и дренирующие опухоли лимфатические узлы удаляли при помощи пинцета и хирургических ножниц и взвешивали. Опухоли от каждой группы животных измельчали ножницами перед инкубацией с 1,67 ед. Вюнша/мл либеразы и 0,2 мг/мл ДНКазы в течение 30 минут при температуре 37°C. Опухоли гомогенизировали путем повторного пипетирования и фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм. Клеточные суспензии однократно промывали полной средой RPMI и очищали в градиенте фиколла для удаления мертвых клеток. Клетки из дренирующих опухоль лимфатических узлов выделяли путем протирания лимфатических узлов через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм.

Проточная цитометрия.

Клетки, выделенные из опухолей и дренирующих опухоли лимфатических узлов, обрабатывали для мечения поверхности наборами для окрашивания из нескольких антител к CD45, CD3, CD4, CD8, CD44, ICOS, CD11c, CD19, NK1.1, CD11b, F4/80, Ly6C и Ly6G. Фиксирующий краситель для живых клеток eFluor780 (eBioscience) использовали для того, чтобы отличить живые клетки. Затем клетки пермеабилizировали при помощи фиксации для FoxP3 и набора реагентов для пермеабилзации (eBioscience) и окрашивали для выявления Ki-67, FoxP3, гранзима B, CTLA-4 и IFN-гамма. Данные получали при помощи проточного цитометра LSRII (BD Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения Flow Jo (Treestar).

Очистка и нагрузка ДК.

Селезенки не подвергавшихся экспериментальному воздействию мышей выделяли и обрабатывали 1,67 ед. Вюнша/мл либеразы и 0,2 мг/мл ДНКазы в течение 30 минут при температуре 37°C. Полученные клеточные суспензии фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм и однократно промывали полной средой RPMI. CD11c+ дендритные клетки очищали при помощи положительного отбора с использованием магнитных частиц Miltenyi. Выделенные дендритные клетки культивировали в течение ночи с рекомбинантным GM-CSF и опухолевыми лизатами B16-F10 и очищали в градиенте фиколла.

Анализ синтеза цитокинов.

Клеточные суспензии из опухолей и дренирующих опухоли лимфатических узлов объединяли и обогащали для увеличения содержания Т-клеток, используя набор реагентов для очистки Т-клеток Miltenyi. Выделенные Т-клетки подсчитывали и совместно культивировали в течение 8 часов с дендритными клетками, нагруженными опухолевыми лизатами B16-F10, в присутствии 20 Ед/мл IL-2 (R&D) плюс брэфелдин А (BD Bioscience). После повторной стимуляции лимфоциты обрабатывали для анализа при помощи проточной цитометрии, как описано выше.

Иммунофлуоресценция и микроскопия.

Опухоли вырезали у мышей, промывали PBS, фиксировали в 4% параформальдегиде и обрабатывали для заливки парафином в соответствии с ранее описанными протоколами. Срезы получали с помощью микротомы, установленного на направляющих, и обрабатывали для окрашивания гематоксилином и эозином (ГЭ) или анти-CD3 и анти-FoxP3 антителами. Срезы анализировали при помощи широкопольного микроскопа Zeiss Axio 2 с использованием объективов 10× и 20×.

Статистика.

Данные анализировали при помощи двустороннего критерия Стьюдента (для сравнения 2 групп), и дисперсионного анализа где необходимо. Данные для выживаемости анализировали при помощи логарифмического рангового критерия (Кокса-Мантеля).

Двусторонний $p < 0,05$ считали статистически значимым ($P \leq 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***), $P \leq 0,0001$ (****)).

7.2 Результаты.

Репликация NDV ограничена инъекционной опухолью.

Была охарактеризована кинетика распределения вируса при внутриопухолевом и системном введении NDV. Внутриопухолевое введение рекомбинантного NDV, экспрессирующего репортерную конструкцию с люциферазой светлячка (NDV-Fluc), приводило к устойчивому люциферазному сигналу в инъекционной боковой опухоли, в то время как системное введение вируса не приводило к поддающемуся обнаружению люциферазному сигналу в опухоли (фиг. 20A). Так как ограниченная системная доставка вируса с малой вероятностью была способна вызвать достаточный лизис опухоли и иммунный ответ, то внутриопухолевую инъекцию NDV изучали в качестве способа вызвать противоопухолевый иммунный ответ, который потенциально мог бы преодолеть ограничения системной внутривенной терапии. Таким образом, для дальнейших исследований модельное метастатическое заболевание было смоделировано с использованием модели двусторонней боковой опухоли B16-F10 (фиг. 22A). Введение NDV-Fluc в правую боковую опухоль приводило к репликации вируса в пределах инъекционной опухоли с люциферазным сигналом, который можно было обнаружить в течение периода времени до 96 часов (фиг. 20B-D). Вирус не был обнаружен в контралатеральной (левой боковой) опухоли при анализе путем люминесцентной визуализации (фиг. 20B-D), путем пассирования в оплодотворенном яйце или при помощи ОТ-ПЦР. Таким образом, эта система позволила охарактеризовать иммунный ответ как в инъекционных вирусах, так и в отдаленных опухолях, которые не подвергались прямому воздействию NDV.

Терапия NDV увеличивает местную и отдаленную инфильтрацию опухоли лимфоцитами и замед-

ляет опухолевый рост.

Анализ инъецированных вирусом опухолей выявил воспалительный ответ, о чем свидетельствует повышенная инфильтрация клетками, экспрессирующими общий лейкоцитарный антиген CD45 (фиг. 21A-B). Иммунные инфильтраты характеризовались повышенным содержанием клеток врожденного иммунитета, включая миелоидные клетки, NK-клетки и NKT-клетки (фиг. 21C), и клеток адаптивного иммунитета, включая CD8⁺ и обычные CD4⁺FoxP3⁻ (Tconv) T-клетки, что приводило к значимому увеличению соотношений между CD8 и Tconv с одной стороны и регуляторными (Treg) T-клеткам с другой стороны ($p=0,0131$ и $p=0,0006$, соответственно) (фиг. 21D-21F). Примечательно, что анализ контралатеральных опухолей выявил аналогичное увеличение в воспалительных инфильтратах (фиг. 22B,C), характеризующееся повышенным количеством как врожденных иммунных клеток (фиг. 22D), так и эффекторных T-клеток (фиг. 22E,G). Стоит отметить, что хотя в абсолютном количестве Treg не было больших изменений (фиг. 22G), имело место существенное снижение их относительного процентного содержания (фиг. 22E,F,H) со значимым увеличением соотношений между CD8 и Tconv с одной стороны и Treg с другой стороны ($p=0,002$ и $p=0,0021$, соответственно) (фиг. 22I). Эффекторные T-клетки, выделенные из отдаленных опухолей, имели повышенную экспрессию маркеров активации, пролиферации и лизиса ICOS, Ki-67 и гранзима B, соответственно (фиг. 22J,K). Как и ранее, вирус или вирусную РНК не удалось выделить из отдаленных опухолей, что свидетельствует о том, что изменения в микроокружении отдаленных опухолей не были обусловлены непосредственной вирусной инфекцией. Для того чтобы в дальнейшем исключить возможность скрытого местного распространения вируса, опухоли пересаживали в другие отдаленные участки, такие как двусторонние опухоли на задних лапах, получая при этом аналогичные результаты (фиг. 23).

Согласуясь с наблюдаемым воспалительным эффектом, внутриопухолевое введение NDV приводило к задержке роста не только инъецированных, но также контралатеральных опухолей, что приводило к более длительному выживанию животных (фиг. 22L,M). Для определения того, является ли данный эффект временным, и возможна ли продолжительная противоопухолевая защита, мышам, имевшим одностороннюю боковую опухоль B16-F10, внутриопухолево вводили NDV, и мышам, показавшим долгосрочную выживаемость, в противоположный бок вводили клетки B16-F10. Большинство животных имело задержку роста опухоли, и 30% животных полностью отторгали повторно введенные клетки, что свидетельствует о том, что внутриопухолевая терапия NDV действительно способна индуцировать защитный противоопухолевый анамнестический ответ (фиг. 25).

NDV вызывает инфильтрацию и размножение опухоль-специфичных лимфоцитов.

Для определения того зависит ли противоопухолевый иммунный ответ от типа инъецируемой NDV опухоли, или он является результатом неспецифического воспаления, вызываемого инфекцией NDV, проводили эксперимент с гетерологичными опухолями (карицинома толстой кишки MC38 и меланома B16-F10), имплантированными в противоположные бока (фиг. 24A). Для отслеживания опухоль-специфичных лимфоцитов трансгенные CD8⁺ клетки, экспрессирующие в качестве метки конгенный T-клеточный рецептор (Pmel), или меченные люциферазой CD4⁺ клетки (Trp1), распознающие дифференцировочные антигены меланомы gp100 (Pmel) и Trp1 (Trp1), адоптивно перенесли (Muranski et al, 2008, Blood, 112: 362; Overwijk et al, 2003, J Exp Med, 198: 569). Для измерения кинетики распределения и размножения адоптивно перенесенных Trp1 клеток использовали биолуминесцентную визуализацию. Перенос Trp1 клеток в получавших PBS животных, имеющих опухоли, не приводил к накоплению Trp1 в опухолях, показывая сильную иммуносупрессивную природу микроокружения опухоли в этой модели (фиг. 24B-D). Инъекция NDV в опухоли B16-F10 приводила к значительному увеличению сигнала люциферазы в инъецированных опухолях (фиг. 24B-D), указывая на размножение Trp1 T-клеток (площадь под кривой (AUC) $p=0,0084$). Примечательно, что аналогичное размножение наблюдалось в контралатеральной опухоли, хотя и с задержкой ($p=0,0009$) (фиг. 24B-D). В отличие от этого, инъекция NDV в опухоли MC38, оказалась не способна вызвать существенную инфильтрацию Trp1 в инъецированные опухоли MC38 или отдаленные опухоли B16-F10 (фиг. 24B-D), что показывает, что инфильтрация опухоль-специфичными лимфоцитами отдаленных опухолей, вероятно, зависит от антигенной идентичности инъецированной опухоли. Аналогично, внутриопухолевая инъекция NDV приводила к увеличенной инфильтрации клеток Pmel в отдаленные опухоли, которая была более выражена при введении в опухоль B16-F10, чем при введении в опухоль MC38 (фиг. 24E).

Стоит отметить, что хотя инфильтрация отдаленных опухолей B16-F10 адоптивно перенесенными лимфоцитами зависела от идентичности инъецированной опухоли, отдаленные опухоли имели увеличенную иммунную инфильтрацию, даже когда первично инъецированная опухоль представляла собой MC38 (фиг. 24F), что свидетельствует о том, что компонент неспецифического воспалительного ответа также может играть свою роль. Кроме того, сыворотка из получавших NDV мышей, обработанная УФ излучением для инактивации любых возможных вирусов, вызывала инфильтрацию опухоли лейкоцитами при ее внутриопухолевом введении не подвергавшимся воздействию мышам, имеющим опухоль B16-F10 (фиг. 24G,H), при этом основное увеличение наблюдалось для NK и CD8⁺ клеток ($p=0,0089$ и $p=0,0443$, соответственно) (фиг. 24I).

NDV и блокаторы CTLA-4 оказывают совместное действие по отторжению местных и отдаленных

опухолей.

Несмотря на заметный воспалительный ответ и задержку роста у отдаленных опухолей, полное отторжение контралатеральных опухолей, связанное с долгосрочной выживаемостью, наблюдалось только у приблизительно 10% животных (фиг. 24M), позволяя предположить наличие активных иммуносупрессивных механизмов микроокружения опухоли. Изучение инъецированных NDV и отдаленных опухолей выявило активацию CTLA-4 на опухоль-инфильтрирующих Т-клетках (фиг. 26), свидетельствующую о том, что индуцируемое NDV воспаление в опухоли может сделать опухоли чувствительными к системной терапии блокаторами CTLA-4. Примечательно, что комбинированная терапия NDV и анти-CTLA-4 антителами (фиг. 27A) приводила к отторжению двусторонних опухолей и долгосрочной выживаемости у большинства животных -эффект, который не наблюдался при использовании каждой из этих терапий по отдельности (фиг. 27B-D). Для того чтобы определить длительность наблюдаемой защиты, выжившим животным в правый бок в день 90 вводили клетки B16-F10 без дальнейшей терапии. У животных, получавших комбинированную терапию NDV и анти-CTLA-4 антителами, наблюдалось 80% защиты от повторного заражения опухолью, по сравнению с 40% защиты у животных, получавших только анти-CTLA-4 антитела (фиг. 27E).

Комбинированная терапия NDV и блокаторами CTLA-4 эффективна против непроницаемых для вируса опухолей.

Для определения того, может ли эта стратегия лечения быть распространена на другие типы опухолей, эту стратегию испытывали на слабо иммуногенной модели аденокарциномы предстательной железы TRAMP C2. Аналогично модели B16-F10, комбинированная терапия вызывала регрессию инъецированных опухолей (фиг. 27F), и либо задерживала разрастание отдаленных опухолей, либо приводила к полной регрессии отдаленных опухолей с продленной долгосрочной выживаемостью (фиг. 27F,G). Стоит отметить, что в то время как клетки B16-F10 являются чувствительными к опосредованному NDV лизису *in vitro*, клетки TRAMP C2 обладают высокой степенью устойчивости с низкой цитотоксичностью, наблюдаемой при множественности заражения (MOI) до 10 (фиг. 27H). В обеих клеточных линиях инфекция NDV *in vitro* приводила к поверхностной активации МНС и костимулирующих молекул (фиг. 27I-K). Молекулы МНС класса I равным образом активировались во всех клетках, даже притом, что не все клетки инфицируются NDV при MOI, равной 1. Предыдущие исследования показали, что NDV индуцирует экспрессию IFN типа I в клетках B16-F10 (Zamarin et al, 2009, Mol Ther 17: 697). Известно, что оба типа IFN активируют экспрессию молекул МНС класса I на поверхности клеток B16-F10 (Dezfouli et al, 2003, Immunol. Cell. Biol, 81: 459, Seliger et al, 2001, Cancer Res., 61: 1095), что позволяет предположить, что в случае инфицированных опухолей эти механизмы могут играть дополнительную роль в усилении иммуногенности опухоли. Таким образом, эти результаты свидетельствуют о том, что *in vitro* чувствительность к вирусопосредованному лизису не является необходимой для чувствительности к терапии NDV *in vivo*, и дополнительно указывает на преобладающую важность вызываемого вирусом воспалительного ответа по сравнению с прямым онколитическим действием при наблюдаемой противоопухолевой эффективности.

Системный противоопухолевый эффект является антиген-ограниченным инъецируемым типом опухоли.

Для определения того, является ли наблюдаемый в отдаленной опухоли противоопухолевый эффект специфичным по отношению к типу инъецируемой опухоли, проводили оценку комбинированной терапии на животных, имеющих двусторонние отдаленные опухоли B16-F10, и на животных, имеющих гетерологичные типы опухолей (карцинома толстой кишки MC38 и меланома B16-F10), имплантированные в противоположные бока (фиг. 28A). Хотя внутрикожное введение вируса в неимеющий опухоли правый бок приводило к замедлению роста левой боковой опухоли, оно не способно обеспечить долгосрочную защиту и отторжение опухоли, наблюдаемые у животных, имеющих двусторонние опухоли B16-F10 (фиг. 28B,C). Аналогичным образом, инъекция NDV в правые боковые опухоли MC38 животных, имеющих в левом боку опухоли B16-F10, оказалась неспособной вызвать отторжение опухоли B16-F10 (фиг. 28D,E), что свидетельствует о том, что индуцируемый NDV противоопухолевый иммунный ответ, вероятно, является антиген-ограниченным инъецируемой опухолью.

Комбинированная терапия NDV и анти-CTLA-4 антителами индуцирует инфильтрацию опухоли активированными лимфоцитами.

Для изучения микроокружения опухоли B16-F10 у подвергшихся лечению животных двусторонние опухоли собирали и обрабатывали для анализа инфильтрирующих клеток. Анализ инъецированных и отдаленных опухолей от получавших лечение животных выявил заметные воспалительные инфильтраты и большие области некроза опухоли у животных, получавших в качестве лечения комбинированную терапию (фиг. 30a, фиг. 29). Это коррелирует с увеличением количества CD45+ клеток и Т-клеток в группе, получавшей комбинированную терапию (фиг. 30A-C, фиг. 29A-C). Как и ранее, наблюдаемое увеличение количества TIL было прежде всего обусловлено инфильтрацией CD8+ и Tconv, но не Treg, что приводило к увеличению соотношений между эффекторными клетками и Treg (фиг. 30D-F, фиг. 29C-F). Фенотипическая характеристика CD4+ и CD8+ TIL от животных, получавших комбинированное лечение, показала активацию ICOS, гранзима В и Ki-67, по сравнению с не получавшими лечение и получавшими

анти-CTLA-4 антитела животными (фиг. 30G-I), и больший процент экспрессирующих IFN-гамма CD8+ клеток в ответ на повторную стимуляцию дендритными клетками (ДК), активированными опухолевыми лизатами B16-F10 (фиг. 30J).

Противоопухолевая активность комбинированной терапии NDV зависит от CD8+ клеток, NK-клеток и интерферонов типа I и II.

Для определения того, какие компоненты клеточного иммунитета являются ответственными за наблюдаемый терапевтический эффект, лечение повторяли в присутствии истощающих антител для CD4+, CD8+ или NK-клеток. Достаточную степень элиминации каждого подтипа клеток подтверждали при помощи проточной цитометрии периферической крови (фиг. 31). Элиминация или CD8+ или NK-клеток приводила к исчезновению терапевтического эффекта как в инъецированных вирусом, так и в отдаленных опухолях (фиг. 32A,B), со значимым уменьшением долгосрочной выживаемости ($p < 0,0001$ для CD8 и $p < 0,0011$ для NK элиминации) (фиг. 32C). Согласно с этими результатами, введение животным анти-IFN γ нейтрализующих антител также снижало терапевтическую эффективность. В отличие от этого, элиминация CD4+ клеток не приводила к заметному изменению противоопухолевого эффекта, хотя эти результаты должны интерпретироваться с осторожностью, так как анти-CD4+ элиминация также приводит к параллельной элиминации Tregs.

Ранее было показано, что IFN типа I играет важную роль в примировании CD8+ клеток для противоопухолевого иммунного ответа (Fuentes et al, 2011, J Exp Med, 208: 2005; Diamond et al, 2011, J Exp Med, 208: 1989). Для того чтобы исследовать роль IFN типа I в отторжении опухоли с участием NDV, эксперименты повторяли с мышами, у которых был нокаутирован рецептор IFN типа I (IFNAR-/-). IFNAR-/- мыши показали быстрое прогрессирование как инъецированных, так и контралатеральных опухолей, и полную невосприимчивость к комбинированной терапии (фиг. 32D-F). В целом, эти данные показывают важную роль как врожденных, так и адаптивных иммунных реакций для системной терапевтической эффективности вируса, наблюдаемой в данном исследовании.

Терапия NDV приводит к активации PD-L1 на опухолевых клетках и на опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах.

Для определения того, может ли воздействие на другие иммунные контрольные точки в комбинации с терапией NDV оказаться благотворным, оценивали эффект, оказываемый на путь PD-1 - PD-L1, после инфекции NDV. Как показано на фиг. 33, опухолевые клетки, инфицированные NDV, как *in vitro*, так и *in vivo*, имели активацию экспрессии ингибирующего лиганда PD-L1 на поверхности клеток (фиг. 33A), которая также имела место в отдаленных неинфицированных опухолях. Активация PD-L1 не была ограничена только опухолевыми клетками, но также наблюдалась на опухоль-инфильтрирующих лейкоцитах, как врожденного, так и адаптивного происхождения (фиг. 33B).

Комбинированная терапия NDV с PD-1 и PD-L1 блокирующими антителами приводит к повышению противоопухолевого иммунитета и долгосрочной выживаемости у животных.

Комбинацию NDV с антителами, блокирующими PD-1, и комбинацию NDV с антителами, блокирующими PD-L1, изучали на модели двусторонней боковой меланомы, описанной выше. Примечательно, что, как и в случае с блокаторами CTLA-4, терапия NDV в комбинации или с анти-PD-1 антителами, или с анти-PD-L1 антителами приводила к повышению выживаемости у животных (фиг. 34 и 35). Были охарактеризованы отдаленные опухоли от животных, получавших комбинацию NDV и анти-PD-1 антител. Как видно на фиг. 36, комбинация внутриопухолевого введения NDV с системным введением блокатора PD-1 приводила к выраженной инфильтрации отдаленной опухоли иммунными клетками, при этом наиболее важным результатом является увеличение количества опухоль-инфильтрирующих CD8 клеток. Инфильтрирующие клетки экспрессировали маркеры пролиферации и лизиса Ki67 и гранзим В, соответственно (фиг. 37).

NDV индуцирует активацию экспрессии ICOS на опухоль-инфильтрирующих CD4 и CD8 иммунных клетках в инъецированных вирусом и отдаленных опухолях и дренирующих опухоль лимфатических узлах (TDLN).

Приведенные выше результаты показали, что комбинация внутриопухолевого введения NDV и системного введения блокатора иммунных контрольных точек приводит к значительному взаимно усиленному действию этих двух терапевтических подходов. Опираясь на эти результаты, далее изучали, может ли усиление Т-клеточной эффекторной функции в опухолевом микроокружении при помощи соответствующего костимулирующего пути вызывать усиленный противоопухолевый иммунный ответ. Предыдущие исследования выявили, что устойчивая активация экспрессии индуцибельного костимулятора ICOS на поверхности Т-клеток является четким показателем ответа на блокатор CTLA-4 у пациентов (Carthon et al, 2010, Clin. Cane. Res., 16: 2861). ICOS представляет собой гомолог CD28, экспрессируемый на поверхности активированных Т-клеток, и было показано, что он является критическим для формирования опосредованного Т-клетками В лимфоцитарного ответа и развития субпопуляции Т-хелперов (Simpson et al., 2010 Curr Opin Immunol. 22:326). Роль ICOS в противоопухолевой эффективности применения блокаторов CTLA-4 была недавно подтверждена в исследованиях на мышах, в которых у ICOS-дефицитных мышей было серьезно нарушено развитие противоопухолевого ответа при использовании блокаторов CTLA-4 (Fu et al., 2011, Cancer Res., 71: 5445).

Экспрессия ICOS в двусторонних боковых моделях опухолей, обработанных NDV, была охарактеризована, для того чтобы определить, может ли этот рецептор служить мишенью в этом терапевтическом подходе. Для того чтобы охарактеризовать местный и абскопальный эффекты внутриопухолевой терапии NDV использовали двустороннюю боковую модель меланомы B16-F10 с введением вируса в опухоль на одной стороне (фиг. 38A). Оценивали активацию маркеров, которые могли прогнозировать лучший ответ и могли быть мишенями для дальнейшего повышения терапевтической эффективности. Для примера был выбран ICOS, так как ранее было показано, что устойчивая активация ICOS связана с более выраженными терапевтическими реакциями и повышенной выживаемостью у пациентов со злокачественной меланомой, получавших лечение анти-CTLA-4 антителами. Анализ лимфоцитов, выделенных из опухолей и дренирующих опухоль лимфатических узлов, выявил, активацию костимулирующей молекулы ICOS в качестве одного из маркеров активации у получавших лечение животных (фиг. 38B,C).

Получение и оценка *in vitro* вируса NDV-ICOSL.

Используя подходы обратной генетики для NDV, получили NDV, экспрессирующий мышинный ICOSL (NDV-ICOSL) (фиг. 39A). Экспрессия ICOSL на поверхности инфицированных клеток B16-F10 была подтверждена при помощи проточной цитометрии через 24 часа после инфицирования (фиг. 39B). *In vitro* характеристика этого вируса показала, что он обладает репликативными (фиг. 39D) и литическими (фиг. 39C) свойствами, аналогичными эти свойствам у исходного штамма NDV.

NDV-ICOSL задерживает рост отдаленных опухолей и вызывает увеличенную инфильтрацию опухоли лимфоцитами.

Для того чтобы оценить терапевтическое действие NDV-ICOSL на инъецированные вирусом и отдаленные опухоли, животным, имеющим двусторонние опухоли B16-F10, вводили 4 внутриопухолевые инъекции данного вируса в расположенные на одной стороне боковые опухоли. NDV-ICOSL и NDV дикого типа оказались сопоставимы по своей способности вызывать регрессию опухоли при непосредственном введении этого вируса в опухоли (фиг. 40A). Однако по сравнению с NDV дикого типа, NDV-ICOSL вызывал значительное замедление роста опухоли в отдаленных опухолях, при этом у нескольких животных опухоли отсутствовали в течение длительного времени (фиг. 40B-C). Анализ инфицированных вирусом опухолей выявил увеличенную инфильтрацию опухоли CD4 и CD8 эффекторными клетками у животных, получавших NDV дикого типа и NDV-ICOSL, хотя различия между двумя вирусами не были статистически значимыми, показывая аналогичную активность этих двух вирусов в отношении правых боковых опухолей (фиг. 40A и 40D). В отличие от этого, анализ левых боковых опухолей выявил более выраженное увеличение количества опухоль-инфильтрирующих CD8 и Tconv клеток в группе, получавшей NDV-ICOSL (фиг. 40E). Примечательно, что имело место увеличение абсолютного количества регуляторных Т-клеток, при этом наибольшее увеличение наблюдалось в группе, получавшей NDV-ICOSL (фиг. 40E), хотя относительное процентное содержание регуляторных Т-клеток было значительно ниже у животных, получавших NDV (фиг. 40F).

Комбинированная терапия NDV-ICOSL и блокатором CTLA-4 приводит к отторжению инъецированных и отдаленных опухолей.

В целом, вышеприведенные результаты показали, что, несмотря на значительный воспалительный ответ, наблюдаемый в отдаленных опухолях при внутриопухолевом введении NDV-ICOSL, большинство животных все еще погибает от опухолей, что свидетельствует о том, что ингибирующие механизмы, активные в опухолевом микроокружении, предотвращают отторжение опухоли путем инфильтрации иммунных клеток. Поэтому, оценивали эффективность комбинирования местного введения NDV-ICOSL и системного введения блокатора CTLA-4. Для этих экспериментов заражающую дозу опухоли увеличивали до уровня, при котором не наблюдалось значительной терапевтической эффективности NDV или анти-CTLA-4 антитела при их введении по отдельности. Как и ранее, животным вводили 4 дозы NDV в расположенные на одном боку опухоли с одновременным системным введением анти-CTLA-4 антител (фиг. 41A). В модели B16-F10 комбинированная терапия NDV-ICOSL и анти-CTLA-4 антителами приводила к регрессии большинства инъецированных и отдаленных опухолей с долгосрочной выживаемостью животных, которая значительно превосходила показатели комбинации NDV дикого типа и анти-CTLA-4 антител (фиг. 41B-D). Для определения того, могут ли эти результаты быть получены в других моделях опухолей, тот же эксперимент проводили в двусторонней боковой модели карциномы толстой кишки CT26. Несмотря на слабую чувствительность клеток CT26 к опосредованному NDV лизису *in vitro*, значительная терапевтическая эффективность комбинированной терапии NDV и анти-CTLA-4 антител наблюдалась как в инъецированных вирусом, так и в отдаленных опухолях, и снова лучшая эффективность наблюдалась в группе, получавшей комбинацию NDV-ICOSL и анти-CTLA-4 антител (фиг. 42A-D). В обеих моделях опухолей животных, которые полностью излечились от опухолей, повторно заражали летальной дозой опухолевых клеток в день 90 бездальнейшей терапии и наблюдали защиту от повторного заражения у большинства животных (фиг. 41E и фиг. 42E). Примечательно, что в то время как в модели CT26 все излечившиеся животные оказались защищенными от повторного заражения, в модели B16-F10 животные, получавшие комбинированную терапию, продемонстрировали лучшую защиту, по сравнению с животными, которых лечили только анти-CTLA-4 антителами (фиг. 41E), что свидетельствует о том, что комбинированный подход приводит к более эффективному защитному анамнестическому ответу.

Комбинированная терапия приводит к увеличенной инфильтрации опухоли врожденными и адаптивными иммунными клетками.

Анализ отдаленных опухолей B16 у животных, получавших комбинацию NDV и анти-CTLA-4 антител, показал значительную инфильтрацию опухоли различными подтипами иммунных клеток (фиг. 43A,B). Увеличенная инфильтрация была показана как для врожденных (фиг. 43C,D), так и для адаптивных (фиг. 43E) иммунных клеток, при этом наибольшее увеличение наблюдалось в группе, получавшей комбинацию NDV и анти-CTLA-4 антител. Примечательно, что в то время как эта группа демонстрировала наибольшее количество инфильтрирующих CD8⁺ лимфоцитов, в этой группе также наблюдалось статистически значимое увеличение количества регуляторных Т-клеток (фиг. 43E), хотя общее процентное содержание Tregs значительно снижалось, по сравнению с животными, не получавшими лечения, или животными, получавшими только анти-CTLA-4 антитела (фиг. 43F), с возникающим в результате увеличенным соотношением между эффекторными и Treg клетками (фиг. 43G). Подробный анализ TIL показал, что TIL, полученные от животных, которых лечили комбинацией NDV и анти-CTLA-4 антител, экспрессировали наибольшее количество маркеров активации, лизиса и пролиферации ICOS, гранзим В и Ki67, соответственно (фиг. 43H-J).

Получение рекомбинантного NDV, экспрессирующего другие костимулирующие молекулы.

Этот пример показывает, что экспрессия костимулирующего лиганда NDV может приводить к активации более сильного иммунного ответа, который может создавать более эффективный противоопухолевый иммунитет, особенно в условиях комбинированной терапии с блокатором иммунных контрольных точек. Для того чтобы провести оценку дополнительных костимулирующих молекул, изучали лиганды, мишенью которых являются иммуноглобулиновое суперсемейство рецепторов (ICOS и CD28) и суперсемейство рецепторов TNF (GITR, 4-1BB, OX40 и CD40). Для связывания с CD28 конструировали искусственный лиганд, состоящий из гибридного белка с цитоплазматическими и трансмембранными доменами гликопротеина F NDV и внеклеточным доменом, состоящим из одноцепочечного антитела против CD28 (aCD28-scfv) (фиг. 44A,B). В случае лигандов, специфичных по отношению к суперсемейству рецепторов TNF, внеклеточный домен каждого лиганда сливали с трансмембранным и внутриклеточным доменами гликопротеина HN NDV, для того чтобы обеспечить повышенную экспрессию лигандов на поверхности инфицированных клеток (фиг. 44A,B). Кроме того, получали рекомбинантные вирусы, экспрессирующие цитокины из семейства рецепторов общей гамма-цепи (IL-2, IL-15 и IL-21). Получаемые в результате конструкции показаны в виде диаграмм на фиг. 44C. Рекомбинантные вирусы получали методами обратной генетики, и наличие вирусов подтверждали при помощи реакции гемагглютинации (фиг. 45A). Чтобы подтвердить правильность встраивания генов, из каждого вируса выделяли РНК, и проводили с ней ОТ-ПЦР с праймерами, отжигающимися за пределами области клонированного гена (фиг. 45B,C). Последовательность каждого гена затем подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Для подтверждения экспрессии костимулирующих лигандов на поверхности инфицированных клеток, культивируемые клетки B16-F10 инфицировали с MOI, равной 2, и, спустя 24 ч, анализировали при помощи точечной цитометрии с антителами, специфичными для каждого гена (фиг. 46).

NDV-4-1BBL индуцирует повышенную инфильтрацию опухоли лимфоцитами в отдаленных опухолях. Способность сконструированных вирусов проявлять любые признаки усиленного иммунного ответа оценивали, используя в качестве примера NDV-4-1BBL. Мыши, имеющие двусторонние боковые меланомы B16-F10, получали в правую опухоль внутриопухолевую инъекцию контрольного NDV или NDV-4-1BBL, как описано ранее, и отдаленные опухоли собирали в день 15. Как показано на фиг. 47, терапия NDV-4-1BBL вызывала повышенную инфильтрацию как врожденных, так и адаптивных иммунных клеток в контралатеральные опухоли, что согласуется с ранее полученными данными, демонстрирующими аналогичные результаты с NDV, экспрессирующим ICOSL (фиг. 40). В целом, эти результаты свидетельствуют о том, что экспрессия иммуностимулирующих молекул NDV в контексте опухолевого микроокружения может приводить к повышению противоопухолевого иммунитета.

Полученные вирусы NDV-4-1BBL, NDV-GITRL, NDV-OX4 OL, NDV-CD40L, NDV-IL-2, NDV-IL-15, NDV-IL-21 оценивали по их способности индуцировать инфильтрацию опухоли иммунными клетками, используя для этого аналогичные методы анализа, как описано в данном разделе 7. Кроме того, терапевтическую оценку каждого из этих вирусов проводили в двусторонних боковых моделях опухолей, вводя вирус в опухоль на одном боку в комбинации с системным введением антител, регулирующих иммунные контрольные точки PD-1, PD-L1 и/или CTLA-4.

Заключение

Для того чтобы запустить иммуногенную гибель опухолевых клеток и воспалительную реакцию, использовали непатогенный NDV, который, несмотря на свою относительно слабую литическую активность, показал себя как мощный индуктор IFN типа I и созревания ДК (Wilden et al, 2009, Int J Oncol 34: 971; Kato et al., 2005, Immunity 23: 19). Была использована двусторонняя боковая модель меланомы с разнесенной в пространстве имплантацией опухолей по схеме, для которой было ранее показано, что она не дает устойчивости к повторному заражению (Turk et al., 2004, J Exp Med 200: 771). Этот пример показывает, что внутриопухолевая инъекция NDV приводит к инфильтрации отдаленной опухоли иммунными клетками без отдаленного распространения вируса. Следует отметить, что этот эффект был связан с

относительным уменьшением количества Tregs и выраженным увеличением соотношения между CD4 и CD8 эффекторными и Treg клетками, и ранее было показано, что это является маркером благоприятного иммунологического ответа на иммунотерапию (Quezada et al, 2006, J Clin Invest 116: 1935; Curran et al, 2010, Proc Natl Acad Sci USA 107: 4275).

Данные в этом примере показывают, что NDV увеличивает инфильтрацию опухоли опухолюспецифичными лимфоцитами, и этот эффект зависит от идентичности инъецируемой вирусом опухоли. Повышенная инфильтрация опухоли и размножение адоптивно перенесенных лимфоцитов дополнительно свидетельствует о взаимно усиливающем взаимодействии между терапией онколитическим вирусом и терапевтическими подходами, использующими адоптивный перенос Т-клеток. Вполне вероятно, что опухолюспецифичные лимфоциты подвергаются активации и размножению в месте первоначальной вирусной инфекции, после чего следует их миграция в другие места опухоли, что, вероятно, зависит от рецепторов хемокинов и рецепторов хоминга лимфоцитов (Franciszkiewicz et al., 2012, Cancer Res 72: 6325). Данные в этом примере также показывают, что инфильтрация иммунными клетками отдаленных опухолей является отчасти неспецифической и может быть индуцирована инъекцией NDV в гетерологичную опухоль или переносом сыворотки от получавших лечение животных к имеющим опухоль мышам, не получавшим лечения. Повышенная сосудистая проницаемость, индуцируемая воспалительными цитокинами, такими как IL-6, может вносить существенный вклад в активацию сосудистой сети опухоли и рекрутинг лимфоцитов в опухоль (Fisher et al., 2011, The Journal of clinical investigation 121: 3846).

Несмотря на ярковыраженное увеличение количества TIL, терапевтический эффект в отдаленных опухолях при монотерапии NDV был скорее умеренным, что свидетельствует об иммуносупрессивной природе микроокружения этих опухолей (Spranger et al., 2013, Sci Transl Med 5). Примечательно, что комбинация системного введения анти-CTLA-4 антител и внутриопухолевого введения NDV приводила к отторжению отдаленных опухолей B16-F10 с долгосрочной выживаемостью животных. Животные также были защищены от повторного заражения опухолью, что свидетельствует о формировании долгосрочной иммунологической памяти. Примечательно, что терапевтическая эффективность также наблюдалась в случае опухолевых моделей TRAMP C2 и CT26, которые обладают слабой чувствительностью к опосредованному NDV лизису клеток *in vitro*. Эти результаты свидетельствуют о важности индуцируемого NDV противоопухолевого иммунного/воспалительного ответа, а не непосредственного лизиса, в качестве первичного механизма, обуславливающего противоопухолевую эффективность в этой модели. Кроме того, анализ инъецированных NDV и отдаленных опухолей после комбинированной терапии показал их значительную инфильтрацию врожденными иммунными клетками и активированными CD8+ и CD4+ эффекторными клетками, в то время как элиминация CD8+ и NK-клеток приводила к полному исчезновению терапевтической эффективности. Кроме того, комбинированная стратегия оказалась полностью неэффективной в случае IFNAR-/- мышей, что подтверждает роль пути с участием IFN типа I в индуцировании противоопухолевого иммунитета в этой системе (Fuentes et al., 2011, J Exp Med 208, 2005; Diamond et al., 2011, J Exp Med 208: 1989; Swann et al, 2007, J Immunol 178: 7540).

Таким образом, этот пример показывает, что местная внутриопухолевая терапия меланомы B16 NDV вызывает воспалительную реакцию, приводящую к инфильтрации лимфоцитов и противоопухолевому эффекту в отдаленных (не получавших инъекцию вируса) опухолях без отдаленного распространения вируса. Этот воспалительный эффект совпадает с инфильтрацией отдаленных опухолей опухолюспецифичными CD4+ и CD8+ Т-клетками, которая зависит от идентичности инъецированной вирусом опухоли. Комбинация местного введения NDV и системного введения блокатора CTLA-4 приводила к отторжению ранее сформировавшихся отдаленных опухолей и возникновению защиты от повторного заражения опухолью в моделях слабо иммуногенных опухолей, независимо от чувствительности линии опухолевых клеток к опосредованному NDV лизису. Терапевтический эффект был связан с выраженной инфильтрацией отдаленных опухолей активированными CD8+ и CD4+ эффекторными клетками, но не регуляторными Т-клетками, и он зависел от CD8+ клеток, NK-клеток интерферона типа I. Этот пример показывает, что местная терапия онколитическим NDV вызывает воспалительную инфильтрацию отдаленных опухолей иммунными клетками, делая их чувствительными к системной терапии иммуномодулирующими антителами.

Объем настоящего изобретения не ограничивается описанными в настоящем описании конкретными вариантами осуществления изобретения. Более того, различные модификации настоящего изобретения в дополнение тем, которые описаны в настоящем описании, станут очевидны для специалистов в данной области техники из вышеприведенного описания и прилагаемых чертёжей. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все документы, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание путем ссылки во всей своей полноте и для всех целей в такой же степени, как если бы для каждой отдельной публикации или патента или патентной заявки было сделано специальное и отдельное указание о том она(он) включена в настоящее описание путем ссылки во всей своей полноте и для всех целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий (а) введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей вирус болезни Ньюкасла (NDV), где NDV представляет собой штамм LaSota, и NDV содержит упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A, и где мутированный белок F экспрессируется NDV; и (b) введение субъекту композиции, содержащей антитело, которое специфически связывается с PD1 и блокирует связывание с его нативными лигандами.

2. Способ лечения рака, включающий (а) введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей гибридный NDV, который содержит упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую цитокин, где цитокин экспрессируется вирусом, где цитокин представляет собой интерлейкин (IL)-7, IL-9, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, интерферон (IFN)-гамма или фактор некроза опухоли (TNF)-альфа; и (b) введение субъекту композиции, содержащей антитело, которое специфически связывается с PD1 и блокирует связывание с его нативными лигандами.

3. Способ лечения рака, включающий (а) введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей гибридный NDV, который содержит упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую интерлейкин-2 (IL-2), который экспрессируется вирусом; и (b) введение субъекту композиции, содержащей антитело, которое специфически связывается с PD1 и блокирует связывание с его лигандами.

4. Способ лечения рака, включающий (а) введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей гибридный NDV, которая содержит упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), который экспрессируется вирусом, и (b) введение субъекту композиции, содержащей антитело, которое специфически связывается с PD1 и блокирует связывание с его нативными лигандами.

5. Способ лечения рака, включающий (а) внутриопухолевое введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей вирус болезни Ньюкасла (NDV), где NDV представляет собой штамм LaSota, и NDV содержит упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A, и где мутированный белок F экспрессируется NDV; и (b) введение субъекту композиции, содержащей антитело, которое специфически связывается с PD1 и блокирует связывание с его нативными лигандами.

6. Способ лечения рака, включающий (а) внутриопухолевое введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей вирус болезни Ньюкасла (NDV), где NDV представляет собой штамм LaSota, и NDV содержит упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A, и где мутированный белок F экспрессируется NDV; и (b) системное введение субъекту композиции, содержащей моноклональное антитело MK3475.

7. Способ по любому из пп.1-4, в котором антитело представляет собой MK3475.

8. Способ по любому из пп.2-4, где композиция, содержащая NDV, вводится внутрь опухоли.

9. Способ по п.2, где цитокин представляет собой IL-21.

10. Способ по п.2, где цитокин представляет собой IL-15.

11. Способ по любому из пп.1-5, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

12. Способ по любому из пп.1-5, 7 и 8, где композиция, содержащая антитело, вводится системно.

13. Способ по любому из пп.1-5, 7 и 8, где композиция, содержащая антитело, вводится внутривенно.

14. Способ по любому из пп.1-5, 7 и 8, где композиция, содержащая антитело, вводится подкожно.

15. Способ по любому из пп.2-4 и 7-14, где NDV представляет собой штамм LaSota.

16. Способ по любому из пп.2-4, где гибридный NDV представляет собой штамм LaSota, и упакованный геном содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мутированный белок F с аминокислотной мутацией L289A, и где мутированный белок экспрессируется гибридным NDV.

17. Способ по любому из пп.1-16, где рак представляет собой солидную опухоль.

18. Способ по любому из пп.1-16, где рак представляет собой рак крови.

19. Способ по любому из пп.1-16, где рак представляет собой меланому, колоректальный рак, рак легких, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак желудка, рак печени, рак почки, рак мочевого пузыря, болезнь Ходжкина, В-клеточную лимфому или рак шейки матки.

20. Способ по п.19, где рак почки представляет собой почечно-клеточный рак.

21. Способ по п.19, где рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

22. Способ по любому из пп.1-16, где рак представляет собой опухоль мозга, рак молочной железы, карциному эндометрия, рак пищевода, мультиформную глиобластому, гепатоцеллюлярную карциному, рак легких, мезотелиому, неходжкинскую лимфому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточную карциному, рак слюнных желез, саркому, рак щитовидной желе-

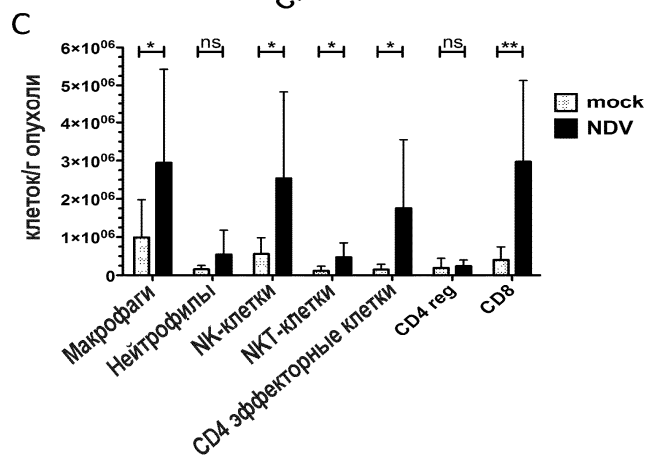
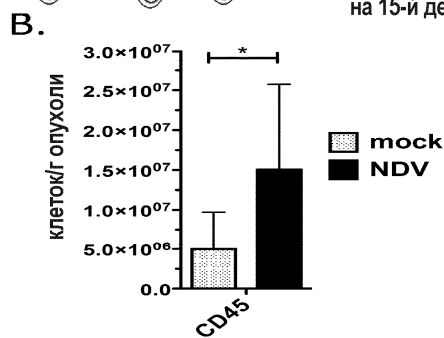
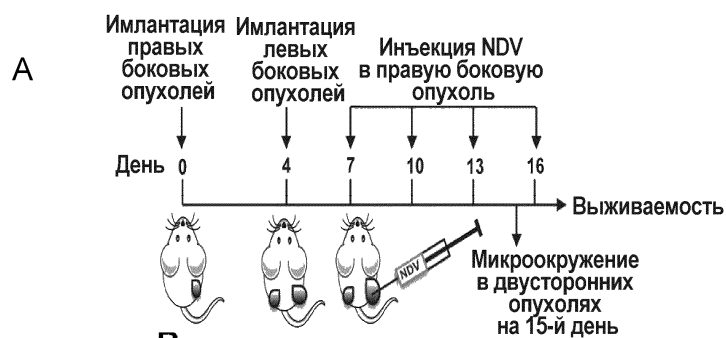
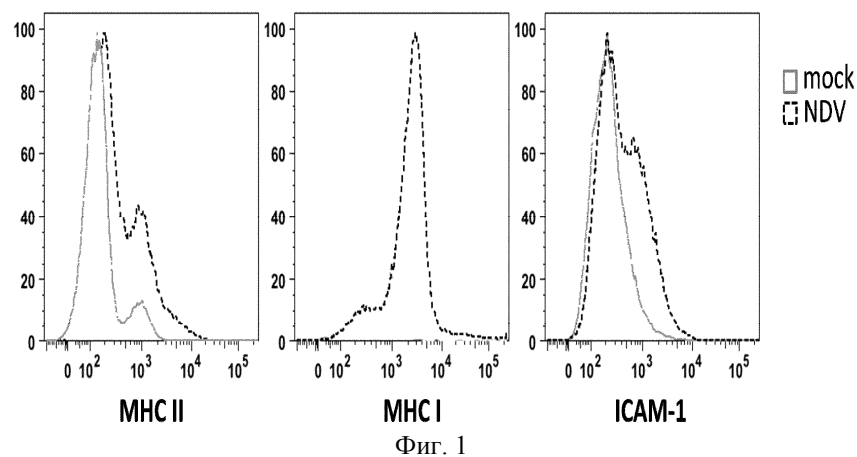
зы или рак матки.

23. Способ по любому из пп.1-22, где рак является метастатическим.

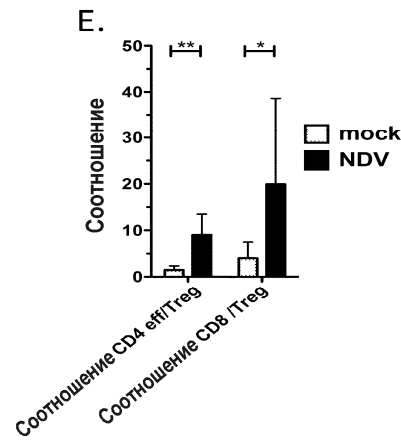
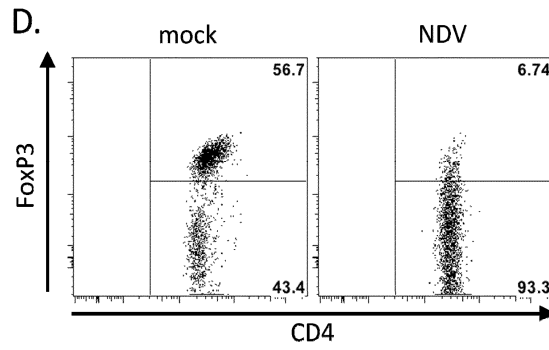
24. Способ по любому из пп.1-23, где рак является рефрактерным или рецидивирующим.

25. Способ по любому из пп.1-24, где субъектом является человек.

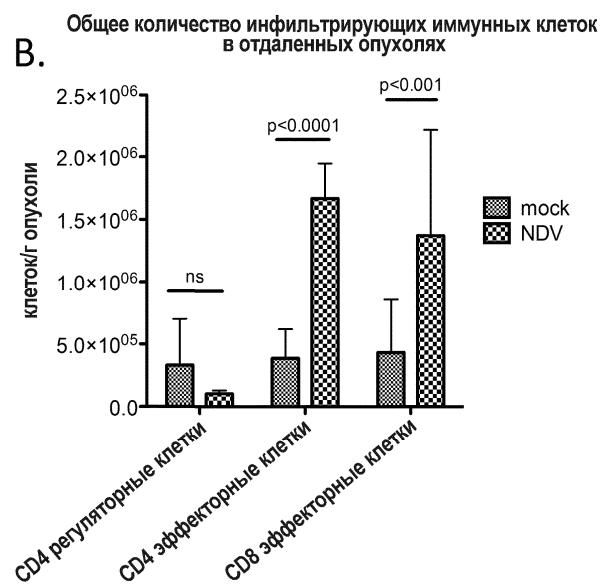
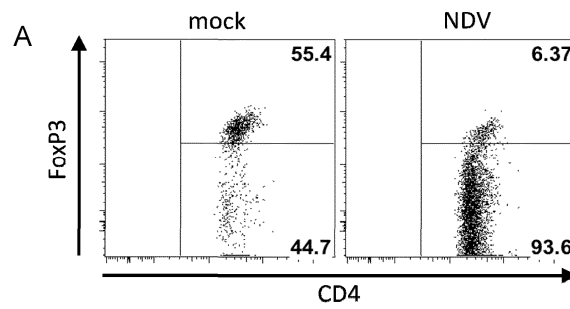
26. Способ по любому из пп.1-25, дополнительно включающий введение субъекту композиции, содержащей антитело, которое специфически связывается с CTLA-4.



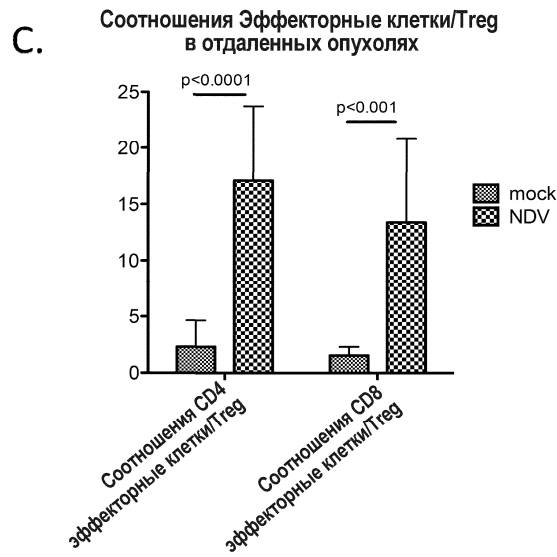
Фиг. 2А-2С



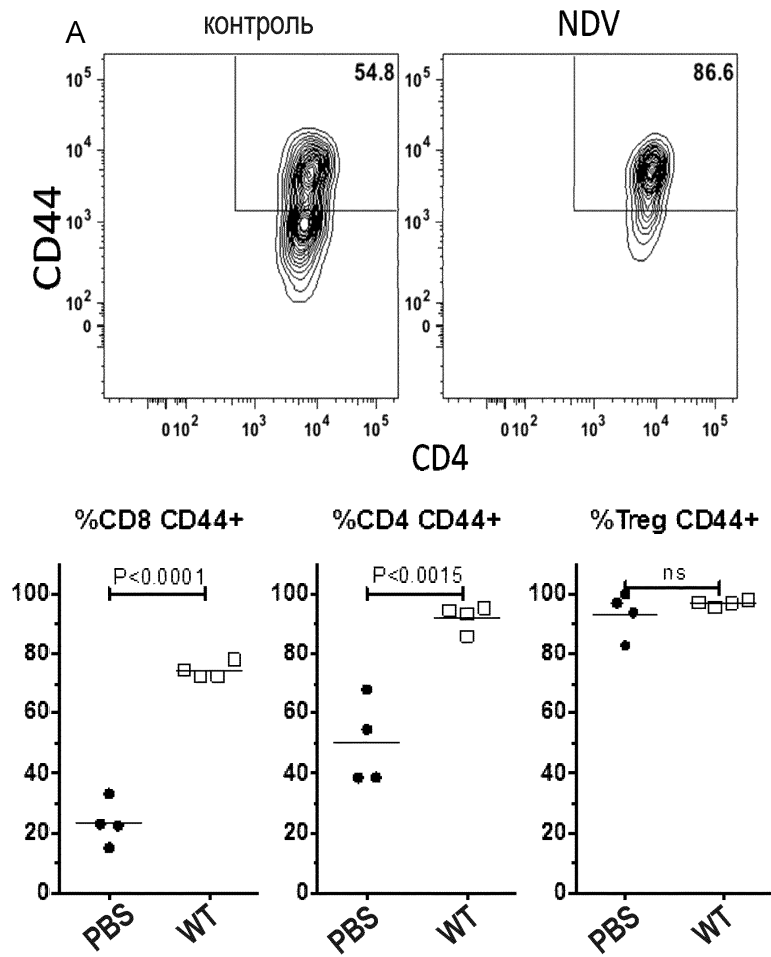
Фиг. 2D-2E



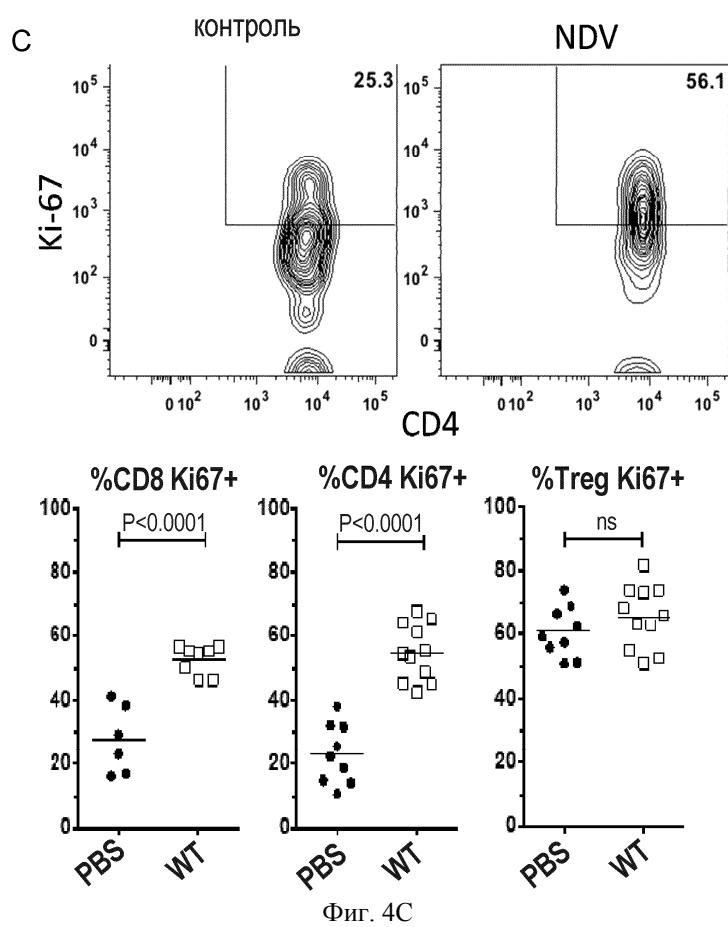
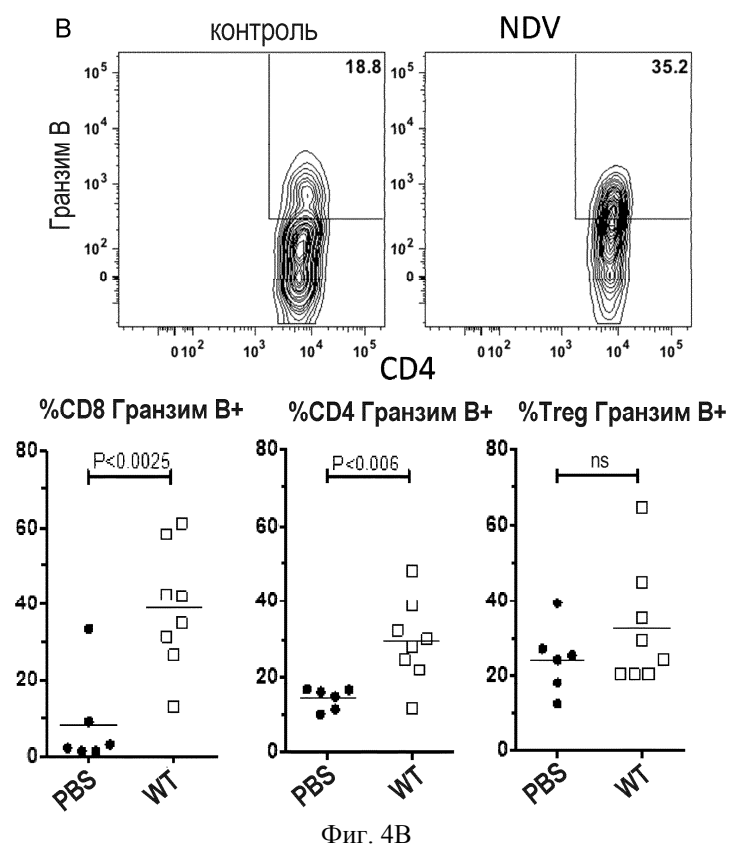
Фиг. 3A-3B

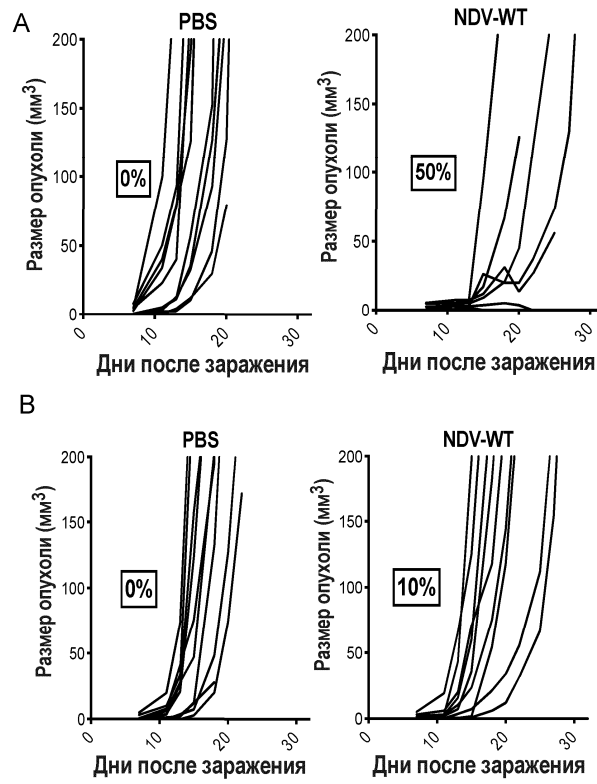


Фиг. 3С

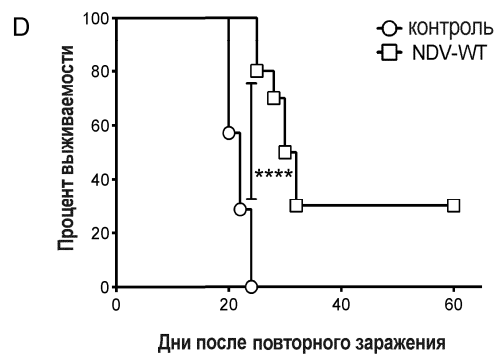
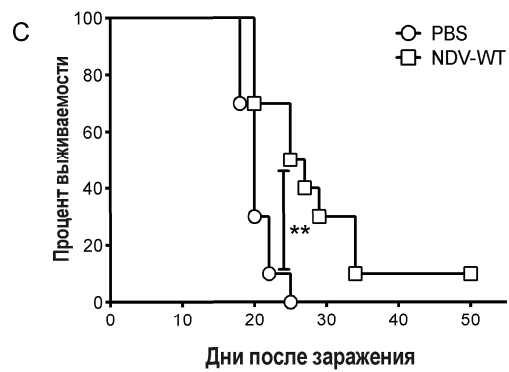


Фиг. 4А

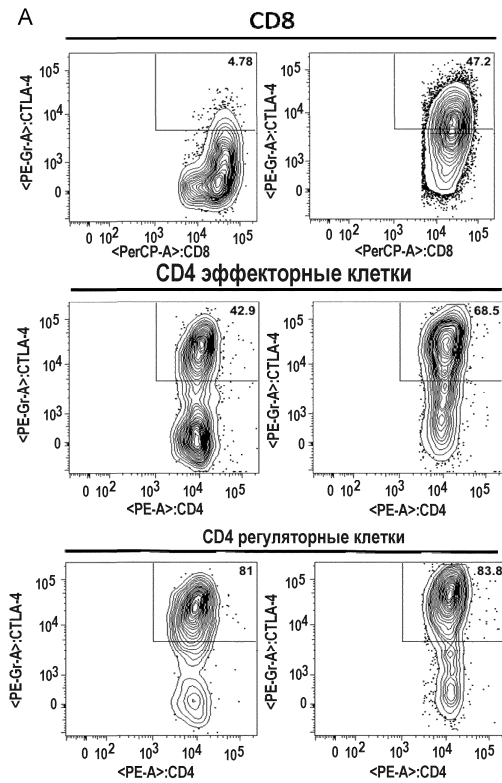




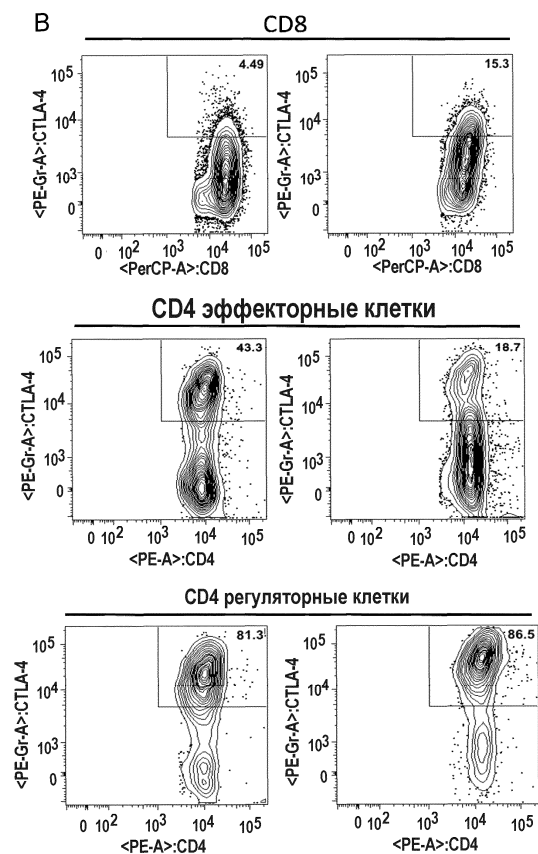
Фиг. 5A-5B



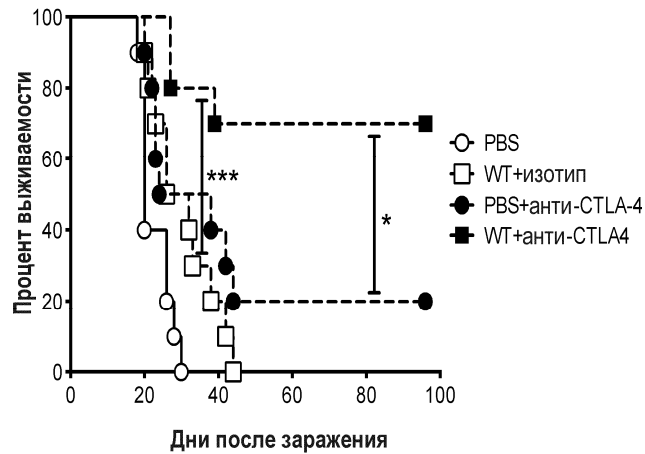
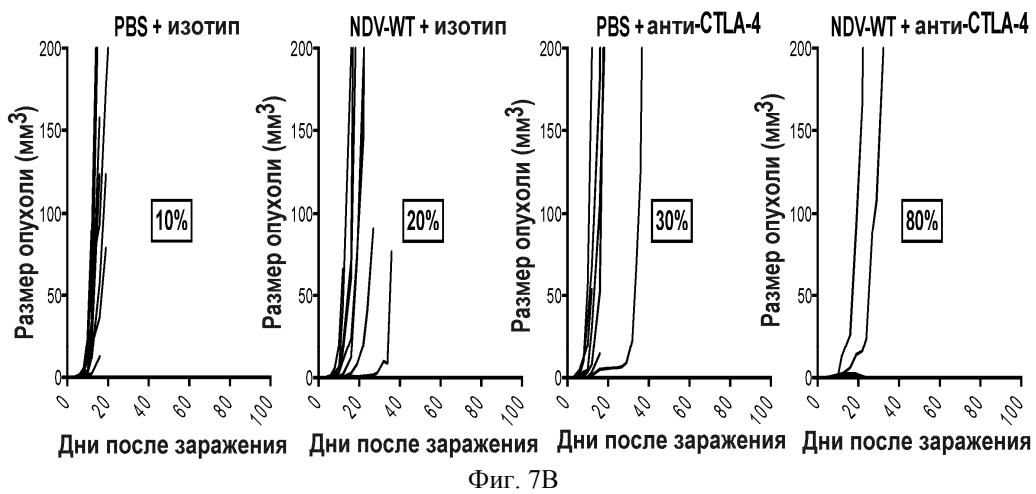
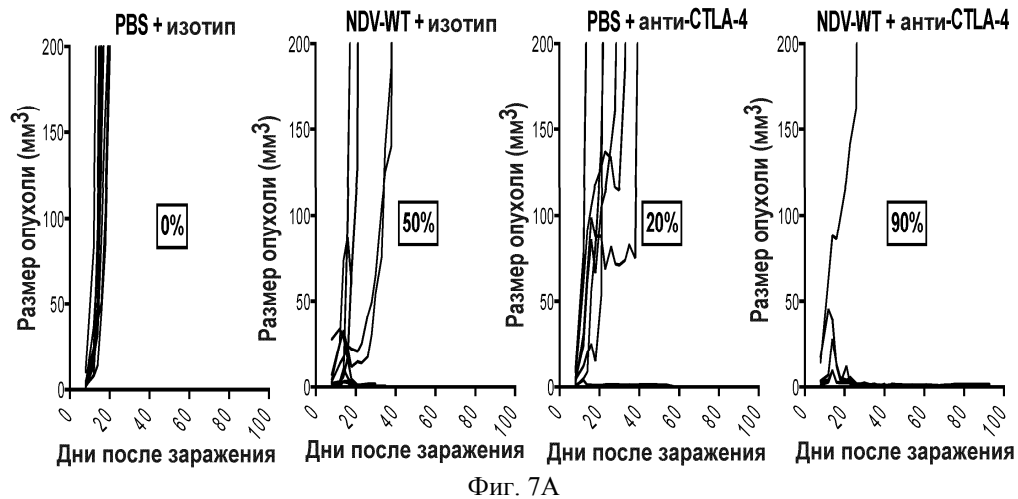
Фиг. 5C-5D

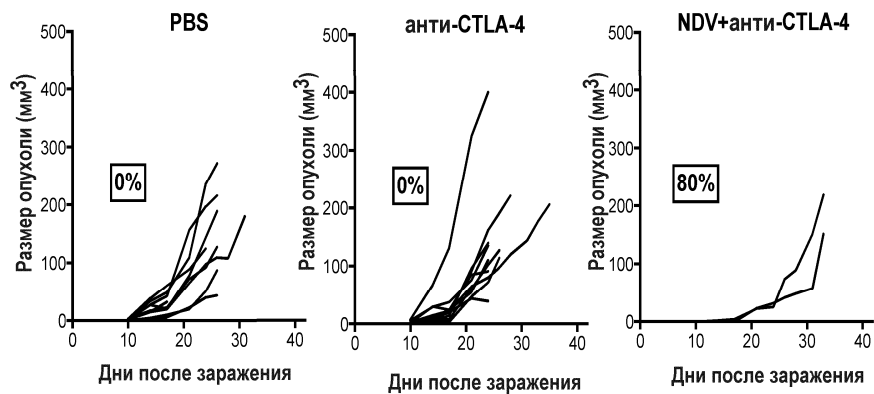


Фиг. 6А

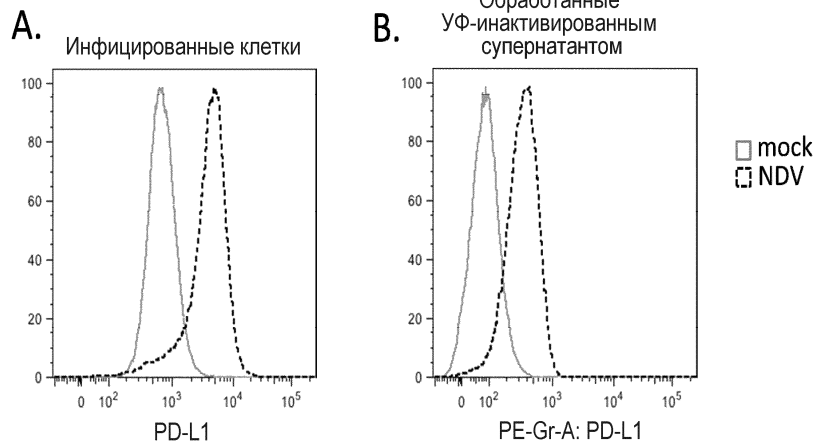


Фиг. 6В

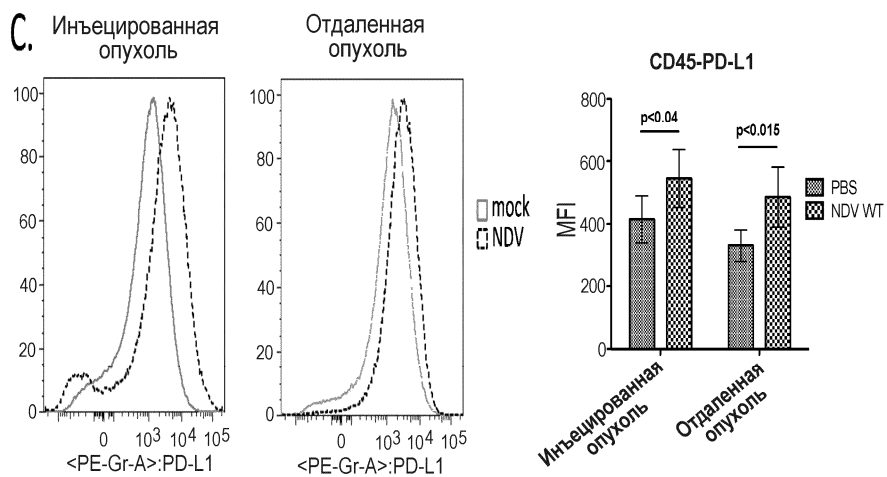




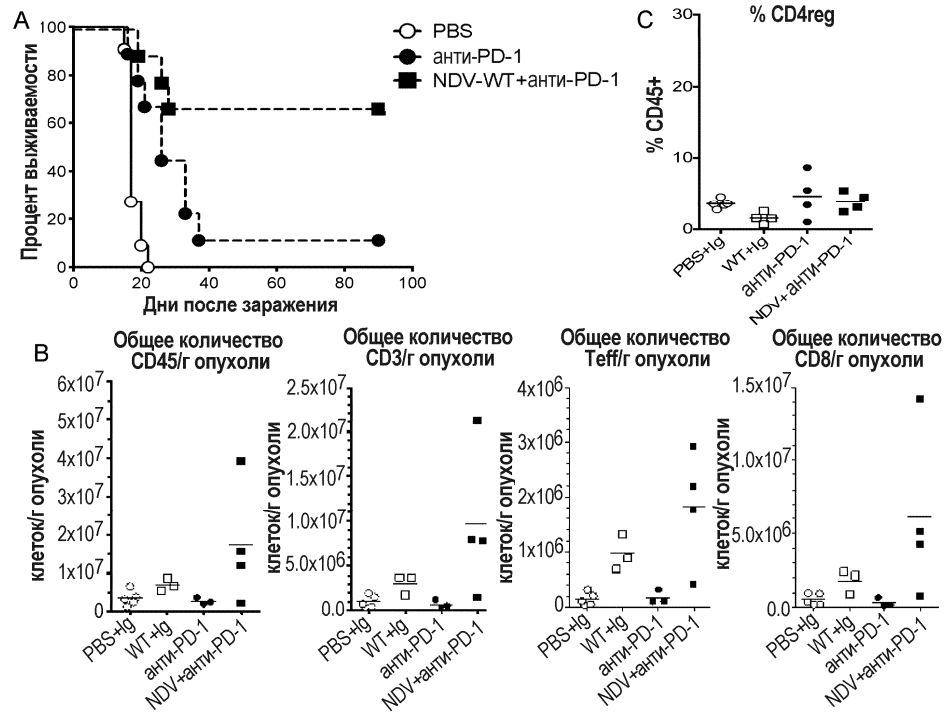
Фиг. 8



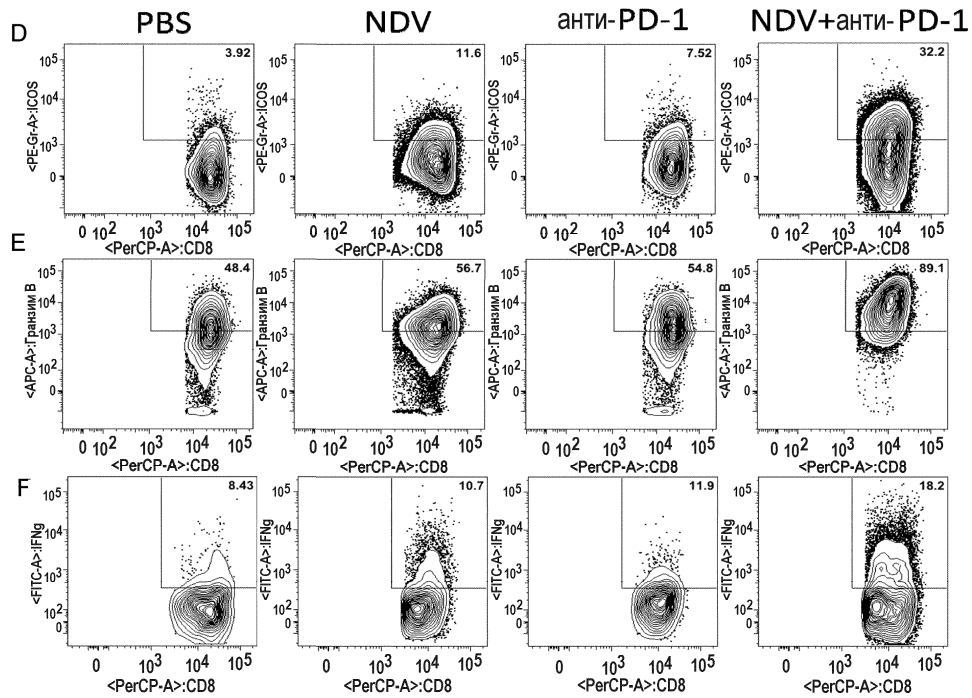
Фиг. 9А-9В



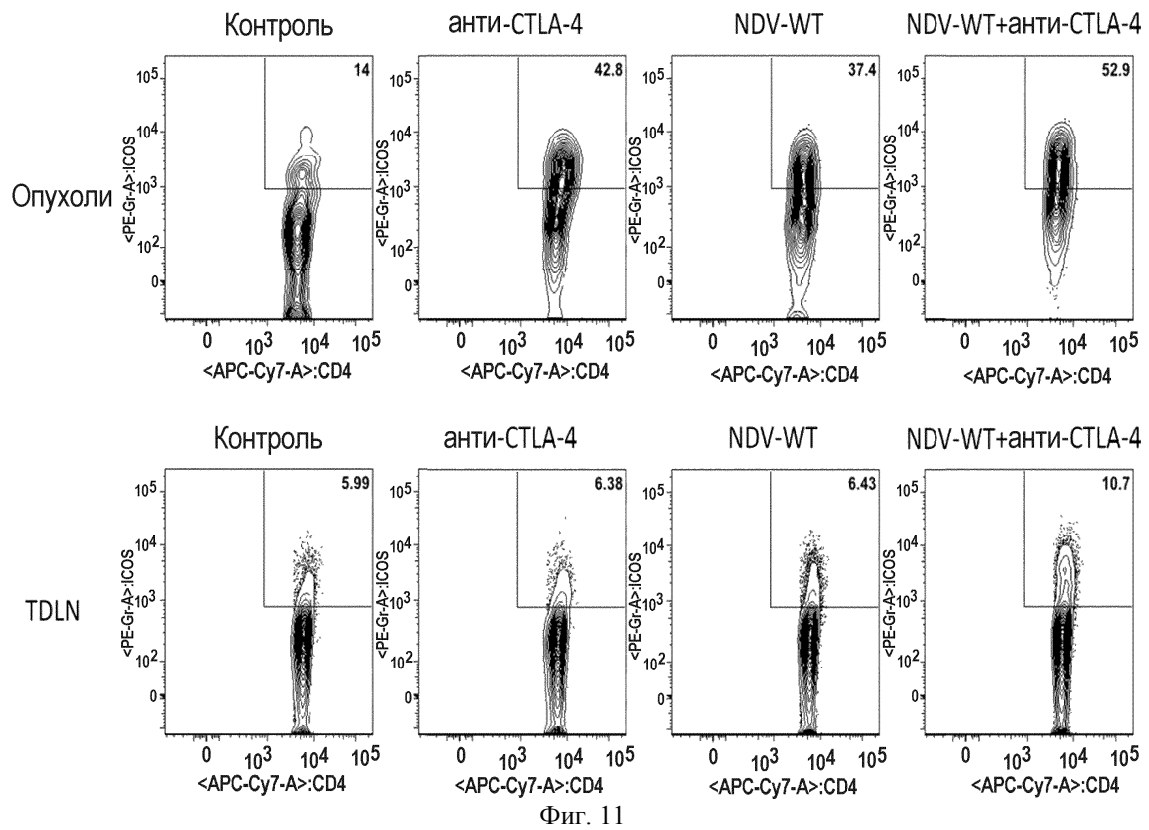
Фиг. 9С



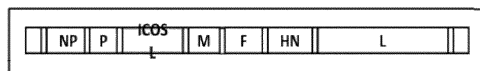
Фиг. 10A-10C



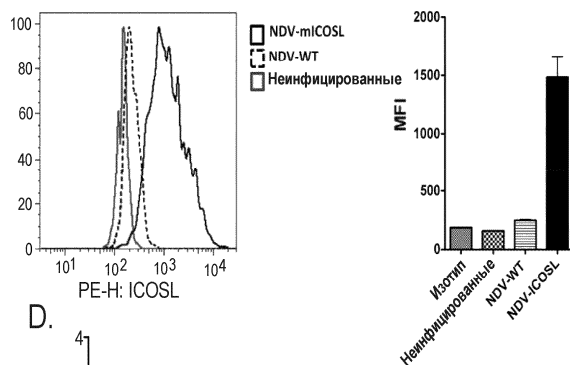
Фиг. 10D-10F



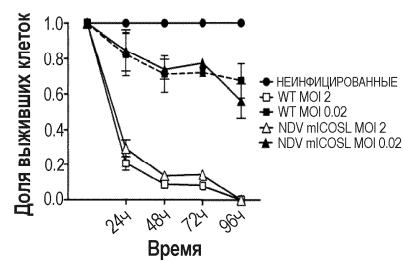
A.



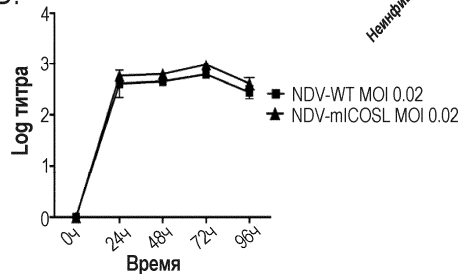
B.



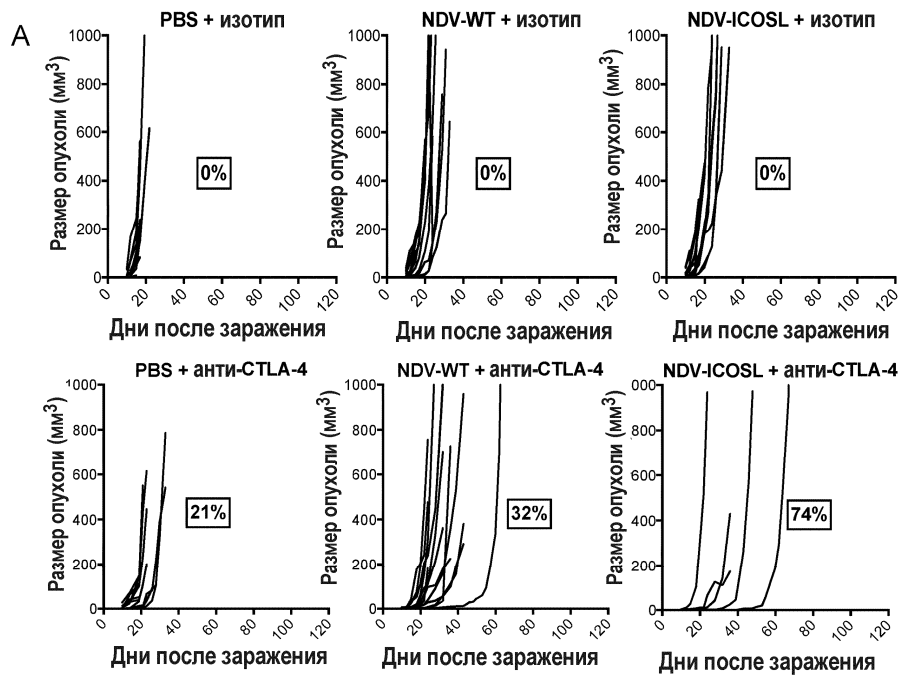
C.



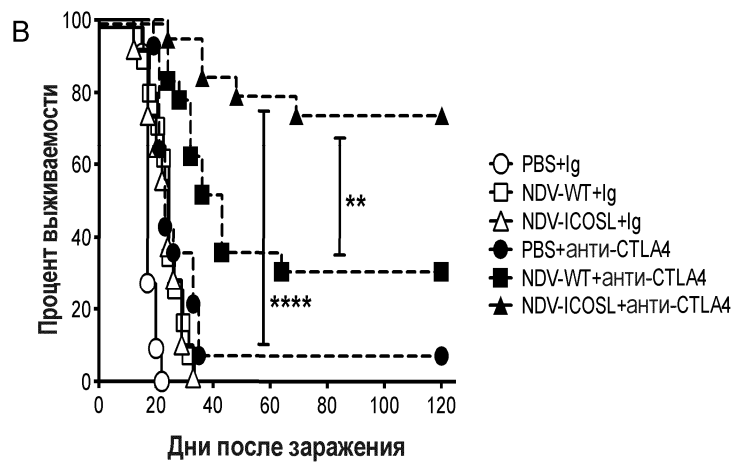
D.



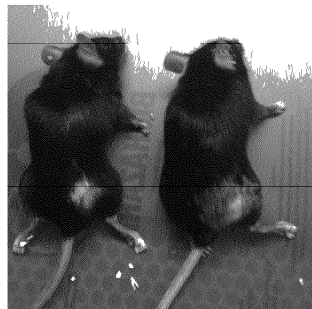
Фиг. 12A-12D



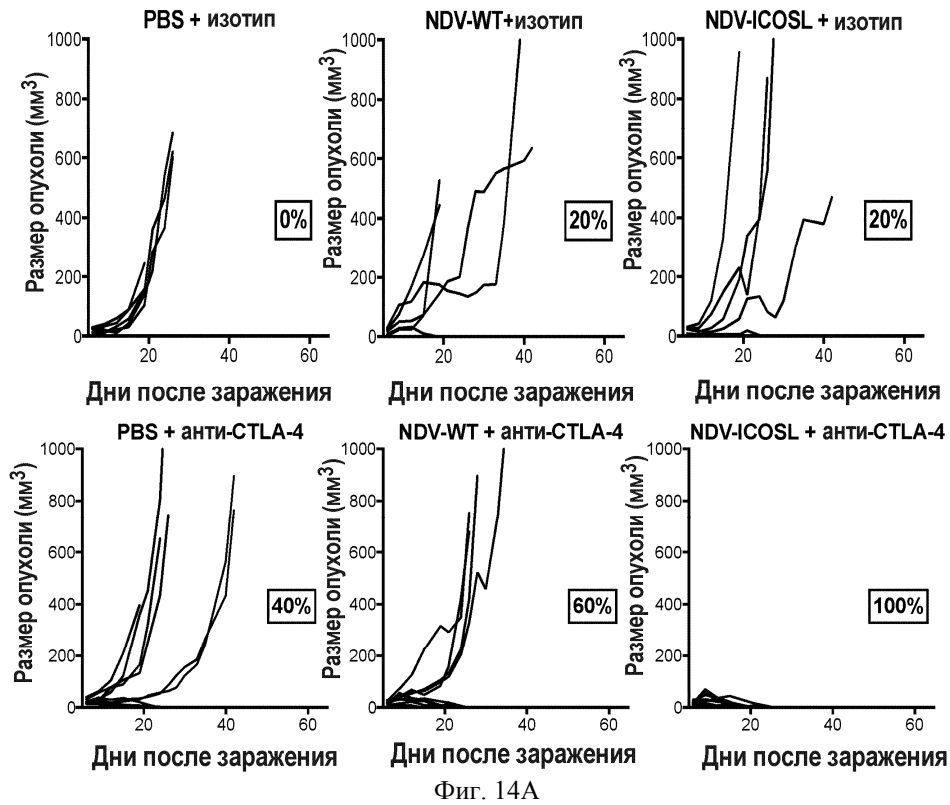
Фиг. 13А



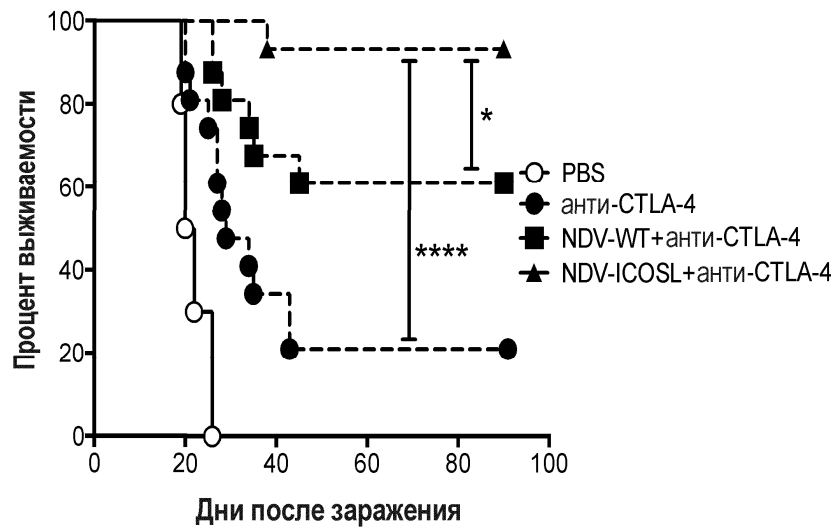
С



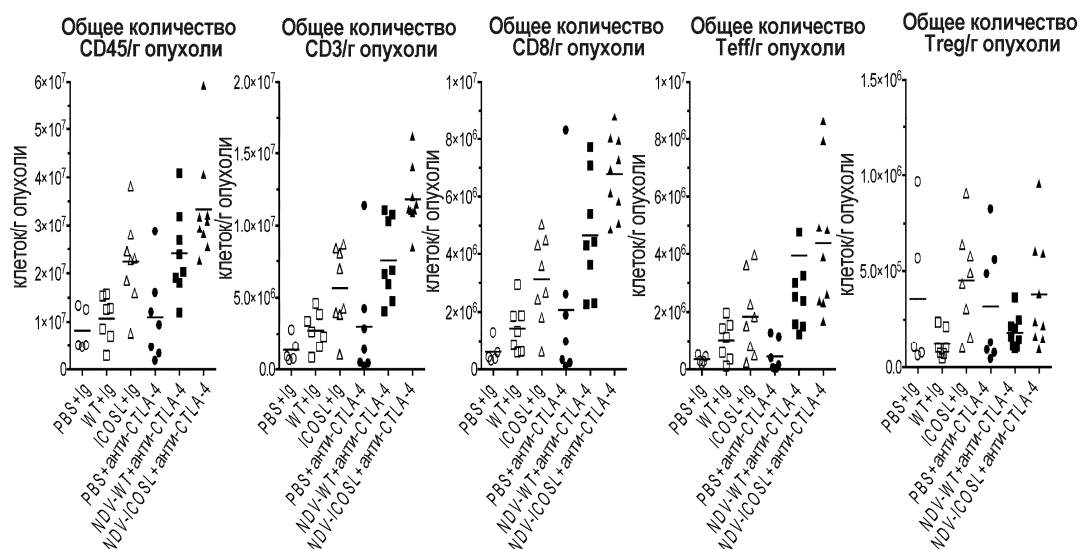
Фиг. 13В-13С



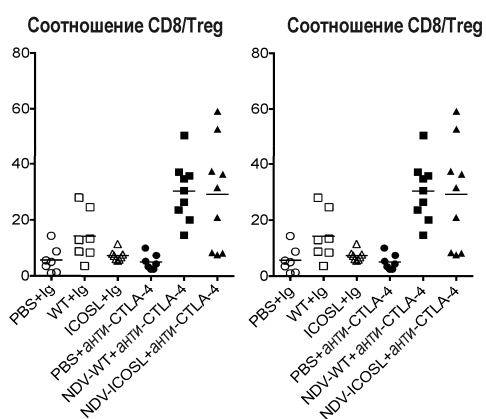
Фиг. 14А



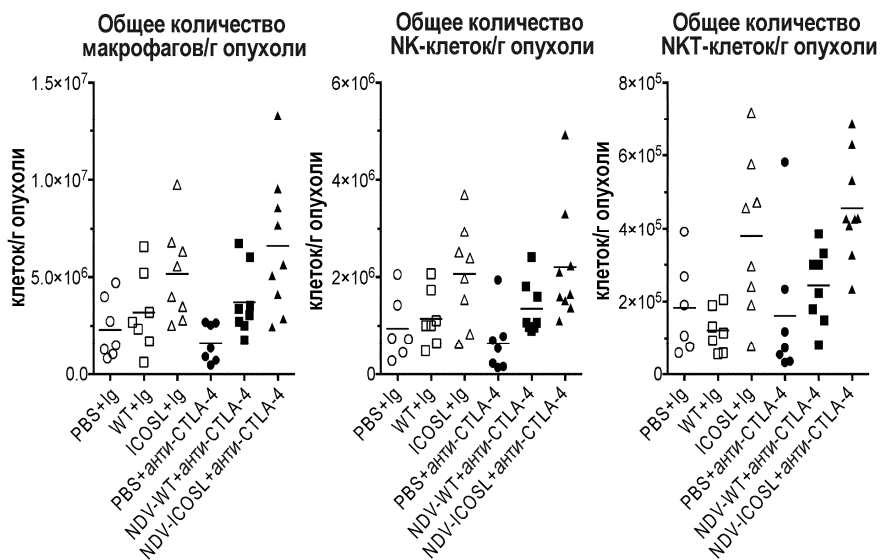
Фиг. 14В



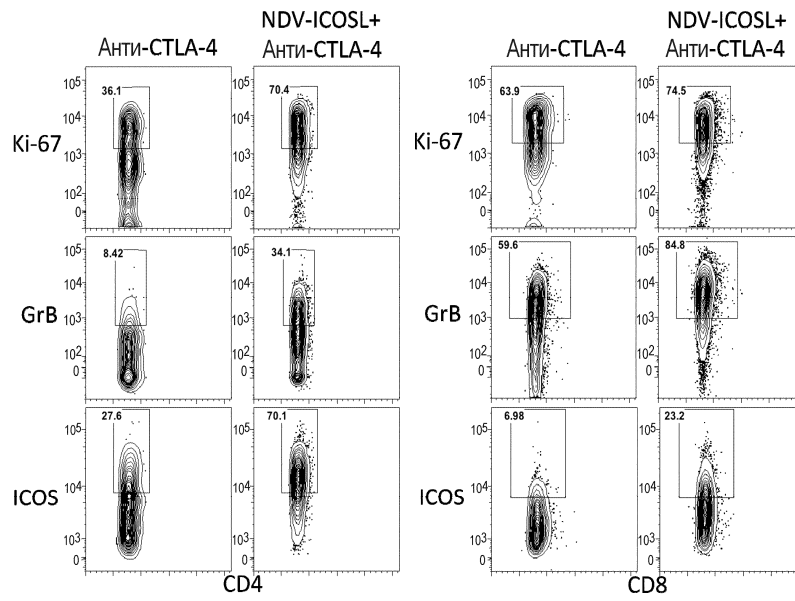
Фиг. 15А



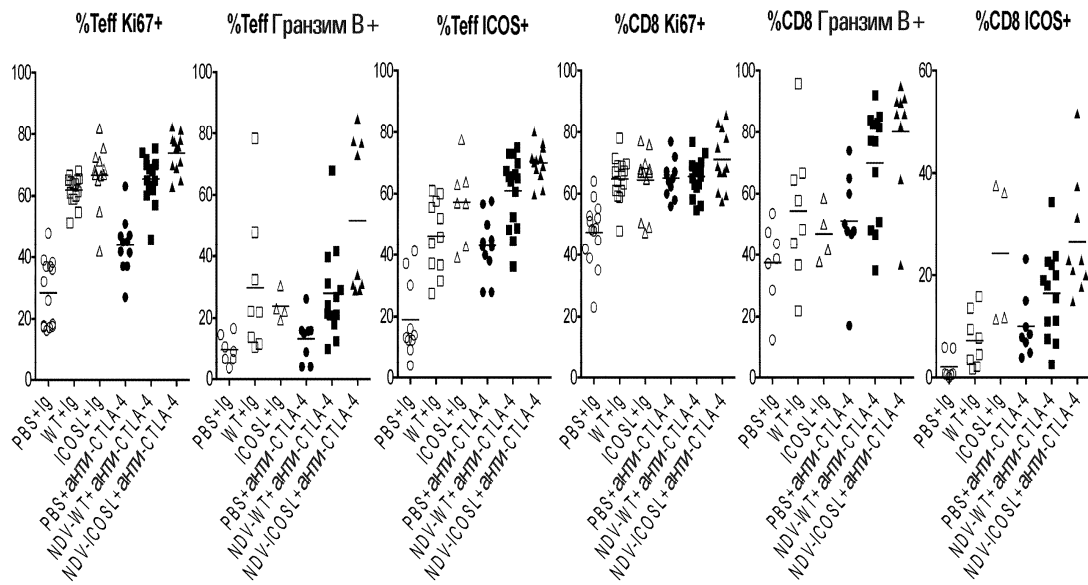
Фиг. 15В



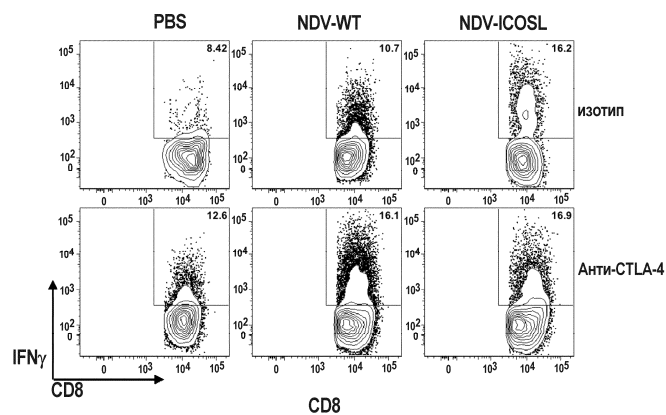
Фиг. 15С



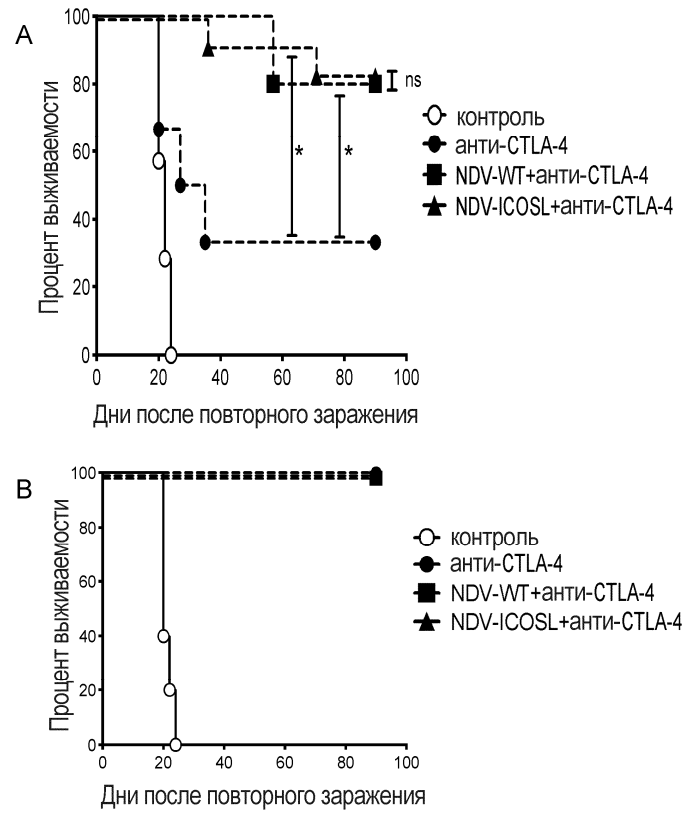
Фиг. 16А



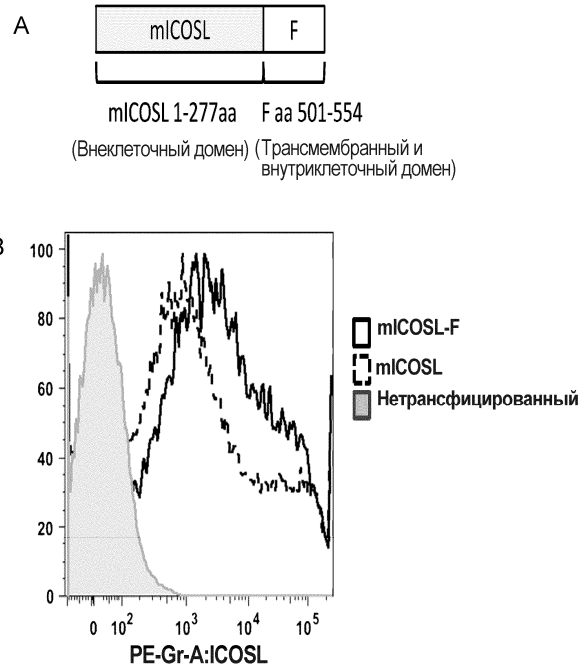
Фиг. 16В



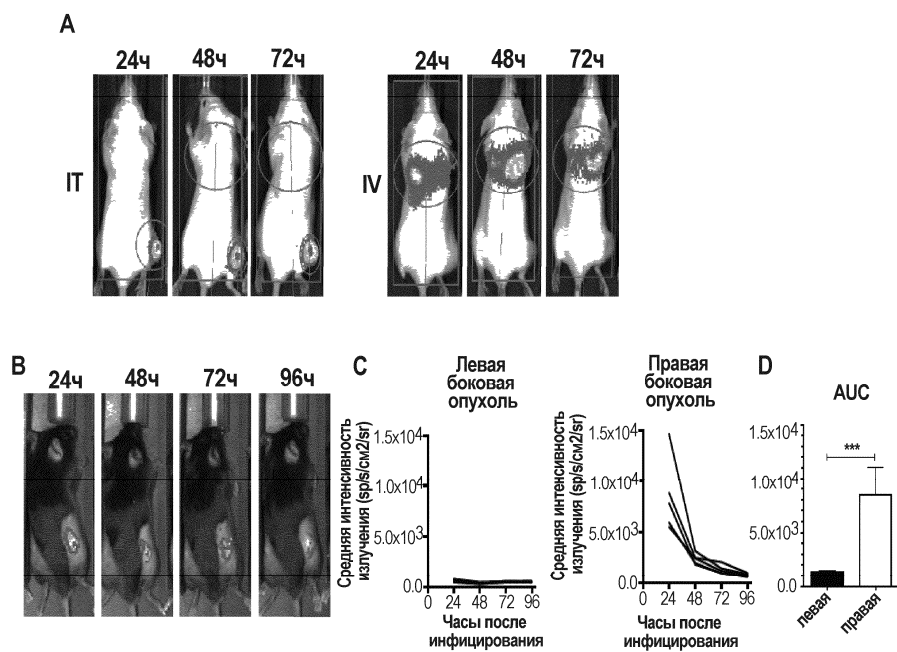
Фиг. 17



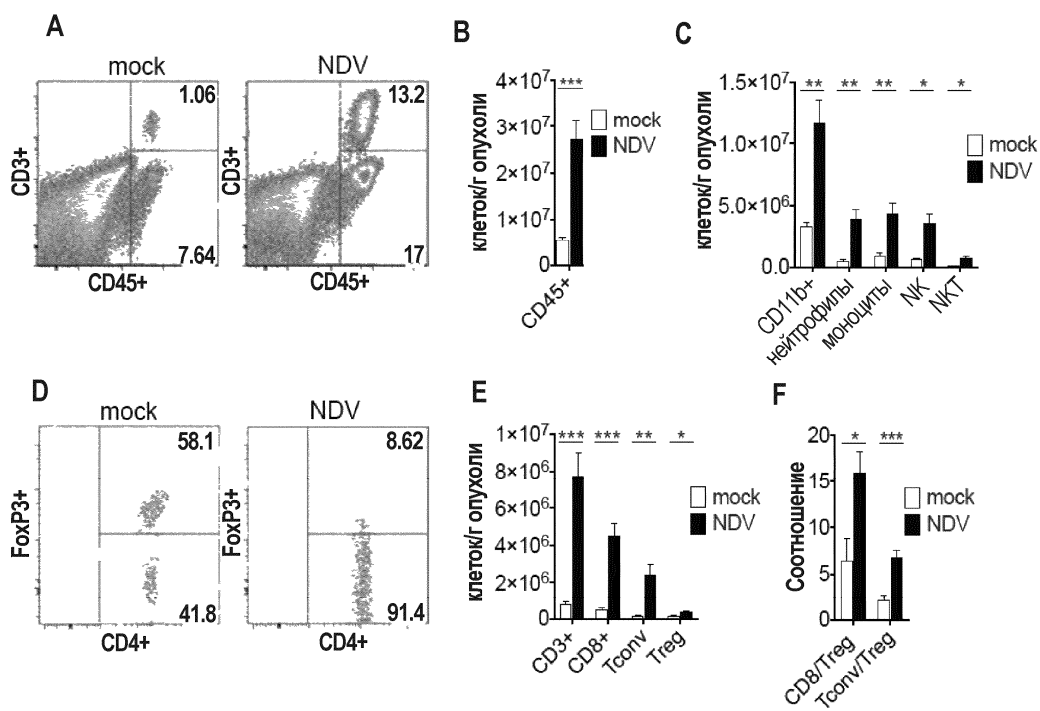
Фиг. 18А-18В



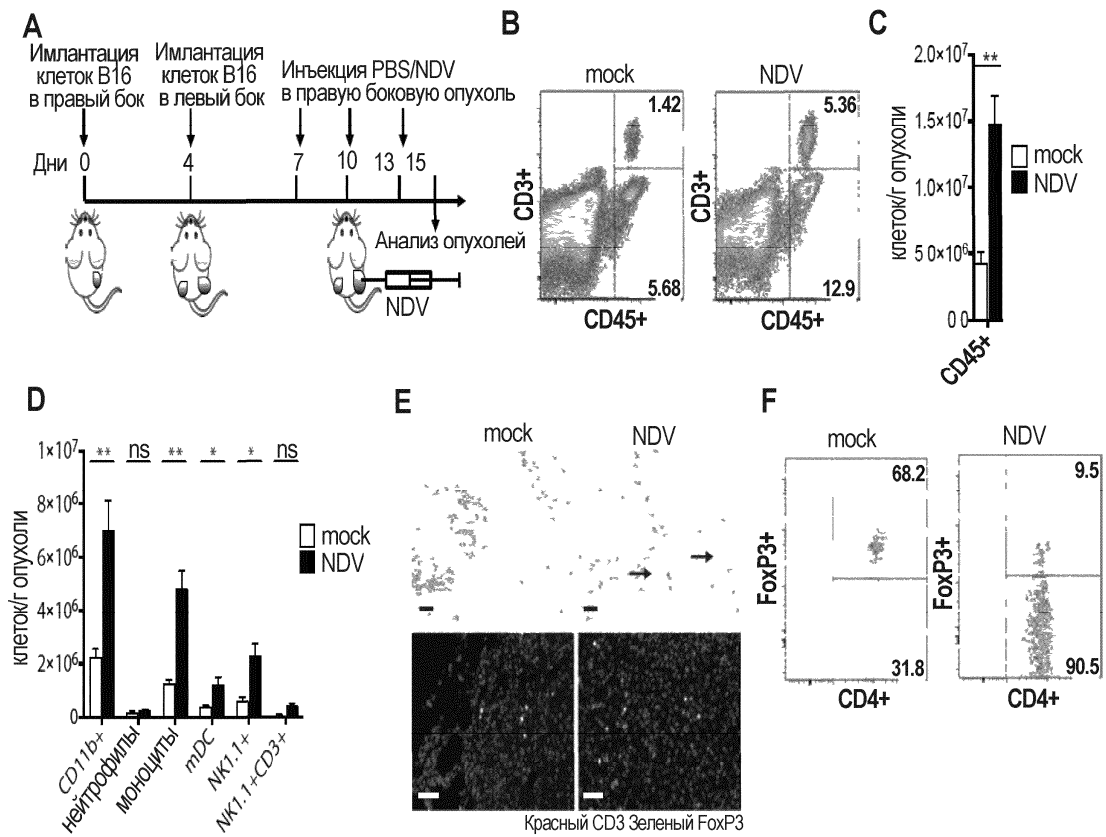
Фиг. 19А-19В



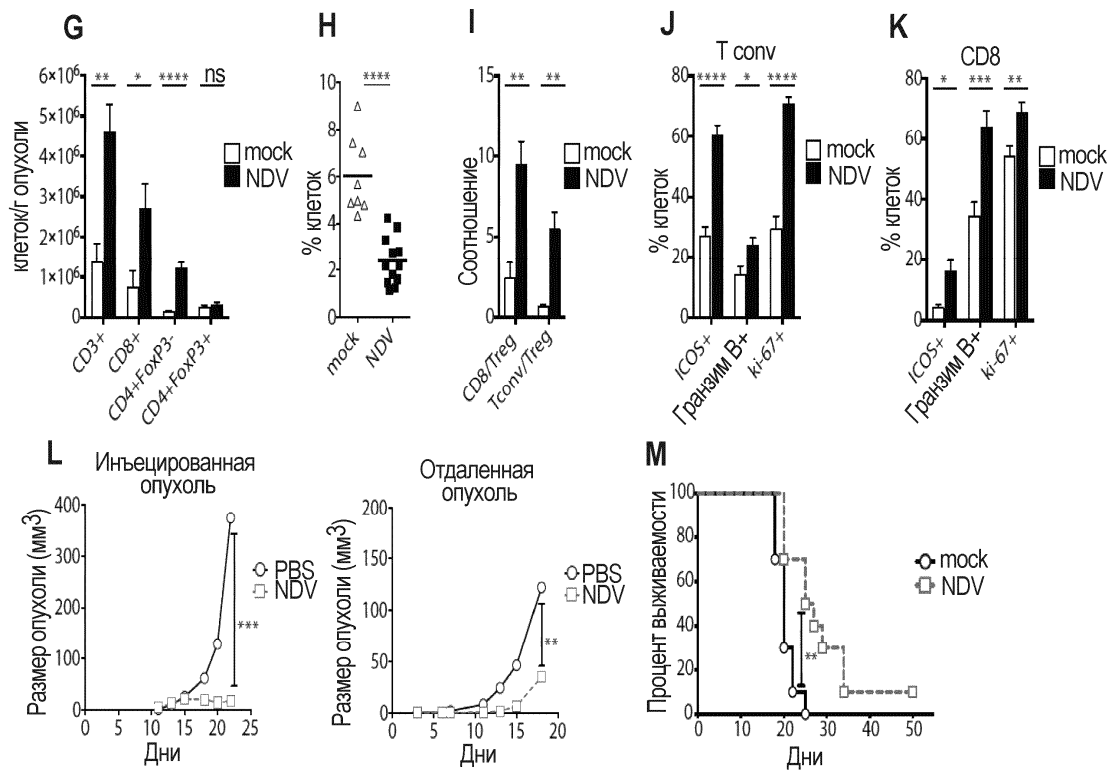
Фиг. 20А-20D



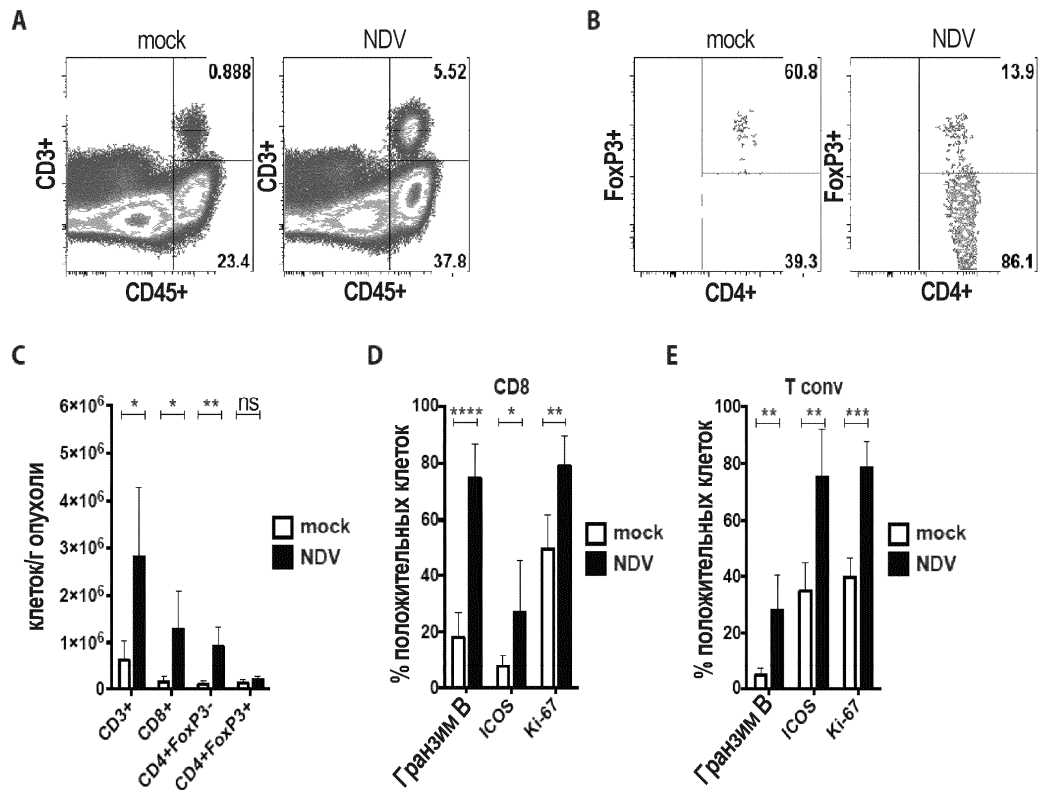
Фиг. 21А-21F



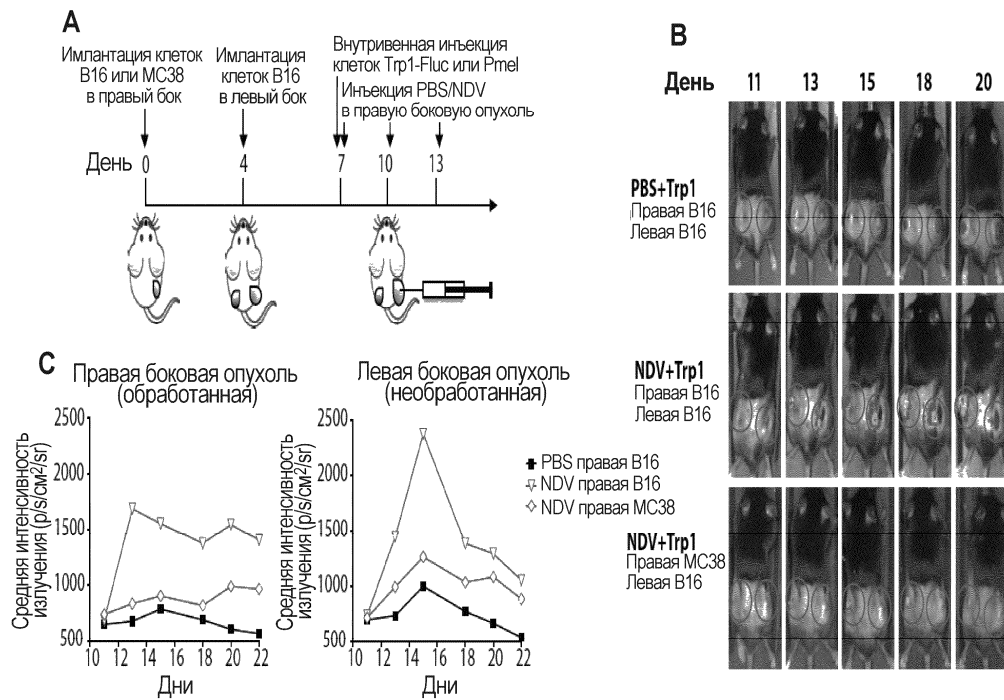
Фиг. 22A-22F



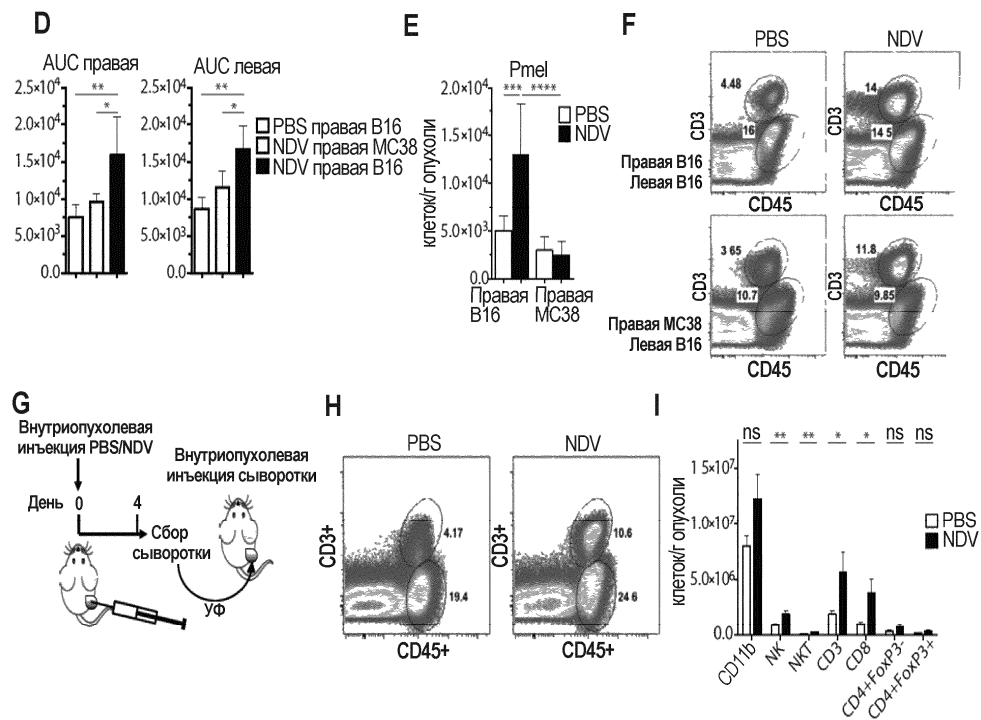
Фиг. 22G-22M



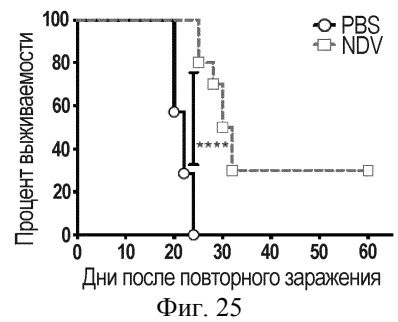
Фиг. 23А-23Е



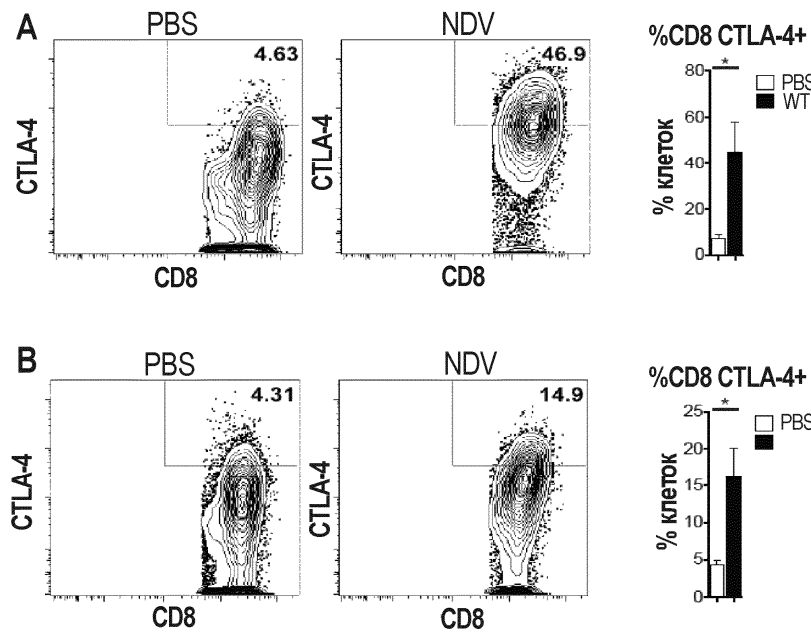
Фиг. 24А-24С



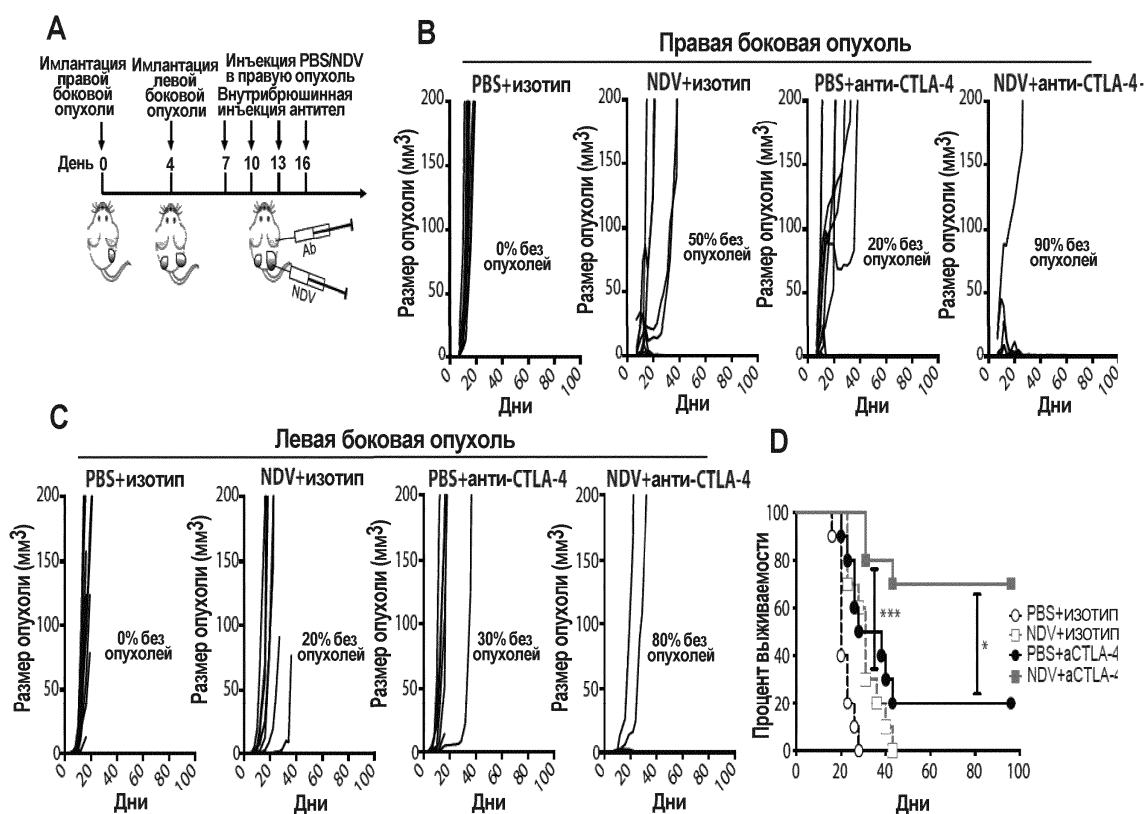
Фиг. 24D-24I



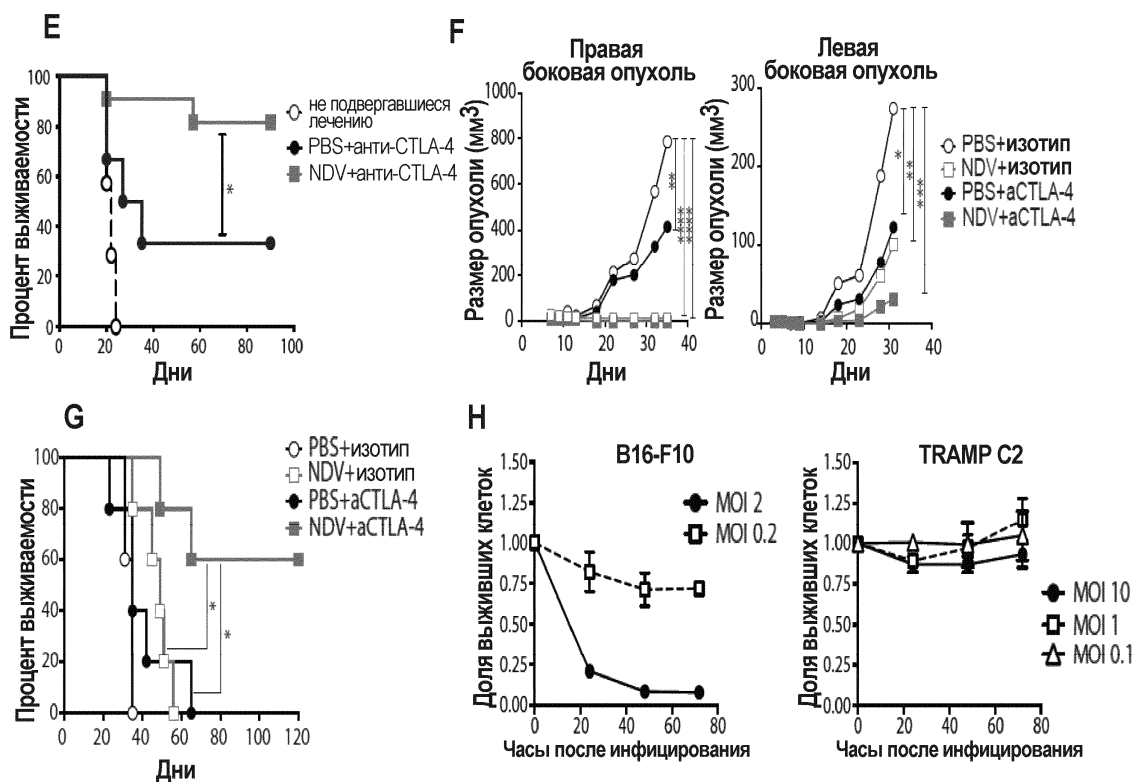
Фиг. 25



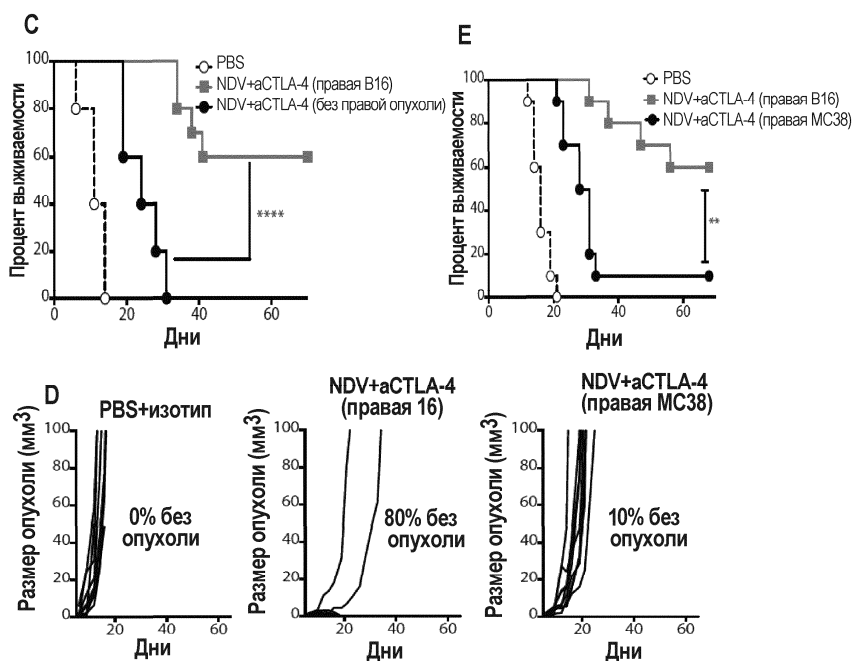
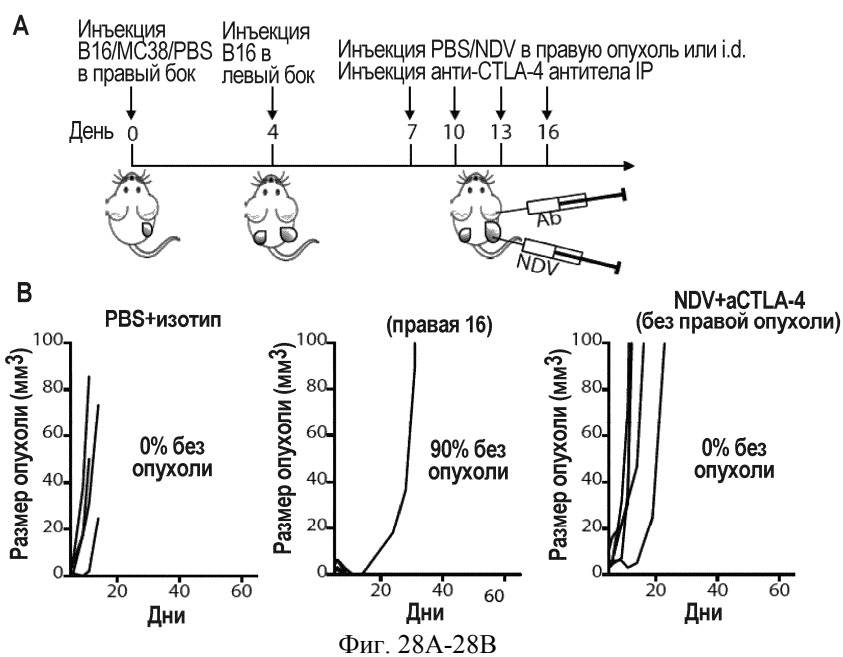
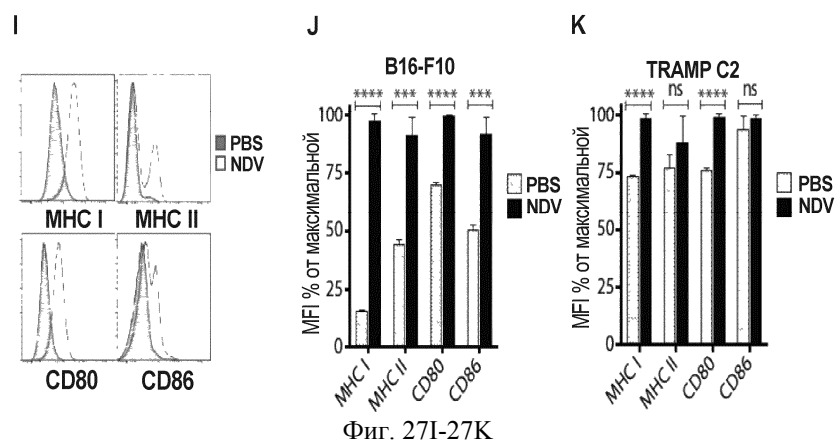
Фиг. 26

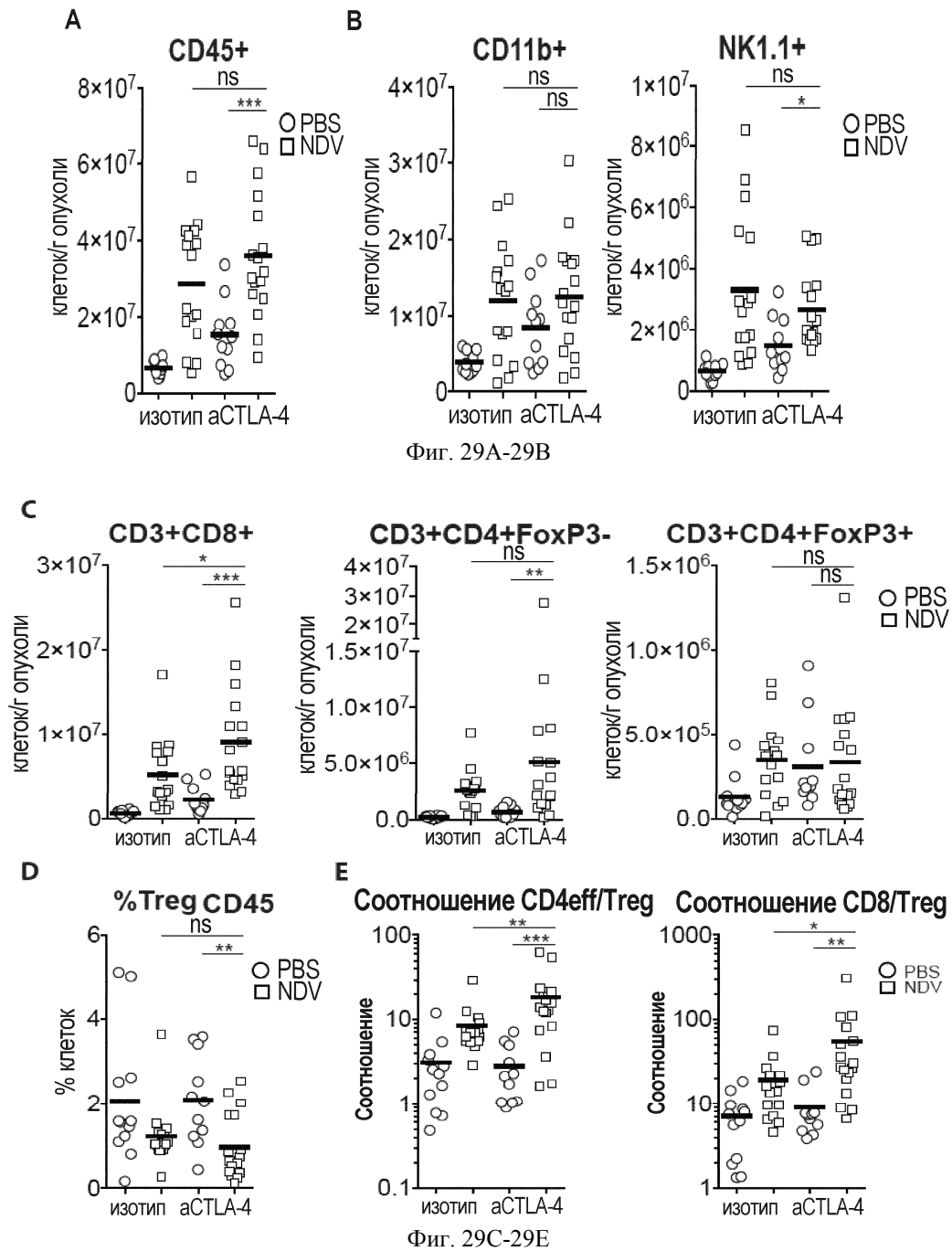


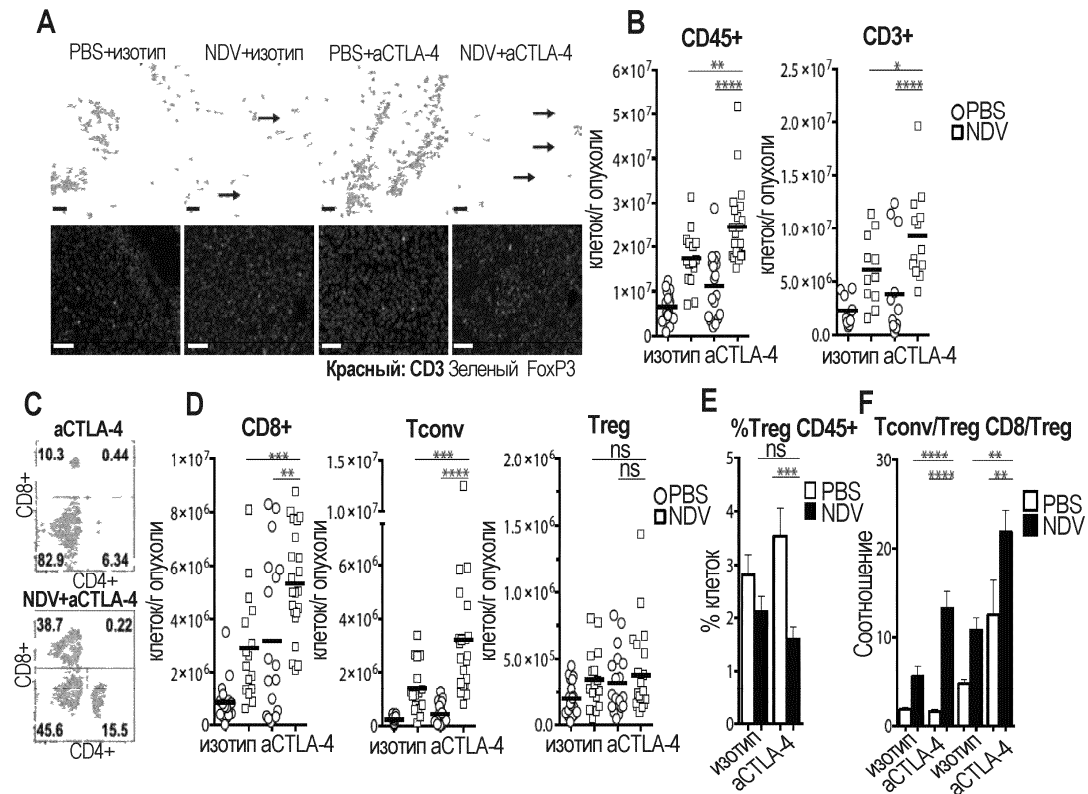
Фиг. 24А-27D



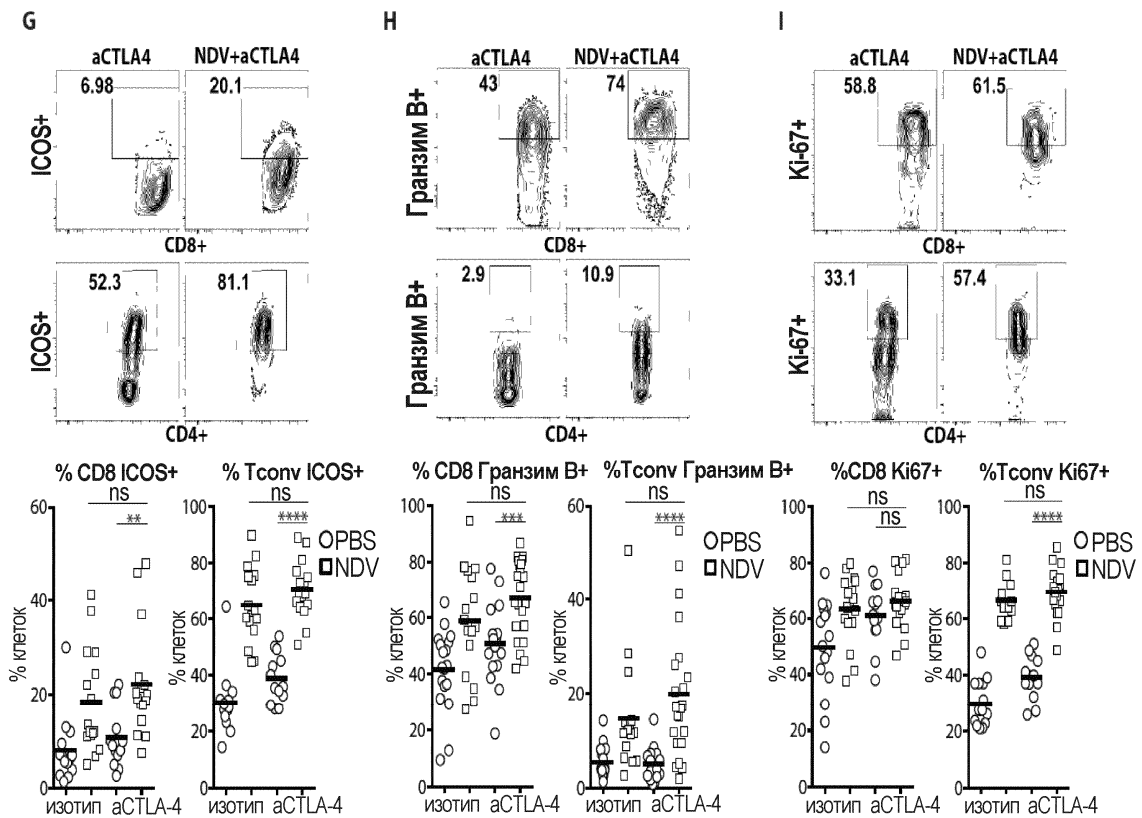
Фиг. 27Е-27Н



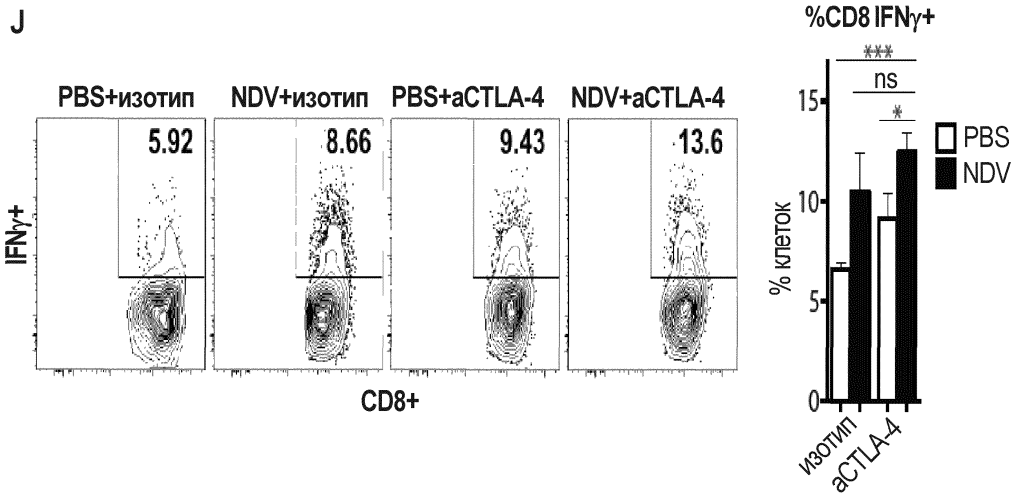




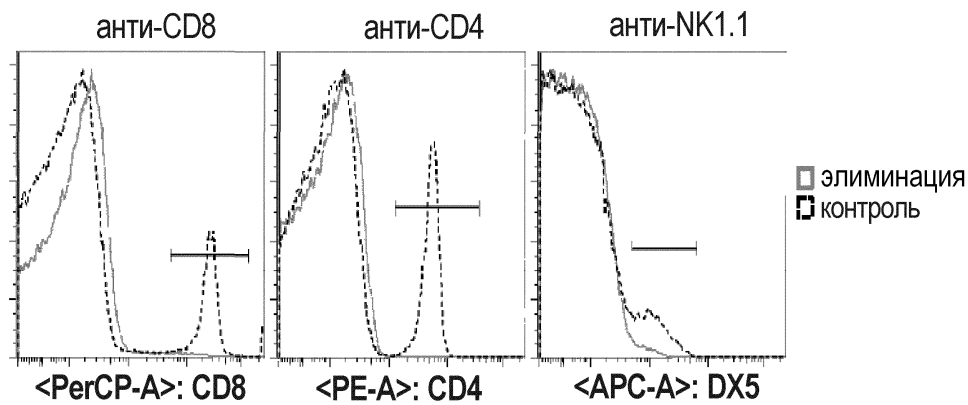
Фиг. 30A-30F



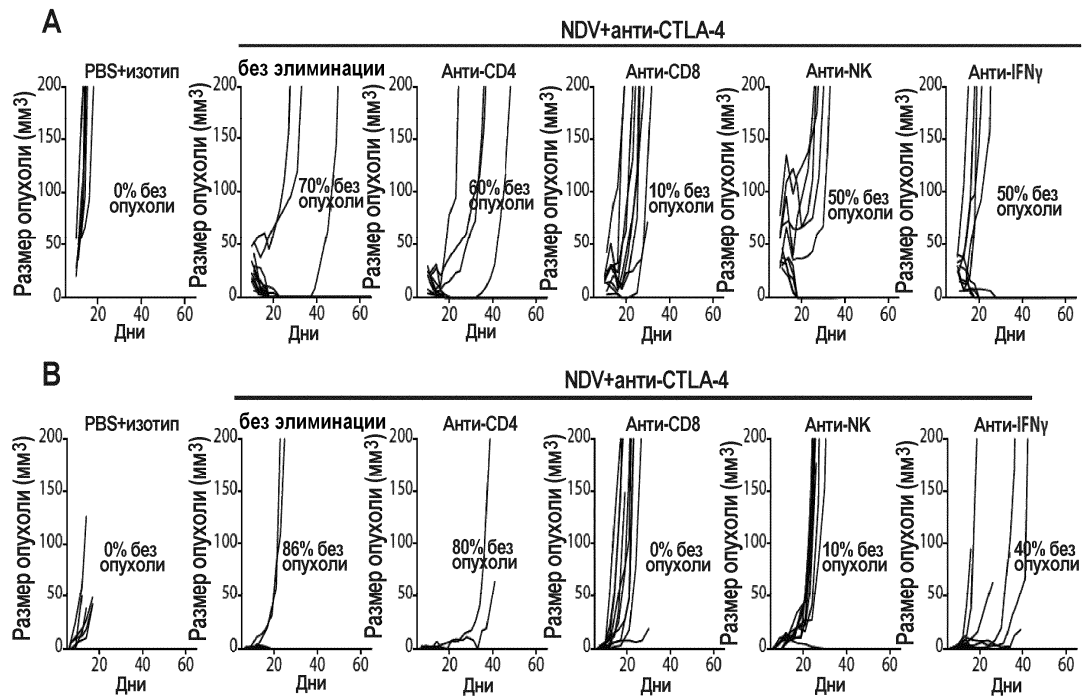
Фиг. 30G-30I



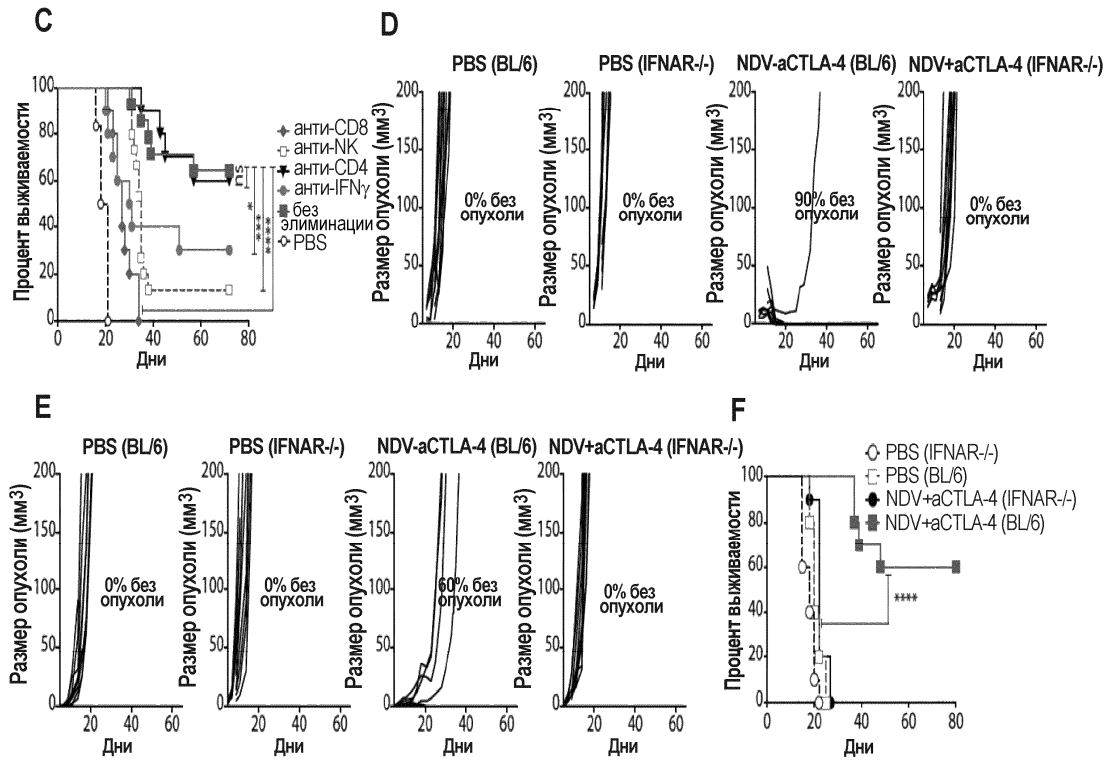
Фиг. 30J



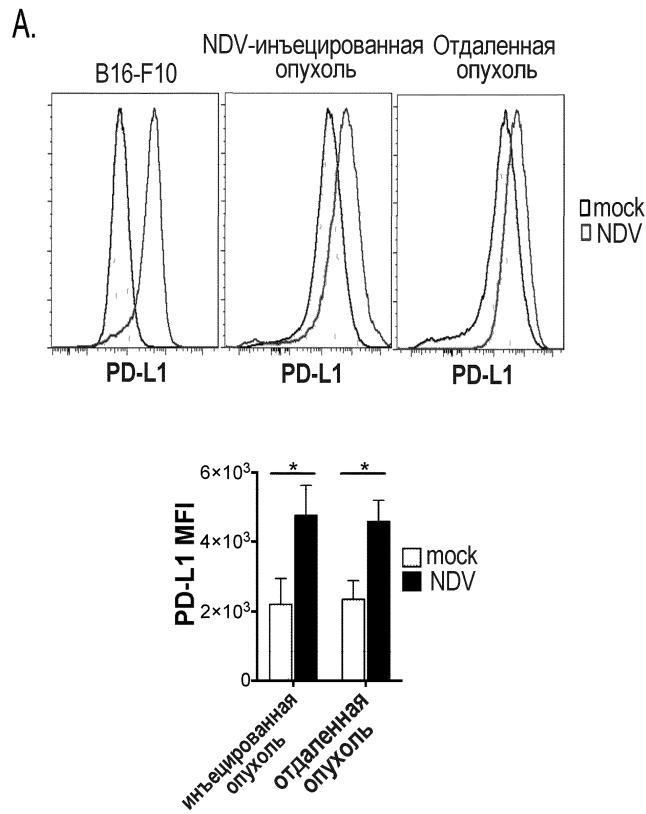
Фиг. 31



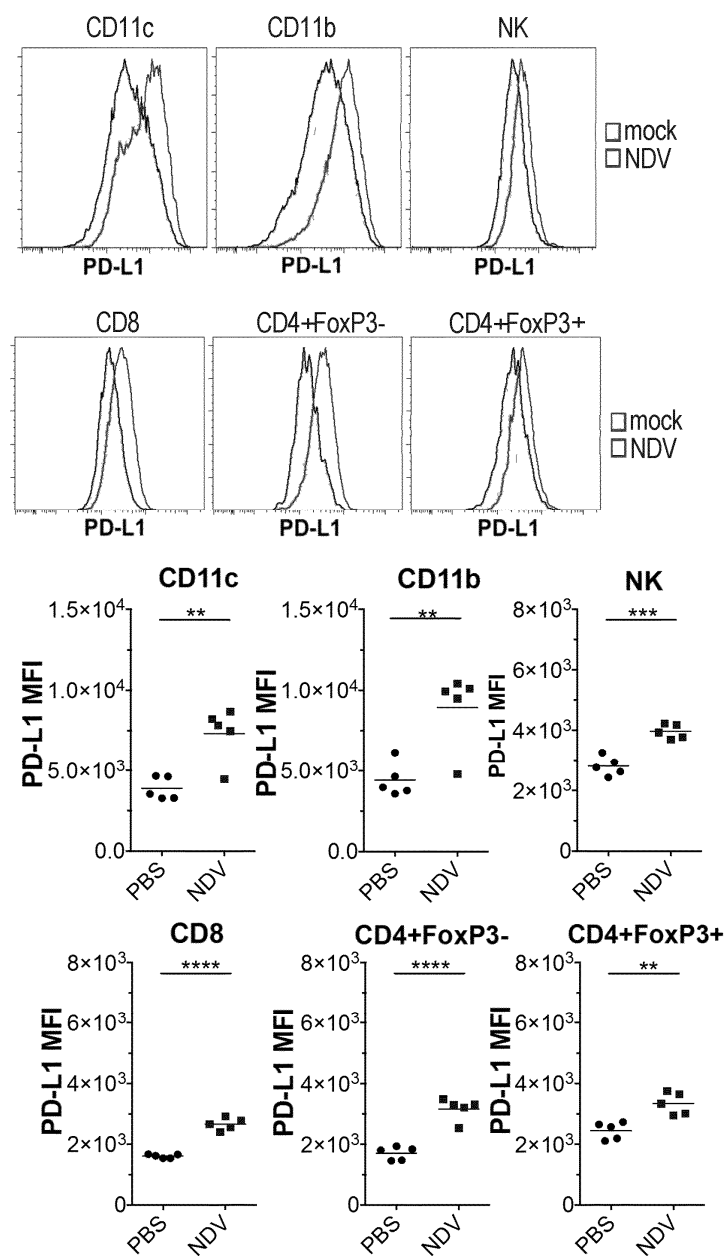
Фиг. 32A-32B



Фиг. 32С-32F

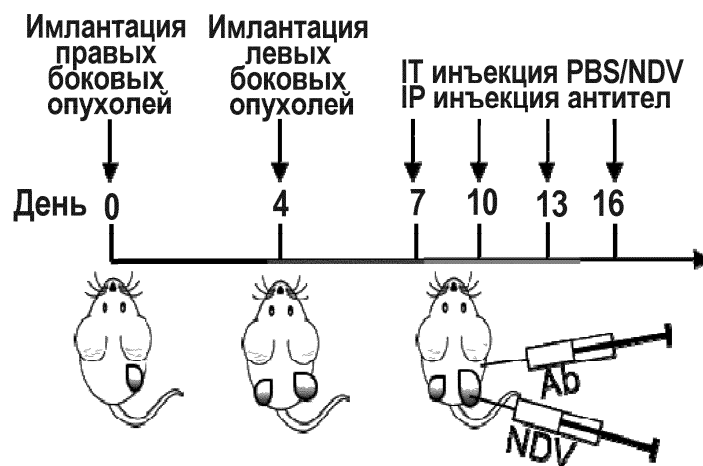


Фиг. 33А

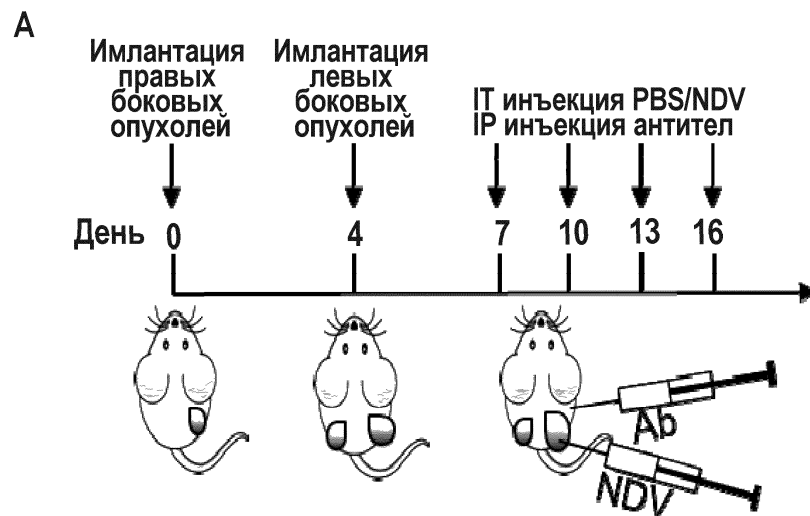
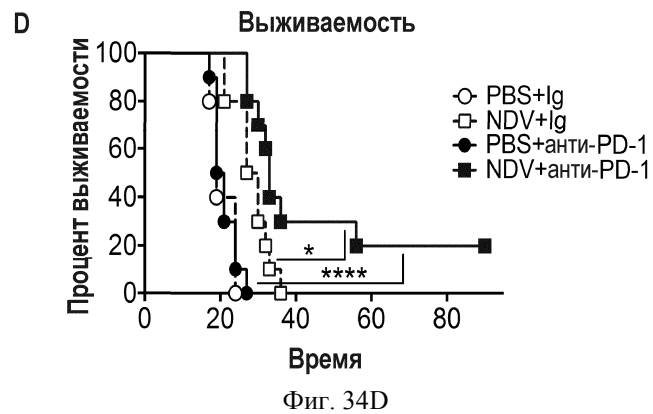
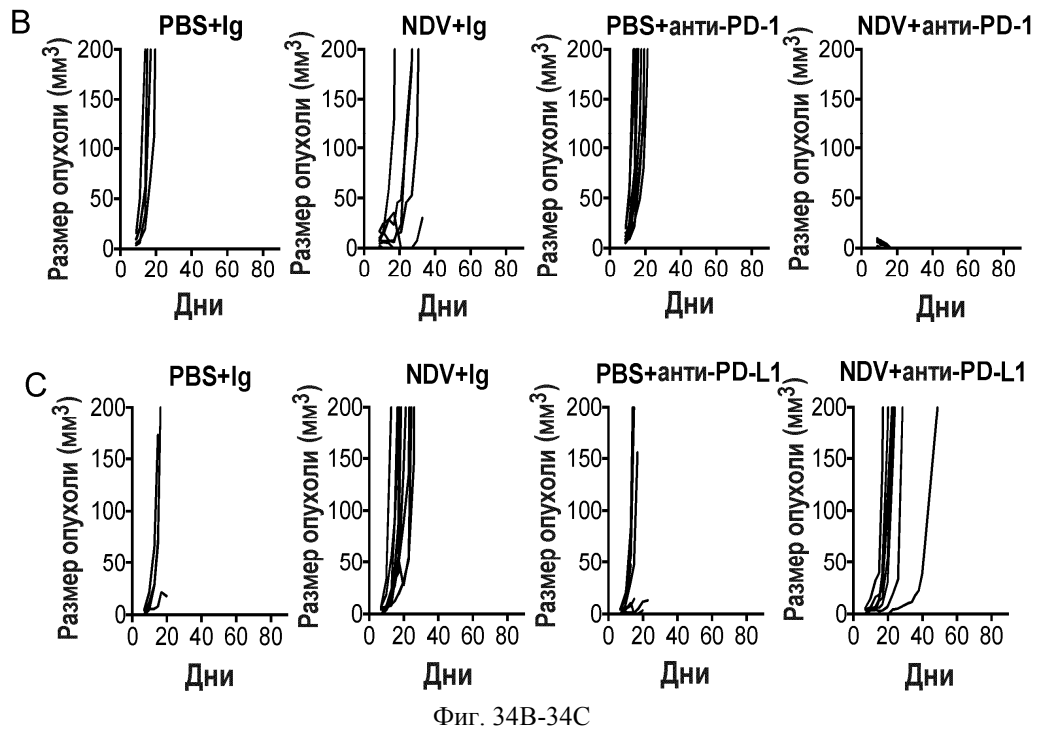


Фиг. 33В

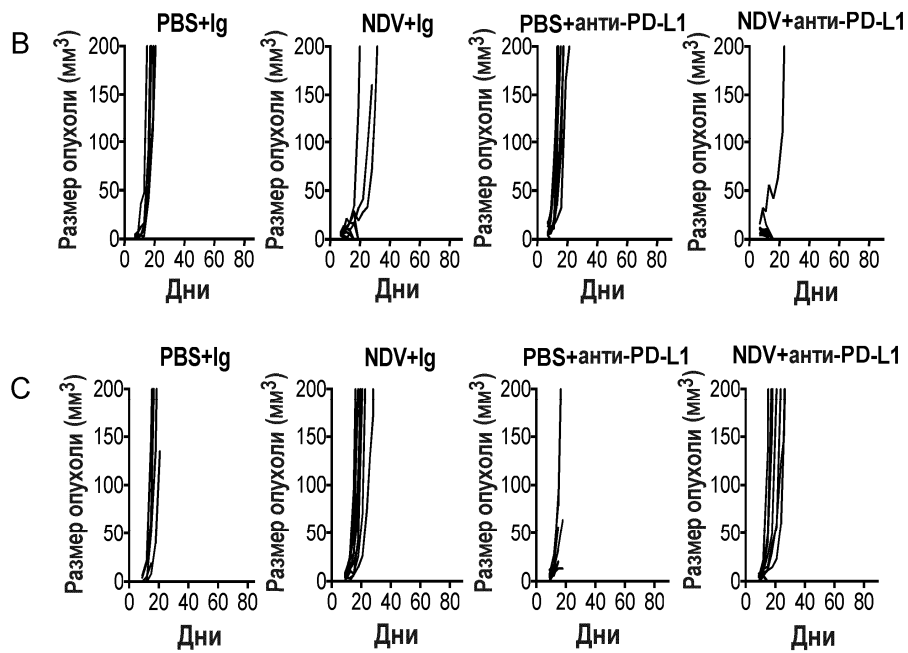
A.



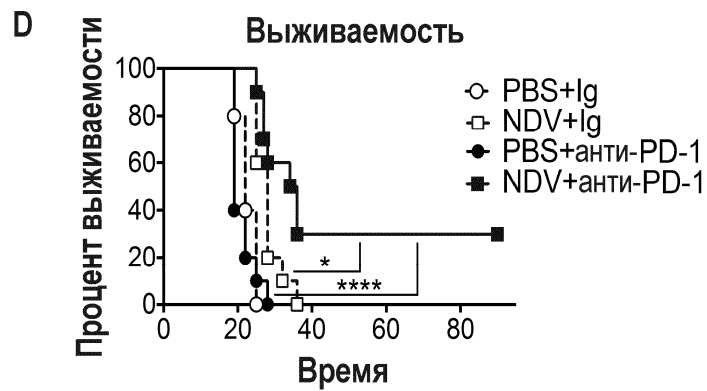
Фиг. 34А



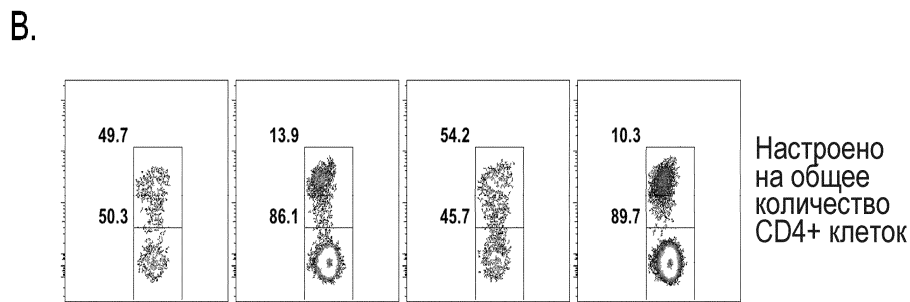
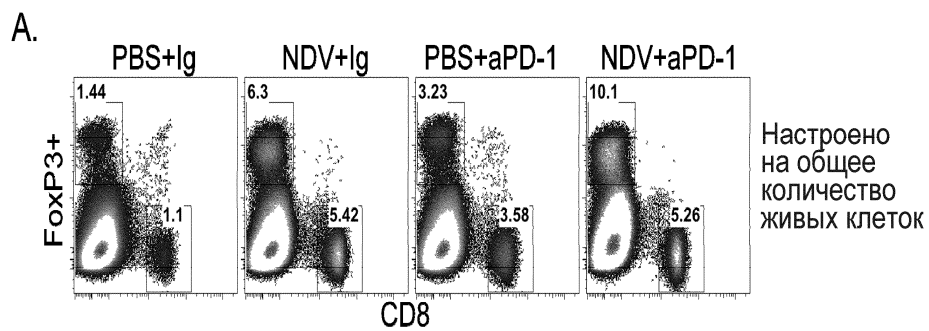
Фиг. 35А



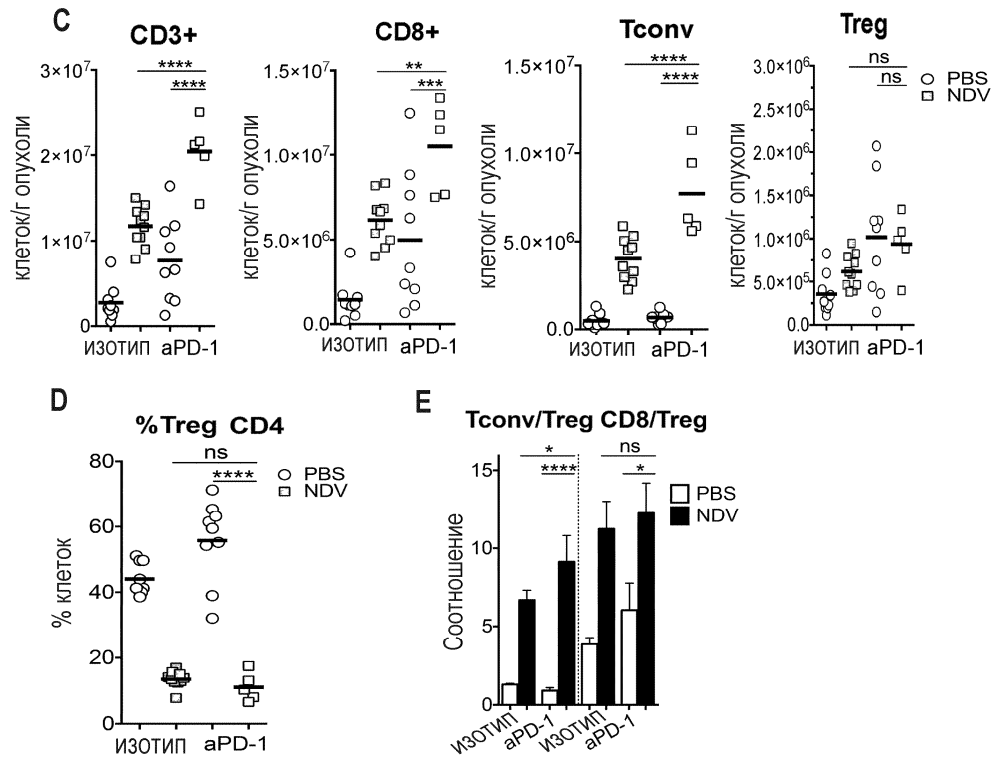
Фиг. 35B-35C



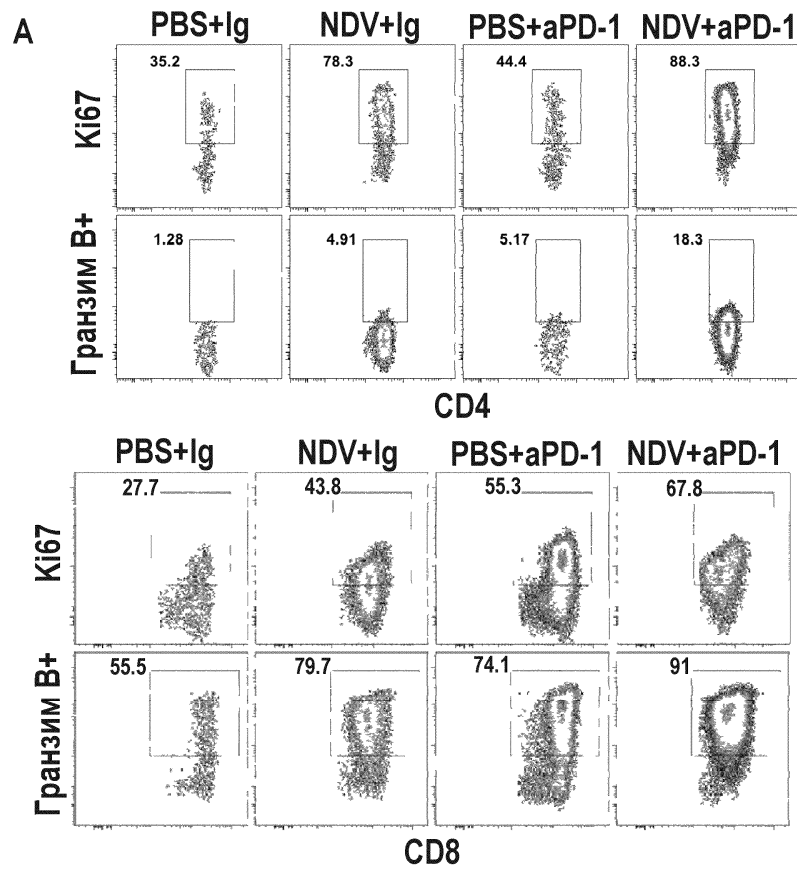
Фиг. 35D



Фиг. 36A-36B

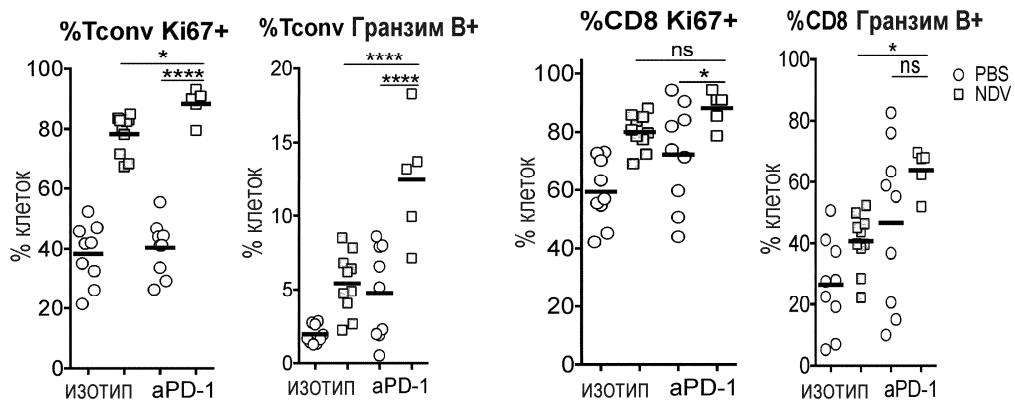


Фиг. 36С-36Е

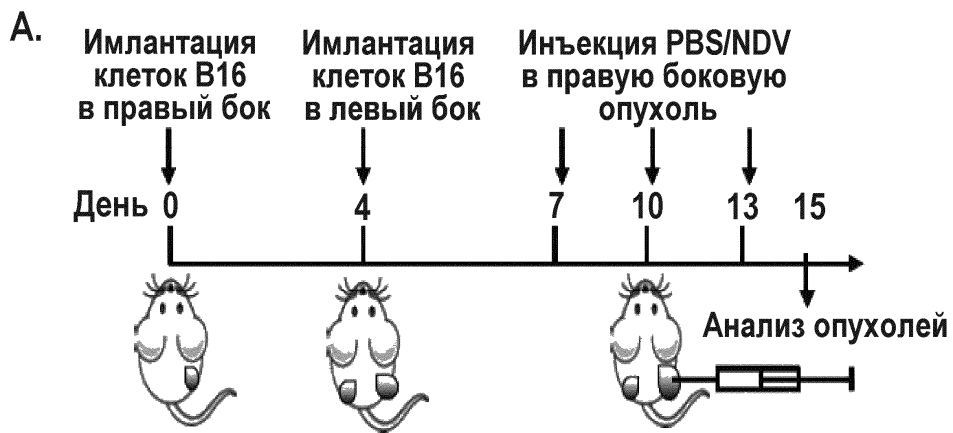


Фиг. 37А

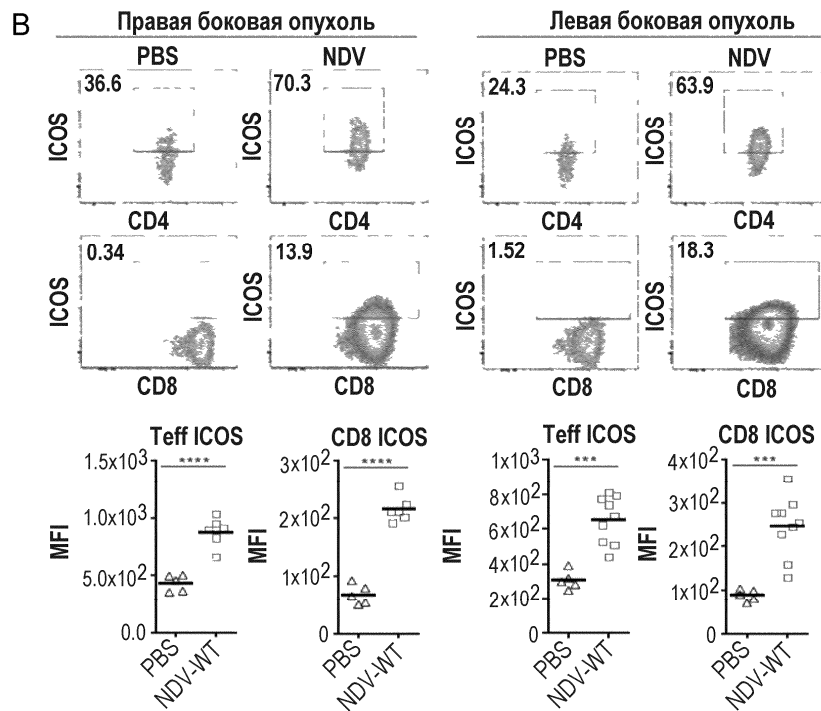
В



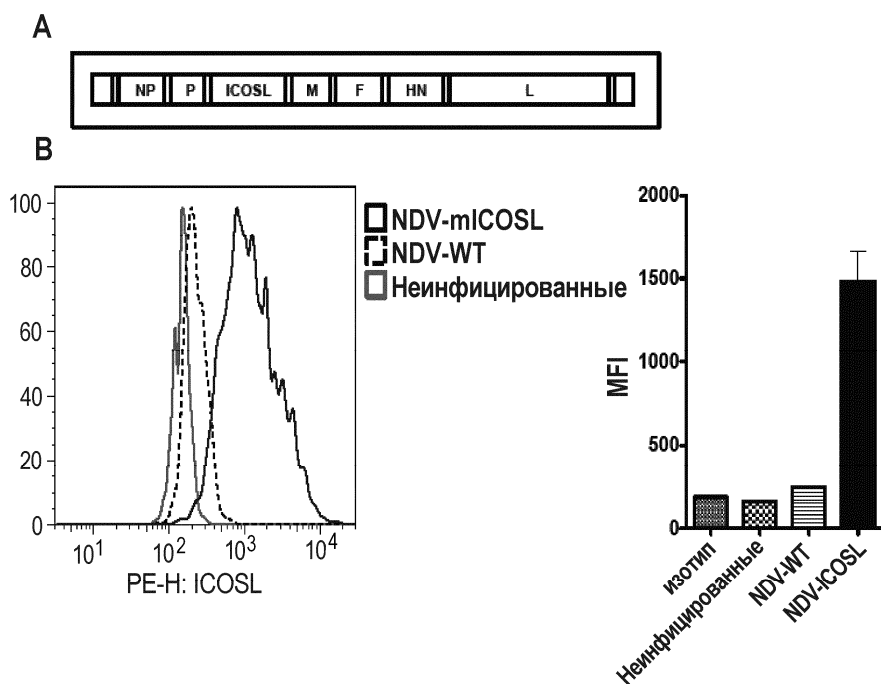
Фиг. 37В



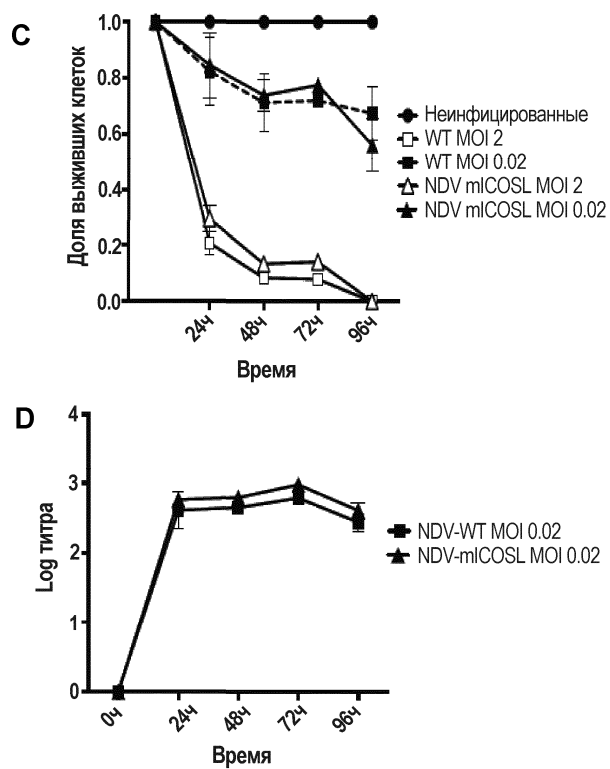
Фиг. 38А



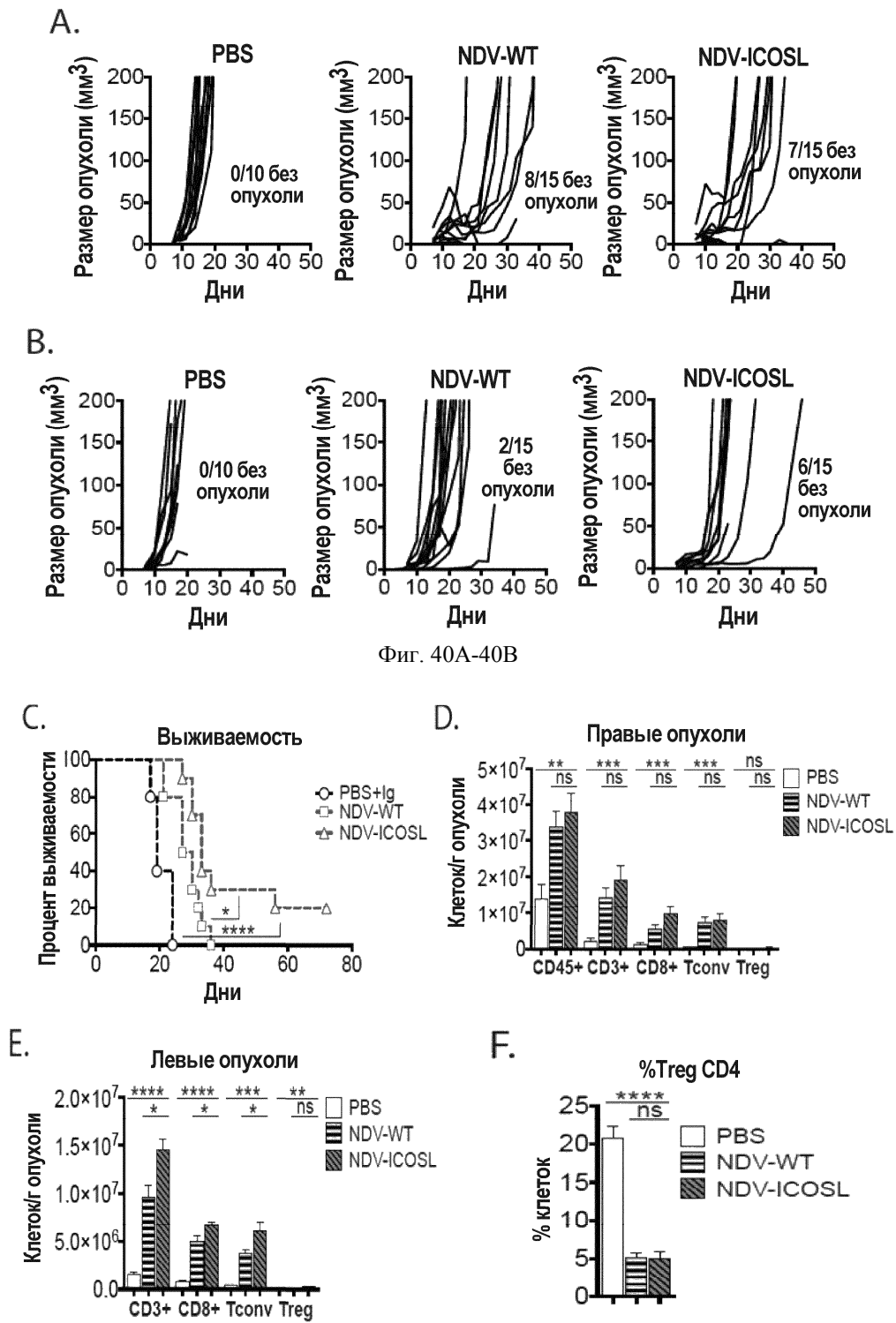
Фиг. 38В-38С



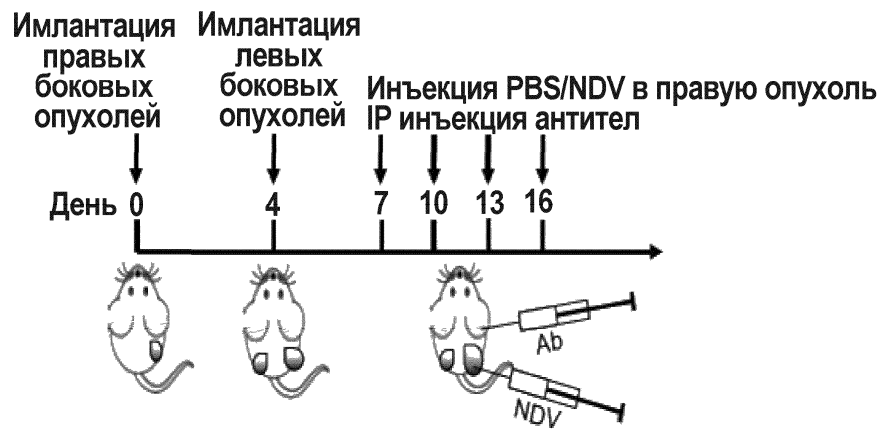
Фиг. 39А-39В



Фиг. 39С-39D



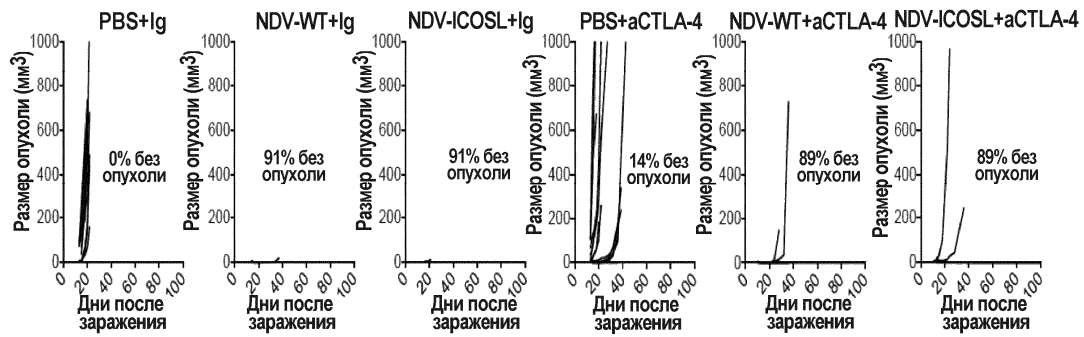
A.



Фиг. 41А

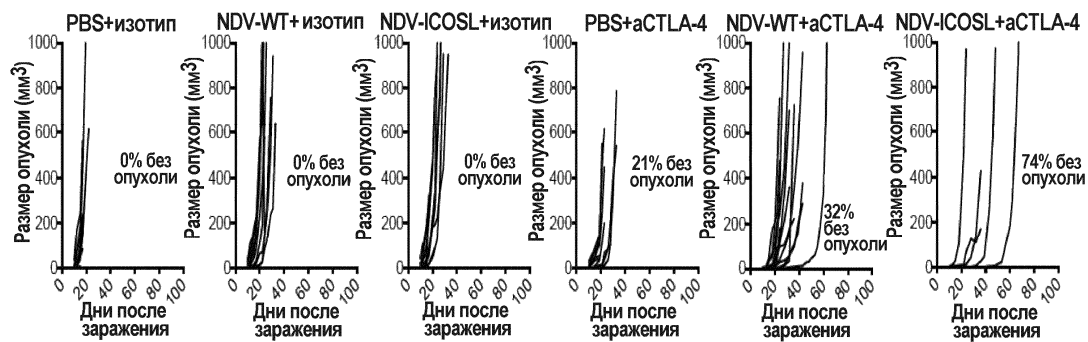
B.

Правая боковая опухоль



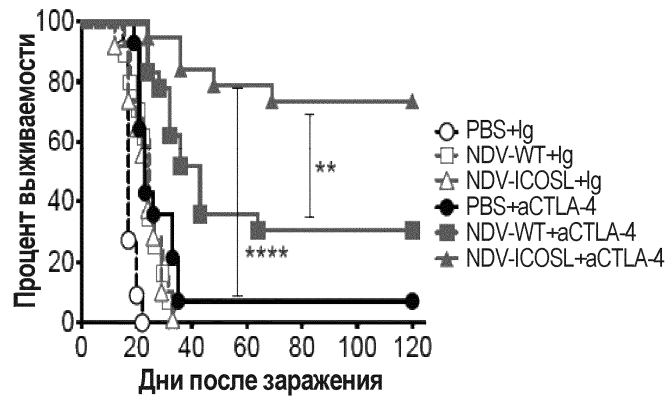
C.

Левая боковая опухоль

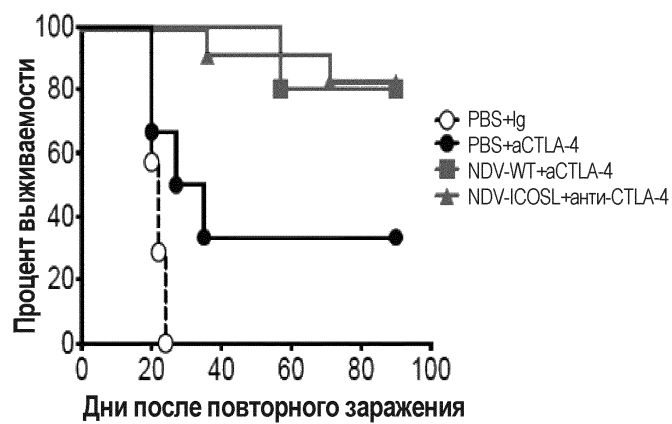


Фиг. 41С-41В

D.

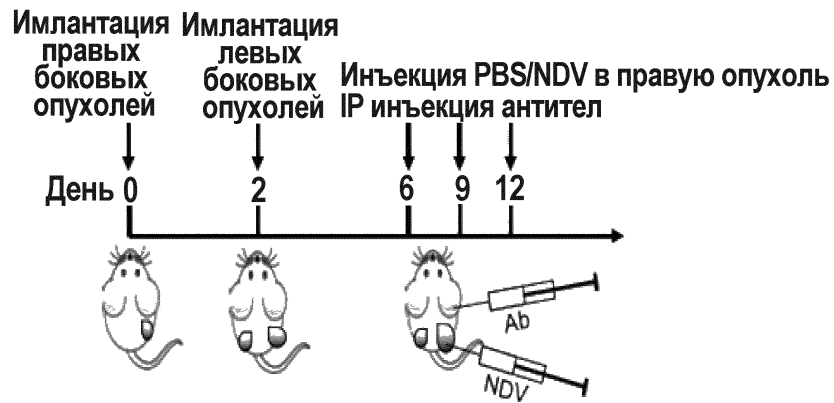


E.



Фиг. 41D-41E

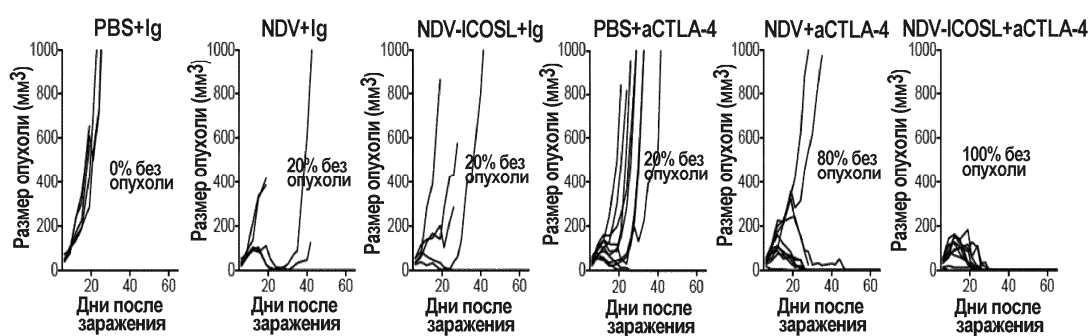
A.



Фиг. 42A

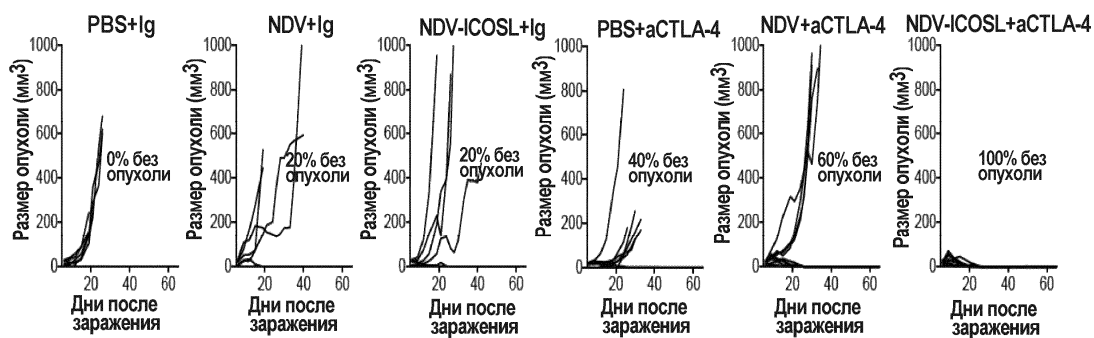
B.

Правая боковая опухоль



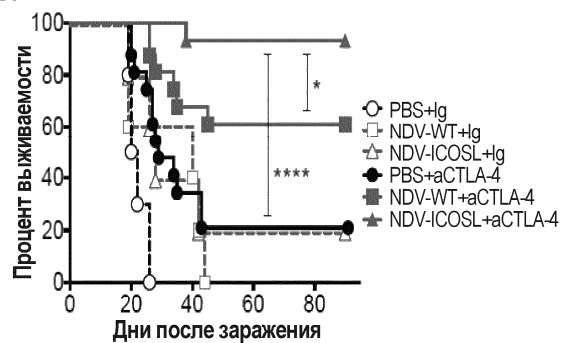
C.

Левая боковая опухоль

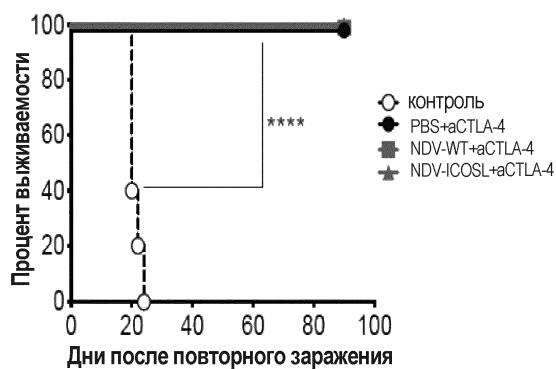


Фиг. 42B-42C

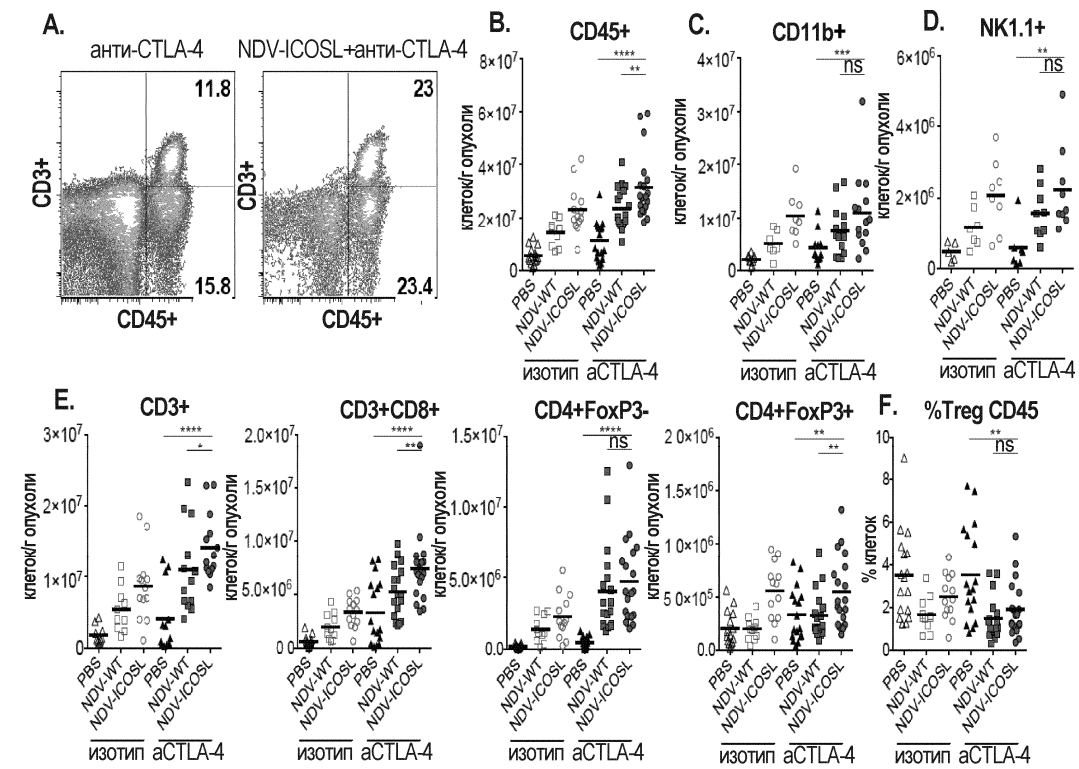
D.



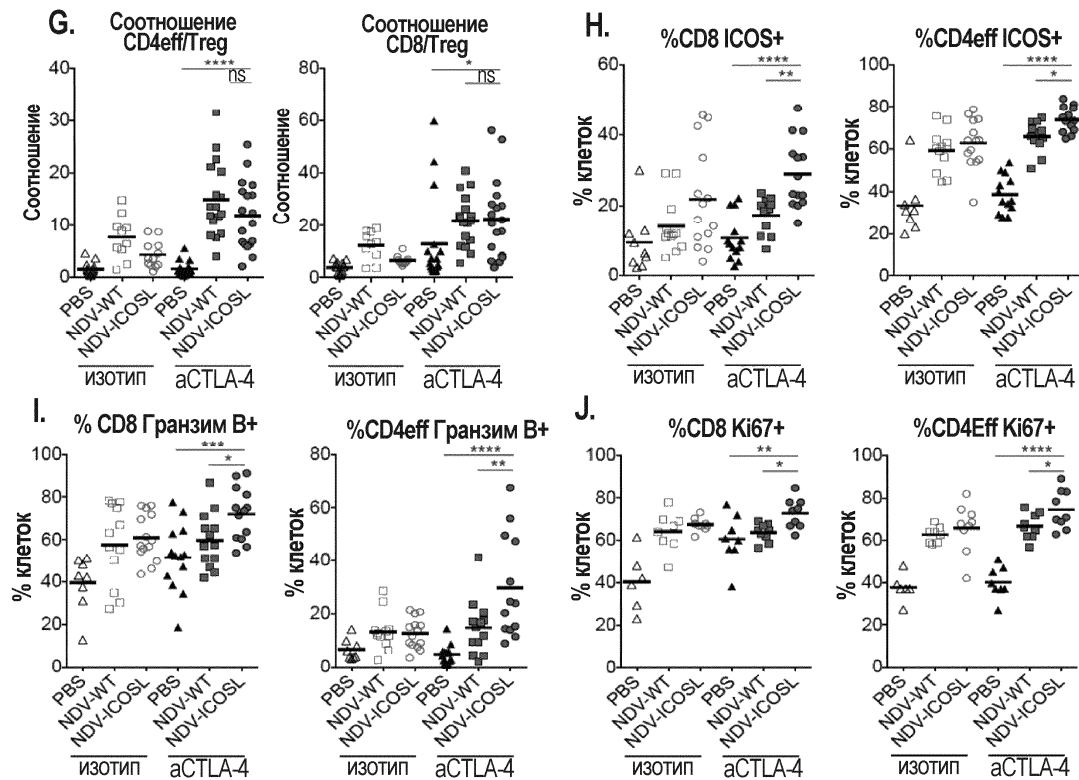
E.



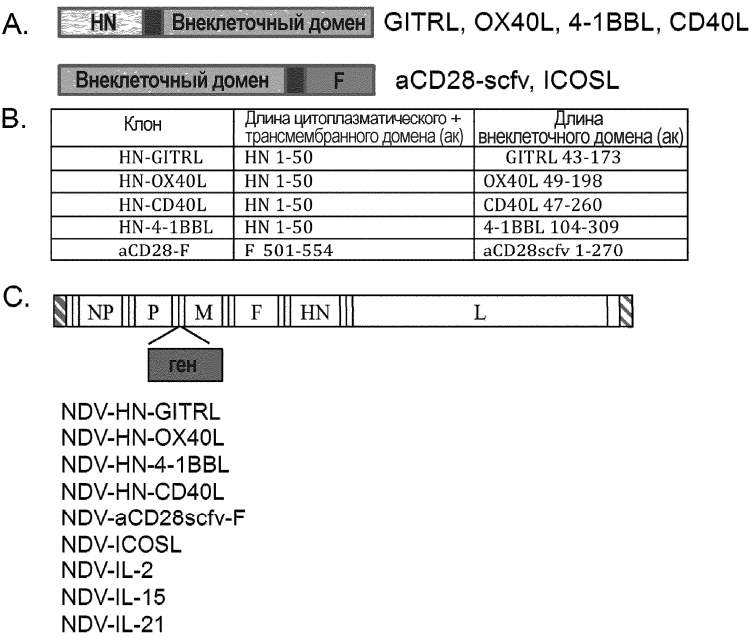
Фиг. 42D-42E



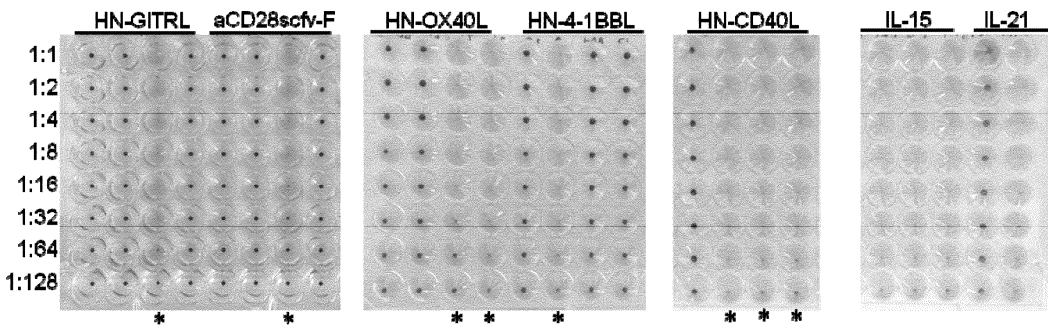
Фиг. 43А-43F



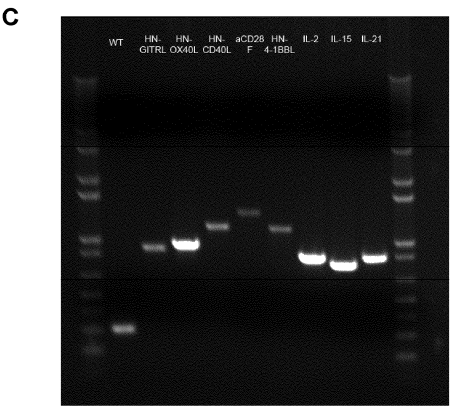
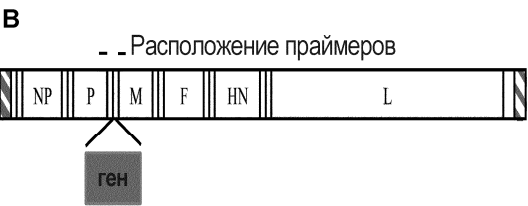
Фиг. 43G-43J



Фиг. 44

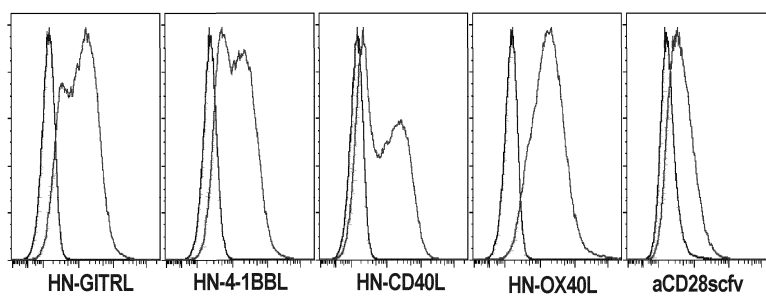


Фиг. 45А

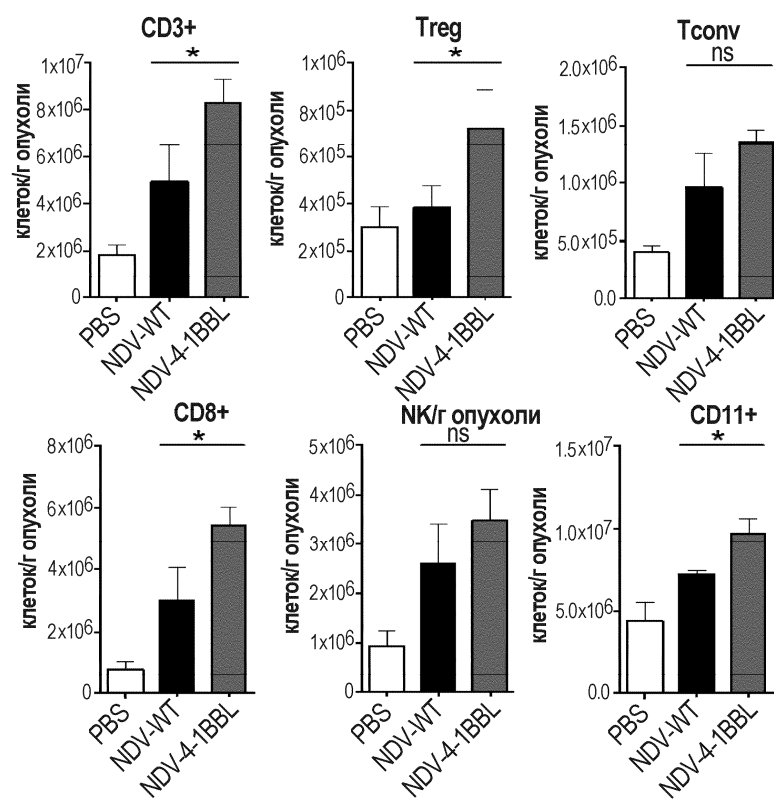


Фиг. 45В-45С

□ NDV-лиганд
■ NDV-WT



Фиг. 46



Фиг. 47



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2