

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039404**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.24

(21) Номер заявки
201690425

(22) Дата подачи заявки
2014.09.02

(51) Int. Cl. **A61K 35/76** (2015.01)
C07K 14/535 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) АТТЕНУИРОВАННЫЙ ВИРУС НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ (NDV) ШТАММА 73Т ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕОПЛАЗИИ, СПОСОБ СЕЛЕКТИВНОГО ЦИТОЛИЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И СПОСОБ ИНДУЦИРОВАНИЯ РЕГРЕССА ОПУХОЛИ С ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

(31) **61/873,039**

(32) **2013.09.03**

(33) **US**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/EP2014/068619**

(87) **WO 2015/032755 2015.03.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Чэнг Синг (US), Кэрролл Дэниелл,
Маккурт Мэттью (GB), Галински
Марк, Цзинь Хон (US)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатев
А.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2010091262**
JANKE M. ET AL.: "Recombinant Newcastle disease virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy", GENE THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 14, no. 23, December 2007 (2007-12), pages 1639-1649, XP002606261, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/SJ.GT.3303026 [retrieved on 2007-10-04], page 1640-1644; figure 1

WO-A1-0120989

WO-A1-2009095167

JOS CFM DORTMANS ET AL.: "Virulence of newcastle disease virus: what is known so far?", VETERINARY RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 42, no. 1, 23 December 2011 (2011-12-23), page 122, XP021130364, ISSN: 1297-9716, DOI: 10.1186/1297-9716-42-122, pages 124, pages 128-129

J. C. F. M. DORTMANS ET AL.: "Passaging of a Newcastle disease virus pigeon variant in chickens results in selection of viruses with mutations in the polymerase complex enhancing virus replication and virulence", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 92, no. 2, 21 October 2010 (2010-10-21), pages 336-345, XP055155911, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.026344-0, pages 340-342

WO-A2-2009101149

PHILIPPE FOURNIER ET AL.: "Oncolytic Newcastle Disease Virus as Cutting Edge between Tumor and Host", BIOLOGY, vol. 2, no. 3, 2 July 2013 (2013-07-02), pages 936-975, XP055155919, DOI: 10.3390/biology2030936, pages 943-945

S. SAMAL ET AL.: "A single amino acid change, Q114R, in the cleavage-site sequence of Newcastle disease virus fusion protein attenuates viral replication and pathogenicity", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 92, no. 10, 15 June 2011 (2011-06-15), pages 2333-2338, XP055156082, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.033399-0, pages 2334-2336

(57) В изобретении предложен аттенуированный вирус ньюкаслской болезни (NDV) штамма 73Т, в котором сайт расщепления F-белка (FPCS) дикого типа, имеющий аминокислотную последовательность 111G-R-R-Q-K-R/F117, модифицирован так, что имеет последовательность, выбранную из 111H-N-R-T-K-S/F117, 111H-N-K-T-K-S/F117, 111H-N-R-M-K-S/F117, 111H-N-K-M-K-S/F118 и 111H-N-R-T-K-R/F118. Этот вирус является непатогенным для домашней птицы (лентогенный), но проявляет онколитические свойства. Кроме того, в изобретении предложены способ селективного цитолиза опухолевых клеток и способ индуцирования регресса опухоли у субъекта с использованием вируса по изобретению. Эти способы преодолевают недостатки применения патогенных штаммов вирусов для терапии человека.

B1**039404****039404****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США с серийным № 61/873039, поданной 3 сентября 2013 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

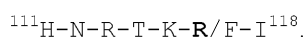
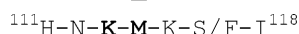
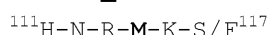
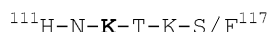
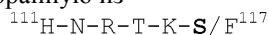
Предпосылки изобретения

Вирус ньюкаслской болезни (NDV) представляет собой птичий вирус, вызывающий контагиозную болезнь птиц, поражающую множество домашних и диких видов птиц. При контакте человека с зараженными птицами (например, на птицеобрабатывающих предприятиях) могут наблюдаться легкий конъюнктивит и гриппоподобные симптомы, но вообще-то NDV не представляет опасности для здоровья человека, и большинство людей являются серонегативными в отношении NDV. Исходя из патогенности вируса для кур, патогенность NDV классифицируют как высокую (велогенный), среднюю (мезогенный) или низкую (лентогенный), определяемую при помощи индекса внутримозговой патогенности (ICPI). Из-за угроз для сельского хозяйства мезогенный и велогенный NDV, обладающие вирулентностью для кур (ICPI>0,7), были классифицированы USDA как "особо опасные патогены" с 2008 г. Перечень особо опасных патогенов и токсинов включает биологические агенты, обладающие возможностью представлять серьезную угрозу для здоровья человека и животных, для жизнестойкости растений, или опасных с точки зрения продуктов животного и растительного происхождения.

Встречающиеся в природе формы NDV применялись в клинических исследованиях в качестве иммунотерапевтического и виротерапевтического биопрепарата. NDV является перспективным в качестве противоракового средства вследствие способности вируса осуществлять селективный цитоллиз опухолевых клеток человека, при этом обладающего ограниченной токсичностью в отношении нормальных клеток. Однако из-за изменения классификации NDV на особо опасный патоген разработка NDV в качестве противоракового средства не добилась успехов. Другие онколитические вирусы показали себя очень перспективными в клинических испытаниях. Для облегчения разработки NDV в качестве средства для терапии рака требуются новые формы вируса. Оптимально такие новые формы будут сохранять свою способность целенаправленно воздействовать на опухолевые клетки, но более не будут вызывать заболевание у птиц.

Краткое описание изобретения

Согласно изобретению предложен аттенуированный вирус ньюкаслской болезни (NDV) штамма 73Т для лечения неоплазии, в котором сайт расщепления F-белка (FPCS) дикого типа, имеющий аминокислотную последовательность $^{111}\text{G-R-R-Q-K-R/F}^{117}$ (где указанные аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с аминокислотной последовательностью F-белка дикого типа), модифицирован так, что имеет последовательность, выбранную из



В предпочтительном варианте осуществления аттенуированного вируса ньюкаслской болезни по изобретению указанный модифицированный FPCS имеет последовательность $^{111}\text{H-N-R-T-K-R/F-I}^{118}$.

В одном варианте осуществления аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по изобретению содержит увеличенную межгенную область HN-L, включающую некодирующую последовательность длиной по меньшей мере 50-300 нуклеотидов, где указанная межгенная область HN-L расположена так, как показано на фиг. 1.

Предпочтительно указанная некодирующая последовательность получена из парамиксовируса 1 типа (APMV-1) или респираторного синцитиального вируса (RSV).

Еще более предпочтительно указанная некодирующая последовательность имеет длину 60, 102, 144, 198 или 318 нуклеотидов.

В еще одном варианте осуществления аттенуированный вирус ньюкаслской болезни, как он определен выше, содержит одну или несколько гетерологичных полинуклеотидных последовательностей, вставленных в участок соединения Р-М, где указанный участок соединения Р-М расположен так, как показано на фиг. 1.

Предпочтительно указанная гетерологичная полинуклеотидная последовательность представляет собой трансген, кодирующий полипептид, который улучшает онколитические свойства вируса.

В одном варианте осуществления указанный трансген кодирует цитокин, лиганд клеточной поверхности и/или хемокин.

Предпочтительно указанный цитокин выбран из GM-CSF, IL-2, IL-21, IL-15, IL-12 и IL-12p70.

Наиболее предпочтительно указанный цитокин представляет собой человеческий GM-CSF.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления аттенуированного вируса ньюкаслской болезни по настоящему изобретению указанный модифицированный FPCS имеет последовательность

$^{111}\text{H-N-R-T-K-R}/\text{F-I}^{118}$, не кодирующая последовательность имеет длину 50-300 нуклеотидов, еще более предпочтительно не кодирующая последовательность имеет длину 198 нуклеотидов.

Также согласно изобретению предложен способ селективного цитолиза опухолевых клеток, включающий приведение опухолевой клетки в контакт с аттенуированным вирусом ньюкаслской болезни по изобретению, как он определен выше.

Также согласно изобретению предложен способ индуцирования регресса опухоли у субъекта, включающий приведение опухолевой клетки в контакт с аттенуированным вирусом ньюкаслской болезни по изобретению, как он определен выше.

Предпочтительно в указанных способах используют аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по настоящему изобретению, в котором модифицированный FPCS имеет последовательность $^{111}\text{H-N-R-T-K-R}/\text{F-I}^{118}$, не кодирующая последовательность имеет длину 50-300 нуклеотидов, и гетерологичная полинуклеотидная последовательность кодирует человеческий GM-CSF, еще более предпочтительно не кодирующая последовательность имеет длину 198 нуклеотидов.

В вариантах осуществления этих способов указанная клетка представляет собой раковую клетку, выбранную из клеток рака мочевого пузыря, яичника, головного мозга, поджелудочной железы, предстательной железы, саркомы, легкого, молочной железы, шейки матки, кости, печени, головы и шеи, желудка, почки, лимфомы, щитовидной железы, толстой кишки, прямой и ободочной кишки, клеток лейкоза и меланомы.

В еще одном варианте осуществления приведение опухолевой клетки в контакт с аттенуированным вирусом ньюкаслской болезни осуществляют путем его введения системно, предпочтительно внутривенно, или внутрь опухоли.

Определения

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, обычно понятное специалисту в данной области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Следующие литературные источники предоставляют специалисту общее определение многих терминов, используемых в настоящем изобретении: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991) и Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Используемые в данном документе следующие термины имеют значения, приписываемые им ниже, если не указано иначе.

Под "аттенуированный вирус ньюкаслской болезни" подразумевают вирус ньюкаслской болезни, который осуществляет селективный цитолиз опухолевых клеток, но не представляет угрозу для домашней птицы. В одном варианте осуществления аттенуированный вирус ньюкаслской болезни характеризуется ICPI, составляющим менее чем приблизительно 0,4 или 0,7. В других вариантах осуществления аттенуированный вирус ньюкаслской болезни характеризуется ICPI, составляющим от приблизительно 0 до 0,1.

Под "гетерологичной полинуклеотидной последовательностью" подразумевают рекомбинантный полинуклеотид, который не присутствует в состоянии дикого типа.

Под "детектируемой меткой" подразумевают композицию, которая при связывании с представляющей интерес молекулой делает последнюю детектируемой при помощи спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств. Например, пригодные метки включают радиоактивные изотопы, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентные красители, электронноплотные реагенты, ферменты (например, обычно применяемые при ELISA), биотин, диоксигенин или гаптены.

Под "средством" подразумевают любое низкомолекулярное химическое соединение, антитело, молекулу нуклеиновой кислоты, или полипептид, или их фрагменты.

Под "сдвигом" или "изменением" подразумевают повышение или снижение. Сдвиг может составлять всего лишь 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30% или составлять 40, 50, 60 или даже вплоть до 70, 75, 80, 90 или 100%.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к полипептиду или группе полипептидов, которые содержат по меньшей мере один домен связывания, который образуется в результате сворачивания полипептидных цепей, имеющий трехмерные углубления для связывания с формами внутренних поверхностей и распределения зарядов, комплементарные особенностям антигенной детерминанты антигена. Антитело, как правило, имеет форму тетрамера, причем содержит две идентичные пары полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" и одну "тяжелую" цепь. Вариабельные области или полипептиды вариабельных участков цепи каждой пары легкая/тяжелая цепь образуют сайт связывания антитела.

Термин "mAb" относится к моноклональному антителу. Антитела по настоящему изобретению включают без ограничений цельные нативные антитела, биспецифические антитела; химерные антитела; Fab, Fab', одноцепочечные фрагменты V-области (scFv), слитые полипептиды и нестандартные антитела.

Под "биологическим образцом" подразумевают образец, полученный от субъекта, включающий образец ткани или жидкости биологического происхождения, полученный или собранный in vivo или in

situ. В конкретных вариантах осуществления биологический образец включает любую клетку, ткань, жидкость или другой материал, происходящий из организма.

Под "реагентом захвата" подразумевают реагент, который специфично связывает молекулу нуклеиновой кислоты или полипептид для отбора или выделения молекулы нуклеиновой кислоты или полипептида.

Под "клинической агрессивностью" подразумевают тяжесть неоплазии. Агрессивная неоплазия метастазирует с большей вероятностью, чем менее агрессивная неоплазия. В то время как консервативные способы лечения подходят для менее агрессивных неоплазий, более агрессивные неоплазии требуют более инвазивных терапевтических схем.

Используемые в данном документе термины "определение", "оценка", "анализ", "измерение" и "обнаружение" относятся как к количественным, так и к качественным определениям, и, как таковой, термин "определение" применяется взаимозаменямо в данном документе с "анализом", "измерением" и т.п. Если подразумевается количественное определение, используют фразу "определение количества" анализируемого вещества и т.п. Если подразумевается качественное и/или количественное определение, используют фразу "определение уровня" анализируемого вещества или "обнаружение" анализируемого вещества.

Термин "субъект" или "пациент" относится к животному, которое является объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Исключительно в качестве примера субъект включает, но без ограничений, млекопитающее, в том числе, но без ограничений, человека или млекопитающее, не относящееся к человеку, такое как примат, не относящийся к человеку, мыши, крупный рогатый скот, лошади, собаки, овцы или кошки.

Под термином "снижать" или "повышать" подразумевают осуществлять сдвиг в отрицательном или положительном направлении, соответственно. Сдвиг может быть осуществлен на 5, 10, 25, 30, 50, 75 или даже 100%.

Под "эталоном" подразумевают стандарт для сравнения.

Под "периодичным" подразумевают "с регулярными интервалами". Периодичное наблюдение за пациентом включает, например, график тестирований, которые проводят ежедневно, два раза в неделю, два раза в месяц, ежемесячно, два раза в год или ежегодно.

Под "тяжестью неоплазии" подразумевают степень патологии. Тяжесть неоплазии повышается, например, с повышением стадии или степени неоплазии.

Молекулы нуклеиновой кислоты, применимые в способах по настоящему изобретению, включают любую молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид по настоящему изобретению или его фрагмент. Такие молекулы нуклеиновой кислоты не должны быть на 100% идентичны последовательности эндогенной нуклеиновой кислоты, но, как правило, проявляют значительную идентичность. Полинуклеотиды, характеризующиеся "значительной идентичностью" с эндогенной последовательностью, как правило, способны гибридизоваться по меньшей мере с одной нитью двунитевой молекулы нуклеиновой кислоты. Под "гибридизоваться" подразумевают соединение попарно с образованием двунитевой молекулы между комплементарными полинуклеотидными последовательностями (например, ген, описанный в данном документе) или их участками при различных условиях жесткости. (См., например, Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152: 399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

Например, концентрация соли в жестких условиях обычно будет составлять менее чем приблизительно 750 mM NaCl и 75 mM тринатрий цитрата, предпочтительно менее чем приблизительно 500 mM NaCl и 50 mM тринатрий цитрата и более предпочтительно менее чем приблизительно 250 mM NaCl и 25 mM тринатрий цитрата. Гибридизацию в условиях низкой жесткости можно получать в отсутствие органического растворителя, например, формамида, тогда как гибридизацию в условиях высокой жесткости можно получать в присутствии по меньшей мере приблизительно 35% формамида и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50% формамида. Жесткие температурные условия обычно предусматривают температуру по меньшей мере приблизительно 30°C, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 37°C и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 42°C. Варьирование дополнительных параметров, таких как время гибридизации, концентрация детергента, например, натрия додецилсульфата (SDS), и включение или исключение ДНК-носителя, хорошо известно специалистам в данной области. Различных уровней жесткости достигают путем комбинирования, при необходимости, этих различных условий. В предпочтительном варианте осуществления гибридизация будет происходить при 30°C в 750 mM NaCl, 75 mM тринатрий цитрата и 1% SDS. В более предпочтительном варианте осуществления гибридизация будет происходить при 37°C в 500 mM NaCl, 50 mM тринатрий цитрата, 1% SDS, 35% формамида и 100 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося (ssDNA). В наиболее предпочтительном варианте осуществления гибридизация будет происходить при 42°C в 250 mM NaCl, 25 mM тринатрий цитрата, 1% SDS, 50% формамида и 200 мкг/мл ssDNA. Применимые вариации этих условий будут явно очевидны для специалистов в данной области.

Для большинства применений стадии отмывки, которые следуют за гибридизацией, также будут варьировать по жесткости. Условия жесткости отмывки могут определяться концентрацией соли и тем-

пературой. Как отмечено выше, жесткость отмывки можно увеличить путем снижения концентрации соли или путем повышения температуры. Например, концентрация соли при жестких условиях для стадий отмывки предпочтительно будет составлять приблизительно 30 mM NaCl и 3 mM тринатрий цитрата и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 15 mM NaCl и 1,5 mM тринатрий цитрата. Жесткие температурные условия для стадий отмывки обычно будут включать температуру по меньшей мере приблизительно 25°C, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 42°C и даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 68°C. В предпочтительном варианте осуществления стадии отмывки будут происходить при 25°C в 30 mM NaCl, 3 mM тринатрий цитрата и 0,1% SDS. В более предпочтительном варианте осуществления стадии отмывки будут происходить при 42°C в 15 mM NaCl, 1,5 mM тринатрий цитрата и 0,1% SDS. В более предпочтительном варианте осуществления стадии отмывки будут происходить при 68°C в 15 mM NaCl, 1,5 mM тринатрий цитрата и 0,1% SDS. Дополнительные вариации этих условий будут явно очевидны для специалистов в данной области. Методики гибридизации хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, в Benton and Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72: 3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York) и Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Под "в значительной степени идентичные" подразумевают, что полипептид или молекула нуклеиновой кислоты проявляют по меньшей мере 50% идентичности в отношении эталонной аминокислотной последовательности (например, любой из аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе) или последовательности нуклеиновой кислоты (например, любой из последовательностей нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе). Предпочтительно такая последовательность по меньшей мере на 60%, более предпочтительно на 80 или 85% и более предпочтительно на 90, 95, 96, 97, 98 или даже 99% или более идентична на аминокислотном уровне или уровне нуклеиновой кислоты последовательности, используемой для сравнения.

Идентичность последовательностей, как правило, измеряют с применением программного обеспечения для анализов последовательностей (например, пакет программного обеспечения для анализа последовательностей Genetics Computer Group, Центр биотехнологии Университета Висконсина, 1710 University Avenue, Мэдисон, Висконсин. 53705, программы BLAST, BESTFIT, GAP или PILEUP/PRETTYBOX). Такое программное обеспечение подбирает идентичные или сходные последовательности путем присваивания степеней гомологии различным замещениям, делециям и/или другим модификациям. Консервативные замещения, как правило, включают замещения в пределах следующих групп: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин и фенилаланин, тирозин. В иллюстративном подходе для определения степени идентичности можно использовать программу BLAST с показателем вероятности от e^{-3} до e^{-100} , указывающим на близкородственную последовательность.

Используемое в данном документе "в значительной степени чистый" означает, что представляющий интерес компонент является преобладающим присутствующим компонентом (т.е. по количеству молей он является более многочисленным, чем любой другой отдельный компонент в композиции), и предпочтительно в значительной степени чистая фракция представляет собой композицию, где целевой компонент составляет по меньшей мере приблизительно 50% (по количеству молей) от всех присутствующих макромолекулярных компонентов. В целом, в значительной степени чистая композиция будет содержать более приблизительно 80% от всех макромолекулярных компонентов, присутствующих в композиции, более предпочтительно более приблизительно 85, 90, 95 и 99%. Наиболее предпочтительно представляющий интерес компонент очищают до существенной гомогенности (компоненты-примеси нельзя обнаружить в композиции при помощи традиционных способов обнаружения), где композиция состоит по существу из одного макромолекулярного компонента.

Используемые в данном документе термины "лечить", "осуществление лечения", "лечение" и подобные относятся к снижению или облегчению нарушения и/или ассоциированных с ним симптомов. Будет понятно, хотя не исключено, что осуществление лечения нарушения или состояния не требует, чтобы нарушение, состояние или ассоциированные с ними симптомы полностью устранялись. Таким образом, успешное лечение может продлевать выживание пациента или ослаблять нежелательный симптом.

Используемые в данном документе термины "предотвращать", "осуществление предотвращения", "предотвращение", "профилактическое лечение" и подобные относятся к снижению вероятности развития нарушения или состояния у субъекта, который не имеет, но подвергается риску или восприимчив к развитию нарушения или состояния.

Доза относится к однократному введению терапевтической композиции. Дозировка относится к количеству терапевтически активной молекулы в дозе. Схема лечения относится к дозировке, графику и способу введения одной или нескольких доз. Цикл относится к повторяемой единице из одной или нескольких доз в пределах схемы лечения. В некоторых схемах лечения дозировки являются одинаковыми для каждой дозы. В других схемах лечения дозировки могут не быть одинаковыми. Например, для по-

вышения концентрации терапевтической молекулы до требуемого уровня у пациента можно применять одну или несколько ударных доз. За ударными дозами может следовать одна или несколько поддерживающих доз, в целом, содержащих меньшие дозировки (например, половину или менее ударной дозы), которые являются достаточными для поддержания требуемой концентрации терапевтической молекулы у пациента. Для постепенного снижения концентрации терапевтической молекулы у пациента можно применять одну или несколько постепенно уменьшающихся доз.

Под "специфично связывает" подразумевают соединение (например, антитело), которое распознает и связывает молекулу (например, полипептид), но которое, в значительной степени, не распознает и не связывает другие молекулы. Если специально не оговаривается или не очевидно из контекста, используемый в данном документе термин "приблизительно" понимают как значение, находящееся в диапазоне нормальной ошибки в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. "Приблизительно" можно понимать как значение, находящееся в пределах 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05 или 0,01% от указанного значения. Если иное не ясно из контекста, все числовые значения, предусмотренные в данном документе, модифицированы при помощи термина "приблизительно".

Диапазоны, предусмотренные в данном документе, понимают, как сокращенную запись всех значений в пределах диапазона. Например, понимают, что диапазон от 1 до 50 включает любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

Любые соединения, композиции или способы, предусмотренные в данном документе, можно комбинировать с одной или несколькими из любых других композиций и способов, предусмотренных в данном документе.

Используемые в данном документе формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "биомаркер" включает ссылку на более чем один биомаркер.

Если специально не оговаривается или не очевидно из контекста, используемый в данном документе термин "или" понимают как охватывающий.

Используемый в данном документе термин "включающий" обозначает фразу "включающий, но без ограничений" и используется взаимозаменяемо с ней.

Используемые в данном документе термины "содержит", "содержащий", "закрывающий", "имеющий" и подобные могут иметь значение, приписываемое им в патентном законе США, и могут означать "включает", "включающий" и подобные; "состоящий по существу из" и "состоит по существу", аналогичным образом, имеют значение, приписываемое в патентном законе США, и термин является термином открытого состава, допускающим присутствие не только того, что упоминается, при условии, что основные или новые характеристики того, что упоминается, не изменяются в результате присутствия не только того, что упоминается, но исключается вариантами осуществления из известного уровня техники.

Последовательности

Иллюстративная нуклеотидная последовательность полной длины вируса NDV 73T представляет собой

tacgtataatacactcactatagggaccaaacagagaatccgtaggttacgataaaaggcgaaggagca
 attgaagttggacgggtagaaggtgtgaatctcagtgcgagcccgaagcacaactcgagaaagccttc
 tgccaacatgtcttcgtaggtgacgagtagaacagctcctcgctctcagactcgccccaatggagct
 catggaggaggggaaaaaggaggtagcttaaaagtagacgtccgggtattcactcttaacagttagacc
 cagaagatagggtggaactttgagggtattctgctccggttgctgttagcgaagatgccaacaaaccact
 caggcaaggtgctctcatactcttttatgctccactcacaagtgatgaggaaacatgttgcccttgca
 ggaaaacagaatgaagccacattggcgtgcttgagattgatggcttgccaacgggtatgccccagtca
 acaataggagtgagtgctgaagagagagcacagagattcgcatgatagcagggtctctccctgggc
 atgcagtaatggcaccctgctcagagccggggccgaagatgatgcaccagaagacatcaccgatacc
 ctggagaggtcctctatccaggcccaagtatgggtcacagtagcaaaagccatgactgcgtatgaga
 ctgcagatgagtcagaacaagacgaatcaataagtatatgcagcaaggcagggtccaaaagaaatacat
 cctctacccgctatgcagagcacaatccaactcacgatcagacagctcttgcagtcgccatcttttg
 gttagcaggtcgaagagaggccgcaacacggcaggtggtacctctactattataacctagtaggggacg
 tagactcatatcaggaataccgggttactgcattctcctgacactcaagtacggaatcaacaccaa
 gacatcagcccttgacttagtagcctctcagcgacatccagaagatgaagcagctcatgcgtttgat
 cggatgaaaggagataatgcgccgtacatgacattgcttggtgatagtgaccagatgagcttgcgcctg
 ccgagatgcacaactttactccttcgcatgggtatggcatcagtcctagataaaggtagccggaaata
 ccaattggccagggtttagagcacatcattctggagacttggagtagagtagctcaggtcaggga
 agtagcattaacgagatagtgctgagcgtaaagctaaccagcagcaaggagagcctggcagctg
 ctgccaacgagctcctcagagagaccagcagcatagacatgctactcaacaagtcgagtgctcactgg
 gctcagcagagggggggtcccaagccctacaaggcgatcgaatagatcgcaaggcgaaccagaagccggg
 gatggggagaccgaattcctggtatgatgagagcggtagcaaatagcatgagggaagcgccaaactctg
 cacaggggcactccccaatcggggcctcccccaactcctggccatcccaagataacgacaccgactggg
 gtattgattgacaaaaccagcttgccttccaaaaatcatccaataccctcaccctgtagtcgacccctc
 gatttgcggccctacatgaccacccctcaaaaaacatccccctcttctcctccccctgctgtaca
 actccgcacgcccctaggtaccacaggcacaatgcggctcactaacaataaaacagagccgaggaaatta
 gaaaaagtagggtagaagagggtattcagagaccagggaagtcctccgagctctgctctctcctc
 tacctgatagattaggacaaatatggccacctttacagatgcggagatcgacgagctatttgagacaagt
 ggaactgtcattgacaacataattacagcccagggtaaaccagcagagactgtgggaaggagtgcaatcc
 cacatggcaaaaccaaggcgtgagcgcagcatgggagaagcatgggagcatccagccaccagccagtca
 agacaccctgatcgacaggacagatctgacaacaacatccacaccgagcaagcgacccccgcatgac
 agccccggcccatccgccgaccagccccaccagggccacagacgaagccgtcgacacacagctca
 ggaccggagcaagcaactctctgctgtgatgcttgacaagctcagcaataaatcatccaatgctaaaaa
 gggcccatggctgagccccaaaggagggaaccaccaacgtccgactcaacagcagggaagtcaaccagc
 cgcggaacagtcaggaaagaccagaaacaaagtcaaggccgcccctggaaccagggcacagacgga
 acacagcatatcatggacaatgggaggagtcacaactatcagctggtgcaaccctcatgctctccgatc
 aaggcagagccaagacaataacctgtatctcggtatcatgtccagccacctgtagactttgtgcaagcg
 atgatgtctatgagggaatatacacagagagtaagtaaggttgactatcagtagatctgtcttga
 aacagacatcctccatccctatgatcggtccgaaatccaacagctgaaaacatctgttcagtcagtgga
 agccaatgggaatgatgaagattctggtatcccggttggtgccaacgtttcatctctgagtgatctacgg
 gcagttgcccgatctcaccgggttttagtttcaggccctggagaccatctccctatgtgactcaaggag

gcgaatggcacttaataaactttcgcaaccagtgccacatccatctgaattgattaacccgccactgc
 atgctgggctgatataaggagtggaaggacactgtccgtgcatgatgtcacgccaatgcacccg
 agttcttcagccaagctcctaagcaagctagatgcagccgggtcgtcgcaggaatcaggaaaatcaagc
 gccttgactaaatggctaattaccactgccacacgtagcgggtccccgtccactcggcatcacacggaa
 tctgcaccgagtcacccccgcagacctaaggtccaactctccaagtggaatcctctcgtctcctca
 gccccactgaatgatcgcaaccgtaattaatctagctacattaaggattagaaaaaacgggtaga
 attggaatgcccccaattgtgccaagatggactcatctaggacaattgggtgtactttgattctgccc
 tctctagcaacctgttagcatttccgatcgtcctacaagacacaggagatgggaagaaagcaaatcgccc
 cgcaatataggatccagcgcttgactcgtggactgatagtaaagaagactcagttatccaccaccta
 tggattcatcttcaggttggaatgaagaagccactgtcggcatgatcaatgataatccaagcgcgag
 ttactttccgtcgtgatctcgtcctaggagcgtcccaataccggagacctgttgagctggcaaggg
 cctgtctcactatggtatgcacatgcaagaagagtgcaactaactgagagaatgttttctcagtagt
 gcaggcaccggagtgctgcaagctgtagggtgtggcagacaatactcatcagcgaatgcagtcgaag
 cacgtgaaagcgcagagaagatccccgggagtggaacctaagaatacaaggtgaactttgtctcctga
 ctgtgtgaccgaagaaggtatgtctacaagatccaactgcagattgaaggtttctggctcgagctgtga
 caatcttgctcgaatgtcactattaatgtggaggtagaccggaggtcctttggttaaatctctgtct
 aagctgcacagcggatatactgtgactcctcttgcatattggacttatgaccaccgtagataggaggg
 ggaagaagtgacttttgacaagctagaaaagaagataaggagactgatctatctgtcgggtcagtgga
 tgtgtcgtcgaccttccgtgctggttaaaagcaaggtgcacggaccaagcttttgacactttctctct
 agcagtgggacagcctgctatccatagcaaatgctctcctcaggtggccaagatactctggagtcgaa
 ccgctgtgctcggagcgttaaaatcattatccaagcaggtaccacacgcgtgtcgcagtgaccgctga
 ccacgaggttacccttactaagctggagaaggggacaccccttgccaatacaatccttttaagaaataa
 gctgcgtttctgagattgcgtcccgccactcaccagagcatcatgacacaaaaactaatctgtcttg
 attatttacagttgattacgtctatcaaatagaaaaaacacgggtagaagattctggatccccgtt
 ggccgtcttagtgcaagatgggccccagaccttctaccaagaaccagcacctatgatgctgactgtc
 cgggtcgcgtggtactgagttgcatctgtccggcaaacctcattgatggcaggcctcttgccgtcgcag
 gaattgtgtaacaggagacaaagcagtcacatatacactcatccagacaggatcaatcatagttaa
 gctcctcccaaacctgccaaggataaggagcatgtgcgaaagcccccttggtatgcatacaacaggaca
 ttgaccactllgclaccccccllgclgactlclalccglaggalacaagagclclglaclacalclggag
 ggaggagacagaaacgctttataggcgccattattggcgggtgtggctcttgaggttgcaactgctgcaca
 aataacagcggcgagctctgatacaagccaacaaaatgctgccaacatcctccgacttaagagagc
 attccgcaaccaatgagggcgtgcatgaggtcactgacggattatcgcaactagcagtggcagttggga
 agatgcagcagttgtcaatgaccaatttaaaaaaactcaggaattaggctgcatcagaattgcaca
 gcaagttggcgtagagctcaacctgtatctaaccgaattgactacagtattcggaaccacaatacattca
 cctgccttaacaagctgactattcaggcactttacaatctagctggtgggaatatggatcactgtttga
 ctaagttagggttagggacaatcaactcagctcattaatcggtagcggcttaatcaccggcaaccctat
 tctgtacgactcacagactcaactcttggtatagcagtaactctaccttcagtcgggaacctaaataat
 atgctgtccacactcttggaaccttatccgtaagcacaaccaggggatttgcctcggcacttgtccaa
 aagtggtgacacaggctgggttctgtgatagaagaacttgacacctatattgtatagaaccgacttggga
 ttatattgtacaagaatagtaacattccctatgtcccctggtatttctctgcttgagcggcaataca
 tcggcctgtatgtactcaaaagaccgaaggcgcactcactacgcatacatgactatcaaaaggctcagtc
 tcgtaactgcgaatgacaacatgtagatgtgtaacccccgggtatcatatcgcaaaactatggggga
 agccgtgtcttaataagataagcaatcatgcaatgtttatccttagacgggataactttaaggctcagt
 ggggaattcgatgcaacttatcagaagaatatctcaatacaagattctcaagtaataataacaggcaatc
 ttgatatctcaactgagcttgggaatgtcaacaactcgcagtaatgctttgaataagttagaggaaag
 caacagcaacttagacaagtaatgtcaaaactgaccagcacatctgctctattacctatctggtttg
 actatcatatctctgttttggatatacttagcctggttctagcatgctacctaattgtacaagcaaaagg

cgcaacaaaagaccttattatggcttgggaataataccctagatcagatgagagccactacaaaaatgtg
 aacacagatgaggaaacgaaggtatccctaataagtaattgtgtgaaagtctggtagctgtcagttcgg
 agagttagaaaaaactaccggtttagatgaccaaaggacgataacgggtagaacggtaagagaggcc
 gcccctcaattgcgagccgggcttcacaacctccgttctaccgcttaccgacagcagtcctcagtcag
 gccgcgcagtttagccaagttgcgttagagaatgatgaaagagaggcaaaaaatcatggcgcttgatat
 tccggattgcaattctactctaacagtagtgaccttagctacatctgtgacctccctgtatatagcat
 gggggctagcacacctagcgacctgttaggcataccgaccaggattccaggggcagaagaaaaaattaca
 tctgcaacttgggtccaatcaagatgtatgatatagatatataagcaagtggcccttgagctcctgttg
 cattgttaaacactgagatcacaaattatgaacgcaataacatctctcttatcagattaatggagctgc
 gaacaacagcggtggggggcacctatccatgcccagattttatcgggggtagagcaagaactcatt
 gtagatgatgctagtgatgtcacatcattctatccctctgcatttcaagaacatctgaattttatccgg
 cgccctactacaggtacaggttgcactcggttacctcttggacatgagtgctaccattactgctacac
 tcataatgtaattgtctggatgcagagatcactcacactcacatcagttattagcacttgggtgctc
 cggacatctgcaacaggaggatattcttttactctgcgttccatcaatctggatgacacccaaaaatc
 ggaagtcttgcatgtgtgagtgcaactcccttaggttgatgtgctgtcgtcgaagtacggagacaga
 ggaagaagattataactcagctgtccctacgctgtaggtacatgggaggttaggggtcgaaggcaatc
 cacgaaaaggacctagacgtcacacaattattgaggactgggtggccaactaccagagtaggggggtg
 gatcttttattgacagccgctatggttctcagctacggagggtgaaacccaactcaccagtgacac
 tctacaggaagagaaatataataatacaagcgatacaatgacacatgccagatgagcaagactaccag
 atccgaatggccaagtcttcgtataagccccggcggttgggtgggaaacgcatacagcaggtctcttat
 ctatcaagggtgcaacatcttggcggaagaccagctactgtactgtaccgccaacacagtcacactcat
 gggggccgaaggcagaattctcacagtagggacatctcatttctgtatcagcgagggtcatcatacttc
 tctcccggttattatctctatgacagtcagcaaaaaacagccactctcatagtccttatacattca
 atgcttctactcgccaggtatgtagtcccttgcaggcttcagcaagatgcccacactgtgtgtactgg
 agtctatacagatccataatccctaattctctataggaaccacaccttgcgaggggtattcgggacaatg
 ctgtatggtgtacaagcaagactcaatcctgcgtctgcagtattcgaagcagatcccgagctgcacaa
 cccgagtgaggtcaagcagcaccaaagcagcatacacaacatcaacctgttttaaagtgtcaagacca
 taagacctattgtctcagcattgctgaaatataatactctcttggagaattcagaatcgcccggtta
 ctagttagatctcctcaaaaatgtaggggttagagaagccaggctgtggttagtgagtcactatgaaaga
 gctggaagatggcattgtatcacctatctccgcgacaccaagaatcaaatgaatgccggtgtgagct
 cgaattccatgtcgccagtgtagtacaatcagccagtgctcatgcgacagatcaagtctgtcaatagt
 ccctcgattaaagaaaaatgtaagtggcaatgagatacaaggcaaacagctcatggttaatagtacggg
 taggacatggcgagctctgtcctgaaaggcgagagcatcagattatcctaccagagtcacacctgtct
 caccattgggtcaagcacaactacttttactggaaattaactgggttaccgcttctctgatgaatgtga
 ctgcaccacctcattctcagcagacaatggaaaaaatactgaatcgccctctcctgatactgagaga
 atgataaaactcggaggggcagtagcaccaaaactcaccacaattctagaataaccggagtagtacc
 ccagggtgttagaagaactggctagttgaggtccctgattcaaccaaaaaatttcggaagattgagaa
 gaagatccaaattcacaacacagagatatggagaatgttcacaaggctgtgtacgcatatagagaagaaa
 ctgctgggggtcatcctgtcttaacaatgtccccgggtcagaggagttcaacagcatccgtacggatccgg
 cattctggttctactcaaaatggtccacagccaagttgcatggctccatataaaacagatccagaggca
 tctgattgtggcagctaggaagggctgcggccaacaaattgggtgatgtaaccataaggttaggcaa
 gtctttgtcactcctgaacttgcattgtgacgcatacgaatgagaacaaagttcacatgtcttaccagg
 aactgtattgtatgtatgcagatatgtggaggcgagagatatggtcaacataatataaccacggcggt
 gcatctcagaagcttatcagagaaaattgatgacatttgcagttaatagacgctctgcgaaaagacttg
 ggtaatcaagtctacatgtgtatcactaatggagggttgcatacggagctgtccagctgtcgcagc
 cgtcaggtacatttgcaggagatttcttcgactcaacctgcaggagcttaagacattctaactgcgct
 cctcccaatgatatagcagaatccgtgactcatgcaatagctactgtattctctggttagaacagaat

caagcagctgagatgttgctgtgctgtggtggtcaccactgcttgagtcctgattgcagcaa
 aggcagtcaggagccaacgtgctgcaccgaaaatggtggacttgatatgaccttcaggactgtctt
 ctcaagggaacaatcatcaacggatacagaagaagaatgcaggtgtgtggccgcgagtcgaagtggat
 acaatatatgggaaggtcattgggcaactacatgcagattcagcagagatttcacacgatatcatgttga
 gagagtataaggtttatctgacttgaatttgagccatgtatagaatacaccctgtcactaacctgag
 catgttctctaaaagacaaggcaatcgacacccctaacgataattggcttcctcgtttaggcggaacctt
 ctctccgaagaccagaagaacaatgtaaaagaagcaacttcgactaatgcctcttgatagagtttttag
 agtcaaatgattttgatccatataaagagatggaaatctgacgaccctggagtagccttagagatgacga
 tgtggcagtatcactcgtcctcaagagaaggaagtgaagttaattggacggatcttcgtaagctgaca
 aagaagttaaggaactgtcaggtgatggcggaaggatcctagccgaccagattgcaaccttttcagg
 gaaatggagtcattcaggatagcatatctttgaccaagagtatgtagcgatgagtcactgtctttaa
 cagcaataagaacgtatcactgactgtaaagaagagtatctcaaacggcaatcatgatccgaagagc
 aagaaccgtcgagaggttcaaccttcataacgactgacctgcaaaagtactgtcttaattggagatc
 agacaatcaaacgttctgctcatgccatcaaccagttgatgggctacctcacttctcgagtggattca
 cctaagactgatggacactacaatgttcgtaggagaccctttcaatcctccaagtacacctactgactgt
 gaccttcaagagtcctaatgatgacatatattgtcagtgccagagggggtatcgaaggattatgtc
 agaagctatggacaatgatctctattgtcgaatcgaactgtcgcagctagatcgattgtcgcgttgc
 ctgtatggtagcaggtgataatcaagtaatagcagtaacgagagaggtgaagatcagacgactctccggag
 atgtgtgtgacacagttgcatcaagccagtgataatttctcaaggaattatcatgcaatcatttga
 ttggccataatttgaaggtatgtgaaaccatcaggtcagacacatttctatatacagcaaacgaatctt
 caaagatggagcaatcctcagtcagtcctcaaaaattcatctaaattagtagtactagatcaggtgatctc
 agtgaanaacaccgtatgtcctgtgccaacattgctctactgtgacaggtatgcgagaacgggcttc
 ccaaggacttctgttactattaaactatataatgagttgcgtgcagacatacttgactctgagttctc
 catcaccaacaattcgaccccgatcttaaccagtcgtggattgaggacatctctttgtgactcatat
 gttctgactcctgcccaattagggggacttagtaaccttcaataactcaaggctctacactagaaatcgc
 gtgacccggggactactgcttttgagagatcaagcgactagaagcagtgaggattactgagtcctaacat
 tatgactaatatcttaactaggccgcctgggaatggagattgggccagtccttgcaacgaccatactct
 tcaattttgagactgttcaagcccaaacattgttcttaagaaacatacgcaagagtcctatttga
 ctgttcaaatccctattgtctggagtgacacagaggataatgaggcagaagagaaggcattggctga
 attctgtctaatacagaggtgattcatccccgcgttgcgcatgctatcatggaggcaagctctgtaggt
 aggagaagcaaattcaagggcttgtgacacaacacaccgtaattaagattgcacttactaggaggc
 cactaggcatcaagaggctgatgcggatagcaattattctagcatgcatgcaatgctgttttagagagca
 tgtttttctcctcaatcgatccaaccaccccttagtctcttctaafatgtgttctctgacactggcagac
 tatgcacggaatagaagctgtcacctttgacgggagggcaggaaaatactgggtgtatctaactctgata
 cgatagaactcgtagagggtgagattctagtgaagcggagggtgcacaagatgtgacagcggagatga
 acagtttactgttccatcttccaagcaatatagaattgaccgatgacaccagcaagaatcctccgatg
 agagtaccatatctcgggtcaaaagacacaggagaggagagctgcctcacttgcgaaaatagtcatatgt
 cgccacatgtgaaggctgccctaaggcatcatccgtgttgatctgggcttatggggataatgaagtaaa
 ttggactgctgctcttacgattgcaaatctcgggtgaatataaacttagagtatcttcgggtattgtcc
 cctttccccacggctgggaatcttcaacatagactagatgacggtataactcagatgacattcacccctg
 catctctacacagggtgtcaccttcaattcacataccaatgattctcaaggctattcactgaagaagg
 agtcaagaggggaatgtggtttatcaacagatcatgctcttgggtttatctctaatacgatcttt
 ccaatgatgacaaccaggacatgatgatgacacattgcatctacatagtaaatattggtgctgtatca
 gggaagcacctgttgcgttcttctgagctacttgggtggcaccggagctaaggacagtgacctcaaa
 taagtttatgtatgaccttagccctgtatcgaggagacttgcgagacttgacttagctatcttcaag
 agttatgagcttaactctggagtcataatcccacgataagctaatgaacattcttcaatatccagcggga
 agttgattggccagctctgtgtttcttatgatgaagatacctcataaagaatgacgccataatagtga

tgacaatacccgaaattggatcagtgaaagctcagaattcagatgtggccgcttatttgaatatgcagca
 ctfgaagtgtcctcgtactgttctaccaactctattatctgagagtaagaggcctagacaatttgtct
 tatataatgggtgatttatacaagaatatgccaggaattctactttccaacattgcagccacaatatctca
 tcccgctatcattcaaggttacatgcagtggtggtcgaacatgacggatcacaccaacttgcagat
 acggattttatcgaaatgtctgcaaaactgttagtatctgcaactcgaactgtgactcggcttatatt
 cagggaataagatgatctgctgttcccatctgtcttagatgataacctgaatgagaagatgcttcagct
 gatataccgggttatgctgtctgtacacgggtactcttctgctacaacaagagaaatcccgaataagaggc
 ttatctgcagaagagaaatgttcagttactgagttactgtcggatgctgtgaaaccattactta
 gccctgatcaggtgagctctatcatgtctcctaataattacattcccagctaattctgtactacatgtc
 tcggagagcctcaatttgatcagggaaaggagacaggatatactctgctgtgttctccccc
 gagccattattagagttcccttctgtgcaagatatgtgctcagtgaaagatcattcaccgcacaac
 tcgctggcattttgcaagagttagattgagtgctccagcaaggtatgacgcattcacatttagtcagat
 ctatcctgagctcacatcacaaatccggagggaagactacttagtacgatactgttcagaggaataggg
 gctgcatctcctctgtgataaggcatcccatctcttctgtacccgaggtgaagatgtgcaagacag
 ggaactccttacttagctgaaggagcggagccatcatgagttctcgaactgcatataccacatga
 aactatctattacaatacgtcttttcaaatgagatgaacccccgcagcgacatttgggcccacccca
 acccagttttgaaatcggtgtttataggaacctacaggcggaggttaacatgcaaggatggattgtcc
 aagagttccgtccactatggagagaaaatacagaggaagcgacctgacctcagataaagcagtgaggga
 tattacatctgcagtgccctacagatctgtatcattgctgattgacattgaaatccctccagggtcc
 aatcaaaagctactagatcaactagctatcaattatctctgattgccatgcattccttaaggaggcggc
 ggtagtgatcatcaaatgtgtgtatgcaatgggatactacttcatctactcatgaactgttctcctcc
 gtgtccacaaaaggatacattctctaatgtgtatgcatgtagaggggatagagtggttacctggta
 ttgtcatgggttacctgggctggcctacattgtacacgaggtgtgaggtggcaaaaactctgtgtc
 agcggcagcgtacgtttttgcaaatcagatgagatcacactgaccaggttattacctcagacggcga
 gcgtgtgacagacatcctatccagtcctttaccaagattaataaagtacttgagaagaatattgacact
 gcgctgattgaagctgggggacagcccgctccgctcattctgtgacagaggttgggtgagcacgctagcgg
 acataactcagataaccagatcattgctatgcattgacacagtcacccgtctgtgatataatgga
 agctgaggggtgctgtcgtgacacagttttctatttacccttacaattctctactgacgggaaaaag
 agaactcacttaaacagtgacgagacagatcctagaggttacaatactgggtcttagagtcgaagatc
 tcaataaaataggcgtatgaatcagcctagtgtctaaaggcatgatctccatggaggacattatccact
 aaggacatactgaagcatagctacgtccctaaataatttgaaggctgtcctagggtattaccaactaaa
 gaaatgtttacagacacctctgtattgtactgactcgtgctcaacaaaattctacatgaaaactatag
 gcaatgcagtcgaagataatcagtaactgtgactcttaacgaaaatcacatataataggctctttt
 ctggccaattgtatccttgggtgatttaattatactatttagaaaaagttgaactctgactccttagag
 ctagaattcgactcaataaataatgtcttaaaaaagggtgcgcaacaattttcttgagtgtgctgtc
 attcaccaaatcttgttgggtggcggcatggtccagcctcctcgtgctggcggcgtgggcaacattc
 cgaggggacccgtccctcggtaatggcgaatgggacgtcgacagctaacaagcccgaaggagtgagtt
 gctgctgccaccgttgagcaataactagcataacccttggggcctctaaacgggtcttgagggggtttt
 tgctgaaaggagtcgtggagacgtgtttaaac

Иллюстративная нуклеотидная последовательность F-белка wt, где подчеркнутая последовательность обозначает нуклеотидную последовательность сайта расщепления F-белка, представляет собой

atggggccsagaccttaccagaaccagcacctatgatgctgactgtccgggtcgcgtggtactgagttgcatctgtccggcaaa
 ctccattgatggcaggcctcttgcggctgcaggaattgtggttaacaggagacaaagcagtcacatatacacctcatccagacaggat
 caatcatagttaaagctcctccaaacctgcccaggataaggagcagtgatgcgaagcccccttggatgcatacaacaggacattgac
 cactttgtcacccttgggtgactctatcgttaggatacaagagtgctgtaactacatctggagggaggagacagaacgctttatag
 gcgcattattggcgggtgtggtcttggagttgcaactgctgcacaaataacagcggccgagctctgatacaagccaaacaaatgct
 gccaacatcctccgacttaagagagcattgccgaaccaatgagccgtgcatgaggtcactgacggattatcgcaactagcagtggtg
 cagttgggaagatgcagcagttgtcaatgaccaatttaataaaacaactcaggaattaggctgcatcagaattgcacagcaagttggcg
 tagagctcaactgtatctaaacgaattgactacagttatcgaccacaatcattcacctgccttaacaagctgactattcaggcactt
 tacaatctagctgggtgggaatatggatcacttgtgactaagttaggttaggggaacaataactcagctcattaatcggtagcggcctaat
 caccggcaccctattctgtacgactcacagactcaactcttgggtatagaggttaactctacctcagtcgggaacctaaataatagcgt
 gccacactattggaaacctatccgtaagcacaaccaggggatttgctcggcactgtcccaaaagtgtgacagaggtcggttctgtg
 atagaagaactgacacctcatattgtatagaaccgacttggatttatgtacaagaatagtaacattcctatgtccctggtatttattc
 ctgcttgagcgggaatacatcggcctgtatgtactcaagaccgaaggcgcactactacgccatacatgactatcaaggctcagtc
 tcgtaactgcaagatgacaacatgtagatgtgtaacccccgggtatcatatcgaaaactatggggaagccgtgtctctaatagata
 agcaatcatgcaatgttttcttagacgggataactttaaggctcagtggggaattcgatgcaacttatcagaagaataatctcaatacaa
 gattctcaagtaataaacaggcaatctgtatctcaactgagcttgggaatgtcaacaactcagtcagtaaatgctttgaaatagtaga
 ggaaagcaacagcaaaactagacaaggtcaatgtcaaaactgaccagcacatctgctctattacctatatcgtttgactatcatactctgt
 ttttggtatactagcctggttctagcatgctacctaattgtacaagcaaaaggcgaacaaaagaccttatttgcttgggaataataccc
 tagatcagatgagagccactacaaaatgtga

Иллюстративная аминокислотная последовательность F-белка дикого типа, где подчеркнутая последовательность обозначает аминокислотную последовательность сайта расщепления F-белка:

mgprpstknppmmmltvrrvalvlsicpansidgrplaaagivvtgdkavniytssqtgsiivklpnlpkdkeacakapldaynrt
 ltltlplgdsirriqesvttsggrrqkrfgaiiggvalgvataaqitaaaaliqakqnaaniLrlkesiaatneavhevtglsqllavav
 gkmqqfvndqfnkttqelgciriaqqvgvelnlylteltvfgpqtspalnklitqalynlaggnmdhlltklgvgnnqllsligsgli
 tgnpilydsqtqllgiqvtlpsvgnlnnmratyletltsvsttrgfasalvpkvvtqvgsvieeldtsycietldldlyctrivtspmgiys
 clsgntsacmysktegaltpymtikgsvianckmttcrcvnpippiisqnygeavslidkqscnvlslgditrlsgefdatyqnisi
 qdsqviitgnldistelgnvnnsisnlnkleesnsklkvnlkltstsalitvltiislvgilslvlacylmykqkaqqktilwlgnn
 tldqmrattkm

Иллюстративная нуклеотидная последовательность мышинного GM-CSF представляет собой
 Atgtggctgcagaacctgctgttctgggcatcggtgtacagcctgagcgccctaccagatcccccatcaccgtgaccagaccct
 ggaaacatgtggaagccatcaagagagccctgaatctgctggacgacatgcccgtagccctgaacgaagaggtggaagtggtgtcc
 aacgagttcagcttcaagaaactgacctgctgcagaccggctgaagatctttgagcagggcctgagaggcaacttcaccaagctga
 agggcgctctgaacatgaccgccagctactaccagacctactgccccccaccccgagacagattgcgagacacaagtaccacc
 tacgccgacttcacgacagcctgaaaaccttctgaccgacatccccctcgagtgaagaacccggccagaagtga

Иллюстративная аминокислотная последовательность мышинного GM-CSF представляет собой
 mwlqnllfgivvyslsaptrspitvtrpwkhveaikaenllddmpvtlneevevvsnefsfkklctvqtrlkifeqglrgnflklk
 alnmasyuqtpptpetdctetqvtyadfidslktfldipfeckkpqgk

Иллюстративная нуклеотидная последовательность человеческого GM-CSF представляет собой
 Atgtggctgcagagcctgctgctgctgggacagtgccctgtagcatctctgcccctgccagaagccctagccctagcacacagccc
 tgggagcatgtgaagccatccaggaagccagacggctgctgaacctgagcagagacacagccgccgagatgaacgagacagtg
 gaagtgtatccgagatgttcatctgcaagagcctacctgctgcagacccggctggaactgtacaagcagggcctgagaggcagc
 ctgaccaagctgaaggagccctgaccatgatggccagccactacaagcagcactgccccccacaccgagacaagctgtgccac
 ccagatcatcaccttcgagagcttcaagagaacctgaaggacttctgctgtagatcccttcgactgctgggagcccgtaggaat
 ga

Иллюстративная аминокислотная последовательность человеческого GM-CSF представляет собой
 mwlqslillgtvacsisaparspsstqpwhehvnaiearrllnsrdtaaemnetveisemfdlqptclqtrlelykqglrgsltkl
 kgpltmashykqhcpptscatqiitfesfkenlkdflvipfdcwepvqe

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображена структура антигеномной кДНК NDV 73T из штамма 73T. Последовательности NDV из GenBank выравняли с получением консенсусных последовательностей для разработки ДНК-олигонуклеотидов для RT-PCR вирусной РНК. Шесть субгеномных кДНК-фрагментов, полученных с помощью высокоточной RT-PCR, собирали в векторе pUC19. кДНК полной длины NDV 73T обозначили как p73T. Нуклеотидную и предсказанную аминокислотную последовательности сайта расщепления F-белка (FPCS) в 73T модифицировали так, чтобы получить последовательности из штамма NDV LaSota (лентогенный, lento) и gB цитомегаловируса (CMV) (S116). Двойная косая черта указывает на сайт расщепления F-белка. Кроме того, плазмида с кДНК штамма 73T (p73T) содержит 27 нуклеотидов (нт) промотора для РНК-полимеразы T7 на 5'-конце и 189 нт, содержащих последовательность антигеномного рибозима HDV и сигнал терминации транскрипции для РНК-полимеразы T7 на 3'-конце. Для получения невирулентного NDV последовательность, кодирующую сайт расщепления протеазой белка слияния модифицировали при помощи сайт-направленного мутагенеза, чтобы получить последовательность невирулентного штамма NDV LaSota (лентогенный, lento) или гликопротеина В (gB) цитомегаловируса (S116).

На фиг. 2А и 2В изображена вставка трансгенной(трансгенных) кассеты(кассет) в геном NDV 73T. На фиг. 2А показана вставка трансгена в участок соединения Р-М. Сайт рестрикции AfeI вводили в нт 3148 в плазмиде для субклонирования, содержащей фрагмент SacII-PmlI. кДНК кодируют кодон-оптимизированный человеческий или мышинный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) или интерлейкин 2 (IL-2). Вставленная генная кассета содержит последовательность конца гена (GE; 5'-ТТААГАААААА-3'), межгенный нуклеотид (Т), последовательность начала гена (GS; 5'-ACGGGТАГА-3') и открытую рамку считывания (ORF) трансгена. Кроме того, десять нуклеотидов (5'-сgccgcacc-3') вставляли выше сайта инициации для введения последовательности Козак. Фрагмент SacII-PmlI из полученной в результате плазмиды перемещали в плазмиду r73T и называли как p73T-P1. Кроме того, на фиг. 2А показана вставка трансгена в участок соединения HN-L между ORF HN и сигнальной последовательностью конца гена (GE) HN, при этом сайт рестрикции AfeI вводили в нт 8231 в плазмиде, содержащей фрагмент AgeI-XbaI. Генную кассету получали при помощи ПНР с применением пары из смыслового и антисмыслового праймеров с фосфатом (табл. 3) и вставляли в сайт AfeI. Фрагмент AgeI-XbaI из полученной в результате плазмиды перемещали в плазмиду r73T с получением p73T-HN1. кДНК полной длины (FL) 73T, содержащую трансген в участке соединения Р-М или HN-L, обозначали как p73T-P1 или p73T-HN1, соответственно. На фиг. 2В показана вставка двух кассет для транскрипции в участок соединения Р-М. Сайт AfeI вводили в конец ORF GM-CSF (нт 3619). ORF IL-2 амплифицировали с применением пары из смыслового и антисмыслового праймеров с фосфатом, содержащих последовательности GE и GS, и вставляли в сайт AfeI. Фрагмент SacII-PmlI из полученной в результате плазмиды, включающей кассеты для транскрипции GM-CSF и IL-2, переставляли обратно в плазмиду r73T с получением p73T-P2.

На фиг. 3А-3С показано выделение инфекционного рекомбинантного штамма NDV 73Т (r73Т) с модифицированным FPCS, и изображены расщепление F-белка и активность слияния *in vitro*. На фиг. 3А показано, как NP, P, L NDV 73Т и антигеномную к ДНК (p73Т-lento или p73Т-S116) клонировали под контроль промотора и терминатора для РНК-полимеразы Т7. Четыре плазмиды совместно трансфицировали в клеточную линию, экспрессирующую РНК-полимеразу. Выделенные вирусы обозначали как r73Т-lento или r73Т-S116. r73Т-lento и r73Т-S116 пассировали в клетках Vero со средами с добавлением трипсина и без добавления его. Рост r73Т-lento является трипсинзависимым, тогда как r73Т-S116 может расти на средах без добавления трипсина. Для оценки генетической стабильности FPCS в r73Т-S116 и трансгене r73Т-S116 с hGM-CSF в участке соединения Р-М и без него далее пассировали на протяжении 10 пассажей в клетках Vero и фибросаркомы человека HT1080 при MOI 0,01 в средах без добавления трипсина. Мутации (R113K и/или Q114M) в FPCS появлялись на пассаже 7, а мутацию S116R обнаруживали на пассаже 9. На пассаже 10 секвенировали F, HN и трансген и никаких дополнительных мутаций не обнаружили. На фиг. 3В и 3С показан эффект мутации сайта расщепления F-белка (FPCS) на слияние клеток и расщепление F-белка *in vitro*. Для конструирования плазмиды, совместно экспрессирующей два трансгена, GFP и гены F и HN NDV, открытые рамки считывания генов белка F или HN NDV амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали в плазмиду pVito2-neo-MCS (Invitrogen) под контроль промотора цитомегаловируса (CMV). Клетки 293Т высевали при 5×10^5 клеток/лунку в 6-луночный планшет для трансфекции на следующий день. На фиг. 3В изображены клетки, трансфицированные 2 мкг ДНК F-плазмиды NDV, в течение одного дня и собранные в буфер для лизиса белков для Вестерн-блот анализа с применением поликлональной антисыворотки со специфичностью к F NDV. F-белок NDV с лентогенным сайтом расщепления и S116 не подвергались расщеплению, обнаруживали только F0. F-белки с R116 и S116-КМ частично подвергались расщеплению, на что указывает появление полосы F1-белка. На фиг. 3С показаны клетки, которых совместно трансфицировали различными F-плазмидой, HN-плазмидой wt и которых исследовали в отношении образования слияния при помощи флуоресцентного микроскопа. F-белок wt был наиболее эффективным в образовании слияния.

Фиг. 4 представляет собой таблицу, обобщающую характеристики r73Т-lento и производных r73Т-S116. ^aВсе вирусы содержат hGM-CSF в участке соединения Р-М. ^bАминокислоты в FPCS, которые отличаются от FPCS-S116, подчеркнуты. ^cОбразование бляшек в клетках Vero без трипсина в покрытии через 36 часов инкубации и визуализация под $\times 10$ увеличением. ^dСреднее время гибели в яйцах (MDT). ^eПатогенность NDV для 1-дневных не содержащих патогена кур согласно индексу внутримозговой патогенности (ICPI). Анализ ICPI осуществляли в лабораториях Национальной ветеринарной службы (NVSL) (Эймс, Айова). ^fЭффект цитотоксичности вирусов на клетках фибросаркомы человека HT1080 после заражения при множественности заражения (MOI), составляющей 0,01, через 72 ч после заражения. Относительную процентную долю выживших клеток определяют путем сравнения каждого образца с необработанными клетками, жизнеспособность которых считают равной 100%. Данные, представленные в таблице, относятся к относительной процентной доле погибших клеток. ^gВирус, выращиваемый в клетках Vero после заражения при MOI, составляющей 0,01, и культивируемый в OPTI-MEM без добавления трипсина в течение 3-5 дней при 37°C. ^hВирус, выращиваемый в оплодотворенных куриных яйцах. 10-11-дневные оплодотворенные яйца заражали 1000 БОЕ r73Т. Амниотическую жидкость собирали после инкубации при 37°C в течение 72 ч. Инфекционный титр вируса определяли на клетках Vero с помощью анализа бляшкообразования.

На фиг. 5А и 5В изображены стратегии аттенуации вирулентности вируса r73Т-R116 у кур. На фиг. 5А изображена вставка трансгенов в участок соединения Р-М (1) и участок соединения HN-L (2) и удлинение межгенной области HN-L путем вставки некодирующей последовательности (3). Вставку трансгенной кассеты в участок соединения Р-М проводили так же, как показано на фиг. 2А. 2-ая трансгенная кассета содержит последовательность начала гена L (GS; 5'-ACGGGTAGA-3'), открытую рамку считывания (ORF) трансгена, последовательности из 3'-нетранслируемой области гена L (обозначены курсивом) и последовательность конца гена L (GE; 5'-TTAAGAAAAA-3'). Некодирующие последовательности, используемые для удлинения участка соединения HN-L, брали из парамиксовирусов 1 типа (APMV-1), респираторного синцитиального вируса (RSV) или случайной последовательности, которая не обладает идентичностью или гомологией последовательности с известными последовательностями. Длина последовательности вставки может находиться в диапазоне 60-318 нт. Вставка 2-го трансгена в HN-L дает вирусу возможность экспрессировать два трансгена (например, hGM-CSF и GFP). На фиг. 5В изображены последовательности, которые были вставлены в участок соединения HN-L.

Фиг. 6А представляет собой таблицу, обобщающую характеристики производных r73Т-R116. ^aВсе вирусы содержат hGM-CSF в участке соединения Р-М. ^bПоследовательности вставляли в участок соединения HN-L, как показано на фиг. 5В. ^cОбразование бляшек в клетках Vero без трипсина в покрытии через 36 часов инкубации и визуализация под $\times 10$ увеличением. Среднее время гибели в яйцах (MDT). ^eПатогенность NDV для 1-дневных не содержащих патогена кур согласно индексу внутримозговой патогенности (ICPI). Анализ ICPI осуществляли в лабораториях Национальной ветеринарной службы (NVSL) (Эймс, Айова). ^fЭффект цитотоксичности вирусов на клетках фибросаркомы человека HT1080 после за-

ражения при множественности заражения (MOI), составляющей 0,01, через 72 ч после заражения. Относительную процентную долю выживших клеток определяют путем сравнения каждого образца с необработанными клетками, жизнеспособность которых считают равной 100%. Данные, представленные в таблице, относятся к относительной процентной доле погибших клеток. Вирус, выращиваемый в клетках Vero после заражения при MOI, составляющей 0,01, и культивируемый в OPTI-MEM без добавления трипсина в течение 3-5 дней при 37°C. ^hВирус, выращиваемый в оплодотворенных куриных яйцах. 10-11-дневные оплодотворенные яйца заражали 1000 БОЕ r73T. Амниотическую жидкость собирали после инкубации при 37°C в течение 72 ч. Инфекционный титр определяли на клетках Vero с помощью анализа бляшкообразования.

Фиг. 6B-6E представляют собой графики, демонстрирующие кинетику роста рекомбинантного NDV в клетках DF-1 и Vero. Клетки DF-1 и Vero в шестилуночных планшетах заражали с помощью каждого указанного вируса при множественности заражения (m.o.i.), составляющей 5,0 (один цикл, фиг. 6B и 6C) или 0,001 (несколько циклов, фиг. 6C и 6D). Надосадочные жидкости зараженных клеточных культур собирали с интервалами 10 ч вплоть до 50 ч после заражения и титры вирусов определяли с помощью анализа бляшкообразования.

На фиг. 6F и 6G показан синтез вирусной РНК и белка в клетках DF-1. Клетки DF-1 заражали каждым указанным вирусом при m.o.i, составляющей 5,0, инкубировали в течение 20 ч, общие внутриклеточные РНК экстрагировали для нозерн-блот анализа (фиг. 6F), а второй набор зараженных клеток исследовали в отношении синтеза белка при помощи Вестерн-блоттинга (фиг. 6G). РНК разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле, содержащем формальдегид, переносили на нитроцеллюлозные мембраны и гибридизировали с мечеными биотином РНК-зондами, специфичными в отношении генов HN, NP, P и L. РНК-зонд с положительной нитью гена L применяли для обнаружения вирусной геномной РНК. Общие белки разделяли на SDS-PAGE и проводили блоттинг с антисывороткой к NP, F, HN и L. Общие белки, загруженные на гель, обнаруживали с помощью актин-специфичного антитела. Рекомбинантные R116i NDV со вставкой длиной 198 нт в последовательности между генами HN и L характеризовались общим снижением синтеза РНК и белка в клетках DF-1.

На фиг. 6H и 6I изображен синтез вирусной РНК и белка в клетках Vero. На фиг. 6H показан нозерн-блот анализ синтеза РНК. Клетки Vero заражали вирусами при m.o.i, составляющей 5,0, инкубировали в течение 20 ч, общие внутриклеточные РНК экстрагировали. РНК разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле, содержащем формальдегид, переносили на нитроцеллюлозные мембраны и гибридизировали с мечеными биотином РНК-зондами, специфичными в отношении генов HN и L, или положительной смысловой нитью РНК гена L для обнаружения геномной РНК. На фиг. 6I изображен Вестерн-блот анализ синтеза вирусных белков в зараженных клетках Vero. Общие белки разделяли на SDS-PAGE, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и проводили блоттинг с антисывороткой к NP, F, HN и L. Общие белки, загруженные на гель, обнаруживали с помощью актин-специфичного антитела. Вирусы R116i со вставкой длиной 198 нт имели сниженный уровень геномной РНК, но сильно повышенный уровень мРНК NP по сравнению с S116 и NDV wt. Уровень мРНК L-белка был слишком низким, чтобы установить разницу. Белки, расположенные выше гена L, подвергались повышающей регуляции, но уровень L-белка в клетках Vero был снижен.

На фиг. 6J и 6K показано сравнение синтеза F-белка в зараженных клетках DF-1 и Vero при низкой множественности заражения с помощью Вестерн-блот анализа. Клетки DF-1 и Vero заражали каждым указанным вирусом при m.o.i, составляющей 0,001, инкубировали в течение 72 ч и собирали в буфер для лизиса белков. Общие белки разделяли на SDS-PAGE, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и проводили блоттинг с антисывороткой к NP, F, HN и L. Белки, загруженные на гель, обнаруживали с помощью антитела к актину. Уровень L-белка был снижен в обеих клеточных линиях, однако, белки выше гена L подвергались понижающей регуляции в клетках DF-1, но при этом подвергались понижающей регуляции в клетках Vero.

На фиг. 6L показан синтез вирусных белков в зараженных человеческих клетках в сравнении с клетками DF-1. Человеческие клетки HT1080, Hela и клетки DF-1 заражали каждым указанным вирусом при m.o.i, составляющей 5,0, инкубировали в течение 20 ч и собирали в буфер для лизиса белков. Белки разделяли на SDS-PAGE, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и проводили блоттинг с антисывороткой к HN и L. Экспрессия HN-белка из R116i со вставкой длиной 198 нт в участке связывания между HN и L является повышенной в клетках HT1080 и Hela, но сниженной в клетках DF-1. L-белок был сниженным во всех трех клеточных линиях, зараженных R116i-198 или 198RSV.

На фиг. 7 показаны графики, изображающие кинетику роста вирусов r73T в оплодотворенных куриных яйцах. Для определения условий роста для вирусов r73T исследования кинетики роста осуществляли на яйцах. Оплодотворенные куриные яйца заражали 100, 1000, 10 000 или 100 000 БОЕ/яйцо указанных вирусов и инкубировали в течение 2, 3 или 4 дней (73T wt, верхний ряд, слева; R116, верхний ряд, справа; R116i-318, средний ряд, слева; R116i-198-RSV, средний ряд, справа; R116i-198-random, нижний ряд, слева; S116-KM, нижний ряд, справа). Собирали аллантоисную жидкость и вирусные титры определяли с помощью FFA. Инокуляция 100 FFU/яйцо приводила к низкому титру в день 1, но пиковый титр достигался в день 2. В целом, большинство вирусов достигали пиковых титров, составляющих ~8

log/мл в день 2, независимо от применяемой дозы инокулята. R116i-198 характеризовался самым низким титром, причем низкая доза инокуляции приводила к самому высокому выходу в день 2, что указывает на то, что могло происходить накопление дефектных частиц. Вставка R116i-318-APMV также характеризовалась более низким пиковым титром, составлявшим ~ 7 log. R116i-198-RSV достигал пикового титра, составлявшего 7,5 log. S116, полученный снова с помощью обратной генетики, не характеризовался снижением вирусной продуктивности в яйцах. Следовательно, среди производных R116 вирус со вставкой RSV-198 нт представлял собой лучший онколитический вирус-кандидат с точки зрения свойств роста в яйцах.

На фиг. 8 показаны графики, изображающие кинетику роста вирусов r73T в клетках Vero. Вирусы также оценивали в клоне 51D11 клеток Vero, выращиваемом на бессывороточной среде, проприетарной клеточной линии, полученной с помощью MedImmune. Все вирусы реплицировались одинаково хорошо при обоих условиях моИ (0,001, вверх; 0,0001, вниз). Модификация FPCS 73T и межгенная вставка в участок соединения HN-L R116 не воздействовали на рост вируса в клетках Vero.

На фиг. 9A-9D показано, что вирусы r73T селективно реплицируются в опухолевых клетках и обладают цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток в сравнении с неопластическими клетками. Данные получали после заражения производными r73T при разной дозе в диапазоне от 1 до 100 000 БОЕ в течение 72 ч. Фиг. 9A представляет собой график, на котором показана оценка r73T и его производных в отношении цитолиза клеток на клетках фибросаркомы человека HT1080 относительно необработанных контрольных клеток. На раковых клетках HT1080 вирус с лентогенным FPCS характеризовался минимальной степенью цитолиза, с S116 в FPCS характеризовался средней степенью, а вирусы с R116 в FPCS характеризовались настолько же эффективным цитолизом клеток, что и вирус r73T wt. Фиг. 9B представляет собой график, на котором показана оценка r73T и его производных в отношении цитолиза клеток на клетках-нормальных фибробластах кожи человека CCD1122Sk относительно необработанных контрольных клеток. На нормальных клетках CCD1122SK все вирусы не осуществляли цитолиз клеток настолько же эффективно, как на раковых клетках, при этом снижение эффективности цитолиза составляло ~ 100 раз. Независимо от последовательностей FPCS все вирусы характеризовались аналогичным цитолизом на нормальных клетках, вероятно, вследствие одного цикла репликации (отсутствие распространения вируса). Фиг. 9C представляет собой таблицу, демонстрирующую эффективность цитолиза клеток на раковых и нормальных клетках, выраженную как 50% эффективная концентрация (EC_{50}), интерполированную из кривой доза-эффект с применением Prism 6.0. Производное R116 характеризовалось значением EC_{50} , аналогичным таковому у r73T wt с EC_{50} , составляющей 10 БОЕ, что указывает на то, что модификация FPCS не влияла на репликацию вируса в раковых клетках и эффективность цитолиза клеток. Фиг. 9D представляет собой диаграмму, показывающую репликацию вирусов в клетках HT1080 и CCD1122SK при МОИ 0,01 в день 3 после заражения. Все вирусы предпочтительно реплицировались в раковых клетках, а не в нормальных клетках, с отличием, составляющим приблизительно 1,5-2,0 log.

Фиг. 10A и 10B представляют собой графики, показывающие, что производные r73T являются эффективными в регрессии опухоли после местного и системного введения. Для оценки онколитической активности *in vivo* модель ксенотрансплантата HT1080 получали путем инъекции клеток HT1080 при концентрации 5×10^6 клеток/0,1 мл подкожно в бестимусных "голых" мышей Balb/C возрастом 5-6 недель. Фиг. 10A представляет собой график, показывающий эффект R116i-318-hGM-CSF, вводимого внутрь опухоли (it) или внутривенно (iv). Данные показывают, что производные R116i-318-hGM-CSF обладали противоопухолевой активностью *in vivo* при доставке либо системно, либо внутрь опухоли иммунодефицитным мышам, несущим ксенотрансплантаты опухолей человека. Скорость роста опухоли сравнивали у группы обработки и контрольной группы. Регресс опухоли, индуцированный при помощи двух путей введения, значимо отличался в обоих случаях от контрольной группы. Мышей рандомизировали в указанные группы ($n=10$), когда объем опухоли достигал приблизительно 65 мм^3 . Мыши получали однократную дозу либо PBS, либо 2×10^7 БОЕ r73T-hGM-CSF-R116i-198, вводимую внутрь опухоли (IT), либо 1×10^8 БОЕ, вводимую внутривенно (IV) путем инъекции в хвостовую вену. * $P < 0,05$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок фиг. 10B представляет собой график, сравнивающий онколитическую активность производных r73T на ксенотрансплантатах HT1080 при IV инъекции 1×10^8 БОЕ. Две дозы производных r73T были способны индуцировать значительный регресс опухоли с варьирующими степенями эффективности. r73T-lento был наименее эффективным в регрессе опухоли, тогда как r73T wt был наиболее эффективным в регрессе опухоли. r73T-lento обладал эффектом, аналогичным таковому у вируса S116, хотя вирус S116 характеризовался в 10 раз более низкой EC_{50} в цитолизе клеток *in vitro* (см. фиг. 9A). r73T-R116i-318 был настолько же активным, как и 73T wt, в ингибировании роста опухоли до 9 дней после 2^{ой} дозы (день 19 после имплантации опухоли), опухоль уменьшалась у мышей, обработанных R116i, но не у группы, обработанной 73T wt. Мышей рандомизировали в группы ($n=7$), когда объем опухоли достигал приблизительно 180 мм^3 . Мыши получали либо PBS, либо 1×10^8 БОЕ r73T-hGM-CSF-lento (lento), либо r73T-hGM-CSF-S116K113M114 (S116 KM), либо r73T-hGM-CSF-R116i-318 нт APMV-N (R116i), либо r73T-hGM-CSF (r73T wt), вводимую IV. Размер опухоли измеряли через каждые 3-4 дня. * $P < 0,05$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Данные показывают, что производные r73T

обладали противоопухолевой активностью *in vivo* при введении либо системно, либо внутрь опухоли иммунодефицитным мышам, несущим ксенотрансплантаты опухолей человека. Эффективное расщепление F-белка является важным для репликации вируса *in vitro* и *in vivo*. Вирусы с R116 в FPCS были более активными в цитолизе клеток *in vitro* и *in vivo*.

На фиг. 11A-G изображено биораспределение производных r73T в тканях после внутривенной доставки и эффект мышинного GM-CSF в сравнении с человеческим в отношении ингибирования роста опухоли. Для определения происходит ли селективная репликация онколитического вируса NDV в опухолевых тканях и клиренс вируса, определяли распределение вируса в различных органах. Бестимусных "голых" мышей, несущих подкожные опухоли HT1080 размером $\sim 250 \text{ мм}^3$, обрабатывали R116i (r73T-hGM-CSF-R116i-318 нт APMV-N) при дозе 1×10^8 БОЕ внутривенно и умерщвляли в день 1, 4 или 8 ($n=3$ на момент времени). Собирали сыворотку крови, легкие, селезенку, яичники и опухоль и количественно оценивали присутствие вируса. Репликацию вируса в опухоли и органах оценивали в дни 1, 4 и 8 после заражения. Фиг. 11A представляет собой график, изображающий количественное определение вируса в тканях при помощи анализа бляшкообразования на клетках Vero. Вирус в органах обнаруживали только в день 1 (вирус не обнаруживали в яичнике во все временные точки, данные не показаны), и вирусная нагрузка в опухолевых тканях была в ~ 100 раз выше, чем в легких и селезенках. Присутствие вируса в опухоли, с персистенцией в течение по меньшей мере 8 дней, указывает на то, что вирус селективно реплицировался в опухолевых тканях.

Фиг. 11B представляет собой график, изображающий количественное определение GM-CSF, экспрессируемого вирусом в тканях, при помощи анализа ELISA экспрессии трансгена hGM-CSF. С данными по вирусной репликации, полученными с помощью анализа бляшкообразования, согласуется то, что уровень hGM-CSF был самым высоким и удерживался более 8 дней в опухолевой ткани. Эти данные показывали, что вирус NDV эффективно реплицировался в опухолевой ткани и что трансген эффективно доставлялся в локализованную опухолевую ткань.

На фиг. 11C изображены графики, показывающие эффект экспрессии mGM-CSF на ингибирование роста опухоли на мышинной модели с ксенотрансплантатом опухоли HT1080. Бестимусным "голым" мышам возрастом 5-6 недель в группах по семь особей подкожно (s.c.) имплантировали 5×10^6 клеток HT1080 в правый бок. Когда опухоли достигали объема 110 мм^3 (день 6), в опухоль инъецировали однократную дозу 1×10^8 БОЕ rNDV, R116i-198RSV с mGM-CSF или hGM-CSF. Размер опухоли измеряли через каждые 3-4 дня. R116i-198RSV с mGM-CSF был менее активным в ингибировании роста опухоли, чем трансген hGM-CSF. Однако никаких различий в ингибировании роста опухоли не наблюдали для S116 либо с hGM-CSF, либо с mGM-CSF.

На фиг. 11D изображены графики, показывающие эффект mGM-CSF на клиренс вируса из опухолей на мышинной модели с ксенотрансплантатом опухоли HT1080. Бестимусным "голым" мышам в группах по три особи подкожно (s.c.) имплантировали 5×10^6 клеток HT1080 в правый бок. Когда опухоли достигали объема 180 мм^3 (день 10), мышей обрабатывали при помощи внутривенного введения одной дозы 1×10^8 БОЕ R116i-198RSV или S116KM. Опухоли собирали в день 4 или 7 и вирусные титры в опухолевой ткани определяли с помощью анализа бляшкообразования. Оба R116i-198RSV и S116KM либо с mGM-CSF, либо с hGM-CSF характеризовались сравнимым титром в день 4. В день 7 R116i-198RSV с mGM-CSF был сильно сниженным по сравнению с R116i-198RSV с hGM-CSF. Для сравнения, титры S116 с mGM-CSF и с hGM-CSF были сравнимыми.

На фиг. 11E изображена диаграмма, показывающая эффект заражения R116i-198RSV или S116KM на проникновение иммунных клеток в опухоли на мышинной модели с ксенотрансплантатом опухоли HT1080. Бестимусным "голым" мышам в группах по три особи подкожно (s.c.) имплантировали 5×10^6 клеток HT1080 в правый бок. Когда опухоли достигали объема 180 мм^3 (день 10), мышей обрабатывали при помощи внутривенного введения одной дозы 1×10^8 БОЕ указанного вируса. Опухоли собирали в день 4 и ткани обрабатывали для окрашивания нейтрофилов, NK-клеток и макрофагов с помощью FACS-анализа. R: R116i-198-RSV, S: S116-KM. R116i-198RSV с mGM-CSF характеризовался большим проникновением иммунных клеток.

На фиг. 11F изображена таблица, показывающая, что цитокины и хемокины подвергались повышающей регуляции на мышинной модели с ксенотрансплантатом опухоли HT1080. Бестимусным "голым" мышам в группах по три особи подкожно (s.c.) имплантировали 5×10^6 клеток HT1080 в правый бок. Когда опухоли достигали объема 180 мм^3 (день 10), мышей обрабатывали при помощи внутривенного введения одной дозы 1×10^8 БОЕ R116i-198RSV или S116KM с hGM-CSF или mGM-CSF. Опухоли собирали в день 4 и ткани обрабатывали для определения уровней цитокинов и хемокинов с помощью анализа Lumiplex. Заражение вирусом индуцировало выработку цитокинов и хемокинов в локализованных опухолевых тканях, их уровни варьировали в зависимости от вирусного остова и присутствия человеческого или мышинного GM-CSF.

На фиг. 11G изображен график, показывающий, что R116i-198RSV-hGM-CSF и R116i-318APMV-hGM-CSF были сравнимыми в ингибировании роста опухоли на мышинной модели с ксенотрансплантатом опухоли HT1080. Бестимусным "голым" мышам в группах по семь особей подкожно (s.c.) импланти-

ровали 5×10^6 клеток HT1080 в правый бок. Когда опухоли достигали объема приблизительно 110 мм^3 (день 6), однократную дозу вируса из расчета 1×10^8 БОЕ инъецировали внутрь опухоли. Размер опухоли измеряли через каждые 3-4 дня и наносили на график. Длина вставки с размером 198 и 318 нт не влияла на онколитическую активность R116i.

На фиг. 12А и 12В изображена структура антигенной кДНК 73Т, содержащей химерные гены F и/или HN, и их характеристики, а на фиг. 12С сравниваются функции активности комплекса РНК-полимеразы. Поверхностные гликопротеины вируса являются важными антигенами, определяющими иммуногенность и вирулентность для кур. Гены F и/или HN NDV замещали на соответствующие внеклеточные (экто) домены из других парамиксовирусов, которые не являются вирулентными для кур по отдельности или в комбинации. Вирус парагриппа 5 (PIV 5) представляет собой парамиксовирус собак и не вызывает заболеваний у человека, а парамиксовирус голубей типа 1 (PPMV-1), как было показано, является невирулентным для кур. На фиг. 12А показано, что эктодомены гликопротеинов F и/или HN антигенных кДНК полной длины из NDV 73Т замещали на таковые из PPMV-1 и/или PIV5. Последовательности из NDV, PIV5 и PPMV-1 отмечены цветными прямоугольниками как голубые, пурпурные или зеленые, соответственно. Указана длина в аминокислотах отдельных белков или белковых доменов. Фиг. 12В представляет собой таблицу, в которой показаны характеристики производных 73Т, содержащих химерные гены F и/или HN. Бляшкообразование на клетках Vero, относительный цитолитический эффект HT1080 и MDT осуществляли, как описано выше. Химерные вирусы, за исключением PVI-5 F-HN, выделялись и росли в клетках в отсутствие экзогенного трипсина. Все три вируса образовывали бляшки значительных размеров и демонстрировали эффективное распространение от клетки к клетке. Химерные вирусы с F-HN или F из PPMV-1 имели значение MDT, составляющее 79 и 84 ч соответственно, что указывает на потенциальную вирулентность для кур. Оба химерных вируса PPMV-1 эффективно осуществляли цитолитический эффект на клетках HT1080 на уровнях, составляющих 71 и 61%. Химеры PIV5-F не росли в яйцах и не были вирулентными для кур, но приводили к цитолиту клеток HT1080 на уровне 47%. Перекрестную реактивность сыворотки крови между NDV и химерами PPMV-1 или PIV5 проверяли с помощью анализа нейтрализации с применением сыворотки крови, собранной от мышей, которым IV вводили 2 дозы 1×10^8 БОЕ г73Т-R116L. Вирус г73Т могла нейтрализовать сыворотка крови от мышей, зараженных NDV (титр 960), в то время как она не нейтрализовала химеры PPMV-1 и PIV5 (титр < 4), что подтверждает отсутствие перекрестной реактивности между NDV и PPMV-1 или PIV5. Химерные вирусы с отличающейся антигенностью могли усиливать онколитические вирусы у пациентов, у которых иммунные ответы против NDV развились во время предшествующего лечения с помощью NDV.

На фиг. 12С показано сравнение активности РНК-полимеразы NDV с другими парамиксовирусами с помощью анализа минигенома. Клетки, экспрессирующие Т7, трансфицировали тремя плазмидами, экспрессирующими белки NP, P, L NDV, и плазмидой, кодирующей анти-минигеномную кДНК NDV, кодирующую ген GFP, с применением Lipofectamine 2000, или плазмидами, кодирующими гены N, P, L вируса кори (MV) или респираторного синцитиального вируса (RSV), и соответствующей плазмидой с анти-минигеномной кДНК GFP RSV или MV. Через два или три дня после трансфекции репликацию минигенома, на что указывает экспрессия белков GFP, проверяли под флуоресцентным микроскопом. NDV характеризовался самой сильной активностью полимеразы по сравнению с вирусом кори и RSV.

На фиг. 13А и В показана чувствительность линий раковых клеток к вариантам гNDV. Линии раковых клеток из тканей различного происхождения заражали NDV S116 или NDV R116i при MOI, составляющей 0,1, и жизнеспособность клеток оценивали через 72 ч после заражения с применением Cell Titre Glo. Чувствительность к NDV определяли как более чем 30% цитолитический эффект клеток через 72 ч после заражения. На фиг. 13А изображен график процентной доли чувствительных к NDV линий раковых клеток человека для совокупности из минимум 16 широких категорий. Количество клеточных линий в пределах каждой группы указано числом и отмечено в таблице. На фиг. 13В изображен график чувствительности 22 линий раковых клеток к вариантам NDV. % цитолитического эффекта клеток определяется как процентная доля от необработанных контрольных клеток.

На фиг. 14 представлены графики, показывающие чувствительность линий раковых клеток к гесNDV^{GM-CSF}. Цитолитический эффект под действием R116i-GM-CSF на типичных линиях опухолевых клеток представлен на фиг. 14. Максимальный % цитолитического эффекта определяли через 3 дня после заражения линий опухолевых клеток относительно незараженного контроля при MOI, составляющей 0,1. Хотя определенные клеточные линии происходили из одних и тех же типов опухоли, таких как рак мочевого пузыря, желудка, предстательной железы, меланомы, рак молочной железы, яичника, поджелудочной железы и легкого, они демонстрировали различную чувствительность к цитолиту под действием вируса. Количества клеточных линий из каждой категории опухолей, цитолитический эффект которых может осуществлять R116i-GM-CSF на уровне >50%, обобщены в табл. 1.

Фиг. 15А-Е представляют собой графики, показывающие, что производные NDV ингибируют рост опухоли на различных мышиных моделях рака. Фиг. 15А и 15В представляют собой графики, показывающие, что штаммы гесNDV ингибируют рост опухоли на изогенной мышинной модели меланомы (B16F10 AP3). 73Т-R116i-hGM-CSF (фиг. 15А, слева) и R116i-mGM-CSF (фиг. 15А, справа) оценивали в

отношении их онколитического эффекта на мышинной модели меланомы B16 в пробном исследовании. Поскольку переносимость вируса у мышей B16 уже оценивалась, размер группы был небольшим ($n=3$). Каждый вирус вводили внутривенно (i.v) при дозе 2×10^7 БОЕ дважды в дни 11 и 14; внутрибрюшинно (i.p) при 2×10^7 БОЕ дважды в дни 11 и 14 или внутрь опухоли (i.t) один раз при $1,1 \times 10^7$ БОЕ в день 11. Группы, обработанные с помощью R116-hGM-SCF или mGM-SCF посредством трех путей введения, характеризовались замедленной скоростью роста опухоли по сравнению с необработанной группой. Уровни ингибирования опухоли имели статистическую значимость по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 15B показано исследование эффективности на изогенной мышинной модели меланомы B16F10 с введением внутрь опухоли 1×10^8 БОЕ вариантов S116 NDV. Ингибирование роста опухоли показано на левой панели, и индивидуальные измерения животных показаны на средней панели, и график выживаемости показан справа.

На фиг. 15C показано, что NDV характеризуется сильной противораковой активностью на иммунокомпетентной мышинной модели опухоли прямой и ободочной кишки CT26. В частности, на фиг. 15C представлено исследование эффективности на изогенной мышинной модели рака прямой и ободочной кишки CT26 с введением внутрь опухоли 1×10^8 БОЕ варианта R116 NDV, кодирующего человеческий GM-CSF. Ингибирование роста опухоли показано на правой панели, а ИHC-анализ остаточной опухоли показан с правой стороны при окрашивании H&E и окрашивании в отношении NDV. Отмечены некротические участки, наличие многоядерных синцитиев и жизнеспособные участки опухолей.

На фиг. 15D-F изображено ингибирование роста опухоли на модели ксенотрансплантата яичника. Бестимульным "голым" мышам подкожно (s.c.) имплантировали клетки Ovar4 в правый бок. Когда опухоли достигали объема 100 мм^3 , мышей рандомизировали в группы обработки. В развившиеся опухоли инъецировали один раз в неделю $2,5 \times 10^7$ БОЕ rNDV, R116i-318 с mGM-CSF или hGM-CSF. Показаны кривые роста опухоли (фиг. 15D) и гистологические анализы опухолей (фиг. 15E и 15F).

Фиг. 16 представляет собой таблицу, обобщающую характеристики конструкций NDV. Образование бляшек в клетках Vero без трипсина в покрытии через 36 ч инкубации и визуализация под $\times 10$ увеличением. Эффект цитотоксичности вирусов на клетках фибросаркомы человека HT1080 после заражения при множественности заражения (MOI), составляющей 0,01, через 72 ч после заражения. Относительную процентную долю выживших клеток определяют путем сравнения каждого образца с необработанными клетками, жизнеспособность которых считают равной 100%. Данные, представленные в таблице, представляют собой относительную процентную долю погибших клеток. Патогенность NDV для 1-дневных не содержащих патогена кур согласно индексу внутримозговой патогенности (ICPI). Анализ ICPI осуществляли в лабораториях Национальной ветеринарной службы (NVSL) (Эймс, Айова).

Фиг. 17 представляет собой диаграмму 17, показывающую, что NDV, полученный в яйцах и клеточных линиях человека, проявлял отличающуюся чувствительность к опосредованной комплементом инактивации. Человеческую сыворотку крови с подтвержденной активностью комплемента (C') (Sigma, Сент-Луис, Миссури) серийно разводили с помощью PBS и инкубировали с 100 БОЕ NDV в течение 1 ч при 37°C перед заражением клеток Vero для проведения анализа бляшкообразования. После инкубации при 37°C в течение 6 дней бляшки визуализировали посредством окрашивания кристаллическим фиолетовым и оценивали. Вирус, выращенный в оплодотворенных куриных яйцах, преимущественно инактивировался сывороткой, разведенной от 1:10 до 1:40. Вирус, выращенный на клетках 293, был более устойчивым к C', чем выращенный в яйцах вирус, приблизительно 40% инфективность сохранялась при концентрации сыворотки крови, составляющей 1:40. Однако вирус, выращенные на клетках Hela, был наиболее устойчивым к опосредованной C' инактивации вируса. Приблизительно 90% живых вирусов были инфекционными при концентрации сыворотки крови, составляющей 1:40.

На фиг. 18A и 18B изображены результаты Вестерн-блот анализа, показывающие сравнение уровней RCA-белков в клетках 293 и Hela и у вирусов, полученных в этих двух клеточных линиях. На фиг. 18A равное количество клеток 293 и Hela S3 загружали на SDS-PAGE для проведения Вестерн-блот анализа. Клетки Hela содержали более высокие уровни белков hCD46, hCD55 и hCD59, чем клетки 293. На фиг. 18B показан результат Вестерн-блот анализа, который проводили для исследования количеств белков в вирусе от зараженных клеток 293 или Hela. Незараженные клетки (имитация) служили в качестве контролей. Три CD-молекулы обнаруживали в вирусах от зараженных клеток Hela при уровнях, превышающих таковые в случае вирусов от клеток 293.

На фиг. 19 показана оценка белков мембраносвязанных регуляторов C' (RCA) в опосредованной C' инактивации вируса. кДНК, кодирующую hCD55, hCD59 и hCD46, синтезировали в Origene (Роквилл, Мэриленд) или Genscript (Пискатавей, Нью-Джерси). Каждую генную кассету вставляли в межгенную область P-N антигенной кДНК NDV и рекомбинантные вирусы получали с помощью обратной генетики. Рекомбинантные вирусы амплифицировали в яйцах и очищали с помощью 15-60% градиента сахара и вирусную полосу осаждали с помощью ультрацентрифугирования. Экспрессию каждого RCA-белка с помощью рекомбинантного NDV подтверждали посредством Вестерн-блоттинга.

Фиг. 20 представляет собой диаграмму, показывающую, что CD55 является главным RCA-белком

для предотвращения опосредованной C' инактивации NDV. NDV с hCD46, hCD55 или hCD59 амплифицировали в яйцах, очищали с помощью градиента сахарозы, инкубировали с человеческой плазмой крови, разведенной от 1:10 до 1:40, в течение 1 ч и инфективность вируса проверяли посредством анализа бляшкообразования в клетках Vero. NDV с hCD55, полученный в яйцах, характеризовался аналогичной устойчивостью к C', сравнимой с таковой у NDV, полученного в клетках Hela, приблизительно 65% жизнеспособных вирусов при концентрации плазмы крови 1:20 и ~80% жизнеспособных вирусов при концентрации плазмы крови 1:40. Оказалось, что hCD46 слегка или незначительно улучшал устойчивость вируса к опосредованной C' инактивации, приблизительно на 20% больше жизнеспособных вирусов при инкубации с плазмой крови человека, разведенной 1:40, по сравнению с NDV-контролем. При более низких разведениях плазмы крови отличия обнаружены не были.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены рекомбинантный аттенуированный вирус ньюкаслской болезни и способы применения данного вируса для лечения неоплазии.

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на выявлении онколитического NDV с пониженной вирулентностью для кур. Как подробнее сообщается ниже, штамм NDV 73T получали из NDV MK-107, который представляет собой коммерческую вакцину (мезогенный) для домашней птицы, впервые выведенную на рынок в 1948. Штамм NDV MK-107 поддерживали на протяжении 73 пассажей в клетках из асцитной опухоли Эрлиха (Cassel et al., Cancer. 1965 Jul;18: 863-8). NDV MK-107 применяли в серии клинических исследований Фазы I и Фазы II в 1970-х гг. NDV MK-107 также применяли в 1980-х гг. в качестве иммунотерапевтического средства для лечения пациентов с поздней стадией меланомы (Cassel et al., Cancer. 1983 1; 52: 856-860; Murray et al., Cancer. 1977. 40: 680-686).

Чтобы получить онколитический NDV с пониженной вирулентностью для кур, для рекомбинантного штамма NDV 73T были предусмотрены определенные генетические модификации. В частности, изменяли последовательность расщепления F-белка и увеличивали длину межгенной последовательности HN-L. Предпочтительно, модифицированный вирус можно применять для экспрессии представляющего(представляющих) интерес трансгена(трансгенов). В одном варианте осуществления штамм NDV 73T содержит трансген, кодирующий полипептид, который улучшает онколитические свойства рекомбинантного NDV. В другом варианте осуществления штамм NDV 73T содержит трансген, кодирующий биомаркер, который обеспечивает считываемый показатель, применимый для отслеживания репликация вируса. При необходимости штамм NDV 73T можно модифицировать с внедрением дополнительной генетической информации, которая нарушает нормальную транскрипционно-активную ориентацию стандартного генома и, как ожидается, дополнительно снижает вирулентность вируса для кур. Соответственно в настоящем изобретении предусмотрен рекомбинантный вирус ньюкаслской болезни (NDV), полученный с применением обратной генетики для снижения его патогенности для кур, при этом с сохранением его способности к селективному цитолизу раковых клеток, и способы получения такого вируса. В настоящем изобретении также предусмотрена структура NDV и применение его в качестве вирусного вектора для доставки и экспрессии гетерологичных продуктов гена для улучшения лечения рака. Трансгены, кодирующие иллюстративные терапевтические средства, можно доставлять с помощью NDV, как описано в данном документе ниже. В демонстрационных примерах, описанных в данном документе ниже, новые конструкции на основе вируса NDV, экспрессирующие гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), осуществляют селективный цитолитиз раковых клеток, но не уничтожают нормальные клетки. Этот эффект селективного цитолиза раковых клеток наблюдали на ряде линий раковых клеток, а также *in vivo* при тестировании на модели гетеротрансплантата опухоли HT1080. Эффективность и селективность рекомбинантного аттенуированного вируса ньюкаслской болезни (NDV) также демонстрировали на модели меланомы, где наблюдали регресс опухоли. Коротко говоря, в настоящем изобретении предусмотрена вставка специфического(специфичных) трансгена(трансгенов) в рекомбинантный аттенуированный NDV-вектор и эффективная экспрессия кодируемого белка в опухолевом окружении.

Вирус ньюкаслской болезни

Вирус ньюкаслской болезни (NDV) представляет собой оболочечный вирус, содержащий геном в виде линейной, однонитевой, несегментированной РНК с отрицательной полярностью. Однонитевой геном NDV с отрицательной полярностью кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, белок слияния (F), белок гемагглютинин-нейраминидазу (HN), матриксный белок, фосфопротеин и нуклеопротеин. Геномная РНК содержит гены в следующем порядке: 3'-NP-P-M-F-HN-L. Организация РНК-генома NDV описана более подробно в данном документе ниже. Геномная РНК также содержит лидерную последовательность на 3'-конце.

Структурные элементы вириона включают оболочку вируса, которая представляет собой липидный бислой, происходящий из плазматической мембраны клетки. Гликопротеин, гемагглютинин-нейраминидаза (HN), выдается наружу из оболочки, что обеспечивает то, вирус имеет как гемагглютининую, так и нейраминидазную активности. Гликопротеин слияния (F), который представляет собой интегральный мембранный белок, вначале вырабатывается как неактивный предшественник, затем расщепляется посттрансляционно с образованием двух полипептидов, соединенных дисульфидной связью. Ак-

тивный F-белок вовлечен в проникновение NDV в клетки-хозяева путем облегчения слияния вирусной оболочки с плазматической мембраной клетки-хозяина. Матриксный белок (М) вовлечен в сборку вируса и взаимодействует как с вирусной мембраной, так и с нуклеокапсидными белками.

Основной белковой субъединицей нуклеокапсида является нуклеокапсидный белок (NP), который придает капсиду спиральную симметрию. В ассоциации с нуклеокапсидом находятся Р- и L-белки. Фосфопротеин (Р), который подвергается фосфорилированию, как полагают, играет регуляторную роль в транскрипции, а также может вовлекаться в метилирование, фосфорилирование и полиаденилирование. Ген L, который кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, необходим для синтеза вирусной РНК вместе с Р-белком. L-белок, который занимает почти половину кодирующей емкости вирусного генома, представляет собой самый крупный из вирусных белков и играет важную роль как при транскрипции, так и при репликации.

Репликация всех вирусов с отрицательной нитью РНК, в том числе NDV, осложняется отсутствием клеточного аппарата, требуемого для репликации РНК. Кроме того, геном с отрицательной нитью не может напрямую транслироваться в белок, а должен вначале транскрибироваться в копию положительной нити (мРНК). Следовательно, до проникновения в клетку-хозяина геномная РНК отдельно не может синтезировать требуемую РНК-зависимую РНК-полимеразу. L-, Р- и NP-белки должны попасть в клетку вместе с геномом после заражения.

Не привязываясь к теории, высказывается предположение, что большинство или все вирусные белки, которые принимают участие в транскрипции мРНК NDV, также осуществляют репликацию. Механизм, который регулирует альтернативное использование (т.е. в транскрипции или репликации) одного и того же набора белков, не был точно установлен. Непосредственно после проникновения вируса при помощи L-белка инициируется транскрипция с использованием РНК с отрицательной полярностью в нуклеокапсиде в качестве матрицы. Синтез вирусной РНК регулируется таким образом, что в ходе транскрипции образуется моноцистронные мРНК. Вслед за транскрипцией происходит репликация вирусного генома - второе событие после заражения клетки вирусами с отрицательной нитью РНК. Как и случае других вирусов с отрицательной нитью РНК, репликация вирусного генома вируса ньюкаслской болезни (NDV) опосредуется вирус-специфичными белками. Первые продукты репликативного синтеза РНК представляют собой комплементарные копии (т.е. с положительной полярностью) РНК-генома NDV (кРНК). Эти копии с положительной нитью (антигеномы) отличаются от мРНК-транскриптов с положительной нитью структурой своих концов. В отличие от мРНК-транскриптов антигеномные кРНК не экпированы и не метилированы на 5'-концах и не усечены и не полиаденилированы на 3'-концах. кРНК являются котерминальными с их матрицами-отрицательными нитями и содержат всю генетическую информацию в каждом геномном РНК-сегменте в комплементарной форме. кРНК служит в качестве матрицы для синтеза вирусных геномов NDV с отрицательной нитью (вРНК).

Как геномы с отрицательной нитью (вРНК), так и антигеномы (кРНК) NDV заключаются в капсид с помощью нуклеокапсидных белков; единственными незаключенным в капсид видом РНК является мРНК вируса. В случае NDV местом репликации вирусной РНК служит цитоплазма, наряду с этим она является местом транскрипции. Сборка вирусных компонентов, вероятно, происходит в плазматической мембране клетки-хозяина. Затем зрелый вирус высвобождается из клетки посредством почкования.

Онколитические вирусы

Как известно, вирусы проявляют онколитические эффекты в отношении опухолевых клеток, и сообщалось о применении онколитических вирусов в качестве терапевтических средств. Делались некоторые попытки применения вирусов, не поражающих человека, которые проявляют среднюю-высокую патогенность в отношении своих естественных хозяев, в лечении пациентов с раком. В настоящем изобретении раскрыты способы индуцирования регрессии опухолей у субъектов-людей, причем в способах используется модифицированный мезогенный штамм вируса ньюкаслской болезни (NDV) с модифицированным сайтом расщепления F-белка, который является непатогенным для домашней птицы (лентогенный), но проявляет онколитические свойства. Раскрытые способы обеспечивают безопасное, эффективное и надежное средство для индуцирования регрессии опухоли у индивида, нуждающегося в этом. Эти способы преодолевают недостатки применения патогенных штаммов вирусов для терапии человека.

В настоящем документе раскрыт способ индуцирования регрессии опухоли у субъекта, причем способ включает стадию введения субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество лентогенного онколитического штамма NDV. Согласно одному варианту осуществления лентогенный онколитический штамм NDV представляет собой NDV r73T-R116.

Онколитические вирусы способны проявлять цитотоксический или цитолитический эффект *in vitro* и *in vivo* в отношении опухолевых клеток, при этом эффект в отношении нормальных клеток является небольшим или отсутствует. Термин "онколитическая активность" относится к цитотоксической или цитолитической активности вируса, который целенаправленно воздействует на опухолевые клетки. Без желания ограничиваться каким-либо определенным механизмом действия, онколитическая активность, проявляемая лентогенным штаммом NDV (например, r73T-R116), вероятно, в первую очередь, обусловлена апоптозом клеток и, в меньшей степени, лизисом плазматической мембраны, при этом последнее сопровождается высвобождением жизнеспособного потомства в окружение клетки, в результате чего

впоследствии заражаются соседние клетки. Без желания ограничиваться конкретной теорией, полагают, что NDV характеризуется непосредственной цитолитической активностью в отношении раковых клеток. Также полагают, что NDV способен специфичным образом отличать раковые клетки от нормальных, здоровых клеток. Результаты показали, что некоторые онкогены (H-ras, N-ras и N-myc), которые, как известно, придают злокачественные свойства раковым клеткам, улучшают восприимчивость клеток к цитолиту с помощью NDV. См. Lorence, R. M., Reichard, K. W., Cascino, C. J. et al. (1992) Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 33, 398; Reichard, K. W., Lorence, R. M., Cascino, C. J., et al. (1992) Surg. Forum, 43, 603-606. Кроме того, наблюдали, что обработка клеток ретиноевой кислотой (витамин А) также усиливает лизис раковых клеток с помощью NDV. Reichard, K. W., Lorence, R. M., Katubig, B. B., et al. (1993) J. Pediatr. Surg., 28, 1221.

Цитотоксические эффекты в условиях *in vitro* или *in vivo* можно обнаруживать с помощью различных средств, известных в данной области техники, например, путем ингибирования пролиферации клеток, путем определения размера опухоли с применением усиливаемого гадолинием МРТ-сканирования, путем введения радиоактивной метки в опухоль и т.п.

Для клинических исследований желательно получать клональный вирус, чтобы быть уверенным в однородности вируса. Клональный вирус можно получать согласно любому способу, доступному для специалиста в данной области. Например, клональный вирус можно получать с помощью метода предельного разведения или метода бляшкообразования.

Культура NDV

Вирус, используемый в настоящем изобретении, можно получать при помощи различных способов. Например, NDV можно получать в 8-10-дневных оплодотворенных куриных яйцах (получены от SPAFAS, Inc., Роанок, Иллинойс). Способы выделения вируса известны в данной области техники и описаны, например, у Weiss, S. R. & Bratt, M. A. (1974) J. Virol, 13, 1220-1230. Этот способ дополнительно описан в примере 1 ниже. С применением этого способа выделения можно получать NDV с чистотой, составляющей приблизительно 90-95%.

В качестве альтернативы, вирус можно получать в клеточной культуре *in vitro*. Предпочтительно клеточная культура включает клетки млекопитающих, и более предпочтительно клетки можно применять для производства вируса, как, например, клетки Vero. Вирусы будут очищать с помощью хроматографии или других подходящих способов. Клетки могут быть зависимыми от якорной подложки или независимыми от якорной подложки.

Методики клеточной культуры, которые можно использовать в получении вируса, известны в данной области техники и могут включать применение матрасов для стационарных культур с большой площадью поверхности или матрасов для культур роллерного типа. Предпочтительно выбранный тип культуральной системы может поддерживать относительно большие количества клеток. Для получения большого количества вирусов будут задействовать биореакторный способ, при этом клетки выращивают на гранулах микроносителя для заражения вирусом и его получения.

Среды для клеточных культур, которые можно использовать в получении вируса, известны специалистам в данной области. Среда, как правило, включает источник питательных веществ, антибиотик (антибиотики) и альбумин или источник сыворотки, который содержит фактор (факторы) роста. Выбор конкретных сред и компонентов сред, подходящих для клеток, используемых в культуре, находится в пределах компетенции специалиста в данной области. В определенных вариантах осуществления в ростовые среды включают трипсин. В других вариантах осуществления трипсин не включают.

Условия культивирования, как правило, включают инкубацию при требуемой температуре (как, например, 37°C), а также выбранных концентрациях кислорода и диоксида углерода. Конкретные выбранные условия культивирования можно определять в соответствии с клетками, используемыми в культуре, и определение таких условий находится в пределах компетенции специалиста в данной области.

Клетки помещали в культуральный сосуд и обеспечивали возможность инкубации и роста при выбранных условиях культивирования. Предпочтительно зависимым от якорной подложки клеткам дают расти до конfluence или максимального роста. Время, требуемое для роста, будет варьировать в зависимости от размера первичных клеток инокулята, вносимого в культуральный сосуд, и времени удвоения используемой клеточной линии. Предпочтительно от приблизительно 3×10^3 до приблизительно 3×10^5 клеток высевает на см^2 и выращивают в течение одного-пяти дней. Для инокуляции вируса в клеточную культуру от клеток удаляют среду (в случае прикрепленных клеток путем аспирации культуральной среды; в случае клеток, растущих в суспензии, путем центрифугирования клеточной суспензии и аспирации надосадочной жидкости клеток) и вирус (после восстановления) добавляют к клеткам в минимальном объеме среды или солевого раствора (такого как сбалансированный солевой раствор Хенкса, Gibco) для предотвращения обезвоживания. Предпочтительно этот объем находится в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 2500 мкл на см^2 площади поверхности культурального сосуда или 10^5 клеток. Предпочтительное разбавление инокулята вируса находится в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 10 инфекционных единиц на клетку, оптимальное соотношение зависит от конкретного вируса и клеточной линии. Затем вирус выращивают в течение приблизительно 1-7 дней, при

этом продолжительность времени определяется, главным образом, остаточной выживаемостью клеточной линии. В случае NDV оптимальным временем сбора является 1-5 день после инокуляции вируса.

Затем вирус можно собирать либо путем удаления надосадочной жидкости и замещения ее свежей средой или свежей средой со свежими клетками с интервалами 12-48 ч, либо путем замораживания-оттаивания клеток для высвобождения вируса в надосадочную жидкость. Затем надосадочную жидкость можно подвергать центрифугированию и ультрацентрифугированию для выделения вируса в относительно чистой форме или применять методы хроматографии. Чистоту вирусного препарата можно тестировать с помощью исследования белков и/или с помощью электрофореза. Затем вирус можно вносить в фармацевтически приемлемый носитель, дополнительно описанный ниже.

Терапия

Может предусматриваться терапия, где бы эта терапия рака не осуществлялась: дома, в кабинете врача, в клинике, в амбулаторном отделении больницы или в больнице. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение вируса ньюкаслской болезни (NDV) (например, r73T-R116).

Лечение, в целом, начинают в больнице, так что врач может внимательно наблюдать эффекты терапии и производить любые корректировки, которые необходимы. Продолжительность терапии зависит от типа рака, подлежащего лечению, возраста и состояния пациента, стадии и типа заболевания пациента и того, как организм пациента реагирует на лечение. Введение лекарственного средства можно осуществлять с различными интервалами (например, ежедневно, еженедельно или ежемесячно). Терапию можно проводить в виде периодических циклов, которые включают периоды отдыха, так что организм пациента имеет возможность вырастить здоровые новые клетки и восстановить свои силы.

В зависимости от типа рака и стадии его развития терапия может применяться для замедления распространения рака, для замедления роста рака, для осуществления цитолиза или угнетения раковых клеток, которые могут распространяться в остальные части организма из исходной опухоли, для облегчения симптомов, вызванных раком, или для предотвращения рака изначально. Рост рака является неконтролируемым и прогрессирующим и происходит в условиях, которые не будут вызывать размножения нормальных клеток или будут вызывать его прекращение.

Как описано выше, при необходимости, лечение с помощью композиции по настоящему изобретению можно комбинировать с видами терапии для лечения пролиферативного заболевания (например, радиотерапией, оперативным вмешательством или химиотерапией). Составление фармацевтических композиций

Введение вируса по настоящему изобретению (например, NDV r73T-R116) для лечения опухолей можно проводить при помощи любых подходящих средств, в которых концентрация терапевтического средства в комбинации с другими компонентами является эффективной в предотвращении, замедлении прогрессирования или уменьшении опухолей. Средство может содержаться в любом подходящем количестве в любом подходящем веществе-носителе и, в целом, присутствует в количестве 1-95% по весу от общего веса композиции. Композицию можно обеспечивать в виде лекарственной формы, которая подходит для парентерального (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно или внутрибрюшинно) пути введения. Фармацевтические композиции можно составлять в соответствии с общепринятыми фармацевтическими практическими руководствами (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

Фармацевтические композиции можно составлять для высвобождения активного соединения практически сразу же после введения или в любое заранее определенное время или период времени после введения. Последние типы композиций, в целом, известны как составы с контролируемым высвобождением, которые включают (i) составы, которые создают практически постоянную концентрацию лекарственного средства в пределах организма в течение продолжительного периода времени; (ii) составы, которые после заранее определенного периода задержки создают практически постоянную концентрацию лекарственного средства в пределах организма в течение продолжительного периода времени; (iii) составы, которые сохраняют действие в течение заранее определенного периода времени путем поддержания относительно постоянного, эффективного уровня в организме с сопутствующей минимизацией нежелательных побочных эффектов, ассоциированных с колебаниями уровня активного вещества в плазме крови (пилообразный паттерн кинетики); (iv) составы, которые локализуют действие, например, путем пространственного размещения композиции с контролируемым высвобождением по соседству с саркомой или в ней; (v) составы, которые обеспечивают возможность удобного дозирования, так что дозы вводят, например, один раз в неделю или две недели; и (vi) составы, которые целенаправленно воздействуют на пролиферирующие неопластические клетки при помощи носителей или химических производных для доставки терапевтического средства в клетку саркомы. Для некоторых применений составы с контролируемым высвобождением избавляют от необходимости в частом дозировании в течение дня для сохранения уровня в плазме крови на терапевтическом уровне.

Можно рассматривать любое число стратегий для получения контролируемого высвобождения, при котором скорость высвобождения превышает скорость метаболизма рассматриваемого соединения. В

одном примере контролируемое высвобождение получают путем соответствующего подбора различных параметров составления и ингредиентов состава, в том числе, например, различных типов композиций с контролируемым высвобождением и покрытий. Таким образом, терапевтическое средство составляют вместе с соответствующими наполнителями в фармацевтическую композицию, которая после введения высвобождает терапевтическое средство контролируемым образом. Примеры включают композиции в форме таблетки или капсулы с одной или несколькими единицами дозирования, масляные растворы, суспензии, эмульсии, микрокапсулы, микросферы, молекулярные комплексы, наночастицы, пластыри и липосомы.

Композицию можно вводить в фармацевтически-приемлемом разбавителе, носителе или наполнителе в виде единичной лекарственной формы. Общеизвестные фармацевтические практические руководства можно использовать для получения подходящих составов или композиций для введения соединений пациентам, страдающим от заболевания, вызванного чрезмерной пролиферацией клеток. Введение можно начинать перед появлением у пациента симптомов.

Можно использовать любой подходящий путь введения, например введение может представлять собой парентеральное, внутривенное, внутриартериальное, подкожное, введение внутрь опухоли, внутримышечное, внутримозговое, интратекальное, интракраниальное, глазное, внутрижелудочковое, внутрипеченочное, интракапсулярное, интракапсулярное, интракраниальное, интрабрюшинное, интраназальное, введение в виде аэрозоля, суппозитория или пероральное введение. Например, терапевтические составы могут находиться в форме жидких растворов или суспензий; для перорального введения составы могут находиться в форме таблеток или капсул; и для интраназальных составов - в форме порошков, капель в нос или аэрозолей. В случае любых способов применения, описанных выше, композицию желательно вводить внутривенно или наносить на участок, в котором требуется событие апоптоза (например, путем инъекции).

Способы, хорошо известные в области техники получения составов, можно найти, например, в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" Ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2000. Составы для парентерального введения могут, например, содержать наполнители, стерильную воду или солевой раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрогенизированные нафталины. Биосовместимые, биоразлагаемые лактидные полимеры, сополимер лактида и гликолида или сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена можно применять для контроля высвобождения соединений. Другие потенциально применимые системы парентеральной доставки для доставки средств включают частицы сополимера этилена и винилацетата, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Составы для ингаляций могут содержать наполнители, например, лактозу, или могут представлять собой водные растворы, содержащие, например, простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, гликохолат и дезоксигликолат, или могут представлять собой масляные растворы для введения в форме капель в нос или применения в качестве геля.

Составы можно вводить пациентам-людям в терапевтически эффективных количествах (например, количествах, которые предотвращают, устраняют или уменьшают патологическое состояние) с обеспечением терапии для заболевания или состояния. Предпочтительная дозировка композиции, вероятно, зависит от таких переменных как тип и степень нарушения, общее состояние здоровья конкретного пациента, состав наполнителей в лекарственном препарате и ее пути введения.

Величины дозировки для человека в случае любой терапии, описанной в данном документе, изначально можно определять путем экстраполяции количества соединения, применяемого на мышах, при этом как понятно специалисту в данной области техники, общепринятым является преобразование дозировки для человека путем соотношения с животными моделями. В определенных вариантах осуществления предусмотрено, что дозировка может варьировать от приблизительно 10^7 БОЕ до приблизительно 10^{11} БОЕ; или от приблизительно 10^8 БОЕ до приблизительно 10^{10} БОЕ; или от приблизительно 10^9 БОЕ до приблизительно 10^{11} БОЕ. В других вариантах осуществления эта доза может составлять приблизительно 10^7 БОЕ, 10^8 БОЕ, 10^9 БОЕ, 10^{10} БОЕ, 10^{11} БОЕ. Конечно, величину дозирования можно корректировать в сторону повышения или снижения, как это обычно делают в таких протоколах лечения, в зависимости от результатов первоначальных клинических испытаний и потребностей конкретного пациента.

Выбор способа лечения

В настоящем документе также представлен способ лечения неоплазии у субъекта, у которого развился иммунный ответ против NDV, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества аттенуированного химерного вируса ньюкаслской болезни, описанного в данном документе, где вирус представляет собой химерный вирус, содержащий ген F и/или HN вируса парагриппа 5 собак (PIV 5) или парамиксовируса голубей типа 1 (PPMV-1), где химерный вирус ньюкаслской болезни отличается антигенами от NDV. В одном варианте осуществления способ повышает уровень онколитических вирусов, присутствующих у субъекта, относительно уровня онколитических вирусов, присутствующих у контрольного субъекта, у которого развился иммунный ответ против NDV, но который не получает химерный вирус ньюкаслской болезни.

После того как у субъекта диагностируют неоплазию, выбирают способ лечения. В случае неопла-

зии, например, доступен целый ряд стандартных схем лечения. При выборе способа лечения используют профиль маркеров неоплазии. В одном варианте осуществления клетки неоплазии восприимчивы к цитолиту клеток с помощью NDV (например, r73T-R116).

Менее агрессивные виды неоплазии, вероятно, поддаются консервативным способам лечения. Более агрессивные виды неоплазии (например, метастазирующие неоплазии) менее поддаются консервативным способам лечения и с большей вероятностью способны к рецидиву. Когда способы по настоящему изобретению указывают, что неоплазия является очень агрессивной, следует выбирать инвазивный способ лечения. Инвазивные терапевтические схемы, как правило, включают одну или несколько из следующих видов терапии: хирургическая резекция, радиационная терапия или химиотерапия.

Анализы для измерения жизнеспособности клеток

Средства (например, NDV), применимые в способах по настоящему изобретению, включают средства, которые индуцируют гибель неопластических клеток и/или снижают выживаемость неопластических клеток, i.e. жизнеспособность.

Анализы для измерения жизнеспособности клеток известны в данной области техники и описаны, например, в Crouch et al. (J. Immunol. Meth. 160, 81-8); Kangas et al. (Med. Biol. 62, 338-43, 1984); Lundin et al. (Meth. Enzymol. 133, 27-42, 1986); Petty et al. (Comparison of J. Biol. Chem. 10, 29-34, 1995) и Cree et al. (AntiCancer Drugs 6: 398-404, 1995). Жизнеспособность клеток можно анализировать с применением множества способов, в том числе с применением МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолийбромид) (Barltrop, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 1: 611, 1991; Cory et al, Cancer Comm. 3, 207-12, 1991; Paull J. Heterocyclic Chem. 25, 911, 1988). Анализы для определения жизнеспособности клеток также коммерчески доступны. Эти анализы включают, но без ограничений, люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CELLTITER-GLO® (Promega), в котором применяется методика с люциферазой для обнаружения АТФ и количественной оценки здоровья или количества клеток в культуре, и люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®, который представляет собой анализ цитотоксичности с измерением уровня лактатдегидрогеназы (LDH) (Promega).

Соединения-кандидаты, которые индуцируют или повышают гибель неопластических клеток (например, повышают апоптоз, снижают выживаемость клеток), также применимы в качестве терапевтических средств против неоплазмы. Анализы для измерения апоптоза известны специалисту в данной области. Апоптотические клетки отличаются характерными морфологическими изменениями, в том числе конденсацией хроматина, сжатием клетки и пузырением мембраны, которые можно отчетливо наблюдать с помощью световой микроскопии. Биохимические признаки апоптоза включают фрагментацию ДНК, расщепление белка в определенных положениях, повышенную проницаемость митохондриальной мембраны и появление фосфатидилсерина на поверхности клеточной мембраны. Анализы для определения апоптоза известны в данной области техники. Иллюстративные анализы включают анализы TUNEL (присоединение к концам одонитевых разрывов метки биотин-dUTP с помощью терминальной дезокси-нуклеотидилтрансферазы), анализы активности каспазы (в частности, каспазы-3) и анализы на присутствие fas-лиганда и аннексина V. Коммерчески доступные продукты для обнаружения апоптоза включают, например, гомогенный анализ обнаружения каспазы-3/7 Apo-ONE®, набор FragEL TUNEL (ONCOGENE RESEARCH PRODUCTS, Сан-Диего, Калифорния), анализ фрагментации ДНК ApoBrdU (BIOVISION, Mountain View, CA) и набор для быстрого обнаружения апоптотической фрагментации ДНК с помощью электрофореза (BIOVISION, Маунтин Вью, Калифорния).

Неопластические клетки имеют способность метастазировать или распространяться из места происхождения в отдаленные участки по всему организму. Анализы для определения метастатического потенциала или инвазивности известны специалисту в данной области. Такие анализы включают анализы *in vitro* в отношении исчезновения контактного торможения (Kim et al., Proc Natl Acad Sci USA. 101: 16251-6, 2004), повышение колониеобразования в мягком агаре *in vitro* (Zhong et al., Int J Oncol. 24(6): 1573-9, 2004), модели метастазов в легких (Datta et al., *In vivo*, 16: 451-7, 2002) и анализы инвазии клеток на основе матригеля (Hagemann et al. Carcinogenesis. 25: 1543-1549, 2004). Способы скрининга *in vivo* в отношении инвазивности клеток также известны в данной области техники, и они включают, например, скрининг онкогенности на бестимусных "голых" мышах. Обычно применяемый *in vitro* анализ для оценки метастазирования представляет собой анализ инвазии клеток на основе матригеля (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ).

При необходимости, соединения-кандидаты, выбранные с применением любого из способов скрининга, описанных в данном документе, тестируют в отношении их эффективности с применением животных моделей неоплазии. В одном варианте осуществления мышам инъецируют неопластические клетки человека. Затем мышам, содержащим неопластические клетки, инъецируют (например, внутривенно) среду (PBS) или соединение-кандидат ежедневно в течение периода времени, который определяют эмпирически. Затем мышей подвергают эвтаназии и неопластические ткани собирают и анализируют в отношении уровней NDV, полипептидов NDV и/или маркеров NDV (например, трансгена, кодирующего детектируемый фрагмент) с применением способов, описанных в данном документе. Соединения, которые снижают уровни мРНК или экспрессию белка NDV, полипептидов NDV или маркера NDV

относительно контрольных уровней, как ожидается, являются эффективными для лечения неоплазмы у субъекта (например, пациента-человека). В другом варианте осуществления эффект соединения-кандидата на опухолевую нагрузку анализируют у мышей с инъекционной неопластической клеткой человека. Неопластической клетке обеспечивают возможность роста с образованием массы. Затем мышей обрабатывают соединением-кандидатом или средой (PBS) ежедневно в течение периода времени, который определяют эмпирически. Мышей подвергают эвтаназии и неопластическую ткань собирают. Массу неопластической ткани у мышей, обработанных выбранными соединениями-кандидатами, сравнивают с массой неопластической ткани, присутствующей у соответствующих контрольных мышей.

Наборы

В настоящем описании раскрыты наборы для лечения или предотвращения саркомы. В одном варианте осуществления набор включает терапевтическую или профилактическую композицию, содержащую эффективное количество NDV (например, r73T-R116) в виде единичной лекарственной формы. В дополнительном варианте осуществления набор включает терапевтическую или профилактическую композицию, содержащую эффективное количество NDV (например, r73T-R116) в виде единичной лекарственной формы.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит стерильный контейнер, который содержит терапевтическую или профилактическую композицию; такие контейнеры могут представлять собой коробки, ампулы, бутылки, флаконы, пробирки, пакеты, саше, блистерные упаковки или другие подходящие формы контейнеров, известные в данной области. Такие контейнеры можно производить из пластика, стекла, ламинированной бумаги, металлической фольги или других материалов, подходящих для помещения лекарственных препаратов.

При необходимости такой набор снабжают инструкциями по введению NDV (например, r73T-R116) субъекту, имеющему неоплазию или подвергающемуся риску развития неоплазии. Инструкции, в целом, будут включать информацию о применении композиции для лечения или предотвращения неоплазии. В других вариантах осуществления инструкции включают по меньшей мере одно из следующего: описание терапевтического средства; схема дозирования и введения для лечения или предотвращения неоплазии или ее симптомов; меры предосторожности; предупреждения; указания; противопоказания; информация о передозировке; побочные реакции; фармакологические свойства у животных; клинические исследования и/или ссылки. Инструкции могут быть напечатаны непосредственно на контейнере (если присутствует) или находиться в виде этикетки, прикрепленной к контейнеру, или в виде отдельного листка, брошюры, карточки или несшитой брошюры, поставляемых внутри контейнера или вместе с ним.

При применении настоящего изобретения на практике используют, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии (в том числе рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся целиком в пределах компетенции специалиста в данной области. Такие методики полностью объяснены в литературе, как, например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", второе издание (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Эти методики применимы для получения полинуклеотидов и полипептидов по настоящему изобретению и, сами по себе, могут рассматриваться в осуществлении и применении настоящего изобретения на практике. Особенно применимые методики для конкретных вариантов осуществления будут обсуждаться в следующих разделах.

Следующие примеры предложены, чтобы обеспечить обычных специалистов в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы анализа, скрининга и терапевтические способы по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением.

Примеры

Пример 1. Сборка антигена кДНК штамма NDV 73T

Шесть субгеномных кДНК-фрагментов, полученных с помощью высокоточной RT-PCR, собирали в векторе pUC19. кДНК полной длины NDV 73T обозначили как p73T. Нуклеотидную и предсказанную аминокислотную последовательности сайта расщепления F-белка (FPCS) в 73T модифицировали в таковы из штамма NDV LaSota (лентогенный, lento) или гликопротеина В (gB) цитомегаловируса (CMV) (S116) (фиг. 1; двойная косая черта указывает на сайт расщепления F-белка). кДНК полностью секвенировали для подтверждения вирусной последовательности. Сайт расщепления F-белка: Wt: ggg agg aga cag aaa cgc ttt; Lento: ggg ggg aga cag gaa cgc ctt; S116: cat aat aga acg aaa tcc ttt; S116KM: cat aat aaa atg aaa tcc ttt; R116: cat aat aga acg aaa cgc ttt.

Пример 2. Вставка трансгена в геном NDV 73T

Трансгены вставляли в p73T в два положения: в межгенные последовательности между Р и М или межгенные последовательности между HN и L (участки соединения) (фиг. 2А). Для вставки одной трансгенной кассеты в участки соединения Р-М или HN-L конструирование кДНК p73T, содержащей трансген в участках соединения Р-М или HN-L, осуществляли путем вставки трансгенной кассеты в сайты AfeI,

созданные между генами Р и М (nt 3148) или между генами HN и L (nt 8231). Вставленная генная кассета содержит последовательность конца гена (GE; 5'-ТТААГАААААА -3'), межгенный нуклеотид (Т), последовательность начала гена (GS; 5'-ACGGGТАGA-3') и открытую рамку считывания (ORF) трансгена. Кроме того, десять нуклеотидов (5'-сгсгсгсгсгс-3') вставляли выше сайта инициации для введения последовательности Козак. кДНК полной длины (FL) 73Т, содержащую трансген в участке соединения Р-М или HN-L, обозначали как р73Т-Р1 или р73Т-HN1, соответственно, кДНК полной длины, содержащую два отдельных трансгена в участках соединения Р-М и HN-L в одном геноме, конструировали и обозначали как р73Т-Р1-HN1 (фиг. 2В). Для вставки двух трансгенных кассет в один участок соединения (например, Р-М) сайт AfeI вводили в конец ORF первого трансгена (#1) (nt 3169). ORF 2^{го} трансгена подвергали ПЦР-амплификации с помощью праймеров, содержащих последовательности GE и GS, и вставляли в сайт AfeI. Антигеномную кДНК, содержащую две трансгенные кассеты в участке соединения Р-М, обозначали как р73Т-Р2.

Пример 3. Выделение инфекционного рекомбинантного штамма NDV 73Т (r73Т) с модифицированным FPCS

Белки NP, Р, L NDV 73Т и антигеномную кДНК (р73Т-lento или р73Т-S116) клонировали под контролем промотора и терминатора для РНК-полимеразы T7. Четыре плазмиды совместно трансфицировали в клеточную линию, экспрессирующую РНК-полимеразу (фиг. 3А). Выделенные вирусы обозначали как r73Т-lento или r73Т-S116.

r73Т-lento и r73Т-S116 пассировали в клетках Vero со средами с добавлением трипсина и без добавления его. Рост r73Т-lento является трипсин-зависимым, тогда как r73Т-S116 может расти на средах без добавления трипсина. Оценивали последовательности расщепления F-белка (FPCS) в r73Т-S116, с hGM-CSF в участке соединения Р-М и без него. Штаммы 73Т-S116 далее пассировали на протяжении 10 пассажей в клетках Vero и фибросаркомы человека HT1080 при MOI 0,01 в среде без добавления трипсина. Мутации в FPCS (R113K и/или Q114M) появились на пассаже 7. Мутацию S116R обнаружили на пассаже 9. На пассаже 10 секвенировали F, HN и трансген и никаких дополнительных мутаций не обнаружили.

Пример 4. Определение характеристик рекомбинантного штамма 73Т с различными последовательностями расщепления F-белка

Рекомбинантный штамм 73Т с новыми модифицированными последовательностями расщепления F-белка (FPCS) включал следующие последовательности:

Lento: ¹¹¹G-G-R-Q-E-R/L-I¹¹⁸
 S116: ¹¹¹H-N-R-T-K-S/F¹¹⁷
 S116K: ¹¹¹H-N-K-T-K-S/F¹¹⁷
 S116M: ¹¹¹H-N-R-M-K-S/F¹¹⁷
 S116KM: ¹¹¹H-N-K-M-K-S/F-I¹¹⁸
 R116: ¹¹¹H-N-R-T-K-R/F-I¹¹⁸

Рекомбинантные штаммы 73Т с различными FPCS характеризовали с точки зрения MDT, ICPI, относительного цитолиза клеток HT1080, репликации в клетках Vero и репликации в яйцах (фиг. 4).

Вирулентность NDV для птиц определяется, в основном, последовательностями расщепления F-белка (FPCS). r73Т-lento разрабатывали так, чтобы он содержал FPCS невирулентного штамма LaSota. Репликация вируса штамма LaSota в тканевых культурах является трипсин-зависимой, поскольку F-белок не может расщепляться. r73Т-lento образует крошечные бляшки в клетках Vero без добавления трипсина, что указывает на то, что F-белок не расщепляется и вирус не может эффективно передаваться от клетки к клетке. r73Т-lento реплицировался на низком уровне в клетках Vero ($7,5 \times 10^3$ БОЕ/мл), при этом эффективно в яйцах с эндогенными трипсиноподобным ферментом ($5,7 \times 10^8$ БОЕ/мл). r73Т-lento не является вирулентным для кур, как показывает среднее время гибели (MDT) эмбрионов, в которых инокулировали вирус (MDT > 156 ч), и индекс внутримозговой патогенности (ICPI; ICPI = 0,00), и обладает низкой цитотоксичностью на клетках HT1080 (13% цитолиз клеток).

r73Т-S116 может образовывать относительно крупные бляшки и достигает титра $4,4 \times 10^6$ БОЕ/мл в клетках Vero. Это было сравнимо с титрами, которые получали при выращивании r73Т-S116 в клетках Vero с добавлением трипсина. Эти данные указывают на то, что сайт расщепления белка слияния (FPCS) r73Т-S116 может расщепляться без экзогенного трипсина в тканевых культурах. Он не был вирулентным для кур и демонстрировал 31% цитолиз клеток на клетках HT1080. r73Т-S116 проверяли в отношении его генетической стабильности с помощью пассирования в клетках *in vitro*.

После 10 пассажей в клетках Vero или HT1080 аминокислотные замены обнаружили в FPCS: R113K, Q114M и/или S116R. Для исключения возможности того, что в вирусном геноме произошли дополнительные изменения последовательности, рекомбинантные мутантные вирусы r73Т-S116 конструировали с помощью обратной генетики и оценивали. Если не считать r73Т-R116, r73Т-S116 и его производные были подобны исходному S116 в том, что эти мутантные вирусы были невирулентными для кур и были способны вызывать подобные уровни цитолиза клеток HT1080. Цитолиз клеток HT1080 составлял 29%-31% в случае одиночной мутации и 48% - в случае двойной мутации.

Размер бляшки у M114 и K113M114 значительно превышал таковой у S116. Мутант r73Т-R116 при-

обрел одну аминокислотную замену в остатке 116 (S116R) в FPCS. Как известно, R116, расположенный рядом с сайтом расщепления, важен для эффективного расщепления F-белка. r73T-R116 образует крупные бляшки у клеток Vero, вырастает до подобных титров при добавлении трипсина и без него и эффективно уничтожает клетки HT1080 (80%). R116 обладает увеличенной вирулентностью для кур, как показано при помощи анализа MDT (72, 80 часов). Хотя значение ICPI (0,65) было $<0,7$ в одном тесте, предпочтительным является дальнейшее снижение его вирулентности для кур.

Пример 5. Производные r73T-R116 обладают сниженной вирулентностью для кур

Можно разработать вирус для экспрессии трансгена в участке соединения Р-М (1), 2^{ого} трансгена в участке соединения HN-L (2) и увеличенной межгенной области HN-L, которая удлинена посредством вставки некодирующей последовательности (3) (фиг. 5А). В данном случае используют то же решение для вставки трансгенной кассеты в участок соединения Р-М, как на фиг. 2А. 2^{ая} трансгенная кассета содержит последовательность начала гена L (GS; 5'-ACGGGTTAGA-3'), открытую рамку считывания (ORF) трансгена, последовательности из 3'-нетранслируемой области гена L (выделены курсивом) и последовательность конца гена L (GE; 5'-TTAAGAAAAA-3'). Некодирующую последовательность, используемую для увеличения участка соединения HN-L, брали из парамиксовирусов 1 типа (APMV-1), респираторного синцитиального вируса (RSV) или случайной последовательности, которая не обладает гомологией с любой известной последовательностью. Длина вставки может находиться в диапазоне 60-318 нт. Вставка 2^{го} трансгена в HN-L дает вирусу возможность экспрессировать два трансгена, такие как hGM-CSF и GFP. Перечислены вставленные последовательности в участке соединения HN-L (фиг. 5В).

Пример 6. Модификация r73T-R116 и определение характеристик производных r73T-R116

Для снижения вирулентности r73T-R116 для кур вирус r73T-R116 модифицировали, увеличивая последовательность между генами HN и L путем вставки последовательностей различной длины. Производные r73T-R116 оценивали в отношении инфективности с помощью исследования бляшкообразования и репликации в клетках и яйцах; в отношении патогенности для птиц с помощью проверки MDT и ICPI, а также в отношении цитолиза опухолевых клеток (фиг. 6А).

Вставки в межгенную область длиной 318 нт из APMV, 198 нт из RSV и случайных последовательностей длиной 198 нт действительно снижали вирулентность для кур, причем MDT составляло >156 ч, и ICPI составлял 0,27, 0,0375 и 0 соответственно. Длинная вставка (случайная последовательность длиной 198 нт) характеризовалась усиленным эффектом на снижение вирулентности по сравнению с короткой вставкой (случайная последовательность длиной 60 нт). Вставки длиной 144, 102 и 60 нт характеризовались определенной вирулентностью для кур, но время MDT было более коротким. Значения ICPI для вставки длиной 144, 102 и 60 нт составляли 0,74, 0,51 и 0,78 соответственно. Вставка невирусной последовательности (случайная последовательность длиной 198 нт) эффективнее снижала вирулентность, чем вставка вирусной последовательности (RSV-198 нт). Вставка 2^{ой} трансгенной кассеты (EGFP) в участок соединения HN-L не снижала вирулентность для кур (MDT составляло 86 ч, а ICPI составляло 0,82). Все вставки слегка снижали репликацию вируса в яйцах до 4 раз, но не воздействовали на репликацию вируса в клетках Vero ($\sim 10^6$ БОЕ/мл). Хотя мутантные вирусы были более аттенуированными для кур, функция цитолиза опухолевых клеток оказалась не затронута. Все производные r73T-R116 характеризовались эффективностью цитолиза опухолевых клеток в диапазоне 75-86% в день 3 после заражения.

Пример 7. Кинетика роста вирусов r73T в яйцах и клетках Vero

Для определения условий роста для вирусов r73T исследования кинетики роста осуществляли на яйцах (фиг. 7) и клетках Vero (фиг. 8). Оплодотворенные куриные яйца заражали с использованием 100, 1000, 10 000 или 100 000 FFU/яйцо указанных вирусов и инкубировали в течение 2, 3 или 4 дней. Собирали аллантоисную жидкость и вирусные титры определяли с помощью FFA. Как показано на фиг. 7, при концентрации 100 БОЕ/яйцо вирусы имели низкий титр в день 1, но достигали пикового титра в день 2. В целом, большинство вирусов достигали пиковых титров, составляющих ~ 8 log/мл в день 2, независимо от применяемой дозы инокулята. R116i-198 характеризовался самым низким титром, причем низкая доза инокуляции приводила к самому высокому выходу в день 2, что указывает на то, что могло происходить накопление дефектных частиц. Вставка R116i-318-APMV также характеризовалась более низким пиковым титром, составлявшим ~ 7 log. R116i-198-RSV достигал пикового титра, составлявшего 7,5 log. S116, сконструированный снова с помощью обратной генетики, не характеризовался снижением вирусной продуктивности в яйцах. Следовательно, среди производных R116 вирус со вставкой RSV-198 нт представлял собой лучшего кандидата из онколитических вирусов с точки зрения свойств роста в яйцах.

Вирусы также оценивали в клоне 51D11 клеток Vero, выращиваемом на бессывороточной среде, проприетарной клеточной линии, полученной с помощью MedImmune. Все вирусы хорошо реплицировались при обоих условиях MOI (0,001 и 0,0001) (фиг. 8). Модификация FPCS 73T и межгенная вставка в участок соединения HN-L R116 не воздействовали на рост вируса в клетках Vero.

Пример 8. Селективный цитолиз клеток под действием r73T и производных на раковых клетках в сравнении с нормальными клетками.

r73T и его производные оценивали в отношении цитолиза ими клеток на клетках фибросаркомы человека HT1080 в сравнении с клетками-нормальными фибробластами кожи человека CCD1122Sk, отно-

сительно необработанных контрольных клеток (фиг. 9А и 9В). Данные получали после заражения производными r73T при разных дозах в диапазоне от 1 до 100 000 БОЕ в течение 72 ч. На раковых клетках HT1080 вирус с лентогенным FPCS характеризовался минимальной степенью цитолиза, с S116 в FPCS характеризовался средней степенью, а вирус с R116 в FPCS характеризовался настолько же эффективным цитолизом клеток, что и вирус r73T wt. На нормальных клетках CCD1122SK цитолиз клеток под действием всех вирусов не был настолько же эффективным, как в отношении раковых клеток. Снижение эффективности цитолиза составляло ~100 раз. Независимо от последовательностей FPCS все вирусы характеризовались аналогичной эффективностью цитолиза на нормальных клетках. Эффективность цитолиза клеток на раковых и нормальных клетках выражали как 50% эффективную концентрацию (EC_{50}), интерполированную из кривой доза-эффект с применением Prism 6.0 (фиг. 9С). Производное R116 характеризовалось значением EC_{50} , аналогичным таковому у r73T wt, с EC_{50} , составляющей 10 БОЕ, что указывает на то, что модификация FPCS не влияла на репликацию вируса и эффективность цитолиза клеток на раковых клетках. Репликацию этих вирусов в клетках HT1080 и CCD1122SK при MOI 0,01 определяли в день 3 после заражения (фиг. 9D). Все вирусы предпочтительно реплицировались в раковых клетках в сравнении с нормальными клетками с отличием, составляющим приблизительно 1,5-2,0 log.

Пример 9. Производные r73T обладали противоопухолевой активностью *in vivo* при введении либо системно, либо внутрь опухоли иммунодефицитным мышам, несущим ксенотрансплантаты опухолей человека

Для оценки онколитической активности *in vivo* модель ксенотрансплантата HT1080 получали путем инъекции клеток HT1080 при концентрации 5×10^6 клеток/0,1 мл подкожно в бестимусных "голых" мышей Balb/C возрастом 5-6 недель. Поскольку hGM-CSF не обладает перекрестной реактивностью на мышях, данное исследование не было предназначено для оценки эффекта трансгена, а для оценки онколитической способности различных конструкций r73T. R116-318i-hGM-CSF вводили внутрь опухоли (it) или внутривенно (iv) и скорость роста опухоли сравнивали у группы обработки и контрольной группы (фиг. 10А).

Мышей рандомизировали в указанные группы (N=10), когда объем опухоли достигал приблизительно 65 мм^3 . Мыши получали однократную дозу либо PBS, либо 2×10^7 БОЕ r73T-hGM-CSF-R116i-198, вводимую внутрь опухоли (IT), либо 1×10^8 БОЕ, вводимую внутривенно (IV) путем инъекции в хвостовую вену. Размер опухоли измеряли через каждые 3-4 дня. Как показано на фиг. 10А, r73T-R116i мог индуцировать значительный регресс опухоли при введении его либо IV, либо IT. Степень регресса опухоли, индуцированного двумя путями, была сравнимой, и значимо отличалась от контрольной группы.

Онколитическую активность производных r73T сравнивали в ксенотрансплантатах HT1080 при IT инъекции 1×10^8 БОЕ (фиг. 10В). Мышей рандомизировали в группы (n=7), когда объем опухоли достигал приблизительно 180 мм^3 . Мыши получали либо PBS, либо 1×10^8 БОЕ r73T-hGM-CSF-lento (lento), либо r73T-hGM-CSF-S116K113M114 (S116 KM), либо r73T-hGM-CSF-R116i-318 нт APMV-N (R116i), либо r73T-hGM-CSF (r73T wt). Размер опухоли измеряли через каждые 3-4 дня (* $P < 0,05$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок). Две дозы производных r73T были способны индуцировать значительный регресс опухоли, несмотря на различия в эффективности. r73T-lento был наименее эффективным, тогда как r73T wt был наиболее эффективным в регрессе опухоли. r73T-lento обладал эффектом, аналогичным таковому у вируса S116, хотя вирус S116 характеризовался в 10 раз более низкой EC_{50} в отношении цитолиза клеток *in vitro* (см. фиг. 9А). r73T-R116i-318 был настолько же активным, как и 73T wt, в ингибировании роста опухоли до 9 дней после $2^{0\text{th}}$ дозы (день 19 после имплантации опухоли), опухоль уменьшалась у мышей, обработанных R116i, но не у группы, обработанной 73T wt. Эти данные продемонстрировали, что производные r73T обладали противоопухолевой активностью *in vivo* при введении либо системно, либо внутрь опухоли иммунодефицитным мышам, несущим ксенотрансплантаты опухолей человека. Эффективное расщепление F-белка является важным для репликации вируса *in vitro* и *in vivo*. Вирусы с R116 в FPCS были более активными в цитолизе клеток *in vitro* и *in vivo*.

Пример 10. Биораспределение производного r73T после внутривенной доставки

Для определения происходит ли селективная репликация онколитического вируса NDV в опухолевых тканях и клиренс вируса, определяли распределение вируса в различных органах. Бестимусных "голых" мышей, несущих подкожные опухоли HT1080 размером ~ 250 мм^3 , обрабатывали R116i (r73T-hGM-CSF-R116i-318 нт APMV-N) при дозе 1×10^8 БОЕ внутривенно и умерщвляли в день 1, 4 или 8 (n=3 на момент времени). Собирали сыворотку крови, легкие, селезенку, яичники и опухоль.

Присутствие вируса количественно оценивали при помощи анализа бляшкообразования на клетках Vero, а экспрессию трансгена hGM-CSF измеряли при помощи анализа ELISA. Репликацию вируса в опухоли и органах оценивали в день 1, 4 и 8 после заражения. Вирус обнаруживали в органах только в день 1 (вирус не обнаруживали в яичнике во все временные точки), и вирусная нагрузка в опухолевых тканях была в ~100 раз выше, чем в легких и селезенках (фиг. 11А). Присутствие вируса в опухоли, с персистенцией в течение по меньшей мере 8 дней, указывает на то, что вирус селективно реплицировался в опухолевых тканях. С данными по вирусной репликации согласуется то, что уровень hGM-CSF был самым высоким и удерживался более 8 дней (фиг. 11В). Эти данные показывали, что вирус NDV может

эффективно реплицироваться в опухолевой ткани и эффективно доставлять трансген в локализованную опухолевую ткань.

Пример 11. Антигенная кДНК 73Т, содержащая химерные гены F и/или HN

Поверхностные гликопротеины вируса являются важными антигенами, определяющими иммуногенность и вирулентность для кур. Исследовали стратегии для замещения генов F и HN NDV на соответствующие внеклеточные (экто) домены других парамиксовирусов, которые не являются вирулентными для кур по-отдельности или в комбинации. Вирус парагриппа 5 (PIV 5) представляет собой парамиксовирус собак и не вызывает заболеваний у человека. Было показано, что парамиксовирус голубей типа 1 (PPMV-1) является невирулентным для кур с ICPI, составляющим 0,025, как сообщалось ранее, и отличается антигенами от NDV (Dortmans et al., *Veterinary Microbiology*, 2010, vol. 143, pages 139-144.) Существуют два генетически близкородственных варианта парамиксовируса голубей типа 1 (PPMV-1) с идентичными везикулярными сайтами расщепления белка слияния, но с сильно отличающейся вирулентностью (*Veterinary Microbiology*, 2010, 143:139-144). Получали антигенные кДНК полной длины из NDV 73Т, в которых поменяли эктодомены гликопротеинов F и/или HN на таковые из PPMV-1 и/или PIV5 (фиг. 12А). Последовательности из NDV, PIV5 и PPMV-1 отмечены цветными прямоугольниками как голубые, пурпурные или зеленые соответственно.

Указана длина в аминокислотах отдельных белков или белковых доменов. Анализы бляшкообразования на клетках Vero, относительного цитолиза клеток HT1080 и MDT осуществляли, как описано выше (фиг. 12В). Химерные вирусы, за исключением PIV-5 F-HN, выделялись и были способны расти в клетках в отсутствие экзогенного трипсина. Все три вируса образовывали бляшки значительных размеров, что демонстрирует эффективное распространение от клетки к клетке. Химерные вирусы с F-HN или F из PPMV-1 имели значения MDT, составлявшие 79 и 84 ч, соответственно, что указывает на потенциальную вирулентность для кур. Обе химеры PPMV-1 осуществляли цитоллиз клеток HT1080 эффективно на уровнях, составляющих 71 и 61%. Химеры PIV5-F не росли в яйцах и не были вирулентными для кур, и приводили к цитолизу клеток HT1080 на уровне 47%. Перекрестную реактивность сыворотки крови между NDV и химерами PPMV-1 или PIV5 проверяли с помощью анализа нейтрализации с применением сыворотки крови, собранной у мышей, которые получили две внутривенные дозы 1×10^8 БОЕ r73Т-R116i. Вирус r73Т нейтрализовала сыворотка крови от мышей, зараженных NDV (титр 960), в то время как она не нейтрализовала химеры PPMV-1 и PIV5 (титр <4). Этот результат подтверждает отсутствие перекрестной реактивности между NDV и PPMV-1 или PIV5. Химерные вирусы с отличающимися уровнями антигенности потенциально могут служить в качестве усиливающих онколитических вирусов для пациентов, у которых иммунные ответы против NDV развились во время предшествующего лечения с помощью NDV.

Сравнение активности РНК-полимеразы NDV с другими парамиксовирусами с помощью анализа минигенома (фиг. 12С). Клетки, экспрессирующие Т7, трансфицировали тремя плазмидами, экспрессирующими белки NP, P, L NDV, и плазмидой, кодирующей анти-минигеномную кДНК NDV, кодирующую ген GFP, с применением Lipofectamine 2000, или плазмидами, кодирующими гены N, P, L вируса кори (MV) или респираторного синцитиального вируса (RSV), и соответствующей плазмидой с анти-минигеномной кДНК GFP RSV или MV. Через два или три дня после трансфекции репликацию минигенома, на что указывает экспрессия белков GFP, проверяли под флуоресцентным микроскопом. NDV характеризовался самой сильной активностью полимеразы по сравнению с вирусом кори и RSV.

Пример 12. Раковые клетки, чувствительные к NDV, идентифицировали с помощью скрининга панели клеток

Чтобы понять, какие типы опухоли могут быть чувствительными к онколизису под действием NDV, 180 линий раковых клеток, перекрывающих широкий диапазон типов и категорий рака, тестировали в отношении чувствительности к рекомбинантному NDV и его вариантам. Клеточные линии получали из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния) или Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) и культивировали в средах и при условиях, рекомендуемых поставщиком. 10 000 линий раковых клеток высевали в 96-луночные планшеты и заражали вирусом спустя 6 часов. Концентрации вируса находились в диапазоне MOI 10-0,0001 (или от 1 до 100 000 БОЕ на лунку). Жизнеспособность клеток определяли через 48-96 ч после заражения. Чувствительность определяли с использованием граничного значения, составляющего >30% цитолиза клеток через 72 ч после заражения вирусом при MOI, составляющей 0,1. На фиг. 13А и 13В представлено общее описание чувствительности в зависимости от типа опухоли. Клеточные линии гемобластозов (лейкоз и лимфома) были относительно нечувствительными к онколизису под действием NDV, в то время как большинство протестированных клеточных линий меланомы, рака яичника и поджелудочной железы были чувствительными к NDV. Приблизительно 58% из всех протестированных линий раковых клеток человека были чувствительными к NDV с R116i в FPCS, в отличие от этого 4% протестированных клеточных линий были чувствительными вирусу на основе S. Наиболее вероятно, это было связано с расщеплением F-белка протеазами. Скорее всего, вирус R116i расщепляется убиквитарными фуриноподобными протеазами, в то время как протеаза, которая, вероятно, расщепляет S116 F-белок, не идентифицирована и, вероятно, менее убиквитарно экспрессируется. Полученный снова вариант S116-КМ приводил к большему размеру бляшек и усиленной онко-

литической активности по сравнению с исходным вариантом S116. Для дальнейшего тестирования эту меньшую панель из 22 линий раковых клеток, которые, как было определено, характеризуются определенным диапазоном чувствительности к вирусу NDV R116, заражали вариантами, экспрессирующими GFP, и жизнеспособность клеток определяли через 72 ч после заражения. С использованием того же самого граничного значения чувствительности, как описано выше, 41% протестированных клеточных линий были чувствительными к R116i, 4% - чувствительными к S116, и полученный снова S-КМ являлся более активным, чем S116 NDV, к которому чувствительны 27% протестированных клеточных линий.

Таблица 4. Сводная таблица чувствительности раковых клеток к цитолизу под действием вируса R116-hGM-CSF

Категория	Количество протестированных клеточных линий	Количество клеточных линий, чувствительных к S116	Количество клеточных линий, чувствительных к R116i
Мочевой пузырь	8	0	6
Кость	4	0	4
Головной мозг	4	0	4
Молочная железа	26	2	14
Прямая и ободочная кишка	14	0	3
Желудок	4	0	3
HNSCC	9	0	5
Гемобластоз	28	0	4
Почка	4	0	4
Печень	9	2	7
Легкое	28	0	20
Меланома	8	0	8
Яичник	10	0	8
Поджелудочная железа	14	0	11
Предстательная железа	6	2	3
Прочие	3	1	1

Клетки, происходящие из указанных раковых тканей, проверяли в отношении цитолиза клеток под действием рекомбинантного NDV 73T с R116 в FPCS и человеческим GM-CSF. Указано количество клеток, продемонстрировавших более чем 50% цитолиз при заражении вирусом с moi , составляющей 0,1, и общее количество клеточных линий, подвергшихся скринингу.

Пример 13. Производные r73T проявляли активностью цитолиза опухоли и/или ингибирования роста опухоли на изогенной модели меланомы

После оптимизации модели опухоли S116-RD NDV кодирующий человеческий или мышинный GM-CSF тестировали на эффективность на оптимизированной изогенной модели B16F10 (фиг. 15A и 15B). 1×10^8 БОЕ инъецировали внутрь опухоли в 3 дозах и использовали минимум 8 мышей на группу. Показано значительное ингибирование роста опухоли, составляющее >80% ингибирование роста опухоли (фиг. 15B). Кратковременного регресса опухоли достигали с помощью многократного дозирования внутрь опухоли (it.), что также приводило к значительному увеличению времени выживания, составляющему 18 дней для контроля по сравнению с 42 днями у обработанной группы. Прекращение лечения после 3 доз сопровождалось повторным ростом опухоли. Одно животное с отсутствием признаков остаточной опухоли в группе S116-mGM-CSF через 50 дней подвергали повторному воздействию посредством имплантации опухолевых клеток в противоположный бок. Рост опухоли был замедленным, но не ингибировался, что позволяет предположить в этой модели, что у этого отдельного животного не достигался полный ответ иммунологической памяти.

Чтобы оценить онколитические и иммунные эффекты на рост опухоли, варианты NDV R116i и S116, кодирующие hGM-CSF или mGM-CSF, соответственно, тестировали в отношении эффективности на иммунокомпетентной мышинной изогенной модели опухоли прямой и ободочной кишки CT26. Каждый вирус вводили при дозе 1×10^8 БОЕ вируса внутрь опухоли за 4 дозы. Опухоли имели минимальный объем 100 мм перед началом введения доз. У всех животных, обработанных вирусом в качестве монотерапии, показана сильная противоопухолевая активность. У 11/12 животных опухоль после обработки с помощью R116, кодирующего человеческий GM-CSF, отсутствовала, что соответствует 92% уровню полного ответа. Менее литический полученный снова вирус S116-КМ характеризовался сниженным ингибированием роста опухоли, при этом достигался 53% TGI, и уровень полного ответа составлял 36%. Однако

в присутствии мышинового GM-CSF, который в отличие от человеческого GM-CSF будет активен на мышинной модели, данный уровень ответа был увеличен до 54%, при этом ингибирование роста опухоли составляло 75%. Таким образом, является вероятным, что снабжение вируса S116 GM-CSF может усиливать противоопухолевую активность.

Вирус	% TGI	% полного ответа (CR)
R116 hGM-CSF	83	92
R116 mGM-CSF	ND	ND
S116 hGM-CSF	53	36
S116 mGM-CSF	75	54

Опухоли, которые оставались, отбирали для гистологического анализа и окрашивали с помощью красителей гематоксилина и эозина (H и E) и применяли иммуногистохимические способы для обнаружения NDV (фиг. 15C). Имеется явное доказательство экспрессии NDV и он, по-видимому, концентрируется вокруг некротических участков опухоли, что позволяет предположить, что NDV принимает участие в гибели и некрозе опухолевых клеток. Также имеется явное доказательство проникновения иммунных клеток в опухоль и некротические участки. В участках, которые характеризуются сильным окрашиванием в отношении NDV, также можно отметить образование многоядерных клеточных синцитиев. Кроме того, оказалось, что имеется очень небольшое количество жизнеспособных опухолей, указывающее на то, что данные по ингибированию роста опухоли могут недооценивать активность NDV в этой модели.

На фиг. 15C показано, что NDV характеризуется сильной противоопухолевой активностью на иммунокомпетентной мышинной модели опухоли прямой и ободочной кишки CT26. Чтобы оценить онколитические и иммунные эффекты на рост опухоли, варианты NDV R116i и S116, кодирующие hGM-CSF или mGM-CSF, соответственно, тестировали в отношении эффективности на иммунокомпетентной мышинной изогенной модели опухоли прямой и ободочной кишки CT26. Каждый вирус вводили при дозе 1×10^8 БОЕ вируса внутрь опухоли за 4 дозы. Опухоли имели минимальный объем 100 мм^3 перед началом введения доз. У всех животных, обработанных вирусом в качестве монотерапии, показана сильная противоопухолевая активность. У 11/12 животных опухоль после обработки с помощью R116, кодирующего человеческий GM-CSF, отсутствовала, что соответствует 92% уровню полного ответа. Менее литический полученный снова вирус S116-КМ характеризовался сниженным ингибированием роста опухоли, при этом достигался 53% TGI и уровень полного ответа составлял 36%. Однако в присутствии мышинового GM-CSF, который в отличие от человеческого GM-CSF будет активен на мышинной модели, данный уровень ответа был увеличен до 54%, при этом ингибирование роста опухоли составляло 75%. Таким образом, снабжение GM-CSF вируса S116 усиливает противоопухолевую активность.

На фиг. 15D-F показано, что введение нескольких доз rNDV R116i вызывало ингибирование роста опухоли и запускало рекрутинг иммунных клеток в модели с ксенотрансплантатом рака яичника (OVCAR4). Для дальнейшей оценки онколитической активности rNDV in vivo использовали модель с ксенотрансплантатом рака яичника человека (OVCAR4). Данная модель является медленно растущей и по своей макропатологии напоминает опухоли яичника человека с морфологически низкодифференцированными клетками и крупными ацитоподобными заполненными жидкостью пространствами. После достижения опухолью объема 100 мм^3 мышей рандомизировали для получения 8 доз R116i NDV, кодирующего либо мышинный, либо человеческий GM-CSF, или PBS в качестве контроля. Только продукт, полученный с помощью мышинной генной последовательности, будет обладать биологической активностью на мышинной модели. $2,5 \times 10^7$ БОЕ инъецировали внутрь опухоли в объеме менее 50 мкл один раз в неделю. Кривые роста опухоли показаны на фиг. 15D. Долгосрочное ингибирование опухоли достигалось у несущих опухоль животных, обработанных любым вариантом NDV. Также имелось доказательство присутствия вирусного генома в опухоли в конце исследования (24 ч после последней дозы), полученное с применением RT-PCR. После гистологического анализа имелось явное доказательство наличия инфильтрата из иммунных клеток, а также другие гистологические изменения в остаточной опухоли (фиг. 15E и F). Обработанные опухоли являются намного менее дедифференцированными, чем у контрольных обработанных животных, и, по-видимому, имеют меньше асцитных заполненных жидкостью пространств. Высокий уровень воспалительного инфильтрата обнаруживали в ряде обработанных опухолей, прилегающих к остаточной опухоли, и иммуногистохимический (ИHC) анализ выявил, что эти инфильтраты из иммунных клеток были позитивными в отношении белка NDV. Обнаружена высокая степень рекрутинга клеток врожденного иммунитета в опухолях у групп, обработанных NDV. Эти данные демонстрируют сильную противоопухолевую эффективность на морфологически релевантной модели рака яичника, которая может быть обусловлена прямым онколизисом и рекрутингом и активацией клеток врожденного иммунитета.

Пример 14. Вирусы NDV индуцировали регресс опухоли

73T-R116i-hGM-CSF и 73T-R116i-mGM-CSF оценивали в отношении онколитического эффекта на модели меланомы B16. В исследовании оценивали переносимость вируса на мышах B16. Каждый вирус вводили с дозой 2×10^7 БОЕ дважды в дни 11 и 14 внутривенно (i.v) или внутривенно (i.p) или один раз в день 11 из расчета $1,1 \times 10^7$ БОЕ внутрь опухоли (i.t). Группы, обработанные с помощью R116-hGM-CSF или mGM-CSF посредством трех различных путей введения, характеризовались замедленной скоростью роста опухоли по сравнению с необработанной группой (фиг. 15A). Каждая группа включала 3 мышей. Уровни ингибирования опухоли имели статистическую значимость по сравнению с контрольной группой. Таким образом, производные r73T по настоящему изобретению характеризовались преимущественной низкой патогенностью для птиц, высокой онколитической активностью и реплицировались до высоких титров в куриных яйцах. Исходя из этих результатов, вирусы по настоящему изобретению применимы для индуцирования регресса опухоли и улучшают исходы лечения у пациентов с раком (фиг. 16).

Кроме GM-CSF целый ряд трансгенов (табл. 2) можно вставлять в штамм NDV 73T для усиления цитолиза опухоли.

Эти трансгены включали следующие.

(1) Цитокины или сконструированные варианты цитокинов, такие как GM-CSF, IL-2, IL-21, IL-15, IL-12 и IL-12p70.

(2) Лиганды клеточной поверхности и хемокины, в том числе OX40L, CD40L, ICOSL, Flt3:, B.1 (CD80), CD137L, CXCL10 (IP-10), CCL5, CXCL9.

(3) ингибитор Мус: Omomus.

(4) Трансгены для целей визуализации in vivo, такой как опосредованная симпортом йодида и иона натрия (NIS) радиовирусная терапия, для радиовирусной терапии.

(5) Дополнительные модуляторы выживания опухолевых клеток для усиления цитолиза опухоли, в том числе, но без ограничений, ингибиторы продвижения клеток по клеточному циклу, ингибирование антиапоптотических белков, усиление проапоптотических белков, ингибирование ключевых онкогенных стимулов злокачественного перерождения. Это может включать трансгенную доставку белков после селективной репликации NDV в опухолевых клетках, выработку siRNA с селективной или широкой активностью, доставку miRNA или ингибирование выбранных miRNA.

(6) Опухолевые антигены, такие как E6, E7, антигены рака семенников, онкоэмбриональные антигены, искусственные или сверхэкспрессированные белки в качестве новых опухолевых антигенов либо отдельно, либо в комбинации с другими трансгенами.

(7) Антитела или рекомбинантные гибридные белки, которые целенаправленно воздействуют на иммуномодулирующие белки либо с блокированием отрицательной регуляции, либо с обеспечением агонистического сигнала для улучшения Т-клеточной функции. Примеры таких антител могут включать, но без ограничений, PD-L1, CTLA4, CD-137 (4-1BB), OX40, GITR, TIM-3, CD73, PD-1, HVEM и LIGHT.

(8) Увеличение фармакодинамической/фармакокинетической активности гесNDV посредством разработки или экспрессии гесNDV в клетках, которые переносят белки на гесNDV для снижения клиренса под действием комплемента или для снижения адаптивного иммунного ответа на NDV.

Таблица 5. Трансгены для потенциальной вставки в NDV 73T и их биологическая активность

Трансген	Размер гена	МОА (функции, относящиеся к иммунотерапии)
Цитокины		
<u>GM-CSF</u>	0,47 т.п.о.	• Фактор роста гематопозитических клеток • Стимулирует стволовые клетки дифференцироваться на гранулоциты и моноциты (и в конечном итоге APC)
<u>IL-2</u>	0,48 т.п.о.	• Стимулирует CD8 T-, CD4 T-, NK- и В-клетки • Увеличивает выработку цитокина • Индуцирует расселение T-reg
<u>IL-21</u>	0,6 т.п.о.	• Стимулирует CD8 T-клетки, NK- и В-клетки • Не индуцирует расселение T-reg
<u>IL-15</u>	0,5 т.п.о.	• Функция, подобная IL-2 • Поддерживает выживание CD8 CTL (в отличие от IL-2 w, который активирует CD8 CTL памяти)
<u>IL-12p70</u>		• Стимулирует CD8 T-клетки и NK-клетки
<u>IL-12A</u>	0,76 т.п.о.	• Управляет дифференциацией Th1 CD-4 T-клеток
<u>IL-12B</u>	0,99 т.п.о.	• Сокращает количество T-reg • Реполяризует M2-макрофаги в M1-макрофаги
Лиганды клеточной поверхности и хемокины		
<u>OX40L</u>	0,55 т.п.о.	• Связывает рецептор на активированных (не наивных) Т-клетках, доставляя сигнал активации • Эффекты снижения активации на Т-клетках: - Пролиферативный и антиапоптотический - Индуцирует цитокины, Ag-специфический Ab - Т-клетки памяти
<u>CD40L</u> или <u>CD40</u>	0,79 т.п.о.	• Связывание с рецептором на CD является критичным для примирования Т-клеток (повышающая регуляция MHC-II, CD86, CD80) • Стимулирует IL-12, MIP-1a из DC управлять Th1-дифференциацией и миграцией в места воспаления • Важен для CTL (примирование перекрестнореагирующим антигеном)
<u>ICOSL</u>	0,9 т.п.о.	• Экспрессия рецептора ICOS на наивных Т-клетках и повышающая регуляция после стимулирования TCR и CD28 • Литературные источники демонстрируют доказательства дифференциации и Th1, и Th2 посредством ICOS

		Обеспечивает сигнал для выработки высокоаффинного Ab
<u>Flt3L</u>	0,7 т.п.о.	- Ключевой фактор развития и дифференциации гематopoэтических клеток (CD-, NK- и B-клеток) - Убиквитарно экспрессируется (рецептор, относящийся к иммунным клеткам)
<u>B7.1 (CD80)</u>	0,866 т.п.о.	- Как правило, повышающая регуляция созревания CD - Костимулирующая молекула для дифференциации Cd4- наивных Т-клеток в субпопуляции Т-хелперов (Th1, IL)
CD137L	0,767 т.п.о.	- Экспрессируется на DC-, NK-клетках, моноцитах, DC - Запускает пролиферацию Т-клеток, секрецию IL-2 и возможности цитолиза
CXCL10 (IP-10)	0,296 т.п.о.	- ELR-отрицательная молекула с проявлением противоопухолевой активности - Хемоаттрактант для Т-клеток, NK-клеток, моноцитов и DC - Аттенуирует ангиогенез
CCL5 (RANTES)	0,275 т.п.о.	- Хемоаттрактант для эозинофилов, базофилов, тучных клеток, моноцитов, CTL, CD4-T-клеток - Противоопухолевые функции, которые, как полагают, являются результатом инфильтрации иммунных клеток
<u>CXCL9 (MIG)</u>	0,367 т.п.о.	- Хемоаттрактант для лейкоцитов - IFN-гамма-зависимая экспрессия; НЕ индуцируется IFN-альфа/бета
ингибитор Muc		
Otomuc	1,3 т.п.о.	Демонстрирует эффективность в мышинной модели рака легких
Image		
NIS	2 т.п.о.	Симпорт йодида натрия у человека с целью концентрации ¹³¹ I в раковых клетках для радиотерапии

Пример 15. Противораковая терапия предусматривает введение онколитического NDV в комбинации с иммуномодулирующим mAb

При необходимости онколитический вирус NDV можно вводить одновременно или последовательно с терапевтическими антителами или агонистическими гибридными белками (например, антителом к PD-L1, антителом к CTLA4, антителом к OX40, антителом к GITR, антителом к TIM-3, антителом к PD-1 и антителом к ICOS). Получены доклинические данные, которые установили наиболее эффективную дозу и схему приема молекул, которые усиливают активность NDV на моделях опухолей в комбинации с новыми конструкциями NDV, описанными в данном документе. Трансгены можно вставлять в рекомбинантный NDV для экспрессии либо отдельно, либо в комбинации, для доставки нескольких форм активности, например, для усиления гибели опухолевых клеток, индуцированной новыми вариантами NDV. Повышение высвобождения антигенов опухолевых клеток в комбинации с иммуномодулирующим подходом имеет потенциал для повышения адаптивного иммунного ответа на эти высвобождаемые опухолевые антигены.

Пример 16. Эффективность расщепления F-белка и активность слияния снижались в случае F-белка с мутацией R, S или S-KM в сайте расщепления F-белка

Чтобы понять, воздействует ли отличие в сайте расщепления F-белка на расщепление F-белка в зараженных клетках, и определить его влияние на активность слияния, плазмиду с F-белком трансфицировали в клетки 293 для проверки расщепления F-белка. Кроме того, совместно трансфицировали плазмиды с F и HN для проверки активности слияния в анализе переноса, поскольку оба белка F и HN необходимы для осуществления слияния (фиг. 3B и 3C). F-белок wt расщеплялся протеазой организма-хозяина более эффективно, чем F-белок с мутацией R, S или S-KM в сайте расщепления F-белка, при этом очень небольшое количество продукта расщепления F-белка (F1) обнаружили в случае F с сайтом расщепления S, и отсутствие продукта расщепления обнаружили в клетках, трансфицированных плазмидой с лентогенным F. Конструкция с F-белком с R и S имеет N-связанный сайт гликозилирования (NXT) в сайте расщепления, что приводит к более медленной подвижности перемещения на SDS-PAGE, чем у lento и S-KM, поскольку мутация KM нарушает сайт гликозилирования. Эти данные показали, что мутации R и S в сайте расщепления F-белка воздействовали на расщепление F-белка и S-KN является более эффективной, чем S. Поскольку каждый из генов F и HN клонировали в вектор pViro2-neo-MCS, кодирующий ген EGFP, при этом образование синцития можно визуально определить при помощи слитых зеленых клеток.

Образование крупных синцитиев наблюдали в клетках 293, трансфицированных плазмидами с F wt и HN. Все мутанты F с остатками R, S или S-KM в сайтах расщепления F-белка приводили к сильному снижению образования синцитиев.

Пример 17. Вирус r73T-R116i со вставкой длиной 198 нт демонстрировал более медленный рост и отличающийся профиль синтеза РНК и белка на клетках DF-1 по сравнению с клетками Vero

Вирус R116i с 198 нт, вставленными в участок соединения HN-L, демонстрировал более медленную кинетику роста в куриных клетках DF-1 в условиях с высокой *moi*, как показано на фиг. 6B и 6D. Отличие в росте R116i со вставкой длиной 198 нт было снижено по сравнению с вирусом wt и R, который не имел межгенной вставки, в ранние моменты времени после заражения (10-20 ч). В клетках Vero отличие в росте между этими вирусами не было очень заметным (фиг. 6C и 6E). Чтобы понять, воздействует ли межгенная вставка в вирусах R116i на транскрипцию и репликацию вирусной РНК, синтез вирусных РНК и белка в зараженных клетках DF-1 исследовали при помощи нозерн- и Вестерн-блоттинг анализов, соответственно (фиг. 6F и 6G). Синтез РНК и белка R116i со вставкой длиной 198 нт был сильно снижен в зараженных клетках DF-1. Напротив, в зараженных клетках Vero уровень расположенного выше генного транскрипта, такого как мРНК NP, был сильно увеличен в клетках, зараженных R118i-198 или 198RSV, тогда как уровень геномных РНК этих двух вирусов был снижен. Уровень L-белка этих двух вирусов был снижен, но был повышен уровень других вирусных белковых продуктов, таких как NP, F и HN, как показано на фигурах 6H и I. Данные, представленные на фиг. 6F-I, получены в условиях высокой *moi* (*moi*=5). Синтез РНК и белка далее оценивали в условиях низкой *moi* (*moi*=0,001). И в этом случае R116i-198 и 198RSV имели отличающийся профиль синтеза РНК и белка на клетках DF-1 и Vero. Как синтез РНК, так и синтез белка у R116i-198 или 198RSV были снижены в куриных клетках DF-1 (фиг. 6J). Напротив, уровень расположенных выше РНК и белка, был увеличенный в клетках Vero, но уровень мРНК L и L-белка был снижен из-за межгенной вставки последовательности длиной 198 нт (фиг. 6K). Далее сравнивали синтез вирусных РНК и белка в человеческих клеточных линиях, клетках фибросаркомы человека HT1080 и клетках Hela, а также клетках DF-1 (фиг. 6L). Эти данные подтвердили, что R116i-198 или 198RSV имели отличающуюся экспрессию, синтез расположенных выше РНК и белка увеличивался, тогда как экспрессия L-белка подвергалась понижающей регуляции. Эти данные объясняют, почему вирусы R116i-198 или 198RSV хорошо реплицировались в линиях клеток млекопитающих, таких как Vero, человеческие клетки HT1080 и Hela, но не росли в достаточной степени в оплодотворенных куриных яйцах и куриных клетках DF-1. Это также является основой пониженной патогенности для кур этих вирусов R116i, как продемонстрировано с помощью их низкого значения индекса внутримозговой патогенности (ICPI).

Пример 18. Экспрессия трансгена мышиногo GM-CSF характеризовалась более низкой эффективностью ингибирования роста опухоли, чем экспрессия трансгена человеческого GM-CSF в случае R116i-198RSV, но не в случае S116-KM

На фиг. 11C приведено сравнение вклада экспрессии трансгена mGM-CSF по сравнению с hGM-CSF на онколитическую активность R116i-198RSV и S116-KM на мышинной модели с ксенотрансплантатом опухоли HT1080. Трансген hGM-CSF не обладает перекрестной реактивностью с mGM-CSF и, поэтому, его использовали в качестве контроля. Трансген mGM-CSF в R116i-198, вводимый внутрь опухоли, характеризовался более низкой эффективностью в ингибировании роста опухоли по сравнению с hGM-CSF. Аналогичное ингибирование роста опухоли у mGM-CSF и hGM-CSF наблюдали в случае вируса S116. Вирусные титры в опухолях, обработанных вирусом, определяли при помощи анализа бляшкообразования (фиг. 11D). В день 4 после инъекции в опухоль аналогичный титр обнаружили в случае R116i-198RSV и S116-KM с парами mGM-CSF или hGM-CSF. Однако в день 7 после инъекции R116i-198RSV с mGM-CSF не обнаруживали, в то время как R116i-198RSV с hGM-CSF все еще имел вирусный титр, составлявший приблизительно 4,5 log/г ткани. Отсутствовало отличие в вирусных титрах S116 с hGM-CSF или mGM-CSF. Эти данные показывают, что экспрессия mGM-CSF при помощи R116i упрощала клиренс вируса.

Исследовали проникновение иммунных клеток в зараженные вирусом опухолевые ткани (фиг. 11E). В случае R116i-198RSV с mGM-CSF наблюдали наибольшее количество нейтрофилов, NK-клеток и макрофагов в обработанных опухолях по сравнению с R116i-198RSV с hGM-CSF и S116 с парой hGM-CSF и mGM-CSF. Цитокины и хемокины в обработанной вирусом опухоли определяли при помощи анализа luminex (фиг. 11F). Все четыре вируса стимулировали выработку цитокинов и хемокинов, во много раз превышающую таковую в необработанных опухолевых тканях. Экспрессия mGM-CSF под действием R116i приблизительно в 10 раз выше таковой под действием S116 (повышение в 106,7 раз в сравнении с 9,9 раз).

На фиг. 11G показана аналогичная активность ингибирования роста опухоли у R116i с 198 или 318 нт, вставленными в участок соединения HN-L, содержащего один и тот же трансген hGM-CSF, на мышинной модели с ксенотрансплантатом опухоли HT1080. Вставка длиной 318 нуклеотидов в участке соединения HN-L не снижала вирусную онколитическую активность вируса.

Пример 19. Оценка опосредованной комплементом инактивации NDV и роль регуляторных белков в ускользании от комплемента

Система комплемента (C') представляет собой главную защитную систему против микробной инвазии у организма-хозяина. В системе комплемента человека насчитывается приблизительно 30 разных гликопротеинов, из которых 20 активны в плазме крови и 10 являются регуляторами или рецепторами на клеточных мембранах. Мембраносвязанные регуляторы C' (RCA) включают 4 хорошо изученные молекулы: hCD46, hCD55, hCD59 и hCD35. Их основной функцией является защита человеческих клеток от атаки собственного комплемента, не затрагивая роль C' в устранении чужеродных агентов. Эти RCA-белки являются видоспецифичными для организма-хозяина. NDV, применяемый для вирусной терапии в прошлом, как правило, получали в оплодотворенных куриных яйцах. Ожидалось, что онколитический вирус NDV, вводимый посредством внутривенной инъекции пациентам с раком, мог подвергаться быстрому выведению, со снижением тем самым эффективного дозирования вируса. Поскольку оболочечные вирусы, получаемые в человеческих клетках, встраивают RCA-белки во время их выхода из зараженных клеток, следовательно, является желательным получать NDV в человеческих клеточных культурах для снижения опосредованного C' лизиса или инактивации вируса.

Чувствительность NDV к опосредованной C' инактивации оценивали путем исследования NDV, полученных в оплодотворенных куриных яйцах, человеческих суспензионных клеточных линиях 293 и Hela S3 (фиг. 17). Выращивание вируса в яйцах было чувствительным к опосредованной C' инактивации, при этом ингибирующее действие сыворотки крови устраняли при помощи термообработки (56°C в течение 30 мин.) сыворотки крови. Комплемент морской свинки характеризовался аналогичным уровнем эффекта инактивации вируса (данные не показаны), что подтверждает, что инактивация вируса была обусловлена C'. Кроме того, вирусы, полученные в клетках Hela, были более устойчивыми к опосредованной C' человека инактивации вируса, чем полученные в клетках 293 и яйцах. Таким образом, эти данные означают, что клетки Hela лучше подходят для получения онколитического вируса NDV, чем клетки 293, что, вероятно, приведет к более медленному клиренсу вируса и, тем самым, увеличит терапевтический индекс.

Для объяснения того, почему NDV, полученный в клетках Hela S3, является более устойчивым к C', суспензионные клеточные линии 293 и Hela S оценивали в отношении уровней 4 хорошо изученных человеческих RCA-белков, hCD46, hCD55, hCD59 и hCD35. hCD35 не обнаружили в клетках 293 и Hela при помощи Вестерн-блот анализа, и эти данные, следовательно, не показаны на фиг. 18. hCD46, hCD55 и hCD59 обнаружили в большем количестве в клетках Hela S3, чем в клетках 293. Таким образом, уровни RCA-белков обратно коррелируют с чувствительностью вируса к C'.

Чтобы определить, все ли три RCA-белка регулируют функцию C', трансген hCD55, hCD59 или hCD46 вставляли в геном NDV с помощью способов обратной генетики и получали рекомбинантные вирусы, экспрессирующие каждый из этих трех RCA-белков. Вестерн-блот анализ показал, что каждый из этих RCA-белков экспрессировался вирусом и встраивался в вирионы (фиг. 19). Определили, что hCD55 является главным RCA-белком, ответственным за функцию инактивации C' (фиг. 20). Полученный в яйцах вирус, экспрессирующий hCD55, с встроенным в вирионы hCD55, был наиболее устойчивым к опосредованной C' инактивации, что очень напоминало вирусы, полученные в клетках Hela. Для сравнения, hCD46 оказывал незначительное улучшение с точки зрения устойчивости вируса к инактивации под действием C', а hCD59 не принимал обнаруживаемого участия в регуляции C'.

В заключение, для снижения клиренса вируса для онколитической вирусной терапии или для повышения терапевтического индекса NDV клетки Hela рассматривают как оптимальную клеточную линию для получения вируса.

Результаты, описанные в данном документе, получали с применением следующих материалов и способов.

Клетки и вирусы

Применяли следующие клеточные линии и соответствующие среды. Клеточная линия Vero из почки африканской зеленой мартышки (ATCC) и фибросаркомы человека (HT1080, ATCC), минимальная питательная среда Игла (EMEM, Hyclone) с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS); линия Vero клон 51D11 (MedImmune), бессывороточная среда (SFM MegaVir, Hyclone) с 1% глутамина; клетки-нормальные фибробласты кожи человека (CCD1122Sk, ATCC), составленная ATCC среда Дульбекко в модификации Исков (IMEM) с 10% FBS. Рекомбинантные вирусы ньюкаслской болезни (NDV) выращивали в аллантаоисных полостях 10-11-дневных свободных от специфических патогенов (SPF) оплодотворенных куриных яйцах, клетках Vero или Vero клон 51D11.

Структура антигеномной кДНК NDV и сопутствующие плазмиды NP, P и L

Вирусную РНК из NDV штамма 73T получили от Dr. Mark Peeples (Национальная детская больница (Nationwide Children's Hospital)). Последовательности NDV (GenBank) выравнивали с получением консенсусных последовательностей для разработки ДНК-олигонуклеотидов для RT-PCR вирусной РНК. Шесть субгеномных перекрывающихся фрагментов кДНК охватывающих весь геном NDV получали при помощи высокоточной RT-PCR (фиг. 1). Вектор pUC19 модифицировали так, чтобы он включал олигонуклеотидный линкер длиной 88 нт, содержащий сайты рестрикции, введенные между сайтами EcoRI и HindIII

для последовательной сборки антигенной кДНК полной длины из штамма NDV 73T. Кроме того, плазмиды с кДНК штамма 73T (p73T) содержат 27 нуклеотидов (нт) промотора для РНК-полимеразы T7 на 5'-конце и 189 нт, содержащих последовательность антигенного рибозима HDV и сигнал терминации транскрипции для РНК-полимеразы T7 на 3'-конце. Для получения невирулентного NDV последовательность, кодирующую сайт расщепления протеазой белка слияния, модифицировали при помощи сайт-направленного мутагенеза до таковой невирулентного штамма NDV LaSota (лентогенный, lento) или гликопротеина В (gB) цитомегаловируса (S116). Для конструирования плазмид экспрессии NP, Р и L открытые рамки считывания белка (ORF) амплифицировали при помощи RT-PCR и клонировали в плазмиду pCITE2a под контроль РНК-полимеразы T7.

Вставка трансгена в NDV

Для вставки трансгена в участок соединения Р-М вводили сайт рестрикции AfeI в нт 3148 в плазмиде для субклонирования, содержащей фрагмент SacII-PmlI (фиг. 2А). кДНК, кодирующую человеческий или мышинный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) или интерлейкин 2 (IL-2), подвергали оптимизации кодона и синтезировали с помощью DNA 2.0. Генную кассету, содержащую конец гена (GE) N, начало гена (GS) Р и открытую рамку считывания (ORF) трансгена, вставляли в сайт AfeI. Фрагмент SacII-PmlI из полученной в результате плазмиды перемещали в плазмиду r73T и называли как p73T-P1.

Для вставки трансгена в участок соединения HN-L между ORF HN и сигнальной последовательностью конца гена (GE) HN, сайт рестрикции AfeI вводили в нт 8231 в плазмиде, содержащей фрагмент AgeI-XbaI (фиг. 2А). Генную кассету получали при помощи ПЦР с применением пары из смыслового и антисмыслового праймеров с фосфатом (табл. 3) и вставляли в сайт AfeI.

Таблица 3. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для вставки кассеты для транскрипции трансгена

Трансген	Смысловый	Антисмысловый
hGM-CSF	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAG</u> <u>AAcgccgccaccATGTGGCTGCAG</u> <u>AGCCTGCTG</u> 3'	5' TCATTCTGCACGGGGCTCCAGCAGTC 3'
mGM-CSF	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAG</u> <u>AAcgccgccaccATGTGGCTGCAG</u> <u>AACCTGCTGTTCTTGG</u> 3'	5' GTATCACTTCTGGCCGGGTTTCTTGCACTC 3'
hIL-2	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAG</u> <u>AAcgccgccaccATGTATAGGATG</u> <u>CAACTTCTGTC</u> 3'	5' GTCAAGTCAGGGTAGAGATAATGCTCTGGC 3'
mIL-2	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAG</u> <u>AAcgccgccaccATGTATTCAATGC</u> <u>AGCTGGCATC</u> 3'	5' GAGTTACTGAGGGGAAGTTGAAATG 3'
EGFP	5' <u>TTAAGAAAAAATACGGGTAG</u> <u>AAcgccgccaccATGGTGAGCAAG</u> <u>GGCGAGGAGCTG</u> 3'	5' AATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC 3'
EGFP (HN-L)	5' <u>ACGGGTAGGACATGGTGAGC</u> <u>AAGGGCGAGG</u> 3'	5' <u>TTTTTCTAACATAGTATAATTAAATCACCAA</u> GGATACAATTGGCCAGAAAAAGAGCCTATT AATATGTGATTTTCGCGTTACTTGTACAGCTC GTCCAT 3'

Последовательности конца гена (GE) и начала гена (GS) подчеркнуты. Последовательность Козак показана бувами нижнего регистра. Последовательности, соответствующие 5'- или 3'-последовательностям трансгена показаны курсивом. За исключением EGFP (H-N) все остальные пары праймеров можно применять для вставки трансгена между G-M или HN-L.

hGM-CSF: человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; mGM-CSF: мышинный GM-CSF; hIL-2 и mIL-2 соответствуют человеческому и мышинному интерлейкину 2 (IL-2) соответственно.

Фрагмент AgI-XbaI из полученной в результате плазмиды перемещали в плазмиду p73Tс получением р73T-HN1. Другая стратегия вставки последовательности в участок соединения HN-L заключалась в вставке трансгенной кассеты или последовательностей от других парамиксовирусов между сигналом конца гена (GE) HN и сигналом начала гена (GS) L (фиг. 4) в сайт AfeI, который был введен в нт 8359. Плазмиду с кДНК полной длины обозначали р73T-R116i. Поскольку длина генома NDV должна быть кратна 6 нуклеотидам (правило 6), антигеномную кДНК различных конструкций получали, следуя правилу 6.

Для вставки двух кассет для транскрипции в участок соединения P-M сайт AfeI вводили на конце ORF GM-CSF (нт 3619) (фиг. 2B). ORF IL-2 амплифицировали с применением пары из смыслового и антисмыслового праймеров с фосфатом, содержащих последовательности GE и GS, и вставляли в сайт AfeI. Фрагмент SacII-PmlI из полученной в результате плазмиды, включающей кассеты для транскрипции GM-CSF и IL-2, переставляли обратно в плазмиду r73Tс получением р73T-P2.

Получение химерных вирусов r73T, содержащих эктодомен из других парамиксовирусов

Геномную ДНК химерных NDV получали путем замещения F и HN из NDV на белки из парамиксовируса 1 голубей (PPMV-1). С-терминальную кодирующую последовательность для цитоплазматического концевой сегмента и трансмембранной части из F NDV 73T (аминокислотные остатки 503-553) соединяли с кодирующей эктодомен F-белка последовательностью из PPMV-1 (остатки 1-502), N-терминальные кодирующие последовательности из HN NDV (остатки 1-45 аминокислотной последовательности) гибридизировали с HN (остатки 46-577) при помощи ПЦП с перекрывающимися праймерами с применением набора GeneArt (Invitrogen). Амплифицированный фрагмент разрезали и клонировали в кДНК NDV, разрезанную с помощью PmlI-AgeI. F или HN вируса парагриппа 5 (PIV-5) вводили в антигеномную кДНК NDV 73T посредством аналогичной стратегии клонирования. Эктодомен F PIV5 (остатки 1-486) сливали с трансмембранной частью и цитоплазматическим концевым сегментом F NDV 73T (остатки 503-553). HN NDV (остатки 1-45) соединяли с эктодомом HN PIV5 (остатки 36-565). Фрагмент кДНК клонировали в антигеномную кДНК NDV, разрезанную с помощью PmlI-AgeI.

Выделение рекомбинантного NDV за счет трансфицированных плазмид с кДНК

Линию клеток млекопитающих, экспрессирующих РНК-полимеразу T7, таких как клетки BHK-T7, трансфицировали тремя плазмидами, экспрессирующими белки NP, P и L NDV (0,4, 0,4 и 0,2 мкг на лунку 6-луночной чашки соответственно), и плазмидой, кодирующей антигеномную кДНК NDV (1,6 мкг), с применением Lipofectamine 2000. Через три дня после трансфекции надосадочную жидкость клеточной культуры вводили в аллантаисные полости 10-11-дневных SPF оплодотворенных куриных яиц или пассировали в клетках Vero для амплификации спасенного вируса. Выделение вируса подтверждали с помощью анализа гемагглютинации с применением 1% эритроцитов цыпленка (RBC). Спасение вирусов также можно осуществлять с помощью электропорации плазмид с NP, P, L, антигеномной кДНК вместе с плазмидой, экспрессирующей РНК-полимеразу T7, в клетки Vero, как описано ранее (Kaur et al., Optimization of plasmid-only rescue of highly attenuated and temperature-sensitive respiratory syncytial virus (RSV) vaccine candidates for human trials. 2008 J. Virol. Methods 153:196-202). Выделенный вирус подтверждали с помощью секвенирования кДНК, амплифицированной с помощью RT-PCR.

Пассирование in vitro для отбора вируса со стабильным сайтом расщепления F-белка

Для проверки того, была ли стабильной последовательность расщепления F-белка (FPCS) и можно ли было отбирать какие-либо стабилизирующие мутации после пассирования в клеточной культуре, r73T-S116 подвергали 10 серийным пассажам в клетках Vero и фибросаркомы человека HT1080 при MOI, составляющей 0,01. Через каждые 2-3 пассажа вирусную РНК выделяли из культуральной среды, кДНК амплифицировали с помощью RT-PCR и гены F и/или HN секвенировали.

Морфология вирусных бляшек в клетках Vero и количественное определение титра с помощью анализа бляшкообразования

Клетки Vero в 6-луночной планшете заражали серийно разведенным вирусом и инкубировали под покрытием из 1% метилцеллюлозы при 37°C в течение 3 дней или 6 дней для исследования морфологии бляшек в присутствии трипсина (TrypLE™, Invitrogen) для количественного определения вирусного титра. Клеточные монослои фиксировали метанолом и окрашивали куриным поликлональным антителом к NDV, выработанным против цельного инактивированного NDV, с последующим воздействием конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела к курице (Dako).

Проверка патогенности вируса для кур с помощью анализов среднего времени гибели в яйцах (MDT) и индекса внутримозговой патогенности (ICPI)

Патогенность вирусов r73T определяли путем определения среднего времени гибели (MDT) в 10-дневных SPF оплодотворенных куриных яйцах. Тест ICPI на 1-дневных SPF цыплятах проводили в лаборатории Национальной ветеринарной службы Министерства сельского хозяйства США (NVSL, Эймс, Айова). Для теста MDT 0,1 мл из серии 10-кратных разведений от 10^{-6} до 10^{-9} инокулировали в аллантаисные полости 8-10 из 9-10-дневных яиц на разведение и инкубировали при 37°C. Яйца проверяли дважды в день в течение 7 дней для регистрации времени гибели эмбриона. MDT рассчитывали как среднее время (ч) для минимальной летальной дозы вируса, которая убивает все инокулированные эмбрионы.

Анализ MDT дает обоснованную предварительную оценку патогенности вируса. Вирусы с MDT<60 ч представляют собой нормальные вегетативные (вирулентные) штаммы; с MDT=60-90 ч - мезогенные (промежуточные) штаммы; >90 ч - лентогенные (авирулентные) штаммы. Для теста ICPI по 0,05 мл 1:10 разведения свежей инфекционной аллантоисной жидкости для каждого вируса инокулировали в группу из 10 1-дневных SPF цыплят посредством внутримозгового пути введения. Птиц обследовали в отношении клинических симптомов и смертности через каждые 8 ч в течение периода 8 дней. При каждом обследовании птицам присваивали следующие баллы: 0, если нормальная, 1, если больная, и 2, если погибшая. ICPI представляет собой среднее значение балла на птицу на наблюдение в течение 8-дневного периода. Значения ICPI находились в диапазоне от 0,0 до 2,0. Низковирулентные (LoND): ICPI<0,7; вирулентные (vND): ICPI>0,7.

Цитолиз клеток под действием вируса оценивали при помощи анализа жизнеспособности клеток

Клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчета 5×10^3 клеток/луночку на одну ночь, заражали r73T при различной MOI. Жизнеспособность клеток определяли с помощью набора CellTiter Glo (Promega) согласно руководству производителя. Относительный процент выживших клеток определяют с помощью сравнения уровня АТФ каждого тестируемого образца с необработанным контрольным образцом со 100% жизнеспособностью. Данные, представленные в таблице, относятся к относительному проценту погибших клеток.

Эффект NDV в отношении цитолиза опухоли оценивали на модели подкожного ксенотрансплантата HT1080

Бестимусным гомогенным по NCR "голым" мышам (Taconic) имплантировали подкожно (s.c.) 5×10^6 клеток HT1080 (в 100 мкл PBS) в один бок. Обработку вирусом начинали, когда опухоли достигали объема 65-300 мм³. Рекомбинантный 73T в 100 мкл вводили с различными уровнями дозы либо местно с помощью инъекции внутрь опухоли (i.t), либо системно с помощью инъекции внутрь опухоли (i.t) в хвостовую вену, соответственно. Контрольным животным инъецировали только 100 мкл PBS. Рост опухоли измеряли с применением цифрового штангенциркуля, и объем опухоли рассчитывали как $0,5 \times (\text{высота}) \times (\text{ширина}) \times (\text{длина})$ (мм³). Мышей умерщвляли, когда масса тела снижалась на 20% по сравнению с исходной массой тела или объем опухоли превышал 2000 мм³.

Биораспределение вируса в мышах с ксенотрансплантатом HT1080

Девяти "голым" мышам, несущим подкожные опухоли из ксенотрансплантата фибросаркомы человека HT1080, i.v инъецировали 10^8 БОЕ r73T-R116i-hGM-CSF. По три мыши умерщвляли в 1, 4 и 8 дни после инъекции. Одну мышь, которой инъецировали PBS, умерщвляли в день 8. Собирали опухоли, легкие, селезенку, яичники и образцы плазмы крови. Титр инфекционного вируса в гомогенатах тканей количественно оценивали с помощью анализа бляшкообразования.

Количественная оценка уровня белка GM-CSF с помощью ELISA

Опухоли от зараженных NDV мышей и мышей, которым инъецировали PBS, гомогенизировали в PBS с применением gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec) согласно инструкциям производителя. Надосадочную жидкость от гомогенизированных тканей или сыворотки крови, собранной от мышей, тестировали в отношении уровня GM-CSF с помощью набора для ELISA DuoSet (R&D).

Статистический анализ

Все статистические анализы осуществляли с применением программного обеспечения GraphPad Prism 6.0. t-критерий для независимых выборок применяли для оценки отличий в регрессе опухоли между группами. Программное обеспечение GraphPad Prism также использовали для расчета IC50 rNDV 73T в отношении in vitro цитолиза клеток на нормальных и опухолевых клетках.

Другие варианты осуществления

Из вышеприведенного описания будет очевидным, что в настоящее изобретение, описанное в данном документе, можно вносить вариации и модификации для внедрения его в различные способы использования и условия. Такие варианты осуществления также находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

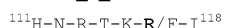
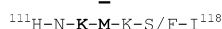
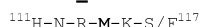
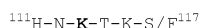
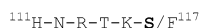
Изложение перечня элементов в любом определении переменной в данном документе включает определения такой переменной в качестве любого отдельного элемента или комбинации (или подкомбинации) приведенных элементов. Изложение варианта осуществления в данном документе включает такой вариант осуществления в качестве любого отдельного варианта осуществления или в комбинации с любыми другими вариантами осуществления или их частями.

Все патенты, публикации, CAS и номера доступа, упоминаемые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный патент, публикация и номер доступа был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни (NDV) штамма 73T для лечения неоплазии, в котором сайт расщепления F-белка (FPCS) дикого типа, имеющий аминокислотную последовательность

$^{111}\text{G-R-R-Q-K-R/F}^{117}$ (где указанные аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с аминокислотной последовательностью F-белка дикого типа), модифицирован так, что имеет последовательность, выбранную из



2. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.1, где указанный модифицированный FPCS имеет последовательность $^{111}\text{H-N-R-T-K-R/F-I}^{118}$.

3. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.1 или 2, содержащий увеличенную межгенную область HN-L, включающую некодирующую последовательность длиной по меньшей мере 50-300 нуклеотидов, где указанная межгенная область HN-L расположена так, как показано на фиг. 1.

4. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.3, где указанная некодирующая последовательность получена из парамиксовируса 1 типа (APMV-1) или респираторного синцитиального вируса (RSV).

5. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.3 или 4, где указанная некодирующая последовательность имеет длину 60, 102, 144, 198 или 318 нуклеотидов.

6. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по любому из пп.1-5, содержащий одну или несколько гетерологичных полинуклеотидных последовательностей, вставленных в участок соединения Р-М, где указанный участок соединения Р-М расположен так, как показано на фиг. 1.

7. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.6, где указанная гетерологичная полинуклеотидная последовательность представляет собой трансген, кодирующий полипептид, который улучшает онколитические свойства вируса.

8. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.7, где указанный трансген кодирует цитокин, лиганд клеточной поверхности и/или хемокин.

9. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.8, где указанный цитокин выбран из GM-CSF, IL-2, IL-21, IL-15, IL-12 и IL-12p70.

10. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.9, где указанный цитокин представляет собой человеческий GM-CSF.

11. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.10, где указанный модифицированный FPCS имеет последовательность $^{111}\text{H-N-R-T-K-R/F-I}^{118}$, некодирующая последовательность имеет длину 50-300 нуклеотидов.

12. Аттенуированный вирус ньюкаслской болезни по п.11, где некодирующая последовательность имеет длину 198 нуклеотидов.

13. Способ селективного цитолиза опухолевых клеток, включающий приведение опухолевой клетки в контакт с аттенуированным вирусом ньюкаслской болезни по любому из пп.1-12.

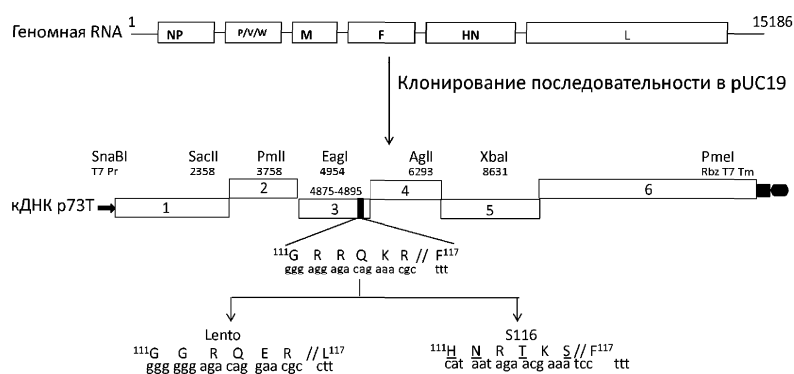
14. Способ индуцирования регресса опухоли у субъекта, включающий приведение опухолевой клетки в контакт с аттенуированным вирусом ньюкаслской болезни по любому из пп.1-12.

15. Способ по п.13 или 14, где аттенуированный вирус ньюкаслской болезни представляет собой вирус по п.11 или 12.

16. Способ по любому из пп.13-15, где указанная клетка представляет собой раковую клетку, выбранную из клеток рака мочевого пузыря, яичника, головного мозга, поджелудочной железы, предстательной железы, саркомы, легкого, молочной железы, шейки матки, кости, печени, головы и шеи, желудка, почки, лимфомы, щитовидной железы, толстой кишки, прямой и ободочной кишки, клеток лейкоза и меланомы.

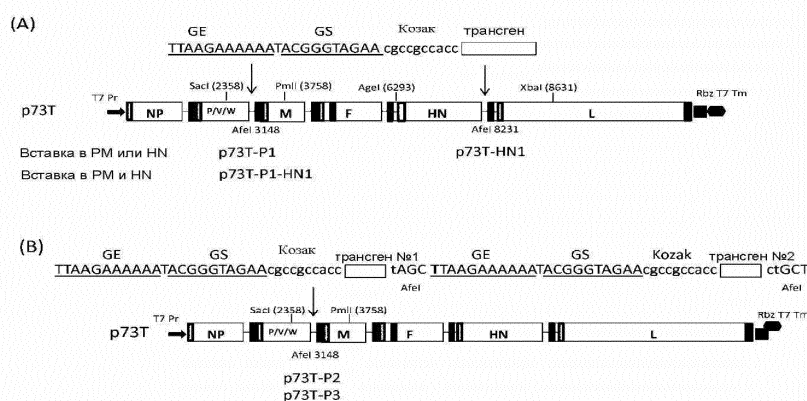
17. Способ по любому из пп.13-16, где приведение опухолевой клетки в контакт с аттенуированным вирусом ньюкаслской болезни осуществляют путем его введения системно, предпочтительно внутривенно, или внутрь опухоли.

Структура антигенной кДНК NDV 73T



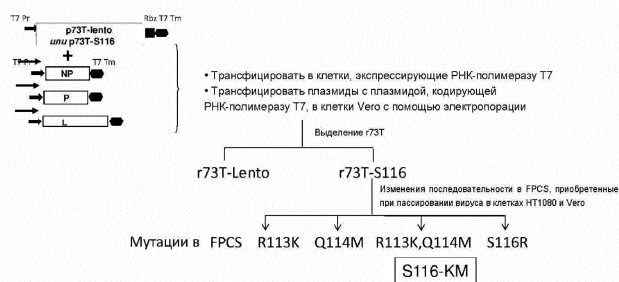
Фиг. 1

Вставка трансгенной кассеты(кассет) в геном NDV 73T



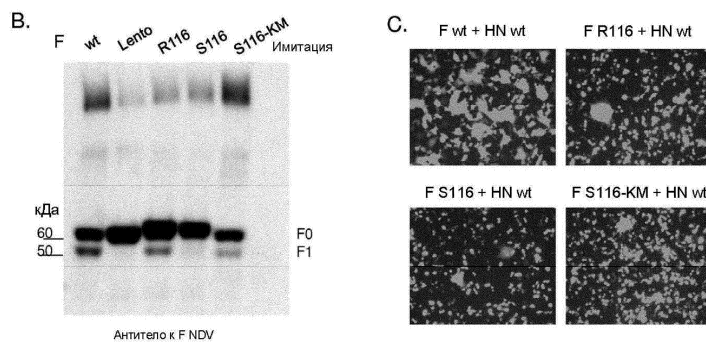
Фиг. 2

Способ выделения инфекционного рекомбинантного штамма NDV 73T (r73T) с модифицированным FPCS



Фиг. 3А

Оценка расщепления F-белка и активности слияния in vitro



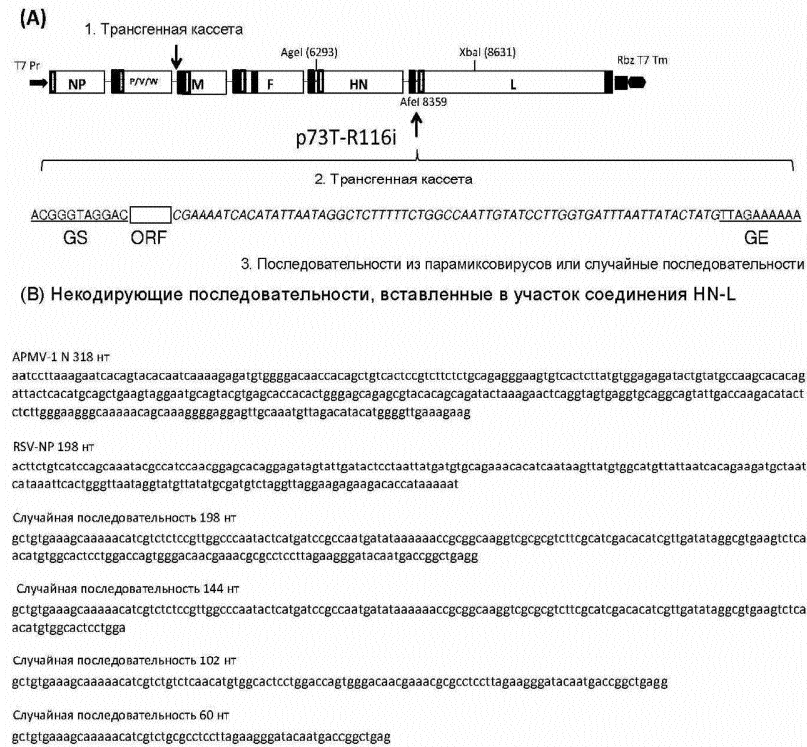
Фиг. 3В и С

Сводная таблица характеристик r73T-lento и производных r73T-S116

Название вируса (r73T) ^a	Последовательность FPCS ^b	Образование бляшек ^c	MDT (ч) ^d	ICPI ^e	Относительный цитопатический эффект клеток HT1080	Vero (pfu/мл) ^g	Яйца (pfu/мл) ^h
-lento	¹¹¹ G-G-R-Q-E-R/L- I ¹¹⁸		> 156	0,00	13	7,5E+03	5,7E+08
-S116	¹¹¹ H-N-R-T-K-S/F-I ¹¹⁸		> 156	0,00	31	4,4E+06	4,6E+08
-S116K113	¹¹¹ H-N-K-T-K-S/F-I ¹¹⁸		> 156	ND	29	3,4E+06	3,8E+08
-S116M114	¹¹¹ H-N-R-M-K-S/F-I ¹¹⁸		> 156	ND	31	3,6E+06	3,4E+08
-S116K113M114 (S116-KM)	¹¹¹ H-N-K-M-K-S/F-I ¹¹⁸		> 156	0,00	48	2,4E+06	4,2E+08
-R116	¹¹¹ H-N-R-T-K-F/I ¹¹⁸		66	0,00	80	6,2E+06	1,7E+08

Фиг. 4

Стратегии аттенуации вирулентности вируса r73T-R116 для кур



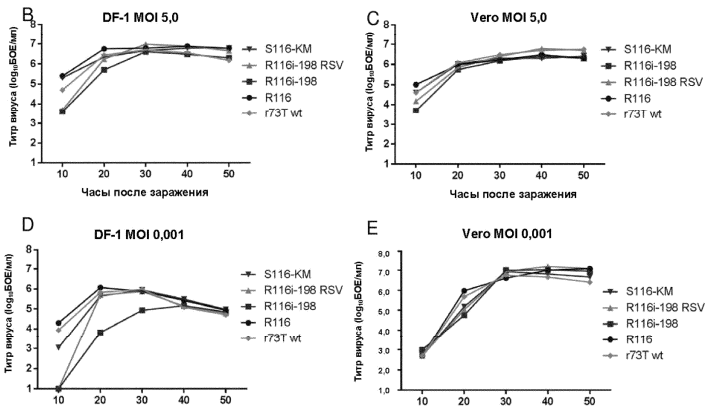
Фиг. 5

Сводная таблица характеристик производных r73T-R116

Название вируса (r73T-R116i) ^a	Вставка в HN-L ^b	Образование бляшек ^c	MDT (ч) ^d	ICPI ^e	Относи- тельный цитоплиз клеток ^f	Vero (БОЕ/мл) ^g	Яйца (БОЕ/мл) ^h
R116i	отсутствует		62	0,65	80	6,3E+06	2,0E+08
318 APMV	APMV-N 318 нт		>156	0,27	80	9,9E+06	5,0E+07
198 RSV	RSV-NP 198 нт		>156	0,0375	86	6,4E+06	6,0E+07
198	Случайная 198 нт		>156	0	85	7,7E+06	5,0E+07
144	Случайная 144 нт		79	0,74	82	7,3E+06	2,4E+08
102	Случайная 102 нт		64	0,51	83	6,4E+06	1,1E+08
60	Случайная 60 нт		64	0,78	75	6,5E+06	1,3E+08
GFP	генная кассета EGFP		86	0,82	87	5,7E+06	1,5E+08

Фиг. 6А

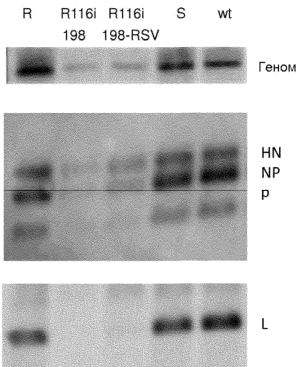
Вирус r73T-R116i проявляет более медленную кинетику роста на клетках DF-1 по сравнению с клетками Vero



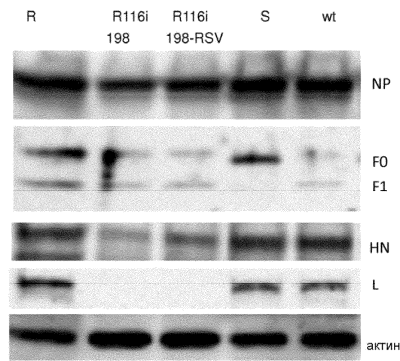
Фиг. 6В-Е

Экспрессия генов r73T-R116i снижена в клетках-фибробластах курицы DF-1

Ф. Синтез РНК

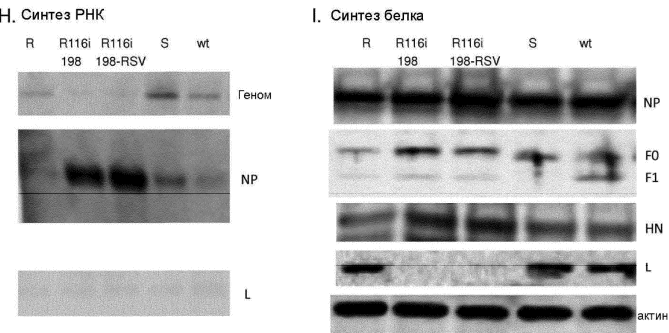


Г. Синтез белка



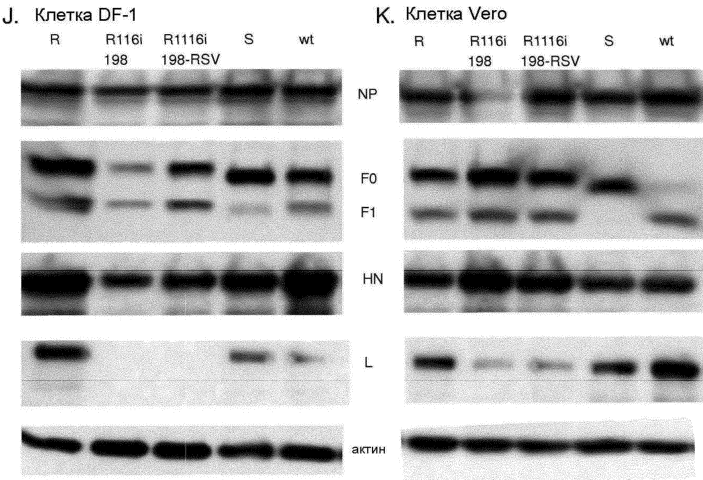
Фиг. 6F и G

Экспрессия генов выше вставки HN-L подвергается повышающей регуляции, тогда как экспрессия генов ниже подвергается понижающей регуляции в клетках Vero, зараженных вирусом r73T-R116i



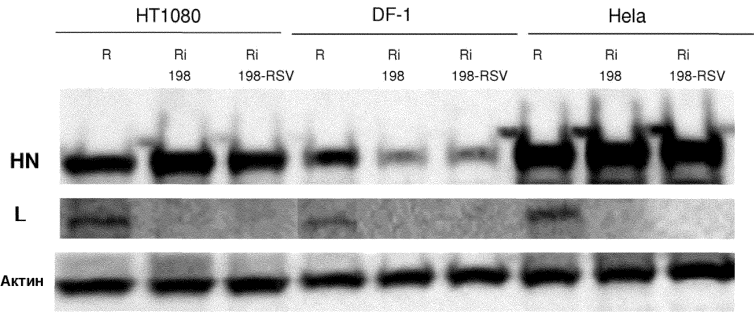
Фиг. 6Н и И

На экспрессию генов в клетках DF-1 и Vero влияет вставка в участок соединения HN-L



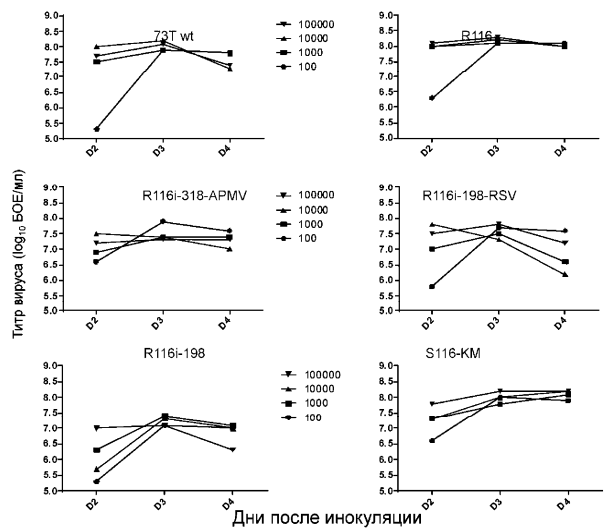
Фиг. 6Ж и З

Экспрессия расположенных выше генов подвергается повышающей регуляции в человеческих клетках, зараженных r73T-R116i



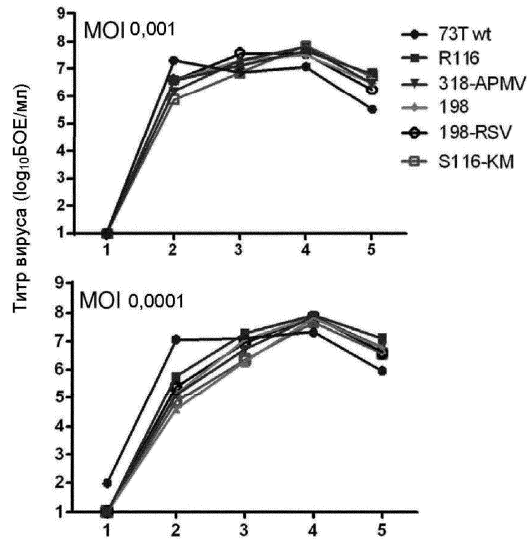
Фиг. 6Л

Кинетика роста вирусов г73Т в оплодотворенных куриных яйцах



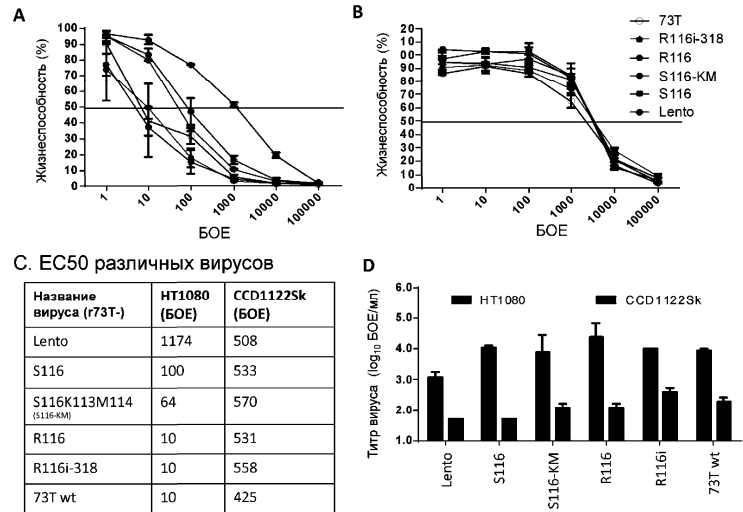
Фиг. 7

Кинетика роста вирусов г73Т в клетках Vero



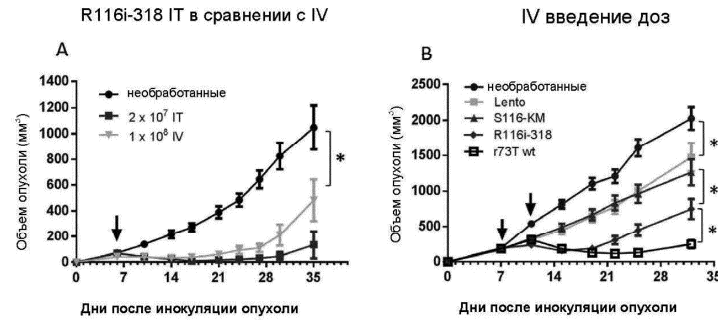
Фиг. 8

Селективная репликация и цитотоксичность вируса г73Т на опухолевых клетках

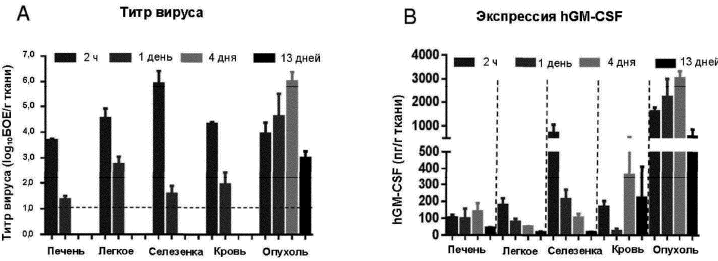


Фиг. 9

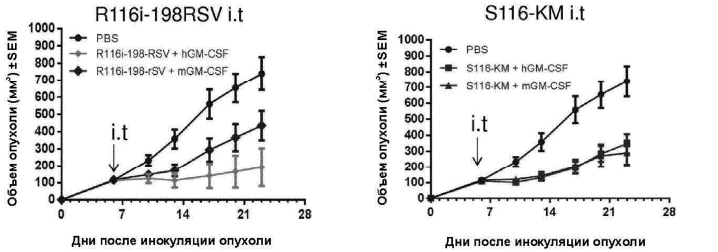
Производные г73Т являются эффективными в регрессии опухоли после местного и системного введения



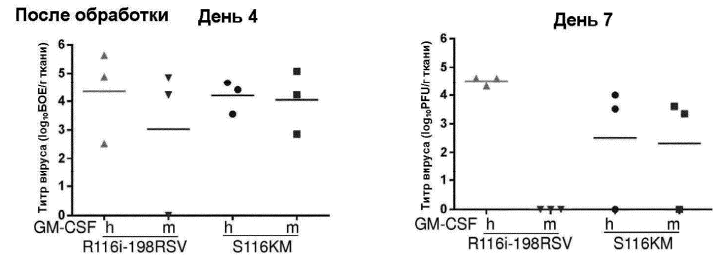
г73Т-R116i-hGM-CSF селективно реплицируется в опухолях после однократного IV введения



Эффект мышинного GM-CSF на ингибирование роста опухоли при IV и IT на модели HT1080



Экспрессия мышинного GM-CSF ускоряла клиренс вируса из опухолей

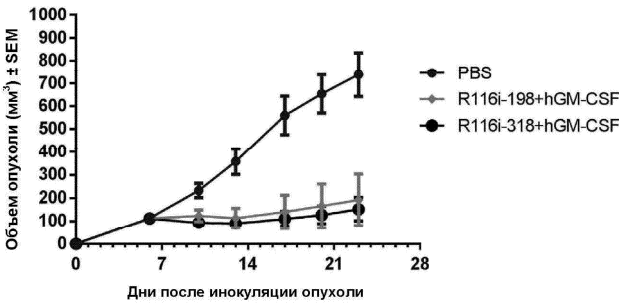


Обработка rNDV вызывает повышающую регуляцию цитокинов и хемокинов в опухолевых тканях

Цитокин/хемокин в день 4 после обработки	Кратное изменение относительно группы PBS			
	R		S	
	hGM-CSF	mGM-CSF	hGM-CSF	mGM-CSF
mGM-CSF	1,3	106,7	2,4	9,9
MIG (CXCL9)	3,9	3,1	5,3	4,9
IFN- β	51	28	8	12
IFN- γ	6,9	2,7	6	2,4
IL-6	13,2	5,5	6,6	2,7
IL-10	5,7	2,8	0,5	2
MIP-1a (CCL3)	37,9	13,4	15,6	4,4
IL-12	2,9	2,5	2,4	2,3
MCP-1(CCL2)	8,4	9,5	8,9	5
TNF- α	5,2	4,7	3,6	3,7
IP-10 (CXCL10)	8,5	6,6	12,5	6,5
RANTES (CCL5)	24,5	21,2	35,9	10,1

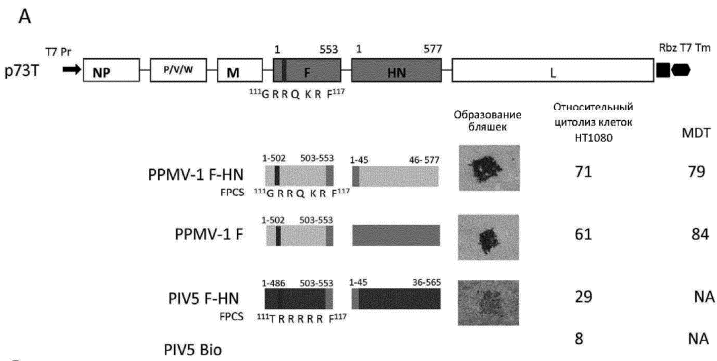
Фиг. 11F

R116i-318 и -198 являются сравнимыми в отношении ингибирования роста опухоли



Фиг. 11G

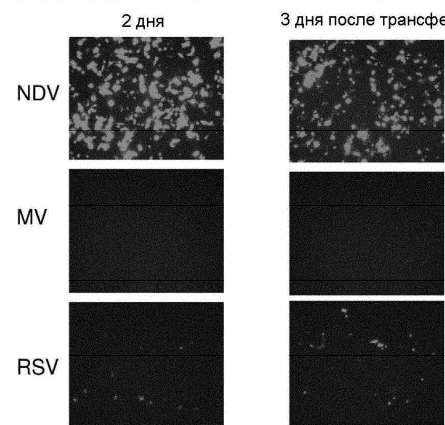
Структура антигенной кДНК 73Т, содержащей химерный ген F и/или HN



Vero без трипсина	Распро- странение в клетках	Ген F	Ген HN	Рост в яйцах (БОЕ/мл)	Рост в Vero без трипсина (БОЕ/мл)
	+++	PIV5 NDV	PIV5 NDV	Отсутствует	6,0 x 10 ⁶
	++++	PPMV-1 NDV	NDV	2,4 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶
	+++	PPMV-1 NDV	PPMV-1 NDV	2,7 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶

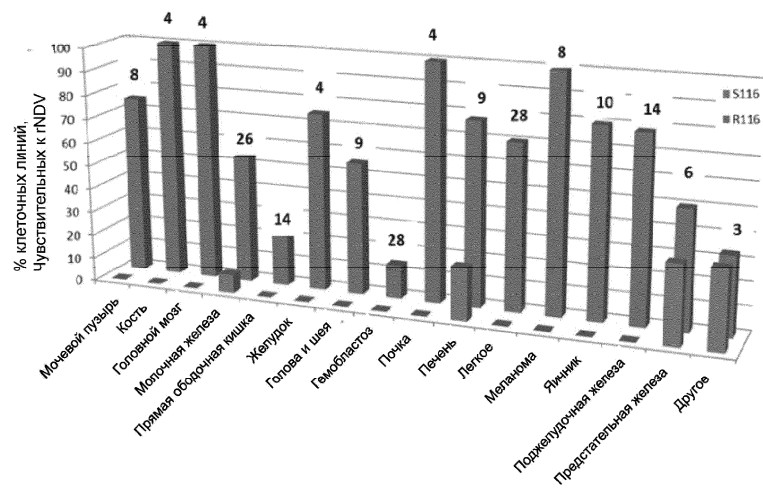
Фиг. 12А и В

Сравнение функции комплекса РНК-полимеразы с помощью анализа минигенома

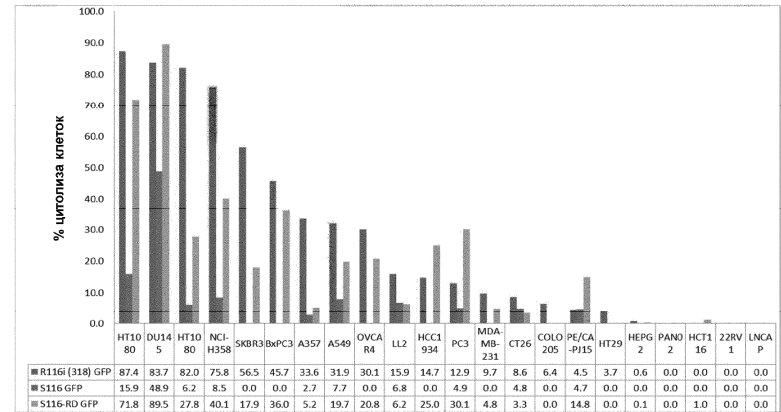


Фиг. 12С

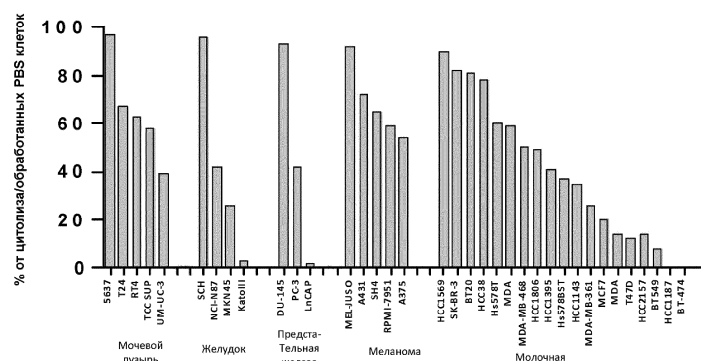
Чувствительность линий раковых клеток к вариантам rNDV



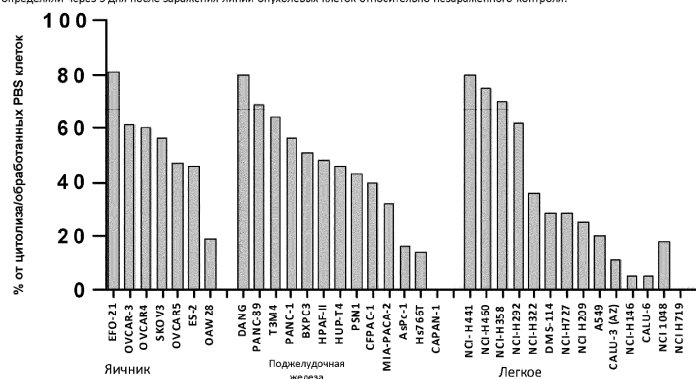
Фиг. 13А



Фиг. 13В

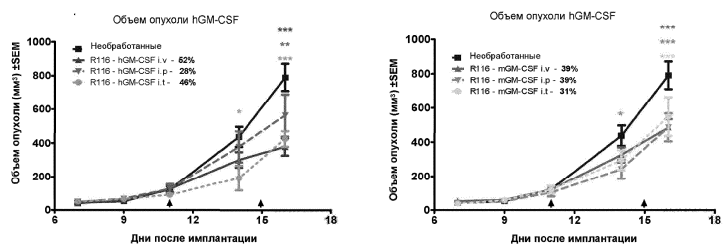
Чувствительность линий раковых клеток к recNDV^{GM-CSF}

Пояснения к фигуре: цитопатический эффект вариантов R116i rNDV (экспрессирующих GM-CSF). Максимальный процент цитолиза определяли через 3 дня после заражения линий опухолевых клеток относительно неза зараженного контроля.

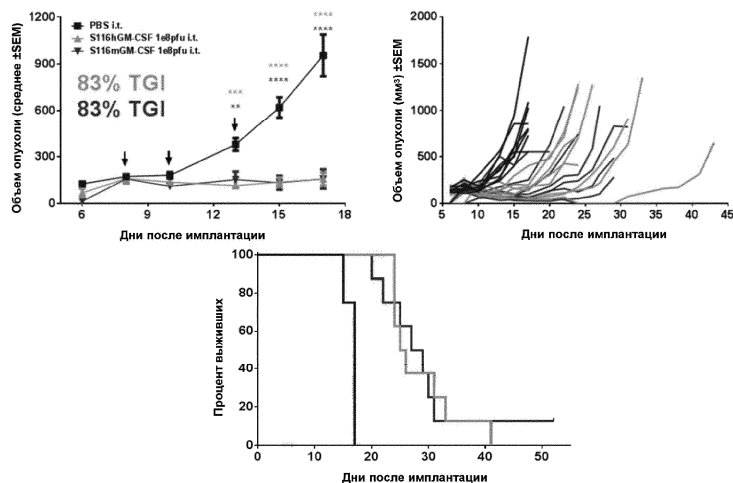


Пояснения к фигуре: цитопатический эффект вариантов R116i rNDV (экспрессирующих GM-CSF). Максимальный процент цитолиза определяли через 3 дня после заражения линий опухолевых клеток относительно неза зараженного контроля.

Фиг. 14

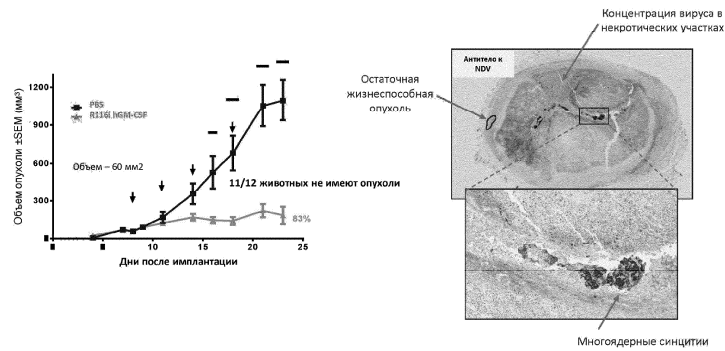
Ингибирование роста опухоли на изогенной мышиной модели меланомы (B16F10 AP3) с помощью recNDV^{GM-CSF}

Фиг. 15A

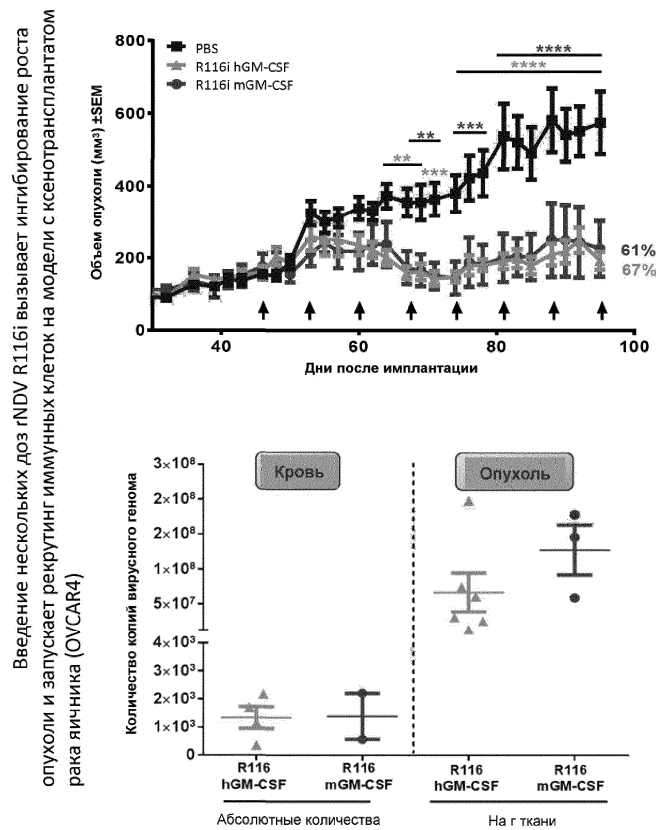


Фиг. 15B

NDV характеризуется сильной противоопухолевой активностью на иммунокомпетентной мышинной модели опухоли толстой и прямой кишки СТ26

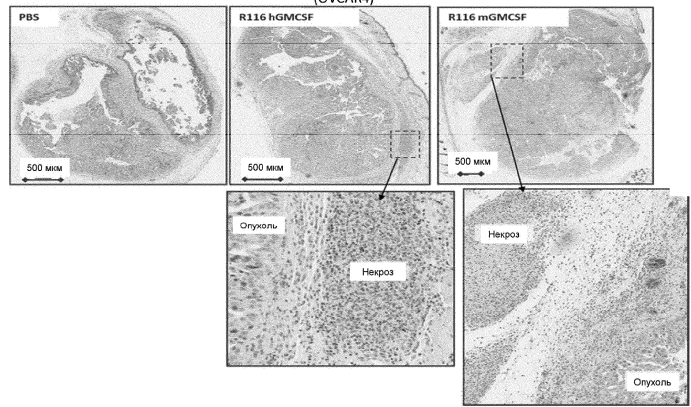


Фиг. 15C



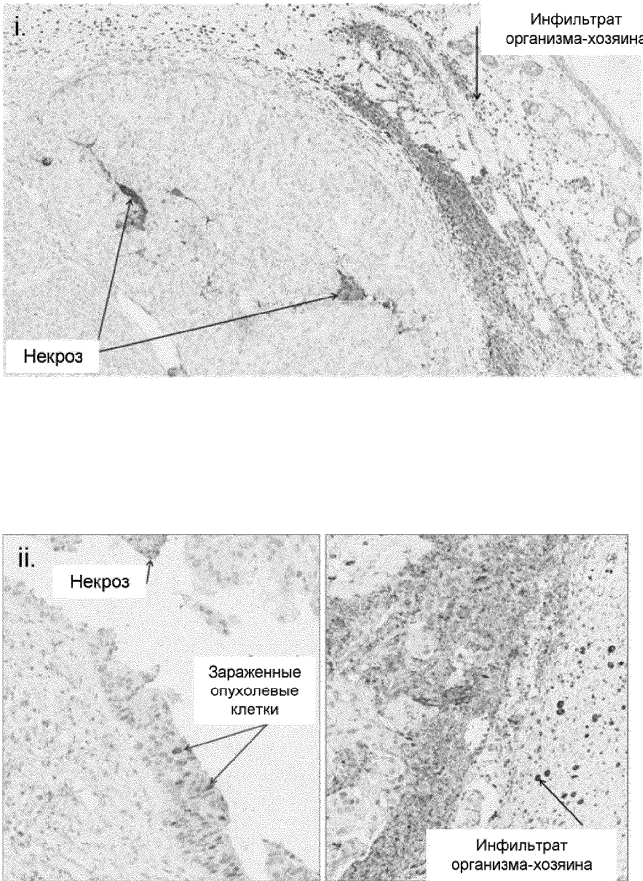
Фиг. 15D

Введение нескольких доз rNDV R116i вызывает ингибирование роста опухоли и запускает рекрутинг иммунных клеток на модели с ксенотрансплантатом рака яичника (OVCAR4)



Фиг. 15E

Введение нескольких доз гNDV R116i вызывает ингибирование роста опухоли и запускает рекрутинг иммунных клеток на модели с ксенотрансплантатом рака яичника (OVCAR4)



Фиг. 15F

Сводная таблица конструкций NDV

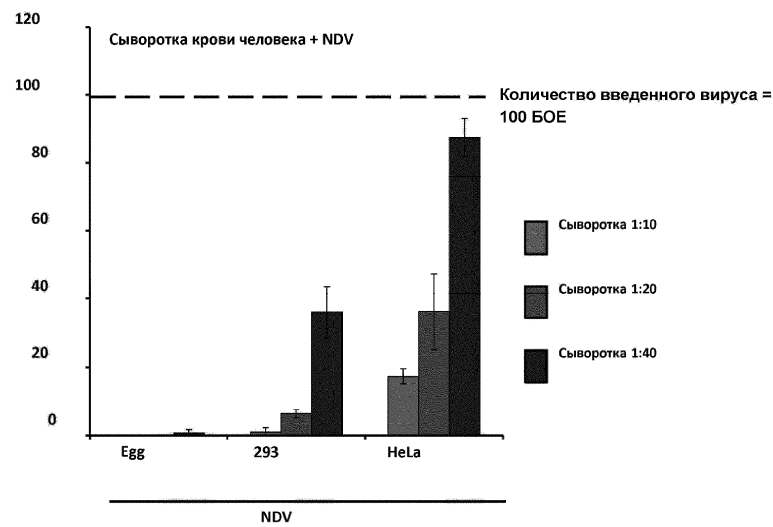
FPCS (R-R-Q-K-R ¹¹⁶ /F)	Бляшки на Vero (без трипсина)	Трансген	Цитолиз HT1080 (%) за 72h	ICPI	Комментарии
Lento (G-R-Q-E-R/L)		hGM-CSF	20	0.0	Репликация зависит от трипсина
S116 (N-R-T-K-S/F)		отсутствует	60	0.0	Не нуждается в трипсине для вступления в репликацию Более крупные бляшки
		hGM-CSF	40	0.075	
R116 (N-R-T-K-R/F)		отсутствует	80	tbd	Большие бляшки, более эффективный цитолиз клеток
		hGM-CSF	80	0.65	
S116K113M114 (N-K-M-K-S/F)		hGM-CSF	48	0.00	Большие бляшки, умеренно эффективный цитолиз клеток

R116-HN/L(318nt) (N-R-T-K-R/F)		hGM-CSF	80	0.05 - 0.27	2 локуса контролируют <i>alt</i> расщепления F и межгенное удлинение вируса
R116-HN/L(198nt) (N-R-T-K-R/F)		hGM-CSF	86	0.0375	

Все штаммы имеют титры 8-9log₁₀PFU/мл в яйцах и -7,0log₁₀PFU/ml в клетках Vero с сайтом расщепления lento: 3 log₁₀PFU/мл в Vero

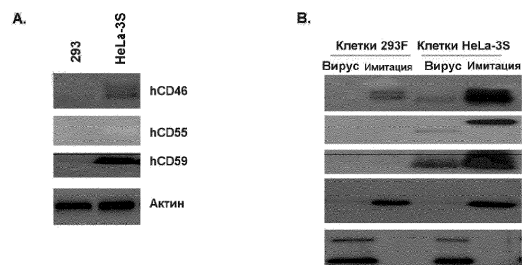
Фиг. 16

NDV, полученный в клетках Hela, менее чувствительный к опосредованной С инаktivации

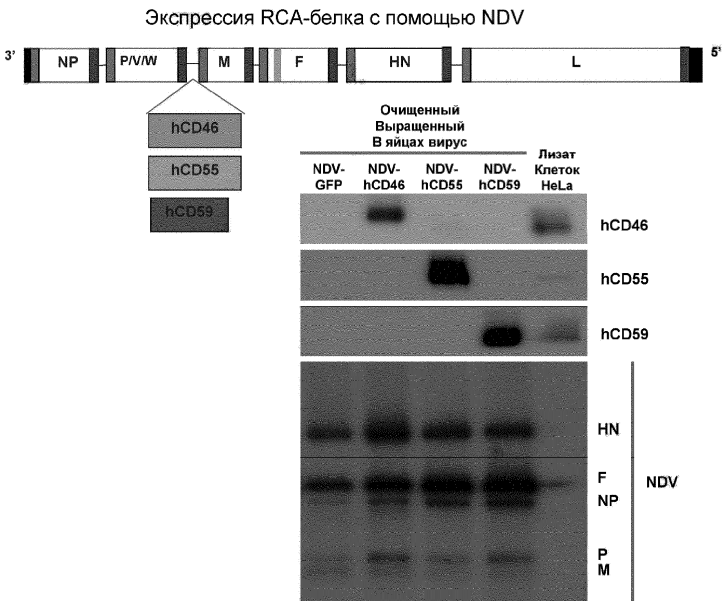


Фиг. 17

Клетки HeLa-3S экспрессируют более высокие уровни RCA-белков, чем клетки 293

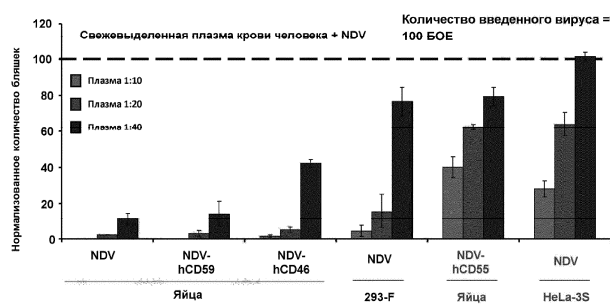


Фиг. 18



Фиг. 19

CD55 является ключевым RCA-белком для предотвращения опосредованной C' инaktivации NDV



Фиг. 20

