

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192420 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.13

(22) Дата подачи заявки
2020.03.03

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)
A61K 35/763 (2015.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 62/813,961

(32) 2019.03.05

(33) US

(86) PCT/US2020/020793

(87) WO 2020/180864 2020.09.10

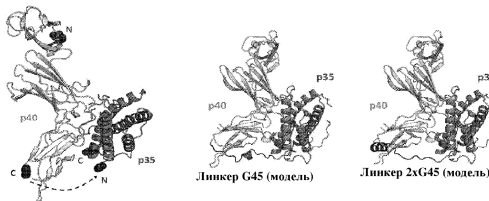
(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Девосс Джейсон Джеймс, Мейсен
Вальтер Ханс, Тинберг Кристине
Элейн, Кук Киган, Моеста Ахим
Клаус (US)

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

(57) Изобретение относится к применению онколитических вирусов (например, модифицированных вирусов HSV-1) для лечения разных типов рака. Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям и наборам, относящимся к таким применениям онколитических вирусов.



202192420

A1

A1

202192420

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570164EA/022

ПРИМЕНЕНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/813961, поданной 5 марта 2019 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данное заявление содержит перечень последовательностей в машиночитаемой форме. Перечень последовательностей представлен в виде текстового файла под названием A-2353-WO-PCIT_SeqListing_ST25.txt, созданного 10 января 2020 г., размер которого составляет 37667 байт. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Последние достижения в лечении многих форм рака обеспечили значительное увеличение частоты выживания для мужчин и женщин при наиболее распространенных типах рака, таких как рак легких, рак толстой кишки, рак молочной железы и рак предстательной железы. Появление ингибиторов контрольных точек, которые продемонстрировали успех в направлении иммунной системы пациента на атаку определенных форм рака, обеспечило значительное увеличение выживаемости пациентов при определенных типах рака. Например, ингибиторы контрольных точек, такие как ипилимумаб (антитело к CTLA-4), пембролизумаб и ниволумаб (антитела к PD-1) и атезолизумаб (антитело к PD-L1) продемонстрировали эффективность в отношении различных видов опухолей. См., Grosso et al., *Cancer Immun.*, 13:5 (2013); Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12:252-264 (2012); and Chen et al., *Immunity*, 39:1-10 (2013).

[0004] Онколитические вирусы также продемонстрировали клиническую эффективность в лечении определенных форм рака. Онколитические вирусы, как правило, являются генетически сконструированными для репликации преимущественно в раковых клетках (по сравнению со здоровыми клетками) и включают "нагрузки", которые могут использоваться для усиления антиопухолевого ответа. Такая генетическая инженерия изначально была направлена на применение неспособных к репликации вирусов для предотвращения вызываемого вирусами повреждения неопухолевых клеток. В последнее время генетическая инженерия онколитических вирусов направлена на создание "условнореплицирующихся" вирусов для избежания системной инфекции, когда вирусы позволяют распространяться в другие опухолевые клетки.

[0005] В настоящее время единственным одобренным онколитическим лекарственным средством на основе вируса в США и Европе является талимоген лагерпарепвек (IMLYGIC®). Талимоген лагерпарепвек представляет собой HSV-1, полученный из клинического штамма JS1 (депонированного в Европейской коллекции

клеточных культур (ЕСААС) под номером доступа 01010209). В талимогене лагерапарепвеке вирусные гены HSV-1, кодирующие ICP34.5 и ICP47, были подвергнуты функциональной делеции. Функциональная делеция ICP47 приводит к более ранней экспрессии US11, гена, который способствует размножению вируса в опухолевых клетках без снижения селективности к опухоли. Кроме того, кодирующая последовательность GM-CSF человека была вставлена в вирусный геном в сайтах, где ранее находился ICP34.5. См., Liu et al., Gene Ther., 10:292-303, 2003.

[0006] Исследовались терапевтические комбинации онколитических вирусов и ингибиторов контрольных точек. Например, комбинации талимогена лагерапарепвека и иммунотерапевтических средств (например, ипилимумаба и пембролизумаба) в настоящее время исследуются в клинических испытаниях лечения меланомы (NCT01740297 и NCT02263508) и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (NCT02626000).

[0007] Хотя онколитические вирусы продемонстрировали многообещающие результаты в лечении рака, остается необходимость в создании онколитических вирусов, которые не только ограничивают свою репликацию и литическое поражение раковых клеток, но также способны помочь установить и поддерживать функциональный систематический противоопухолевый иммунный ответ.

[0008] Настоящее изобретение отвечает этим и другим потребностям.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Настоящее изобретение относится к онколитическим вирусам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фактор роста дендритных клеток, и нуклеиновую кислоту, кодирующую первый гетерологичный цитокин. Гетерологичный фактор роста дендритных клеток и первый гетерологичный цитокин могут быть связаны полицистронным линкерным элементом. В некоторых вариантах осуществления полицистронный линкерный элемент представляет собой свиной тешовирус 2а (Р2А) или внутренний сайт связывания рибосомы (IRES). Онколитический вирус может представлять собой вирус простого герпеса, такой как вирус простого герпеса 1. В конкретном варианте осуществления онколитический вирус получен из штамма JS1 HSV-1.

[0010] Онколитический вирус может быть дополнительно модифицирован так, что в нем отсутствует функциональный ген ICP 34.5 и функциональный ген ICP 47.

[0011] Кроме того, онколитический вирус может дополнительно содержать промотор, где обе последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие фактор роста дендритных клеток и первый цитокин, находятся под контролем одного и того же промотора. В других вариантах осуществления онколитический вирус может содержать первый промотор, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фактор роста дендритных клеток, находится под контролем первого промотора; и второй промотор, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый цитокин, находится под контролем второго промотора.

[0012] Первый гетерологичный цитокин может представлять собой интерлейкин, такой как интерлейкин-12 (IL12). Гетерологичный фактор роста дендритных клеток может представлять собой второй цитокин, такой как лиганд fms-подобной тирозинкиназы-3 (FLT3L).

[0013] В конкретном варианте осуществления онколитический вирус по настоящему изобретению предусматривает HSV-1, в котором отсутствует функциональный ген, кодирующий ICP34.5, и отсутствует функциональный ген, кодирующий ICP47, и который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую FLT3L, и дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую IL12. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая IL12, и нуклеиновая кислота, кодирующая FLT3L, присутствуют на месте прежнего сайта гена, кодирующего ICP34.5. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая IL12, и нуклеиновая кислота, кодирующая FLT3L, связаны посредством P2A.

[0014] Нуклеиновые кислоты, кодирующие IL12, FLT3L и P2A, могут быть представлены в виде: [Flt3L]-[P2A]-[IL12], где конструкция [Flt3L]-[P2A]-[IL12] находится под контролем одного промотора, и конструкция находится на месте прежнего сайта гена, кодирующего ICP34.5. Подходящие промоторы включают: промотор цитомегаловируса (CMV), вируса саркомы Рауса (RSV), промотор человеческого фактора элонгации 1 α (EF1a), ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор убиквитина С (UBC) и промотор вируса стволовых клеток мышей (MSCV). В конкретном варианте осуществления промотор представляет собой промотор CMV.

[0015] Онколитические вирусы по настоящему изобретению могут содержать сигнальную последовательность полиаденилирования свиного гормона роста (BGHrA). Онколитические вирусы по настоящему изобретению могут также содержать нуклеиновую кислоту, которая усиливает трансляцию у млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, которая усиливает трансляцию у млекопитающих, представляет собой последовательность Козак или консенсусную последовательность Козак. В конкретном варианте осуществления консенсусная последовательность Козак представлена SEQ ID NO: 20.

[0016] В одном варианте осуществления онколитический вирус содержит нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты (также называемые конструкцией или кассетой экспрессии), кодирующие [CMV]-[Козак]-[Flt3L]-[P2A]-[IL12]-[BGHrA]. В другом варианте осуществления IL12 присутствует в виде [субъединица P40]-[GGGGS]-[субъединица P35]. В другом варианте осуществления сигнальный пептид в субъединице P35 IL12 отсутствует. В другом варианте осуществления онколитический вирус содержит нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, кодирующие [CMV]-[Козак]-[Flt3L]-[P2A]-[IL12(p40-GGGGS-No SP-p35)]-[BGHrA]. В еще одном варианте осуществления конструкция присутствует на месте прежнего сайта гена, кодирующего ICP34.5. Ориентация конструкции в пределах прежнего сайта гена, кодирующего ICP34.5,

применяемого для создания HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12, изображена на фигуре 9, хотя различные ориентации кассеты экспрессии в пределах прежнего сайта гена, кодирующего ICP34.5, могут быть получены/использованы.

[0017] В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус содержит последовательность FLT3L, предусматривающую SEQ ID NO: 1, и последовательность IL12, предусматривающую SEQ ID NO: 7.

[0018] В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус содержит промотор CMV, содержащий SEQ ID NO: 24, последовательность Козак, предусматривающую SEQ ID NO: 20, последовательность FLT3L, предусматривающую SEQ ID NO: 1, последовательность P2A (GSG-P2A) SEQ ID NO: 17, последовательность IL12, предусматривающую SEQ ID NO: 7, и последовательность BGHра, предусматривающую SEQ ID NO: 21.

[0019] Настоящее изобретение также включает способы лечения рака с применением онколитического вируса по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение включает терапевтически эффективное количество онколитического вируса для применения в лечении рака.

[0020] Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции для применения в лечении рака. Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать ингибитор контрольных точек.

[0021] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает набор, содержащий онколитический вирус по настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0022] **ФИГ. 1.** На фигуре 1 представлено in-silico моделирование линкеров, оцениваемых для слияния цепей IL12p35 и IL12p40 для создания продукта на основе цитокина с одной цепью.

[0023] **ФИГ. 2.** На фигуре 2 представлено моделирование энергетической конформации для линкеров, оцениваемых для слияния цепей IL12p35 и IL12p40.

[0024] **ФИГ. 3.** На фигуре 3 представлена инженерия слитого белка IL12 для оптимизации экспрессии, включающая оценку ориентации цепей, расположение сигнальных пептидов и применяемый линкер.

[0025] **ФИГ. 4.** На фигуре 4 представлена экспрессия FLT3L и одноцепочечного IL12 в случае экспрессии с последовательностью свиного вируса 2A (P2A) или последовательностью внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES).

[0026] **ФИГ. 5.** На фигуре 5 представлен эффект внедрения последовательности Козак в конструкцию ДНК на уровне произведенного продукта на основе цитокина.

[0027] **ФИГ. 6.** На фигуре 6 представлено структурное влияние добавления аминокислоты P2A на активность и связывание рецептора FLT3L с его родственным рецептором FLT3.

[0028] **ФИГ. 7.** На фигуре 7 представлена активность рекомбинантного человеческого IL12 (A) и одноцепочечного IL12, полученного с помощью конструкции

FLT3L-P2A-IL12 (B) в *in vitro* анализе репортерного гена.

[0029] **ФИГ. 8.** На фигуре 8 представлена активность рекомбинантного человеческого FLT3L (A) и FLT3L, полученного с помощью конструкции FLT3L-P2A-IL12 (B) в *in vitro* анализе клеточной пролиферации.

[0030] **ФИГ. 9.** На фигуре 9 представлен подход гомологичной рекомбинации для создания вируса, полученного методами генной инженерии, содержащего последовательность FLT3-IL12, вставленную в два локуса 34.5 генома HSV1.

[0031] **ФИГ. 10.** На фигуре 10 представлена *in vitro* репликативная способность клеточных линий вируса HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 в VERO (A) и A375 (B).

[0032] **ФИГ. 11.** На фигуре 11 представлена *in vitro* инфекционная и литическая способность вируса HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 в мышинных клетках CT26 (A) и клеточных линиях HT-29 (B), SK-MEL-5 (C), FADU (D) и VxPC-3 человека (E).

[0033] **ФИГ. 12.** На фигуре 12 представлена экспрессия FLT3L и IL12 вируса HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 в инфицированных человеческих клетках VERO, SK-MEL-5 и A375.

[0034] **ФИГ. 13.** На фигуре 13 представлена активность IL12 при экспрессии человеческими клетками SK-MEL-5 (A) или A375 (B), инфицированными вирусом HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 *in vitro*.

[0035] **ФИГ. 14.** На фигуре 14 представлена активность FLT3L при экспрессии человеческими клетками SK-MEL-5 (A) или VERO (B), инфицированными вирусом HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 *in vitro*.

[0036] **ФИГ. 15.** На фигуре 15 представлена *in vivo* экспрессия мышинных FLT3L и IL12 у опухолевых клеток A20, имплантированных животным BALB/c, в которые внутритуморально вводится HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в количестве 1е6 БОЕ/животное.

[0037] **ФИГ. 16.** На фигуре 16 представлена *in vivo* экспрессия мышинных FLT3L и IL12 у опухолевых клеток B16F10, имплантированных животным C57BL6, в которые внутритуморально вводится HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в количестве 5е6 БОЕ/животное.

[0038] **ФИГ. 17.** На фигуре 17 представлены противоопухолевые ответы Т-клеток, которые проявляются в результате инъекции вируса HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF или HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12.

[0039] **ФИГ. 18.** На фигуре 18 представлена противоопухолевая эффективность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в билатеральной изогенной мышинной модели опухоли, представляющей собой В-клеточную лимфому (клеточная линия A20), где вирус доставлялся внутритуморально только в одну из опухолей (правая сторона), и другую опухоль оставляли без лечения (левая сторона).

[0040] **ФИГ. 19.** На фигуре 19 представлена противоопухолевая эффективность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в билатеральной изогенной мышинной модели опухоли, представляющей собой

нейробластому (клеточная линия Neuro2A), где вирус доставлялся внутритуморально только в одну из опухолей (правая сторона), и другую опухоль оставляли без лечения (левая сторона).

[0041] **ФИГ. 20.** На фигуре 20 представлена противоопухолевая эффективность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в билатеральной изогенной мышинной модели колоректальной опухоли (клеточная линия CT26), где вирус доставлялся внутритуморально только в одну из опухолей (правая сторона), и другую опухоль оставляли без лечения (левая сторона).

[0042] **ФИГ. 21.** На фигуре 21 представлена противоопухолевая эффективность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в комбинации с блокадой контрольных точек (mAb к PD1) в билатеральной изогенной мышинной модели колоректальной (клеточная линия MC38) опухоли, где вирус доставлялся внутритуморально только в одну из опухолей (правая сторона), и другую опухоль оставляли без лечения (левая сторона).

[0043] **ФИГ. 22.** На фигуре 22 представлено получение цитокина/нагрузки HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в одной изогенной мышинной модели колоректальной опухоли (клеточная линия CT26), где вирус доставлялся внутритуморально в опухоль (правая сторона).

[0044] **ФИГ. 23.** На фигуре 23 представлен противоопухолевый ответ (измеренный посредством ELISpot), полученный вследствие инъекции HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 отдельно или в комбинации с антителом к PD1 в билатеральной изогенной мышинной модели колоректальной (клеточная линия MC38) опухоли. Линии под осью X представляют результаты статистического анализа (двусторонний критерий Стьюдента) между группами, указанными в начале и в конце линии. Значения P указаны следующим образом: * указывает на $p \leq 0,05$; ** указывает на $p \leq 0,01$, *** указывает на $p \leq 0,001$, **** указывает на $p \leq 0,0001$.

[0045] **ФИГ. 24.** На фигуре 24 представлена противоопухолевая эффективность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в комбинации с антителом к агонисту 4-1BB в билатеральной изогенной мышинной модели колоректальной (клеточная линия MC38) опухоли, где вирус доставлялся внутритуморально только в одну из опухолей (правая сторона), и другую опухоль оставляли без лечения (левая сторона).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0046] Используемые в данном документе заголовки разделов служат только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый объект изобретения. Все цитируемые в тексте данного описания литературные источники включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0047] Если в данном документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в рамках настоящей заявки, имеют значения, которые общеизвестны рядовым специалистам в данной области техники. Кроме того, если контекст не предусматривает иное, термины в единственном числе будут включать их формы во множественном числе, а термины во множественном числе будут включать их

формы в единственном числе.

[0048] В целом, номенклатура, применяемая в рамках культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации и связанные с ними методики, описанные в данном документе, являются общеизвестными и общепринятыми в данной области техники. Способы и методики из настоящей заявки в целом осуществляются в соответствии с традиционными способами, общеизвестными в данной области техники и описанными в различных общих и более специализированных литературных источниках, которые цитируются и обсуждаются на протяжении всей настоящей заявки, если не указано иное. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), and Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены в данный документ посредством ссылки. Ферментативные реакции и методики очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как обычно выполняется в данной области техники или как описано в данном документе. Терминология, применяемая в рамках аналитической химии, химии органического синтеза и медицинской и фармацевтической химии и связанные с ними лабораторные процедуры и методики, описанные в данном документе, являются общеизвестными и общепринятыми в данной области техники. Стандартные методики можно применять для химических синтезов, химических анализов, получения, составления и доставки фармацевтических средств, а также лечения пациентов.

[0049] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами и т. д., описанными в данном документе, и, ввиду этого, может изменяться. Используемая в данном документе терминология служит только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

[0050] Кроме случая рабочих примеров или случаев, где указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакций, применяемые в данном документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях с помощью термина "приблизительно." Термин "приблизительно" при использовании в сочетании с процентами может означать $\pm 1\%$.

[0051] Все варианты осуществления, более узкие по объему, чем вариации, определенные конкретными абзацами в данном документе, должны рассматриваться как включенные в настоящее изобретение. Например, некоторые аспекты описываются как род, и следует понимать, что каждый член рода может быть отдельно вариантом осуществления. Также следует понимать, что аспекты, описываемые как род, или выбирающие член рода, включают комбинации двух или более членов рода. Следует также понимать, что хотя различные варианты осуществления в настоящем описании

представлены с использованием формулировки "содержащие", при различных обстоятельствах связанный вариант осуществления также может быть описан с использованием формулировок "состоящий из" или "состоящий, по существу, из".

Определения

[0052] Термин "подвергнутый функциональной делеции" при ссылке на ген означает, что ген является модифицированным (например, посредством частичной или полной делеции, замены, перестановки или изменения гена другим образом) так, что данный ген более не может экспрессировать функциональный белок. В контексте вируса простого герпеса (такого как онколитический вирус), ген является "подвергнутым функциональной делеции", когда ген вируса модифицирован в геноме простого герпеса так, что этот ген вируса простого герпеса более не может экспрессировать функциональный белок вируса.

[0053] Термин "гетерологичный" при ссылке на нуклеиновую кислоту (или белок, кодируемый нуклеиновой кислотой), присутствующую в геноме вируса, относится к нуклеиновой кислоте, которая в естественных условиях не присутствует в вирусе (или белку, который в естественных условиях не продуцируется вирусом). Например, нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий IL12, или нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий FLT3L, являлись бы "гетерологичными" по отношению к HSV-1.

[0054] Термин "онколитический вирус" относится к вирусу, который, в естественных условиях или в результате модификации, преимущественно инфицирует и уничтожает раковые клетки в отличие от нераковых клеток.

[0055] Применяемые в данном документе термины "пациент" или "субъект" применяются взаимозаменяемо и обозначают млекопитающее, включающее без ограничения млекопитающее, являющееся человеком или млекопитающее, не являющееся человеком, такое как бычья, лошадиные, собачьи, овечьи или кошачьи. Предпочтительно пациент является человеком.

[0056] Термин "HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12" относится к модифицированному HSV-1, полученному из штамма JS1, где у HSV-1 отсутствует функциональный ген, кодирующий ICP34.5, отсутствует функциональный ген, кодирующий ICP47, и вирус содержит следующую конструкцию, вставленную на место прежних сайтов гена ICP 34.5: [CMV]-[Козак]-[Flt3L]-[P2A]-[IL12(p40-GGGGS-No SP-p35)]-[BGHрA].

Онколитические вирусы

[0057] Любой вирус может использоваться для создания онколитического вируса по настоящему изобретению. В общем вирус может быть модифицирован для, например, изменения его репликации (например, для преимущественной репликации в опухолевых клетках в отличие от здоровых клеток), его способности быть обнаруженным иммунной системой хозяина и включения экзогенных нуклеиновых кислот.

[0058] В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус представляет

собой вирус простого герпеса (HSV). В других вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой вирус простого герпеса 1 (HSV-1). В других вариантах осуществления онколитический вирус получен из JS1 (HSV-1). JS1 депонирован в Европейской коллекции клеточных культур (ЕСААС) под номером доступа 01010209.

[0059] В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой HSV-1, где гены вируса, кодирующие ICP34.5, являются подвергнутыми функциональной делеции. Функциональная делеция ICP34.5, который выполняет функцию фактора вирулентности во время инфицирования HSV, ограничивает репликацию в неделящихся клетках и делает вирус непатогенным. Безопасность HSV с подвергнутым функциональной делеции ICP34.5 была показана в нескольких клинических исследованиях (MacKie et al, *Lancet* 357: 525-526, 2001; Markert et al, *Gene Ther* 7: 867-874, 2000; Rampling et al, *Gene Ther* 7:859-866, 2000; Sundaresan et al, *J. Virol* 74: 3822-3841, 2000; Hunter et al, *J Virol Aug*; 73(8): 6319-6326, 1999).

[0060] В других вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой HSV-1, где ген вируса, кодирующий ICP47 (который блокирует презентацию вирусного антигена молекулам класса I и II крупных комплексов гистосовместимости) является подвергнутым функциональной делеции. Функциональная делеция ICP47 также приводит к более ранней экспрессии US11, гена, который способствует размножению вируса в опухолевых клетках без снижения селективности к опухоли.

[0061] В некоторых вариантах осуществления гены вируса, кодирующие ICP34.5, подвергаются делеции. В некоторых вариантах осуществления гены вируса, кодирующие ICP47, подвергаются делеции. В некоторых вариантах осуществления как гены вируса, кодирующие ICP34.5, так и гены вируса, кодирующие ICP47, подвергаются делеции. В некоторых вариантах осуществления как гены вируса, кодирующие ICP34.5, так и гены вируса, кодирующие ICP47, подвергаются делеции, и делеция ICP47 приводит к более ранней экспрессии US11.

[0062] Штаммы вируса герпеса и способы получения таких штаммов описаны в патентах США №№. US5824318; US6764675; US6,770,274; US7,063,835; US7,223,593; US7749745; US7744899; US8273568; US8420071; US8470577; номера публикаций WIPO: WO199600007; WO199639841; WO199907394; WO200054795; WO2006002394; WO201306795; номера патентов Китая: CN128303, CN10230334 и CN 10230335; Varghese and Rabkin, (2002) *Cancer Gene Therapy* 9:967-97 и Cassady and Ness Parker, (2010) *The Open Virology Journal* 4:103-108, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

[0063] Онколитические вирусы по настоящему изобретению являются также модифицированными так, что они содержат экзогенную (экзогенные) нуклеиновую (нуклеиновые) кислоту (кислоты), кодирующую (кодирующие) белки. Такие белки были рационально выбраны для усиления иммуностимулирующей способности вируса. Увеличение иммуностимулирующей способности позволяет онколитическому вирусу вызывать более устойчивый противоопухолевый ответ. Таким образом, в одном аспекте

онколитический вирус содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фактор роста дендритных клеток, первый гетерологичный цитокин, или оба. FLT3L усиливает пролиферацию и выживаемость дендритных клеток, особенно принадлежащих к подтипу cDC1, который является критически важным для перекрестной презентации опухолевых антигенов Т-клеткам. Кроме того, IL12 усиливает функцию Т-хелперов 1 типа (Th1) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), результатом чего является максимальная активность, направленная на уничтожение опухоли. Не ограничиваясь какой-либо теорией, есть основания полагать, что в случае комбинации этих двух наборов свойств результат представлял бы собой онколитический вирус, который является неожиданно способным к, например, индуцированию системного иммунного ответа на раковые клетки.

[0064] В конкретном варианте осуществления онколитический вирус содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный фактор роста дендритных клеток и нуклеиновую кислоту, кодирующую первый гетерологичный цитокин (иногда называемые "нагрузки"). Примеры первых гетерологичных цитокинов включают интерлейкин-2 (IL2), IL7, IL12, IL15, IL21, TNF и другие представители интерлейкинового семейства цитокинов и белков, способных к связыванию рецепторов на иммунных клетках и/или способных к усилению функции Т-клеток или образованию памяти. В конкретном варианте осуществления первый гетерологичный цитокин представляет собой IL12 (мышинный или человеческий). Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие *muIL12a* и *muIL12b*, представлены под SEQ ID NO: 11 и 13 соответственно. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие *huIL12a* и *huIL12b*, представлены под SEQ ID NO: 3 и 5 соответственно. Последовательности аминокислот *muIL12a* и *muIL12b* представлены под SEQ ID NO: 12 и 14 соответственно. Последовательности аминокислот *huIL12a* и *huIL12b* представлены под SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно.

[0065] В своей нативной форме IL12 представляет собой гетеродимерный цитокин, содержащий IL12A (субъединица p35) и IL12B (субъединица p40), где каждая субъединица кодируется отдельным геном. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления онколитический вирус по настоящему изобретению содержит две гетерологичные нуклеиновые кислоты: одну, кодирующую субъединицу p35 IL12, и другую, кодирующую субъединицу p40 IL12. В других вариантах осуществления онколитический вирус по настоящему изобретению содержит вариант одноцепочечного IL12. В таких вариантах одноцепочечного IL12, субъединицы p35 и p40 могут быть непосредственно сочлененными друг с другом (т. е. без линкера) или могут быть соединены друг с другом посредством линкера (либо синтетического, либо на основе пептида). Примеры подходящих линкеров включают: линкеры на основе эластина (VPGVGVPGVGGG; последовательность нуклеиновой кислоты представлена под SEQ ID NO: 22; аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 23), G₄S, 2x(G₄S), 3x(G₄S), 4x(G₄S), 5x(G₄S), 6x(G₄S), 7x(G₄S), 8x(G₄S), 9x(G₄S) и 10x(G₄S). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой VPGVGVPGVGGG, G₄S,

2x(G₄S) или 3x(G₄S). В конкретном варианте осуществления линкер представляет собой G₄S.

[0066] Варианты IL12 могут содержать или могут исключать сигнальные пептиды (один для каждой субъединицы), присутствующие в нативном белке IL12. В некоторых вариантах осуществления вариант IL12 содержит один из сигнальных пептидов или оба сигнальных пептида или не содержит их. В конкретном варианте осуществления вариант IL12 содержит один сигнальный пептид - например, [IL12(p40-GGGGS-No SP-p35)] (последовательность нуклеиновой кислоты, представлена под SEQ ID NO: 7; аминокислотная последовательность, представлена под SEQ ID NO: 8), где сигнальный пептид p40 сохранен и сигнальный пептид p35 удален. См. фигуру 3.

[0067] Примеры гетерологичных факторов роста дендритных клеток включают цитокины, лектины С-типа и CD40L. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный фактор роста дендритных клеток представляет собой цитокин (т. е. второй цитокин), выбранный из перечня, включающего: лиганд fms-подобной тирозинкиназы 3, (FLT3L), GMCSF, TNF α , IL36 γ и IFN. В конкретном варианте осуществления гетерологичный фактор роста дендритных клеток представляет собой FLT3L. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая muFLT3L, представлена под SEQ ID NO: 9. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая huFLT3L, представлена под SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность muFLT3L представлена под SEQ ID NO: 10. Аминокислотная последовательность huFLT3L представлена под SEQ ID NO: 2.

[0068] В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус содержит нуклеиновую (нуклеиновые) кислоту (кислоты), кодирующую (кодирующие) FLT3L и IL12. В других вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой HSV-1, где гены вируса, кодирующие ICP34.5, и гены вируса, кодирующие ICP47, подвергаются делеции, и онколитический вирус содержит нуклеиновую (нуклеиновые) кислоту (кислоты), кодирующую (кодирующие) FLT3L и IL12.

[0069] Экзогенные нуклеиновые кислоты могут находиться под контролем одного и того же промотора или разных промоторов. В конкретном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая гетерологичный фактор роста дендритных клеток и нуклеиновая кислота, кодирующая первый гетерологичный цитокин, находятся под контролем одного и того же промотора. Преимуществом применения одного промотора (например, промотора CMV) является получение как гетерологичного фактора роста дендритных клеток, так и первого гетерологичного цитокина в одной и той же инфицированной клетке с одной и той же скоростью и в одно и то же время.

[0070] Примеры подходящих промоторов включают: промотор цитомегаловируса (CMV), вируса саркомы Рауса (RSV), промотор человеческого фактора элонгации 1 α (EF1 α), ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор убиквитина С (UBC) и промотор вируса стволовых клеток мышей (MSCV). В конкретном варианте осуществления промотор представляет собой промотор

CMV (последовательность нуклеиновой кислоты представлена под SEQ ID NO: 24).

[0071] При нахождении под контролем одного и того же промотора нуклеиновые кислоты, кодирующие нагрузки, могут быть связаны дополнительной нуклеиновой кислотой, которая, например, обеспечивает полицистронную трансляцию (полицистронные линкерные элементы). Примеры подходящих полицистронных линкерных элементов включают: сайты связывания рибосом (например, внутренние сайты связывания рибосомы (IRES) (SEQ ID NO: 19)), последовательности 2A (например, свиной тешовирус 2a (GSG-P2A; последовательность нуклеиновой кислоты представлена под SEQ ID NO: 17; аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 18), вирус *thosea asigna* 2A (T2A), вирус ящура 2A (F2A) и вирус ринита лошадей A (E2A)). Такие последовательности могут использоваться для соединения двух нуклеиновых кислот в любой ориентации. Например, нуклеиновые кислоты в геноме вируса могут быть ориентированы в следующем виде: [гетерологичный фактор роста дендритных клеток]-[P2A]-[первый гетерологичный цитокин] или [первый гетерологичный цитокин]-[P2A]-[гетерологичный фактор роста дендритных клеток].

[0072] Наблюдали, что применение IRES приводит к уменьшенному продуцированию второй нуклеиновой кислоты 3' IRES в конструкции. Например, продуцирование FLT3L в конструкции [IL12]-[IRES]-[FLT3L] было уменьшено, в то время как продуцирование IL12 в [FLT3L]-[IRES]-[IL12] было уменьшено. См. пример 4. Соответственно в одном варианте осуществления полицистронный линкерный элемент представляет собой 2A. В конкретном варианте осуществления полицистронный линкерный элемент представляет собой P2A.

[0073] Онколитические вирусы по настоящему изобретению могут также содержать последовательности, которые усиливают трансляцию (например, трансляцию у млекопитающих) экзогенных нуклеиновых кислот. Например, как известно, последовательности Козак усиливают трансляцию у млекопитающих. Таким образом в некоторых вариантах осуществления онколитический вирус содержит последовательность Козак. В одном варианте осуществления последовательность Козак представляет собой консенсусную последовательность Козак (SEQ ID NO: 20).

[0074] Онколитические вирусы по настоящему изобретению могут также содержать последовательности, которые усиливают стабильность экспрессируемых в вирусе мРНК. Примеры таких последовательностей включают сигнальную последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHPA) и кроличий бетаглобин (RBGPA), SV40 поли-A и hGH поли-A. В конкретном варианте осуществления последовательность представляет собой BGHPA (SEQ ID NO: 21).

[0075] Другие онколитические вирусы, которые могут быть модифицированы как описано в данном документе, включают RP1 (HSV-1/ICP34.5/ICP47/GM-CSF/GALV-GP R(-); RP2 (HSV-1/ICP34.5/ICP47/GM-CSF/GALV-GP R(-)/молекула, связывающая антитела к CTLA-4; и RP3 (HSV-1/ICP34.5/ICP47/GM-CSF/GALV-GP R(-)/молекула, связывающая антитела к CTLA-4/костимулирующие лиганды (например, CD40L, 4-1BBL,

GITRL, OX40L, ICOSL)). В таких онколитических вирусах GALV (вирус лейкоза гиббонов) был модифицирован посредством специфической делецией R-пептида, что привело к образованию GALV-GP R(-). Такие онколитические вирусы рассматриваются в WO2017118864, WO2017118865, WO2017118866, WO2017118867 и WO2018127713A1, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте. Дополнительные примеры онколитических вирусов, которые могут быть модифицированы, как описано в данном документе, включают NSC-733972, HF-10, BV-2711, JX-594, Myb34.5, AE-618, Brainwel™ и Hearwel™, Cavatak® (вирус Коксаки, CVA21), HF-10, Seprehvir®, Reolysin®, эннаденотуцирев, ONCR-177 и таковые, описанные в USP 10105404, WO2018006005, WO2018026872A1 и WO2017181420, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[0076] Дополнительные примеры онколитических вирусов, которые могут быть модифицированы, как описано в данном документе, включают:

[0077] G207, онколитический HSV-1, полученный из штамма F HSV-1 дикого типа, имеющий делеции в обеих копиях крупного эпитопа нейровирулентности HSV, ген ICP 34.5, и инактивирующую вставку гена lacZ E. coli в UL39, который кодирует белок 6 инфицированной клетки (ICP6), см. Mineta et al. (1995) Nat Med. 1:938-943.

[0078] OrienX010, вирус простого герпеса с делецией обеих копий γ 34.5 и гены ICP47, также как и прерывание гена ICP6 и вставку человеческого гена GM-CSF, см. Liu et al., (2013) World Journal of Gastroenterology 19(31):5138-5143.

[0079] NV1020, вирус простого герпеса, где совместный участок длинных (L) и коротких (S) участков подвергнут делеции, включая одну копию ICP34.5, UL24 и UL56.34,35. Подвергнутый делеции участок был заменен на фрагмент ДНК HSV-2 US (US2, US3 (PK), gJ и gG), см. Todo, et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA. 98:6396-6401.

[0080] M032, вирус простого герпеса с делецией обеих копий гена ICP34.5 и вставкой интерлейкина 12, см. Cassidy and Ness Parker, (2010) The Open Virology Journal 4:103-108.

[0081] ImmunoVEX HSV2, вирус простого герпеса (HSV-2), имеющий функциональные делеции генов, кодирующих vhs, ICP47, ICP34.5, UL43 и US5.

[0082] OncoVEX^{GALV/CD}, также полученный из штамма JS1 HSV-1 с генами, кодирующими ICP34.5 и ICP47, которые были подвергнуты функциональной делеции, и генами, кодирующими цитозиндезаминазу и фузогенный гликопротеин слияния лейкемии гиббона, вставленными в геном вируса вместо генов ICP34.5.

[0083] В конкретном варианте осуществления онколитический вирус по настоящему изобретению представляет собой HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12. В другом варианте осуществления онколитический вирус по настоящему изобретению представляет собой HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12, где указанный вирус получен из штамма JS1 HSV-1, депонированного в Европейской коллекции клеточных культур (ЕСААС) под номером доступа 01010209.

Комбинации с другими средствами

[0084] Онколитические вирусы по настоящему изобретению могут использоваться как одиночные средства для лечения заболеваний, таких как рак. Онколитические вирусы в целом, как обнаружено, являются безопасными с благоприятным профилем безопасности. Таким образом, онколитические вирусы по настоящему изобретению могут использоваться в комбинации с другими средствами без значительного отрицательного влияния на профиль безопасности.

[0085] Онколитические вирусы по настоящему изобретению (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) могут применяться в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, иммунными цитокинами, агонистами костимулирующих молекул, видами целевой терапии, а также видами терапии согласно стандартам клинической практики. Например, онколитические вирусы по настоящему изобретению (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) могут применяться в комбинации со средствами целевой терапии рака (например, ингибиторами MEK, такими как кобиметиниб, траметиниб и биниметиниб) и/или цитокинами (например, пегилированным IL2 (например, бемпегальдеслейкином) или пегилированным IL10 (например, пегилодецакином)).

Ингибиторы контрольных точек

[0086] Контрольные точки иммунного ответа представляют собой белки, которые регулируют некоторые типы клеток иммунной системы, такие как Т-клетки (которые играют центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете). Хотя контрольные точки иммунного ответа оказывают помощь в контроле иммунного ответа, они могут также предотвращать уничтожение раковых клеток Т-клетками. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа (или сокращенно "ингибиторы контрольных точек") могут блокировать активность белков контрольных точек иммунного ответа, отпуская "тормоза" иммунной системы, и позволяя Т-клеткам лучше уничтожать раковые клетки.

[0087] Применяемый в данном документе термин "ингибитор контрольных точек иммунного ответа" или "ингибитор контрольных точек" относится к молекулам, которые полностью или частично уменьшают, подавляют, препятствуют или модулируют один или несколько белков контрольных точек. Белки контрольных точек регулируют активацию Т-клеток или их функцию. Известны многочисленные белки контрольных точек, такие как CTLA-4 и его лиганды CD80 и CD86; и PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2 (Pardoll, Nature Reviews Cancer 12: 252-264, 2012). Такие белки являются ответственными за костимулирующие или ингибирующие взаимодействия ответов Т-клеток. Белки контрольных точек иммунного ответа регулируют и поддерживают аутоотолерантность и продолжительность и амплитуду физиологических иммунных ответов. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа включают антитела или могут быть получены из антител.

[0088] Ингибиторы контрольных точек могут включать низкомолекулярные ингибиторы или могут включать антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с рецепторами контрольных точек иммунного ответа и блокируют

или подавляют их, или подавляют лиганды рецепторов точек иммунного ответа. Иллюстративные молекулы контрольных точек, которые могут являться целью блокирования или подавления, включают без ограничения CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, GAL9, LAG3, TIM3, VISTA, KIR, 2B4 (принадлежит к семейству молекул CD2 и экспрессируется на всех клетках NK, $\gamma\delta$ и Т-клетках памяти CD8⁺ ($\alpha\beta$)), CD160 (также называемый BУ55), CGEN-15049, киназы СНК 1 и СНК2, A2aR и различные лиганды семейства В-7. Лиганды семейства В7 включают без ограничения В7-1, В7-2, В7-DC, В7-Н1, В7-Н2, В7-Н3, В7-Н4, В7-Н5, В7-Н6 и В7-Н7. Ингибиторы контрольных точек включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, другие связывающие белки, биологические терапевтические средства или малые молекулы, которые связываются с одним или несколькими из CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD 160 и CGEN- 15049 и блокируют или подавляют их активность.

[0089] Цитотоксический ассоциированный с Т-лимфоцитом белок 4 (CTLA-4) представляет собой молекулу контрольной точки иммунного ответа, которая подвергается понижающей регуляции биологические пути активации Т-клеток. CTLA-4 представляет собой отрицательный регулятор активации Т-клеток. Как было показано, блокада CTLA-4 усиливает активацию и пролиферацию Т-клеток. Комбинация вируса простого герпеса и антитела к CTLA-4 предназначена для усиления активации Т-клеток посредством двух различных механизмов с целью усиления противоопухолевого иммунного ответа на опухолевый антиген, высвобождаемый после литической репликации вируса в опухоли. Следовательно, комбинация вируса простого герпеса и антитела к CTLA-4 может усилить разрушение подвергнутых инъекции и не подвергнутых инъекции/дистальных опухолей, улучшить общий ответ опухоли и продлить общую выживаемость, в частности, где продление общей выживаемости сравнивается с продлением, полученным с использованием только антитела к CTLA-4.

[0090] Белок 1 программируемой гибели клеток (PD-1) представляет собой молекулу белка клеточной поверхности из 288 аминокислот, экспрессируемую на Т-клетках и про-В клетках, и играющую роль в их метаболизме/дифференцировке. Два лиганды PD-1, PD-L1 и PD-L2, являются представителями семейства В7. PD-1 ограничивает активность Т-клеток в периферических тканях во время воспалительного ответа на инфекцию и с целью ограничения аутоиммунитета блокада PD-1 *in vitro* усиливает пролиферацию Т-клеток и продуцирование цитокинов в ответ на вызов специфических антигенов-мишеней или аллогенные клетки в реакциях смешанных лимфоцитов. Сильная корреляция между экспрессией PD-1 и ответом была показана посредством блокады PD-1 (Pardoll, Nature Reviews Cancer, 12: 252-264, 2012). Блокада PD-1 может быть достигнута посредством различных механизмов, включающих применение антител, которые связываются с PD-1 или PD-L1.

[0091] Лиганд 1 программируемой гибели клеток (PD-L1), также называемый кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог 1 В7 (B7-Н1), представляет собой

белок, кодируемый геном CD274. См., Entrez Gene: Молекула CD274 CD274. PD-L1, трансмембранный белок 1 типа весом 40 кДа, который играет роль в подавлении иммунной системы, связывается с его рецептором (PD-1), находящимся на активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках для модуляции клеточной активации или подавления. См., Chemnitz et al., *Journal of Immunology*, 173 (2):945-54 (2004).

[0092] Другие ингибиторы контрольных точек иммунного ответа включают ингибиторы гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), такие как IMP321, растворимый слитый белок Ig (Brignone et al., 2007, *J. Immunol.* 179:4202-4211). Также включены ингибиторы В7, такие как ингибиторы В7-Н3 и В7-Н4 (например, антитело MGA271 к В7-Н3 (Loo et al., 2012, *Clin. Cancer Res.* July 15 (18) 3834). Другой ингибитор контрольных точек представляет собой TIM3 (домен иммуноглобулина Т-клетки и домен муцина 3) (Fourcade et al., 2010, *J. Exp. Med.* 207:2175-86 and Sakuishi et al., 2010, *J. Exp. Med.* 207:2187-94).

[0093] Как описано дополнительно в данном документе, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к применению комбинаций онколитических вирусов и ингибиторов контрольных точек для лечения видов рака. В другом аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим комбинацию онколитических вирусов и ингибиторов контрольных точек.

[0094] Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения, ингибитор контрольных точек представляет собой блокатор или ингибитор CTLA-4, PD-1, PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой блокатор или ингибитор CTLA-4, такой как тремелимуаб, ипилимуаб (также известный как 10D1, MDX-D010), BMS-986249, AGEN-1884, и антитела к CTLA-4, описанные в патентах США №№: 5811097; 5811097; 5855887; 6051227; 6207157; 6682736; 6984720; и 7605238, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой блокатор или ингибитор PD-L1 или PD-1 (например, молекулу, которая подавляет взаимодействие PD-1 с ингибиторами PD-L1 и/или PD-L2), включая такой как пембролизумаб (антитело к PD-1), ниволумаб (антитело к PD-1), CT-011 (антитело к PD-1), CX-072 (антитело к PD-L1), IO-103 (антитело к PD-L1), BGB-A333 (антитело к PD-L1), WBP-3155 (антитело к PD-L1), MDX-1105 (антитело к PD-L1), LY-3300054 (антитело к PD-L1), KN-035 (антитело к PD-L1), FAZ-053 (антитело к PD-L1), SK-301 (антитело к PD-L1), AK-106 (антитело к PD-L1), M-7824 (антитело к PD-L1), CA-170 (антитело к PD-L1), CS-1001 (антитело к PD-L1); SHR-1316 (антитело к PD-L1); BMS 936558 (антитело к PD-1), BMS- 936559 (антитело к PD-1), атезолизумаб (антитело к PD-L1), AMP 224 (белок слияния внеклеточного домена PD-L2 и антитела IgG1, сконструированного для блокирования взаимодействия PD-L2/PD-1), MEDI4736 (дурвалумаб; антитело к PD-L1), MSB0010718C (антитело к PD-L1) и другие, описанные в патентах США №№ 7488802; 7943743; 8008449; 8168757; 8217149 и РСТ опубликованных

заявках на патент №№: W003042402, WO2008156712, W02010089411, W02010036959, WO2011066342, WO2011159877, WO2011082400, и WO2011161699, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Дополнительные антитела к PD-1 включают PDR-001; SHR-1210; BGB-A317; BCD-100; JNJ-63723283; PF-06801591; BI-754091; JS-001; AGEN-2034; MGD-013; LZM-009; GLS-010; MGA-012; AK-103; генолимзумаб; достарлимаб; цемиплимаб; IBI-308; камрелизумаб; AMP-514; TSR-042; Sym-021; HX-008 и ABBV-368.

[0095] BMS 936558 представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, мишенью которого является PD-1. В I фазе клинических испытаний введение дважды в неделю BMS-936558 субъектам с трудно поддающимися лечению злокачественными опухолями на поздней стадии показало долговременные частичные или полные регрессии. Наиболее значительную частоту ответа на лечение наблюдали у субъектов с меланомой (28%) и почечно-клеточной карциномой (27%), но значительную клиническую активность также наблюдали у субъектов с немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), и некоторые ответы сохранялись в течение периода, составляющего более года.

[0096] BMS 936559 представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, мишенью которого является лиганд PD-L1 PD-1. Результаты I фазы показали, что введение данного лекарственного средства дважды в неделю привело к долговременным ответам, особенно у субъектов с меланомой. Диапазон частоты объективного ответа находился в пределах от 6% до 17% в зависимости от типа рака у субъектов с NSCLC на поздней стадии, меланомой, RCC или раком яичников, при этом некоторые субъекты испытывали ответы длительностью год или более.

[0097] AMP 224 представляет собой слитый белок внеклеточного домена второго лиганда PD-1, PD-L2 и IgG1, который потенциально может блокировать взаимодействие PD-L2/PD-1. AMP-224 в настоящее время находится в I фазе клинических испытаний в качестве монотерапии у субъектов с раком на поздней стадии.

[0098] MEDI4736 представляет собой антитело к PD-L1, которое продемонстрировало приемлемый профиль безопасности и долговременную клиническую активность в данном исследовании с повышением дозы. Продолжается расширение использования при нескольких видах рака и развитие MEDI4736 в качестве монотерапии и в комбинации.

Способы лечения заболевания или нарушения

[0099] Настоящее изобретение также относится к способам лечения заболеваний или нарушений, таких как рак, с помощью онколитического вируса (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12). Онколитические вирусы по настоящему изобретению (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12), могут использоваться для лечения любого вида рака, который можно лечить посредством инъекции (т. е., любой опухоли, которая может быть подвергнута инъекции, например, иглой, под контролем введения или без него (например, под визуальным или ультразвуковым контролем введения)). В некоторых

вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому (например, диффузную В-крупноклеточную лимфому), немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, колоректальный рак, меланому (например, увеальную меланому), плоскоклеточный рак головы и шеи, печеночно-клеточный рак, рак желудка, саркому (например, саркому мягких тканей, саркому Юинга, остеосаркому или рабдомиосаркому), рак пищевода и желудка, почечно-клеточную карциному, глиобластому, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), Т-клеточную лимфому кожи, карциному Меркеля или множественную миелому.

[00100] Термин "метастатический рак" относится к типу рака, который распространился из части тела, где он появился (т. е. первичного очага опухоли) в другие части тела. Когда рак распространяется в новый участок (т. е. образует метастазы), он все еще называется по части тела, где он появился. Например, рак толстой кишки, который распространился в поджелудочную железу, называется "рак толстой кишки с метастазами в поджелудочную железу", в отличие от рака поджелудочной железы. Лечение также основывается на том, где возник рак. Если рак толстой кишки распространяется в кости, он все еще является раком толстой кишки, и соответствующий врач будет рекомендовать виды лечения, которые, как было показано, способны бороться с метастатическим раком толстой кишки.

[00101] Настоящее изобретение также относится к применению комбинаций онколитических вирусов (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) и других средств (например, ингибиторов контрольных точек) для лечения типов рака таких как типы рака, рассмотренные выше.

[00102] Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболеваний или нарушений, таких как рак, посредством введения: (i) терапевтически эффективного количества онколитического вируса (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12); и (ii) терапевтически эффективного количества другого средства (например, ингибитора контрольных точек).

[00103] В определенных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к комбинации онколитического вируса (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) и антитела к PD-1, онколитического вируса (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) и антитела к PD-L1 или онколитического вируса (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) и антитела к CTLA-4. В конкретных вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12.

[00104] Во многих случаях рак присутствует у пациентов как в качестве первичной опухоли (т. е. опухоли, растущей на месте анатомической локализации, где прогрессирование опухоли началось и продолжилось с образованием массы раковых клеток), так и в качестве вторичной опухоли или метастаз (т. е. распространения опухоли

от ее первичного очага в другие части тела). Онколитические вирусы по настоящему изобретению могут быть эффективными в лечении опухолей посредством литического эффекта и системного иммунного эффекта. Например, HSV1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/FLT3L/IL12 подвергает опухолевые клетки физическому лизису, вызывая гибель клеток первичной опухоли и высвобождение происходящих из опухоли антигенов, которые затем распознаются иммунной системой. Кроме того, результатом репликации HSV1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/FLT3L/IL12 является продуцирование FLT3L и IL12, которые содействуют в установлении и поддержании противоопухолевого иммунного ответа (как местно, так и системно) так, что иммунная система может распознавать и атаковать как первичные, так и вторичные опухоли/метастазы. Соответственно настоящее изобретение предполагает лечение первичных опухолей, метастаз (т. е. вторичных опухолей) или обеих с помощью онколитического вируса (например, HSV1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/FLT3L/IL12) либо отдельно, либо в комбинации со вторым средством (например, ингибитором контрольных точек).

[00105] В некоторых вариантах осуществления способы лечения или применения, описанные в данном документе, включают лечение в комбинации со средствами целевой терапии рака, например, ингибиторами MEK, такими как кобиметиниб, траметиниб и биниметиниб. В других вариантах осуществления способы лечения или применения, описанные в данном документе, включают обработка с помощью цитокинов, таких как пегилированный IL2 (например, бемпегальдеслейкин) или пегилированный IL10 (например, пегилодекакин). В других вариантах осуществления способы лечения или применения, описанные в данном документе, включают обработка с помощью комбинации целевой терапии и иммуномодуляторов.

[00106] Способы по настоящему изобретению могут использоваться для лечения нескольких разных стадий рака. Большинство систем стадирования включают информацию, относящуюся к распространению рака в близлежащие лимфоузлы, расположению опухоли в организме, типу клеток (например, сквамозно-клеточная карцинома), распространению рака в различные части тела, размеру опухоли и степени злокачественности опухоли (т. е. уровня отклонения от нормы клеток и вероятности роста и распространения опухоли). Например, стадия 0 относится к присутствию измененных клеток, которые не распространились в близлежащую ткань - т. е. клеток, которые могут стать раковыми. Стадия I, стадия II и стадия III рака относятся к наличию рака. Чем выше стадия, тем крупнее раковая опухоль и тем большее степень ее распространения в близлежащих тканях. Стадия IV рака представляет собой рак, который распространился в дистальные части тела. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут использоваться для лечения метастатического рака.

Фармацевтические композиции

[00107] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим онколитические вирусы (например, HSV1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/FLT3L/IL12) или содержащим комбинацию онколитических вирусов (например, HSV1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/FLT3L/IL12) и ингибиторов контрольных точек, средств целевой

терапии рака и/или других иммуномодуляторов. Фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. Фармацевтически активные средства могут быть введены пациенту различными путями, включая, например, перорально или парентерально, таким путем как внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутриглазно, внутрисуставно, внутривнутрибрюшинно, внутривнутриректально, интрацестернально, внутритуморально, внутрисосудисто, внутривнутридермально или посредством пассивной или упрощенной абсорбции через кожу с применением, например, кожного пластыря или трансдермального ионофореза соответственно. В одном варианте осуществления онколитический вирус (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) вводится посредством инъекции в опухоль (т. е. посредством внутривнутриопухолевой инъекции). В другом варианте осуществления ингибитор контрольных точек (например, антитело к PD-1, антитело к PD-L1 или антитело к CTLA-4) вводится системно (например, внутривенно). В другом варианте осуществления средство целевой терапии (например, низкомолекулярный ингибитор киназы MEK, такой как кобиметиниб, траметиниб или биниметиниб) вводится системно пероральным путем. В еще одном варианте осуществления цитокины, такие как пегилированный IL2 (например, бемпегальдеслейкин) или пегилированный IL10 (например, пегилодекакин), вводят системно.

[00108] Специалист средней квалификации в данной области техники сможет определить дозировку и продолжительность лечения в соответствии с любым аспектом настоящего описания. Например, специалист в данной области техники может наблюдать за пациентами для определения того, следует ли начинать, продолжать, прекращать или восстанавливать лечение. Эффективное количество для конкретного пациента может варьироваться в зависимости от факторов, таких как состояние, подвергающееся лечению, общее состояние здоровья пациента и способ, путь и доза введения. Лечащий врач с применением параметров, известных из уровня техники, определяет подходящую дозу. Эффективное количество фармацевтической композиции, которая будет использоваться в терапии, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области будет принимать во внимание, что соответствующие уровни дозирования для лечения, таким образом, будут варьироваться в зависимости от доставляемой молекулы, показания, для которого применяют молекулу связывающего средства, пути введения и размера (веса тела, площади поверхности тела или размера органа) и состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. Соответственно, лечащий врач может подбирать дозировку и модифицировать путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта.

[00109] Клинические исследования продемонстрировали, что онколитические вирусы могут вводиться посредством инъекции непосредственно в кожные, подкожные

или лимфоузелковые очаги поражения, которые являются видимыми, прощупываемыми, или которые могут быть подвергнуты инъекции под ультразвуковым контролем введения. Таким образом, в одном аспекте фармацевтические композиции, содержащие HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12, вводятся посредством внутриочаговой инъекции. В некоторых вариантах осуществления HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 предоставлен в одноразовых флаконах объемом 1 мл с фиксированными концентрациями доз: 10^6 БОЕ/мл для исходной дозы и 10^8 БОЕ/мл для последующей дозы. Объем, вводимый посредством инъекции, может варьироваться в зависимости от типа опухоли. Например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 может быть введен посредством внутриопухолевой инъекции в кожные, подкожные и лимфоузелковые опухоли, которые могут быть подвергнуты инъекции дозой, составляющей не более 4,0 мл 10^6 бляшкообразующих единиц/мл (БОЕ/мл) в день 1 недели 1 с последующей дозой не более 4,0 мл 10^8 БОЕ/мл в день 1 недели 4, и каждые 2 недели (± 3 дня) после этого. В другом варианте осуществления HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 может быть введен посредством внутриопухолевой инъекции в кожные, подкожные и лимфоузелковые опухоли, которые могут быть подвергнуты инъекции, в дозе, составляющей не более 4,0 мл 10^6 бляшкообразующих единиц/мл (БОЕ/мл) в день 1 недели 1 с последующей дозой не более 4,0 мл 10^7 БОЕ/мл в день 1 недели 4, и каждые 2 недели (± 3 дня) после этого.

[00110] Композиции по настоящему изобретению могут содержать один или несколько дополнительных компонентов, включающих физиологически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель. Например, композиции могут содержать один или несколько из буфера, антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота, низкомолекулярного полипептида (например, имеющего менее 10 аминокислот), белка, аминокислоты, углевода, такого как глюкоза, сахароза или декстрины, хелатирующего средства, такого как EDTA, глутатиона, стабилизатора и вспомогательного вещества. Приемлемые разбавители включают, например, нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный со специфической сывороткой альбумина. Консерванты, такие как бензиловый спирт, также могут быть добавлены. Композиция может быть составлена как лиофилизат с применением подходящих растворов вспомогательных веществ (например, сахарозы) в качестве разбавителей.

[00111] В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек вводят в дозах 0,01 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,7 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг или любых комбинациях этих доз. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек вводится раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, раз в каждые две недели или раз в месяц. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек вводится в количестве одной дозы, двух доз, трех доз, четырех доз, пяти доз или 6 или более доз.

[00112] В определенных вариантах осуществления антитело к PD-1 вводится

посредством инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе, составляющей от приблизительно 1 до 30 мг/кг, например, от приблизительно 5 до 25 мг/кг, от приблизительно 10 до 20 мг/кг, от приблизительно 1 до 5 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг. Режим введения доз может варьироваться от, например, одного раза в неделю до одного раза в 2, 3 или 4 недели. В одном варианте осуществления антитело к PD-1 вводится в дозе, составляющей от приблизительно 10 до 20 мг/кг раз в две недели.

[00113] В одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1, например, ниволумаб, вводится внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 1 мг/кг до 3 мг/кг, например, приблизительно 1 мг/кг, 2 мг/кг или 3 мг/кг каждые две недели. В одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1, например, ниволумаб, вводится внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг с 3-недельными интервалами. В одном варианте осуществления ниволумаб вводится в количестве от приблизительно 1 мг/кг до 5 мг/кг, например, 3 мг/кг, и может быть введен в течение периода длительностью 60 минут, приблизительно от одного раза в неделю до одного раза в 2, 3 или 4 недели.

[00114] В одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1, например, пембролизумаба, вводится внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 1 мг/кг до 3 мг/кг, например, приблизительно 1 мг/кг, 2 мг/кг или 3 мг/кг каждые три недели. В одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1, например, пембролизумаба, вводится внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг с 3-недельными интервалами. В другом варианте осуществления молекула антитела к PD-1, например, пембролизумаба, вводится внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 100 мг/кг до 300 мг/кг, например, приблизительно 100 мг/кг, 200 мг/кг или 300 мг/кг каждые три недели. В одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1, например, пембролизумаба, вводится внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 200 мг/кг с 3-недельными интервалами.

[00115] В определенных вариантах осуществления антитело к TLA-4 (например, ипилимумаб) вводится посредством инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе, составляющей приблизительно 3 мг/кг IV Q3W в максимальном количестве, составляющем 4 дозы; приблизительно 3 мг/кг IV Q6W в максимальном количестве, составляющем 4 дозы; приблизительно 3 мг/кг IV Q12W в максимальном количестве, составляющем 4 дозы; приблизительно 10 мг/кг IV Q3W в максимальном количестве, составляющем 4 дозы; или приблизительно 10 мг/кг IV Q12W в максимальном количестве, составляющем 4 дозы. В определенных вариантах осуществления антитело к CTLA-4 (например, тремелимумаб) вводится посредством инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг Q4W; или приблизительно 15 мг/кг каждые 3 месяца.

[00116] В определенных вариантах осуществления антитело к PD-L1 (например, атезолизумаб) вводится посредством инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе, составляющей приблизительно 1200 мг IV Q3W до прогрессирования заболевания

или неприемлемой токсичности.

[00117] Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в способе лечения любого вида рака, который можно лечить посредством инъекции. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому (например, диффузную В-крупноклеточную лимфому), немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, колоректальный рак, меланому (например, увеальную меланому), плоскоклеточный рак головы и шеи, печеночно-клеточный рак, рак желудка, саркому (например, саркому мягких тканей, саркому Юинга, остеосаркому или рабдомиосаркому), рак пищевода и желудка, почечно-клеточную карциному, глиобластому, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), Т-клеточную лимфому кожи, карциному Меркеля или множественную миелому, где фармацевтическая композиция содержит онколитический вирус (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12), или онколитический вирус (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) и второе средство (например, ингибитор контрольных точек).

[00118] В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к терапевтически эффективному количеству онколитического вируса (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) для применения в лечении В-клеточной лимфомы (например, диффузной В-крупноклеточной лимфомы), немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, базальноклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, колоректального рака, меланомы (например, увеальной меланомы), плоскоклеточного рака головы и шеи, печеночно-клеточного рака, рака желудка, саркомы (например, саркомы мягких тканей, саркомы Юинга, остеосаркомы или рабдомиосаркомы), рака пищевода и желудка, почечно-клеточной карциномы, глиобластомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы), Т-клеточной лимфомы кожи, карциномы Меркеля или множественной миеломы. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к терапевтически эффективному количеству онколитического вируса (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12) и второго средства (например, ингибитора контрольных точек) для применения в лечении В-клеточной лимфомы (например, диффузной В-крупноклеточной лимфомы), немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, базальноклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы, колоректального рака, меланомы (например, увеальной меланомы), плоскоклеточного рака головы и шеи, печеночно-клеточного рака, рака желудка, саркомы (например, саркомы мягких тканей, саркомы Юинга, остеосаркомы или рабдомиосаркомы), рака пищевода и желудка, почечно-клеточной карциномы, глиобластомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы), Т-клеточной лимфомы кожи, карциномы Меркеля

или множественной миеломы.

Наборы

[00119] В другом аспекте настоящее изобретение относится к наборам, содержащим [1] онколитический вирус (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12), необязательно в комбинации с вторым средством (например, ингибитором контрольных точек); и [2] инструкции по введению пациентам. Например, набор по настоящему изобретению может содержать онколитический вирус (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12), и инструкции (например, на листке-вкладыше или этикетке) для лечения пациента, имеющего рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак. В другом варианте осуществления набор по настоящему изобретению может содержать онколитический вирус (например, HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12), ингибитор контрольных точек иммунного ответа (например, антитело к PD-1, антитело к PD-L1 или антитело к CTLA-4) и инструкции (например, на листке-вкладыше или этикетке) для лечения пациента, имеющего рак.

[00120] В некоторых вариантах осуществления второе средство представляет собой средство целевой терапии рака (например, ингибитор MEK, такой как кобиметиниб, траметиниб и биниметиниб) или цитокин (например, пегилированный IL2 (например, бемпегальдеслейкин) или пегилированный IL10 (например, пегилодекакин)).

[00121] В некоторых вариантах осуществления, набор, содержащий HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12, содержит инструкции (например, на листке-вкладыше или этикетке) для введения посредством интратуморальной инъекции в дозе, составляющей не более 4,0 мл 10^6 БОЕ/мл в день 1 недели 1 с последующей дозой, составляющей не более 4,0 мл 10^8 БОЕ/мл в день 1 недели 4, и каждые 2 недели после этого (например, до достижения полного ответа). В некоторых вариантах осуществления, набор, содержащий HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12, содержит инструкции (например, на листке-вкладыше или этикетке) для введения посредством интратуморальной инъекции в дозе, составляющей не более 4,0 мл 10^6 БОЕ/мл в день 1 недели 1 с последующей дозой, составляющей не более 4,0 мл 10^7 БОЕ/мл в день 1 недели 4, и каждые 2 недели после этого (например, до достижения полного ответа).

[00122] В вариантах осуществления, где набор содержит антитело к PD-1, набор содержит инструкции (например, на листке-вкладыше или этикетке) для внутривенного введения в дозах, описанных в данном документе. Примеры антител к PD-1 включают пембролизумаб и ниволумаб.

[00123] В вариантах осуществления, где набор содержит антитело к PD-L1, набор содержит инструкции (например, на листке-вкладыше или этикетке) для внутривенного введения в дозах, описанных в данном документе. Примеры антител к PD-L1 антител включают атезолизумаб.

[00124] В вариантах осуществления, где набор содержит антитело к CTLA-4, набор содержит инструкции (например, на листке-вкладыше или этикетке) для внутривенного введения в дозах, описанных в данном документе. Примеры антител к CTLA-4 включают

ипилимумаб.

[00125] В другом варианте осуществления предусмотрен способ изготовления наборов по настоящему изобретению.

ПРИМЕРЫ

[00126] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации конкретных вариантов осуществления или признаков настоящего изобретения и не предназначены для ограничения его объема.

Пример 1. Интерлейкин-12 (IL12), полученный в качестве одноцепочечного белка с субъединицей р40 в положении 5' и субъединицей р35 в положении 3' и соединенных посредством одного линкера G4S, является активным *in vitro* и *in vivo*

[00127] Действие сконструированной одноцепочечной молекулы IL12 со специфическими критериями создания приводит к оптимальной экспрессии и активности цитокина.

[00128] Оптимальную конфигурацию субъединиц р40 и р35 IL12 оценивали посредством анализа кристаллической структуры IL12 (PDB ID 3HMX). Как ожидается, одноцепочечный белок будет иметь более высокую степень эффективности гетеродимеризации, так как субъединицы находятся вблизи друг от друга для сборки. Ориентация р40-р35 (фигура 1А; пунктирные линии) является более структурно предпочтительной по сравнению с ориентацией р35-р40 в связи с близостью точек соединения С- и N-концов. Это приводит к образованию линкера, который перекрывает промежуток длиной ~36 ангстрем (соединяющий концевую карбоксильную группу р40 с начальной аминогруппой р35). Напротив, образование пептида р35-р40 приводит к появлению промежутка длиной ~60 ангстрем, для которого требуется более длинный линкер и который является менее благоприятным.

[00129] Для моделирования линкеров между субъединицами р40 и р35 субъединицы р40 и р35 кристаллической структуры IL12 (PDB 3HMX) получали с применением FastRelax с координационными ограничениями 0.5 Å в RosettaScripts (S. J. Fleishman, A. Leaver-Fay, J. E. Corn, E.-M. Strauch, S. D. Khare, N. Koga, J. Ashworth, P. Murphy, F. Richter, G. Lemmon, J. Meiler and D. Baker. RosettaScripts: A Scripting Language Interface to the Rosetta Macromolecular Modeling Suite. PLoS ONE. 2011, 6, 6, e20161). Полученный в результате PDB-файл соединяли в одну цепь с ориентацией р40-р35 и затем применяли Rosetta Remodel для моделирования следующих линкеров между двумя доменами: линкера на основе эластина, который был описан ранее (VPGVGVPGVGGGS), G4S (фигура 1B), 2x(G4S) (фигура 1C), 3x(G4S), и при отсутствии линкера. Неустановленный С-концевой остаток р40 (S340) и первые 11 остатков зрелой р35 (RNLPVATPDPG) включали в циклы Remodel. Также контроль, не имеющий неустановленных остатков, также включали в цикл. Ожидалось, что линкеры будут необходимы, так как рассчитанная степень закрытия петель, полученная с применением симуляций по моделированию петель с помощью Rosetta, была в значительной степени улучшена при включении линкеров. Для каждого линкера включали в цикл 2880

траекторий Remodel с применением вставки фрагментов от фрагментов петель для отбора образцов и обратной кинематики на основе CCD для закрытия петель. Модели оценивали с помощью набора значений веса Remodel и модели с успешными закрытиями петель (показатель поломки цепей $< 0,07$) записывали как файлы PDB. Степени закрытия петель определяли посредством оценки доли в процентах траекторий, соответствующих критериям закрытия петель. Для каждого линкера конформационное сходство измеряли посредством построения графика RMSD от каждой модели до модели с самым низким значением с применением RMSD Mover в RosettaScripts без наложения друг на друга. Десять лучших моделей для каждого линкера оценивали с помощью единиц энергии Rosetta (REU) на остаток и наименований показателей остова остатков линкеров (таблица 1). Модели с полными маргинальными остатками по карте Рамачандрана идентифицировали в MOE (Chemical Computing Group, Inc.).

[00130] Циклы Remodel без линкеров или с укороченными неустановленными концами p40 и p35 имели степени закрытия петель $< 10\%$, что дает основание предполагать, что для соединения субъединиц p40 и p35 в одну цепь необходим линкер. Напротив, циклы Remodel с линкерами имели успешные степени закрытия петель для всех четырех последовательностей линкеров. Модели с наивысшими показателями для всех четырех линкеров демонстрировали высокие показатели без нагрузки на остов или полных маргинальных остатков по карте Рамачандрана. Более длинные линкеры из эластина и линкеры 3x(G₄S) с большей вероятностью, чем линкеры G₄S и 2x(G₄S), являются конформационно гибкими, так как первые продемонстрировали большее расхождение RMSD с моделью с наивысшими показателями по сравнению с последними. Rosetta Remodel применяли для идентификации линкеров для нагрузки p40-линкер-p35. Модели с наивысшими показателями конструкций, соединенных с G₄S и 2xG₄S, указывают на то, что оба линкера являлись подходящими, как и линкер на основе эластина (фигура 2).

[00131] Краткое описание показателей закрытия петель дано в таблице 1, ниже.

Таблица 1. Степень закрытия петель для линкеров, оцененных для слияния цепей IL12p35 и IL12p40.

	эластин	G ₄ S	2x(G ₄ S)	3x(G ₄ S)	Без линкера	Без разупорядоченных областей
Цикл 1	28	19	316	312	13	0
Цикл 2	14	151	13	310	35	0
Цикл 3	13	187	175	318	41	0
Цикл 4	317	25	23	19	50	0
Цикл 5	317	138	319	14	9	0
Цикл 6	27	166	314	18	32	0

Цикл 7	243	313	178	317	23	0
Цикл 8	318	10	315	315	64	0
Цикл 9	14	310	299	19	7	0
Всего	1291	1319	1952	1642	274	0
Процент успешного закрытия петель (%)	44,8	45,8	67,8	57,0	9,5	0,0

[00132] Для подтверждения функции одноцепочечного IL12, установленной по моделированию *in silico*, конструкции одноцепочечного IL12 в различных форматах клонировали в вектор рΔ34.5(XS) (см. изображение конструкций, фигура 3А), вектор на основе рсDNA3.1 с конструкциями, вставленными между промотором CMV промотор и хвостом поли-А BGH. Инвертированные повторы HSV-1, фланкирующие промотор CMV и хвост поли-А BGH упрощают рекомбинацию конструкций одноцепочечного IL12, CMV и хвоста поли-А BGH в вирус HSV-1. Вектор рΔ34.5(XS) переводили в линейную форму рестриктазами Hind III и Xho I, которые следуют за промотором CMV и предшествуют хвосту поли-А BGH соответственно. Перекрывающиеся фрагменты ДНК, кодирующие конструкции одноцепочечного IL12, упорядочивали и клонировали в линеализованный вектор рΔ34.5(XS) с применением метода сборки Гибсона. Аутентичность конструкций одноцепочечного IL12 подтверждали с помощью секвенирования ДНК. Такие конструкции применяли для трансфекции клеток НЕК 293 *in vitro* и сравнения продуцирования белка IL12. Клетки трансфицировали с помощью 4 мкг ДНК с 8 мкл липофектамина 2000 в среде OptiMem и инкубировали в течение 48 часов при 37°C с 5% CO₂. Супернатанты удаляли и уровень экспрессии IL12 количественно определяли с применением анализа Biolegend ELISA человеческого IL12p70. Положение пептидных цепей приводило к значительному изменению экспрессии. Конструкция, содержащая р35-эластин-р40, не продуцировала поддающиеся обнаружению уровни IL12, в то время как конструкция, содержащая р40-эластин-р35, продуцировала IL12 (фигура 3В).

[00133] В нативной форме IL12 продуцируется в виде двух независимых цепей, каждая из которых содержит сигнальные пептиды, необходимые для секреции белка. В модифицированной версии оценивали необходимость второго сигнального пептида. Конструкцию, содержащую один сигнальный пептид, расположенный на 5'-конце слияния [IL12(р40-эластин-No SP-р35)] сравнивали с конструкцией, кодирующей сигнальные пептиды в обеих субъединицах р35 и р40 [IL12(р40-эластин-р35)]. Удаление второго сигнального пептида приводило к увеличению общего выхода IL12, полученного в результате трансфекции (фигура 3В). Наконец, экспрессию IL12 с линкером из эластина сравнивали с одним линкером G4S (фигура 3В). На основе этих наблюдений, кассету одноцепочечного IL12, включающую р40-G4S линкер-р35 с удаленным из субъединицы р35 сигнальным пептидом, выбрали для включения в вирус, полученный методами геной инженерии.

Пример 2. Биоактивные FLT3L и IL12 экспрессируются одновременно

посредством добавления линкера P2A.

[00134] Эти эксперименты относятся к генной инженерии, проводимой для получения биоактивных FLT3L и IL12 в бицистронном формате под контролем одного промотора с применением последовательности свиного тешовируса 2A.

[00135] Экспрессия нескольких рационально выбранных белков должна усилить иммуностимулирующую способность вируса для вызова противоопухолевого ответа. FLT3L и IL12 выбирали из иммуностимулирующих цитокинов. Один промотор (промотор CMV) использовали для получения обоих цитокинов. Преимуществом данного подхода являлось получение обоих цитокинов в одной и той же инфицированной клетке с одной и той же скоростью и в одно и то же время. Авторы настоящего изобретения выбрали два объекта для экспрессии нескольких белков посредством одного промотора: внутренние сайты связывания рибосомы (IRES) и последовательности 2A. ДНК-конструкции создавали посредством включения FLT3L-IRES-IL12, IL12-IRES-FLT3L или FLT3L-P2A-IL12. ДНК-конструкции тестировали *in vitro* как описано ранее (фигура 4A). ДНК-конструкции трансфицировали в клетки 293T и супернатанты тестировали с помощью ELISA (анализ Biolegend IL12p70 для IL12 и анализ Thermo FLT3L для FLT3L).

[00136] В любой ориентации (FLT3L в качестве первого гена и IL12 в качестве второго, или IL12 в качестве первого гена и FLT3L в качестве второго) продуцирование второго гена уменьшалась при применении IRES (фигуры 4B и 4C). По этой причине последовательность P2A выбирали в качестве функциональной единицы для обеспечения продуцирования двух белков посредством одного промотора.

[00137] Оценивали эффект консенсусной последовательности Козак в отдельных экспериментах с применением альтернативной нагрузки (GMCSF). Как известно, последовательности Козак усиливают трансляцию у млекопитающих, и ожидалось, что они улучшат трансляцию всей кассеты. В соответствии с этим экспрессия белка 5' (GMCSF) была в значительной степени увеличена посредством внедрения последовательности Козак выше сайта начала трансляции независимо от применения P2A или IRES (фигура 5; (ср. нг/мл с Козак=660,9; ср. нг/мл без Козак=102,5)).

[00138] Потенциальным следствием добавления сайта P2A является то, что он добавляет несколько аминокислот к концу белка FLT3L. P2A представляет собой последовательность, которая приводит к продуцированию двух различных полипептидных цепей в большинстве клеток млекопитающих, но первый полученный белок включает добавление аминокислотной последовательности GSGATNFSLLKQAGDVEENPG. Проводили моделирование *in silico* для определения того, будет ли добавление аминокислот к карбоксильному концу FLT3L влиять на взаимодействие с его рецептором, FLT3. PyMOL v. 1.8.6.0 применяли для оценки структуры комплекса Flt3L/Flt3 для выбора ориентации конструкции в кассете вектора с двойной нагрузкой нагрузка-1-P2A-нагрузка-2. P2A приводит к образованию белка из 18 аминокислот, сочлененного с С-концом нагрузки-1. Структура Flt3L/Flt3 показывает, что С-конец Flt3L является открытым и дистальным по отношению к сайту связывания

рецептора и интерфейсу димеризации Flt3L. Flt3L, следовательно, вероятно сможет перенести добавление метки P2A, и его выбирали как нагрузку, расположенную выше последовательности P2A (фигура 6). Однако, для подтверждения активности проводили демонстрацию биоактивности как FLT3L, так и IL12.

[00139] Для IL12 супернатанты, описанные ранее и применяемые в анализах ELISA для количественного определения общего количества экспрессируемого IL12, применяли в анализе по гену-репортеру клеток IL12. Биоактивность IL12 измеряли с применением клеток НЕК-Blue IL12 (Invivogen #hkb-il12). Биоактивный IL12 индуцирует зависимое от дозы продуцирование секретируемой эмбрионной щелочной фосфатазы (SEAP) посредством клеточной линии НЕК-Blue IL12, и уровни SEAP могут быть оценены с применением хромогенного реагента, QUANTI-Blue (Invivogen #rep-qb1). Супернатант из трансфицированных с помощью ДНК клеток 293Т добавляли непосредственно на 96-луночный плоскодонный планшет в виде трехкратных серийных разведений в двух повторностях с клетками НЕК-Blue IL12 и инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. На следующий день, реагент QUANTI-Blue готовили заново в соответствии с инструкциями изготовителя, подвергали предварительному нагреванию до 37°C в течение 15 мин и инкубировали с 20 мкл супернатанта ночной культуры клеток в течение 1 ч. при 37°C. Уровни SEAP определяли посредством измерения абсорбции при 620-630 нм с применением считывающего устройства для микропланшетов BioTek Synergy Neo2 (BioTek; программное обеспечение Gen5 v3.04). Супернатанты демонстрировали активность в анализе по гену-репортеру IL12, сравнимую с рекомбинантным человеческим белком IL12, приобретенным у коммерческого поставщика (R&D #219-IL-005; фигура 7).

[00140] Для FLT3L супернатанты также тестировали посредством анализа пролиферации клеток линии BaF3, которая описывается в литературе как чувствительная к FLT3L клеточная линия. Клетки BaF3 высевали в количестве 30000 клеток на лунку в 24-луночном планшете в RPMI+10% FBS+генетицин в течение ночи при 37°C. Супернатант от клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, содержащими сконструированные нагрузки или рекомбинантный человеческий FLT3L, добавляли к клеткам, и общий объем регулировали до 500 мкл для всех лунок перед инкубированием в течение 14 дней при 37°C в 5% CO₂. В день 14 клетки BaF3 осторожно ресуспендировали посредством пипетирования, и образец удаляли из каждой лунки для подсчета клеток с применением анализатора жизнеспособности клеток Vi-CELL XR (Beckman Coulter). Общее число жизнеспособных клеток в лунке рассчитывали на основе концентрации жизнеспособных клеток, предоставляемой Vi-CELL XR. Человеческий рекомбинантный FLT3L включали в качестве контроля, и супернатант от трансфицированных клеток 293Т демонстрировал сравнимые эффекты на клеточную пролиферацию (фигура 8).

[00141] На основе этих наблюдений, конечную конструкцию, подлежащую рекомбинации в геном HSV1, выбирали из человеческого FLT3L-P2A-huIL12(p40-G4S-r35) со способом генной инженерии, описанным выше.

Пример 3. Создание вируса HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12

[00142] HSV1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 создавали следующим образом.

Описание генома вируса.

[00143] HSV-1 получали из штамма JS1, депонированного в Европейской коллекции клеточных культур (ЕСААС) под номером доступа 01010209 В HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12, гены вируса HSV-1, кодирующие ICP34.5 и ICP47, подвергали функциональной делеции, как описано ранее. См., Liu et al., Gene Ther., 10:292-303, 2003; патент США № 7223593 и патент США № 7537924. В HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 функциональная делеция генов, кодирующих ICP34.5 и ICP47, в комбинации с ранней экспрессией US11 улучшает репликацию опухоли, в то же время поддерживая безопасность. Кодирующие последовательности человеческих FLT3L и IL12 вставляли в геном вируса на местах прежних двух сайтов генов ICP34.5 HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 (фигура 9). Человеческая кассета экспрессии FLT3L и IL12 заменяет почти весь ген ICP34.5, обеспечивая то, что любое потенциальное явление рекомбинации между HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 и вирусом дикого типа может привести только к образованию инактивированного непатогенного вируса и не может привести к образованию вируса дикого типа, несущего гены для человеческих FLT3L и IL12. Ген тимидинкиназы HSV (ТК) остается интактным в HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12, что делает вирус чувствительным к антивирусным средствам, таким как ацикловир. Следовательно, ацикловир может использоваться для блокирования репликации HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 при необходимости.

Создание транспортной плазмиды pΔ34.5.

[00144] Транспортную плазмиду, содержащую человеческую кассету экспрессии FLT3L и IL12, создавали на основе модифицированного вектора SP72 (Promega) как описано ранее (см., Liu et al., Gene Ther., 10:292-303, 2003; патент США № 7223593 и патент США № 7537924). Плазмида содержит модифицированный удаленный фрагмент Sau3AI HSV-1 17syn+ (нуклеотиды 123462-126790 с фрагментом NotI, кодирующим большую часть ICP34.5 (нуклеотиды 124948-125713)). Кассету экспрессии, содержащую CMV-КОЗАК-FLT3L-P2A-IL12-BGHNPolyA, вставляли в плазмиду возле исходного сайта NotI. Результатом вставки является кассета экспрессии, фланкированная участками 17syn+ HSV-1, вырезанными фрагментом Sau3AI (фигура 9).

Вставка терапевтических генов в HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12.

[00145] Гены вставляли в геном вируса посредством процесса гомологической рекомбинации. Клетки Vero трансфицировали посредством транспортной плазмиды pΔ34.5. Трансфицированные клетки затем инфицировали HSV-1/ICP34.5-ICP47/GFP (штамм JS1). Данный вирус содержал GFP в кодирующих ICP34.5 участках генома, где была вставлена кассета экспрессии CMV-FLT3L-P2A-IL12-BGHNPolyA. Обеспечивали продолжение реакции трансфекция-инфицирование до наблюдения полного CPE (цитопатического эффекта). Клетки и супернатанты, полученные из реакции трансфекции-инфицирования, разбавляли и применяли для инфицирования клеток Vero в 96-луночных

планшетах. Через 2 дня супернатанты оценивали посредством ELISA для идентификации вирионов, экспрессирующих IL12 и FLT3L. Клетки и супернатанты из IL12- и FLT3L-положительных лунок собирали и высевали в анализе бляшкообразования с клетками Vero. Через 2 дня рекомбинантные вирусы идентифицировали с помощью потери маркерного гена GFP. Потеря маркерного гена давала основание предполагать, что GFP в сайтах ICP34.5 был заменен на кассету экспрессии [CMV]-[Козак]-[Flt3L]-[P2A]-[IL12]-[BGHPA] (фигура 9). Бляшки, не связанные с GFP, идентифицировали с помощью флуоресцентного микроскопа и переносили в пробирку erpendorf, содержащую свежую питательную среду, с применением стерильного наконечника для пипетки. Вирус высвобождали из клеток посредством замораживания-оттаивания и вирус высевали на новые клетки. Данный способ повторяли каждые 2-3 дня до получения гомогенной популяции (т. е. никакие из бляшек не являлись зелеными). Валидацию вставки кассеты экспрессии CMV-FLT3L -P2A-IL12-BGHPolyA проводили посредством ПЦР и секвенирования.

Пример 4. Вирус HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 способен к инфицированию, репликации внутри и уничтожению опухолевых клеточных линий и продуцированию биоактивных FLT3L и IL12 in vitro.

[00146] Оценивали способность рекомбинированного вируса к поддержанию клеточной инфекции, репликации и лизиса клеток во время продуцирования биоактивных FLT3L и IL12.

[00147] Для подтверждения того, что вирус, полученный методами генной инженерии, был способен к репликации внутри человеческих клеток, две линии клеток человека инфицировали и количественно определяли общее количество вирусных частиц после инфицирования. 1 миллион клеток A375 или VERO высевали на 6-луночный планшет и инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂ в DMEM, содержащей 5% FBS. Клетки инфицировали вирусом HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 при MOI, составляющей 0,1, в трех повторностях и возвращали в инкубатор. Через 48 часов после инфицирования клетки и супернатанты собирали и титр вируса оценивали посредством анализа бляшек на клетках Vero. Оценивали сконструированный вирус HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 и вирус HSV-1/ICP34.5/ICP47/GMCSF (фигура 10).

[00148] Для подтверждения того, что модификации, введенные в вирус, не влияли на способность вируса инфицировать и лизировать клетки, проводили анализы уничтожения in vitro. Различные клеточные линии, как мышиноного (CT26), так и человеческого происхождения (HT-29, SK-MEL-5, FADU, и VxPC3) культивировали при различных значениях множественности заражения (MOI) вирусными частицами (фигура 11A-E). Результаты рассмотрены ниже.

Колоректальный рак мыши (CT26)

[00149] Клетки CT26 высевали на 96-луночный планшет в количестве 6000 клеток на лунку и инкубировали в течение ночи при 37°C. HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/GMCSF подвергали серийным разведениям (4-кратным, 10 лунок)

с начальным значением MOI, составляющим 100. После 72-часовой инкубации число клеток, остающихся в каждой лунке, количественно определяли с применением анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo Luminescent (Promega, Мадисон, Висконсин).

Линии опухолевых клеток человека (HT-29, SK-MEL-5, FADU и BxPC-3)

[00150] Различные клеточные линии солидных опухолей человека (колоректальной, меланомы, сквамозной карциномы головы и шеи и поджелудочной железы) высевали на 96-луночный планшет в количестве 7000-10000 клеток на лунку и инкубировали в течение ночи при 37°C. HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/GMCSF подвергали серийным разбавлениям (4-кратным, 10 лунок) с начальным значением MOI, составляющим 100. После 72-часовой инкубации число клеток, остающихся в каждой лунке, количественно определяли с применением анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo Luminescent (Promega #G7571, Мадисон, Висконсин) на считывающем устройстве для микропланшетов SpectraMax M5.

[00151] HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 являлся эффективным против всех тестируемых линий опухолевых клеток. Все тестируемые клеточные линии имели значения MOI IC₅₀ ниже 1. На фигуре 11 представлена степень ингибирования роста, достигнутая посредством увеличения концентраций HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 в каждой из пяти клеточных линий, наряду со значениями MOI IC₅₀. Эти результаты демонстрируют, что результатом воздействия на клеточные линии колоректального рака, меланомы, рака головы и шеи и рака поджелудочной железы HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12 является сильное подавление роста клеток опухоли со значениями MOI IC₅₀, которые являются сходными с HSV-1/ICP34.5/ICP47/GMCSF.

[00152] Оценивали продуцирование биоактивных FLT3L и IL12 *in vitro* в результате инфицирования HSV-1/ICP34.5/ICP47/FLT3L/IL12. Анализ экспрессии ELISA, анализ по гену-репортеру IL12 и анализ пролиферации клеток FLT3L повторяли с применением супернатантов, полученных от инфицированных вирусом клеток. Супернатанты от клеток A375 и VERO, применяемые для подтверждения репликации, подвергали скринингу как описано выше. ELISA IL12p70 подтвердил экспрессию IL12 для всех тестируемых клеточных линий (VERO, A375 и SK-MEL-5) (фигура 12A). Кроме того, ELISA FLT3L демонстрировал экспрессию FLT3L во всех тестируемых клеточных линиях (фигура 12B). Доказательство биоактивности IL12 устанавливали с применением описанного ранее анализа по гену-репортеру IL12 и анализа пролиферации клеточной линии BaF3. Супернатанты инфицированных вирусом клеток демонстрировали активный IL12 зависимым от дозы образом как в клетках SK-MEL-5 (фигура 13A), так и в клетках A375 (фигура 13B). Доказательство биоактивности FLT3L демонстрировали с применением клеточной линии BaF3, стимулированной супернатантами либо от клеточной линии SK-MEL-5 (фигура 14A), либо A375 (фигура 14B).

[00153] Во всех исследованных случаях супернатанты инфицированных вирусом клеток содержали биоактивный IL12 и FLT3L, как ожидалось на основе описания особенностей генной инженерии.

Пример 5. Вирус HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 способен к образованию биоактивных FLT3L и IL12 in vivo при лечении животных, несущих опухоль В-клеточной лимфомы (клеточная линия A20)

[00154] Оценивали экспрессию двойных нагрузок цитокина, кодируемых HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в модели опухоли A20 мыши.

[00155] Опухолевые клетки A20 (2×10^6 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую сторону самок мышей Balb/c в день 0. Объем опухоли (мм^3) измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). Как только опухоли достигали среднего размера примерно 230 мм^3 , животных рандомизировали в 5 групп (4 мыши на группу) таким образом, чтобы средний объем опухоли и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. Мыши получали внутриопухолевую инъекцию HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGM-CSF, HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L или HSV-1/ICP34.5/ICP47/mIL12 (каждая в дозе, составляющей 1×10^6 БОЕ/доза), и затем опухоли и плазму крови собирали через 16 часов. Уровни mGM-CSF, mFLT3L и mIL12 измеряли в лизатах опухоли и плазме крови, полученных от каждой группы обработки с применением анализа MSD (mGM-CSF и mIL12 (нуклеиновая кислота mIL-12 представлена под SEQ ID NO: 15; аминокислота mIL-12 представлена под SEQ ID NO: 16)) или R&D Quantikine ELISA (mFLT3L).

[00156] Результаты (фигура 15) указывают на то, что одна внутриопухолевая доза HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 приводит к экспрессии как mFLT3L, так и mIL12 в лизатах опухоли A20 и плазме крови через 16 часов.

Пример 6. Вирус HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 приводит к продуцированию биоактивных FLT3L и IL12 in vivo при лечении животных, несущих опухоль меланомы (клеточная линия B16F10)

[00157] Оценивали экспрессию двойных нагрузок цитокина, кодируемых HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в модели опухоли B16F10-mNectin1 мыши.

[00158] Опухолевые клетки B16F10-mNectin1 (3×10^5 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую сторону самок мышей C57Bl/6 в день 0. Объем опухоли (мм^3) измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). Когда опухоли достигали среднего размера примерно 210 мм^3 , животных рандомизировали в 5 групп (4 мыши на группу) таким образом, чтобы средний объем опухоли и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. Мыши получали единичную внутриопухолевую инъекцию HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGM-CSF, HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L или HSV-1/ICP34.5/ICP47/mIL12 (каждая при 5×10^6 БОЕ/доза), и затем опухоли и плазму крови собирали через 16 часов. Уровни mGM-CSF, mFLT3L и mIL12 измеряли в лизатах опухоли и плазме крови, полученных от каждой группы лечения с применением анализа MSD (mGM-CSF и mIL12) или R&D Quantikine ELISA (mFLT3L).

[00159] Результаты (фигура 16) указывают на то, что одна внутритуморальная доза HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 приводит к экспрессии как mFLT3L, так и mIL12 в лизатах опухоли A20 и плазме крови через 16 часов.

Пример 7. Вирус HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 вызывает системные противоопухолевые иммунные ответы после внутритуморальных инъекций *in vivo*

[00160] Оценивали системные противоопухолевые ответы Т-клеток, вызываемые обработкой с помощью HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12.

[00161] Опухолевые клетки A20 (2×10^6 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую и левую сторону самок мышей Balb/c в день 0. Объем опухоли (мм^3) измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). Когда опухоли достигали среднего размера примерно 100 мм^3 (день 11), животных рандомизировали в 3 группы (12 мышей на группу) таким образом, чтобы средний объем опухоли (в обеих сторонах) и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mGMCSF (3×10^4 БОЕ/доза) или контрольный буфер для составления вводили интратуморально (в правую сторону животного) в дни исследования 11, 14 и 17. В контралатеральные опухоли (на левой стороне животного) инъекции не вводились. Исследование останавливали в день 21 и собирали селезенки. Спленциты выделяли из отдельных селезенок и применяли в анализе цельных клеток ELISpot (CTL, Шейкер Хайтс, Огайо) для измерения числа Т-клеток, секретирующих mIFN- γ при смешении с опухолевыми клетками A20. Вкратце, $7,5 \times 10^4$ спленцитов смешивали с $1,5 \times 10^4$ опухолевых клеток A20 и инкубировали в течение 20 часов при 37°C. Анализатор CTL56 Fluorospot (CTL, Шейкер Хайтс, Огайо) применяли для считывания результатов анализа и подсчета пятен IFN- γ +

[00162] Результаты (фигура 17А) указывают на то, что обработка с помощью HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 привело к значительному увеличению системной противоопухолевой активности A20 по сравнению с лечением с помощью HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mGMCSF (427 точек на $7,5 \times 10^4$ спленцитов в отличие от 152 точек, соответственно; $p=0,0008$). В дополнение к цельным опухолевым клеткам, EliSpot проводили с применением идентифицированного вирусного антигена, ассоциированного с клеточной линией A20, АН1 (фигура 17В) и мутацией неоантигена, идентифицированной в клеточной линии A20, UV Rag (фигура 17С).

Пример 8. HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 вызывает противоопухолевую эффективность в модели опухоли изогенной мышинной модели В-клеточной лимфомы (клетки A20)

[00163] Данное исследование разрабатывали для оценки переносимости и противоопухолевой активности HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mGMCSF в контралатеральной модели опухоли A20 мыши.

[00164] Опухолевые клетки A20 (2×10^6 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую и левую сторону самок мышей Balb/c в день 0. Объем опухоли (мм^3)

измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). После того, как опухоли достигали объема, составляющего в среднем приблизительно 100 мм^3 , животных рандомизировали в 6 групп (10 мышей на группу) таким образом, чтобы средний объем опухоли (в обеих сторонах) и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF (3×10^4 БОЕ/доза) или контрольный буфер для составления вводили интратуморально (в правую сторону животного) каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем. В контралатеральные опухоли (на левой стороне животного) инъекции не вводились. Клинические признаки, изменения веса тела и выживаемость (мышей удаляли из исследования, когда опухоли достигали размера 800 мм^3) измеряли 2 раза в неделю до окончания исследования.

[00165] Все животные выжили на протяжении эксперимента и не проявляли признаков неблагоприятного воздействия на здоровье, ассоциированных с обработкой, что доказывал вес тела, и при ежедневных осмотрах для мониторинга состояния здоровья не выявляли неблагоприятные клинические признаки.

[00166] Подавление роста опухоли наблюдали как в подвергаемых обработке (правая сторона), так и в не подвергаемых обработке (левая сторона) опухолях у групп, получавших обработку HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF зависимым от дозы образом (фигура 18). Однако, наблюдалось увеличение числа полных ответов (10/10 по сравнению с 7/10) для подвергнутых обработке опухолей и контралатеральных опухолей (5/10 по сравнению с 2/10) у животных, получающих обработку с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 по сравнению с животными, получающими обработку с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF. Медиана выживаемости в значительной степени увеличивалась в группе, получающей обработку с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 по сравнению с HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF (53 дня по сравнению с 32 днями соответственно; $p = 0,048$).

[00167] Эти данные указывают на то, что обработка с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 привела к улучшенному контралатеральному устранению опухоли и улучшенной общей выживаемости.

Пример 9. Исследование, оценивающее эффективность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF в модели опухоли мышинной нейробластомы (Neuro2A)

[00168] Данное исследование разрабатывали для оценки переносимости и противоопухолевой активности HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF в контралатеральной модели опухоли Neuro2A мыши.

[00169] Опухолевые клетки Neuro2A (1×10^6 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую и левую сторону самок мышей Balb/c в день 0. Объем опухоли (мм^3) измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). После того, как опухоли достигали объема, составляющего в среднем

приблизительно 100 мм^3 , животных рандомизировали в группы (10 мышей на группу) таким образом, чтобы средний объем опухоли (в обеих сторонах) и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF (5×10^5 или 5×10^4 БОЕ/доза) или контрольный буфер для составления вводили интратуморально (в правую сторону животного) каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем. В опухоли (контралатеральные, на левой стороне животного) инъекции не вводились. Клинические признаки, изменения веса тела и выживаемость (мышей удаляли из исследования, когда опухоли достигали размера 800 мм^3) измеряли 2 раза в неделю до окончания исследования.

[00170] Все животные выжили на протяжении эксперимента и не проявляли признаков неблагоприятного воздействия на здоровье, ассоциированных с обработкой, что доказывал вес тела, и при ежедневных осмотрах для мониторинга состояния здоровья не выявляли неблагоприятные клинические признаки.

[00171] При количестве 5×10^5 БОЕ на дозу, как группа, получающая обработку HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, так и группа, получающая обработку HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF, являлись статистически значимыми по сравнению с группой животных, получавшей обработку контролем. При количестве 5×10^4 БОЕ на дозу общая выживаемость в группе, получающей обработку с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 по сравнению с HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF увеличилась (хотя медиана выживаемости для обеих групп составляла 20 дней; $p = 0,0056$).

[00172] Такие данные указывают на то, что обработка с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 привела к улучшенному контралатеральному устранению опухоли и улучшенной общей выживаемости.

Пример 10. Исследование, оценивающее эффективность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF в модели опухоли мышечной нейробластомы (CT26)

[00173] Данное исследование разрабатывали для оценки переносимости и противоопухолевой активности HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF в контралатеральной модели опухоли CT26 (также известной как colon26) мыши.

[00174] Опухолевые клетки CT26 (3×10^5 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую и левую сторону самок мышей Balb/c в день 0. Объем опухоли (мм^3) измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). После того, как опухоли достигали объема, составляющего в среднем приблизительно 100 мм^3 , животных рандомизировали в группы (10 мышей на группу) таким образом, чтобы средний объем опухоли (в обеих сторонах) и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF (5×10^6 БОЕ/доза) или контрольный буфер для составления вводили интратуморально (в

правый бок животного) каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем. В опухоли (контралатеральные, на левой стороне животного) инъекции не вводились. Клинические признаки, изменения веса тела и выживаемость (мышей удаляли из исследования, когда опухоли достигали размера 800 мм^3) измеряли 2 раза в неделю до окончания исследования.

[00175] Все животные выжили на протяжении эксперимента и не проявляли признаков неблагоприятного воздействия на здоровье, ассоциированных с обработкой, что доказывал вес тела, и при ежедневных осмотрах для мониторинга состояния здоровья не выявляли неблагоприятные клинические признаки.

[00176] При количестве 5×10^6 БОЕ на дозу, выживаемость как группы, получающей обработку с помощью HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12, так и группы, получающей обработку с помощью HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mGMCSF, являлась в значительной степени увеличенной по сравнению с группой животных, получавшей обработку контролем (контроль по сравнению с HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mGMCSF; $p=0,0017$ и контроль по сравнению с HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12; $p=0,0008$). Дополнительно, общая выживаемость группы, получавшей обработку с помощью HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 по сравнению с группой, получавшей обработку с помощью HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mGMCSF, являлась увеличенной (медиана выживаемости не определена для HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 по сравнению с 27 днями для HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mGMCSF; $p=0,0059$). См. фигуру 20.

[00177] Эти данные указывают на то, что обработка с помощью HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 привела к улучшенному контралатеральному устранению опухоли и улучшенной общей выживаемости по сравнению с обработкой либо контрольной группой, либо обработкой с помощью HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mGMCSF.

Пример 11. Исследование, оценивающее эффективность HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 в комбинации с блокадой контрольных точек (mAb к PD1) в модели колоректальной опухоли мыши (MC38)

[00178] Данное исследование разрабатывали для оценки переносимости и противоопухолевой активности HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 отдельно или в комбинации с моноклональным антителом (mAb) к белку 1 запрограммированной клеточной гибели (PD1) в контралатеральной модели опухоли MC38 мыши.

[00179] Опухолевые клетки MC38 (3×10^5 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую и левую сторону самок мышей C57BL/6 в день 0. Объем опухоли (мм^3) измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). После того, как опухоли достигали объема, составляющего в среднем приблизительно 100 мм^3 , животных рандомизировали в группы (10 мышей на группу) таким образом, чтобы средний объем опухоли (в обеих сторонах) и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. HSV-1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/mFLT3L/mIL12 (5×10^6 БОЕ/доза) или контрольный буфер для составления вводили интратуморально (в правый бок животного) каждые три

дня с общим количеством инъекций, равным трем. В опухоли (контралатеральные, на левой стороне животного) инъекции не вводились. Моноклональное антитело к PD1 (200 мкг/доза) вводили посредством внутривентриальной инъекции согласно одному и тому же графику (каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем). Клинические признаки, изменения веса тела и выживаемость (мышей удаляли из исследования, когда опухоли достигали размера 800 мм³) измеряли 2 раза в неделю до окончания исследования.

[00180] Все животные выжили на протяжении эксперимента и не проявляли признаков неблагоприятного воздействия на здоровье, ассоциированных с обработкой, что доказывал вес тела, и при ежедневных осмотрах для мониторинга состояния здоровья не выявляли неблагоприятные клинические признаки.

[00181] Оба отдельных вида лечения, отдельно с помощью mAb к PD1 и отдельно с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в количестве 5×10^6 БОЕ, демонстрировали в значительной степени увеличенную выживаемость по сравнению с группой животных, получавшей обработку контролем ($p < 0,0001$ для каждого сравнения соответственно). Выживаемость животных, получавших обработку отдельно с помощью антитела mAb к PD1, не являлась статистически значимой по сравнению с 5×10^6 БОЕ HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 отдельно ($p = 0,246$). Комбинация обоих видов обработки с помощью mAb к PD1 плюс 5×10^6 БОЕ HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, продемонстрировала в значительной степени увеличенную выживаемость по сравнению со всеми группами, подвергающимися обработке ($p = 0,0016$ по сравнению с 5×10^6 БОЕ HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 отдельно, $p < 0,0001$ по сравнению с mAb к PD1 отдельно и $p < 0,0001$ по сравнению с контрольной обработкой). См. фигуру 21.

[00182] Эти данные указывают на то, что в то время как обработка либо отдельно HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, либо отдельно с помощью mAb к PD1 привела к значительному улучшению общей выживаемости по сравнению с контрольной обработкой, комбинация обоих видов обработки привела к значительно улучшенной общей выживаемости по сравнению с любым видом обработки отдельно.

Пример 12. Исследование, оценивающее кинетику экспрессии цитокина HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в модели колоректальной (СТ26) опухоли мыши

[00183] Данное исследование разрабатывали для оценки кинетики экспрессии цитокина HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 при инъекции в рамках модели опухоли мыши СТ26.

[00184] Опухолевые клетки СТ26 (3×10^5 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую сторону самок мышей BALB/c в день 0. Объем опухоли (мм³) измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). После того, как опухоли достигали объема, составляющего в среднем приблизительно 100 мм³, животных рандомизировали в группы (5 мышей на группу для контроля, 25 мышей на группу для HSV-1/ICP34.5/ICP47 и 25 мышей на группу для HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12). Средний объем опухоли и вариабельность объема опухоли в начале

обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. Каждый из HSV-1/ICP34.5/ICP47 (5×10^6 БОЕ/доза вируса; не содержащий цитокиновую нагрузку вирус), HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 (5×10^6 БОЕ/доза вируса) и контрольного буфера для составления вводили интратуморально каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем. Клинические признаки и изменения веса тела измеряли 2 раза еженедельно до окончания исследования. 5 мышей на каждую группу, получавшую обработку вирусом, подвергали эвтаназии через 4, 24, 72, 168 и 240 часов после введения вируса. 5 мышей в контрольной группе умертвляли непосредственно после инъекции контрольного буфера для составления. Кровь выделяли и из нее получали сыворотку, опухоли извлекали из животного и из них получали лизат белка.

[00185] Все животные выжили на протяжении эксперимента и не проявляли признаков неблагоприятного воздействия на здоровье, ассоциированных с обработкой, что доказывал вес тела, и при ежедневных осмотрах для мониторинга состояния здоровья не выявляли неблагоприятные клинические признаки.

[00186] Сыворотку крови и лизаты белка опухоли анализировали на наличие мышинных FLT3L и IL-12, которые представляют собой два цитокина, кодируемые вирусом HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12. Вирус без цитокина (HSV-1/ICP34.5/ICP47) применяли для контроля эндогенной экспрессии цитокина.

[00187] В лизате опухоли все животные, подвергнутые инъекции HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 демонстрировали экспрессию IL-12 в лизате опухоли в день 7 (168 часов) после инъекции. 2 из 5 животных демонстрировали экспрессию IL-12 в день 10 (240 часов) после инъекции (фигура 22A). Все животные, подвергавшиеся инъекции либо контроля, либо вируса HSV-1/ICP34.5/ICP47 имели уровни IL-12, которые являлись ниже нижнего предела обнаружения (LLOD). В плазме крови IL-12 определяли у всех 5 животных, подвергавшихся инъекции HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 через 4 часа после инъекции. Через 24 часа после инъекции 4 из 5 животных, подвергавшихся инъекции HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, имели выявляемый IL-12. Все образцы, взятые в моменты времени через 24 часа, являлись ниже LLOD (фигура 22B).

[00188] В лизате опухоли все животные, подвергавшиеся инъекции HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 демонстрировали статистически значительное повышение в экспрессии FLT3L в лизате опухоли в день 3 (72 часа) после инъекции (4 часа HSV-1/ICP34.5/ICP47 по сравнению с HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, $p=0,0197$; 24 часа HSV-1/ICP34.5/ICP47 по сравнению с HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, $p=0,0043$, 72 часа HSV-1/ICP34.5/ICP47 по сравнению с HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, $p=0,0012$; 168 часа HSV-1/ICP34.5/ICP47 по сравнению с HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, $p=0,2281$; 240 часа HSV-1/ICP34.5/ICP47 по сравнению с HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, $p=0,4890$; фигура 22C). В плазме FLT3L являлся выявляемым во всех образцах от всех мышей из всех групп. В любой момент времени между группами не наблюдалось статистически значимых отличий (фигура 22D).

[00189] В лизате опухоли только животные, подвергавшиеся инъекции HSV-1/ICP34.5/ICP47 и HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, демонстрировали в значительной степени увеличенную экспрессию IFN- γ в лизате опухоли по сравнению с контролем через 4 часа после инъекции ($p=0,0057$). Через 24, 72, 168 и 240 часов после инъекции в опухолях, подвергавшихся обработке контролем, не наблюдался детектируемый IFN- γ . Через 24 часа после инъекции животные, получавшие HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, демонстрировали в значительной степени повышенные уровни IFN- γ по сравнению с HSV-1/ICP34.5/ICP47 ($p=0,0253$). Через 72, 168 и 240 часов после инъекции уровни IFN- γ в HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 являлись более высокими, чем HSV-1/ICP34.5/ICP47, но не были в состоянии достигнуть статистической значимости ($p=0,2306$, $0,1155$, и $p=0,0693$; соответственно; фигура 22E). Устойчивое продуцирование IFN- γ через 24 часа после инъекции соответствует продуцированию IL-12 и должно подготавливать усиленный противоопухолевый иммунный ответ. В плазме крови IFN- γ не наблюдали у животных, получавших обработку контролем. У животных, получавших обработку HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 и HSV-1/ICP34.5/ICP47, не наблюдалось статистически значимого отличия в IFN- γ в плазме крови через 4 часа после инъекции ($p=0,4803$), значительного повышения через 24 часа после инъекции ($p=0,0140$), и IFN- γ определяли в HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 через 72 часа. Все другие отметки времени и условия являлись ниже нижнего предела обнаружения (LLOD) для анализа (фигура 22F).

Пример 13. Исследование, оценивающее способность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 вызывать противоопухолевый T-клеточный ответ

[00190] Данное исследование оценивало противоопухолевый иммунный ответ, вызываемый инъекцией HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в рамках модели контралатеральной опухоли мыши MC38.

[00191] Опухолевые клетки MC38 (3×10^5 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую и левую сторону самок мышей C57BL/6 в день 0. Объем опухоли (мм^3) измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). После того, как опухоли достигали объема, составляющего в среднем приблизительно 100^3 , животных рандомизировали в группы (12 мышей на группу) таким образом, чтобы средний объем опухоли (в обеих сторонах) и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 (5×10^6 БОЕ/доза) или контрольный буфер для составления вводили интратуморально (в правый бок животного) каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем. В опухоли (контралатеральные, на левой стороне животного) инъекции не вводились. Моноклональное антитело к PD1 (200 мкг/доза) вводили посредством внутрибрюшинной инъекции согласно одному и тому же графику (каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем). Клинические признаки, изменения веса тела и объемы опухолей измеряли 2 раза еженедельно до окончания исследования в день 21.

[00192] Все животные выжили на протяжении эксперимента и не проявляли признаков неблагоприятного воздействия на здоровье, ассоциированных с обработкой, что доказывал вес тела, и при ежедневных осмотрах для мониторинга состояния здоровья не выявляли неблагоприятные клинические признаки.

[00193] Мышей подвергали эвтаназии в день 21, селезенки вырезали и анализ IFN- γ ELISpot (рестимуляции пептидов и цельных клеток) проводили для суспензии отдельных клеток спленоцитов. Для анализов рестимуляции пептидов 5×10^5 спленоцитов высевали и стимулировали в течение ночи с помощью 9-мономерных пептидов (представляющих собой либо неоантигены MC38, либо полученные из вирусов опухолевые антигены) в конечной концентрации, составляющей 1мкМ. Анализы цельных клеток устанавливали посредством высевания $1,25 \times 10^5$ спленоцитов с $1,25 \times 10^4$ клеток MC38. В каждом анализе подсчет пятен указывает на общее число экспрессирующих IFN- γ иммунных клеток.

[00194] В анализе рестимуляции пептидов обработка с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 отдельно привела к значительному повышению иммунореактивности к опухолевым клеточкам MC38; в анализе цельных клеток обработка с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 привела к значительному повышению активности против MC38 по сравнению с животными, получавшими обработку как с помощью контроля, так и с помощью антитела к PD1 ($p < 0,0001$ для обоих; фигура 23A). Иммунореактивность по отношению к полученному из вируса опухолевому антигену P15E была также в значительной степени увеличена у животных, получавших обработку с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 по сравнению с животными, получавшими контроль ($p=0,0008$; фигура 23B).

[00195] MC38 содержит несколько геномных мутаций, которые приводят к образованию неоантигенов. Количественно определяли иммунореактивность по отношению к таким опухолеспецифичным мутациям. У животных, получавших обработку с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, реактивность к Adpgk (фигура 23C), 2410127L17Rik (фигура 23D) и Aatf (фигура 23E) была в значительной степени повышена по сравнению с мышами, получавшими обработку контролем ($p=0,003$, $p=0,0416$ и $p=0,0035$ соответственно). Кроме того, комбинация HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 и блокады антитела к PD1 привела к значительному повышению иммунореактивности по отношению к Adpgk ($p=0,002$), Aatf ($p=0,040$), Cpne1 ($p=0,030$) и P15E ($p=0,0008$) по сравнению с обработкой отдельно HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12. Эти данные указывают на то, что обработка с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 может усилить противоопухолевый иммунный ответ в модели опухоли MC38. Данное увеличение может быть дополнительно усилено добавлением антитела к PD1. Создание системного противоопухолевого ответа и его усиление посредством блокады контрольных точек должно способствовать противоопухолевому иммунитету к как подверженным инъекции, так и неподверженным инъекции очагам поражения, как демонстрируют исследования эффективности в данном документе.

Пример 14. Исследование, оценивающее эффективность HSV-1/ICP34.5/ICP47

/mFLT3L/mIL12 в комбинации с агонистом mAb 4-1BB в модели колоректальной опухоли мыши (MC38)

[00196] Данное исследование разрабатывали для оценки переносимости и противоопухолевой активности HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 отдельно или в комбинации с антителом-агонистом, мишенью которого является 4-1BB (также известный как CD137) в контралатеральной модели опухоли мыши MC38.

[00197] Опухолевые клетки MC38 (3×10^5 клеток) вводили посредством инъекции подкожно в правую и левую сторону самок мышей C57BL/6 в день 0. Объем опухоли (мм^3) измеряли с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). После того, как опухоли достигали объема, составляющего в среднем приблизительно 100 мм^3 , животных рандомизировали в группы (10 мышей на группу) таким образом, чтобы средний объем опухоли (в обеих сторонах) и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являлись одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 (5×10^6 БОЕ/доза) или контрольный буфер для составления вводили интратуморально (в правый бок животного) каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем. В опухоли (контралатеральные, на левой стороне животного) инъекции не вводились. Моноклональное антитело к 4-1BB (150 мкг/доза) вводили посредством внутрибрюшинной инъекции согласно одному и тому же графику (каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем). Клинические признаки, изменения веса тела и выживаемость (мышей удаляли из исследования, когда опухоли достигали размера 800 мм^3) измеряли 2 раза в неделю до окончания исследования.

[00198] Все животные выжили на протяжении эксперимента и не проявляли признаков неблагоприятного воздействия на здоровье, ассоциированных с обработкой, что доказывал вес тела, и при ежедневных осмотрах для мониторинга состояния здоровья не выявляли неблагоприятные клинические признаки.

[00199] Оба отдельных вида лечения, отдельно с помощью mAb к 4-1BB и отдельно с помощью HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в количестве 5×10^6 БОЕ, демонстрировали в значительной степени увеличенную выживаемость по сравнению с группой животных, получавшей обработку контролем ($p=0,0048$ и $p<0,0001$ для каждого сравнения соответственно). Выживаемость животных, подвергавшихся обработке 5×10^6 БОЕ HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 являлась статистически значимой по сравнению с лечением с помощью mAb к 4-1BB отдельно ($p=0,0175$). Комбинация обоих видов лечения с помощью mAb к 4-1BB плюс 5×10^6 БОЕ HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 продемонстрировала в значительной степени увеличенную выживаемость по сравнению со всеми группами, подвергающимися обработке ($p=0,0246$ по сравнению с 5×10^6 БОЕ HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 отдельно, $p=0,0004$ по сравнению с mAb к 4-1BB отдельно и $p<0,0001$ по сравнению с контрольной группой). См. фигуру 24.

[00200] Эти данные указывают на то, что в то время как обработка либо отдельно HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12, либо отдельно mAb к 4-1BB привела к

значительному улучшению общей выживаемости по сравнению с контрольной группой, комбинация обоих видов обработки привела к значительно улучшенной общей выживаемости по сравнению с любым видом обработки отдельно.

Пример 15. Исследование, оценивающее эффективность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 в комбинации с молекулой биспецифического рекрутера Т-клеток (ViTE®) в модели колоректальной опухоли мыши (MC38)

[00201] Данное исследование оценивает переносимость и противоопухолевую активность HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 отдельно или в комбинации с молекулой биспецифического рекрутера Т-клеток (ViTE®) в контралатеральной модели опухоли мыши MC38, сверхэкспрессирующей адгезивную молекулу эпителиальных клеток человека (ErCAM).

[00202] Опухолевые клетки MC38, сконструированные для экспрессии человеческой ErCAM (3×10^5 склеток) вводятся посредством инъекции подкожно в правую и левую сторону самок мышей C57BL/6, которые сконструированы таким образом, что они экспрессируют человеческий CD3 из эндогенного локуса мыши CD3 в день 0. Объем опухоли (мм^3) измеряют с применением электронного штангенциркуля два раза в неделю (Q2W). После того, как опухоли достигали объема, составляющего в среднем приблизительно 100 мм^3 , животных рандомизируют в группы (10 мышей на группу) таким образом, что средний объем опухоли (в обеих сторонах) и вариабельность объема опухоли в начале обработки посредством введения являются одинаковыми среди групп, подвергающихся обработке. HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 (5×10^6 БОЕ/доза) или контрольный буфер для составления вводят интратуморально (в правую сторону животного) каждые три дня с общим количеством инъекций, равным трем. В опухоли (контралатеральные, на левой стороне животного) инъекции не вводятся. Молекула ViTE®, содержащая связывающие домены антитела к человеческому CD3 и антитела к человеческому ErCAM (150 мкг/кг) вводится посредством внутривенной инъекции раз в неделю с общим количеством инъекций, равным двум. Клинические признаки, изменения веса тела и выживаемость (мышей удаляют из исследования, когда опухоли достигали размера 800 мм^3) измеряют 2 раза в неделю до окончания исследования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Онколитический вирус, содержащий:
последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный фактор роста дендритных клеток; и
последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый гетерологичный цитокин.
2. Онколитический вирус по п. 1, где указанная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая гетерологичный фактор роста дендритных клеток, и указанная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый гетерологичный цитокин, соединены последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей линкерный элемент.
3. Онколитический вирус по п. 2, где указанный линкерный элемент представляет собой свиной тешовирус 2a (P2A) или внутренний сайт связывания рибосомы (IRES).
4. Онколитический вирус по любому из пп. 1-3, где указанный онколитический вирус представляет собой вирус простого герпеса.
5. Онколитический вирус по п. 4, где указанный вирус простого герпеса представляет собой вирус простого герпеса 1.
6. Онколитический вирус по любому из пп. 1-5, где у указанного онколитического вируса дополнительно:
отсутствует функциональный ген, кодирующий ICP 34.5; и
отсутствует функциональный ген, кодирующий ICP 47.
7. Онколитический вирус по любому из пп. 1-6, где указанный онколитический вирус дополнительно содержит промотор, и обе из указанной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей фактор роста дендритных клеток, и указанной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый цитокин, находятся под контролем указанного промотора.
8. Онколитический вирус по любому из пп. 1-7, где указанный онколитический вирус дополнительно содержит:
первый промотор, где указанная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фактор роста дендритных клеток, находится под контролем указанного первого промотора; и
второй промотор, где указанная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый цитокин, находится под контролем указанного второго промотора.
9. Онколитический вирус по любому из пп. 1-8, где указанный первый гетерологичный цитокин представляет собой интерлейкин.
10. Онколитический вирус по п. 9, где указанный интерлейкин представляет собой интерлейкин-12 (IL12).
11. Онколитический вирус по любому из пп. 1-10, где указанный гетерологичный фактор роста дендритных клеток представляет собой второй цитокин.
12. Онколитический вирус по п. 11, где указанный второй цитокин представляет собой лиганд Fms-подобной тирозинкиназы-3 (FLT3L).

13. Онколитический вирус по любому из пп. 1-12, где указанный онколитический вирус представляет собой вирус простого герпеса 1 (HSV-1),

где:

у указанного HSV-1:

отсутствует функциональный ген, кодирующий ICP34.5, и

отсутствует функциональный ген, кодирующий ICP47;

указанный гетерологичный фактор роста дендритных клеток представляет собой FLT3L; и

указанный гетерологичный первый цитокин представляет собой IL12.

14. Онколитический вирус по п. 13, где указанная нуклеиновая кислота, кодирующая IL12, и указанная нуклеиновая кислота, кодирующая FLT3L, присутствуют на месте прежнего сайта гена, кодирующего ICP34.5.

15. Онколитический вирус по п. 14, где указанная нуклеиновая кислота, кодирующая IL12, и указанная нуклеиновая кислота, кодирующая FLT3L, связаны посредством P2A.

16. Онколитический вирус по п. 15, где указанные нуклеиновые кислоты, кодирующие IL12, FLT3L и P2A, присутствуют в виде: [Flt3L]-[P2A]-[IL12].

17. Онколитический вирус по п. 16, где указанная [Flt3L]-[P2A]-[IL12] находится под контролем одного промотора.

18. Онколитический вирус по п. 17, где указанный промотор выбран из перечня, включающего: промотор цитомегаловируса (CMV), вируса саркомы Рауса (RSV), промотор человеческого фактора элонгации 1 α (EF1 α), ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор убиквитина С (UBC) и промотор вируса стволовых клеток мышей (MSCV).

19. Онколитический вирус по любому из пп. 1-18, где указанный онколитический вирус дополнительно содержит сигнальную последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHrA).

20. Онколитический вирус по любому из пп. 1-19, где указанный онколитический вирус дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, которая усиливает трансляцию у млекопитающих.

21. Онколитический вирус по п. 20, где указанная нуклеиновая кислота, которая усиливает трансляцию у млекопитающих, представляет собой последовательность Козак или консенсусную последовательность Козак.

22. Последовательность Козак по п. 21, где указанная консенсусная последовательность Козак представлена под SEQ ID NO: 20.

23. Онколитический вирус по любому из пп. 1-22, где указанный онколитический вирус содержит нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, кодирующие [CMV]-[Козак]-[Flt3L]-[P2A]-[IL12]-[BGHrA].

24. Онколитический вирус по любому из пп. 1-23, где указанный IL12 присутствует в виде [субъединица P40]-[GGGGS]-[субъединица P35].

25. Онколитический вирус по любому из пп. 1-24, где сигнальный пептид в субъединице P35 IL12 отсутствует.

26. Онколитический вирус по любому из пп. 1-25, где указанный онколитический вирус получен из штамма JS1.

27. Онколитический вирус по любому из пп. 1-26, где указанный онколитический вирус содержит:

последовательность FLT3L, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 1; и последовательность IL12, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 7.

28. Онколитический вирус по п. 27, где указанный онколитический вирус представляет собой HSV1/ICP34.5⁻/ICP47⁻/FLT3L/IL12.

29. Онколитический вирус по п. 28, где указанный онколитический вирус содержит:

промотор CMV, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 24;

последовательность Козак, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 20;

последовательность FLT3L, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 1;

последовательность P2A под SEQ ID NO: 17;

последовательность IL12, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 7, и

последовательность BGHrA, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 21.

30. Способ лечения рака с применением онколитического вируса по любому из пп. 1-29.

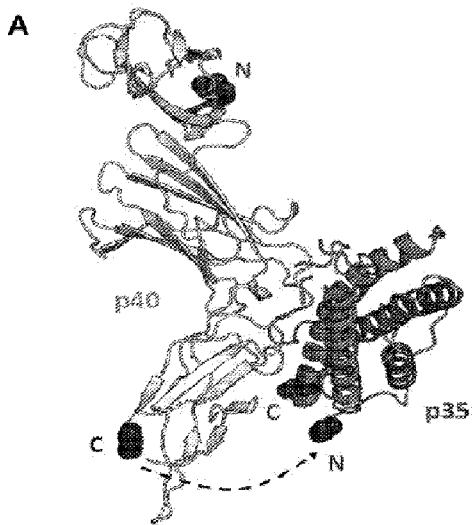
31. Терапевтически эффективное количество онколитического вируса по любому из пп. 1-29 для применения в лечении рака.

32. Фармацевтическая композиция для применения в способе лечения рака, где указанная фармацевтическая композиция содержит онколитический вирус по любому из пп. 1-29.

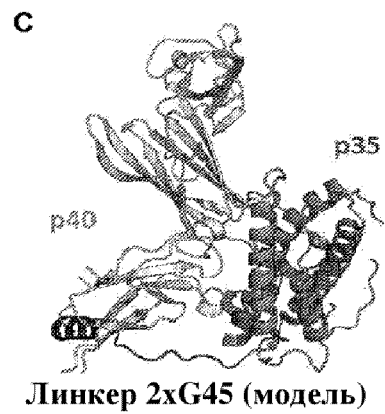
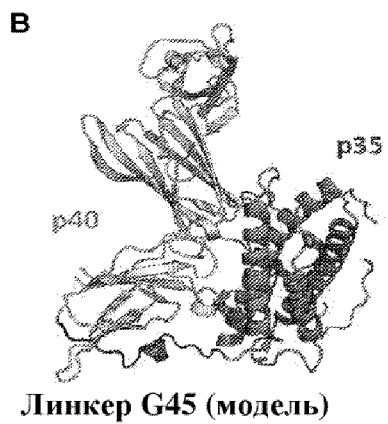
33. Фармацевтическая композиция по п. 32, где указанная композиция дополнительно содержит ингибитор контрольных точек.

34. Набор, содержащий онколитический вирус по любому из пп. 1-29.

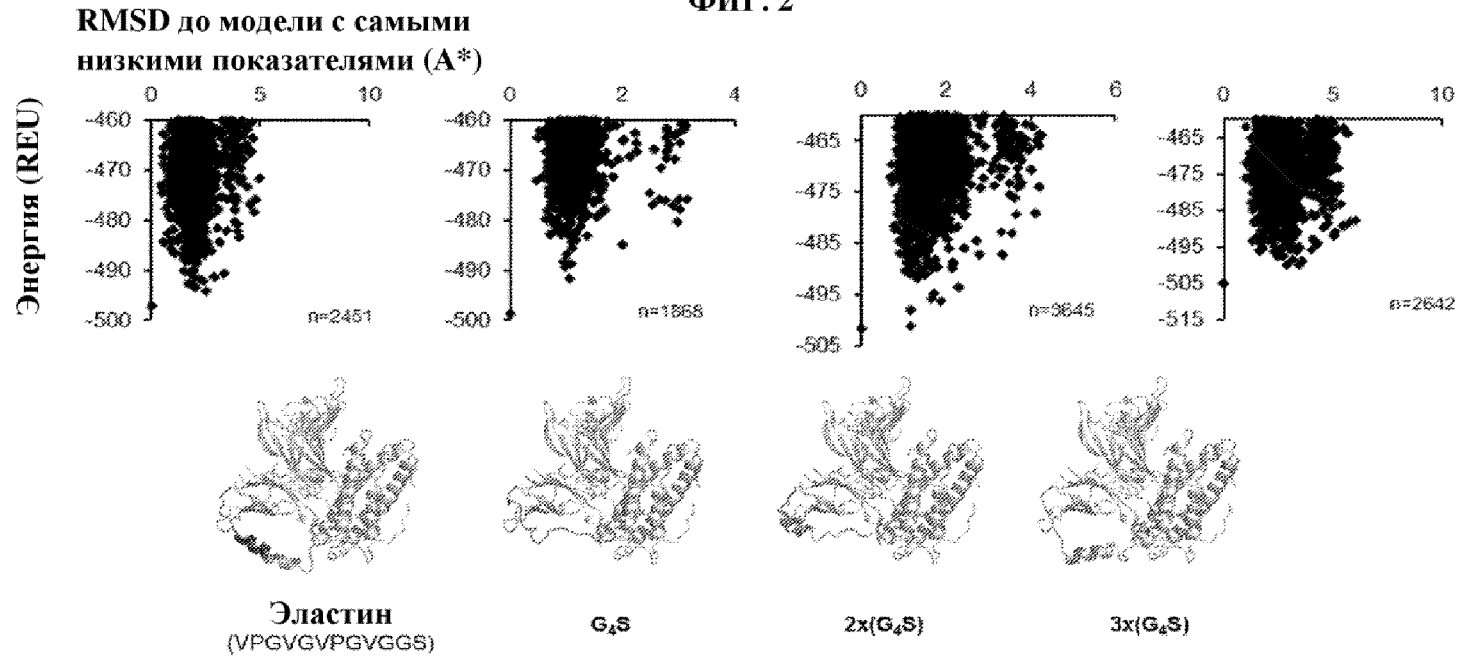
По доверенности



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3

A

Конструкция

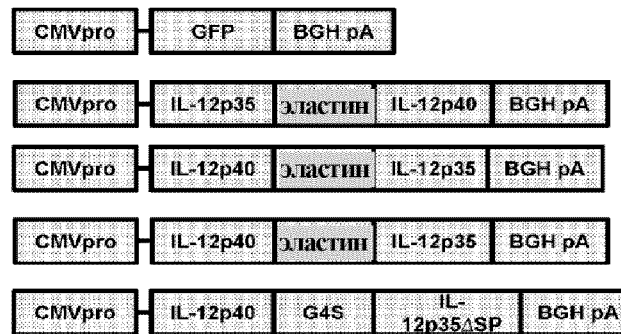
Контроль GFP

IL-12(p35-эластин-p40)

IL-12(p40-эластин-p40)

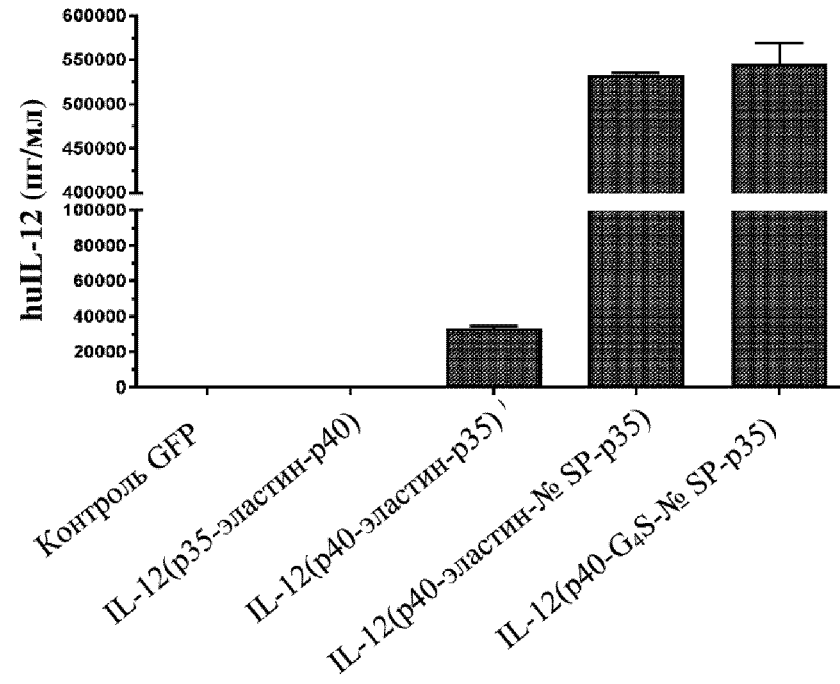
IL-12(p40-эластин-№ SP-p35)

IL-12(p40-G4S-№ SP-p35)



ФИГ. 3 (продолжение)

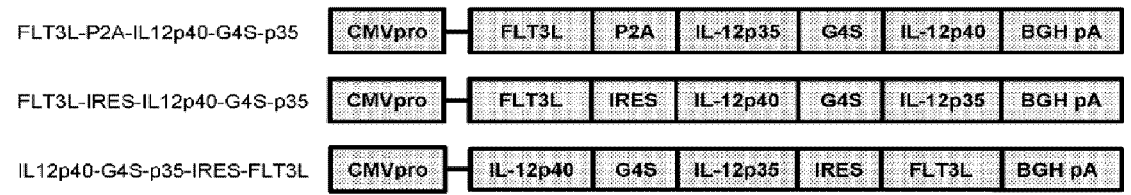
В



ФИГ. 4

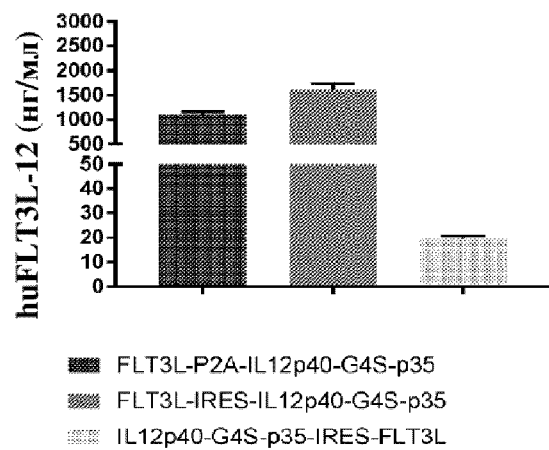
A

Конструкция

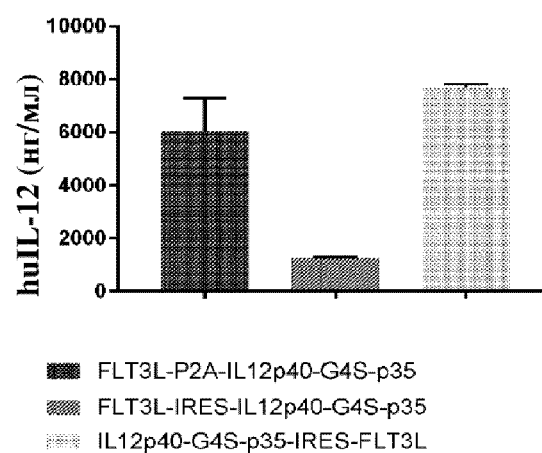


ФИГ. 4 (продолжение)

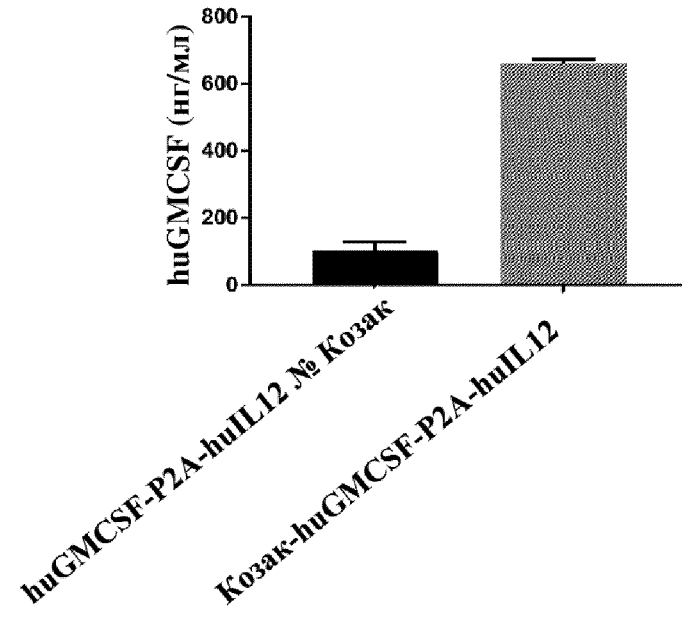
В



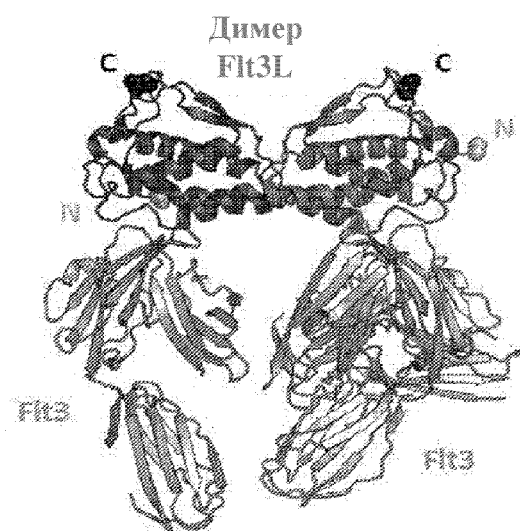
С



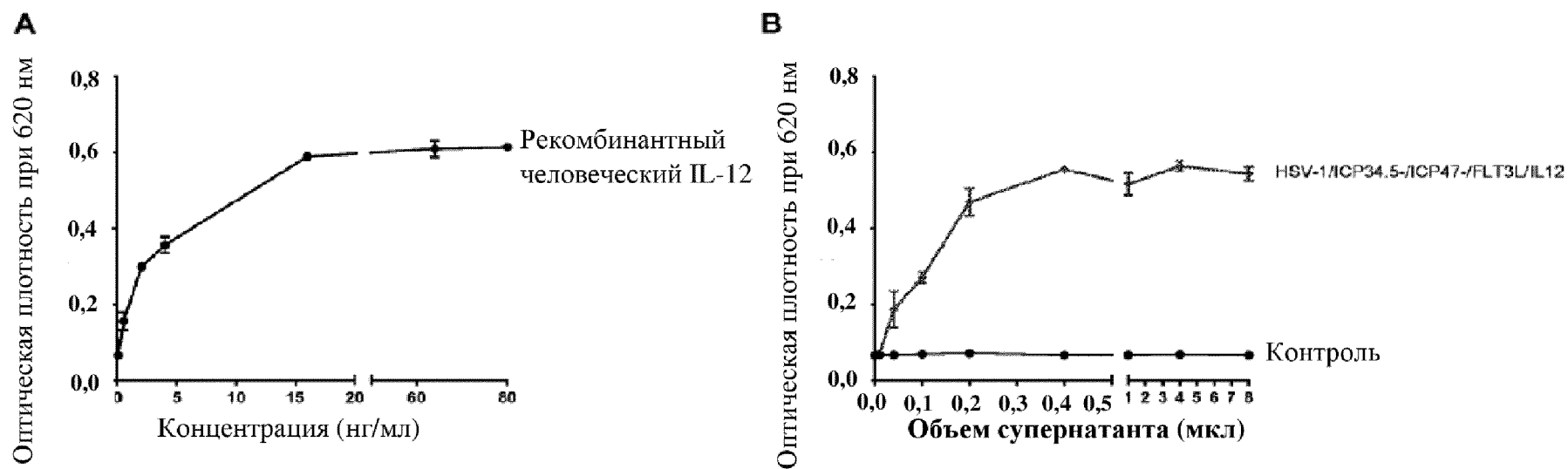
ФИГ. 5



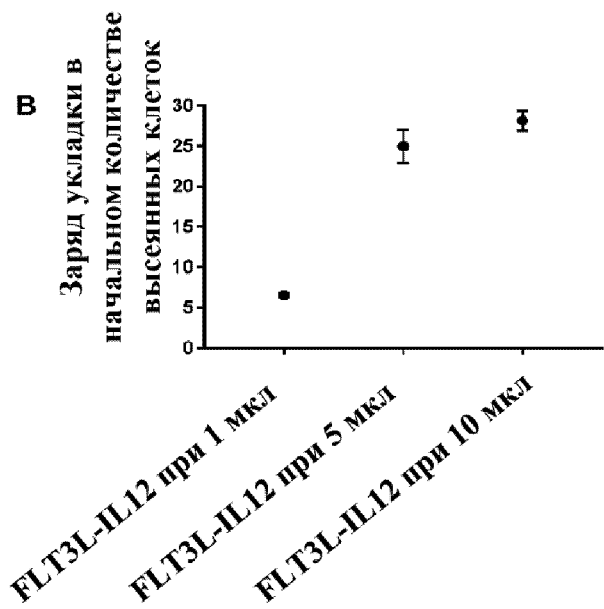
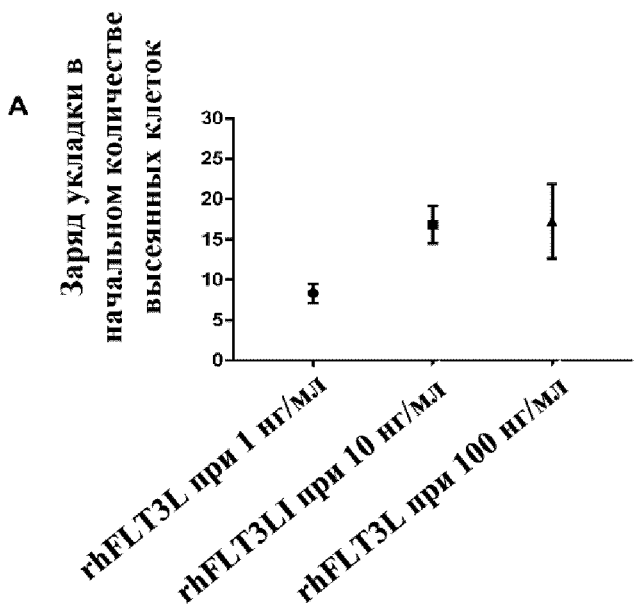
ФИГ. 6



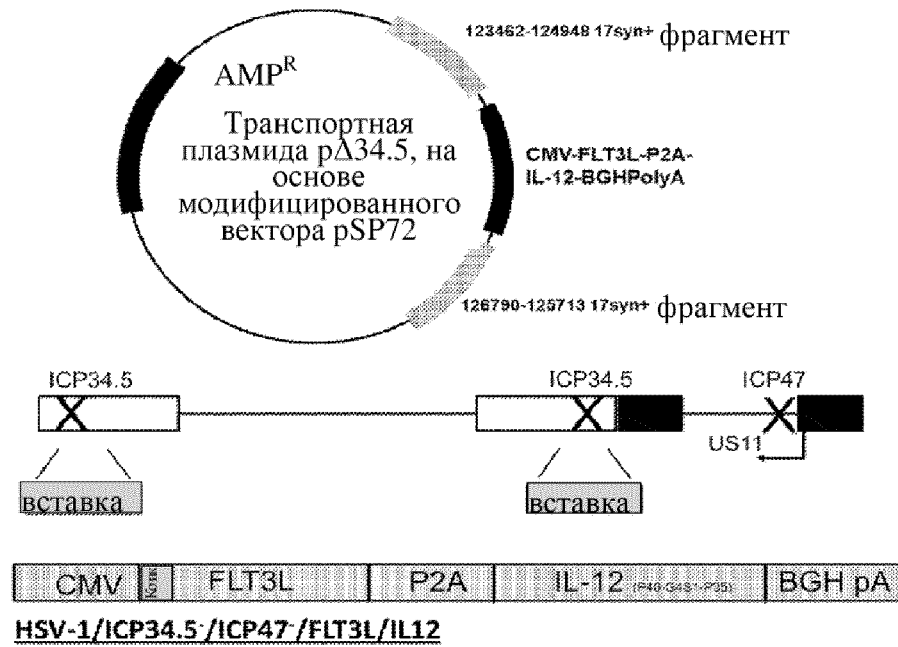
ФИГ. 7



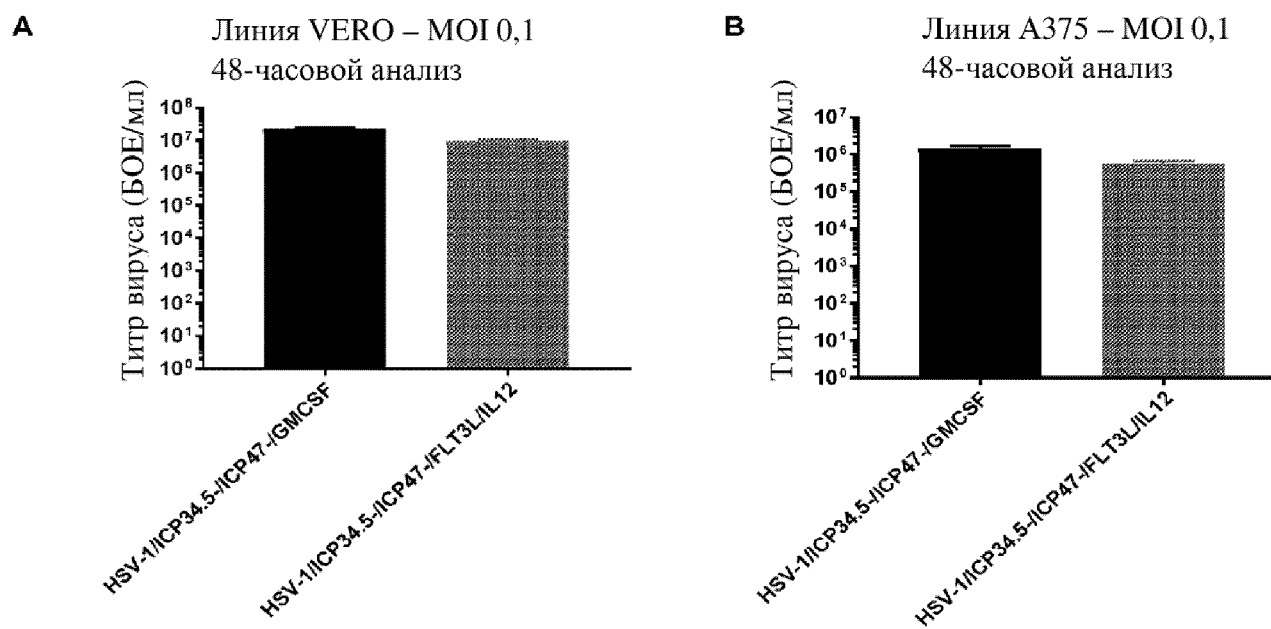
ФИГ. 8



ФИГ. 9

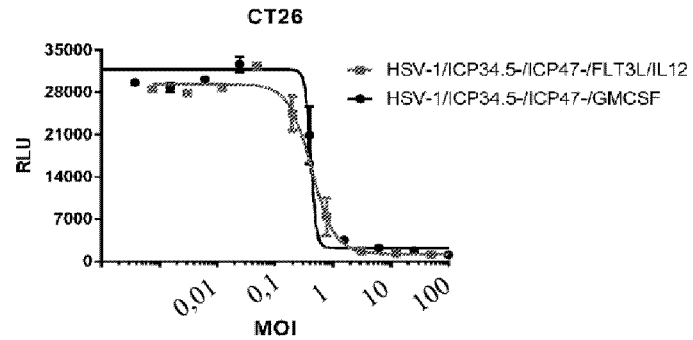


ФИГ. 10



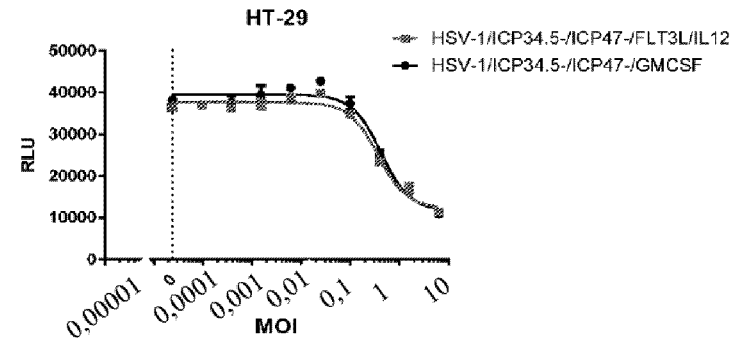
ФИГ. 11

A



	HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/FLT3L/IL12	HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/GMCSF
IC50	0.4257	~0.4151

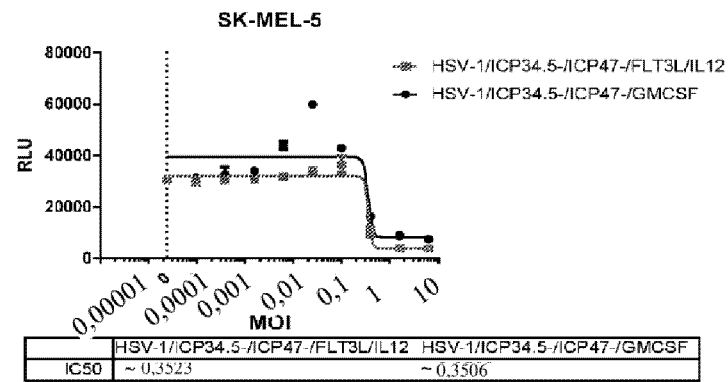
B



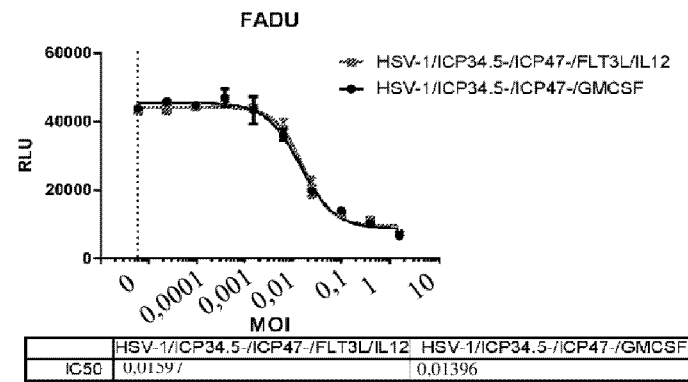
	HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/FLT3L/IL12	HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/GMCSF
IC50	0.3674	0.4249

ФИГ. 11 (продолжение)

C

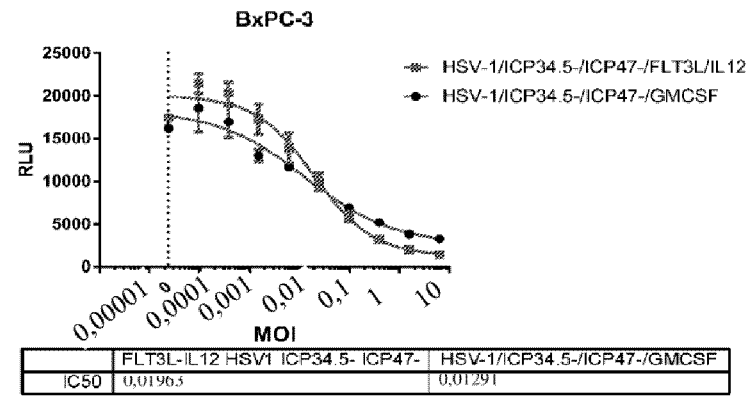


D

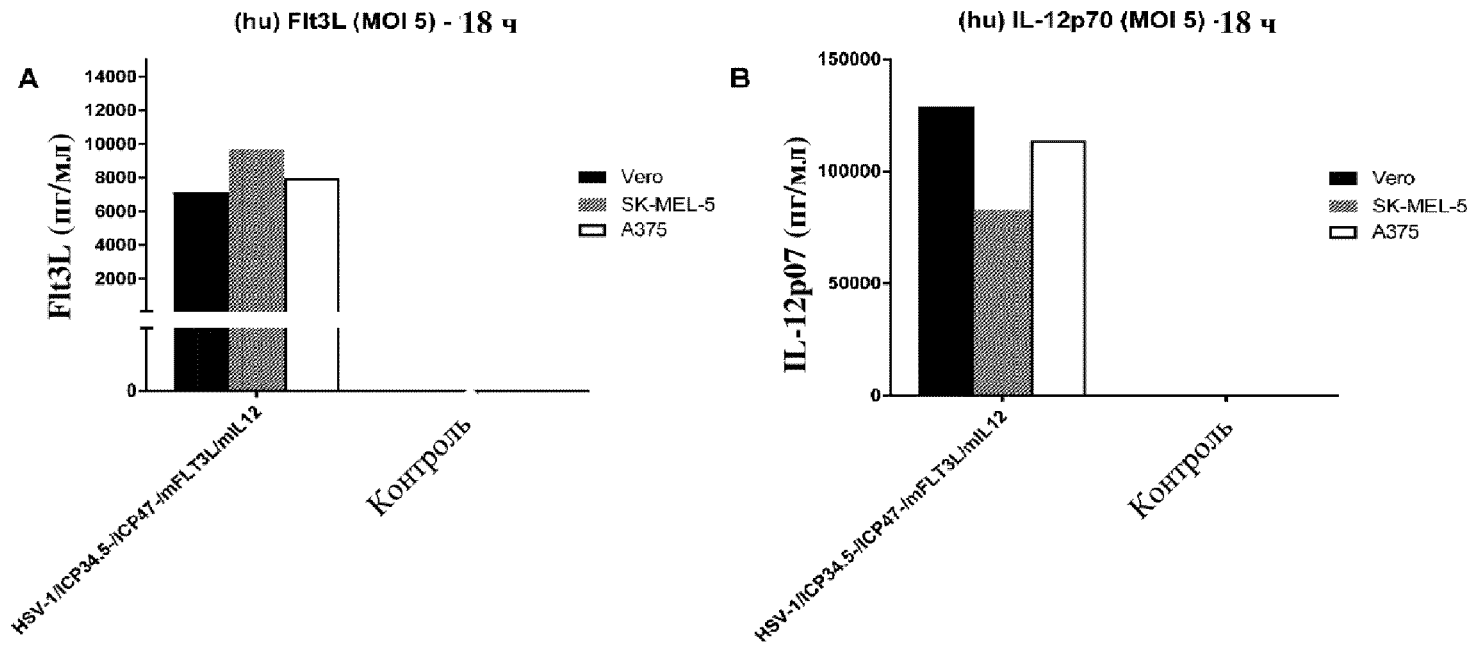


ФИГ. 11 (продолжение)

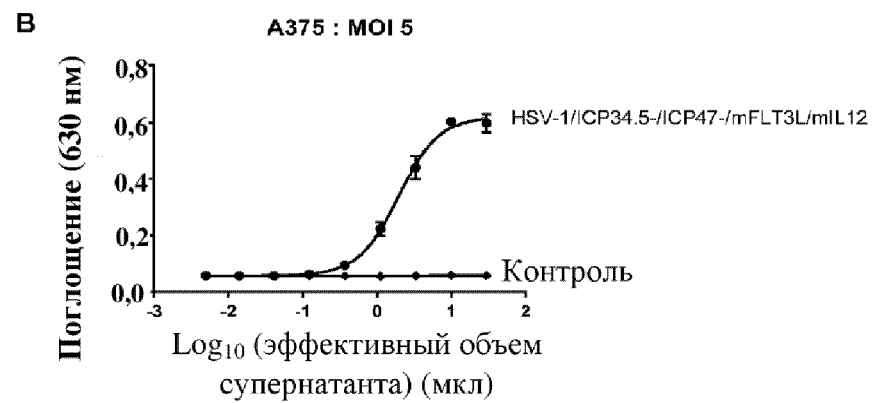
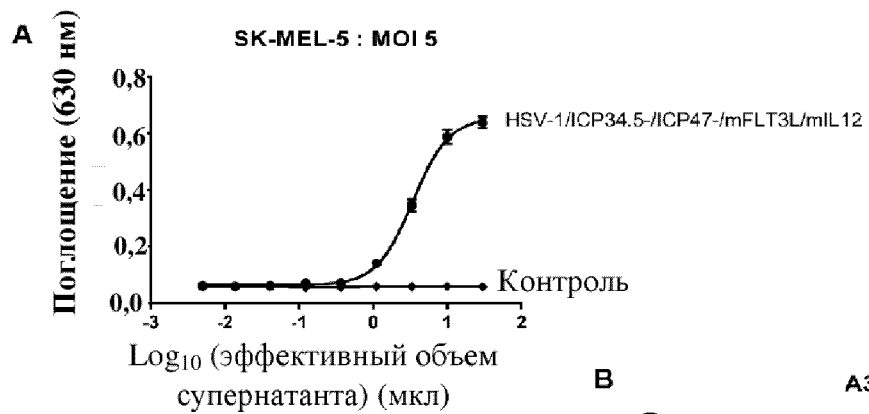
E



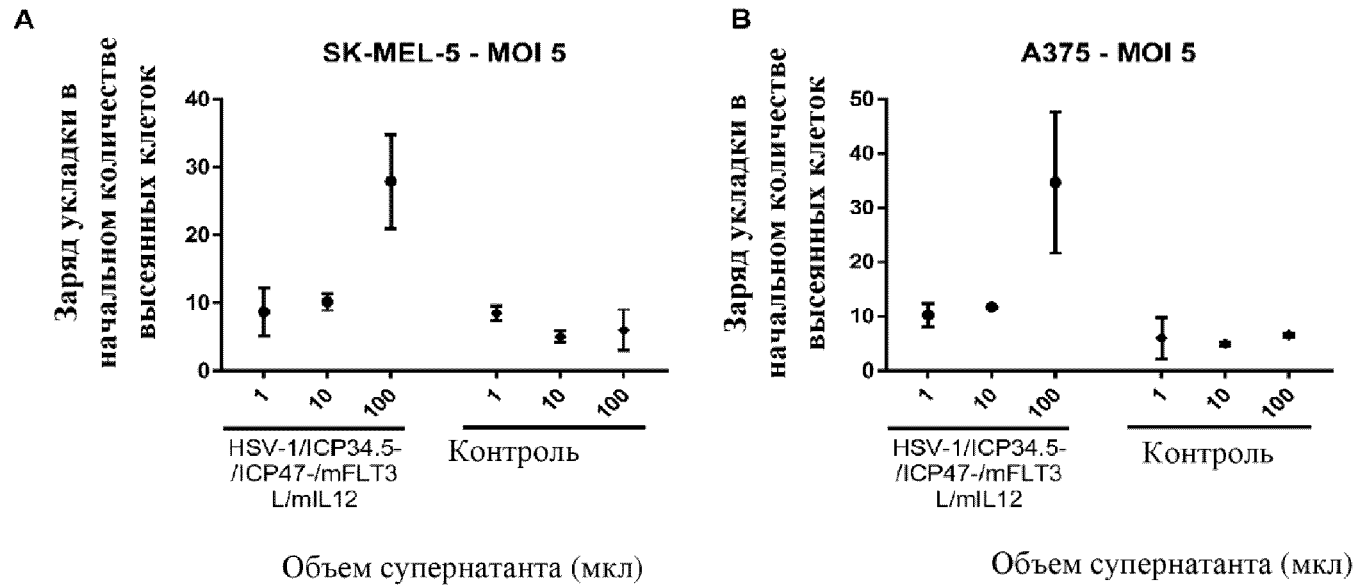
ФИГ. 12



ФИГ. 13



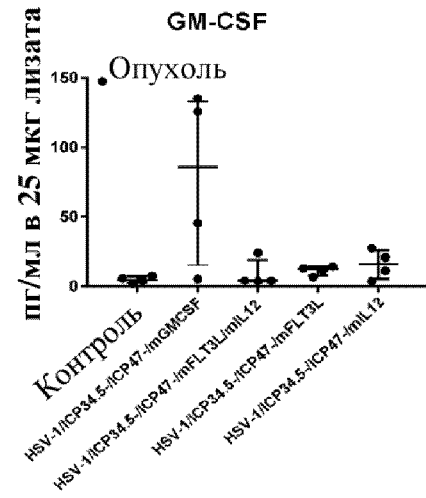
ФИГ. 14



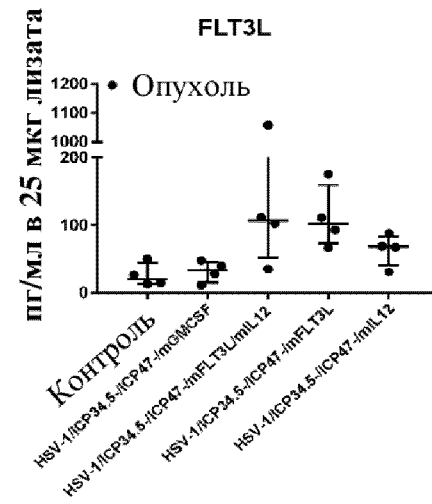
ФИГ. 15

A20

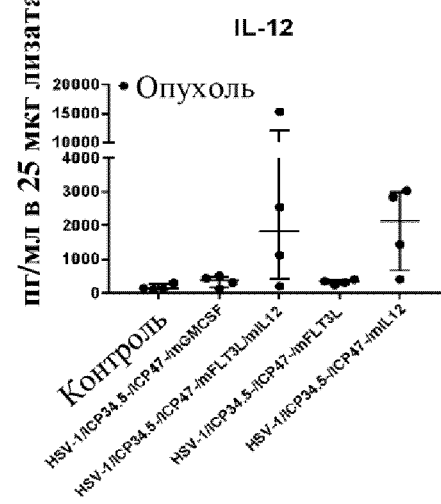
A



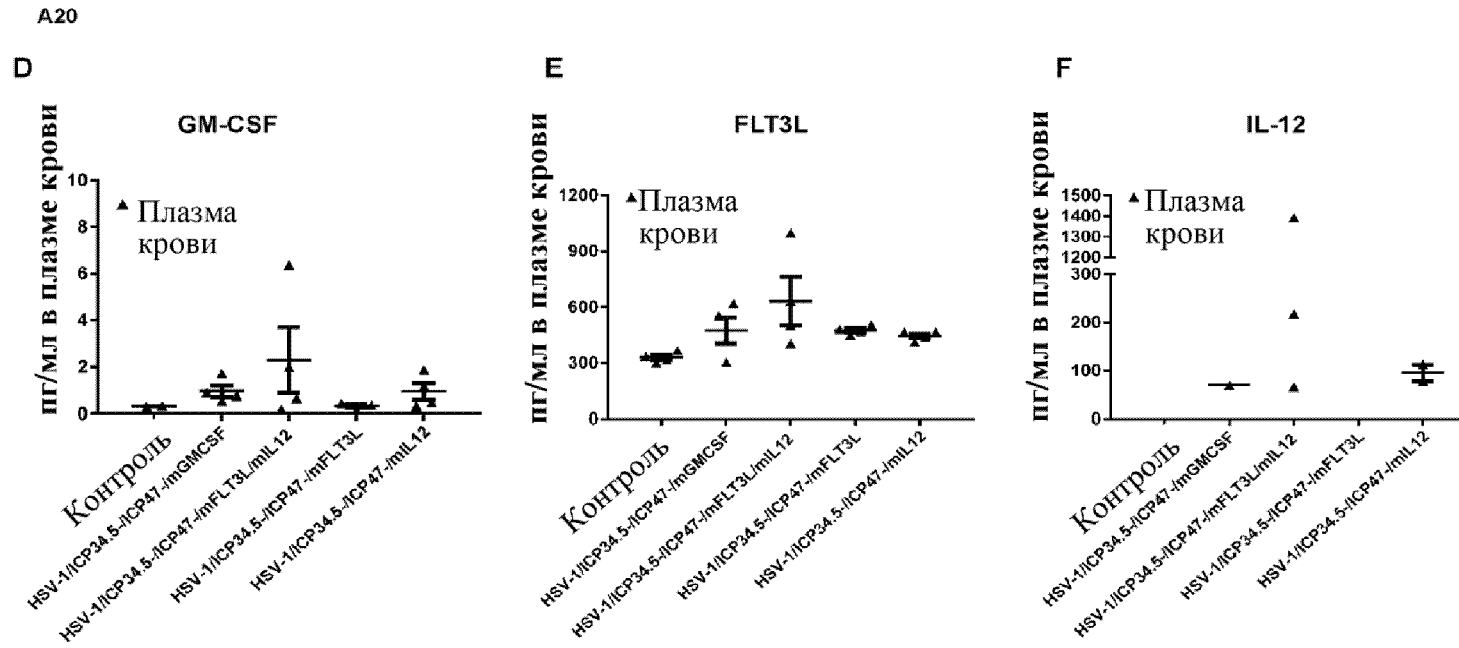
В



С

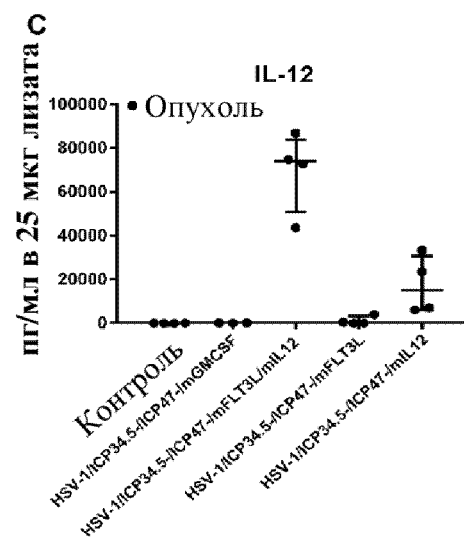
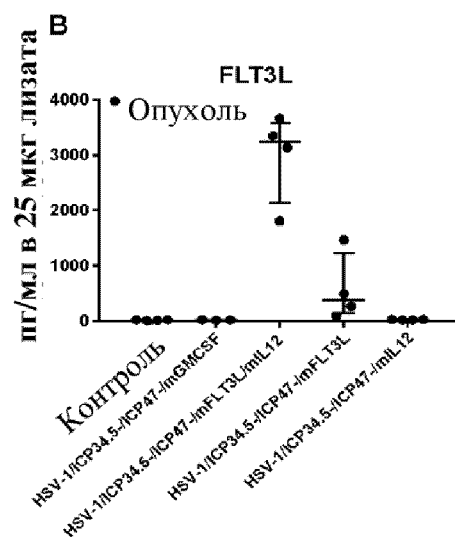
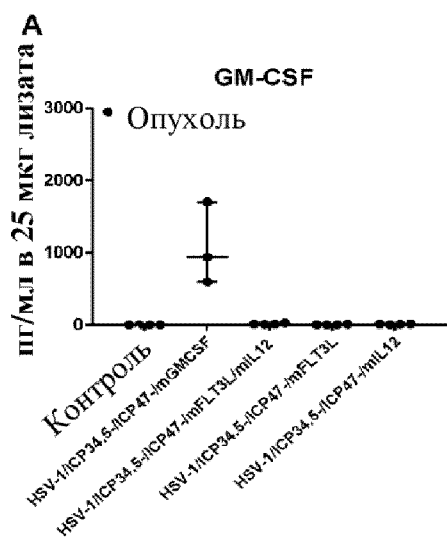


ФИГ. 15 (продолжение)



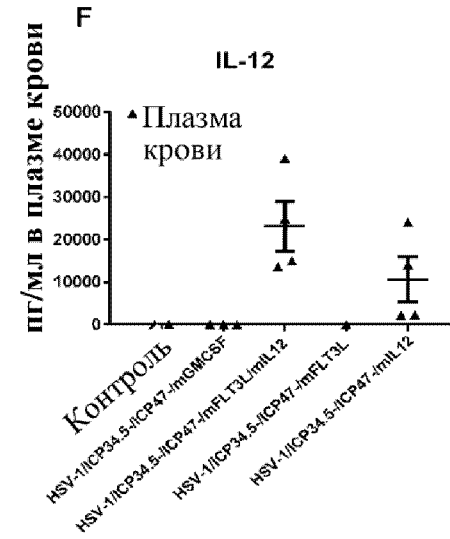
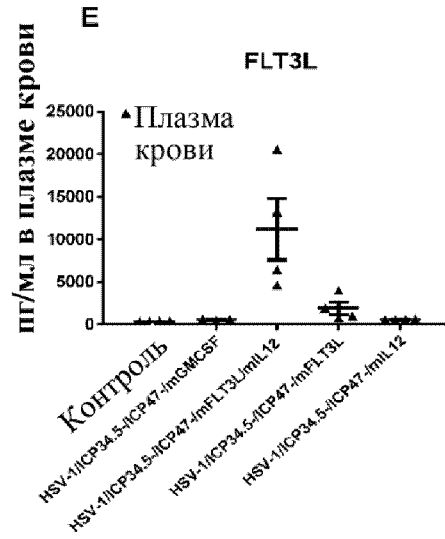
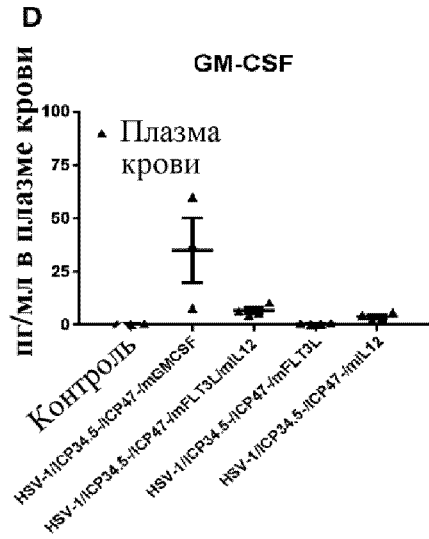
ФИГ. 16

B16F10

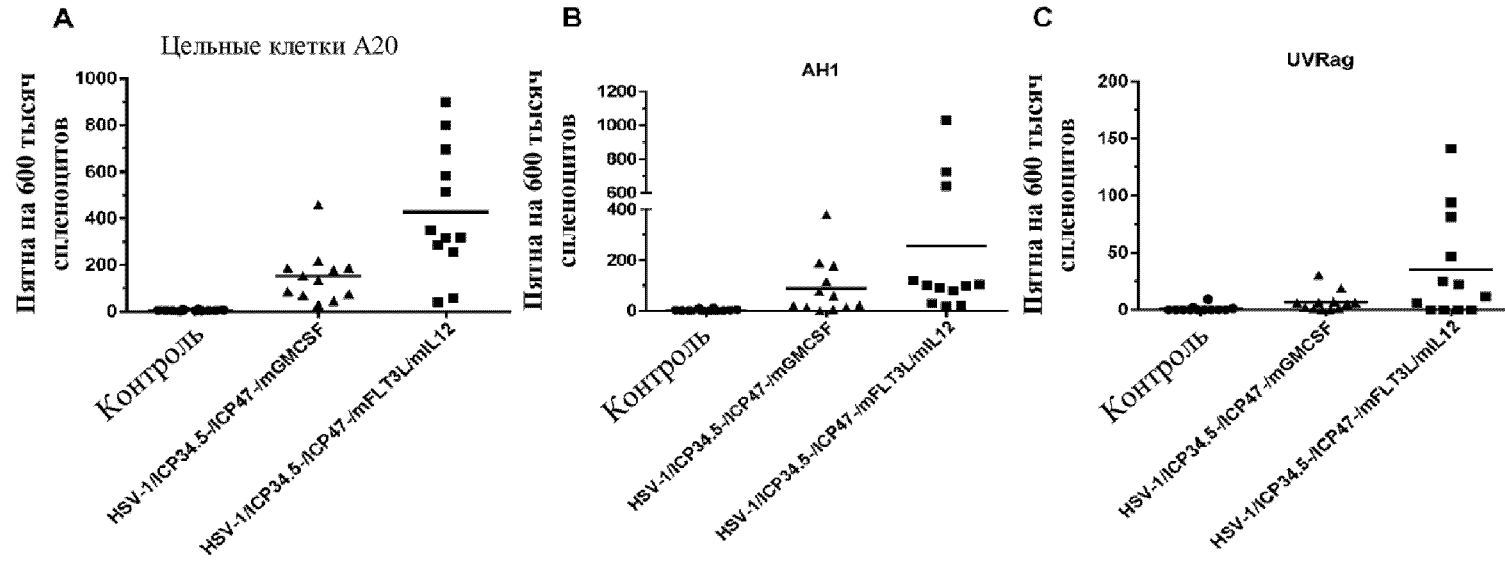


ФИГ. 16 (продолжение)

B16F10



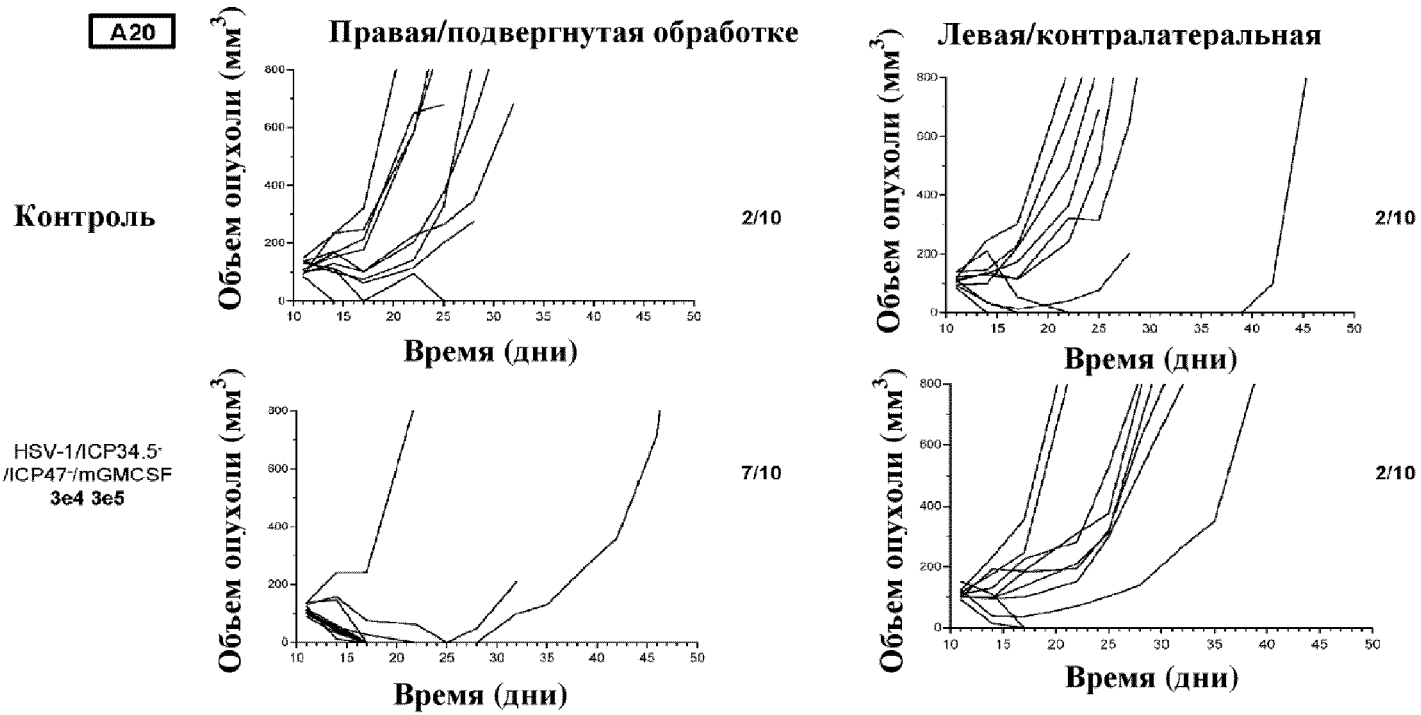
ФИГ. 17



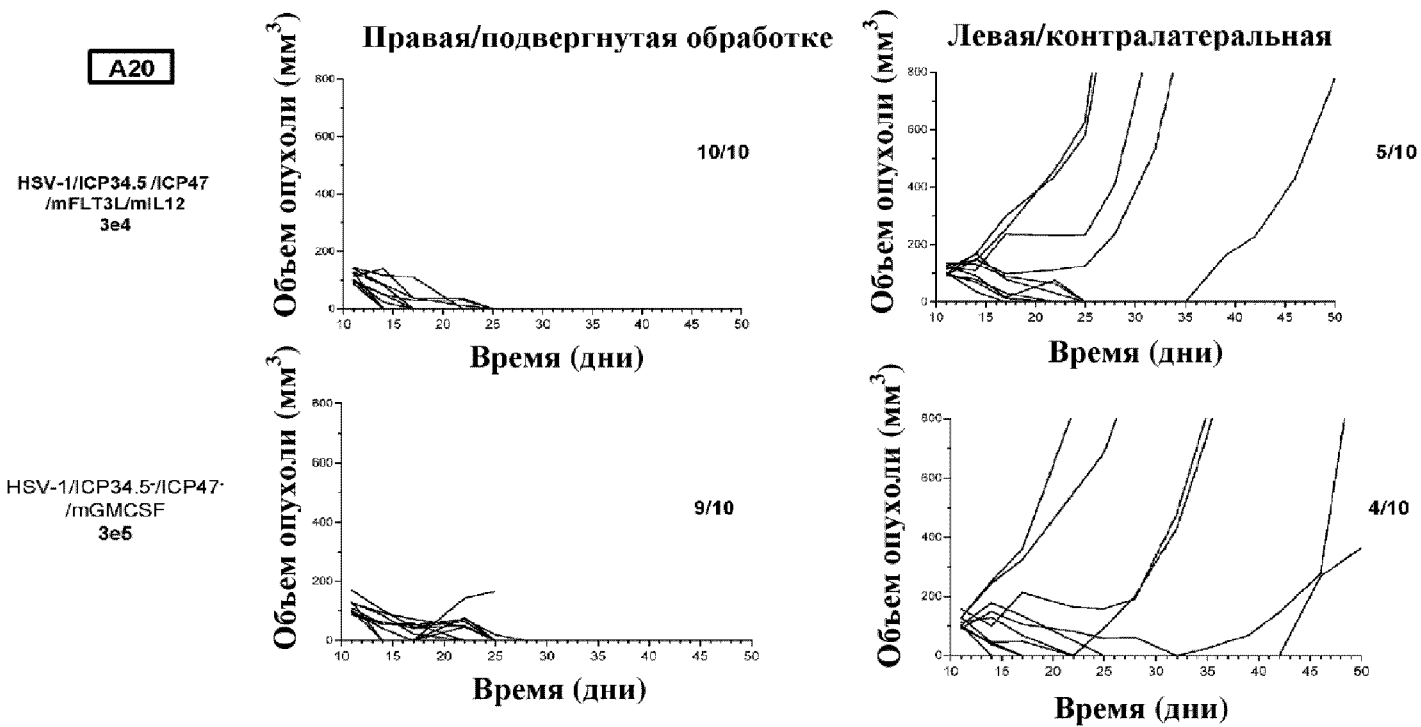
ФИГ. 17 (продолжение)

	Цельная клетка	Ан1	ЦВ Раг
HSV-1/CP34.5/CP47/mFLT3L/mIL12 по сравнению с контролем	P < 0,0001	P < 0,0001	P = 0,011
HSV-1/CP34.5/CP47/mFLT3L/mIL12 vs HSV-1/CP34.5/CP47/mGMCSF	P = 0,0008	Ns; p = 0,105	P = 0,038
HSV-1/CP34.5/CP47/mGMCSF по сравнению с контролем	Ns; p = 0,078	Ns; p = 0,498	Ns; p = 0,8196

ФИГ. 18



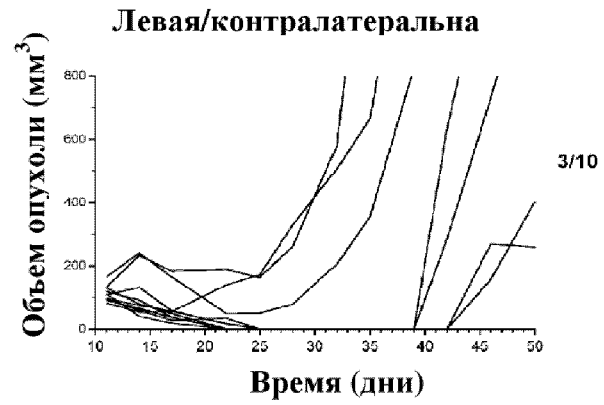
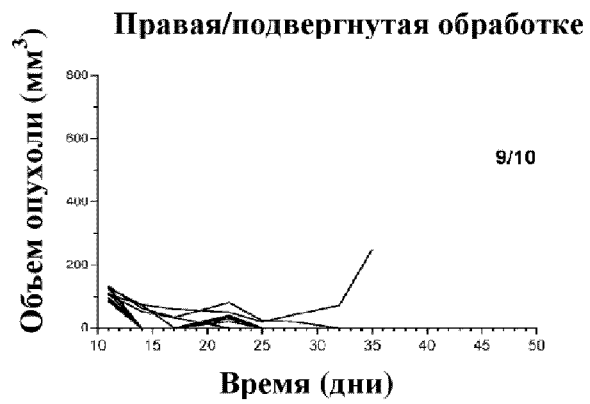
ФИГ. 18 (продолжение)

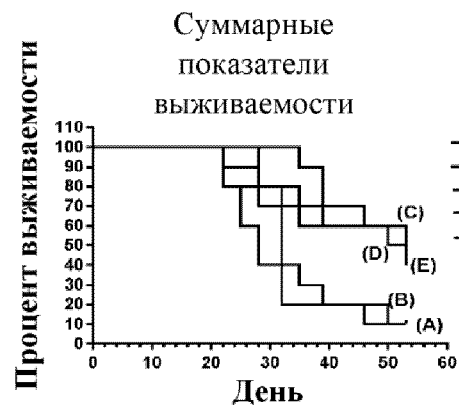


ФИГ. 18 (продолжение)

A20

HSV-1/ICP34.5/ICP47-
/mFLT3L/mlL12
3e5





ФИГ. 18 (продолжение)

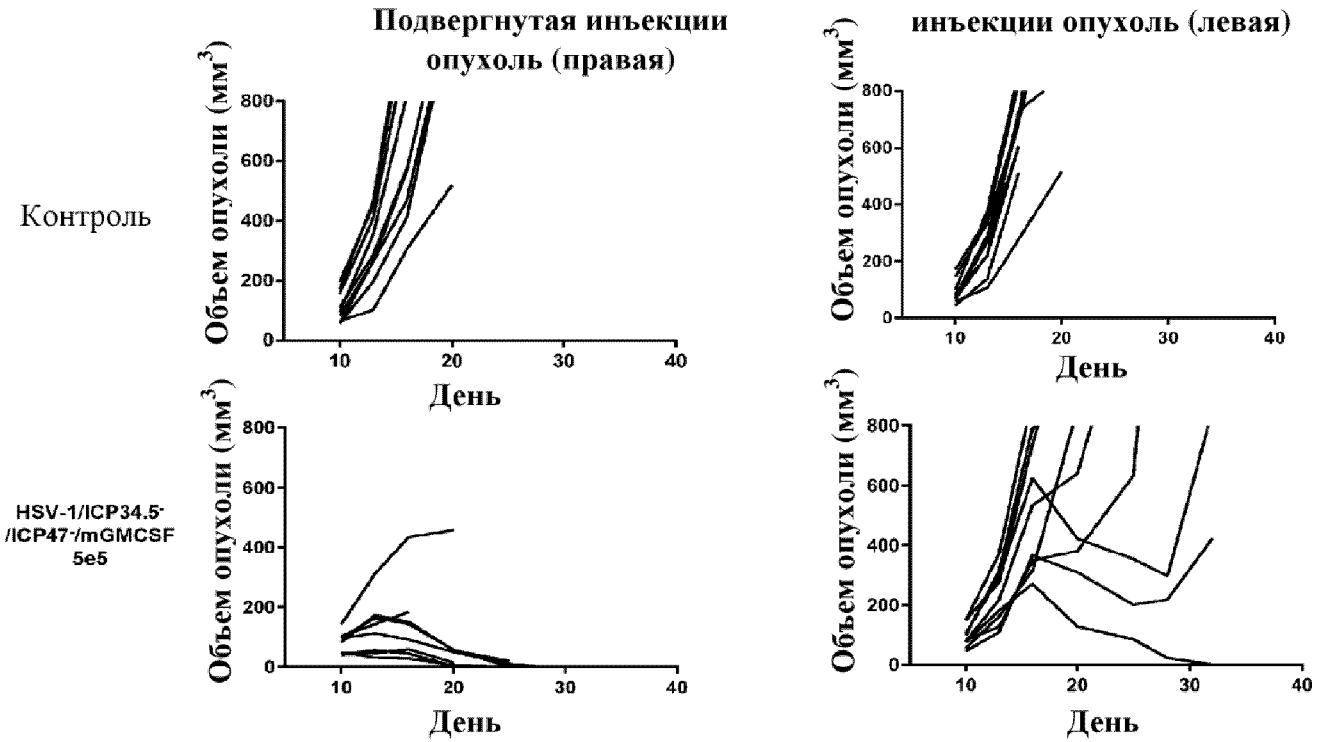
- Контроль (A)
- HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/mGMCSF 3e4 (B)
- HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/mFLT3L/mL12 3e4 (C)
- HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/mGMCSF 3e5 (D)
- HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/mFLT3L/mL12 3e5 (E)

(A) vs (B) * $p=0.033$
 (A) vs (C) * $p=0.015$
 (A) vs (D) * $p=0.021$
 (A) vs (E) ** $p=0.006$
 (B) vs (C) * $p=0.048$
 (D) vs (E) ns $p=0.932$

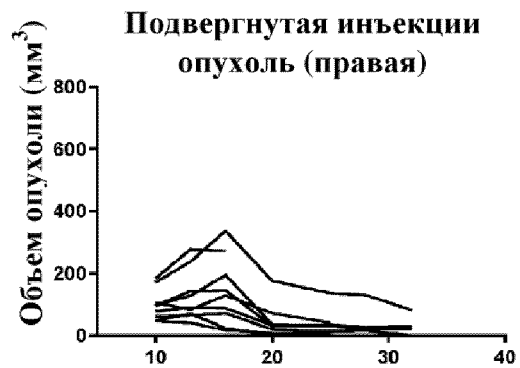
ГРУППА	МЕДИАНА ВЪЖИВАЕМОСТИ	СУБЪЕКТЫ БЕЗ ОПУХОЛИ Подвергнутые инъекции	СУБЪЕКТЫ БЕЗ ОПУХОЛИ Контралатеральная
Контроль	28	2	2
HSV-1/ICP34.5/ICP47-/mGMCSF 3e4 pfu	32	7	2
HSV-1/ICP34.5/ICP47-/mFLT3L/mL12 3e4 pfu	53	10	5
HSV-1/ICP34.5/ICP47-/mGMCSF 3e5 pfu	51,5	9	4
HSV-1/ICP34.5/ICP47-/mFLT3L/mL12 3e5 pfu	51,5	9	3

В анализе использовалась оценка Каплана-Мейера с логарифмическим ранговым критерием Мантеля-Кокса для сравнения кривых

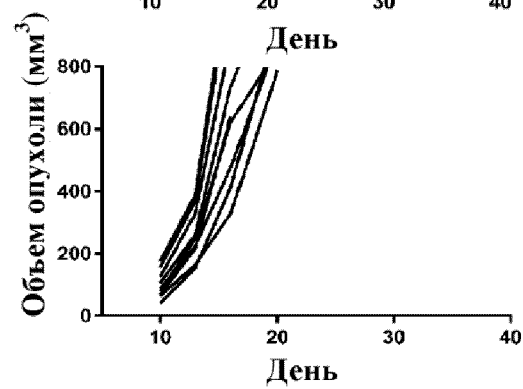
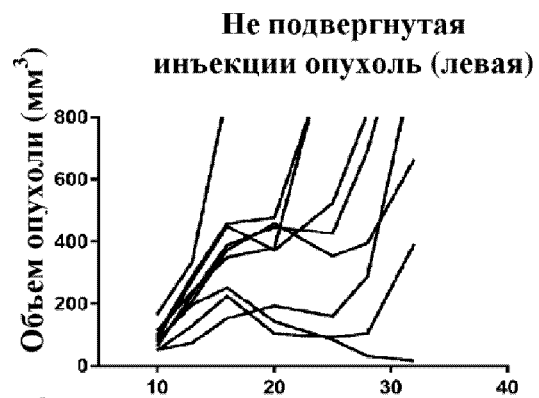
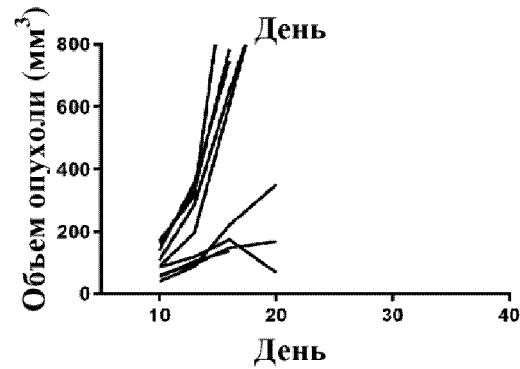
ФИГ. 19



ФИГ. 19 (продолжение)

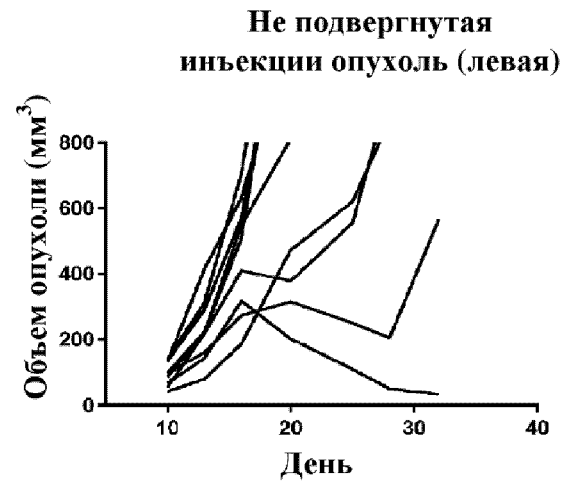
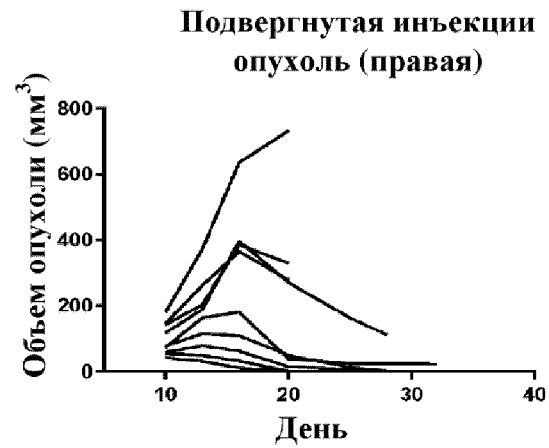


HSV-1/ICP34.5/ICP47-
/mFLT3L/mIL12
5e5

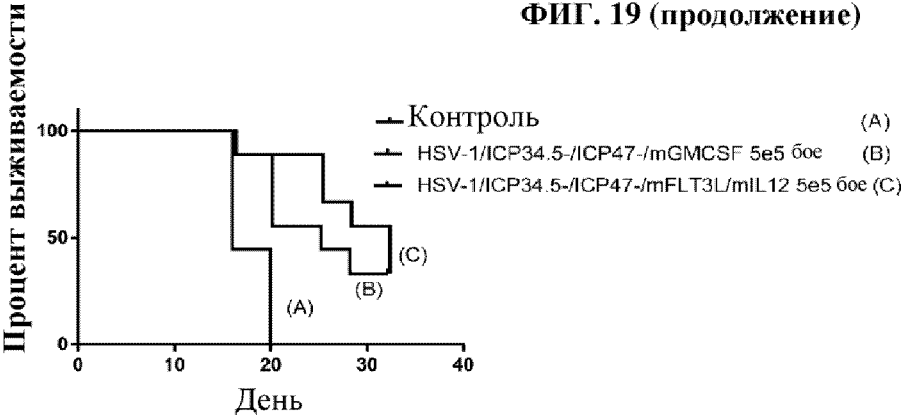


ФИГ. 19 (продолжение)

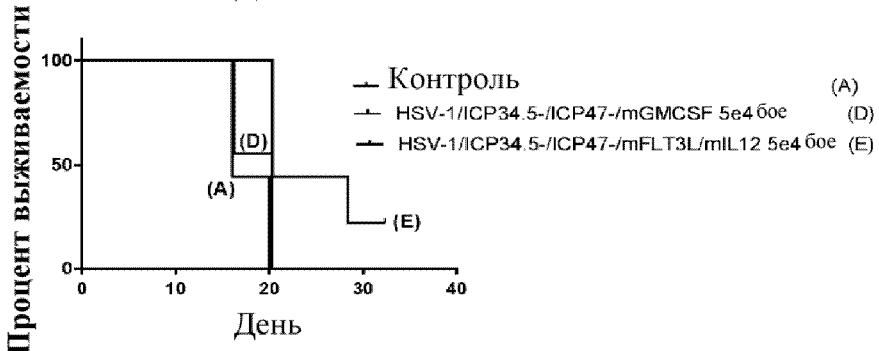
HSV-1/ICP34.5/ICP47
/mFLT3L/mIL12
5e4



ФИГ. 19 (продолжение)



(A) vs (B) 5e5 $p=0,000691$
 (A) vs (C) 5e5 $p=0,000127$
 (B) vs (C) 5e5 $ns; p=0,585$



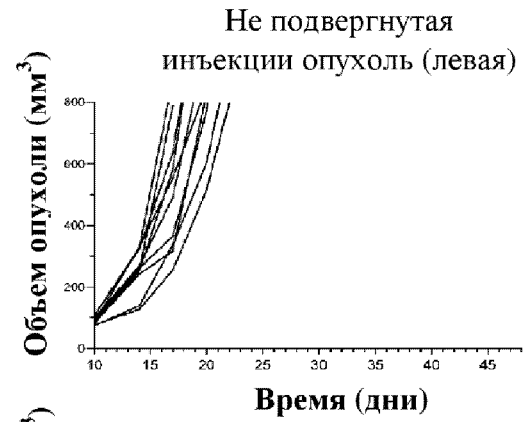
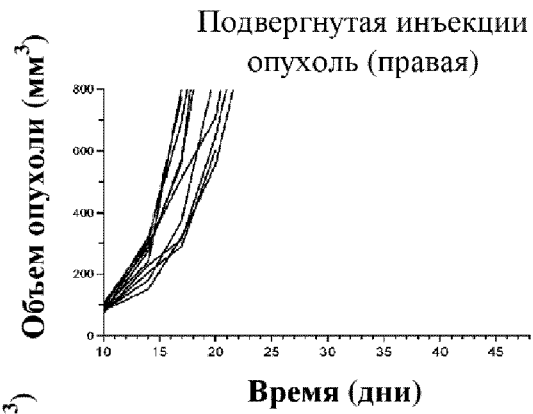
(A) vs (D) 5e4 $ns; p=0,65$
 (A) vs (E) 5e4 $p=0,0031$
 (D) vs (E) 5e4 $p=0,0056$

ФИГ. 19 (продолжение)

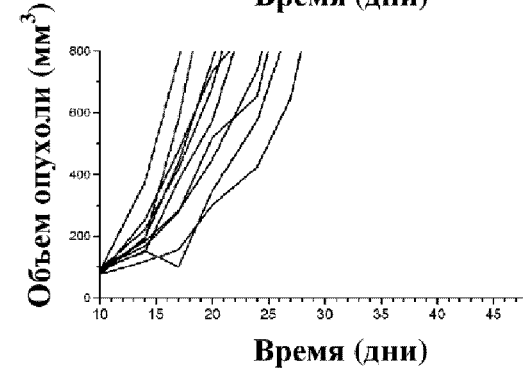
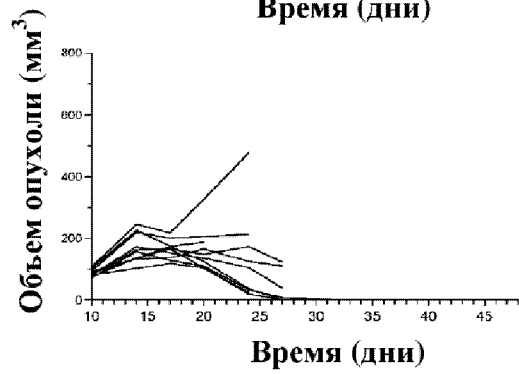
Группа	Медиана выживаемости	Выбывшие субъекты	Субъекты без опухоли (подвергнутые инъекции)	Субъекты без опухоли (не подвергнутые инъекции)
Контроль	18	0	0	0
HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF 5e5 бос	25	0	4	1
HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 6e5 бос	32	0	2	0
HSV-1/ICP34.5/ICP47/mGMCSF 5e4 бос	20	0	0	0
HSV-1/ICP34.5/ICP47/mFLT3L/mIL12 5e4 бос	20	0	2	0

ФИГ. 20

Контроль

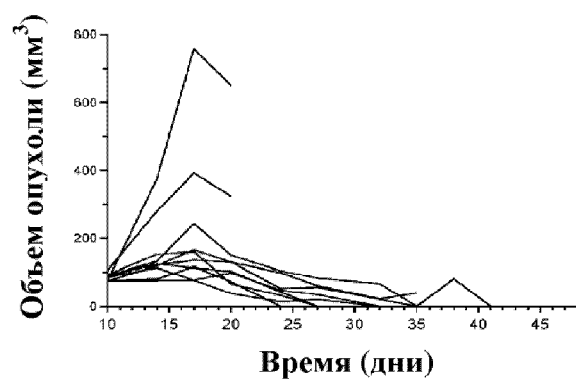


**HSV-1/ICP34.5
/ICP47/mGMCSF
5e6**

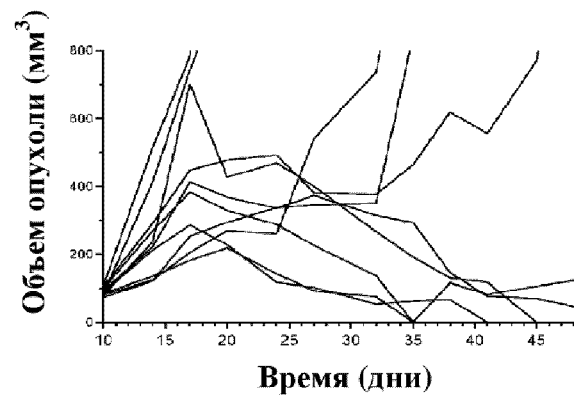


ФИГ. 20 (продолжение)

Подвергнутая инъекции
опухоль (правая)

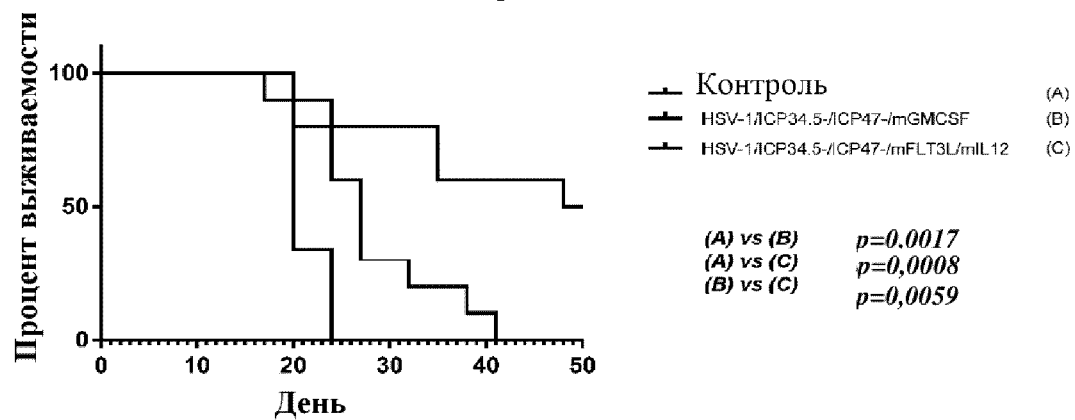


Не подвергнутая
инъекции опухоль (левая)



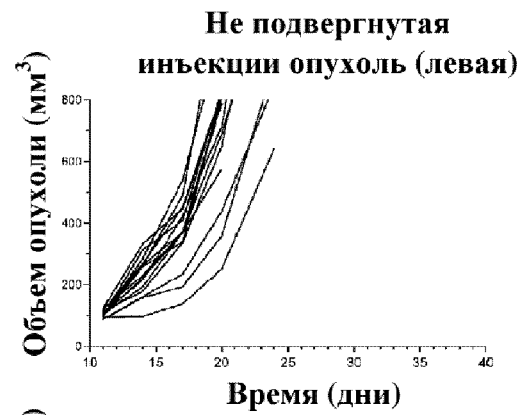
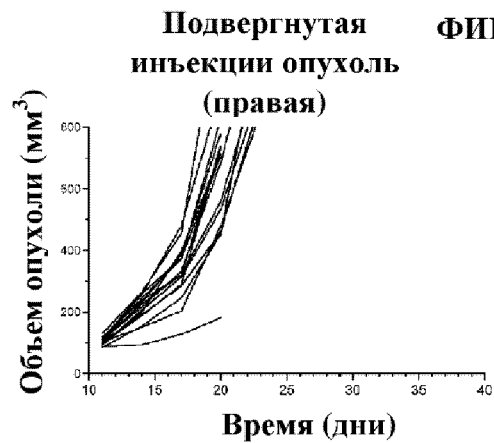
HSV-1/ICP34.5-
/ICP47-
/mFLT3L/mIL12
5e6

ФИГ. 20 (продолжение)

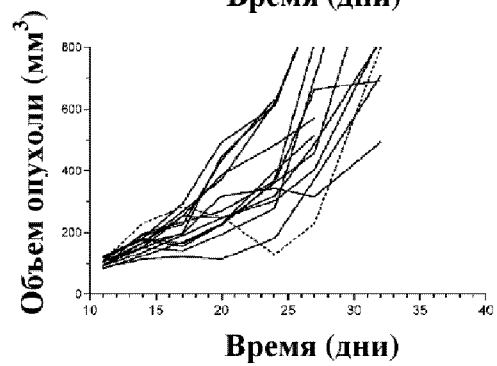
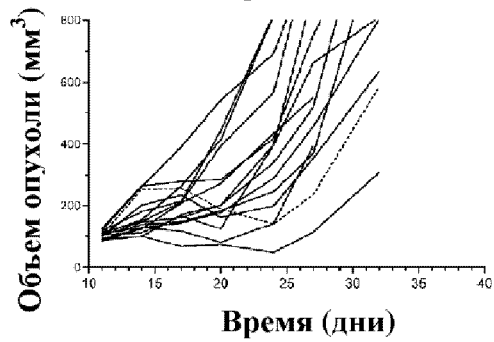


Группа	Медиана выживаемости	Субъекты без опухоли (подвергнутые инъекции)	Субъекты без опухоли (не подвергнутые инъекции)
Контроль	20	0	0
HSV-1/CP34.5-/CP47-/mGMCSF 5×10^6 бос	27	3	0
HSV-1/CP34.5-/CP47-/mFLT3L/mIL12 5×10^6 бос	не определено	7	3

Контроль

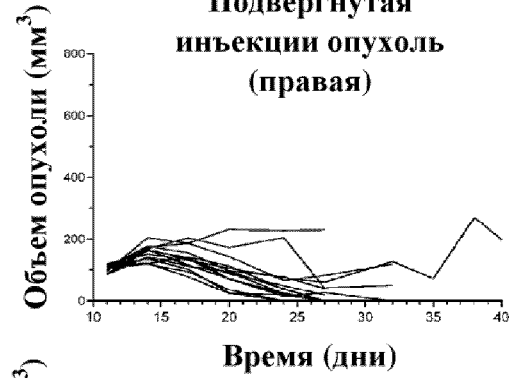


mAb к PD1

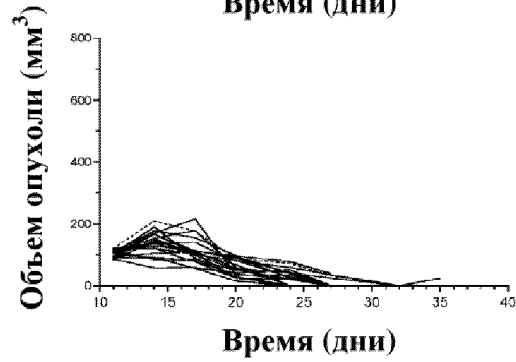


ФИГ. 21 (продолжение)

Подвергнутая
инъекции опухоль
(правая)

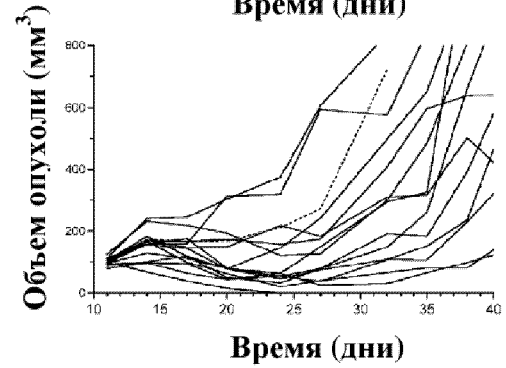
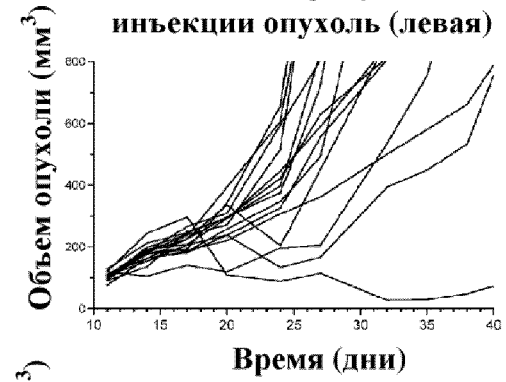


HSV-1/ICP34.5-/ICP47-
/mFLT3L/mIL12
5e6

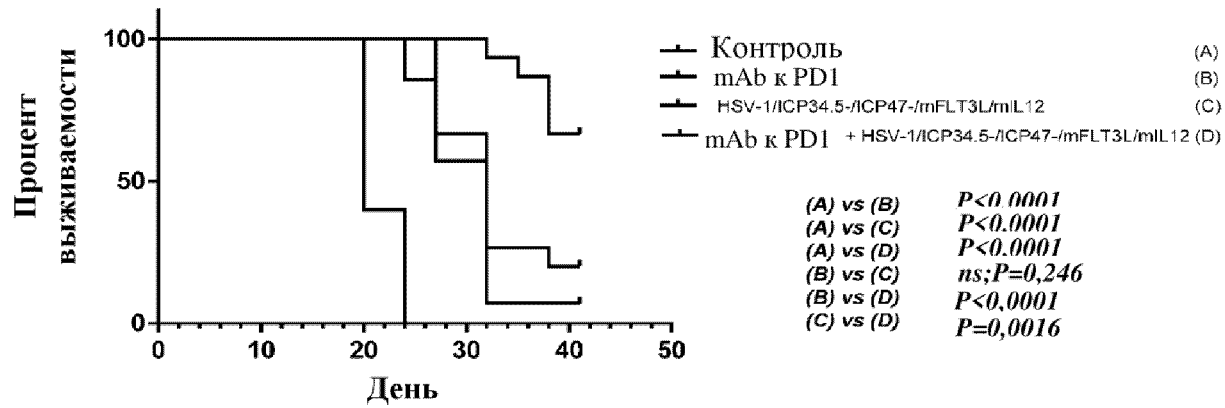


mAb к PD1 + HSV-
1/ICP34.5-/ICP47-
/mFLT3L/mIL12
5e6

Не подвергнутая
инъекции опухоль (левая)

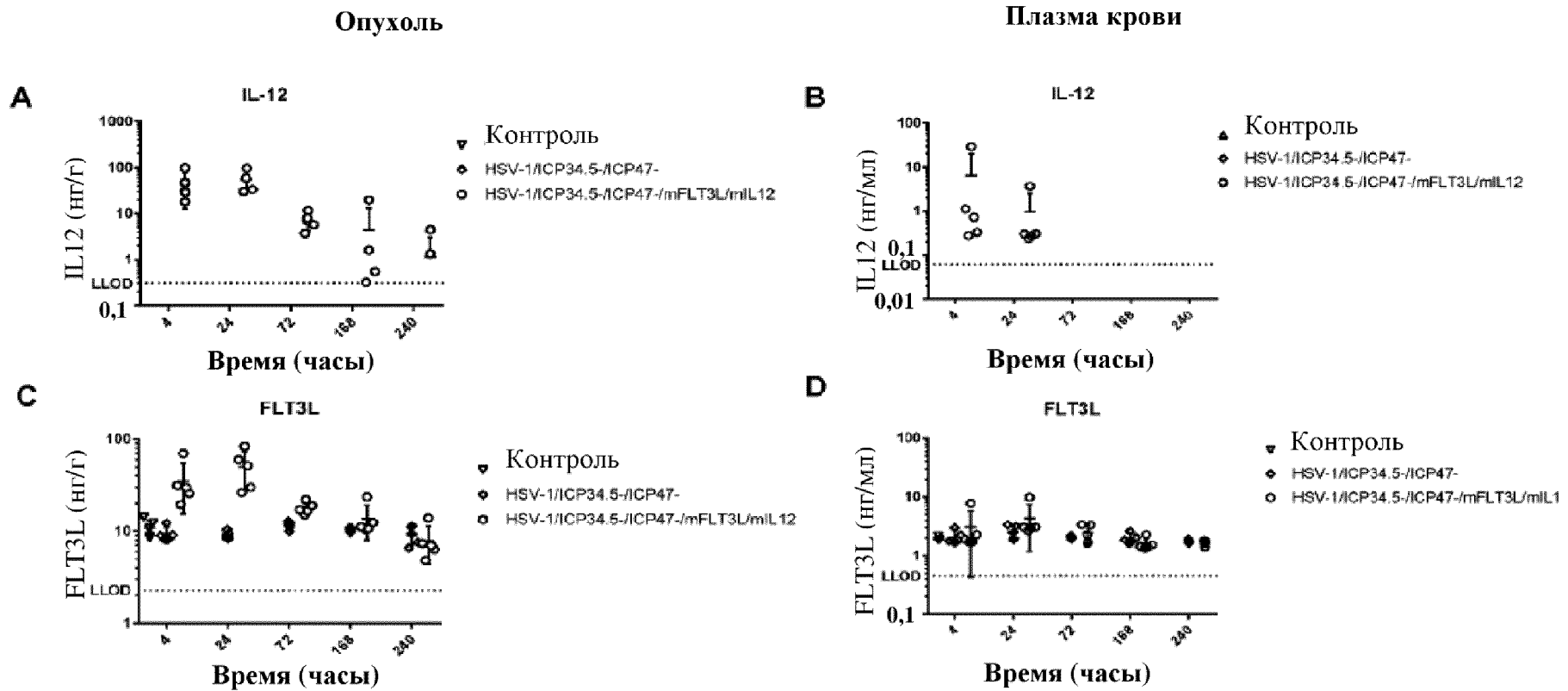


ФИГ. 21 (продолжение)



Группа	Медиана выживаемости	Субъекты без опухоли (подвергнутые инъекции)	Субъекты без опухоли (не подвергнутые инъекции)
Контроль	20	0	0
mAb к PD1	32	0	0
HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/mFLT3L/mIL12 5×10^6 бос	32	9	0
mAb к PD1 + HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/mFLT3L/mIL12 5×10^6 бос	не определено	14	1

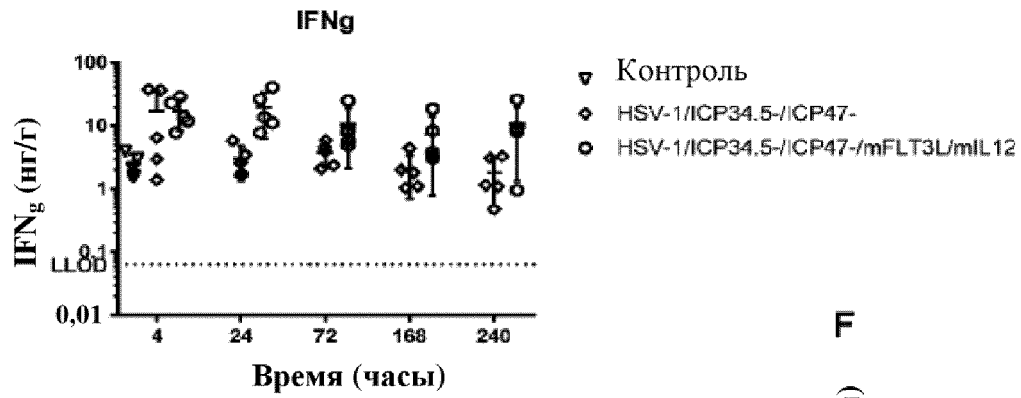
ФИГ. 22



ФИГ. 22 (продолжение)

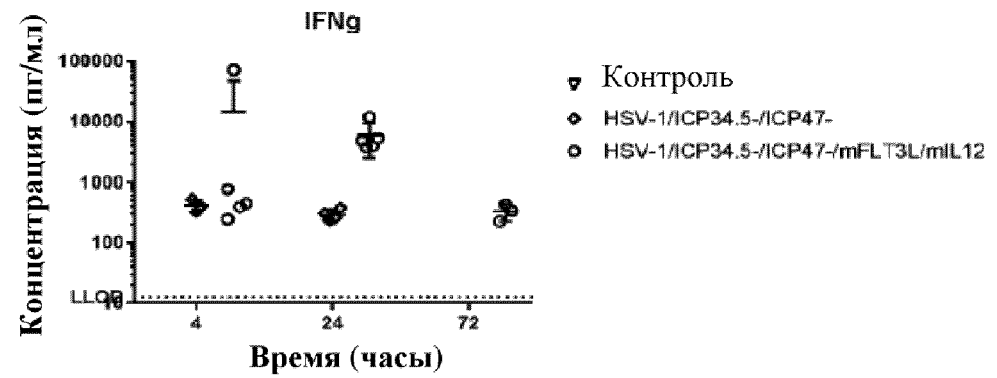
Опухоль

Е

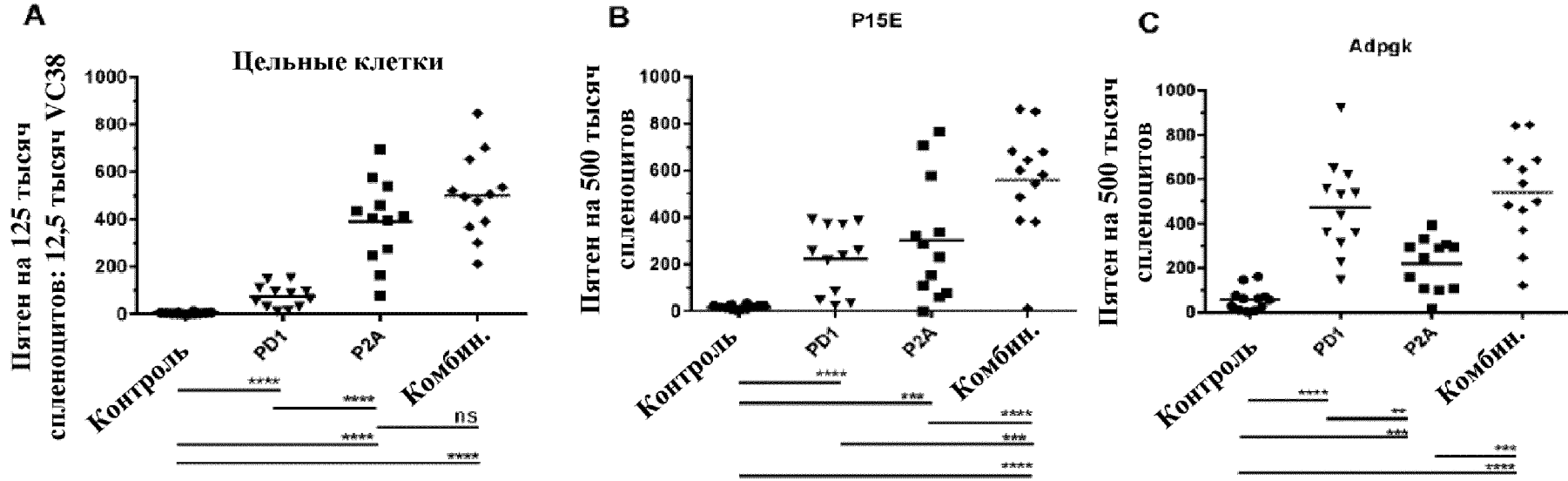


Плазма крови

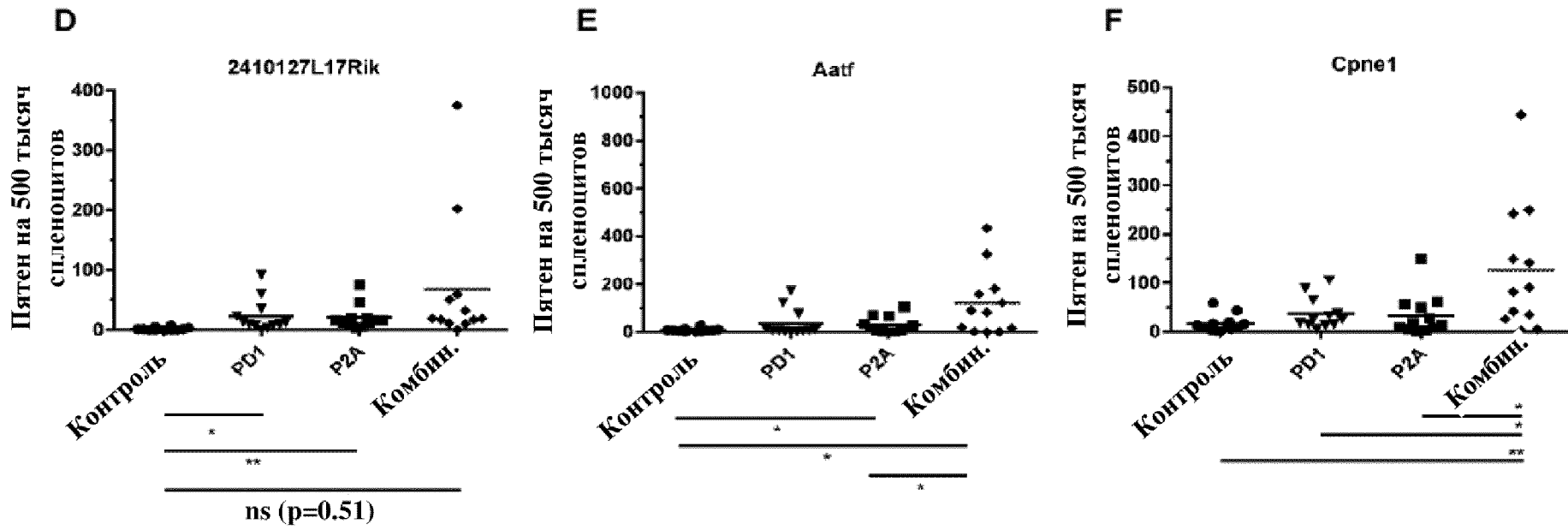
Е



ФИГ. 23



ФИГ. 23 (продолжение)



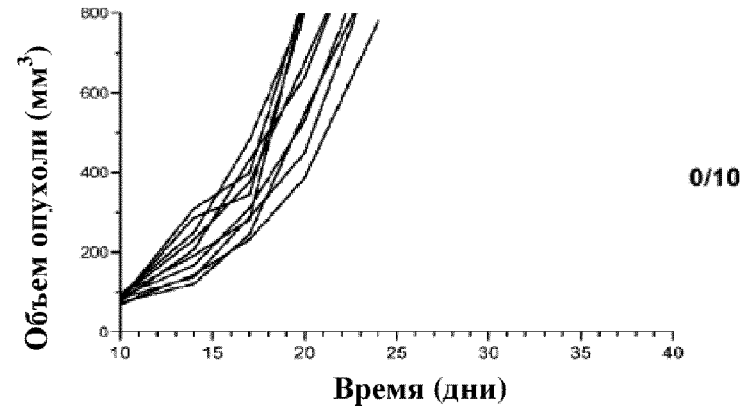
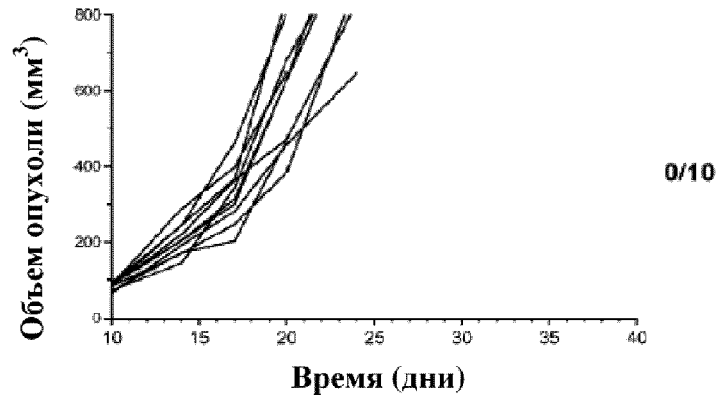
ФИГ. 24

МС38

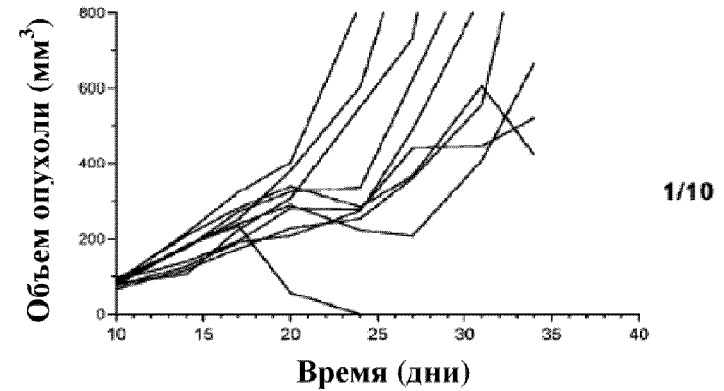
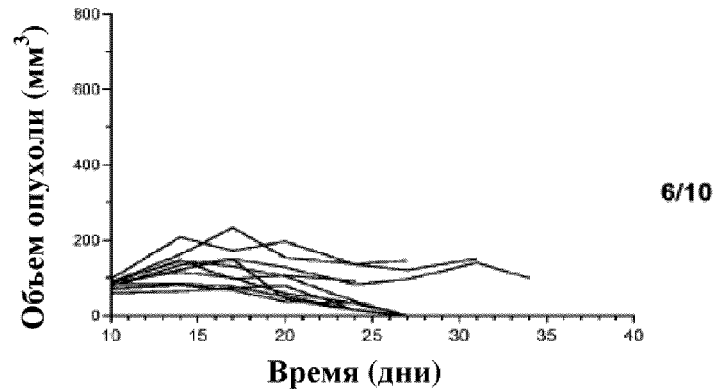
Правая/подвергнутая обработке

Левая/контралатеральная

Контроль



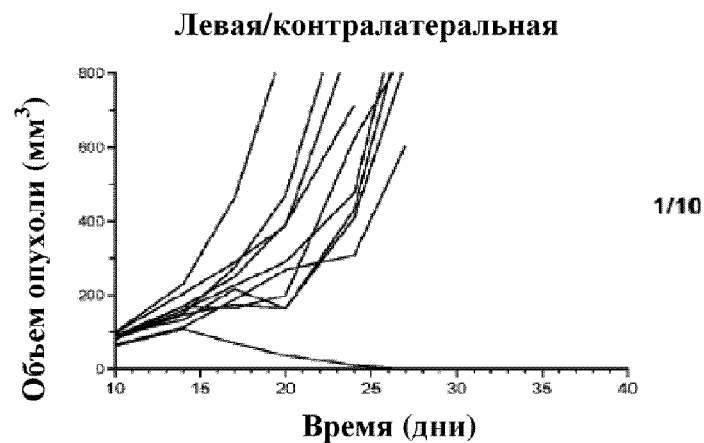
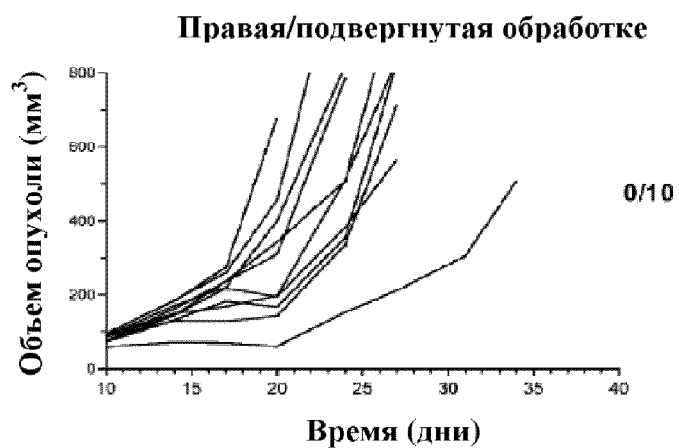
HSV-1/ICP34.5-
/ICP47-
/mFLT3L/mIL12



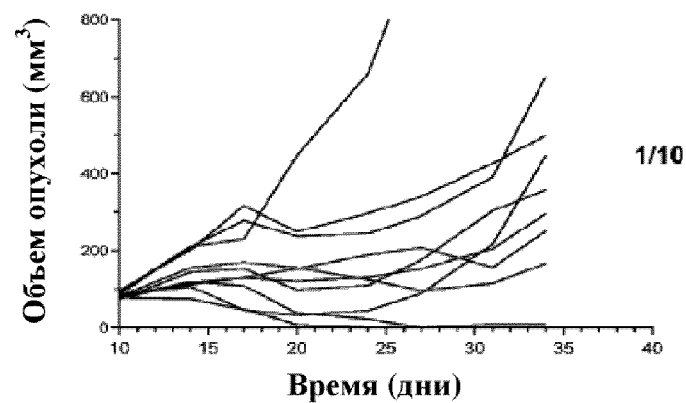
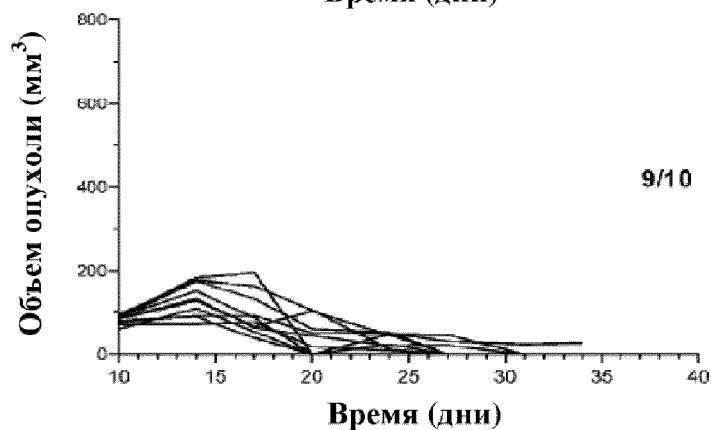
ФИГ. 24 (продолжение)

MC38

mAb к 4-1BB

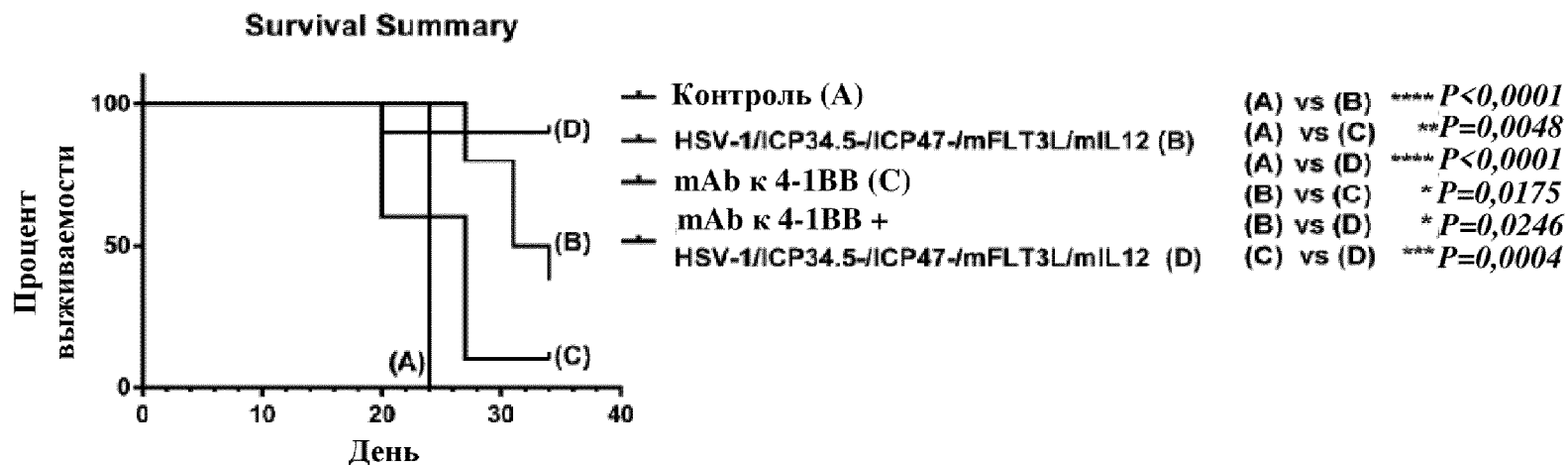


mAb к 4-1BB +
HSV-1/CP34.5-/CP47-
/mFLT3L/mIL12



MC38

ФИГ. 24 (продолжение)



Группа	Медиана выживаемости	Субъекты без опухоли (подвергнутые инъекции)	Субъекты без опухоли Контралатеральна инъекция
Контроль	24	0	0
HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/mFLT3L/mIL12	32,5	6	1
mAb к 4-1BB	27	0	1
mAb к 4-1BB + HSV-1/ICP34.5-/ICP47-/mFLT3L/mIL12	Не определено	9	1

В анализе использовалась оценка Каплана-Мейера с логарифмическим ранговым критерием Мантеля-Кокса