

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191997 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.22

(22) Дата подачи заявки
2020.01.24

(51) Int. Cl. *A61K 35/766* (2015.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ РАБДОВИРУС, КОДИРУЮЩИЙ CCL21

(31) 19153668.9

(32) 2019.01.25

(33) EP

(86) PCT/EP2020/051701

(87) WO 2020/152306 2020.07.30

(71) Заявитель:
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE);
ВАЙРАТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ (AT)

(72) Изобретатель:

Мюллер Филипп, Эрб Клаус, Эрльман
Патрик, Нольден Тобиас, Пак Джон
Эдвард (DE), Волльман Гвидо (AT)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к области онколитических вирусов, в частности рекомбинантного рабдовируса, кодирующего в своем геноме белок CCL21. Изобретение также касается применения рекомбинантного рабдовируса в лечении рака, а также способов получения таких вирусов.

A1

202191997

202191997

A1

РЕКОМБИНАНТНЫЙ РАБДОВИРУС, КОДИРУЮЩИЙ SCL21

5 **Область изобретения**

[0001] Настоящее изобретение относится к области онколитических вирусов, в частности, рекомбинантного рабдовируса, кодирующего в своем геноме белок SCL21. Изобретение также касается применения рекомбинантного рабдовируса в лечении рака, а также способов получения таких вирусов.

10 **Уровень техники**

[0002] Онколитические вирусы представляют перспективный класс биопрепаратов, которые селективно реплицируются в раковых клетках и убивают их и способны размножаться в опухолях. Попытки дальнейшего улучшения онколитических вирусов для увеличения их терапевтического

15 потенциала привели к разработке так называемых вооруженных вирусов, кодирующих в своем геноме опухолевые антигены или иммуномодулирующие трансгены для улучшения их эффективности в лечении опухолей.

[0003] Во многих случаях ощущается дефицит Т-клеток в опухолях, и поэтому существуют так называемые "иммунные пустыни" – микросреда

20 опухоли, в которой Т-клетки иммунной системы не могут проникать или не проникают в опухоль для уничтожения бесконтрольно растущих клеток. Существует предположение, что для избежания иммунологического надзора опухоли создают иммуносупрессивную микросреду путем привлечения супрессорных клеток миелоидного происхождения или секреции факторов,

25 включающих TGF β , которые играют двойную роль вызывания экспрессии генов внеклеточного матрикса и подавления экспрессии хемокинов и цитокинов, необходимых для содействия инфильтрации Т-клеток в опухоли (Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. Nat Rev Cancer 2013; 13: 788 – 99). Кроме того, исследования обнаружили, что

30 опухоли, демонстрирующие высокую экспрессию генов, соответствующих иммуносупрессивной микросреде, связаны с неблагоприятными исходами по многим типам рака, включая рак яичников и рак толстой и прямой кишки (Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, Iglesias M, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. Nat

Genet 2015; 47: 320 – 9; Ryner L, Guan Y, Firestein R, Xiao Y, Choi Y, Rabe C, et al. Upregulation of periostin and reactive stroma is associated with primary chemoresistance and predicts clinical outcomes in epithelial ovarian cancer. Clin Cancer Res 2015; 21: 2941 – 51; Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. Clin Cancer Res 2008; 14: 5198 – 208).

[0004] Один из недавно разработанных подходов предусматривает онколитический вирус, кодирующий в своем геноме белок IFN- β в качестве карго. Согласно другому подходу, была предусмотрена экспрессия опухолевого антигена MAGE-A3. Помимо распознавания подходящего и эффективного карго, экспрессия дополнительных карго из вирусного остова всегда несет риск того, что она усилит не только противоопухолевую эффективность, но и противовирусный иммунитет. Следует позаботиться о том, чтобы карго не снизил онколитический потенциал вируса до степени, при которой преимущество, которое дает экспрессия терапевтического карго, нивелируется потерей онколитической эффективности. Таким образом, в области существует потребность в дополнительно улучшенных вооруженных онколитических вирусах, которые могут быть использованы для эффективного лечения опухолей. Также в данной области существует потребность в выборочном улучшении инфильтрации Т-клеток и/или дендритных клеток в иммуносупрессивные микросреды опухолей.

Краткое описание изобретения

[0005] Настоящее изобретение позволяет удовлетворять вышеупомянутые потребности путем обеспечения рекомбинантного рабдовируса, такого как вирус везикулярного стоматита, который кодирует в своем геноме белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21.

[0006] Следует понимать, что любой вариант осуществления, касающийся конкретного аспекта, также может сочетаться с другим вариантом осуществления, также касающимся этого конкретного аспекта, даже в несколько уровней или комбинаций, включающих несколько вариантов осуществления этого конкретного аспекта.

[0007] В первом аспекте настоящее изобретение касается рекомбинантного рабдовируса, кодирующего в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант.

[0008] В одном варианте осуществления, касающемся первого аспекта, белок CCL21 или его функциональный вариант выбирают из группы, к которой относятся: (I) обработанный плазмином белок CCL21, (II) усеченный на с-конце белок CCL21, (III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 3, (V) белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 4, (VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную последовательность, (VII) белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 1, или (VIII) белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 5.

[0009] В одном варианте осуществления, касающемся первого аспекта, рекомбинантным рабдовирусом является везикуловирус.

[0010] В одном варианте осуществления, касающемся первого аспекта, везикуловирус выбирают из группы, к которой относятся: вирус везикулярного стоматита Алагоас (VSAV), вирус Карахаса (CJSV), вирус Чандипура (CHPV), вирус Кокал (COCV), вирус везикулярного стоматита Индианы (VSIV), вирус Исфахана (ISFV), вирус Мараба (MARAV), вирус везикулярного стоматита Нью-Джерси (VSNJV) или вирус Пири (PIRYV), предпочтительно вирус везикулярного стоматита Индианы (VSIV) или вирус везикулярного стоматита Нью-Джерси (VSNJV).

[0011] В одном варианте осуществления, касающемся первого аспекта, рекомбинантный рабдовирус является репликационно-компетентным.

[0012] В одном варианте осуществления, касающемся первого аспекта, белком CCL21 или его функциональным вариантом является человеческий CCL21.

[0013] В одном варианте осуществления, касающемся первого аспекта, рекомбинантный рабдовирус лишен функционального гена, кодирующего гликопротеин G, и/или лишен функционального гликопротеина G; или ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP

другого вируса, и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP другого вируса; или ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP аренавируса, и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP аренавируса. В еще одном предпочтительном варианте осуществления, ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса Dandenong или вируса Moreia, и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP вируса Dandenong или вируса Moreia. В еще более предпочтительном варианте ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV.

[0014] В предпочтительном варианте осуществления, касающемся первого аспекта, изобретение обеспечивает рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21, выбранный из группы, к которой относятся: (I) обработанный плазмином белок CCL21, (II) усеченный на с-конце белок CCL21, (III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 3, (V) белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 4, (VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную последовательность, (VII) белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 1, или (VIII) белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 5, причем ген, кодирующий гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV.

[0015] Во втором аспекте настоящее изобретение касается рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, кодирующего в своем геноме по меньшей мере нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P),

матриксный белок (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита и по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21.

5 [0016] В одном варианте осуществления, касающемся второго аспекта, нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 7.

10 [0017] В одном варианте осуществления, касающемся второго аспекта, фосфопротеин (P) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 8.

15 [0018] В одном варианте осуществления, касающемся второго аспекта, большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 9.

[0019] В одном варианте осуществления, касающемся второго аспекта, матриксный белок (M) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 10.

20 [0020] В предпочтительном варианте осуществления, касающемся второго аспекта, нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 7, фосфопротеин (P) включает аминокислотную последовательность, 25 представленную в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 8, большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 9, и 30 матриксный белок (M) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 10.

[0021] В одном варианте осуществления, касающемся второго аспекта, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита является репликационно-компетентным.

[0022] В одном варианте осуществления, касающемся второго аспекта, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита лишен функционального гена, кодирующего гликопротеин G, и/или лишен функционального гликопротеина G; или ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP другого вируса, и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP другого вируса; или ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV.

[0023] В одном варианте осуществления, касающемся второго аспекта, белок CCL21 или его функциональный вариант выбирают из группы, к которой относятся: (I) обработанный плазмином белок CCL21, (II) усеченный на с-конце белок CCL21, (III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3, (V) белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 4, (VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную последовательность, (VII) белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, или белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 5.

[0024] В предпочтительном варианте осуществления, касающемся второго аспекта, изобретение обеспечивает рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита и по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21, причем белок CCL21 или его функциональный вариант выбирают из группы, к которой относятся: (I) обработанный плазмином белок CCL21, (II) усеченный на с-конце белок CCL21, (III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей

мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3
 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3, (V) белок,
 включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с
 SEQ ID NO: 4, (VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также
 5 включающий сигнальную пептидную последовательность, (VII) белок,
 включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с
 SEQ ID NO: 1, или (VIII) белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по
 меньшей мере 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % или 99 % идентичности
 с SEQ ID NO: 5, причем ген, кодирующий гликопротеин G вируса везикулярного
 10 стоматита, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса
 лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на
 гликопротеин GP LCMV, и нуклеопротеин (N) включает аминокислоту,
 представленную в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по меньшей
 мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 7,
 15 фосфопротеин (P) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 8, или
 функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96
 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 8, большой белок (L) включает аминокислоту,
 представленную в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по меньшей
 мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 9, и
 20 матриксный белок (M) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO:
 10, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %,

[0025] В третьем аспекте настоящее изобретение обеспечивает
 фармацевтическую композицию, характеризующуюся тем, что композиция
 25 включает рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или
 любым из вариантов его осуществления или рекомбинантный вирус
 везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из
 вариантов его осуществления.

[0026] В четвертом аспекте настоящее изобретение обеспечивает
 30 рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из
 вариантов его осуществления или рекомбинантный вирус везикулярного
 стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его
 осуществления или фармацевтическую композицию в соответствии с третьим

аспектом или любым из вариантов его осуществления для применения в качестве медикамента.

[0027] В одном варианте осуществления, касающемся четвертого аспекта, изобретение обеспечивает рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию для применения в лечении рака, предпочтительно солидного рака. В предпочтительном варианте осуществления солидный рак выбран из списка, включающего: опухоль органов репродуктивной системы, опухоль яичника, опухоль поджелудочной железы, опухоль яичка, эндокринную опухоль, желудочно-кишечную опухоль, опухоль печени, опухоль почки, опухоль толстой кишки, колоректальную опухоль, опухоль мочевого пузыря, опухоль предстательной железы, кожную опухоль, меланому, опухоль дыхательных путей, опухоль легких, опухоль молочной железы, опухоль головы и шеи, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ) и наклонную опухоль.

[0028] В одном варианте осуществления, касающемся четвертого аспекта, рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция предназначена для введения интратуморально или внутривенно. В другом сходном варианте осуществления рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция предназначена для введения по меньшей мере один раз интратуморально, а затем внутривенно. В еще одном сходном варианте осуществления последующее внутривенное введение рекомбинантного рабдовируса, рекомбинантного вируса везикулярного стоматита или фармацевтической композиции осуществляют через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после первоначального интратуморального введения.

[0029] В пятом аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его осуществления или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его осуществления, а также ингибитор, причем ингибитор является ингибитором пути PD-1 или миметиком SMAC.

[0030] В одном варианте осуществления, касающемся пятого аспекта, ингибитором пути PD-1 является антагонистическое антитело, направленное против PD-1 или PD-L1. В еще одном сходном варианте осуществления миметик SMAC выбирают из группы, состоящей из любого из соединений с 1 по 26 из Таблицы 2 или фармацевтически приемлемой соли одного из этих соединений. В другом сходном варианте осуществления ингибитором пути PD-1 является антагонист, выбранный из группы, к которой относятся пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, PDR-001, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5 (как показано в Таблице 1).

[0031] В шестом аспекте настоящее изобретение обеспечивает комплект из частей, включающих: рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию, как определено в любом из аспектов с первого по третий или любом из вариантов их осуществления, и ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC, как определено в любом из вариантов осуществления, касающихся пятого аспекта.

[0032] В седьмом аспекте настоящее изобретение обеспечивает комбинированное лечение, включающее: а) рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его осуществления или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его осуществления или фармацевтическую композицию в соответствии с третьим аспектом или любым из вариантов его осуществления и б) ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC. В одном варианте осуществления, касающемся седьмого аспекта а) и б) вводят одновременно, последовательно или поочередно. В сходном варианте осуществления а) и б) вводят различными путями введения. В еще одном сходном варианте осуществления а) вводят интратуморально, а б) вводят внутривенно.

[0033] В одном варианте осуществления, касающемся седьмого аспекта, ингибитором пути PD-1 является антагонистическое антитело, направленное против PD-1 или PD-L1. В сходном варианте осуществления ингибитор пути PD-1 выбирают из группы, состоящей из пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, PDR-001, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5 (см. Таблицу 1). В еще одном сходном варианте осуществления миметик SMAC выбирают из группы, состоящей из любого из

соединений с 1 по 26 согласно Таблице 2 или фармацевтически приемлемой соли одного из этих соединений.

[0034] В восьмом аспекте изобретение обеспечивает вырабатывающую вирус клетку, характеризующуюся тем, что клетка вырабатывает рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его осуществления или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его осуществления.

[0035] В одном варианте осуществления, касающемся восьмого аспекта, вырабатывающей вирус клеткой является клетка Vero, клетка HEK, клетка HEK293, клетка яичника китайского хомячка (CHO) или клетка почки новорожденного хомяка (BHK).

[0036] В девятом аспекте изобретение обеспечивает способ выработки рекомбинантного рабдовируса в культуре клеток:

(I) Инфицирование клетки-хозяина рекомбинантным рабдовирусом, предпочтительно вирусом везикулярного стоматита,

(II) Культивирование клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих возможность репликации рекомбинантного рабдовируса,

(III) Сбор рекомбинантного рабдовируса из культуры клеток,

(IV) Необязательная ферментативная обработка собранного вируса, предпочтительно бензоназой,

(V) Захват собранного рабдовируса путем загрузки на катионообменный монолитный мембранный адсорбер или смолу с последующим элюированием,

(VI) Осветление рабдовируса путем подвергания элюата с этапа (V) разделению по размеру, мультимодальному разделению по размеру / ионному обмену или тангенциальной поточной фильтрации,

(VII) Замена буфера осветленного рабдовируса путем ультрафильтрации / диафильтрации,

(VIII) Стерильная фильтрация рабдовируса.

[0037] В одном варианте осуществления, касающемся девятого аспекта, клеткой-хозяином является клетка HEK293.

[0038] В одном варианте осуществления, касающемся девятого аспекта, клетку-хозяин культивируют в суспензии.

[0039] В одном варианте осуществления, касающемся девятого аспекта, рекомбинантный рабдовирус рецептируют в фармацевтическую композицию. В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его осуществления
5 или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его осуществления рецептируют в фармацевтическую композицию.

[0040] В еще одном аспекте рекомбинантный рабдовирус кодирует в своем геноме РНК по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный
10 вариант, предпочтительно человеческий CCL21, причем геном РНК рекомбинантного рабдовируса включает или состоит из кодирующей последовательности, идентичной или по меньшей мере на 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичной SEQ ID NO: 24.

Краткое описание фигур

[0041] ФИГ. 1: Анализ экспрессии опухолей LLC1-IFNARKO (полная РНК) из контрольных или получавших лечение с применением VSV-GP мышей на указанные гены.

[0042] ФИГ. 2A - D: Кривые роста отдельных опухолей у мышей с
20 опухолью CT26.CL25-IFNARKO. (A) контрольные мыши (с имитацией лечения), (B) мыши, получавшие лечение с применением анти-PD-1, (C) мыши, получавшие лечение с применением VSV-GP внутривенно или (D) мыши, получавшие лечение с применением комбинации VSV-GP и анти-PD-1.

[0043] ФИГ. 3A - C: Анализ (повторной) стимуляции опухолью
25 подвергнутых лечению мышей, которые предварительно подвергались лечению с применением VSV-GP (см. ФИГ. 2C) или комбинации VSV-GP и анти-PD1 (см. ФИГ. 2D). (A) Интактных мышей с клетками опухоли CT26.CL25-IFNARKO использовали в качестве контрольных. Для (повторной) стимуляции опухолью CT26CL25 IFNAR-/- клетки вводили путем инъекции в организм (B) Прошедших
30 лечение с применением VSV-GP мышей без долговременной опухоли (излеченных) из экспериментов, показанных на ФИГ. 2C, или (C) Прошедших лечение с применением комбинации VSV-GP и анти-PD-1 мышей без долговременной опухоли (излеченных) из экспериментов, показанных на ФИГ. 2D.

[0044] ФИГ. 4: Анализ экспрессии опухолей LLC1-IFNARKO (полная РНК) из контрольных или получавших лечение с применением VSV-GP мышей на указанные хемокины.

5 **[0045] ФИГ. 5А - В:** (А) Рисунок, показывающий место вставки CCL21 (трансгена) в пределах генома VSV-GP. (В) Рисунок, показывающий спасение вируса.

10 **[0046] ФИГ. 6:** (А) Анализ мышиногo CCL21 в супернатантах клеток HEK293, инфицированных VSV-GP-мю-CCL21 (VSV-GP, кодирующий полноразмерный мышиный CCL21). (В) Функциональный анализ миграции мышиных Т-клеток с применением установок Transwell и рекомбинантного мышиногo CCL21 или супернатантов из инфицированных VSV-GP соотв. VSV-GP-мю-CCL21 клеток HEK293.

15 **[0047] ФИГ. 7А - С:** Анализ роста отдельных опухолей у мышей с опухолью CT26.CL25-IFNARKO. Мышей с опухолью лечили с применением (А) VSV-GP, (В) SMACm (миметик SMAC) или (С) VSV-GP в комбинации с SMACm (миметик SMAC). Темными черными линиями показан объем опухоли не подвергавшихся лечению контрольных мышей, а светлыми серыми линиями показан объем опухоли мышей, получавших лечение с применением (А) VSV-GP, (В) SMACm или (С) VSV-GP + SMACm.

20 **[0048] ФИГ. 8А - С:** Анализ роста отдельных опухолей у мышей с опухолью CT26.CL25-IFNARKO. Мышей с опухолью лечили с применением (А) VSV-GP-CCL21, (В) SMACm (миметик SMAC), или (С) VSV-GP-CCL21 в комбинации с а SMACm (миметик SMAC). Темными черными линиями показан объем опухоли не подвергавшихся лечению контрольных мышей, а светлыми
25 серыми линиями показан объем опухоли мышей, получавших лечение с применением (А) VSV-GP-CCL21, (В) SMACm или (С) VSV-GP-CCL21 + SMACm.

[0049] ФИГ. 9: Анализ выживаемости в экспериментах, показанных на ФИГ. 7А-С и ФИГ. 8А-С.

30 **[0050] ФИГ. 10:** Анализ экспрессии опухолей LLC1-IFNARKO (полная РНК) из контрольных, подвергнутых лечению с применением VSV-GP или VSV-GP-мю-CCL21 мышей на CD3-эпсилон, CXCL10 и кодон-оптимизированную последовательность мышиногo CCL21, кодируемого VSV-GP-мю-CCL21.

[0051] ФИГ. 11А - В: Оценка нейротоксичности, вызываемой интрацеребральной инъекцией VSV-G DsRed (нейротоксичность VSV д. т.), VSV-GP, VSV-GP-мю-CCL21 или PBS. Изображение (А) показывает привес / потерю веса в процентах у мышей со временем после соответствующих инъекций. Изображение (В) показывает процент выживаемости мышей со временем после соответствующих инъекций.

[0052] ФИГ. 12А - В: (А) Анализ человеческого CCL21 в супернатантах клеток HEK293, инфицированных VSV-GP-huCCL21 (VSV-GP, кодирующим полноразмерный человеческий CCL21). (В) Функциональный анализ миграции человеческих Т-клеток с применением установок Transwell и рекомбинантного человеческого CCL21 или супернатантов из инфицированных VSV-GP соотв. VSV-GP-huCCL21 клеток HEK293.

[0053] ФИГ. 13А - В: Функциональный анализ миграции Т-клеток мыши (А, левое изображение) и крысы (В правое изображение) с применением установок Transwell и рекомбинантного мышинового CCL21 по сравнению с человеческим или крысиного CCL21 по сравнению с человеческим, соответственно, для испытания межвидовой перекрестной реактивности.

[0054] ФИГ. 14: Анализ роста отдельных опухолей у контрольных мышей с опухолью CT26.CL25-IFNARKO или мышей, получавших лечение с применением VSV-GP или VSV-GP-huCCL21.

[0055] ФИГ. 15: Рисунок, показывающий обработку CCL21 плазмином для образования короткого и способного к диффузии п-концевого фрагмента.

[0056] ФИГ. 16: Функциональный анализ миграции человеческих Т-клеток с применением установок Transwell и рекомбинантного человеческого CCL21 (рек. CCL21) или супернатантов из трансфицированных плазмидой клеток HEK293, экспрессирующих указанные усеченные на с-конце варианты CCL21.

[0057] ФИГ. 17: Функциональный анализ миграции производной от человеческих моноцитов дендритной клетки (moDC) с применением установок Transwell и рекомбинантного человеческого CCL21 или супернатантов из инфицированных VSV-GP соотв. VSV-GP-huCCL21 или VSV-GP-huCCL21(1-79) клеток HEK293.

[0058] ФИГ. 18: Вестерн-блоттинг (WB) CCL21 в супернатантах из трансфицированных плазмидой клеток HEK293, экспрессирующих указанный, усеченный на с-конце соотв. полноразмерный вариант CCL21, или

супернатантах из инфицированных VSV-GP соотв. VSV-GP-huCCL21(1-79) или VSV-GP-huCCL21 клеток HEK293.

[0059] ФИГ. 19А - С: Вирусные титры VSV-GP (GP), VSV-GP-huCCL21 (21) или VSV-GP-huCCL21(1-79) (21k) в супернатантах указанных клеток измеряли в указанные моменты времени после вирусной инфекции для определения способности к репликации вируса. Разные изображения показывают слева направо (А) клетки Vero, (В) клетки ВНК21 и (С) клетки HEK293. На каждом изображении титры VSV-GP (GP), VSV-GP-huCCL21 (21) или VSV-GP-huCCL21(1-79) (21k) измеряли через 0 ч, 24 ч и 48 ч.

[0060] ФИГ. 20: Суммарный рост опухоли у несущих опухоль CT26.CL25-IFNARKO контрольных мышей или мышей, получавших лечение с применением VSV-GP-huCCL21 или VSV-GP-huCCL21(1-79).

[0061] ФИГ. 21: 30-дневная выживаемость мышей с ФИГ. 20.

[0062] ФИГ. 22: Количественное определение на основе ИГХ инфильтрации Т-клеток (жизнеспособный, некротический сегмент опухоли) у несущих опухоль CT26.CL25-IFNARKO контрольных мышей или мышей, получавших лечение с применением VSV-GP-huCCL21 или VSV-GP-huCCL21(1-79).

[0063] ФИГ. 23: Рисунок, показывающий воздействие VSV-GP, VSV-GP-CCL21 (полноразмерный CCL21) и VSV-GP-CCL21(1-79) (усеченный на с-конце CCL21) на иммунную инфильтрацию инфицированных вирусом опухолей.

[0064] ФИГ. 24: Количественное определение на основе ИГХ инфильтрации дендритных клеток (CD11с-положительных) (участки опухоли с активной вирусной репликацией = некротическим краем) у несущих опухоль CT26.CL25 контрольных мышей или мышей, получавших лечение с применением VSV-GP или VSV-GP-мю-CCL21.

Подробное описание изобретения

[0065] В представленном ниже подробном описании многочисленные конкретные детали изложены для обеспечения полного понимания настоящего изобретения. Однако специалисту в данной области станет очевидно, что являющаяся предметом изобретения технология может быть осуществлена на практике без некоторых из этих конкретных деталей. В других случаях общеизвестные структуры и технологии подробно не показаны, чтобы не перегружать деталями настоящее изобретение. Заголовки включены лишь для

удобства и облегчения чтения, и их не следует рассматривать как ограничивающие изобретение конкретными аспектами или вариантами осуществления.

[0066] Рабдовирусы

5 **[0067]** Семейство рабдовирусов включает 18 родов и 134 вида с геномами в форме отрицательно-полярных одноцепочечных РНК из приблизительно 10 - 16 т. н. (Walke et al., ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae, Journal of General Virology, 99: 447 – 448 (2018)).

10 **[0068]** К характерным особенностям представителей семейства рабдовирусов относятся одна или несколько из следующих: пулевидная или палочкоподобная частица длиной 100 – 430 нм и 45 – 100 нм в диаметре, состоящая из спиралевидного нуклеокапсида, окруженного слоем матрикса и липидной оболочкой, причем некоторые рабдовирусы имеют не покрытые оболочкой филаментозные вирусы. Отрицательно-полярная одноцепочечная
15 РНК из 10,8 - 16,1 т. н., которые большей частью несегментированы. Геном, кодирующий по меньшей мере 5 генов, кодирующих структурные белки нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G).

20 **[0069]** В контексте данного описания рабдовирус может относиться к семейству, которое включает: альмендравиреус, куриовиреус, циторабдовирус, дихорхавиреус, эфемеровиреус, хапавиреус, ледантевиреус, лиссавиреус, новирабдовирус, нуклеорабдовирус, перабдовирус, сигмавирус, спрививиреус, шрипувиреус, тибровиреус, тупавиреус, варикозавиреус или везикуловиреус.

25 **[0070]** В пределах упомянутого рода рабдовирус может относиться к любому из упомянутых видов. Род альмендравиреус включает: альмендравиреус арборетум, альмендравиреус Бальза, альмендравиреус Кут-Бэй, альмендравиреус Пуэрто-Альмендрас, альмендравиреус Рио-Чико; род куриовиреус включает: куриовиреус Курионополис, куриовиреус Ирири, куриовиреус Итакаюнас, куриовиреус Рошамбо; род циторабдовирус включает: карликовый
30 циторабдовирус люцерны, Циторабдовирус желто-полосатой мозаики ячменя, циторабдовирус некротической желтизны брокколи, циторабдовирус, ассоциированный с болезнью Colocasia bobone, циторабдовирус полосатости листьев Festuca, циторабдовирус некротической желтизны салата, циторабдовирус желтой крапчатости салата, циторабдовирус северной мозаики

злаков, циторабдовирус сонха 1, циторабдовирус курчавости клубники, циторабдовирус американской полосатой мозаики пшеницы; род дихорхавирус включает: дихорхавирус кольцевой пятнистости кофе, дихорхавирус орхидейной пятнистости; род эфемеровирус включает: эфемеровирус реки Аделаида, 5 эфемеровирус Берримы, эфемеровирус лихорадки крупного рогатого скота, эфемеровирус Кимберли, эфемеровирус Кулпинья, эфемеровирус Котонкан, эфемеровирус Ободхян, эфемеровирус Ята; род хапавирус включает: хапавирус Фландрии, хапавирус Грей Лодж, хапавирус Харт Парк, хапавирус Джоинджакака, хапавирус Камезе, хапавирус Ла Хойя, хапавирус Ланджиа, 10 хапавирус Манитоба, хапавирус Марко, хапавирус Москейро, хапавирус Моссурил, хапавирус Нгаинган, хапавирус Орд-Ривер, хапавирус Пэрри-Крик, хапавирус Вонгабеля; род ледантевирус включает: ледантевирус Барура, ледантевирус Фикирини, ледантевирус Фукуока, ледантевирус Каньявара, ледантевирус каньона Керн, ледантевирус Кералиба, ледантевирус Коленте, 15 ледантевирус Кумаси, ледантевирус Ле Дантек, ледантевирус летучих мышей горы Элгон, ледантевирус Насимуро, ледантевирус Нколбиссона, ледантевирус Оита, ледантевирус Ухань, ледантевирус Юнцзя; род лиссавирус включает: лиссавирус Араван, австралийский лиссавирус летучих мышей, лиссавирус летучих мышей Бокело, лиссавирус Дювенхаге, европейский лиссавирус летучих 20 мышей 1, европейский лиссавирус летучих мышей 2, лиссавирус летучих мышей Ганнорува, лиссавирус Икома, лиссавирус Иркут, худжандский лиссавирус, лиссавирус летучих мышей Лагоса, лиссавирус летучих мышей Льейда, лиссавирус Мокола, лиссавирус бешенства, лиссавирус летучих мышей Шимони, лиссавирус западнокавказских летучих мышей; род новирабдовирус включает: 25 новирабдовирус Хираме, рыбный новирабдовирус, новирабдовирус лососевых рыб, новирабдовирус змееголова; род нуклеорабдовирус включает: нуклеорабдовирус желтой жилки дурмана, нуклеорабдовирус пятнистой карликовости баклажан, нуклеорабдовирус мелкой полосы кукурузы, нуклеорабдовирус иранской мозаики кукурузы, нуклеорабдовирус мозаики 30 кукурузы, нуклеорабдовирус желтой карликовости картофеля, нуклеорабдовирус желтой низкорослости риса, нуклеорабдовирус желтой сети сонха, нуклеорабдовирус желтой жилки осота, нуклеорабдовирус хлороза жилок таро; род перабдовирус включает: перабдовирус угря, перабдовирус окуня, перабдовирус озерной форели; род сигмавирус включает: сигмавирус *Drosophila*

affinis, сигмавирус *Drosophila ananassae*, сигмавирус *Drosophila immigrans*, сигмавирус *Drosophila melanogaster*, сигмавирус *Drosophila obscura*, сигмавирус *Drosophila tristis*, сигмавирус *Muscina stabulans*; род спрививирус включает: спрививирус карпа, спрививирус мальков щуки; род Шрипувирус включает:

5 шрипувирус Альмпивар, шрипувирус Чако, шрипувирус Ниаха, шрипувирус Сена Мадурейра, шрипувирус Шрипура; род тибровирус включает: тибровирус Нижнего Конго, тибровирус Беатрис Хилл, тибровирус прибрежных равнин, тибровирус Экпомы 1, тибровирус Экпомы 2, тибровирус Sweetwater Branch, тибровирус тиброгаргана; род тупавирус включает: тупавирус Дарем, тупавирус

10 Клатат, тупавирус Тупайи; род варикозавирус включает: варикозавирус, связанный с крупными венами салата; род везикуловирус включает: везикуловирус Алагоаса, везикуловирус американских летучих мышей, везикуловирус Карахаса, везикуловирус Чандипуры, кокальный везикуловирус, везикуловирус Индианы, везикуловирус Исфахана, везикуловирус Юрона,

15 везикуловирус Мальпаис-Спринг, везикуловирус Мараба, везикуловирус Морретона, везикуловирус Нью-Джерси, везикуловирус Перинета, везикуловирус Пири, везикуловирус Ради, везикуловирус Юг Богдановац или вирус Муссы.

[0071] В предпочтительном варианте рекомбинантный рабдовирус

20 согласно изобретению является онколитическим рабдовирусом. В этом отношении "онколитический" имеет общепринятое в данной области значение и относится к способности рабдовируса к инфицированию и лизису (разрушению) раковых клеток, в отличие от нормальных клеток (в какой-либо значительной степени). В предпочтительном варианте онколитический рабдовирус способен к

25 репликации в пределах раковых клеток. Онколитическую активность испытывают в разных аналитических системах, известных специалистам в данной области (типичный *in vitro* анализ описан в публикации Muik et al., Cancer Res., 74(13), 3567 - 78, 2014). Следует понимать, что онколитический рабдовирус может инфицировать и разрушать только конкретные типы раковых

30 клеток. Кроме того, онколитический эффект может меняться в зависимости от типа раковых клеток.

[0072] В предпочтительном варианте осуществления рабдовирус относится к роду везикуловирус. Виды везикуловирусов определяют, главным образом, серологическими способами в сочетании с филогенетическим анализом геномов.

Биологические характеристики, такие как круг хозяев и механизмы передачи, также применяют для различения видов вирусов в пределах рода. Род везикуловирус как таковой образует отдельную монофилетическую группу, хорошо подтверждаемую деревьями максимального правдоподобия, которые

5 выводят из полных L последовательностей.

[0073] Вирусы, относимые к разным видам в пределах рода везикуловирусов, могут обладать одной или несколькими из следующих характеристик: А) минимальная дивергенция аминокислотных последовательностей 20 % в L; Б) минимальная дивергенция аминокислотных

10 последовательностей 10 % в N; В) минимальная дивергенция аминокислотных последовательностей 15 % в G; Г) могут различаться в серологических тестах; и Д) занимают различные экологические ниши, о чем свидетельствуют различия в хозяевах и/или членистоногих переносчиках.

[0074] Предпочтение отдают вирусу везикулярного стоматита (VSV), в

15 частности, VSV-GP (рекомбинантный с GP из LCMV). К благоприятным свойствам VSV-GP относятся одно или несколько из следующих: очень эффективный и быстрый убийца (< 8 ч); онколитический вирус; возможно системное применение; сниженный нейротропизм / нейротоксичность; способность к литическому воспроизведению и вызыванию иммуногенной

20 гибели клеток; не реплицируется в здоровых клетках человека из-за реакции на интерферон (IFN); сильная активация врожденного иммунитета; около 3 т. н. пространства для иммуномодулирующих карго и антигенов; рекомбинация с аренавирусным гликопротеином из вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV); благоприятные характеристики безопасности, состоящие в сниженной

25 нейротоксичности и менее чувствительной реакции на нейтрализующее антитело и разрушение комплемента по сравнению с VSV дикого типа (VSV-G); специфичная репликация в опухолевых клетках, утративших способность к организации и реагированию на противовирусные врожденные иммунные реакции (например, сигнал IFN I типа); абортная репликация в “здоровых клетках” для

30 быстрого исключения из нормальных тканей; вирусная репликация в опухолевых клетках вызывает иммуногенную гибель клеток, высвобождение опухолеассоциированных антигенов, местное воспаление и противоопухолевый иммунитет.

[0075] Изобретение далее осуществляется через рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме по меньшей мере нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита и по меньшей мере
 5 один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21.

[0076] В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный вирус везикулярного стоматита кодирует в своем геноме по меньшей мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, включающий
 10 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 7, фосфопротеин (P), включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96
 15 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 8, большой белок (L), включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 9, и матриксный белок (M), включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или
 20 функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 10.

[0077] Специалистам в данной области станет понятно, что существует возможность модификаций последовательности нуклеопротеина (N) вируса везикулярного стоматита, большого белка (L), фосфопротеина (P), матриксного
 25 белка (M) или гликопротеина (G) без потери основных функций этих белков. Такие функциональные варианты в контексте данного описания сохраняют, полностью или частично, свою основную функцию или активность. Например, белок L является полимеразой и выполняет существенную функцию во время транскрипции и репликации вируса. Его функциональный вариант должен
 30 сохранять по меньшей мере часть такой способности. Положительным показателем сохранения основной функциональности или активности является успешное продуцирование вирусов, включая эти функциональные варианты, которые сохраняют способность к репликации и инфицированию опухолевых клеток. Продуцирование вирусов и испытание на инфицирование и репликацию

в опухолевых клетках осуществляют с применением различных аналитических систем, известных специалистам в данной области (типичный *in vitro* анализ описывается в публикации Muik et al., Cancer Res., 74(13), 3567 - 78, 2014).

5 [0078] В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный вирус везикулярного стоматита кодирует в своем геноме по меньшей мере нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита и по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно
10 человеческий CCL21, причем большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности $\geq 80\%$ с SEQ ID NO: 9.

[0079] В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный вирус везикулярного стоматита кодирует в своем геноме по меньшей мере нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок
15 (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита и по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21, причем нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности $\geq 90\%$ с SEQ ID NO: 7.

20 [0080] В еще одном предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный вирус везикулярного стоматита кодирует в своем геноме по меньшей мере нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита и по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант,
25 предпочтительно человеческий CCL21, причем большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности, которая равняется или превышает 80% с SEQ ID NO: 9, и нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности $\geq 90\%$ с SEQ ID NO: 7.

30 [0081] В предпочтительном варианте осуществления изобретения геном РНК рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению включает или состоит из последовательности, показанной в SEQ ID NO: 24. Кроме того, геном РНК рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению также может состоять из этих последовательностей или включать их, причем нуклеиновые кислоты

генома РНК заменяются в соответствии с вырождением генетического кода, не приводя к изменению соответствующей аминокислотной последовательности. В еще одном предпочтительном варианте осуществления геном РНК рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению включает или состоит из

5 кодирующей последовательности, идентичной или по меньшей мере на 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 24.

[0082] Следует понимать, что рекомбинантный рабдовirus согласно изобретению может кодировать в своем геноме другие карго, такие как

10 опухолевые антигены, другие хемокины, цитокины или другие иммуномодулирующие элементы.

[0083] В другом варианте осуществления рекомбинантный рабдовirus согласно изобретению дополнительно кодирует в своем геноме натрий-йодидный симпортерный белок (NIS). Экспрессия NIS и совместная инкубация,

15 например, с ^{125}I позволяет применять NIS в качестве репортера визуализации (Carlson et al., Current Gene Therapy, 12, 33 - 47, 2012).

[0084] Рекомбинантный рабдовirus

[0085] Известно, что некоторые штаммы рабдовируса дикого типа, такие

20 как штаммы VSV дикого типа, считаются нейротоксичными. Также известно, что инфицированные субъекты способны быстро выработать сильную гуморальную реакцию с высокими титрами антител, направленными главным образом против гликопротеина. Нейтрализующие антитела, нацеленные на гликопротеин G рабдовирусов в целом и конкретно VSV, способны ограничивать

25 распространение вируса и, таким образом, опосредовать защиту субъектов от повторного инфицирования вирусом. Однако нейтрализация вируса ограничивает повторное применение рабдовируса для онкологических пациентов.

[0086] Для устранения этих недостатков гликопротеин G дикого типа рабдовируса может быть заменен на гликопротеин из другого вируса. В этом

30 отношении замена гликопротеина означает (I) замену гена, кодирующего гликопротеин G дикого типа на ген, кодирующий гликопротеин GP другого вируса, и/или (II) замену гликопротеина G дикого типа на гликопротеин GP другого вируса.

[0087] В предпочтительном варианте осуществления гликопротеин G рабдовируса заменяют на гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), предпочтительно на штамм WE-HPI. В еще более предпочтительном варианте осуществления рабдовirus является вирусом везикулярного стоматита с гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), предпочтительно со штаммом WE-HPI. Такой VSV описан, например, в документе WO2010/040526 и указан как VSV-GP. Среди предлагаемых преимуществ: (I) потеря опосредованной VSV-G нейротоксичности и (II) отсутствие нейтрализации вектора антителами (как показано на мышах).

[0088] Гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) может быть GP1 или GP2. Изобретение включает гликопротеины из разных штаммов LCMV. В частности, LCMV-GP может происходить от LCMV дикого типа или LCMV штаммов LCMV-WE, LCMV-WE-HPI, LCMV-WE-HPIopt. В предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий гликопротеин GP LCMV, кодирует белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 11, или аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90, 95 %, 98 %, 99 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, при сохранении функциональных свойств рекомбинантного рабдовируса, включающего гликопротеин GP, кодирующий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 11.

[0089] В другом варианте осуществления рекомбинантный гликопротеин G рабдовируса заменяют на гликопротеин GP вируса Dandenong (DANDV) или вируса Moreia (MOPV). В еще более предпочтительном варианте осуществления рекомбинантным рабдовirusом является вирус везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G заменен на гликопротеин GP вируса Dandenong (DANDV) или вируса Moreia (MOPV). К предлагаемым преимуществам относятся (I) потеря опосредованной VSV-G нейротоксичности и (II) отсутствие нейтрализации вектора антителами (как показано на мышах).

[0090] Вирус Dandenong (DANDV) является аренавирусом старого света. В настоящее время существует лишь один известный специалистам в данной области штамм, который включает гликопротеин GP и может быть задействован в рамках настоящего изобретения в качестве донора гликопротеина GP,

включенного в рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению. Гликопротеин GP DANDV, включенный в рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению, имеет более 6 центров гликозилирования, в частности, 7 центров гликозилирования. Типичным предпочтительным гликопротеином GP является включенный в DANDV и имеющий номер доступа в Genbank EU136038. В одном варианте осуществления ген, кодирующий гликопротеин GP DNADV, кодирует аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 12, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, при сохранении функциональных свойств рекомбинантного рабдовируса, включающего гликопротеин GP, кодирующий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 12.

[0091] Вирус Moreia (MOPV) является аренавирусом старого света. Специалистам в данной области известны несколько штаммов, которые включают гликопротеин GP и могут быть задействованы в рамках настоящего изобретения в качестве донора гликопротеина GP, включенного в рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению. Гликопротеин GP MOPV, включенный в рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению, имеет более 6 центров гликозилирования, в частности, 7 центров гликозилирования. Типичным предпочтительным гликопротеином GP является включенный в вирус Moreia и имеющий номер доступа в Genbank AY772170. В одном варианте осуществления, ген, кодирующий гликопротеин GP MOPV, кодирует аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, при сохранении функциональных свойств рекомбинантного рабдовируса, включающего гликопротеин GP, кодирующий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13.

[0092] CCL21 и функциональные варианты CCL21

[0093] Неожиданно было обнаружено, что рекомбинантный рабдовирус, кодирующий в своем геноме белок CCL21, способен вызывать лизис опухолевых клеток в комбинации с иммуногенной гибелью клеток и стимуляцией врожденных иммунных клеток в микросреде опухоли. Кроме того, наблюдалось повышение уровня выживаемости в мышинной модели развившейся опухоли,

которую лечили с применением такого рекомбинантного рабдовируса, усиленного CCL21.

[0094] CCL21 относится к классу CC хемокинов, а также известен как хемокин вторичной лимфоидной ткани (SLC), exodus-2, ckb9, scya21, TCA4 или 6Ckine. CCL21 содержит С-концевой участок, связывающийся с внеклеточным матриксом. CCL21 также связывается с рецептором поверхности клеток CCR7 и, таким образом, обеспечивая его функцию, такую как привлечение Т-клеток и дендритных клеток, а также активацию последних. CCR7 экспрессируется на самых различных периферических Т-клетках и дендритных клетках у здоровых субъектов и онкологических пациентов.

[0095] Таким образом, в одном аспекте рекомбинантный рабдовirus, кодирующий в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, способен усилить рекрутинг Т-клеток и дендритных клеток в среду опухоли.

[0096] В другом аспекте местная экспрессия высокоактивного хемокина CCL21 дополнительно усиливает рекрутинг иммунных клеток, предпочтительно Т-лимфоцитов и дендритных клеток, в микросреду опухоли и улучшает эффективность рекомбинантного рабдовируса.

[0097] В еще одном аспекте рекомбинантный рабдовirus, кодирующий в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, действует как врожденный иммуностимулятор.

[0098] В одном аспекте рекомбинантный рабдовirus, кодирующий в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, преобразует холодные опухоли в горячие опухоли. В частности, возникающая в результате провоспалительная микросреда опухоли преобразует опухоли без инфильтрированных Т-клеток (“холодные”) в воспаленные Т-клетками (“горячие”) опухоли и сопровождается возникновением противоопухолевой иммунной реакции в дренирующие опухоль лимфатические узлы.

[0099] Человеческий белок CCL21 был описан, например, в публикации М. Nagira et al, The Journal of Biological Chemistry, 272, 19518 - 19524 (1 августа 1997 г.) и представляет собой высокоосновный полипептид из общего количества 134 аминокислот, с предполагаемым сигнальным пептидом из 23 аминокислот:

[00100] MAQSLALSLLILVLAFGIPRTQGSDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVR
SYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPA
QGCRKDRGASKTGKKGKGSKGCKRTERSQTPKGP (SEQ ID NO: 1)

5 **[00101]** Белок CCL21, в частности, включает CCL21, включающий или состоящий из следующей последовательности:

[00102] SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKR
SQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKDRGASKTGKKGKGSKG
CKRTERSQTPKGP (SEQ ID NO: 2)

10 **[00103]** Предпочтительно белок CCL21 включает или состоит из белка, имеющего следующую последовательность:

[00104] SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKR
SQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCR (SEQ ID NO: 4)

15 **[00105]** или имеющую по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с SEQ ID NO: 4.

[00106] Более предпочтительно белок CCL21 включает или состоит из белка, имеющего следующую последовательность:

[00107] SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKR
SQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQG (SEQ ID NO: 3)

20 **[00108]** или имеющий по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с SEQ ID NO: 3.

25 **[00109]** Термин "сигнальный пептид" или "сигнальная пептидная последовательность" описывает пептидную последовательность, обычно состоящую из 10 - 30 аминокислот и присутствующую на N-конце вновь синтезированных секреторных или мембранных полипептидов, которая направляет полипептид через/в мембрану клетки (плазматическую мембрану в прокариотах и мембрану эндоплазматического ретикула в эукариотах). Обычно его впоследствии удаляют. В частности, сигнальный пептид может быть
30 способен направлять полипептид в секреторный путь клетки.

[00110] Следует понимать, что для настоящего изобретения другие (т. е., отличные от дикого типа) сигнальные пептидные последовательности могут применяться вместе с белком CCL21. Такие другие сигнальные пептидные последовательности могут заменять первоначальную сигнальную пептидную

последовательность дикого типа. Сигнальный пептид включает пептиды, направляющие вновь синтезированный белок в рибосоме на ER и далее на комплекс Гольджи для переноса в плазматическую мембрану или удаления из клетки. Они, как правило, включают нить из гидрофобных аминокислот и включают лидерные последовательности иммуноглобулина, а также другие последовательности, известные специалистам в данной области. Сигнальные пептиды, в частности, включают пептиды, способные подвергаться воздействию сигнальной пептидазы, специфической протеазы, расположенной на цистернальной поверхности эндоплазматического ретикулума. Сигнальные пептиды хорошо известны специалистам в данной области и могут включать любой известный сигнальный пептид. Сигнальный пептид включен на N-конце белка, и обработка белка CCL21 сигнальной пептидазой образует активную биологическую форму.

[00111] В предпочтительном варианте осуществления сигнальный пептид имеет последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6. В сходном предпочтительном варианте осуществления белок CCL21 включает или состоит из белка, имеющего следующую последовательность:

[00112] MGWSCILFLVATATGVHSSDGG AQDCCLKYSQRKIPAKV VRSYR
KQEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQG
(SEQ ID NO: 5)

[00113] или имеющего по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с SEQ ID NO: 5.

[00114] В сходном варианте осуществления белок CCL21 включает белок, включающий или состоящий из аминокислот SEQ ID NO: 2, 3 или 4, или соответственно имеющий по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с SEQ ID NO: 2, 3 или 4 и также включающий сигнальную пептидную последовательность. В предпочтительном варианте осуществления сигнальная пептидная последовательность включает или состоит из аминокислот 1 - 19 SEQ ID NO: 5.

[00115] Белок CCL21 также включает белок, включающий или состоящий из аминокислот SEQ ID NO: 2, 3 или 4, или соответственно имеющий по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

3 или 4 и также включающий сигнальную пептидную последовательность, включающую или состоящую из аминокислот 1 - 23 SEQ ID NO: 1.

[00116] Белок CCL21 также включает белок, соответствующий обработанным плазмином формам CCL21. CCL21 содержит продленный
 5 уникальный С-конец (например, человеческий CCL21 приблизительно 30aa) с суммарным положительным зарядом, способствующим связыванию с компонентами внеклеточного матрикса, такими как гепариноподобные гликозаминогликаны. Усечение / делеция С-конца существенно уменьшает связывание с гликозаминогликанами, такими как гепарин. CCL21
 10 обрабатывается в человеческом организме плазмином, который является дефектным при некоторых видах рака у людей. Было продемонстрировано, что необходимость в расщеплении плазмином может быть устранена путем кодирования биологически активного N-концевого фрагмента CCL21, напоминающего обработанные плазмином формы CCL21, в рекомбинантный
 15 рабдовирус. Обработанные плазмином формы CCL21 характеризуются усечением / делецией С-конца, что в результате приводит к снижению способности к связыванию с гепарин- и/или гепарансульфатом, которая может быть измерена способами, известными специалистам в данной области. В этом контексте сниженная способность к связыванию с гепарин- и/или
 20 гепарансульфатом относится к сравнению с белком CCL21, имеющим SEQ ID NO: 1 или 2 и способность к связыванию, которая снижена до 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 % или ниже способности к связыванию белка CCL21 с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 1 или 2 (соответственно с сигнальной пептидной
 25 последовательностью или без нее) при испытании в том же анализе и в тех же условиях.

[00117] Плазмин представляет собой серинпротеазу, действующую для растворения фибриновых кровяных сгустков. Помимо фибринолиза, плазмин протеолизует белки в различных других системах: активирует коллагеназы,
 30 некоторые медиаторы системы комплемента и ослабляет стенки граафова пузырька, приводя к овуляции. Он расщепляет фибрин, фибронектин, тромбоспондин, ламинин и фактор фон Виллебранда. Плазмин относится к семейству серинпротеаз. Плазмин высвобождается как профермент, называемый плазминогеном, из печени в системный кровоток. Преобразование плазминогена

в активный плазмин включает расщепление пептидной связи между Arg-561 и Val-562, например, тканевым активатором плазминогена (tPA), активатором плазминогена урокиназного типа (uPA), калликреином и фактором XII (фактором Хагемана).

5 **[00118]** Расщепление белка CCL21 плазмином производят либо на связанном с поверхностью клетки CCL21, либо *in vitro*, в любом из случаев – путем инкубации белка CCL21 с плазмином. Таким образом, обработанный плазмином белок CCL21 включает CCL21, включающий или состоящий из последовательности, соответствующей аминокислотам 1 - 88 SEQ ID NO: 2 или
10 имеющей по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотами 1 - 88 SEQ ID NO: 2. Кроме того, белок CCL21 включает CCL21, включающий или состоящий из последовательности, соответствующей аминокислотам 1 - 91 SEQ ID NO: 2 или имеющей по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотами 1 - 91 SEQ ID NO: 2. Белок CCL21 также включает CCL21, включающий или состоящий из последовательности, соответствующей аминокислотам 1 - 104 SEQ ID NO: 2 или имеющей по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотами 1 - 104 SEQ ID NO: 2.

20 **[00119]** Усеченный на С-конце белок CCL21 характеризуется делецией и/или мутацией аминокислоты (аминокислот) на продленном С-конце белка CCL21. Путем делеции и/или мутации аминокислот на продленном С-конце уменьшают связывание с гликозаминогликанами, такими как гепарин. В предпочтительном варианте осуществления усеченный на с-конце белок CCL21 включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотами 1 - 79 SEQ ID NO: 2 при условии, что в белке отсутствуют по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 аминокислотных остатков, указанных в позициях 80 - 111, или один или несколько из вышеупомянутых остатков мутированы. В еще одном предпочтительном
30

варианте осуществления усеченный на с-конце CCL21 представляет собой CCL21, включающий или состоящий из SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотами 1 - 79 SEQ ID NO: 2, причем все аминокислоты 80-111 SEQ ID NO: 2 делетированы (т. е., 32 делеции).

[00120] В любом из случаев либо обработанный плазмином CCL21, либо усеченный на с-конце CCL21 также может включать сигнальную пептидную последовательность. Особое предпочтение отдают сигнальным пептидным последовательностям, включающим или состоящим из аминокислот 1 - 23 SEQ ID NO: 1 или аминокислот 1 - 19 SEQ ID NO: 5. Также могут быть использованы другие сигнальные пептидные последовательности, которые заменяют первоначальную сигнальную пептидную последовательность. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления обработанный плазмином или усеченный на с-конце белок CCL21 включает или состоит из белка, имеющего следующую последовательность:

[00121] MGWSCILFLVATATGVHSSDGG AQDCCLKYSQRKIPAKV VRSYR
KQEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQG
(SEQ ID NO: 5)

[00122] или имеющего по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с SEQ ID NO: 5.

[00123] Белок CCL21 также может включать CCL21 с усеченной сигнальной пептидной последовательностью. В данном контексте усеченная означает сигнальную пептидную последовательность, которая является более короткой, чем первоначальная сигнальная пептидная последовательность, но сохраняет по меньшей мере часть своей функциональности в качестве сигнального пептида. Например, человеческая сигнальная пептидная последовательность включает или состоит из аминокислот 1 - 23 SEQ ID NO: 1. CCL21 с усеченной сигнальной пептидной последовательностью может иметь 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислот 1 - 23 SEQ ID NO: 1. В еще одном примере сигнальный пептид может включать или состоять из последовательности, показанной в SEQ ID NO: 6. CCL21 с усеченной сигнальной

пептидной последовательностью может иметь 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислот 1 - 18 SEQ ID NO: 6.

[00124] Белок CCL21 с усеченной сигнальной пептидной последовательностью также может быть белком, включающим любую из последовательностей SEQ ID NO: 2 - 4 и дополнительно сигнальную пептидную последовательность, которая является более короткой, чем первоначальная сигнальная пептидная последовательность. Так, в одном примере сигнальная пептидная последовательность может иметь 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислот 1 - 23 SEQ ID NO: 1, или в другом примере сигнальный пептид может включать или состоять из последовательности, показанной в SEQ ID NO: 6. CCL21 с усеченной сигнальной пептидной последовательностью может иметь 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислот 1 - 18 SEQ ID NO: 6.

[00125] Белок CCL21 может иметь любое происхождение, включая организм мыши или крысы. В предпочтительном варианте белок CCL21 имеет человеческое происхождение.

[00126] Функциональные варианты белка CCL21 включают биологически активные варианты и биологически активные фрагменты вышеописанных белков CCL21. Варианты могут иметь одну или несколько разных аминокислот в позиции конкретного описанного белка CCL21. Варианты могут иметь по меньшей мере приблизительно 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % или более идентичности аминокислот с таким белком CCL21. Фрагменты имеют такие же аминокислоты, как в данном конкретном описанном белке CCL21, но в них может не хватать конкретной части или участка белка CCL21.

[00127] В контексте данного описания термины "идентичный" или "процент идентичности" в отношении двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, являющихся одинаковыми при выравнивании и сравнении на максимальное соответствие. Для определения процента идентичности последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислотной или нуклеиновокислотной

последовательности могут быть включены гэпы для оптимального сопоставления со второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательностью). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих позициях аминокислот или позициях нуклеотидов. Если позиция в первой последовательности занята тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и в соответствующей позиции второй последовательности, молекулы в этой позиции идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных позиций, общих для этих последовательностей (т. е., % идентичности = # идентичных позиций / общее количество # позиций (например, перекрывающихся позиций) × 100). В некоторых вариантах осуществления две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после включения в последовательности соответствующих гэпов (например, с исключением дополнительной последовательности, выходящей за пределы сравниваемых последовательностей).

[00128] Определение процента идентичности или процента подобия между двумя последовательностями осуществляют с применением математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, применяемого для сравнения двух последовательностей является алгоритм согласно публикации Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264 - 2268, модифицированный в публикации Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST согласно публикации Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. BLAST поиск нуклеотидов выполняют с применением программы NBLAST, счет=100, длина слова=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей нужный белок. BLAST поиск белков выполняют с применением программы XBLAST, счет=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных нужному белку. Для получения выравниваемых участков с гэпами с целью сравнения применяют Gapped BLAST, как описано в публикации Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402. В альтернативном варианте применяют PSI-Blast для выполнения повторного поиска, который определяет отдаленное сходство между молекулами (Id.). При применении программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast используют параметры по

умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, применяемым для сравнения последовательностей, является алгоритм согласно Myers and Miller, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для выравнивания последовательностей GCG. При применении программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей применяют таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за продление гэпа 12 и штраф за гэп 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны специалистам в данной области, и к ним относятся ADVANCE и ADAM, как описывается в публикации Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10: 3 - 5; и FASTA, как описывается в публикации Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 - 8. В FASTA *ktup* является контрольной опцией, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если *ktup*=2, подобные участки в двух сравниваемых последовательностях находят по парам с выровненными остатками; если *ktup*=1, исследуют отдельные выровненные аминокислоты. *Ktup* можно установить на 2 или 1 для белковых последовательностей или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. Если *ktup* не указывается, по умолчанию устанавливаются значения 2 для белков и 6 для ДНК. В альтернативном варианте выравнивание белковых последовательностей осуществляют с применением алгоритма CLUSTAL W, как описывается в публикации Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266: 383 - 402.

[00129] В обоих случаях функциональные варианты только включают варианты и фрагменты CCL21, которые биологически активны. С точки зрения изобретения биологическую активность варианта CCL21 или фрагмента CCL21, который кодируется в геноме рекомбинантного рабдовируса, определяют после его экспрессии в соответствующей клетке или опухолевой клетке. Это означает, что биологическую активность определяют в контексте рекомбинантного рабдовируса, кодирующего вариант CCL21 или фрагмент CCL21 (например, в анализе Transwell или *in vitro* модели опухоли). Предпочтительно биологическую активность определяют на везикуловирине, кодирующем вариант CCL21 или фрагмент CCL21. В более предпочтительном варианте биологическую активность определяют на VSV-GP, кодирующем вариант CCL21 или фрагмент CCL21.

[00130] Биологическая активность может включать одну или несколько из следующих возможностей: активность хемоаттрактанта, противоопухолевую активность, модуляция экспрессии цитокинов, например, усиление экспрессии полипептидов интерферон-гамма (IFN-гамма) или снижение экспрессии полипептидов трансформирующего фактора роста бета (TGF-бета) в популяции сингенных клеток млекопитающих, включая CD8-положительные Т-клетки, CD4-положительные Т-клетки, антиген-презентирующие клетки и опухолевые клетки. Испытание на биологическую активность осуществляют без ограничения, например, в соответствии с протоколом, как показано в Примерах.

С точки зрения изобретения функциональный вариант или фрагмент белка CCL21 является биологически активным, если он демонстрирует по меньшей мере 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % или 98 % активности белка CCL21 с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 1 или 2 (соответственно с сигнальной пептидной последовательностью или без нее) при испытании в том же анализе и в тех же условиях.

[00131] Без привязывания к какой-либо теории авторы изобретения обнаружили, что после обработки опухолевых клеток VSV-GP некоторые хемокины и цитокины реагируют повышающей регуляцией. CCL21 является одним из хемокинов, который не демонстрирует повышающей регуляции в опухолевых клетках после обработки VSV-GP. Представленные данные показывают, что VSV-GP, кодирующий в своем геноме белок CCL21, особенно эффективен в лечении рака и предназначается для дальнейшего улучшения инфильтрации иммунных клеток в опухоли, инфицированные онколитическим вирусом, и усиления таким образом противоопухолевого иммунитета.

[00132] Более неожиданным оказалось то, что рекомбинантные рабдовирусы, кодирующие белок CCL21, включающий или содержащий последовательности SEQ ID NO: 3 или 4, в частности, SEQ ID NO: 5, были еще более активными и эффективными в лечении опухолей по сравнению с полноразмерным белком CCL21 и являются активными без необходимости в протеолитической обработке.

[00133] Таким белками CCL21 также отдают предпочтение перед полноразмерным белком CCL21 благодаря их меньшему размеру. Большие или множественные трансгены могут отрицательно влиять на жизнеспособность, устойчивость, онколитическую способность, технологичность или экспрессию

рабдовируса, а также сам трансген. Применение меньших трансгенов также обеспечивает возможность добавления дополнительных трансгенов к рабдовирусу, который может иметь ограниченную способность вмещать дополнительные трансгены.

5 **[00134]** Рабдовирусы имеют отрицательно-полярную одноцепочечную РНК (оцРНК) в их генетическом материале (геноме). Содержащие отрицательно-полярную оцРНК вирусы требуют РНК-полимеразы для образования положительно-полярной РНК. Положительно-полярная РНК действует как вирусная мРНК, которая транслируется в белки для образования новых
10 вирусных материалов. С новообразованным вирусом вырабатывается больше отрицательно-полярных молекул РНК.

[00135] Типичный геном рабдовируса кодирует по меньшей мере пять структурных белков в порядке 3'-N-P-M-G-L-5'. Геном может содержать другие короткие межгенные области или дополнительные гены между структурными
15 белками и, таким образом, может иметь разную длину и организацию.

[00136] В соответствии с изобретением, ген CCL21 может быть введен в любое место генома рабдовируса. Эффективность транскрипции гена CCL21 зависит от места вставки. В целом эффективность транскрипции гена CCL21 снижается от 3' вставки до 5' праймерной вставки. Ген CCL21 может быть
20 вставлен в следующих местах генома: 3'-CCL21-N-P-M-G-L-5', 3'-N-CCL21-P-M-G-L-5', 3'-N-P-CCL21-M-G-L-5', 3'-N-P-M-CCL21-G-L-5', 3'-N-P-M-G-CCL21-L-5' или 3'-N-P-M-G-L-CCL21-5'. В предпочтительном варианте осуществления ген CCL21 вставляют между G-белком и L-белком.

[00137] После инфицирования опухолевых клеток ген CCL21, кодируемый
25 в геноме рекомбинантного рабдовируса, транскрибируется в положительно-полярную РНК, а затем транслируется в белок CCL21 опухолевой клеткой. Термин "кодирование" относится к природному свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в нуклеиновой кислоте служить матрицей для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах,
30 имеющих определенную последовательность нуклеотидов (например, молекул РНК) или аминокислот и возникающие в результате биологические свойства. Соответственно, ген кодирует белок, если нужный белок вырабатывается в клетке или другой биологической системе путем транскрипции последующей трансляции мРНК. И кодирующая нить, нуклеотидная последовательность

которой идентична последовательности мРНК, и некодирующая нить – обе могут служить в качестве матрицы для транскрипции гена и могут быть указаны как кодирующие белок или другой продукт этого гена. Нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, могут включать интроны.

[00138] Транскрипция гена CCL21 предпочтительно происходит не под контролем его собственного промотора и только в строгой связи с вирусной репликацией, что гарантирует экспрессию CCL21, направленную на место вирусной репликации и распространения (опухоль). Таким образом, транскрипция гена CCL21 не контролируется дополнительными элементами, такими как промоторы или элементы экспрессии индуцибельного гена.

[00139] Следует заметить, что нуклеиновокислотная последовательность может меняться с изменением или без изменения первичной последовательности кодируемого полипептида. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок, включает любые нуклеиновые кислоты, имеющие различные нуклеотидные последовательности, но кодирующие одну и ту же аминокислотную последовательность белка из-за вырожденности генетического кода. Специалисты в данной области в пределах своей квалификации смогут выбрать нуклеиновокислотную последовательность, которая в результате обеспечит экспрессию белка CCL21, в частности, до любых специфических белков CCL21, как описывается авторами. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислотные последовательности белка CCL21, получают различными способами, известными специалистам в данной области. Эти способы включают, помимо прочих, выделение из природного источника или приготовление путем опосредованного олигонуклеотидом (или сайт-специфического) мутагенеза, ПЦР мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее приготовленного белка CCL21.

[00140] Фармацевтические композиции

[00141] Фактическое фармацевтически эффективное количество или терапевтическая доза, безусловно, зависят от факторов, известных специалистам в данной области, таких как возраст и масса тела пациента, путь введения и тяжесть заболевания. Во всяком случае, рекомбинантный рабдовирус вводят в дозах и с применением способа, которые позволяют доставлять фармацевтически эффективное количество на основе уникального состояния пациента.

[00142] В целом для лечения и/или ослабления упомянутых авторами болезней, нарушений и состояний и в зависимости от конкретной болезни, нарушения или состояния, подлежащего лечению, активности конкретного применяемого рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению, конкретного пути введения и конкретной применяемой фармацевтической композиции или состава рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению в целом вводят, например, дважды в неделю, раз в неделю или раз в месяц, однако дозировка может быть разной в широких пределах, в частности, в зависимости от вышеупомянутых параметров. Таким образом, в некоторых случаях достаточным может быть применение меньше чем вышеуказанная минимальная доза, тогда как в других случаях может возникать необходимость в превышении верхнего предела. При введении большого количества может быть целесообразным разделением его на несколько меньших доз, распределенных в течение дня.

[00143] Для применения в терапии рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению рецептируют в фармацевтические композиции, подходящие для содействия введению животным или человеку. Типичные композиции приготавливают путем смешивания рекомбинантного вируса с физиологически приемлемыми носителями, формообразующими или стабилизаторами в форме водных растворов или водных или неводных суспензий. Носители, формообразующие, модификаторы или стабилизаторы являются нетоксичными в применяемых дозах и концентрациях. К ним относятся буферные системы, такие как фосфаты, цитраты, ацетаты и другие неорганические или органические кислоты и их соли; антиоксиданты включают аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты, такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и m-крезол; белки, такие как альбумин сыворотки, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль (PEG); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды, олигосахариды или полисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу, декстрины или декстраны; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахарные спирты, такие

как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или ионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™ (полисорбаты), PLURONICS™ или сложные эфиры жирных кислот, эфиры жирных кислот или сложные эфиры сахаров. Формообразующие также могут иметь модифицирующую высвобождение или модифицирующую абсорбцию функцию.

[00144] В одном варианте осуществления рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению рецептируют в фармацевтическую композицию, включающую Tris, аргинин и необязательно цитрат. Tris предпочтительно применяют в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 100 мМ. Аргинин предпочтительно применяют в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 100 мМ. Цитрат может присутствовать в концентрации до 100 мМ. В предпочтительном варианте композиция включает приблизительно 50 мМ Tris и 50 мМ аргинина.

[00145] Фармацевтическая композиция может быть предусмотрена как жидкость, замороженная жидкость или в лиофилизированной форме. Замороженную жидкость хранят при температурах от приблизительно 0 °C до приблизительно -85 °C, включая температуры от -70 °C до -85 °C и приблизительно -15 °C, -16 °C, -17 °C, -18 °C, -19 °C, -20 °C, -21 °C, -22 °C, -23 °C, -24 °C или приблизительно -25 °C.

[00146] Рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическая композиция согласно изобретению необязательно может быть рецептирована с одним или несколькими агентами, которые в настоящее время применяют для профилактики или лечения того или иного нарушения. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества рекомбинантного антитела, присутствующего в композиции, типа нарушения или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Их обычно применяют в таких же дозах и при способах введения, как описывается авторами, или в количестве приблизительно от 1 до 99 % от описанных авторами доз, или в любой дозе и при любом способе введения, который эмпирически / клинически определен как целесообразный.

[00147] Для профилактики или лечения заболевания надлежащая доза рекомбинантного рабдовируса или фармацевтической композиции согласно изобретению (при применении отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами) зависит от типа

подлежащего лечению заболевания, типа рекомбинантного рабдовируса, тяжести и течения болезни, от того, вводят ли рекомбинантный рабдовирус с профилактическими или терапевтическими целями, предыдущей терапии, клинического анамнеза пациента и реакции на рекомбинантный рабдовирус, а также от мнения лечащего врача. Рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению соответствующим образом вводят пациенту за один раз или в несколько приемов.

[00148] В зависимости от типа и тяжести заболевания, приблизительно от 10^8 до 10^{13} инфекционных частиц, измеренных по TCID₅₀ рекомбинантного рабдовируса, могут быть возможной первоначальной дозой для введения пациенту, например, в один или несколько приемов или путем непрерывной инфузии. Для неоднократного введения в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно бывает длительным, до появления необходимого подавления симптомов болезни. Типичная доза рекомбинантного рабдовируса может составлять приблизительно от 10^8 до 10^{13} инфекционных частиц, измеренных по TCID₅₀. Таким образом, пациенту вводят одну или несколько доз приблизительно 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} или 10^{13} инфекционных частиц, измеренных по TCID₅₀ (или любой их комбинации). Такие дозы вводят с промежутками, например, раз в неделю или раз в три недели (например, таким образом, чтобы пациент получал от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, приблизительно шесть доз рекомбинантного рабдовируса). Сначала может быть введена первая более высокая ударная доза, с последующим введением одной или нескольких меньших доз, или наоборот. Однако могут применяться и другие режимы дозирования. Процесс этой терапии можно легко наблюдать при помощи традиционных технологий и анализов.

[00149] Эффективность рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению и композиций, которые его включают, испытывают с применением любого подходящего хорошо известного *in vitro* анализа, клеточного анализа, *in vivo* анализа и/или животной модели, или любой их комбинации, в зависимости от конкретного заболевания. Подходящие анализы и животные модели станут понятны специалистам в данной области и включают, например, анализы и животные модели, применяемые ниже в Примерах.

[00150] Разумеется, фактическое фармацевтически эффективное количество или терапевтическая доза зависят от факторов, известных специалистам в

данной области, таких как возраст и масса тела пациента, путь введения и тяжесть заболевания. В любом случае рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят в дозах и с применением способа, позволяющего доставлять фармацевтически эффективное количество в зависимости от уникального

5 состояния пациента.

[00151] В альтернативном варианте рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению доставляют в объеме от приблизительно 50 мкл до приблизительно 100 мл, включая все значения в этом диапазоне, в зависимости от размера обрабатываемой площади, применяемого

10 вирусного титра, пути введения и желаемого эффекта от применения способа.

[00152] Для интратуморального введения объем предпочтительно составляет от приблизительно 50 мкл до приблизительно 5 мл, включая объемы приблизительно 100 мкл, 200 мкл, 300 мкл, 400 мкл, 500 мкл, 600 мкл, 700 мкл, 800 мкл, 900 мкл, 1000 мкл, 1100 мкл, 1200 мкл, 1300 мкл, 1400 мкл, 1500 мкл,

15 1600 мкл, 1700 мкл, 1800 мкл, 1900 мкл, 2000 мкл, 2500 мкл, 3000 мкл, 3500 мкл, 4000 мкл или приблизительно 4500 мкл. В предпочтительном варианте осуществления объем составляет приблизительно 1000 мкл.

[00153] Разумеется, для системного введения, например, путем инфузии рекомбинантного рабдовируса объемы могут быть больше. В альтернативном

20 варианте концентрированный раствор рекомбинантного рабдовируса может быть разведен в большем объеме раствора для инфузии непосредственно перед инфузией.

[00154] В частности, для внутривенного введения объем предпочтительно составляет от 1 мл до 100 мл, включая объемы приблизительно 2 мл, 3 мл, 4 мл,

25 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл, 14 мл, 15 мл, 16 мл, 17 мл, 18 мл, 19 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл, 50 мл, 55 мл, 60 мл, 70 мл, 75 мл, 80 мл, 85 мл, 90 мл, 95 мл или приблизительно 100 мл. В предпочтительном варианте осуществления объем составляет от приблизительно 5 мл до 15 мл, более предпочтительно объем составляет приблизительно 6 мл, 7

30 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл или приблизительно 14 мл.

[00155] Предпочтительно применяют одну и ту же композицию для интратуморального введения и внутривенного введения. Соотношение доз и/или объема между интратуморальным и внутривенным введением может составлять приблизительно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14,

1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19 или приблизительно 1:20. Например, соотношение доз и/или объема 1:1 означает, что одинаковые дозы и/или объем вводят интратуморально, а также внутривенно, тогда как, например, соотношение доз и/или объема приблизительно 1:20 означает внутривенное введение дозы и/или объема, в двадцать раз превышающих дозу и/или объем для интратуморального введения. Предпочтительно соотношение доз и/или объема между интратуморальным и внутривенным введением составляет приблизительно 1:9.

[00156] Эффективная концентрация рекомбинантного рабдовируса в оптимальном варианте составляет приблизительно от 10^8 до 10^{14} геномов вектора на миллилитр (гв/мл). Инфекционные единицы измеряют, как описывается в публикации McLaughlin et al., J Virol.; 62(6): 1963 - 73 (1988). Предпочтительно концентрация составляет от приблизительно $1,5 \times 10^9$ до приблизительно $1,5 \times 10^{13}$, более предпочтительно – от приблизительно $1,5 \times 10^9$ до приблизительно $1,5 \times 10^{11}$. В одном варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^9$. В другом варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{10}$. В другом варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{11}$. В еще одном варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{12}$. В другом варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{13}$. В другом варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{14}$. Может быть целесообразным применение самой низкой эффективной концентрации с целью снижения риска нежелательных эффектов. Другие дозы в этих диапазонах могут быть выбраны лечащим врачом с учетом физического состояния субъекта, предпочтительно человека, который подвергается лечению, возраста субъекта, конкретного типа рака и степени, до которой развился рак в случае его прогрессирования.

[00157] Эффективная целевая концентрация рекомбинантного рабдовируса может быть выражена через TCID₅₀. TCID₅₀ определяют, например, с применением способа Спирмана-Кербера. Желательные диапазоны включают эффективную целевую концентрацию от 1×10^8 / мл до 1×10^{14} / мл TCID₅₀. Предпочтительно эффективная целевая концентрация составляет от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{12} / мл, более предпочтительно – от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{11} / мл. В одном варианте

осуществления эффективная целевая концентрация составляет приблизительно 1×10^{10} / мл. В предпочтительном варианте осуществления целевая концентрация составляет 5×10^{10} / мл. В другом варианте осуществления эффективная целевая концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{11}$ / мл. В одном варианте осуществления эффективная целевая концентрация составляет приблизительно 1×10^{12} / мл. В другом варианте осуществления эффективная целевая концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{13}$ / мл.

[00158] Эффективная целевая доза рекомбинантного рабдовируса также может быть выражена через $TCID_{50}$. Желательные диапазоны включают целевую дозу от 1×10^8 до 1×10^{14} $TCID_{50}$. Предпочтительно целевая доза составляет от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{13} , более предпочтительно от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{12} . В одном варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно 1×10^{10} . В предпочтительном варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно 1×10^{11} . В одном варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно 1×10^{12} . В другом варианте осуществления эффективная концентрация составляет приблизительно 1×10^{13} .

[00159] В другом аспекте обеспечивается комплект или набор из частей, содержащий материалы, применяемые для лечения, профилактики и/или диагностики описываемых авторами нарушений. Комплект или набор из частей включает контейнер и ярлык или листок-вкладыш на контейнере или связанный с ним. Подходящими контейнерами могут быть, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для внутривенного вливания и т. п. Контейнеры могут быть выполнены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая отдельно или в комбинации с другой композицией, является эффективной для лечения, профилактики и/или диагностики нарушения, и может иметь стерильный порт доступа (например контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного вливания или флакон, имеющий пробку, которая поддается прокалыванию иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере одним активным агентом в композиции является рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическая композиция согласно изобретению. Ярлык или листок-вкладыш указывает, что

композиция предназначена для применения в лечении соответствующего состояния.

[00160] Кроме того, комплект или набор из частей может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, причем композиция
5 включает рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению; и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, причем композиция включает еще один цитотоксический или другой терапевтический агент, такой как ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC. Комплект или набор из частей в этом варианте осуществления также
10 может включать листок-вкладыш, указывающий, что композиции могут применяться для лечения конкретного состояния, в частности, рака. В альтернативном или дополнительном варианте комплект или набор из частей также может включать второй (или третий) контейнер, включающий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для
15 инъекций (BWFI), фосфатно-буферный раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Он также может включать другие материалы, целесообразные с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

[00161] В еще одном аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно
20 изобретению применяют в комбинации с устройством, применяемым для введения рекомбинантного рабдовируса, таким как шприц, шприц-ручка, микронасос или другое устройство. Предпочтительно рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению включен в набор частей, также включающий, например, листок-вкладыш с инструкциями по применению рекомбинантного
25 рабдовируса.

[00162] Медицинское применение

[00163] В еще одном аспекте изобретение обеспечивает рекомбинантный рабдовирус, кодирующий в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, для применения в медицине.

[00164] Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению эффективно
30 вызывает лизис опухолевых клеток в комбинации с иммуногенной гибелью клеток и стимуляцией врожденных иммунных клеток в микросреде опухоли. Соответственно, рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению может применяться для лечения и/или профилактики.

[00165] В еще одном аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению может быть применен согласно способу лечения и/или профилактики рака, включающему введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного рабдовируса субъекту, страдающему от рака, для

5 облегчения, таким образом, одного или нескольких симптомов рака.

[00166] В еще одном аспекте изобретение также обеспечивает применение рекомбинантного рабдовируса в соответствии с изобретением для производства медикамента для лечения и/или профилактики рака.

[00167] В еще одном аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению применяют согласно способу лечения и/или профилактики рака

10 желудочно-кишечного тракта, рака легкого или рака головы и шеи, включающему введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного рабдовируса субъекту, страдающему от рака желудочно-кишечного тракта, рака легкого или рака головы и шеи, для облегчения, таким

15 образом, одного или нескольких симптомов рака желудочно-кишечного тракта, рака легкого или рака головы и шеи.

[00168] Для профилактики или лечения болезни надлежащая доза рекомбинантного рабдовируса зависит от различных факторов, таких как тип заболевания, поддающегося лечению, как определено выше, тяжесть и течение

20 болезни, вводится ли рекомбинантный рабдовирус с профилактическими или терапевтическими целями, предыдущая терапия, клинический анамнез пациента и реакция на рекомбинантный рабдовирус, а также мнение лечащего врача. Рекомбинантный рабдовирус соответствующим образом вводят пациенту за один раз или курсом лечения.

[00169] В одном аспекте рак представляет собой солидный рак. Солидным раком может быть рак головного мозга, рак толстой и прямой кишки, орофарингеальная плоскоклеточная карцинома, рак желудка, аденокарцинома

желудочно-пищеводного соединения, карцинома пищевода, гепатоцеллюлярная карцинома, аденокарцинома поджелудочной железы, холангиокарцинома,

30 уротелиальная карцинома мочевого пузыря, метастатическая меланома, карцинома предстательной железы, карцинома молочной железы, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ), глиобластома, мелкоклеточный рак легкого, опухоль головного мозга или мелкоклеточный рак легкого.

Предпочтение отдают лечению рака желудочно-кишечного тракта, рака легкого и рака головы и шеи.

[00170] Рекомбинантный рабдовирус вводят любым подходящим способом, включая пероральный, парентеральный, подкожный, интратуморальный, внутривенный, интрадермальный, внутрибрюшинный, внутрилегочный и интраназальный. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, рекомбинантный рабдовирус может вводиться путем импульсной инфузии. В одном аспекте дозу вводят путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или хроническим.

[00171] В зависимости конкретного рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению и его конкретным фармакокинетическим и другим свойствам, его вводят раз в день, раз в два, три, четыре, пять или шесть дней, раз в неделю, раз в месяц и т. п. Режим введения может включать долговременное, еженедельное лечение. Под "долговременным" следует понимать длительность по меньшей мере две недели, предпочтительно месяцы или годы.

[00172] Курс лечения может включать различные режимы и, как правило, требует введения пациенту множества доз в течение периода в одну, две, три или четыре недели, необязательно с последующими одним или несколькими циклами лечения. В одном аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят пациенту в количестве до 1, 2, 3, 4, 5 или 6 доз в течение данного периода времени. Предпочтительно первый цикл лечения осуществляют в течение трех недель. В процессе трехнедельного лечения рекомбинантный рабдовирус вводят пациенту, как описано в следующих схемах: (I) однократно в день 0 (II) в день 0 и день 3; (III) в день 0, день 3 и день 6; (IV) в день 0, день 3, день 6 и день 9; (V) в день 0 и день 5; (VI) в день 0, день 5 и день 10; (VII) в день 0, день 5, день 10 и день 15. Эти режимы могут повторяться, и необходимость во втором или третьем цикле лечения может зависеть от исхода первого цикла лечения. Рассчитываемый на основе первого цикла лечения, второй цикл лечения предпочтительно включает дальнейшие сеансы лечения в день 21, день 42 и день 63. В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят пациенту в соответствии со следующей схемой: в день 0, день 3, день 21, день 42 и день 63.

[00173] Термин “подавление” применяется авторами в том же контексте, что и “смягчение” и “облегчение”, то есть, снижение или уменьшение одной или нескольких характеристик болезни. Рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению рецептируют, дозируют и вводят в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, рассматриваемые в данном контексте, включают конкретное заболевание, поддающееся лечению, конкретное млекопитающее, подвергаемое лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причина нарушения, место доставки действующего вещества, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам. “Терапевтически эффективное количество” вводимого рекомбинантного рабдовируса определяется этими факторами и составляет минимальное количество, необходимое для профилактики, смягчения или устранения клинических симптомов рака, в частности, минимальное количество, эффективное в отношении этих нарушений.

[00174] В другом аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят многократно и несколькими дозами. В одном аспекте первую дозу рекомбинантного рабдовируса вводят интратуморально, а последующие дозы рекомбинантного рабдовируса вводят внутривенно. В еще одном аспекте первую дозу и по меньшей мере одну или несколько следующих доз рекомбинантного рабдовируса вводят интратуморально, а последующие дозы рекомбинантного рабдовируса вводят внутривенно. Последующие дозы могут вводиться через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после первоначального интратуморального введения.

[00175] В другом аспекте первую дозу рекомбинантного рабдовируса вводят внутривенно, а последующие дозы рекомбинантного рабдовируса вводят интратуморально. Последующие дозы могут вводиться через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после первоначального внутривенного введения.

[00176] В другом аспекте рекомбинантный рабдовирус вводят внутривенно, а последующие дозы рекомбинантного рабдовируса вводят интратуморально.

[00177] В другом аспекте рекомбинантный рабдовирус в каждый момент времени вводят внутривенно и интратуморально.

5 [00178] Как указано выше, рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению может быть очень полезен для стимулирования иммунной реакции против раковых клеток. Согласно наблюдениям, сильный иммуноактивирующий потенциал ограничивался микросредой опухоли. Таким образом, в предпочтительном аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению
10 может вводиться пациенту системно. Системная применимость является ключевым свойством, поскольку многие виды рака активно метастазируют, и она позволяет лечить труднодоступные, а также недоступные опухоли. Благодаря его уникальным иммуностимулирующим свойствам, рекомбинантный рабдовирус в соответствии с изобретением особенно полезен для лечения
15 метастазирующих опухолей.

[00179] У некоторых пациентов развивается резистентность к терапии с применением ингибитора иммунных контрольных точек, и, согласно наблюдениям, у таких пациентов накапливались мутации в пути IFN. Таким образом, в одном аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению, в
20 частности, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита согласно изобретению может применяться для лечения пациентов, у которых развилась резистентность к терапии с применением ингибитора иммунных контрольных точек. Благодаря уникальным способствующим иммунитету свойствам рекомбинантного рабдовируса, в частности, рекомбинантного вируса
25 везикулярного стоматита согласно изобретению, такие подвергнутые лечению пациенты могут быть допущены к продолжению терапии с применением ингибитора иммунных контрольных точек.

[00180] В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению, в частности, рекомбинантный вирус
30 везикулярного стоматита согласно изобретению, может применяться для лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого, которые полностью прошли курс терапии с применением ингибитора иммунных контрольных точек с ингибитором PD-1 или PD-L1, например, антагонистическими антителами к PD-1 или PD-L1.

[00181] Следует понимать, что любые из вышеупомянутых фармацевтических композиций или терапевтических способов могут осуществляться с применением любых из рекомбинантных рабдовирусов или фармацевтических композиций согласно изобретению.

5 **[00182] Комбинации**

[00183] Настоящее изобретение также обеспечивает комбинацию способов лечения, обеспечивающую определенные преимущества по сравнению со способами лечения, применяемыми в настоящее время и/или известными из существующего уровня техники. Эти преимущества могут включать
10 эффективность *in vivo* (например, улучшенный клинический ответ, продление ответа, повышение частоты ответа, длительность ответа, показатель стабилизации болезни, длительность стабилизации, время до снижения прогрессирования, выживаемость без прогрессирования заболевания (ВБПЗ) и/или общая выживаемость (ОВ), случаи резистентности впоследствии и т. п.),
15 безопасное и хорошо переносимое введение и снижение частоты и тяжести неблагоприятных явлений.

[00184] Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению применяют в комбинации с другими фармакологически активными ингредиентами, такими как соединения существующего уровня техники или представляющие стандарт
20 клинической практики, например, цитостатические или цитотоксические вещества, ингибиторы пролиферации клеток, антиангиогенные вещества, стероиды, иммуномодуляторы/ингибиторы иммунных контрольных точек и т.п.

[00185] Цитостатические и/или цитотоксические активные вещества, которые вводят в комбинации с рекомбинантным рабдовирусом согласно
25 изобретению, включают, помимо прочих, гормоны, аналоги гормонов и антигормоны, ингибиторы ароматазы, агонисты и антагонисты РФЛГ, ингибиторы факторов роста (факторы роста, например, тромбоцитарный фактор роста (ТФР), фактор роста фибробластов (ФРФ), фактор роста сосудистого эндотелия (ФРСЭ), эпидермальный фактор роста (ЭФР), инсулиноподобные
30 факторы роста (ИФР), эпидермальный фактор роста человека (HER, например, HER2, HER3, HER4) и фактор роста гепатоцитов (ФРГ)), причем ингибиторами являются, например антитела против фактора роста, антитела против рецептора фактора роста и ингибиторы тирозинкиназы, такие как, например, цетуксимаб, гефитиниб, афатиниб, нинтеданиб, иматиниб, лапатиниб, бозутиниб и

трастузумаб; антиметаболиты (например, антифолаты, такие как метотрексат, ралтитрексед, аналоги пиримидина, такие как 5-фторурацил (5-FU), гемцитабин, иринотекан, доксорубицин, TAS-102, капецитабин и гемцитабин, аналоги пурина и аденозина, такие как меркаптопурин, тиогуанин, кладрибин и

5 пентостатин, цитарабин (ага С), флударабин); противоопухолевые антитела (например, антрациклины); производные платины (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин); алкилирующие агенты (например, эстрамустин, мехлорэтамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, декарбазин, циклофосфамид,

10 ифосфамид, темозоломид, нитрозомочевины, такие как, например, кармустин и ломустин, тиотепа); антимитотические агенты (например, алкалоиды барвинка, такие как, например винбластин, виндезин, винорелбин и винкристин; и таксаны, такие как паклитаксел, доцетаксел); ингибиторы ангиогенеза, включая

15 бевацизумаб, рамуцирумаб и афлиберцепт, ингибиторы тубулина; ингибиторы синтеза ДНК, ингибиторы PARP, ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподофиллотоксины, такие как этопозид и этопофос, тенипозид, амсакрин, топотекан, иринотекан, митоксантрон), ингибиторы серин / треонинкиназы (например, ингибиторы PDK1, ингибиторы Raf, ингибиторы A-Raf, ингибиторы

20 B-Raf, ингибиторы C-Raf, ингибиторы mTOR, ингибиторы mTORC1/2, ингибиторы PI3K, ингибиторы PI3Kα, двойные ингибиторы mTOR/PI3K, ингибиторы STK33, ингибиторы АКТ, ингибиторы PLK1 (такие как воласертиб), ингибиторы CDK, включая ингибиторы CDK9, ингибиторы аврора-киназы), ингибиторы тирозинкиназы (например, ингибиторы PTK2/FAK), ингибиторы

25 межбелкового взаимодействия, ингибиторы MEK, ингибиторы ERK, ингибиторы FLT3, ингибиторы BRD4, ингибиторы IGF-1R, ингибиторы Bcl-xL, ингибиторы Bcl-2, ингибиторы Bcl-2/Bcl-xL, ингибиторы рецепторов ErbB, ингибиторы BCR-ABL, ингибиторы ABL, ингибиторы Src, аналоги рапамицина (например, эверолимус, темсиролимус, ридафоролимус, сиролимус), ингибиторы синтеза

30 андрогена, ингибиторы андрогеновых рецепторов, ингибиторы DNMT, ингибиторы HDAC, ингибиторы ANG1/2, ингибиторы CYP17, радиофармацевтические средства, иммунотерапевтические средства, такие как ингибиторы иммунных контрольных точек (например, связывающие молекулы CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3 и TIM3 / иммуноглобулины, такие как ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб) и различные химиотерапевтические средства, такие как амифостин, анагрелид, клодронат, филграстим, интерферон, пегинтерферон

альфа, лейковорин, ритуксимаб, прокарбазан, левамизол, месна, митотан, памидронат и порфимер; ингибиторы протеасомы (такие как бортезомиб); миметики Smac и ВНЗ; агенты, восстанавливающие функциональность p53, включая антагонист mdm2-p53; ингибиторы сигнального пути Wnt/бета-катенина; и/или ингибиторы циклинзависимой киназы 9.

[00186] Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению может применяться в комбинированном лечении с применением ингибитора пути PD-1 или SMACm / антагониста IAP. Такое комбинированное лечение возможно в форме нефиксированной (например, свободной) комбинации веществ или в форме фиксированной комбинации, включая набор частей.

[00187] В данном контексте “комбинация” или “комбинированный” согласно этому изобретению включает, помимо прочего, продукт, являющийся результатом смешивания или комбинирования более одного активного агента и включает как фиксированные, так и нефиксированные (например, свободные) комбинации (включая комплекты) и способы применения, такие как, например, одновременное, параллельное, последовательное, поочередное или отдельное применение компонентов или агентов. Термин “фиксированная комбинация” означает, что активные агенты вводят пациенту одновременно в форме монопрепарата или единой дозы. Термин “нефиксированная комбинация” означает, что активные агенты вводят пациенту отдельными единицами либо одновременно, либо параллельно, либо последовательно, без конкретных ограничений по времени, причем такое введение обеспечивает терапевтически эффективный уровень двух соединений в организме пациента. Последнее также касается коктейльной терапии, например, введения трех или более активных агентов.

[00188] Изобретение обеспечивает рекомбинантный рабдовирус в комбинации с ингибитором пути PD-1 или антагонистом SMACm / IAP для применения в лечении рака, как описывается авторами, предпочтительно для лечения солидного рака.

[00189] Изобретение также обеспечивает применение рекомбинантного рабдовируса в комбинации с ингибитором пути PD-1 или антагонистом SMACm / IAP для производства медикамента для лечения и/или профилактики рака, как описывается авторами, предпочтительно для лечения солидного рака.

[00190] Изобретение также обеспечивает способ лечения и/или профилактики рака, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению и ингибитора пути PD-1 или антагониста SMACm / IAP субъекту, страдающему от рака, для облегчения, таким образом, одного или нескольких симптомов рака. Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению и ингибитор пути PD-1 или антагонист SMACm / IAP вводят одновременно, последовательно или поочередно.

[00191] Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению и ингибитор пути PD-1 или антагонист SMACm / IAP вводят одинаковыми путями введения или различными путями введения. Предпочтительно ингибитор пути PD-1 или антагонист SMACm / IAP вводят внутривенно, а рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят интратуморально. В другом варианте осуществления ингибитор пути PD-1 или антагонист SMACm / IAP вводят внутривенно, а рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят по меньшей мере один раз интратуморально, а последующие дозы рекомбинантного рабдовируса вводят внутривенно. Последующие дозы могут вводиться через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после первоначального интратуморального введения. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор пути PD-1 или антагонисты SMACm / IAP вводят через 21 день после первоначального интратуморального введения.

[00192] Особое предпочтение отдают лечению рекомбинантным рабдовирусом согласно изобретению в комбинации с:

[00193] (I) миметиком SMACa (SMACm) / антагонистами IAP,

[00194] (II) иммунотерапевтическими средствами, включая средства против PD-1 и против PD-L1 и средства против LAG3, такие как пембролизумаб и ниволумаб, и антитела, описываемые в документе WO2017/198741.

[00195] Обеспечиваемая согласно изобретению комбинация включает (I) рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению и (IIa) ингибитор пути PD-1, предпочтительно антагонистическое антитело, направленное против PD-1 или PD-L1, или (IIb) антагонисты SMACm / IAP. Также обеспечивается применение

такой комбинации, которая включает (I) и (IIa) или (I) и (IIb) для лечения рака, как описывается авторами.

[00196] В другом аспекте обеспечивается комбинированное лечение, включающее применение (I) рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению и (IIa) ингибитора пути PD-1 или (IIb) антагонистов SMACm / IAP. В таком комбинированном лечении рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят одновременно, последовательно или поочередно с ингибитором пути PD-1 или антагонистами SMACm / IAP.

[00197] Например, “параллельное” введение включает введение активных агентов в пределах одного общего периода времени, например, в один день, но не обязательно в одно и то же время. Поочередное введение включает введение агента в течение периода времени, например, на протяжении пяти дней или недели, с последующим введением другого агента в течение следующего периода времени, например, на протяжении пяти дней или недели, с последующим повторением этой схемы в течение одного или нескольких циклов. Последовательное введение включает введение одного агента в течение первого периода времени (например, на протяжении пяти дней или недели) с применением одной или нескольких доз, с последующим введением другого агента в течение второго периода времени (например, на протяжении пяти дней или недели) с применением одной или нескольких доз. Также может применяться перекрывающийся график, который включает введение активных агентов в разные дни в течение периода лечения, не обязательно в соответствии с регулярной последовательностью. Также возможны варианты общих рекомендаций, например, в соответствии с применяемыми агентами и состоянием субъекта.

[00198] Последовательные курсы лечения включают введение рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению с последующим введением ингибитора пути PD-1 или антагониста SMACm / IAP. Последовательные курсы лечения также включают введение ингибитора пути PD-1 или антагонистов SMACm / IAP с последующим введением рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению. Последовательные курсы лечения могут включать введение через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней,

19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после окончания предыдущего.

[00199] Ингибитором пути PD-1 с точки зрения этого изобретения и всех вариантов его осуществления является соединение, ингибирующее взаимодействие PD-1 с его рецептором(ами). Ингибитор пути PD-1 способен нарушать сигнал пути PD-1, предпочтительно опосредованный рецептором PD-1. Ингибитор PD-1 может быть любым ингибитором, направленным против любого компонента пути PD-1, способного антагонизировать сигнал пути PD-1. Ингибитор может быть антагонистическим антителом, воздействующим на любой компонент пути PD-1, предпочтительно направленным против рецептора PD-1, PD-L1 или PD-L2. Ингибитор пути PD-1 также может быть фрагментом рецептора PD-1 или рецептора PD-1, блокирующего активность лигандов PD1.

[00200] Антагонисты PD-1 хорошо известны специалистам в данной области и рассматриваются, например, в публикации Li et al., Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 1151 (включенной в данное описание путем ссылки). Любой антагонист PD-1, в частности, антитела, такие как описываемые в Li et al., а также другие описываемые далее антитела, могут применяться в соответствии с изобретением. Предпочтительно антагонист PD-1 согласно этому изобретению и все варианты его осуществления выбирают из группы, состоящей из следующих антител:

- пембролизумаб (антитело против PD-1);
 - ниволумаб (антитело против PD-1);
 - пидилизумаб (антитело против PD-1);
 - PDR-001 (антитело против PD-1);
 - PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5, как описывается ниже
- (антитела против PD-1);
- атезолизумаб (антитело против PD-L1);
 - авелумаб (антитело против PD-L1);
 - дурвалумаб (антитело против PD-L1).

[00201] Пембролизумаб (ранее также известный как ламбролизумаб; торговое название Keytruda; также известен как MK-3475), описываемый, например, в публикации Hamid, O. et al. (2013) New England Journal of Medicine 369(2): 134 - 44, представляет собой гуманизированное IgG4 моноклональное антитело, которое связывается с PD-1; содержит мутацию в C228P, предназначенную для предотвращения Fc-опосредованной цитотоксичности.

Пембролизумаб описан, например, в документе US 8,354,509 и документе WO2009/114335. Утвержден Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) для лечения пациентов, страдающих от неоперабельной или метастатической меланомой и пациентов с метастатическим НМРЛ.

[00202] Ниволумаб (CAS Registry Number: 946414-94-4; BMS-936558 или MDX1106b) представляет собой полностью человеческое IgG4 моноклональное антитело, специфически блокирующее PD-1, без обнаружимой антителозависимой клеточно-обусловленной цитотоксичности (ADCC). Ниволумаб, например, описывается в документе US 8,008,449 и документе WO2006/121168. Он был утвержден Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) для лечения пациентов, страдающих от неоперабельной или метастатической меланомы, метастатического НМРЛ и распространенной почечно-клеточной карциномы.

[00203] Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное IgG1k моноклональное антитело, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб описывается, например, в документе WO2009/101611.

[00204] PDR-001 или PDR001 представляет собой высокоаффинное лиганд-блокирующее гуманизированное IgG4 антитело против PD-1, которое блокирует связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1. PDR-001 описывается в документе WO2015/112900 и документе WO2017/019896.

[00205] Антитела с PD1-1 по PD1-5 представляют собой молекулы антител, определяемые последовательностями, показанными в Таблице 1, где HC означает (полноразмерную) тяжелую цепь, а LC означает (полноразмерную) легкую цепь:

[00206] Таблица 1:

SEQ ID NO:	Назв. посл.	Аминокислотная последовательность
14	HC PD1-1	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
15	LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQ

SEQ ID NO:	Назв. посл.	Аминокислотная последовательность
	PD1-1	GSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
16	HC PD1-2	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNPNYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSLG
17	LC PD1-2	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	HC PD1-3	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSLG
19	LC PD1-3	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	HC PD1-4	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSLG
21	LC PD1-4	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
22	HC PD1-5	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSLG
23	LC PD1-5	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWWYQQKPGQAPKLLIYVASNQGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00207] Более конкретно, вышеописанная молекула антитела против PD-1 имеет:

(PD1-1:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; или

(PD1-2:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; или

(PD1-3:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; или

(PD1-4:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; или

(PD1-5:) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

[00208] Атезолизумаб (Tecentriq, также известный как MPDL3280A) представляет собой фаговое человеческое IgG1k моноклональное антитело, направленное на PD-L1 и описанное, например, в публикации Deng et al. mAbs 2016; 8: 593 - 603. Утвержден Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) для лечения пациентов, страдающих от уротелиальной карциномы.

[00209] Авелумаб представляет собой полностью человеческое IgG1 моноклональное антитело против PD-L1, описанное, например, в публикации Boyerinas et al. Cancer Immunol. Res. 2015; 3: 1148 - 1157.

[00210] Дурвалумаб (MEDI4736) представляет собой человеческое IgG1k моноклональное антитело с высокой специфичностью к PD-L1, описанное, например, в публикациях Stewart et al. Cancer Immunol. Res. 2015; 3: 1052 - 1062 или Ibrahim et al. Semin. Oncol. 2015; 42: 474 - 483.

[00211] Другие антагонисты PD-1, описанные в публикации Li et al. (выше) или, по сведениям, проходящие клинические испытания, такие как AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), REGN2810, BMS-936559, JS001-PD-1, SHR-1210, BMS-936559, TSR-042, JNJ-63723283, MEDI4736, MPDL3280A и MSB0010718C, могут

применяться в качестве альтернативы или в дополнение к вышеупомянутым антагонистам.

[00212] INN в контексте данного описания также включают все биологически подобные антитела, имеющие такую же или по сути такую же аминокислотную последовательность, как и у исходного антитела, включая, помимо прочих, биологически подобные антитела, утвержденные согласно разделу 42 Свода законов США (USC) §262, подраздел (k), в США и в равноценных нормативных требованиях других юрисдикций.

[00213] Вышеперечисленные антагонисты PD-1 известны специалистам в данной области по их соответствующим способам производства, терапевтическому применению и свойствам.

[00214] В одном варианте осуществления антагонистом PD-1 является пембролизумаб.

[00215] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является ниволумаб.

[00216] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является пидилилизумаб.

[00217] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является атезолизумаб.

[00218] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является авелумаб.

[00219] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является дурвалумаб.

[00220] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является PDR-001.

[00221] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является PD1-1.

[00222] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является PD1-2.

[00223] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является PD1-3.

[00224] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является PD1-4.

[00225] В другом варианте осуществления антагонистом PD-1 является PD1-5.

[00226] Миметик SMAC в контексте данного изобретения и всех вариантов его осуществления представляет собой соединение, которое связывается с белками IAP и вызывает их расщепление. Предпочтительно миметик SMAC в контексте данного изобретения и всех вариантов его осуществления выбирают из группы, состоящей из следующих соединений (A0):

- миметик SMAC (т. е. соединение) как описывается (в целом и/или конкретно) в документе WO 2013/127729, или его фармацевтически приемлемая соль;

- миметик SMAC (т. е. соединение) как описывается (в целом и/или конкретно) в документе WO 2015/025018, или его фармацевтически приемлемая соль;

- миметик SMAC (т. е. соединение) как описывается (в целом и/или конкретно) в документе WO 2015/025019, или его фармацевтически приемлемая соль;

- миметик SMAC (т. е. соединение) как описывается (в целом и/или конкретно) в документе WO 2016/023858, или его фармацевтически приемлемая соль;

- миметик SMAC (т. е. соединение) как описывается (в целом и/или конкретно) в документе WO 2008/0016893, или его фармацевтически приемлемая соль;

- LCL161, т. е. соединение A в примере 1 документа WO 2008/016893 (стр. 28 / 29; [122]) или его фармацевтически приемлемая соль;

- миметик SMAC, известный как Debio-1143, или его фармацевтически приемлемая соль;

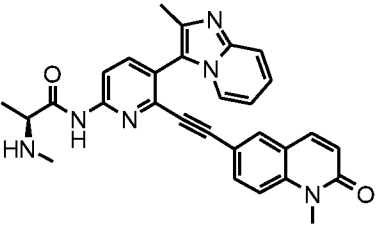
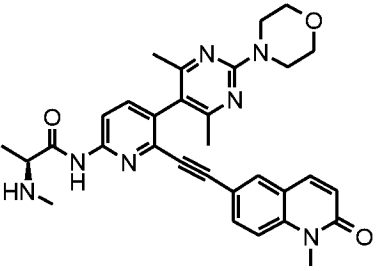
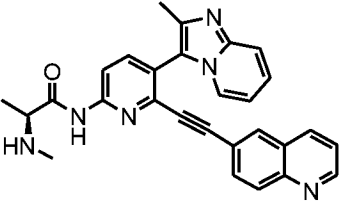
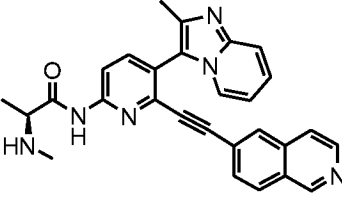
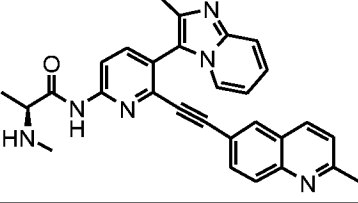
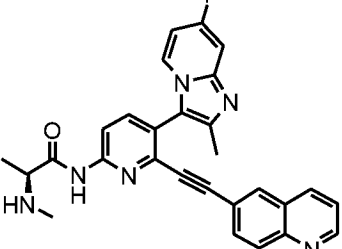
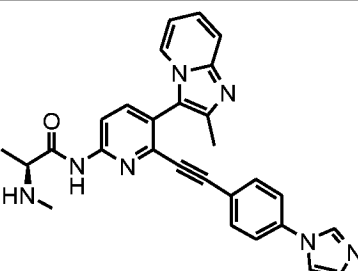
- миметик SMAC, известный как биринапант, или его фармацевтически приемлемая соль;

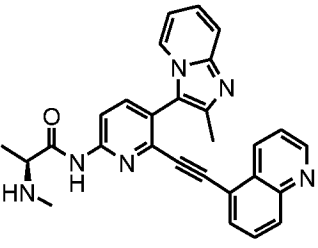
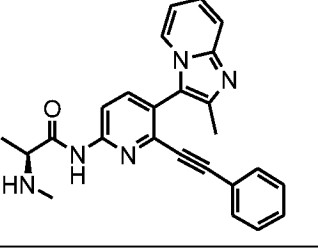
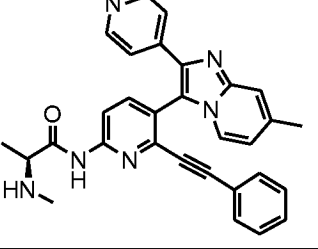
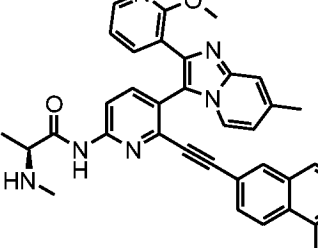
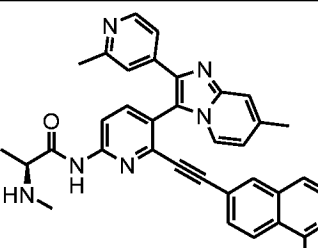
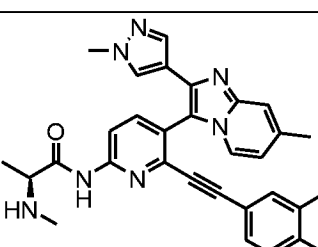
- миметик SMAC, известный как ASTX-660, или его фармацевтически приемлемая соль;

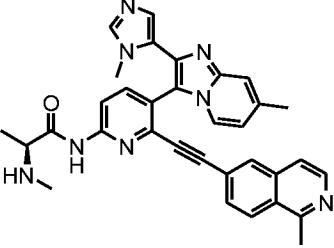
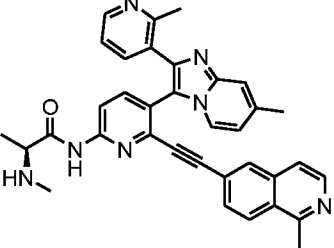
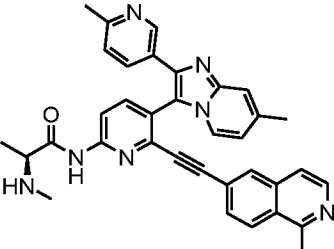
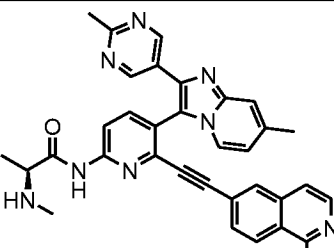
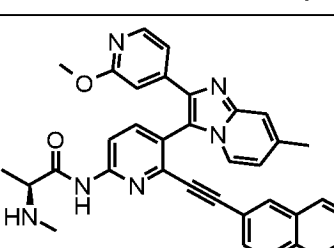
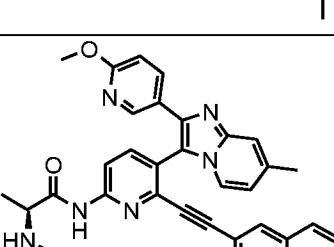
- миметик SMAC, известный как CUDC-427, или его фармацевтически приемлемая соль;

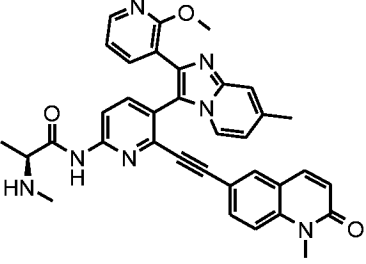
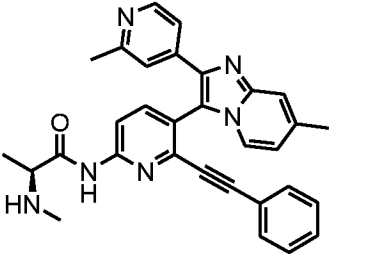
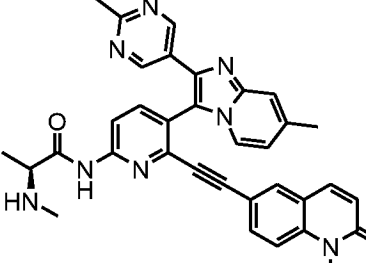
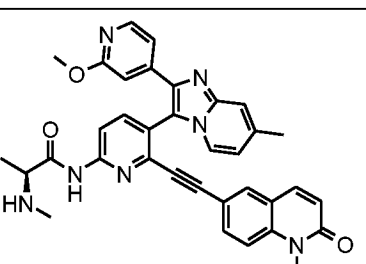
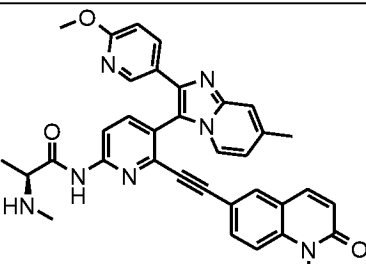
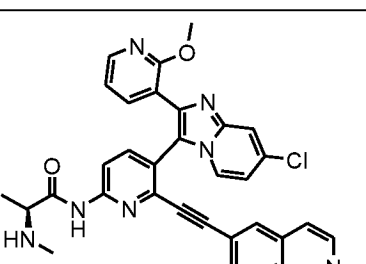
- любой из миметиков SMAC с 1 по 26 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль;

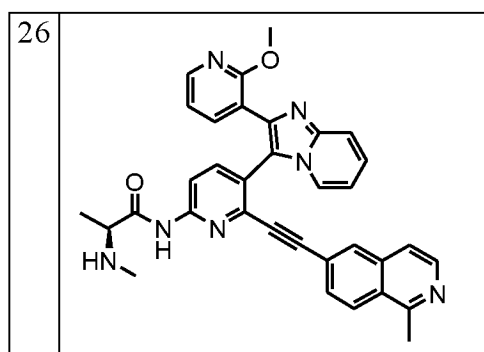
[00227] Таблица 2:

1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	

8	
9	
10	
11	
12	
13	

14	
15	
16	
17	
18	
19	

20	
21	
22	
23	
24	
25	



[00228] Примеры соединений с 1 по 10 в Таблице 2 раскрываются в документе WO 2013/127729. Примеры соединений с 11 по 26 в Таблице 2 раскрываются в документе WO 2016/023858.

5 **[00229]** Термин “Миметик SMAC / антагонист IAP” в контексте данного описания также включает вышеперечисленные миметики SMAC в форме таутомера, фармацевтически приемлемой соли, гидрата или сольвата (включая гидрат или сольват фармацевтически приемлемой соли). Он также включает миметик SMAC во всех его твердых, предпочтительно кристаллических, формах и во всех кристаллических формах его фармацевтически приемлемых солей, гидратов и сольватов (включая гидраты и сольваты фармацевтически приемлемых солей).

15 **[00230]** Все вышеперечисленные миметики SMAC известны специалистам в данной области, с соответствующими способами их синтеза и свойствами. Все упомянутые выше патентные заявки включены путем ссылки в их полном объеме.

[00231] В одном варианте осуществления миметиком SMAC является LCL161 или его фармацевтически приемлемая соль (A1).

20 **[00232]** В другом варианте осуществления миметиком SMAC является соединение 1 в Таблице 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A2).

[00233] В другом варианте осуществления миметиком SMAC является соединение 2 в Таблице 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A3).

[00234] В другом варианте осуществления миметиком SMAC является соединение 3 в Таблице 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A4).

25 **[00235]** В другом варианте осуществления миметиком SMAC является соединение 4 в Таблице 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A5).

[00253] В другом варианте осуществления миметиком SMAC является соединение 22 в Таблице 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A23).

[00254] В другом варианте осуществления миметиком SMAC является соединение 23 в Таблице 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A24).

5 **[00255]** В другом варианте осуществления миметиком SMAC является соединение 24 в Таблице 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A25).

[00256] В другом варианте осуществления миметиком SMAC является соединение 25 в Таблице 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A26).

10 **[00257]** В другом варианте осуществления миметиком SMAC является соединение 26 в Таблице 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A27).

[00258] Все варианты осуществления с (A1) по (A27) являются предпочтительными вариантами осуществления варианта (A0) в отношении природы миметика SMAC.

15 **[00259]** В предпочтительном варианте осуществления, касающемся комбинированного лечения, рекомбинантный рабдовирус представляет собой рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21, выбранный из группы, к которой относятся: (I) обработанный плазмином белок CCL21, (II) усеченный на с-конце

20 белок CCL21, (III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 3, (V) белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 4, (VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную

25 последовательность, (VII) белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 1, или (VIII) белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92

%, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 5, причем ген, кодирующий гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV.

[00260] В еще одном предпочтительном варианте осуществления, касающемся комбинированного лечения, рекомбинантный рабдовирус представляет собой рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита и по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21, причем белок CCL21 или его функциональный вариант выбирают из группы, к которой относятся: (I) обработанный плазмином белок CCL21, (II) усеченный на с-конце белок CCL21, (III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 3, (V) белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 4, (VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную последовательность, (VII) белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 1, или (VIII) белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 5, причем ген, кодирующий гликопротеин G вируса везикулярного стоматита, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV, и нуклеопротеин (N) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID

NO: 7, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7, фосфопротеин (P) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8, большой белок (L) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9, и матриксный белок (M) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 10, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

[00261] В еще более предпочтительном варианте осуществления, касающемся способов комбинированного лечения, рекомбинантный рабдовирус представляет собой рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21, причем белок CCL21 или его функциональный вариант включает SEQ ID NO: 5 или имеет по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 5, причем ген, кодирующий гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV.

[00262] Хотя комбинация рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению, в частности, вируса везикулярного стоматита согласно изобретению вместе с ингибиторами PD-1 или антагонистами SMACm / IAP была исключительно эффективной в лечении рака, авторами изобретения было обнаружено, что комбинация вируса везикулярного стоматита, не кодирующего дополнительный карго, т. е., не кодирующего белок CCL21, также эффективна в сочетании с ингибитором пути PD-1 или антагонистом SMACm / IAP. В частности, комбинированное лечение VSV-GP (вирус везикулярного стоматита с

гликопротеином LCMV) с применением ингибитора пути PD-1 или антагониста SMAC α / IAP, как описывается авторами, было эффективным для лечения рака, предпочтительно солидного рака. Таким образом, авторами также предлагается комбинация, включающая VSV-GP, не кодирующий белок CCL21, и ингибитор пути PD-1, предпочтительно антагонистическое антитело, направленное против PD-1 или PD-L1 или антагонист SMAC α / IAP. Также предлагается применение такой комбинации для лечения рака, как описывается авторами. Также предлагается комбинированное лечение, включающее применение VSV-GP, не кодирующего белок CCL21, и ингибитора пути PD-1 или антагониста SMAC α / IAP.

[00263] В связи с комбинированным лечением с применением VSV-GP, не кодирующего белок CCL21, предпочтение отдают рекомбинантному рабдовирусу, который является рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита, причем ген, кодирующий гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV.

[00264] Также в связи с комбинированным лечением с применением VSV-GP, не кодирующего белок CCL21, предпочтение отдают рекомбинантному рабдовирусу, который представляет собой рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита, причем ген, кодирующий гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV, и нуклеопротеин (N) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7, фосфопротеин (P) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8, большой белок (L) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по меньшей

мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9, и матриксный белок (М) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 10, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

[00265] Образование и выработка вируса и вырабатывающая вирус клетка

[00266] Изобретение также обеспечивает вырабатывающую вирус клетку, характеризующуюся тем, что клетка вырабатывает рекомбинантный рабдовирус или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии с изобретением.

[00267] Клетка может иметь любое происхождение и может присутствовать как изолированная клетка или как клетка, включенная в популяцию клеток. В предпочтительном варианте клетка, вырабатывающая рекомбинантный рабдовирус или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, является клеткой млекопитающего. В еще более предпочтительном варианте осуществления вырабатывающая вирус клетка согласно изобретению характеризуется тем, что клетка млекопитающего представляет собой плюрипотентную клетку-предшественник взрослого организма (МАРС), нейтральную стволовую клетку (NSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC), клетку HeLa, клетку НЕК, любую клетку НЕК293 (например, НЕК293F или НЕК293Т), клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку почки новорожденного хомяка (ВНК) или клетку Vero или клетку костномозгового происхождения, инфильтрирующую опухоль (BM-TIC).

[00268] В альтернативном варианте вырабатывающая вирус клетка может быть клеткой человека, клеткой обезьяны или клеткой хомяка. Специалистам в данной области известны способы, применимые для испытания с целью определения, вырабатывает ли данная клетка вирус, и, таким образом, охватывается ли конкретная клетка объемом этого изобретения. В этом отношении количество вируса, вырабатываемого клеткой согласно изобретению, особенно не ограничивается. Предпочтительные вирусные титры составляют $\geq 1 \times 10^7$ TCID₅₀/мл или $\geq 1 \times 10^8$ копий генома/мл в необработанных супернатантах

данной культуры клеток после инфицирования без последующей дополнительной обработки.

[00269] В конкретном варианте осуществления вырабатывающая вирус клетка согласно изобретению характеризуется тем, что клетка включает одну или несколько экспрессионных кассет для экспрессии по меньшей мере одного из генов, выбранных из группы, к которой относятся гены *n*, *l*, *p* и *m*, кодирующие белки N, L, P и M VSV, и ген *gp*, кодирующий гликопротеин LCMV-GP, Dandenong-GP или Mopeia-GP.

[00270] Вырабатывающие вирус клетки с точки зрения изобретения включают классические упаковывающие клетки для вырабатывания рекомбинантного рабдовируса из нереплицируемых векторов, а также вырабатывающих клеток для выработки рекомбинантного рабдовируса из векторов, способных к воспроизводству. Упаковывающие клетки обычно включают одну или несколько плазмид для экспрессии существенных генов, отсутствующих в соответствующем векторе для упаковки и/или необходимых для выработки вируса. Такие клетки известны специалистам в данной области, которые могут выбрать соответствующие линии клеток, подходящие для нужной цели.

[00271] Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вырабатывают в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, включающими, помимо прочих (1) применение кДНК, трансфицированных в клетку, или (2) комбинацию кДНК, трансфицированных в хелперную клетку, или (3) кДНК, трансфицированные в клетку, которую затем инфицируют хелпером / минивирусом, обеспечивающим транс-активность остальных компонентов или активность, необходимую для выработки инфекционного или неинфекционного рекомбинантного рабдовируса. При применении любого из этих способов (например, хелпера / минивируса, линии хелперных клеток или только трансфекции кДНК) минимальными необходимыми компонентами являются молекула ДНК, содержащая цис-действующие сигналы для (1) капсидирования геномной (или антигеномной) РНК N-белком, Р-белком и L-белком рабдовируса и (2) репликации эквивалента геномной или антигеномной РНК (промежуточного продукта репликации).

[00272] Реплицирующий элемент или репликон представляет собой нить РНК, минимально содержащую на 5' и 3' концах лидерную последовательность и

трейлерную последовательность рабдовируса. С геномной точки зрения лидер находится на 3' конце, а трейлер находится на 5' конце. Любая РНК, расположенная между этими двумя сигналами репликации, в свою очередь будет реплицирована. Лидерный и трейлерный участки также должны содержать минимальные цис-действующие элементы для капсидирования N-белком и для связывания полимеразы, которые необходимы для инициации транскрипции и репликации. Для получения рекомбинантного рабдовируса минивирус, содержащий G-ген, также должен содержать лидерный участок, трейлерный участок и G-ген с соответствующими сигналами инициации и терминации для выработки мРНК G-белка. Если минивирус также включает M-ген, также должны присутствовать сигналы инициации и терминации для выработки мРНК M-белка.

[00273] Для любого гена, содержащегося в геноме рекомбинантного рабдовируса, ген должен быть фланкирован соответствующими сигналами инициации и терминации транскрипции, которые обеспечивают возможность экспрессии этих генов и выработки белковых продуктов (Schnell et al., Journal of Virology, p. 2318 - 2323, 1996). Для выработки "неинфекционного" рекомбинантного рабдовируса рекомбинантный рабдовирус должен иметь минимальные репликонные элементы и N-, P- и L-белки и должен содержать M-ген. Это позволяет вырабатывать вирусные частицы, почкующиеся из клетки, но являющиеся неинфекционными частицами. Для выработки "инфекционных" частиц вирусные частицы должны дополнительно включать белки, которые могут опосредовать связывание и слияние вирусных частиц, например, через применение стыковочного белка или рецепторного лиганда. Нативный рецепторный лиганд рабдовирусов представляет собой G-белок.

[00274] Может быть использована любая клетка, обеспечивающая возможность сборки рекомбинантного рабдовируса. Один способ получения инфекционных вирусных частиц включает инфицирование соответствующей линии клеток плазмидой, кодирующей РНК-полимеразу T7 или другую подходящую полимеразу бактериофага, такую как полимеразы T3 или SP6. Затем клетки могут быть трансфицированы отдельной кДНК, содержащей гены, кодирующие G-, N-, P-, L- и M-белки рабдовируса. Эти кДНК обеспечивают белки для построения частиц рекомбинантного рабдовируса. Клетки могут быть трансфицированы любым способом, известным специалистам в данной области.

[00275] Также в линию клеток трансфицируют "полицистронную кДНК", содержащую эквивалент геномной РНК рабдовируса. Если частица инфекционного рекомбинантного рабдовируса должна быть литической в инфицированной клетке, должны присутствовать гены, кодирующие N-, P-, M- и L-белки, а также любой гетерологичный сегмент нуклеиновой кислоты. Если не предполагается, чтобы частица инфекционного рекомбинантного рабдовируса была литической, ген, кодирующий M-белок не включают в полицистронную ДНК. Под "полицистронной кДНК" следует понимать кДНК, включающую по меньшей мере транскрипционные единицы, содержащие гены, которые кодируют N-, P- и L-белки. Полицистронная ДНК рекомбинантного рабдовируса также может содержать ген, кодирующий вариант белка или его полипептидный фрагмент или терапевтическую нуклеиновую кислоту или белок. В альтернативном варианте может обеспечиваться любой транс-активный белок, который изначально должен быть ассоциирован с первой выработанной вирусной частицей или ее фрагментом.

[00276] Также предусматривается полицистронная кДНК, включающая ген, кодирующий CCL21. Предусмотренная полицистронная кДНК может содержать ген, кодирующий вариант белка, ген, кодирующий репортер, терапевтическую нуклеиновую кислоту, и/или N-P-L-гены или N-P-L-M-гены. Первым этапом в выработке рекомбинантного рабдовируса является экспрессия РНК, которая является геномным или антигеномным эквивалентом из кДНК. Затем эту РНК упаковывают N-белком, после чего реплицируют P/L белками. Выработанный таким образом рекомбинантный вирус может быть извлечен. Если G-белок отсутствует в рекомбинантном геноме РНК, его обычно обеспечивают в транс-активной форме. Если отсутствуют и G-, и M- белки, они оба обеспечиваются в транс-активной форме. Для получения частиц "неинфекционного рабдовируса" процедура может быть такой же, как указано выше, за исключением того, что полицистронная кДНК, трансфицированная в клетки, должна содержать только N-, P- и L-гены рабдовируса. Полицистронная кДНК частиц неинфекционного рабдовируса дополнительно может содержать ген, кодирующий белок.

[00277] Трансфицированные клетки обычно инкубируют в течение по меньшей мере 24 ч при нужной температуре, как правило, приблизительно 37 градусов. Для частиц неинфекционного вируса собирают супернатант и выделяют частицы вируса. Для частиц инфекционного вируса супернатант,

содержащий вирус, собирают и переносят в свежие клетки. Свежие клетки инкубируют в течение приблизительно 48 часов и супернатант собирают.

[00278] Другие особенности и преимущества настоящего изобретения станут очевидными по ознакомлении с представленными ниже подробными

5 Примерами, которые поясняют принципы изобретения.

[00279] **ПРИМЕРЫ**

[00280] **Пример 1**

[00281] Вызывание / активация иммунной инфильтрации и экспрессия иммунной контрольной точки в инфицированных VSV-GP опухолях

10 [00282] Анализ экспрессии / NanoString (ФИГ. 1)

[00283] Для лучшего понимания влияния терапевтического вмешательства с инфильтрацией иммунных клеток платформы VSV-GP (Т-клетки: CD3 эпсилон, CD4 и CD8) активацию (CD69, Granzyme B (GzmB) и Perforin (Prfl)), а также экспрессию в иммунных контрольных точках (PD-L1 (CD274), PD-1 (Pdc1),
15 Ctl4-4, Tigit и Lag3) анализировали в контрольных или инфицированных VSV-GP опухолях. Для этого C57BL/6 мышей с развившимися опухолями LLC1-IFNARKO (LLC1 опухолевые клетки с делетированным рецептором пегинтерферона альфа) использовали в качестве контрольных или обрабатывали путем однократной внутривенной инъекции 1×10^8 TCID₅₀ VSV- GP. Через семь
20 дней после обработки опухоли вырезали; полную РНК извлекали и анализировали с применением программы “Pan Cancer Immune Profiling Panel” от NanoString в соответствии с инструкциями производителя. Как показано на ФИГ. 1, Результатом обработки VSV-GP была сильная повышающая регуляция экспрессии анализируемых генов, включая гены PD- L1 и PD-1.

25 [00284] **Пример 2**

[00285] Эффективность: VSV-GP в комбинации с анти-PD-1

[00286] Рост опухоли (ФИГ. 2А - D)

[00287] На основе клинического успеха блокирующих антител PD-1 соотв. PD-L1 у онкологических пациентов и наших собственных данных (см. ФИГ. 1),
30 показывающих, что лечение с применением платформы VSV-GP в результате приводит к активации инфильтрирующих опухоль Т-клеток, в тесной связи с повышающей регуляцией иммунных контрольных точек, таких как PD-1 и PD-L1 терапевтический потенциал комбинирования производных от VSV-GP терапевтических средств с блокирующим PD-1 антителом анализировали с

использованием модели опухоли CT26.CL25-IFNARKO (опухолевые клетки CT26.CL25 с делетированным рецептором пегинтерферона альфа).

[00288] Показатели приживления введенных путем подкожной инъекции CT26Cl25 IFNAR-/- опухолевых клеток составляли 100 % (50 / 50 мышей). На 8-й день (день применения вируса) медианный размер опухоли составлял 0,05 см³. Рост опухоли отслеживали с 60-дневным интервалом. Имитационные (=необработанные) контрольные образцы демонстрировали 10 % спонтанную ремиссию (1 / 10), и одна опухоль разрасталась значительно медленнее. Среди мышей, получавших лечение с применением только VSV-GP внутривенно, у 30 % (3 / 10 мышей) наблюдали полную ремиссию. Лечение с применением только PD-1, начатое на 11-й день после приживления, не имело воздействия на рост опухоли. Комбинация VSV-GP с анти-PD-1 обеспечивала высокие показатели ремиссии опухоли. Полную ремиссию наблюдали у 70 % (7 / 10 мышей) при применении анти-PD-1 после лечения VSV-GP. Отсутствие опухоли сохранялось у мышей в течение по меньшей мере 60 дней. В целом высокие показатели выживаемости были достигнуты в комбинированных группах (не показано).

[00289] Пример 3

[00290] Формирование памяти: VSV-GP и комбинация VSV-GP/анти-PD-1

[00291] Рост опухоли / повторное назначение (ФИГ. 3А - С)

[00292] Мыши, прошедшие лечение в экспериментах с применением комбинации VSV-GP/анти-PD-1, были защищены от повторного назначения. Мышей из групп, получавших комбинацию VSV-GP / анти-PD-1 (n=7) или только VSV-GP (низкая доза, n=3), подвергали повторному назначению. То есть, клетки CT26Cl25 IFNAR-/- вводили мышам путем подкожной инъекции в левый бок и наблюдали рост опухоли со временем. В качестве положительного контроля подобранным по возрасту и полу интактным мышам (n=10) подкожно вживляли CT26Cl25 IFNAR-/-, и опухоли неизменно разрастались, с одной спонтанной ремиссией, как наблюдалось ранее. Разрастание опухоли не наблюдали в группе, получавшей комбинацию VSV-GP/анти-PD-1 (n=7) или группе, получавшей только VSV-GP (низкая доза, n=3), что указывало на то, что у подвергнутых лечению мышей развивалась определенная иммунологическая память.

[00293] Пример 4

[00294] Выбор карго CCL21 и вызванная VSV-GP экспрессия хемокина в опухолях

[00295] Анализ экспрессии NanoString® (ФИГ. 4)

5 **[00296]** Влияние терапевтического вмешательства с применением платформы VSV-GP в доклинических опухолевых моделях анализировали путем измерения экспрессии множественных хемокинов (ФИГ. 4). Экспрессия CCL5, CXCL9, CXCL10 и других хемокинов сильно повышалась в опухолях LLC1-IFNARKO через 3 соотв. 7 дней после однократного внутривенного введения 10 1×10^8 TCID₅₀ VSV-GP. С другой стороны, экспрессия лигандов CCR7 CCL19 и CCL21 не повышалась инфекцией VSV-GP.

[00297] Пример 5

[00298] Образование рекомбинантов VSV-CCL21

[00299] Спасение вируса (ФИГ. 5)

15 **[00300]** На основе данных, описанных в Примере 4, геном онколитического вирус VSV-GP подвергали инженерии для кодирования гена CCL21 (см. ФИГ. 5) для местной экспрессии хемокина CCL21 в месте опухоли во время вирусной репликации и для заполнения “иммунотерапевтического пропуска” VSV-GP (VSV-GP не был способен на повышающую регуляцию лигандов CCR7 CCL19 и 20 CCL21) и дополнительного улучшения инфильтрации иммунных клеток, а также терапевтической эффективности онколитического вируса VSV-GP.

[00301] Варианты репликационно-компетентного вируса VSV-GP-CCL21 получали при помощи обратной генетики (клонирование требуемого гена (GOI), спасения вируса и повторного клонирования с помощью бляшкообразования) из 25 бактериальных плазмид, содержащих кДНК для полного вирусного генома VSV-GP и вариантов мышиного или человеческого CCL21. Плазмиды pVSV-GP-CCL21 были получены на основе плазмиды pVSV-XN1 (Schnell et al.), которая содержит полный геном кДНК серотипа VSV Indiana под контролем промотора T7. Для выработки вариантов pVSV-GP-CCL21 полную последовательность для 30 оболочечного G-белка VSV замещали кодон-оптимизированной последовательностью оболочечного GP- белка из вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV, штамм WE-HPI). Кроме того, синтетическую нуклеиновую кислоту, кодирующую ген CCL21, вставляли между гликопротеином GP и вирусной полимеразой L путем сборки Гибсона.

Транскрипцию гена CCL21 в контексте вирусной инфекции обеспечивают при помощи дополнительной старт-сигнальной последовательности VSV на 3' конце и дополнительной стоп-сигнальной последовательности на 5' конце открытой рамки считывания CCL21 (Фиг. 5А).

5 **[00302]** Инфекционные вирусы извлекали (или спасали) из плазмидных кДНК путем трансфекции HEK293Т или любой другой допустимой линии клеток VSV стандартными способами трансфекции (например, осаждения CaPO_4 , доставки липосомальной ДНК). То есть, клетки HEK293Т трансфицировали экспрессионными плазмидами на основе pSF-CAG-amp, кодирующими VSV-
10 белки N, Р и L, а также кодон-оптимизированную Т7-полимеразу. Кроме того, котрансфицировали плазмиду, кодирующую вирусную геномную кДНК VSV-GP, VSV-GP-CCL21 или ее вариант (ФИГ. 5В). На первом этапе процесса спасения Т7 полимеразы транскрибирует геномную РНК вируса из кодируемой плазмидой вирусной кДНК. На втором этапе белки VSV-L и -Р, которые экзогенно
15 экспрессируются из котрансфицированных плазмид, дополнительно амплифицируют вирусные геномные РНК. Вирусные геномные РНК котранскрипционно инкапсидируются белком VSV-N. Кроме того, комплекс Р/Л полимеразы позволяет осуществлять транскрипцию полного набора вирусных генных продуктов N, Р, М, GP и L, а также вставленных вариантов CCL21. Затем
20 вирусные геномные РНК упаковывают в инфекционные частицы VSV, содержащие рибонуклеопротеин, матриксный белок и вирусный оболочечный GP. Вирусные частицы высвобождаются из клеток путем бадинга.

[00303] Спасенные вирусы сначала пересеивали на допустимые линии клеток, такие как HEK293Т, ВНК21С1.13 или VERO. Выполняли несколько
25 циклов клонирования с помощью бляшкообразования перед образованием вирусного посевного материала стандартными способами. То есть, HEK293Т, ВНК21С1.13 или клетки Vero инфицировали путем серийных десятикратных разведений спасенного предварительного посевного материала. Приблизительно через два часа монослой клеток дважды промывали и покрывали средой,
30 содержащей 0,8 % легкоплавкой агарозы. Через 24 - 48 ч после инфицирования бляшки собирали и вирус использовали для дополнительного цикла клонирования с помощью бляшкообразования или создавали вирусный посевной материал.

[00304] Пример 5.1**[00305]** Подтверждение репликативной способности вируса *in vitro***[00306]** TCID₅₀ (ФИГ. 19А - С)

[00307] За день до инфицирования клетки Vero, ВНК21 и НЕК293 высевали в 6-луночные планшеты. Соответствующими культуральными средами были: (а) клетки Vero: DMEM (Gibco, #31966-021) + 5 % инактивированная нагреванием FBS (Gibco, #10500-064), (б) клетки ВНК21: GMEM (Life Technologies, #21710-082/025) + 10 % инактивированная нагреванием ФБС (Gibco, #10500-064) + 5 % ТРВ – триптозо-фосфатный бульон (Life Technologies, #18050-039), (в) клетки НЕК293: Freestyle™ 293 экспрессионная среда (ThermoFisher Scientific, #12338018).

[00308] В день инфицирования все линии клеток имели конфлюентность 60 - 70 %. Подсчет производили на одной лунке с каждой линии клеток (счетчик клеток Countess™, Invitrogen) перед инфицированием других лунок 0,005 MOI одного из вирусных конструкторов VSV-GP (GP), VSV-GP-huCCL21 (21) или VSV-GP-huCCL21(1-79) (21k).

[00309] Супернатанты культур (общим объемом 3 мл) собирали через 0 ч, 24 ч или 48 ч после инфицирования для определения способности к репликации вируса путем измерения TCID₅₀/мл.

[00310] TCID₅₀ (медианную инфекционную дозу тканевой культуры) определяли на 96-луночных планшетах клеток Vero, которые высевали за день до инфицирования. Из всех супернатантов приготавливали двадцать два серийных полулогарифмических разведения (от 1E-1,0 до 1E-11,5) и титровали в четырех одинаковых испытаниях. Через шесть дней после инфицирования цитопатический эффект (ЦПЭ) считывали путем микроскопического исследования планшетов.

[00311] TCID₅₀/мл рассчитывали согласно формуле Спирмана-Кербера $M = x + d [0,5 - (1/n) (r)]$, где x: положительная степень наибольшего испытываемого разведения; d = интервал между разведениями; n = лунок на разведение; r = сумма количества отрицательных ответов.

[00312] Пример 5.2**[00313]** Экспрессия карго *in vitro***[00314]** ELISA / вестерн-блоттинг (ФИГ. 6А - В и ФИГ. 12А - В, и ФИГ. 18)

[00315] Для подтверждения и количественного определения экспрессии вирусных карго CCL21 (трансгенов), а также для лучшей характеристики различных вариантов CCL21 проводили CCL21-специфические анализы ELISA, а также вестерн-блоттинг. Как показано на ФИГ. 6А и ФИГ. 12А, супернатанты из инфицированных VSV-GP-мю-CCL21 (ФИГ. 6А; VSV-GP, экспрессирующий полноразмерный мышинный CCL21) клеток НЕК293 или VSV-GP-huCCL21 (ФИГ. 12А; VSV-GP, экспрессирующий полноразмерный человеческий CCL21), соответственно, анализировали в разные моменты времени после вирусной инфекции с применением ELISA-анализов, специфичных к мышинным и соотв. человеческим CCL21. Кроме того, характеризовали варианты человеческого CCL21, т. е., полноразмерного человеческого CCL21 и усеченного на с-конце варианта, подобного первым 79 аминокислотам (без сигнальной последовательности) человеческого CCL21 = CCL21 (1-79) с применением специфичного к человеческому CCL21 вестерн-блоттинга. Как показано на ФИГ. 18 (слева), анализировали супернатанты из трансфицированных плазмидой клеток НЕК293, которые кодируют CCL21(1-79) или полноразмерные белки CCL21, а также супернатанты из клеток НЕК293, инфицированных указанными вирусами. Варианты хемокина хорошо экспрессировались в обеих системах (плазмидной и вирусной). Если образцы полноразмерных CCL21 содержали множество видов CCL21, соответственно продукты распада / расщепления белка CCL21 (1-79) были представлены как одна чистая полоса.

[00316] Пример 5.3**[00317]** Активность карго *in vitro***[00318]** Transwell (Т-клетки/DC) (ФИГ. 6А, 12А, 16 и 17)

[00319] Для подтверждения и дополнительной характеристики биологической функциональности вирусных карго CCL21 (трансгенов) их способность к привлечению Т-клеток или дендритных клеток моноцитарного происхождения (moDC) анализировали путем анализа миграции Transwell. Для этого мышинный и человеческий CCL21, содержащие супернатанты, соответственно описанные в Примере 5.2 (ФИГ. 6А и 12А), только миграционную среду (фоновый контроль), рекомбинантный CCL21

(положительный контроль) или соответствующие супернатанты из инфицированных VSV-GP клеток HEK293 (VSV-GP фоновый контроль) добавляли в нижнюю лунку установки для анализа миграции Transwell и в верхнюю камеру добавляли стимулированные CD3/28 мышинные (Фигура 6; справа) или человеческие (Фигура 12; справа) Т-клетки (вставка Transwell). После инкубации клетки в нижней лунке подсчитывали при помощи анализа жизнеспособности клеток Promega® CellTiter-Glo®. Результаты показаны как “кратное увеличение” относительно контроля, состоящего только из миграционной среды. Дальнейшие эксперименты включали короткий вариант карго CCL21, CCL21(1-79) (аминокислоты 1-79 человеческого CCL21) и самый короткий встречающийся в природе фрагмент CCL21, возникающий в результате опосредованной плазмином обработки; CCL21(1-81) (аминокислоты 1 - 81 человеческого CCL21) с применением вышеописанных анализов (см. ФИГ. 15). Для этого образовывали и анализировали супернатанты из трансфицированных экспрессионной плазмидой клеток HEK293 (см. ФИГ. 16). На последнем этапе сравнивали супернатанты из инфицированных VSV-GP, VSV-GP-huCCL21 (полноразмерный) и VSV-GP-huCCL21(1-79) клеток HEK293, применяя описанный выше анализ миграции Transwells и moDC в качестве реагирующих клеток. В этом анализе и полноразмерный человеческий CCL21, и CCL21 (1-79) демонстрировали сравнимую миграцию moDC (см. ФИГ. 17).

[00320] Пример 5.4

[00321] Межвидовая перекрестная реактивность (человек – мышь и крыса) *in vitro*

[00322] Transwell (Т-клетки) (ФИГ. 13)

[00323] Для подтверждения межвидовой перекрестной реактивности человеческого CCL21 с рецептором CCL21 мыши и крысы (CCR7) применяли вышеописанный анализ миграции Transwell с мышинными (слева) или крысиными (справа) Т-клетками в качестве респондеров (см. ФИГ. 13). Анализы миграции выполняли с использованием человеческого в сравнении с мышинным (слева) и человеческого в сравнении с крысиным (справа) рекомбинантных хемокинов в указанной концентрации (нижняя лунка). Таким образом, человеческий CCL21 был так же активен в мышинной и крысиной системе, как и соответствующие мышинные и крысиные хемокины, соответственно, что

указывает на то, что человеческая молекула может быть испытана в доклинических моделях грызунов (мыши / крысы).

[00324] Пример 6:

[00325] Карго CCL21 экспрессия *in vivo*

5 **[00326]** РНКсек (ФИГ. 10)

[00327] Экспрессию кодируемого вирусом CCL21 анализировали / подтверждали в опухолях грызунов в контрольных или инфицированных VSV-GP соотв. VSV-GP-мю-CCL21 опухолях. Для этого мышей C57BL/6 с развившимися опухолями LLC1-IFNARKO использовали в качестве
10 контрольных или подвергали лечению путем однократной внутривенной инъекции 1×10^8 TCID₅₀ VSV-GP или VSV-GP-мю-CCL21. Через семь дней после обработки опухоли вырезали; полную РНК извлекали и анализировали с применением РНКсек. Для сравнения использовали CD3-эпсилон и CXCL10. Кодируемый вирусом CCL21 специфически обнаруживали, используя кодон-
15 оптимизированную последовательность ДНК в качестве выборки (см. ФИГ. 10).

[00328] Пример 6.1:

[00329] Отсутствие нейротоксичности VSV-GP и VSV-GP-CCL21

[00330] Выживаемость (ФИГ. 11)

[00331] Инфекции VSV дикого типа могут вызывать неврологические
20 симптомы, когда вирус получает доступ к головному мозгу. К этим неврологическим осложнениям относятся тяжелый энцефалит, который может приводить к смерти инфицированного субъекта. Преимущество использования химерного VSV-GP состоит в том, что нейрональная инфекция почти полностью отсутствует, благодаря чему VSV-остов становится безопасным онколитическим
25 агентом. Считается, что причиной аттенюированного фенотипа является измененный тропизм вируса, которому способствует вирусный оболочечный гликопротеин. Хотя нейрональная инфекция и распространение VSV-GP в головном мозге не наблюдается, остается невыясненным, полностью ли отсутствует экспрессия вирусного гена в других типах клеток, таких как,
30 например, глиальные клетки или астроциты. Случайная экспрессия трансгена CCL21 под действием VSV GP может привлечь иммунные клетки, вызывающие неблагоприятные эффекты в головном мозге, и поэтому осуществляли оценку нейротоксичности VSV-GP-мю-CCL21.

[00332] Швейцарские мыши CD-1 получали однократную внутривенную инъекцию 3 мкл, содержащую 1×10^6 TCID₅₀, через стереотаксическую инъекцию в правый стриатум. PBS вводили в/к в контрольной группе. Животных наблюдали ежедневно на наличие признаков нейротоксичности и общее состояние. Графики выживаемости мышей в экспериментальных группах, получавших PBS (точки), VSV-G DsRed (ромбы), VSV-GP (квадраты) и VSV-GP-мю-CCL21 строили как кривые Каплана-Мейера (ФИГ. 11В). Анализ кривой Каплана-Мейера указывает, что ни один из испытанных вариантов вируса не демонстрировал нейротоксичности у мышей. Только в контрольной группе VSV-G DsRed, которая содержала гликопротеин VSV дикого типа на поверхности вируса, была обнаружена повышенная потеря веса (ФИГ. 11А) и развивались неврологические признаки, которые привели к эвтаназии в течение первой недели после в/к инфицирования.

[00333] Пример 6.2

[00334] *In vivo* эффективность VSV-GP и VSV-GP-CCL21

[00335] Рост опухоли (ФИГ. 14)

[00336] Терапевтический потенциал VSV-GP и VSV-GP-huCCL21 оценивали / сравнивали с использованием модели опухоли CT26.CL25-IFNARKO. Для этого развившиеся опухоли лечили с применением двух в/в инъекций (день 0 и 3) 2×10^7 TCID₅₀ VSV-GP или VSV-GP-huCCL21. Выживаемость мышей, получавших указанное лечение, показана на ФИГ. 14.

[00337] Пример 6.3

[00338] *In vivo* эффективность VSV-GP-huCCL21 и VSV-GP-CCL21(1-79)

[00339] Рост опухоли / выживаемость (ФИГ. 20 / 21)

[00340] Терапевтический потенциал VSV-GP-huCCL21 и VSV-GP-huCCL21(1-79) оценивали / сравнивали с использованием модели опухоли CT26.CL25-IFNARKO. Для этого развившиеся опухоли лечили с применением двух в/в инъекций (день 0 и 3) 2×10^7 TCID₅₀ VSV-GP-huCCL21 или VSV-GP-huCCL21(1-79). Суммарный рост опухоли, а также 30-дневное выживание мышей, получавших указанное лечение, показаны на Фигуре 20 / 21. Лечение с применением короткого варианта CCL21 (CCL21(1-79)), который соответствовал полностью обработанной плазмином (без аминокислот 80 / 81) и свободно диффундирующей форме человеческого CCL21, позволяло лучше сдерживать

рост опухоли и улучшить выживаемость по сравнению с полноразмерным CCL21, несущим вариант VSV-GP.

[00341] Пример 6.4

5 **[00342]** МоА: Инфильтрация Т-клеток, вызываемая VSV-GP-huCCL21 и VSV-GP-huCCL21(1-79)

[00343] ИНС (ФИГ. 22 / 23)

10 **[00344]** Опухоли, которые лечили согласно Примеру 6.3, анализировали на инфильтрацию Т-клеток. Срезы опухоли FFPE окрашивали на наличие CD4 и CD8, а также VSV-N и расщепляющей каспазы 3. Подсчитывали общее количество Т-клеток (CD4+ & CD8+) в жизнеспособных (ненекротических) участках опухоли. Как показано на ФИГ. 22, короткий вариант CCL21 (CCL21(1-79)), соответствующий полностью обработанной плазмином (без аминокислот 80 / 81) и свободно диффундируемой форме человеческого CCL21, был способен привлекать больше Т-клеток в опухоль, что объясняло наблюдаемое повышение
15 эффективности (Пример 6.3).

[00345] Кроме того, вирусно-экспрессированный CCL21 был способен привлекать дендритные клетки (CD11с-положительные) в инфицированные опухоли CT26.CL25. В развившиеся опухоли CT26.CL25 по месту (интратуморально) вводили 2×10^7 TCID₅₀ VSV-GP или VSV-GP-мю-CCL21 в
20 день 0 и 3. Срезы FFPE соответствующих опухолей анализировали на инфильтрацию дендритных клеток (участки опухоли с активной вирусной репликацией = некротический край) (см. ФИГ. 24).

[00346] Пример 7

[00347] Эффективность: VSV-GP и VSV-GP-CCL21 в комбинации с SMACm

25 **[00348]** Рост / выживаемость опухоли (ФИГ. 7 - 9)

[00349] На основе обнадеживающих данных комбинации VSV-GP и блокирующего PD-1 антитела (Пример 2) испытывали дополнительные комбинации VSV-GP (ФИГ. 7 / 9) и VSV-GP-мю-CCL21 (ФИГ. 8 / 9) с миметиком SMAC (SMACm), модулятором путей клеточной смерти, который
30 повышает восприимчивость опухолевых клеток к вызывающим клеточную смерть раздражителям / агентам. Терапевтическое взаимодействие соединений анализировали с использованием модели опухоли CT26.CL25-IFNARKO. Для этого мышей Balb/c с развившимися опухолями CT26.CL25-IFNARKO подвергали лечению с однократным внутривенным введением 4×10^6 TCID₅₀

VSV-GP соотв. VSV-GP-мю-CCL21 и/или 100 мг/кг SMACm, который ежедневно вводили перорально в течение двухнедельного периода, начиная с того же дня, что и лечение с применением VSV-GP соотв. VSV-GP-мю-CCL21. Комбинация VSV-GP и SMACm в результате обеспечивала улучшенную эффективность по сравнению с соответствующей монотерапией. При сочетании VSV-GP-мю-CCL21 с SMACm комбинаторные эффекты были еще более выраженными, в результате чего было достигнуто излечение всех подвергнутых лечению животных.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный рабдовирус, кодирующий в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21.

2. Рекомбинантный рабдовирус по п. 1, отличающийся тем, что белок CCL21 или его функциональный вариант выбран из группы, к которой относятся:

- (I) обработанный плазмином белок CCL21,
- (II) усеченный на с-конце белок CCL21,
- (III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,
- (IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3,
- (V) белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 4,
- (VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную последовательность,
- (VII) белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, или
- (VIII) белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 5.

3. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. 1 или 2, который является везикуловиром.

4. Рекомбинантный рабдовирус по п. 3, где везикуловир выбран из группы, к которой относятся: вирус везикулярного стоматита Алагоас (VSAV), вирус Карахаса (CJSV), вирус Чандипура (CHPV), вирус Кокал (COCV), вирус везикулярного стоматита Индианы (VSIV), вирус Исфахана (ISFV), вирус Мараба (MARAV), вирус везикулярного стоматита Нью-Джерси (VSNJV) или вирус Пири (PIRYV).

5. Рекомбинантный рабдовирус по п. 3, который является вирусом везикулярного стоматита, предпочтительно вирусом везикулярного стоматита Индианы (VSIV) или вирусом везикулярного стоматита Нью-Джерси (VSNJV).

5 6. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. 1 - 5, отличающийся тем, что рабдовирус является репликационно-компетентным.

7. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. 1 - 6, отличающийся тем, что рабдовирус

- 10 (I) лишен функционального гена, кодирующего гликопротеин G, и/или
(II) лишен функционального гликопротеина G.

8. Рекомбинантный рабдовирус по п. 7, отличающийся тем, что

- 15 (I) ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP другого вируса, и/или
(II) гликопротеин G заменен на гликопротеин GP другого вируса.

9. Рекомбинантный рабдовирус по п. 8, отличающийся тем, что

- 20 (I) ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP аренавируса, и/или
(II) гликопротеин G заменен на гликопротеин GP аренавируса.

10. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. 8 или 9, отличающийся тем, что

- 25 (I) ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса Dandenong или вируса Moreia, и/или
(II) гликопротеин G заменен на гликопротеин GP вируса Dandenong или вируса Moreia.

30 11. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. 7 - 9, отличающийся тем, что

- (I) ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или
(II) гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV.

12. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21 идентичности с SEQ ID NO: 2, выбранный из группы, к которой относятся:

(I) обработанный плазмином белок CCL21,
 (II) усеченный на с-конце белок CCL21,
 (III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

(IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3,

(V) белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 4,

(VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную последовательность,

(VII) белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1,

(VIII) белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 5,

причем ген, кодирующий гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV.

13. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 12, отличающийся тем, что геном кодирует обработанный плазмином белок CCL21.

14. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 12, отличающийся тем, что геном кодирует усеченный на с-конце белок CCL21.

15. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 12, отличающийся тем, что геном кодирует белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2.

16. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 12, отличающийся тем, что геном кодирует белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3.

5 17. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 12, отличающийся тем, что геном кодирует белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 4.

10 18. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 12, отличающийся тем, что геном кодирует белок, включающий белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную последовательность.

15 19. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 12, отличающийся тем, что геном кодирует белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1.

20 20. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 12, отличающийся тем, что геном кодирует белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 5.

25 21. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме по меньшей мере нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита и по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21.

30 22. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 21, отличающийся тем, что нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 7.

23. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 или 22, отличающийся тем, что фосфопротеин (P) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 8.

24. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 23, отличающийся тем, что большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 9.

25. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 24, отличающийся тем, что матриксный белок (M) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 10.

26. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 25, отличающийся тем, что:

- нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 7

- причем фосфопротеин (P) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 8

- причем большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 9, и

- матриксный белок (M) включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или функциональный

вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 10.

27. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 26, который является репликационно-компетентным.

28. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 27, который

- (I) лишен функционального гена, кодирующего гликопротеин G, и/или
- (II) лишен функционального гликопротеина G.

29. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 28, отличающийся тем, что

- (I) ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP другого вируса, и/или
- (II) гликопротеин G заменен на гликопротеин GP другого вируса.

30. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 29, отличающийся тем, что

- (I) ген, кодирующий гликопротеин G, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или
- (II) гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV.

31. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 30, отличающийся тем, что белок CCL21 или его функциональный вариант выбирают из группы, к которой относятся:

- (I) обработанный плазмином белок CCL21,
- (II) усеченный на с-конце белок CCL21,
- (III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,
- (IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3,
- (V) белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 4,

(VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную последовательность,

(VII) белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1,

5 (VIII) белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 5.

32. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в своем геноме нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P),
10 матриксный белок (M) и гликопротеин (G) вируса везикулярного стоматита и по меньшей мере один белок CCL21 или его функциональный вариант, предпочтительно человеческий CCL21, причем белок CCL21 или его функциональный вариант выбирают из группы, к которой относятся:

(I) обработанный плазмином белок CCL21,

15 (II) усеченный на с-конце белок CCL21,

(III) белок, включающий SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

(IV) белок, включающий SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3,

20 (V) белок, включающий SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 4,

(VI) белок согласно одному из подпунктов (I) – (V), также включающий сигнальную пептидную последовательность,

25 (VII) белок, включающий SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1,

(VIII) белок, включающий SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 5,

причем ген, кодирующий гликопротеин G вируса везикулярного стоматита, заменен на ген, кодирующий гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен на гликопротеин GP LCMV, и причем

- нуклеопротеин (N) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 7

- причем фосфопротеин (P) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 8

5 - причем большой белок (L) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 9

- матриксный белок (M) включает аминокислоту, представленную в SEQ ID NO: 10, или функциональный вариант, по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % идентичный SEQ ID NO: 10.

10

33. Фармацевтическая композиция, характеризующаяся тем, что композиция включает рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. 1 - 20 или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 32.

15 34. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. 1 - 20, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 32 или фармацевтическая композиция по п. 33 для применения в качестве медикамента.

20 35. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. 1 - 20, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 21 - 32 или фармацевтическая композиция по п. 33 для применения в лечении рака, предпочтительно солидного рака.

25 36. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по п. 35, отличающиеся тем, что солидный рак выбирают из списка, включающего: опухоль органов репродуктивной системы, опухоль яичника, опухоль яичка, эндокринную опухоль, желудочно-кишечную опухоль, опухоль поджелудочной железы, опухоль печени, опухоль почки, опухоль толстой кишки, колоректальную опухоль, опухоль мочевого пузыря, опухоль предстательной железы, кожную опухоль, меланому, опухоль дыхательных путей, опухоль легких, опухоль молочной железы, опухоль головы и шеи, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ) и накостную опухоль.

30

37. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. 34 - 36, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция
5 предназначена для введения интратуморально или внутривенно.

38. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. 35 - 37, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный
10 вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция предназначена для введения по меньшей мере один раз интратуморально, а затем внутривенно.

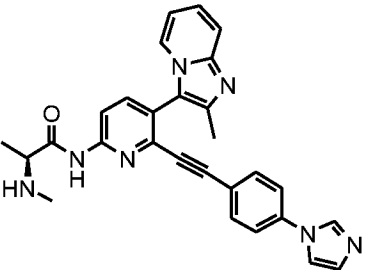
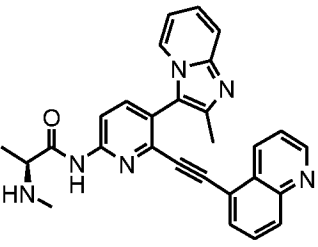
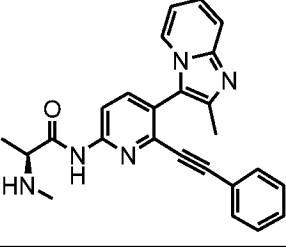
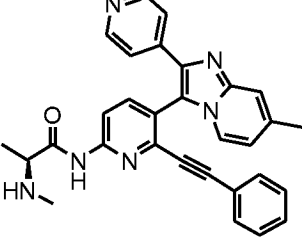
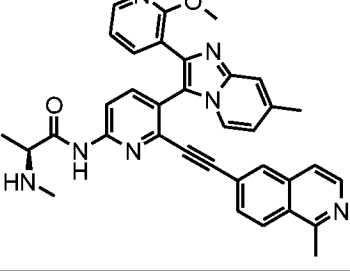
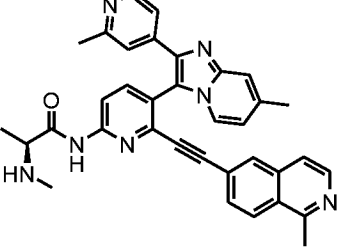
39. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного
15 стоматита или фармацевтическая композиция для применения по п. 38, отличающиеся тем, что последующее внутривенное введение осуществляют через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дня, 13 дня, 14 дня, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20
20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после первоначального интратуморального введения.

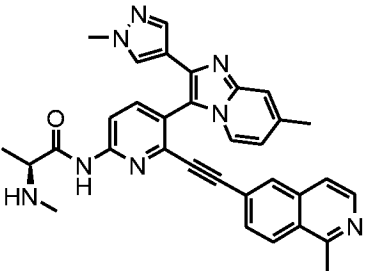
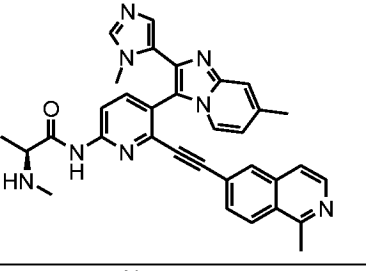
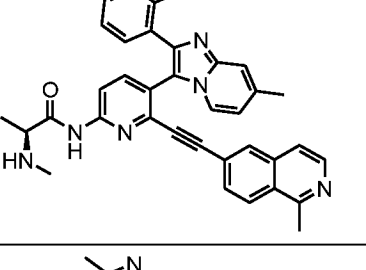
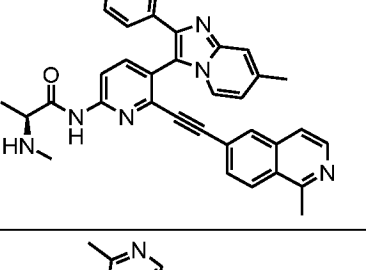
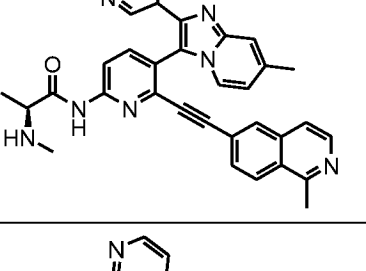
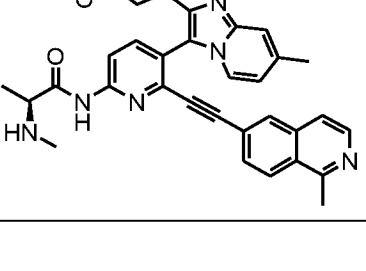
40. Композиция, включающая рекомбинантный рабдовирус или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из предыдущих пунктов, а также ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC.
25

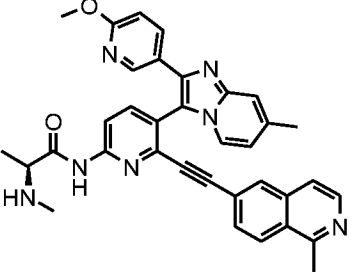
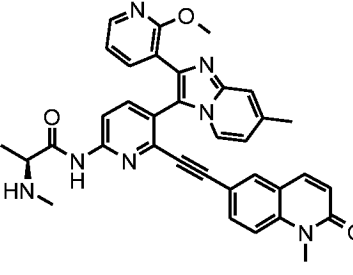
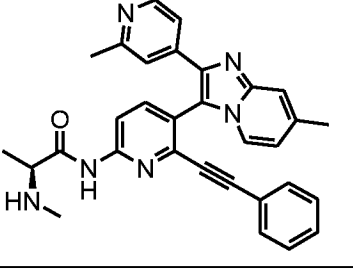
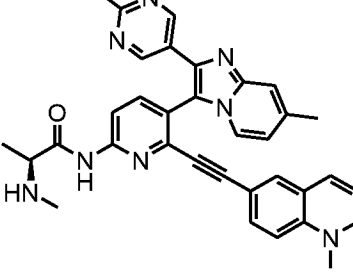
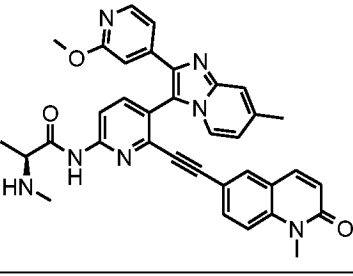
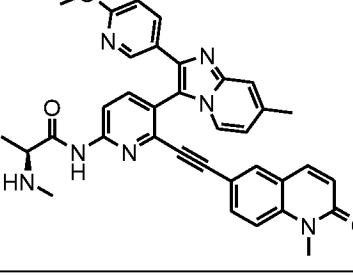
41. Композиция по п. 40, отличающаяся тем, что ингибитором пути PD-1 является антагонистическое антитело, направленное против PD-1 или PD-L1.

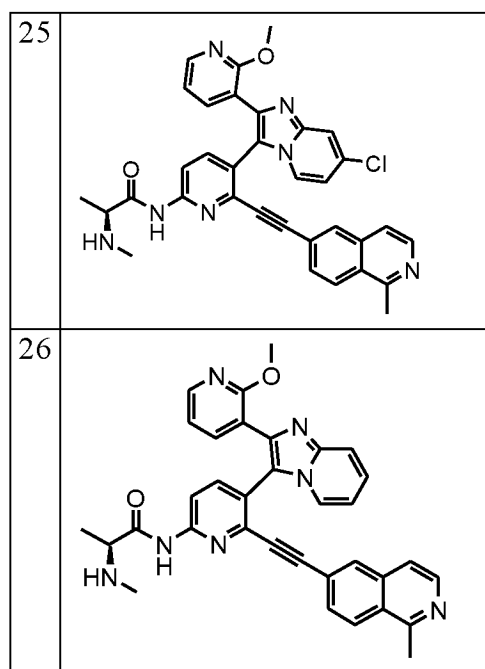
42. Композиция по п. 40, отличающаяся тем, что миметик SMAC выбран из группы, состоящей из любого из соединений с 1 по 26:

1	
2	
3	
4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	
11	
12	

13	
14	
15	
16	
17	
18	

19	
20	
21	
22	
23	
24	



или фармацевтически приемлемой соли одного из этих соединений.

43. Композиция по п. 40, отличающаяся тем, что ингибитором пути PD-1 является антагонист, выбранный из группы, к которой относятся пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, PDR-001, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5.

44. Комплект из частей, включающих:

а) рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию по любому из предыдущих пунктов, и

б) ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC по любому из предыдущих пунктов.

45. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. 34 - 36 в комбинации с ингибитором пути PD-1 или миметиком SMAC.

46. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по п. 45, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус

везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию вводят одновременно, последовательно или поочередно с ингибитором пути PD-1 или миметиком SMAC.

5 47. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по пунктам 45 или 46, отличающиеся тем, что миметик SMAC выбирают из группы, состоящей из любого из соединений с 1 по 26 по п. 42 или фармацевтически приемлемой соли одного из этих соединений.

10 48. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по пунктам 45 или 46, отличающиеся тем, что ингибитор пути PD-1 выбирают из группы, состоящей из пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба, атезолизумаба, 15 авелумаба, дурвалумаба, PDR-001, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5.

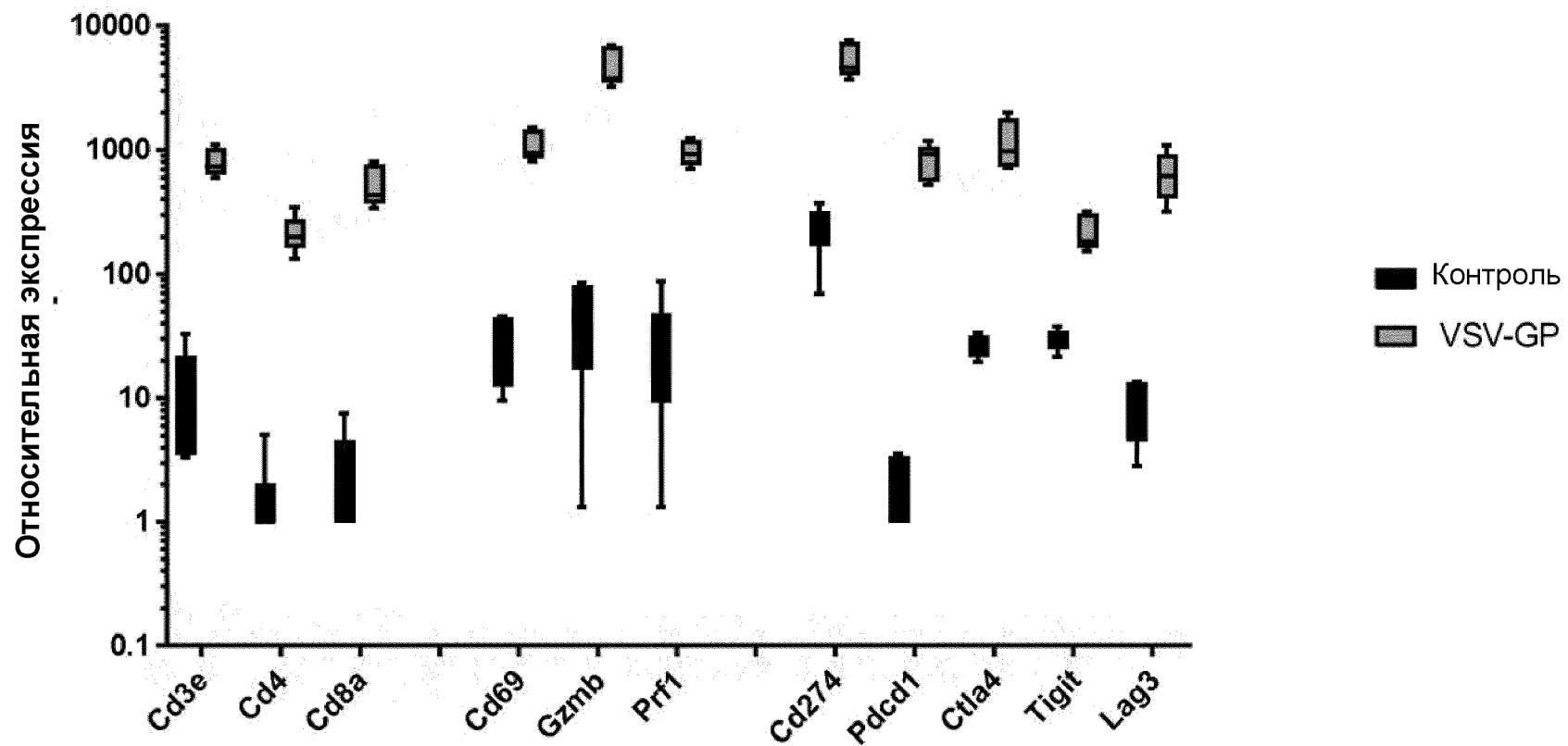
 49. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. 45 - 47, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный 20 вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию вводят другим способом введения, чем ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC.

 50. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. 25 45 - 47, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию вводят по меньшей мере один раз интратуморально и ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC вводят внутривенно.

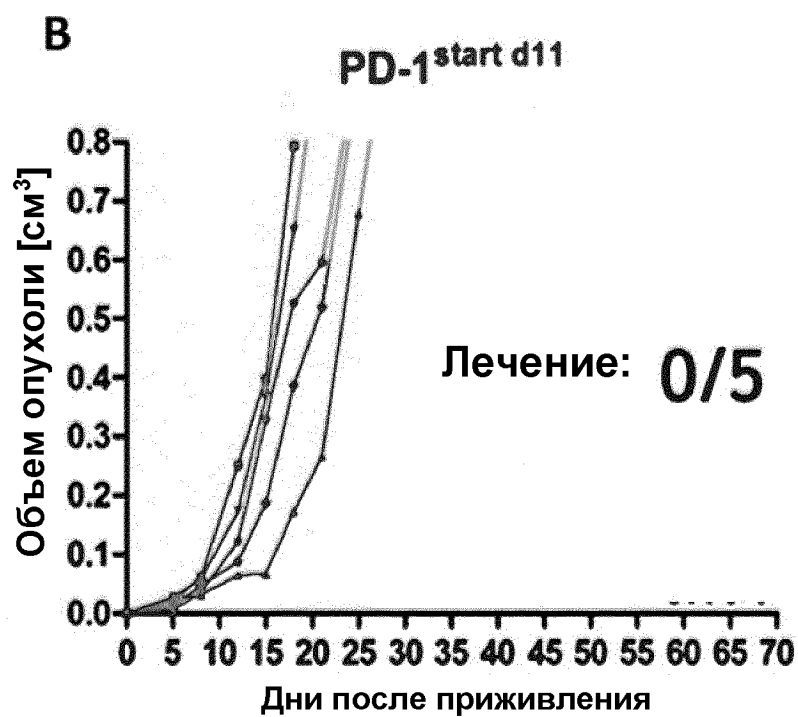
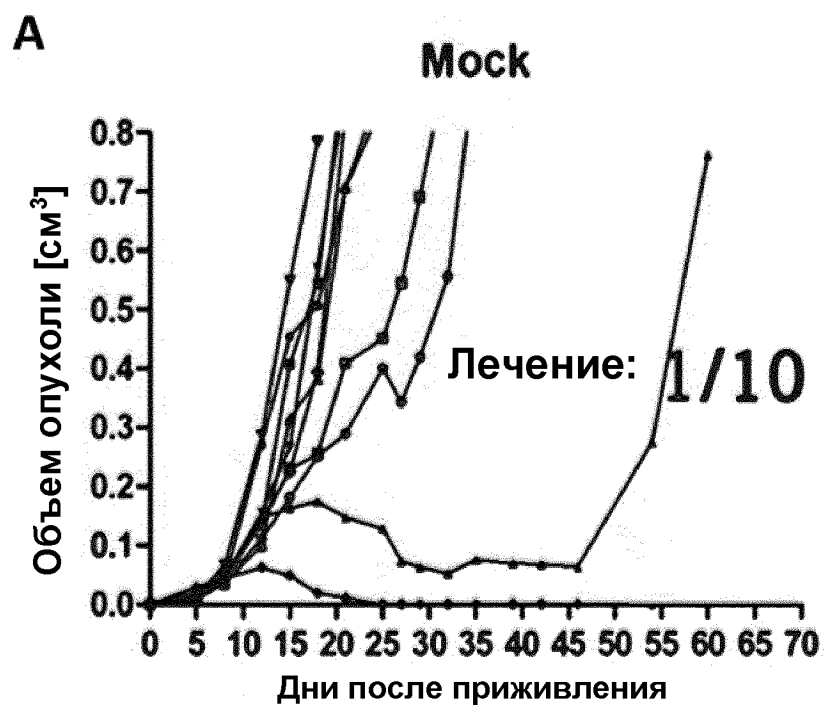
30 51. Вырабатывающая вирус клетка, отличающаяся тем, что клетка вырабатывает рекомбинантный рабдовирус или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из предыдущих пунктов.

52. Вырабатывающая вирус клетка по п. 51, отличающаяся тем, что клеткой является клетка Vero, клетка НЕК, клетка НЕК293, клетка яичника китайского хомячка (СНО) или клетка почки новорожденного хомяка (ВНК).

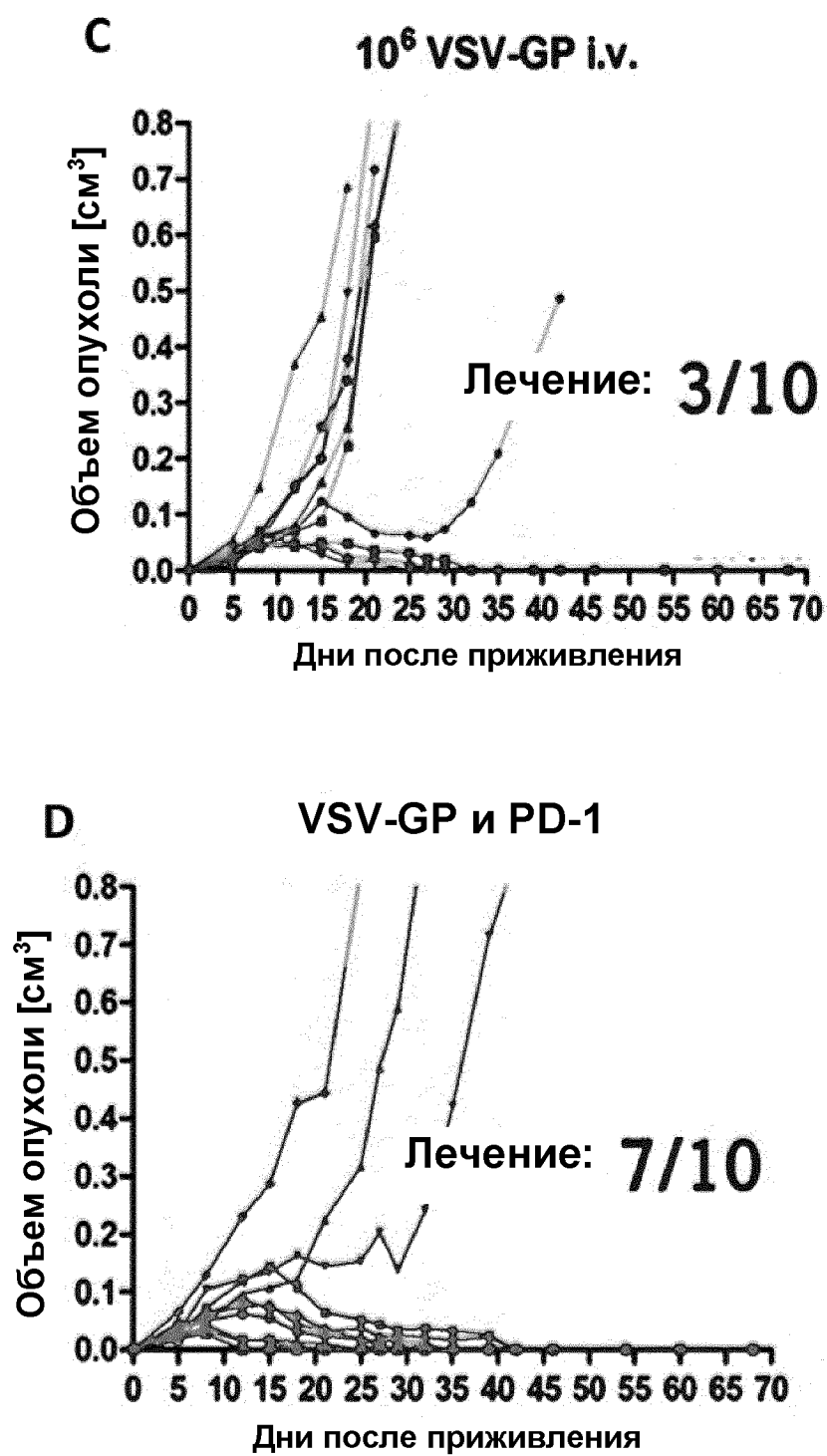
5 53. Рекомбинантный рабдовирус, кодирующий в своем геноме РНК по
меньшей мере один белок ССL21 или его функциональный вариант,
предпочтительно человеческий ССL21, причем геном РНК рекомбинантного
рабдовируса включает или состоит из кодирующей последовательности,
идентичной или по меньшей мере на 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95
10 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичной SEQ ID NO: 24.



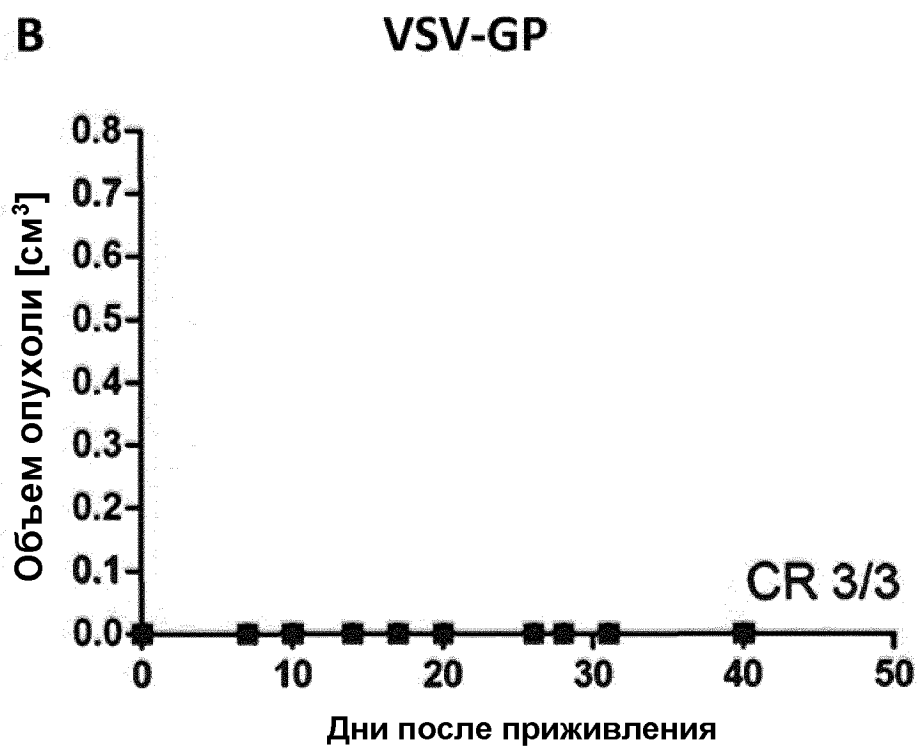
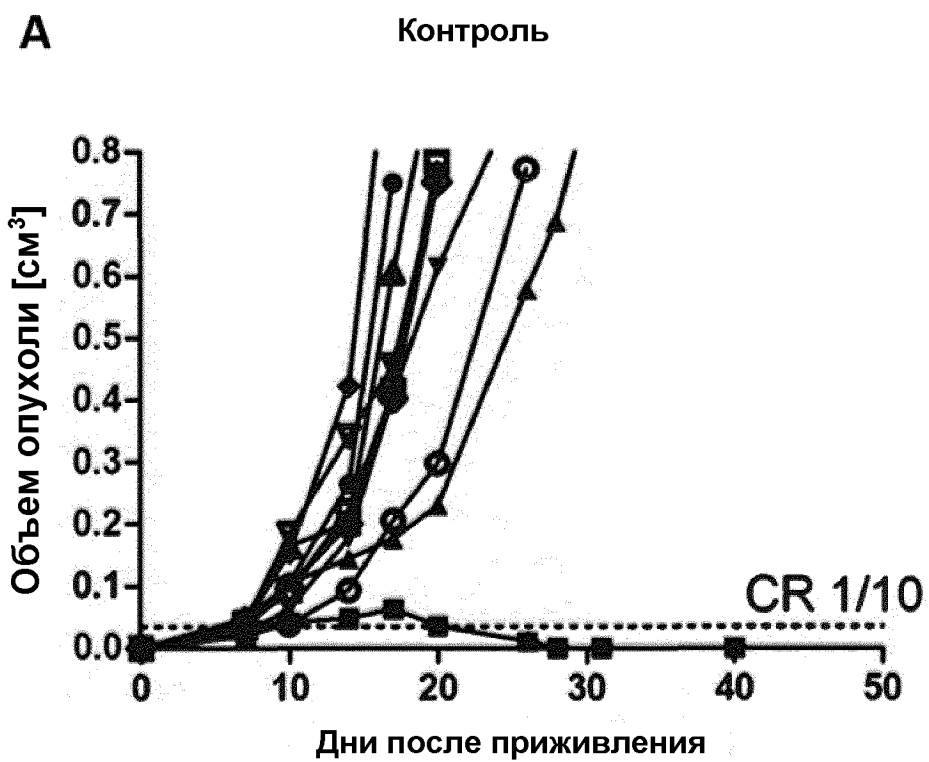
ФИГ. 1



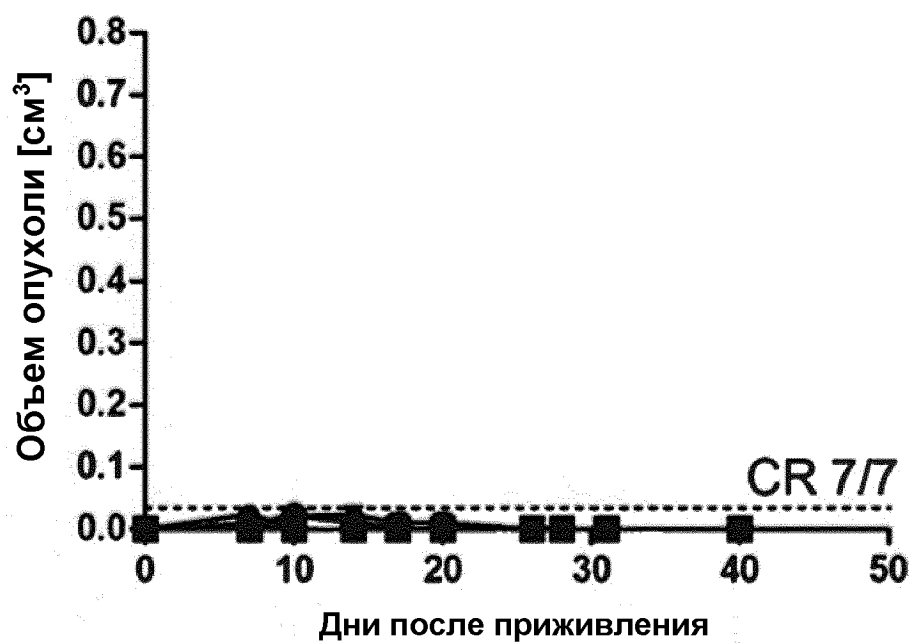
ФИГ. 2А - D



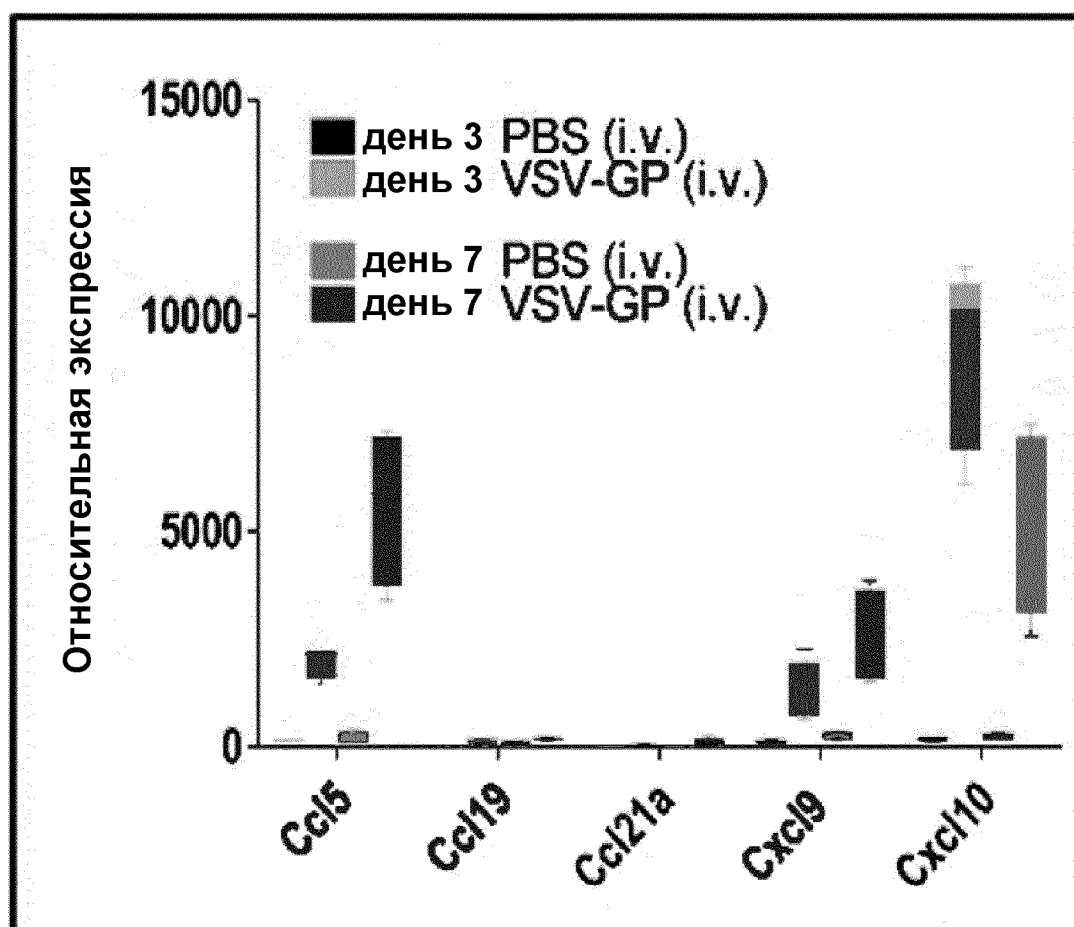
ФИГ. 2А - D (продолжение)



ФИГ. 3А - С

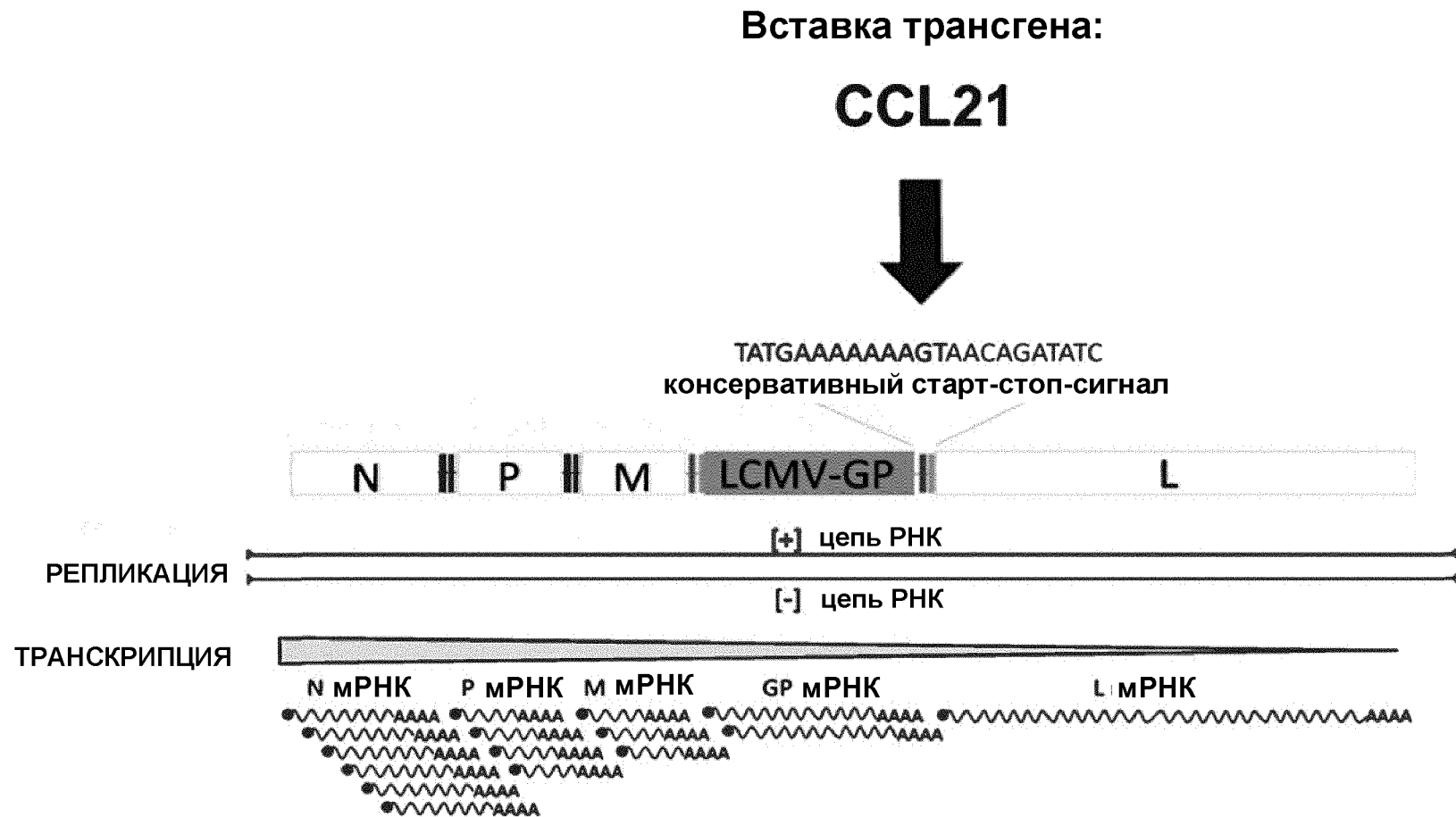
С**PD-1 после VSV-GP**

ФИГ. 3А - С (продолжение)



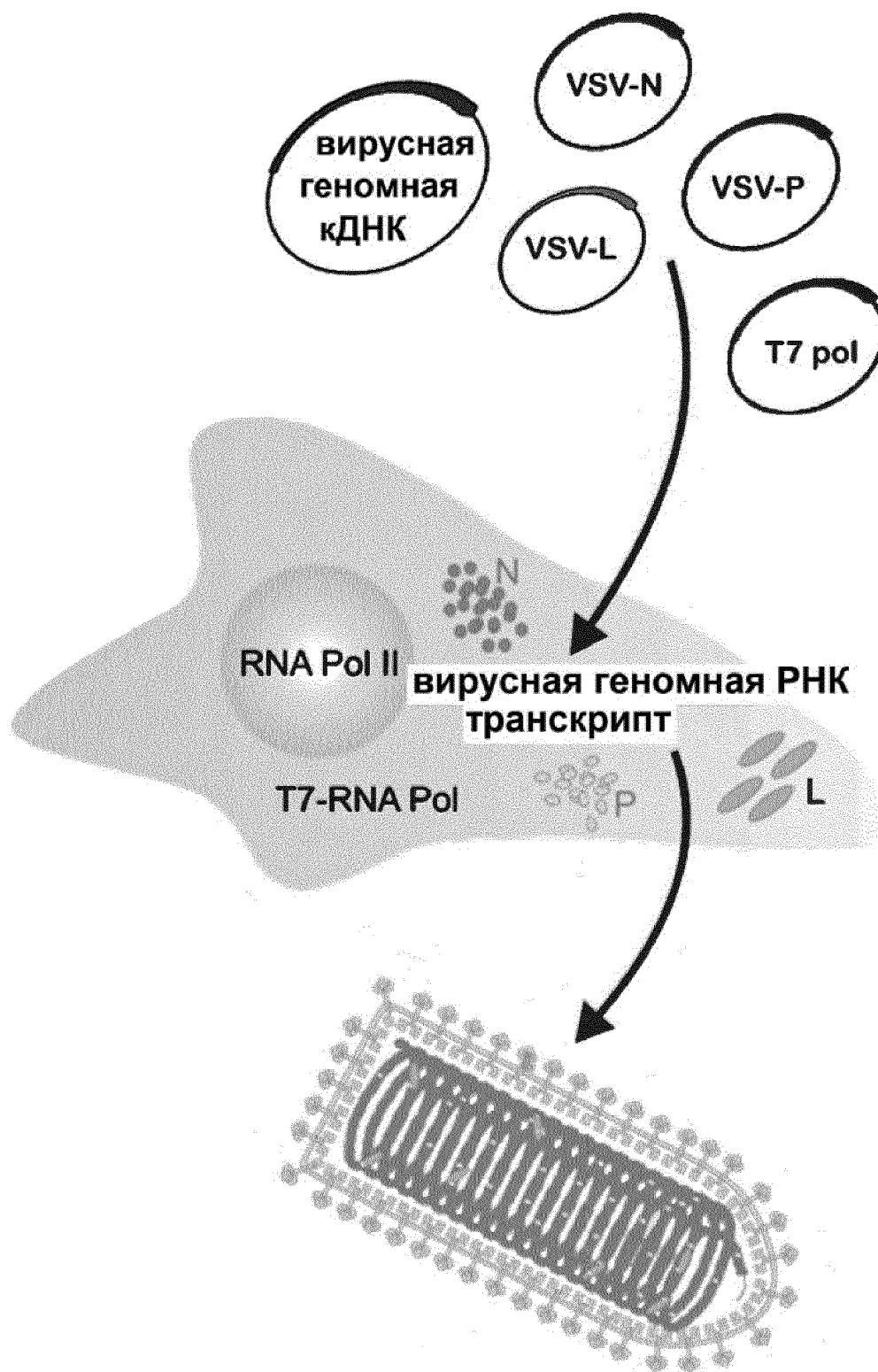
ФИГ. 4

A

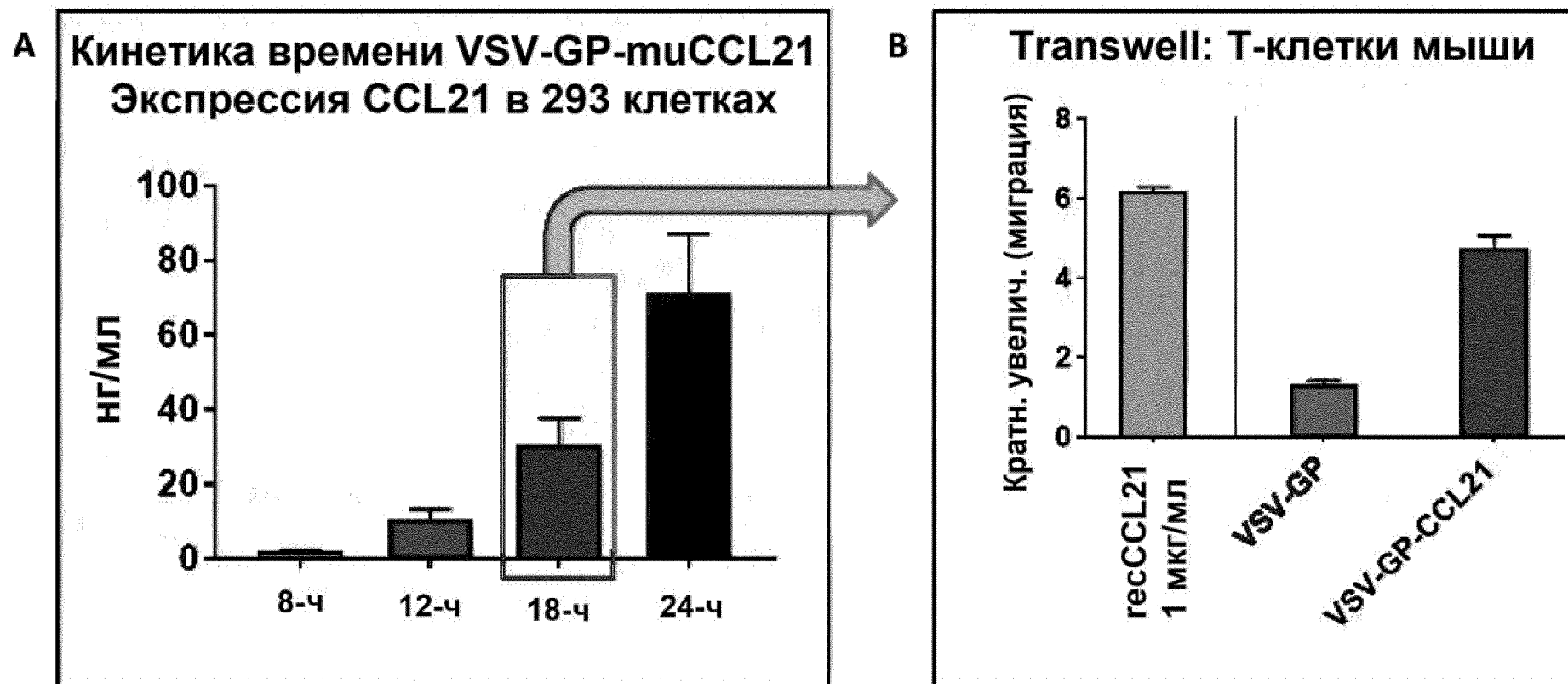


ФИГ. 5А - В

В



ФИГ. 5А - В (продолжение)

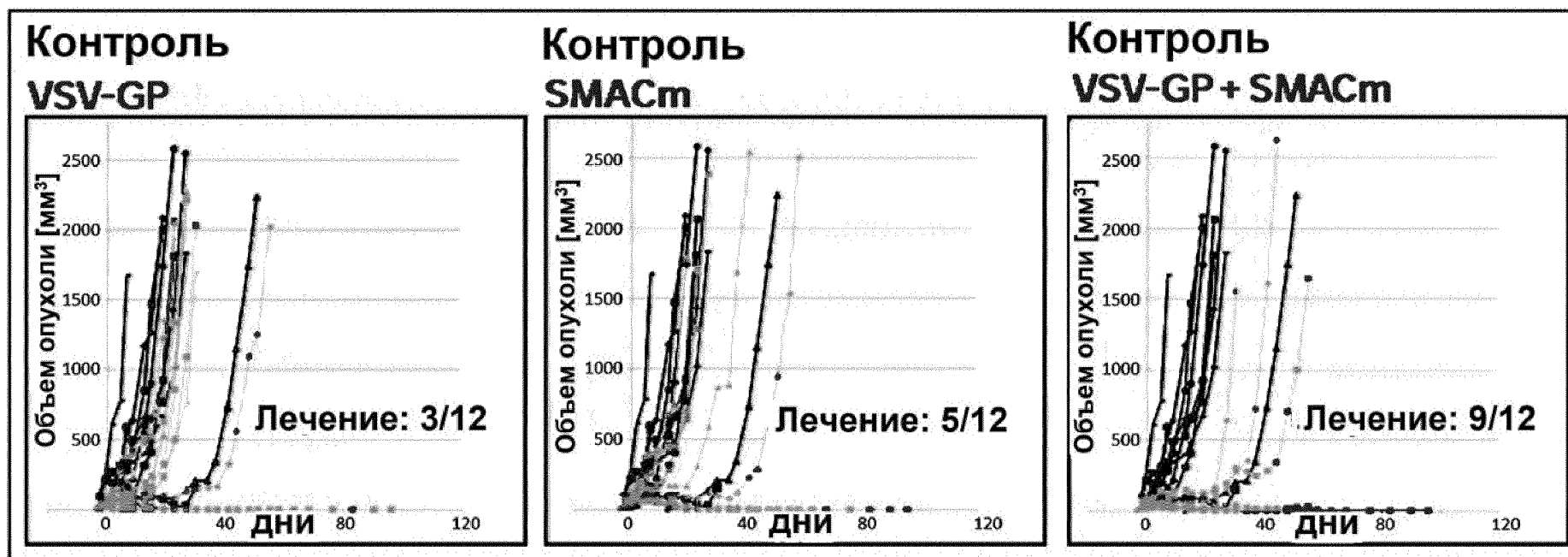


ФИГ. 6А - В

A

B

C

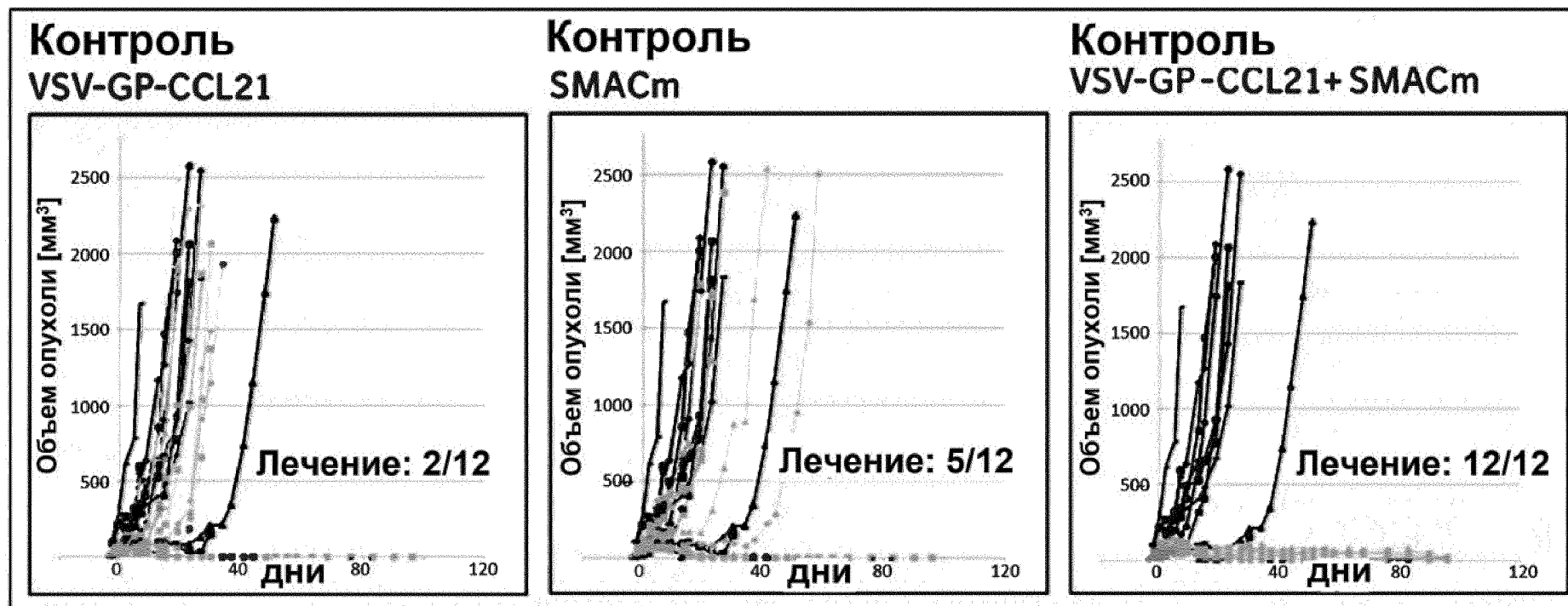


ФИГ. 7А - С

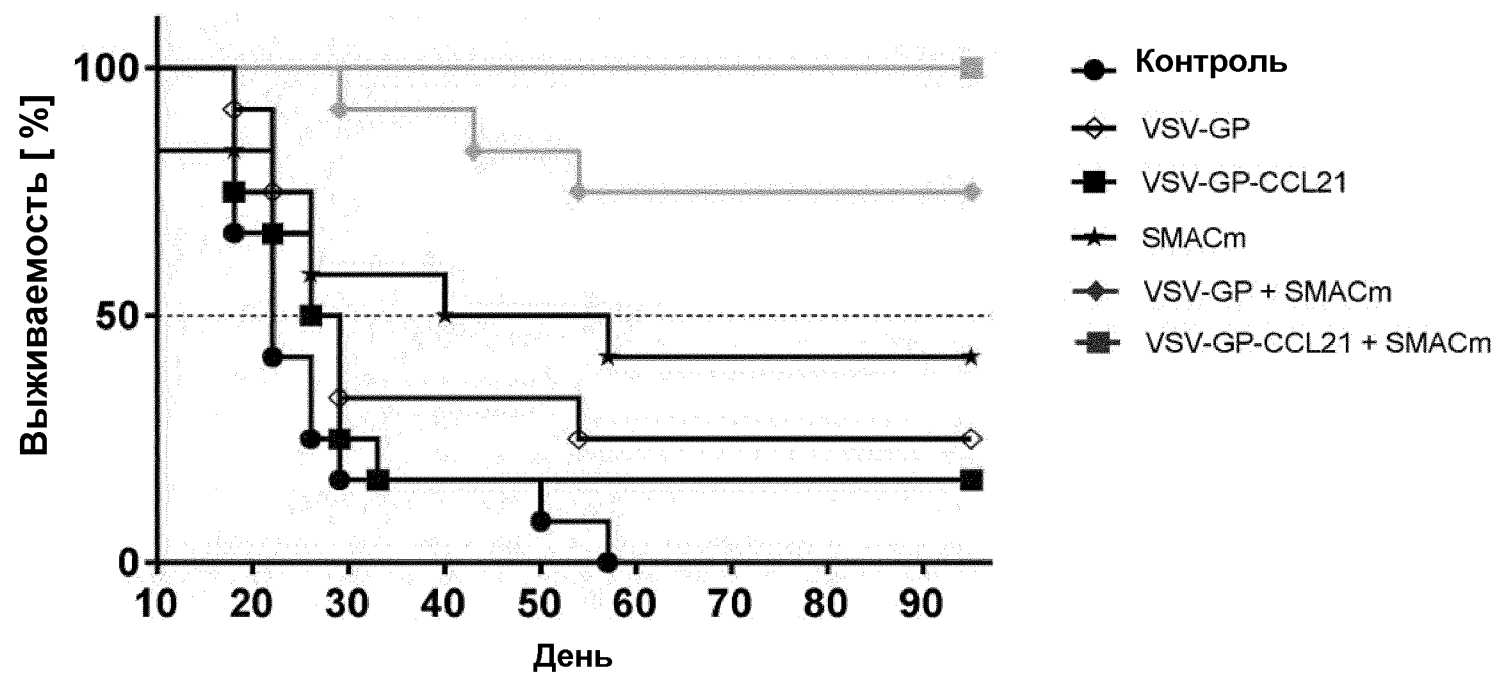
A

B

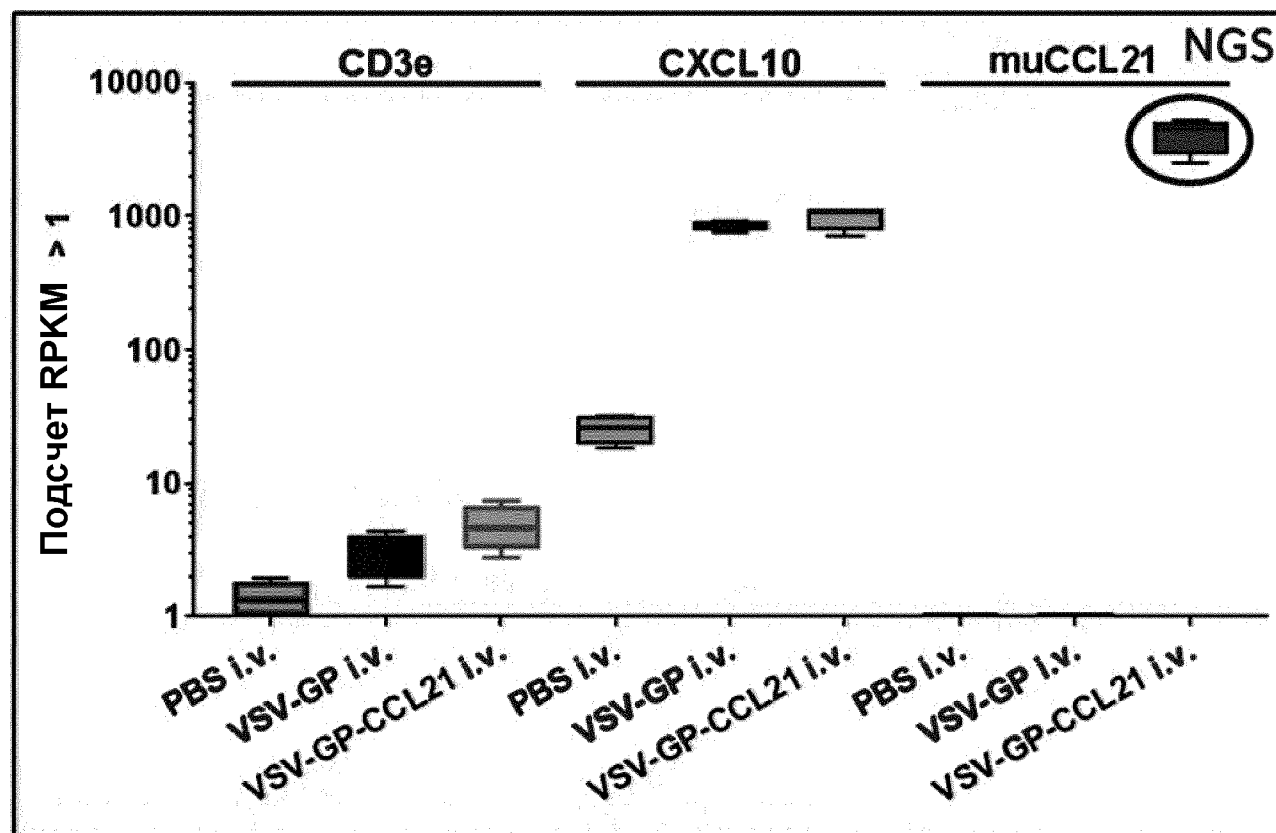
C



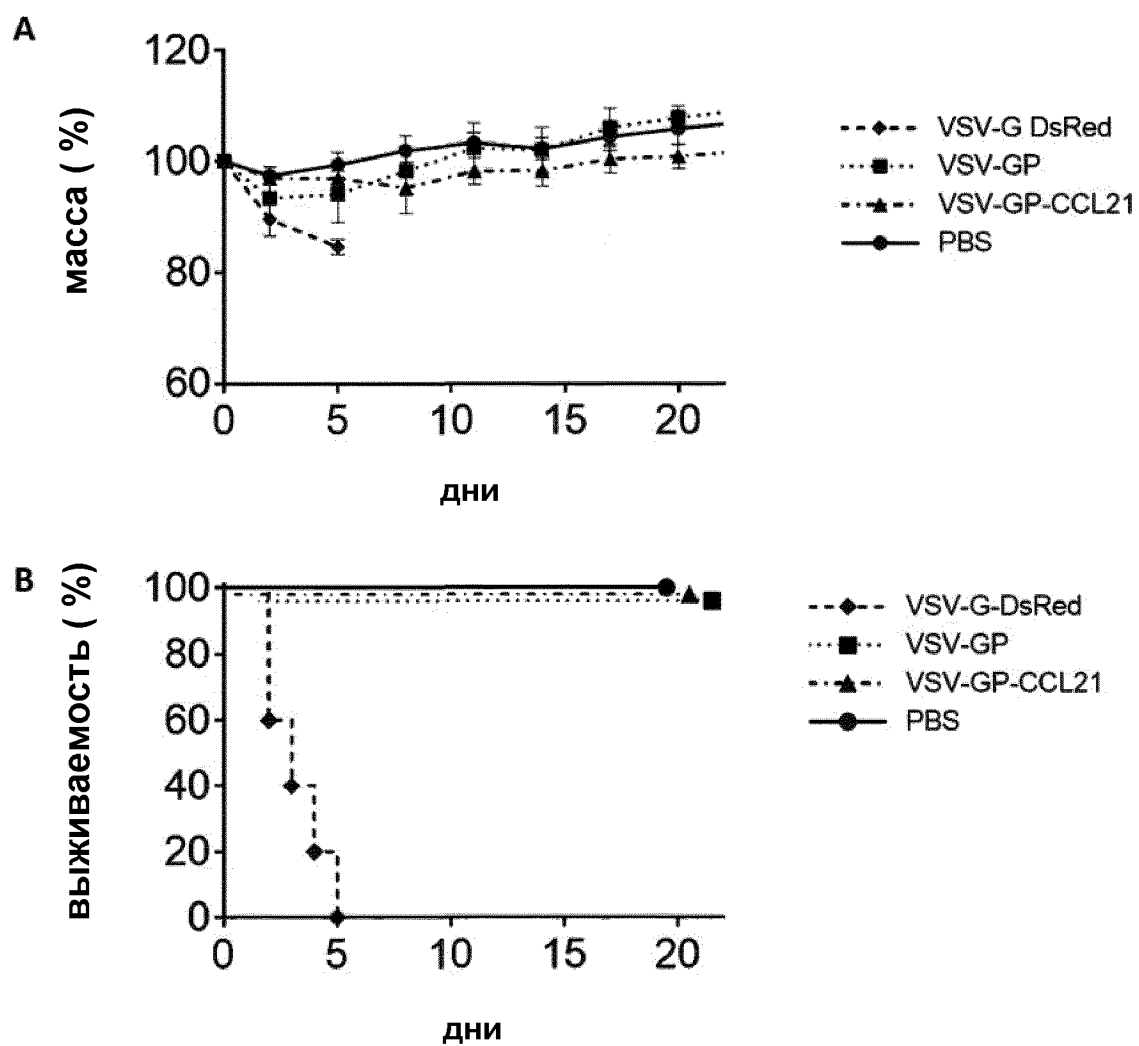
ФИГ. 8А - С



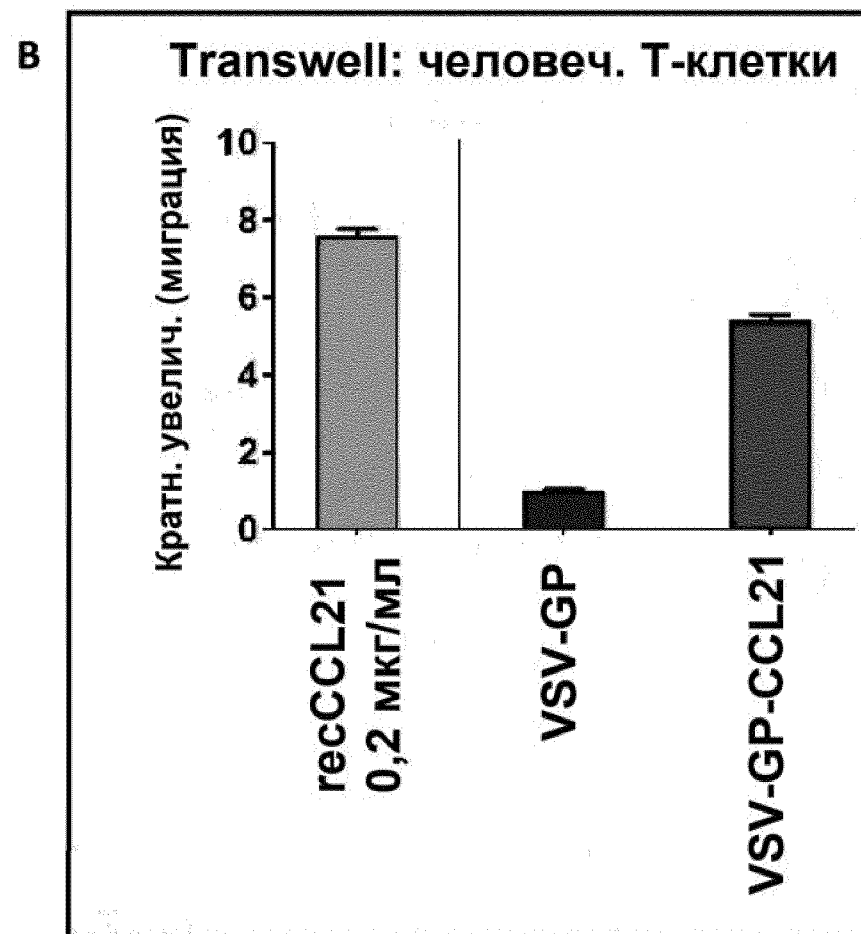
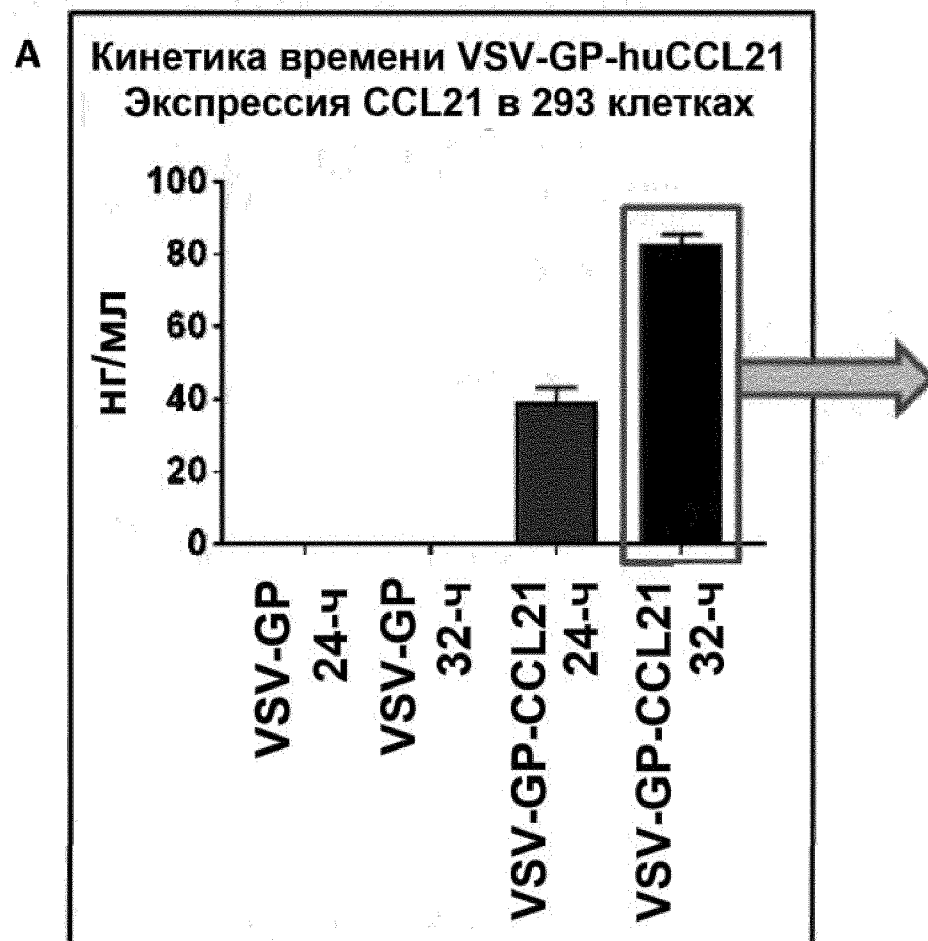
ФИГ. 9



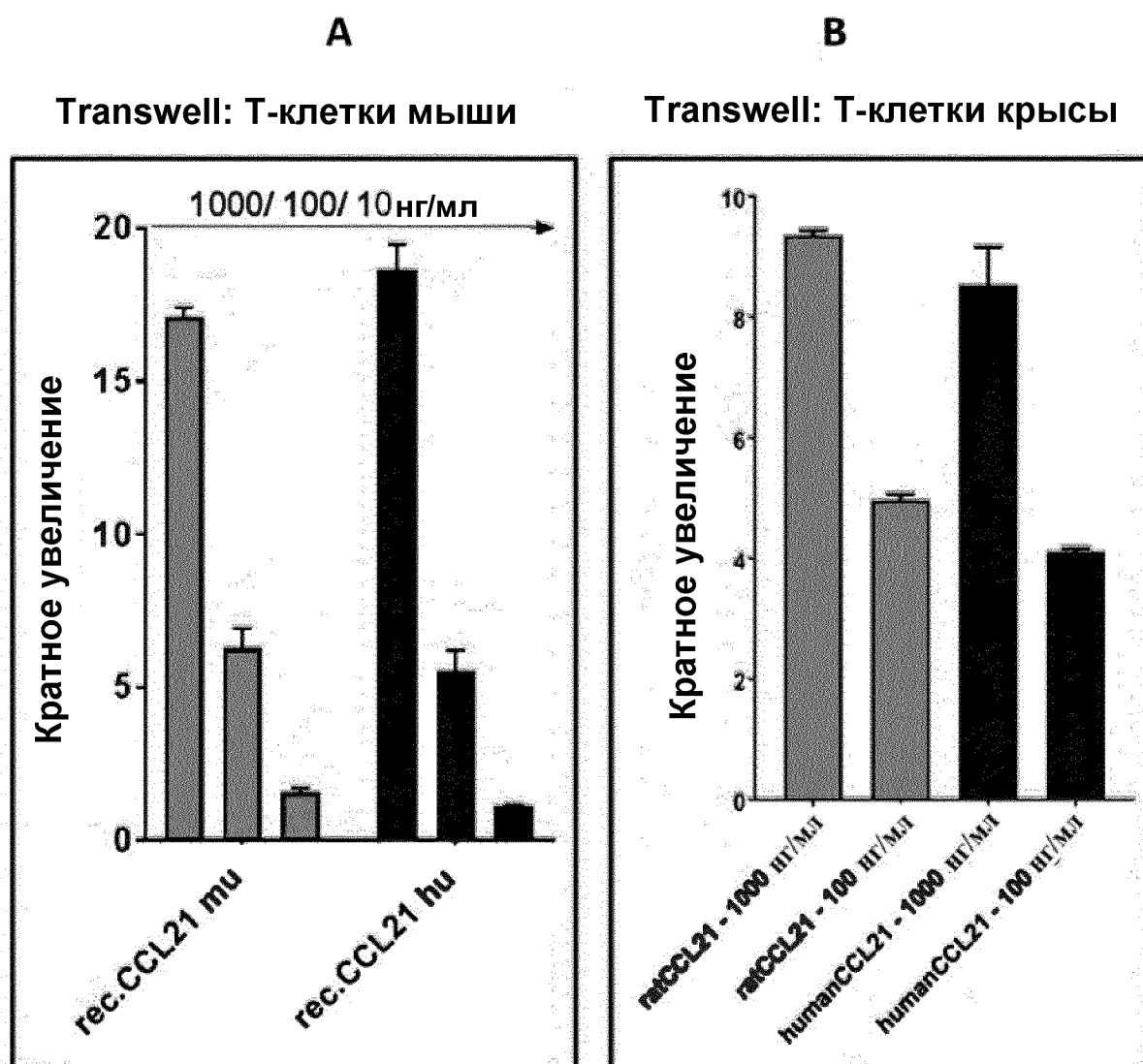
ФИГ. 10



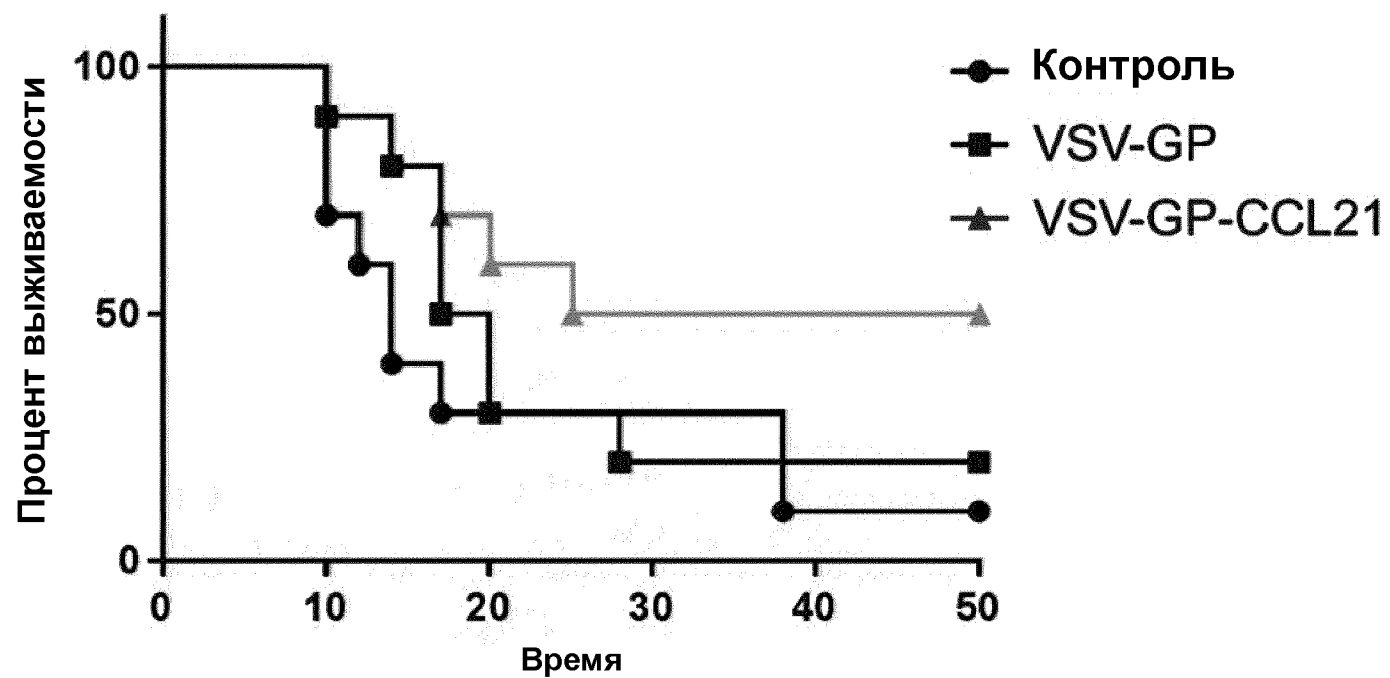
ФИГ. 11А - В



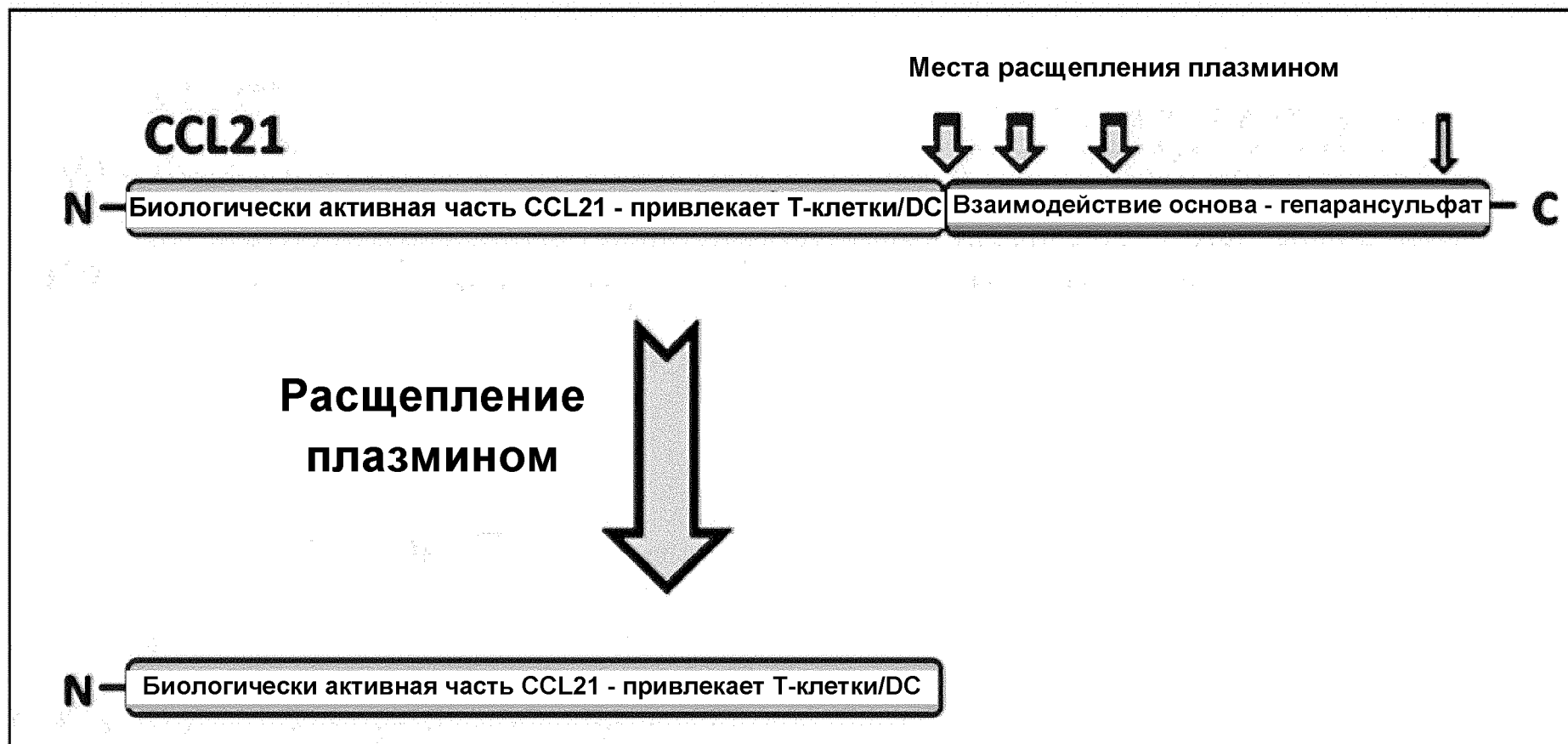
ФИГ. 12А - В



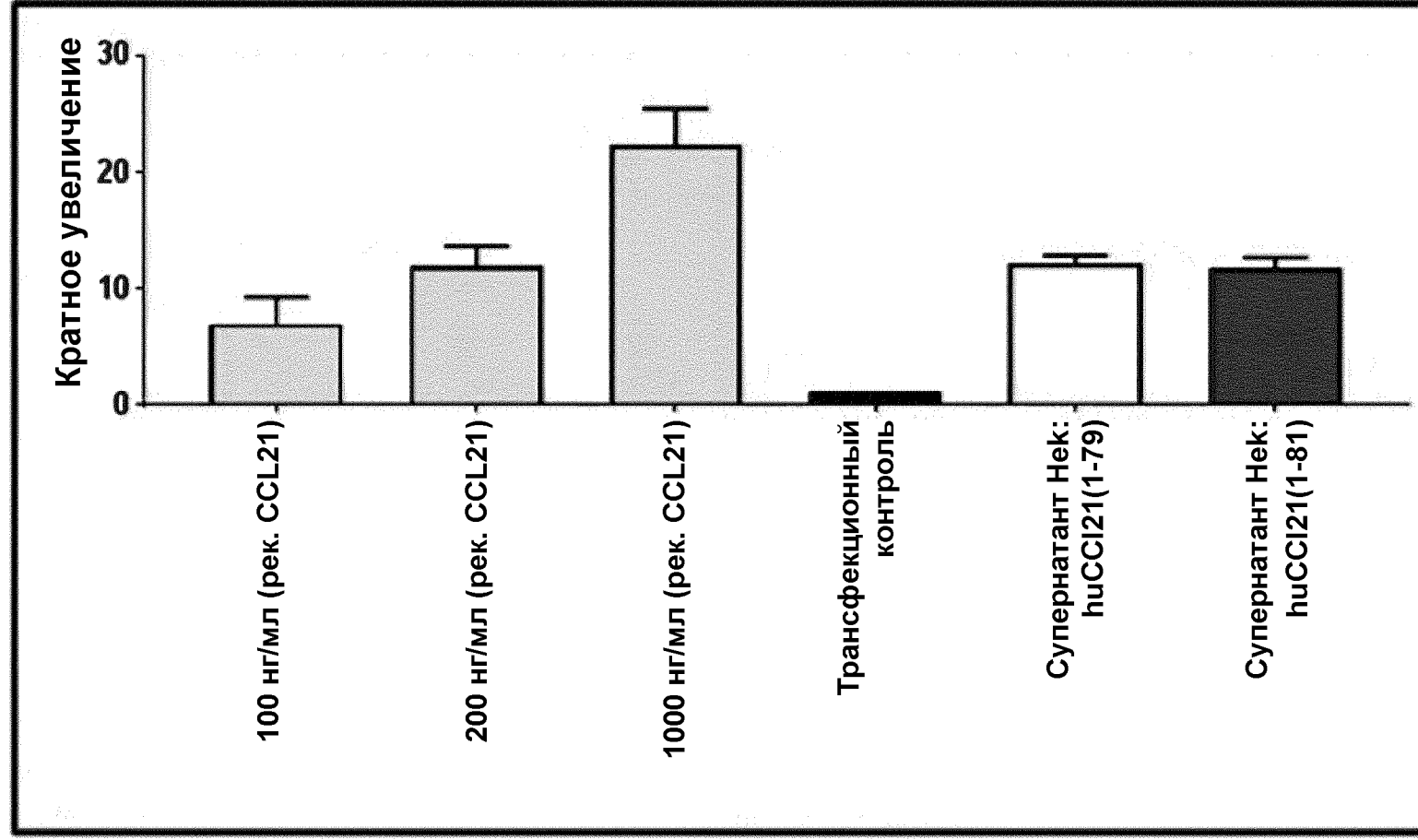
ФИГ. 13А - В



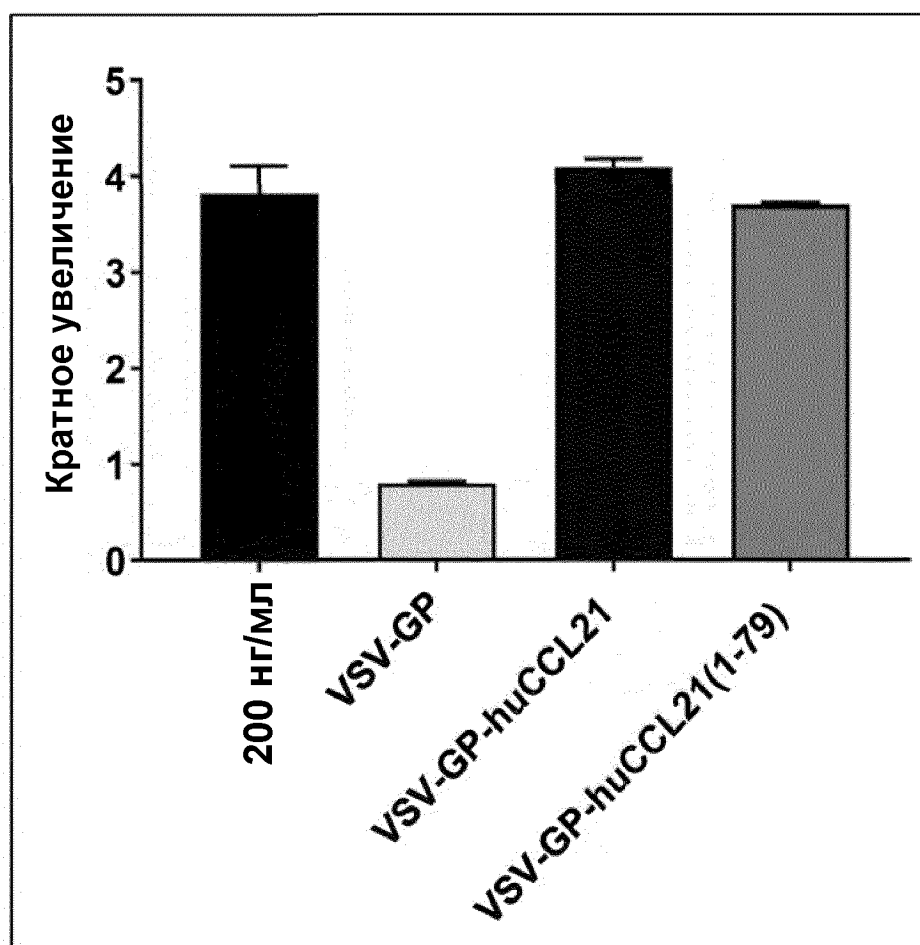
ФИГ. 14



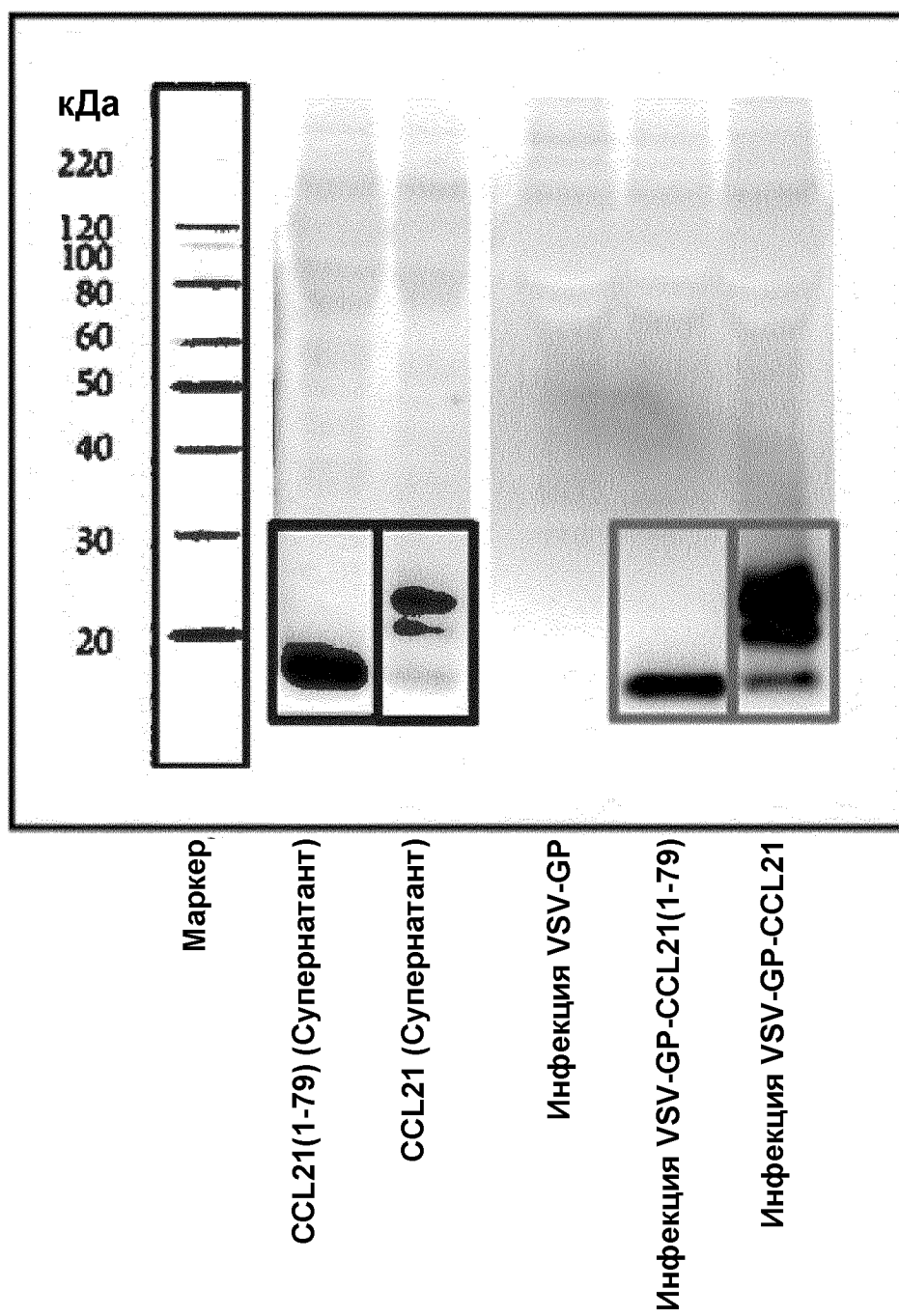
ФИГ. 15



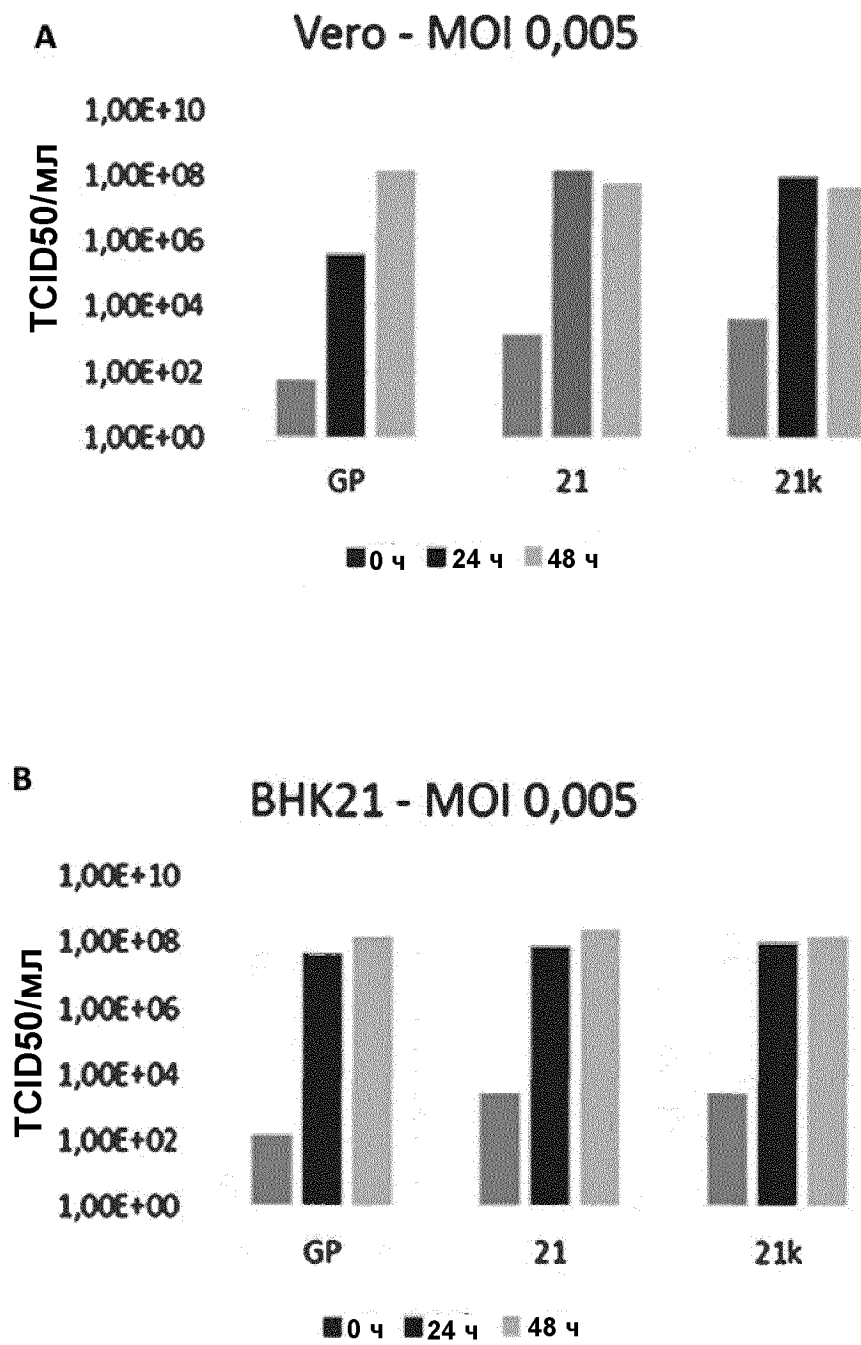
ФИГ. 16



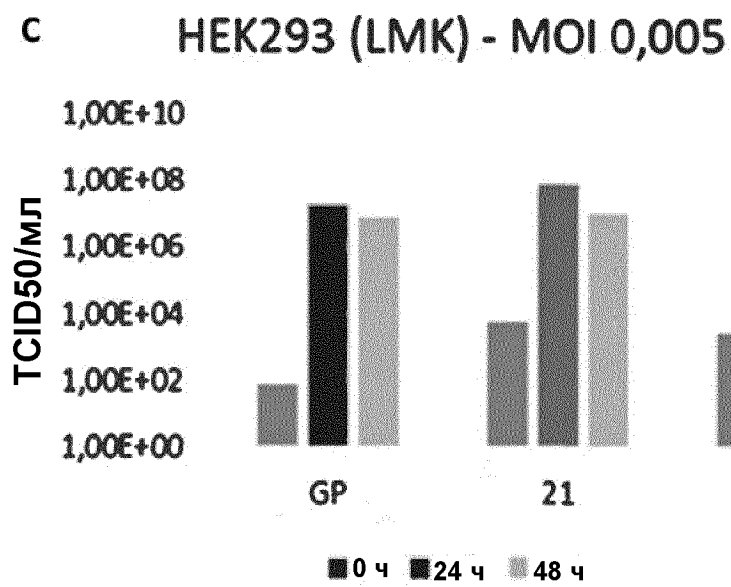
ФИГ. 17



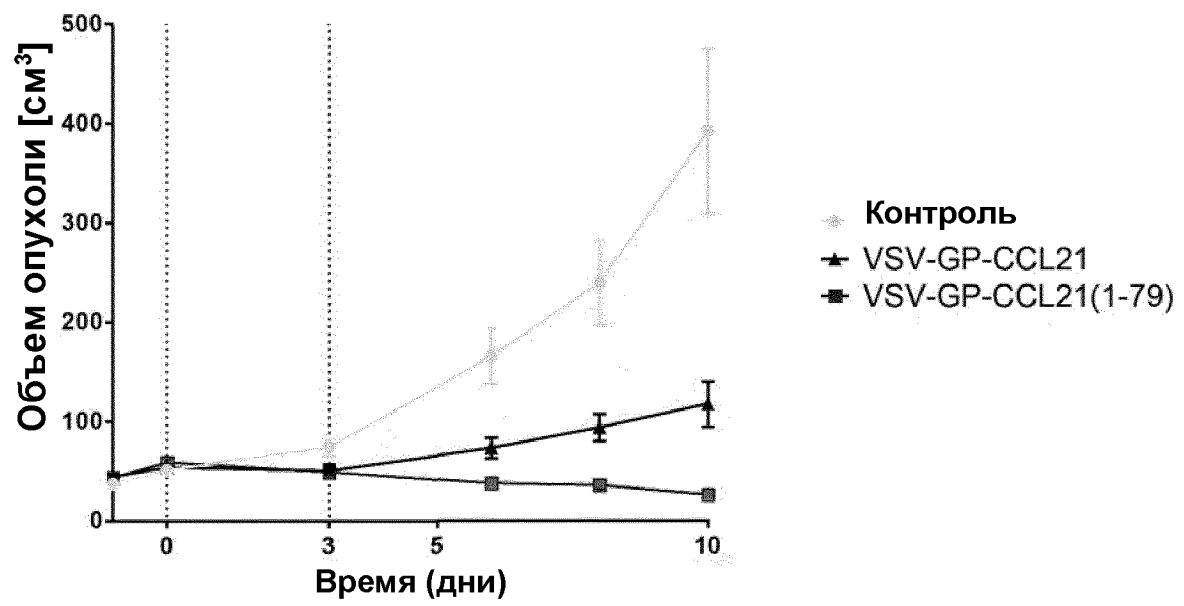
ФИГ. 18



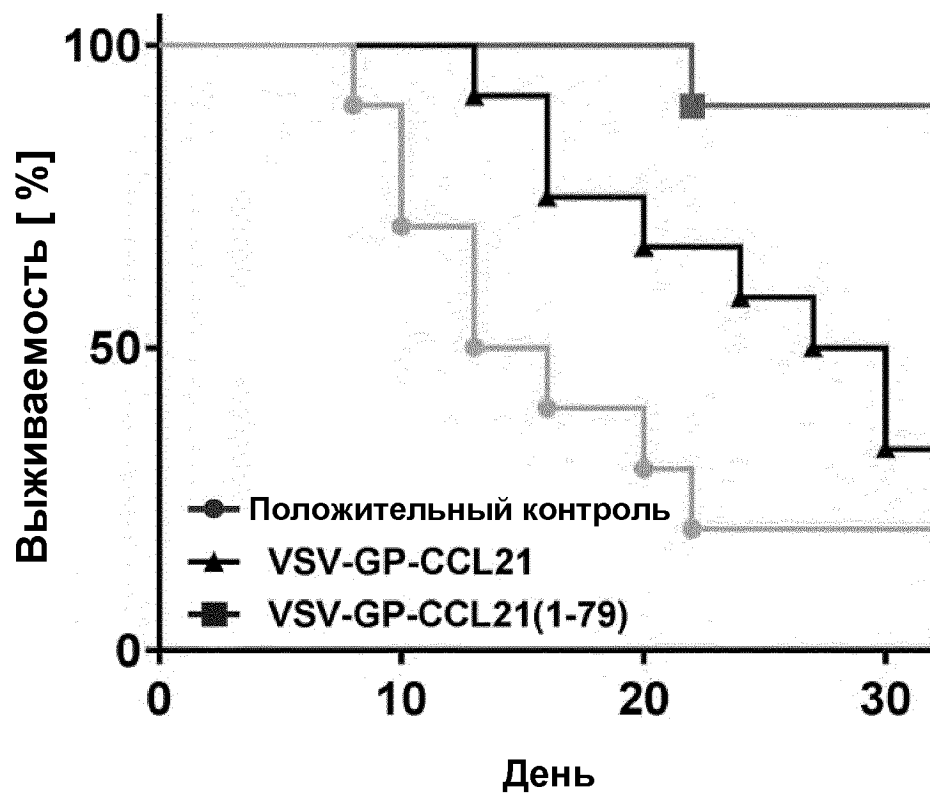
ФИГ. 19А - С



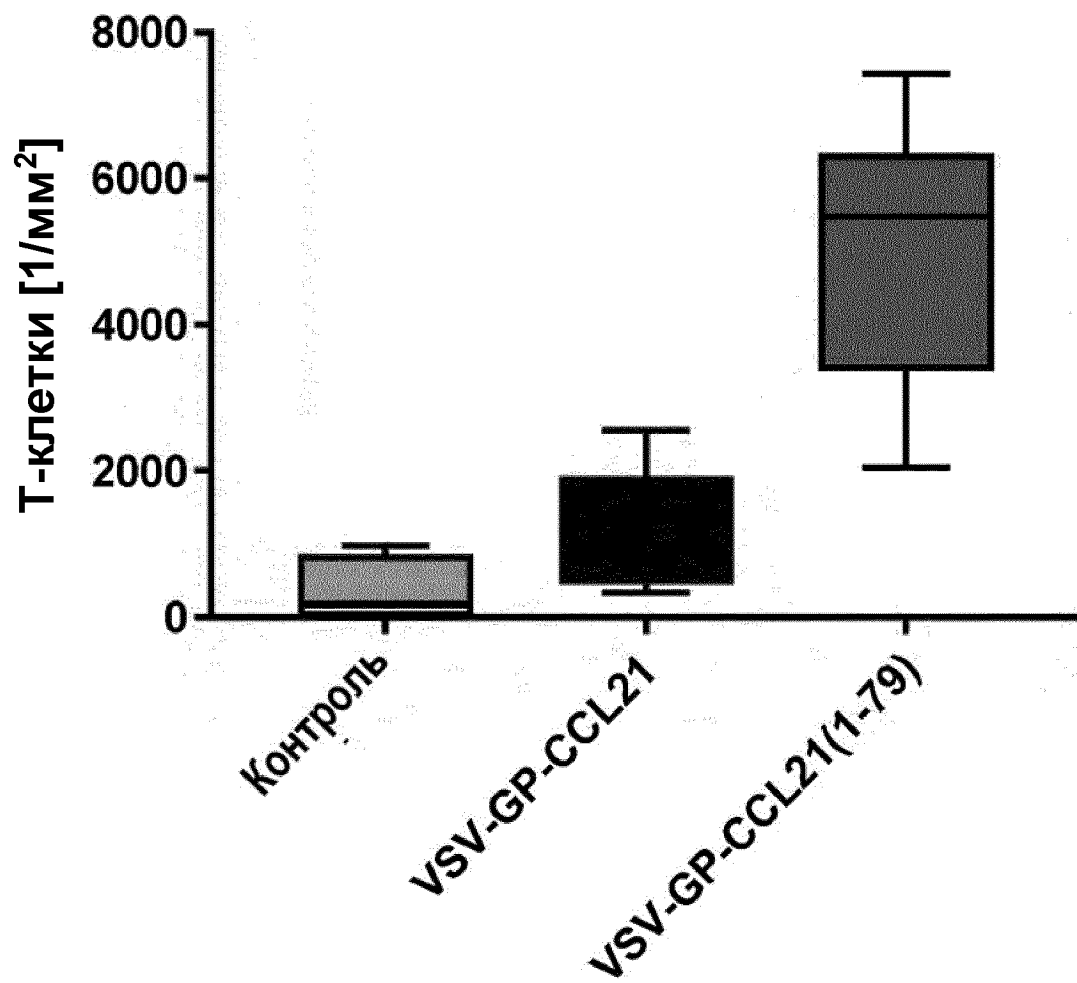
ФИГ. 19А - С (продолжение)



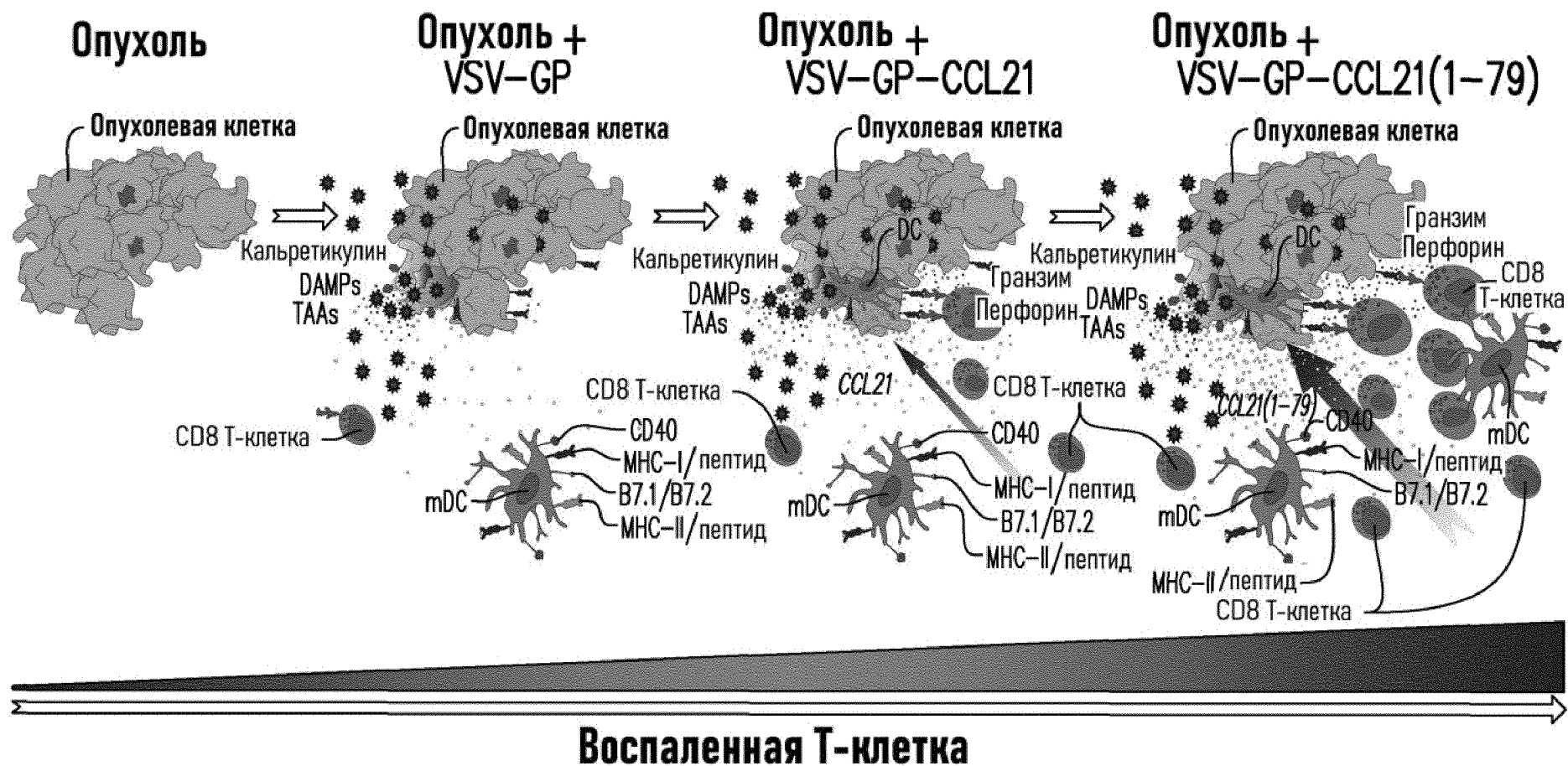
ФИГ. 20



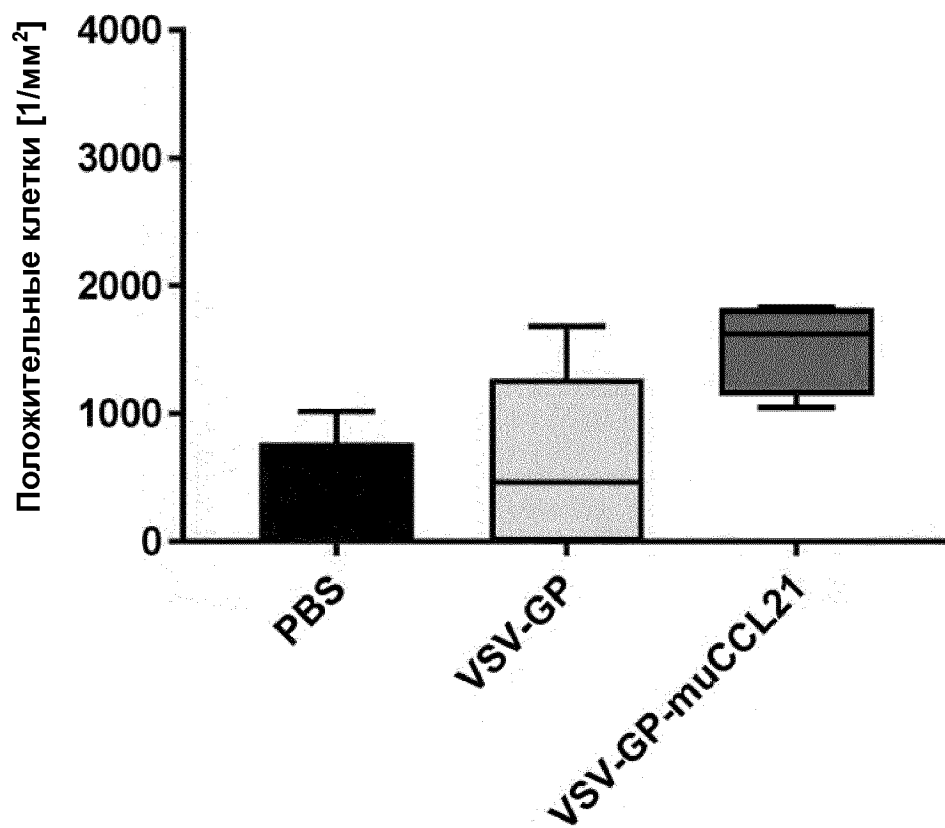
ФИГ. 21



ФИГ. 22



ФИГ. 23

CD11c⁺ клетки (опухоль)

ФИГ. 24