

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040268**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.05.16**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201800148**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.08.11**

---

**(54) ОСПЕННАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

---

**(31)** 62/203,835; 62/216,292; 62/317,226

**(32)** 2015.08.11; 2015.09.09; 2016.04.01

**(33)** US

**(43)** 2019.01.31

**(86)** PCT/US2016/046647

**(87)** WO 2017/027757 2017.02.16

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**КАЛИДИ БИОТЕРАПЬЮТИКС,  
ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Сзалай Аладар, Минев Борис (US)**

**(74)** Представитель:  
**Стояченко И.Л. (RU)**

**(56)** AHMED JAHANGIR ET AL.: "The Lister Strain of Vaccinia Virus as an Anticancer Therapeutic Agent", GENE THERAPY OF CANCER: TRANSLATIONAL APPROACHES FROM PRECLINICAL STUDIES TO CLINICAL IMPLEMENTATION, 3RD EDITION ELSEVIER ACADEMIC PRESS INC, 525 B STREET, SUITE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495 USA, 2014, pages 225-238, XP055323186, page 228, left-hand column, last paragraph - right-hand column, page 229, right-hand column, last paragraph, page 234, right-hand column, paragraph 2

ZEH HERBERT J. ET AL.: "First-in-man study of western reserve strain oncolytic vaccinia virus: safety, systemic spread, and antitumor activity.", MOLECULAR THERAPY: THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY JAN 2015, vol. 23, no. 1, January 2015 (2015-01), pages 202-214, XP002764670, ISSN: 1525-0024, page 210, right-hand column, paragraph 2 - left-hand column, paragraph top

THORNE S. H. ET AL.: "Vaccinia virus and oncolytic virotherapy of cancer", CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS 200508 GB, vol. 7, no. 4, August 2005 (2005-08), pages 359-365, XP008075687, ISSN: 1464-8431 page 362, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph top, page 363, left-hand column, paragraph 2

MUNGUIA A. ET AL.: "Cell carriers to deliver oncolytic viruses to sites of myeloma tumor growth", GENE THERAPY 200805 GB, vol. 15, no. 10, May 2008 (2008-05), pages 797-806, XP002764671, ISSN: 0969-7128, page 800, right-hand column, paragraph 3

---

**(57)** В изобретении раскрыты способы и композиции, относящиеся к терапии рака. Более конкретно, раскрытые способы и композиции относятся к применению осповакцины для индукции эффективного противоопухолевого иммунного ответа.

---

**B1**

**040268**

**040268**

**B1**

### **Перекрестные ссылки на родственные заявки**

Данная заявка претендует на приоритет предварительной заявки США номер 62/203835, поданной 11 августа 2015, предварительной заявки США номер 62/216292, поданной 9 сентября 2015 и предварительной заявки США номер 62/317226, поданной 1 апреля 2016, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Предшествующий уровень техники**

Рак является второй по распространенности причиной смерти в Соединенных Штатах, уступая только сердечно-сосудистым заболеваниям. В Соединенных Штатах рак становится причиной каждой четвертой смерти. Показатель относительной 5-летней выживаемости для всех пациентов, у которых в 1996-2003 гг. диагностировали рак, составил 66% по сравнению с 50% в 1975-1977 гг. (Cancer Facts & Figures American Cancer Society: Atlanta, GA (2008)). Создание высокоэффективных методов лечения рака является основной целью исследований рака.

### **Сущность изобретения**

В настоящем документе раскрыты способы и композиции для лечения солидной опухоли или гематологических злокачественных опухолей у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения пролиферативного заболевания (например, солидная опухоль или гематологическая злокачественная опухоль) у субъекта, включающий введение субъекту оспенной вакцины. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина представляет собой компетентный по репликации вирус. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина не содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину вводят путем внутриопухолевой, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной или внутриглазной инъекции. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина представляет собой ослабленный штамм вируса осповакцины из Департамента здравоохранения Нью-Йорка (New York City Board of Health (NYCBOH)). В некоторых вариантах осуществления штамм вируса осповакцины NYCBOH может представлять собой ATCC VR-118 или CJ-MVB-SPX. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина выбрана из Dryvax, ACAM1000, ACAM2000, Lister, EM63, LIVP, Tian Tan, Copenhagen, Western Reserve или модифицированной вакцины вируса Анкара (MVA). В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль выбрана из глиобластомы, карциномы молочной железы, карциномы легких, карциномы предстательной железы, карциномы толстой кишки, карциномы яичника, нейробластомы, опухоли центральной нервной системы или меланомы. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент детского возраста. В некоторых вариантах осуществления пролиферативное заболевание представляет собой детскую или педиатрическую опухоль или рак.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту оспенной вакцины одновременно со стволовой клеткой. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой аутологичную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из стволовых клеток взрослых, эмбриональных стволовых клеток, фетальных стволовых клеток, мезенхимальных стволовых клеток, нейтральных стволовых клеток, тотипотентных стволовых клеток, плюрипотентных стволовых клеток, мультипотентных стволовых клеток, олигопотентных стволовых клеток, унипотентных стволовых клеток, адипозных стромальных клеток, эндотелиальных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, стволовых клеток костного мозга, стволовых клеток из пуповинной крови, стволовых клеток периферической крови взрослых, миобластных стволовых клеток, малых ювенильных стволовых клеток, стволовых клеток фибробластов кожи и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой адипозную стромальную клетку.

В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой модифицированную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка представляет собой стволовую клетку взрослых. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка трансформирована лентивирусом или ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка временно трансфицирована искусственной хромосомой, ДНК вируса или плазмидной ДНК. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина не содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину вводят путем внутриопухолевой, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой внутрисуставной или внутриглазной инъекции. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина представляет собой ослабленный штамм вируса осповакцины из Департамента здравоохранения Нью-Йорка (New York City Board of Health (NYCBOH)). В некоторых вариантах осуществления штамм вируса осповакцины NYCBOH может представлять собой ATCC VR-118 или CJ-MVB-SPX. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина выбрана из Dryvax, ACAM1000, ACAM2000, Lister, EM63, LIVP, Tian Tan, Copenhagen, Western Reserve или модифицированной вакцины вируса Анкара (MVA). В некоторых вариантах

осуществления солидная опухоль выбрана из глиобластомы, карциномы молочной железы, карциномы легких, карциномы предстательной железы, карциномы толстой кишки, карциномы яичника, нейробластомы, опухоли центральной нервной системы или меланомы. В некоторых вариантах осуществления стволовую клетку и оспенную вакцину вводят субъекту одновременно путем внутриопухолевой, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной или внутриглазной инъекции. В некоторых вариантах осуществления стволовую клетку и оспенную вакцину помещают в один и тот же сосуд перед инъекцией субъекту. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает одновременное введение субъекту генетически сконструированного вируса. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент детского возраста. В некоторых вариантах осуществления пролиферативное заболевание представляет собой детскую или педиатрическую опухоль или рак.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения пролиферативного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту оспенной вакцины одновременно со стромально-васкулярной фракцией адипозного происхождения (SVF). В некоторых вариантах осуществления SVF адипозного происхождения является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления SVF адипозного происхождения вводят субъекту в течение 24 ч после того, как жировая ткань была взята у субъекта. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину вводят путем внутриопухолевой, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной или внутриглазной инъекции. В некоторых вариантах осуществления SVF адипозного происхождения выделяют из субъекта с помощью устройства Time Machine™. В некоторых вариантах осуществления SVF адипозного происхождения выделяют из субъекта, используя канюлю размером от 2,5 до 3 мм. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина представляет собой ослабленный штамм вируса осповакцины из Департамента здравоохранения Нью-Йорка (New York City Board of Health (NYCBOH)). В некоторых вариантах осуществления штамм вируса осповакцины NYCBOH может представлять собой ATCC VR-118 или CJ-MVB-SPX. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина выбрана из Dryvax, ACAM1000, ACAM2000, Lister, EM63, LIVP, Tian Tan, Copenhagen, Western Reserve или модифицированной вакцины вируса Анкара (MVA). В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль выбрана из глиобластомы, карциномы молочной железы, карциномы легких, карциномы предстательной железы, карциномы толстой кишки, карциномы яичника, нейробластомы, опухоли центральной нервной системы или меланомы. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент детского возраста. В некоторых вариантах осуществления пролиферативное заболевание представляет собой детскую или педиатрическую опухоль или рак.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения пролиферативного заболевания, например, солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту оспенной вакцины одновременно с клеткой-носителем. В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой аутологичную клетку из субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой иммунную клетку, выбранную из гранулоцита, тучной клетки, моноцита, дендритной клетки, естественного киллера и лимфоцита. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина и клетка-носитель культивируются вместе *in vitro* перед введением субъекту. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина и клетка-носитель помещаются в один и тот же сосуд перед введением субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент детского возраста. В некоторых вариантах осуществления пролиферативное заболевание представляет собой детскую или педиатрическую опухоль или рак.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта композиция, включающая: (а) оспенную вакцину и (b) стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из стволовых клеток взрослых, эмбриональных стволовых клеток, фетальных стволовых клеток, мезенхимальных стволовых клеток, нейтральных стволовых клеток, тотипотентных стволовых клеток, плюрипотентных стволовых клеток, мультипотентных стволовых клеток, олигопотентных стволовых клеток, унипотентных стволовых клеток, адипозных стромальных клеток, эндотелиальных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, стволовых клеток костного мозга, стволовых клеток из пуповинной крови, стволовых клеток периферической крови взрослых, миобластных стволовых клеток, малых ювенильных стволовых клеток, стволовых клеток фибробластов кожи и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой адипозную стромальную клетку. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой модифицированную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка представляет собой стволовую клетку взрослых. В неко-

торых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка трансформирована лентивирусом или ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка временно трансфицирована искусственной хромосомой, ДНК вируса или плазмидной ДНК. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина не содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает генетически сконструированный вирус.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта композиция, включающая: (а) оспенную вакцину; и (b) иммунную клетку, такую как гранулоцит, тучная клетка, моноцит, дендритная клетка, естественный киллер или лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта композиция, включающая: (а) оспенную вакцину и (b) выделенную стромально-васкулярную фракцию (SVF) жировой ткани.

Дополнительно в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта клетка-хозяин или опухолевая клетка или организм млекопитающих, содержащие любую из композиций, включающую оспенную вакцину и стволовую клетку; или включающую оспенную вакцину и иммунную клетку, выбранную из гранулоцита, тучной клетки, моноцита, дендритной клетки, естественного киллера и лимфоцита; или включающую оспенную вакцину и выделенную стромально-васкулярную фракцию (SVF) жировой ткани.

### **Краткое описание графических материалов**

Комплект материалов патента или заявки содержит по меньшей мере одну фигуру, выполненную в цвете. Копии этого патента или опубликованной заявки на патент с цветной фигурой (цветными фигурами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после оплаты пошлины.

На фиг. 1A и 1B на панели опухолевых клеточных линий человека продемонстрирован онколитический эффект после инфекции штаммами вирусов Listex и ACAM2000 соответственно.

### **Подробное описание**

Несмотря на большие достижения в противоопухолевой терапии за последние 30 лет рак остается основной причиной смерти в мире. В настоящем документе предусмотрены способы и композиции для лечения опухоли, рака или метастазов у субъекта, такого как человек или животное. В частности, в настоящем документе раскрыты способы и композиции для активации собственной иммунной системы организма для борьбы с раком путем введения оспенной вакцины.

### **Определения**

Использованный в настоящем документе термин "субъект" включает любое животное, для которого предусмотрена диагностика, скрининг, мониторинг или лечение. Животные включают млекопитающих, таких как приматы и одомашненные животные. Приматом предпочтительно является человек. Пациент относится к субъекту, такому как млекопитающее, примат, человек или сельскохозяйственное животное, страдающему заболеванием или состоянием или у которого заболевание или состояние должно быть определено или должен быть установлен риск заболевания или состояния.

Использованный в настоящем документе термин "пациент детского возраста" относится к лицам в возрасте 21 года или младше на момент диагностики или лечения. В некоторых вариантах осуществления пациент детского возраста может быть выбран из новорожденного, младенца, ребенка и подростка. Термин "новорожденный" относится к людям от рождения до 38 дня жизни. Термин "младенец" относится к людям в возрасте от 29 дней до двух лет. Термин "ребенок" относится к людям в возрасте от двух лет до 12 лет. Термин "подросток" относится к людям в возрасте от 12 лет до 21 года (включительно, но, не включая двадцать второй день рождения). В некоторых вариантах осуществления пациенту детского возраста больше 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления пациенту детского возраста меньше 18 лет.

Использованный в настоящем документе термин "одновременно" по отношению к введению оспенной вакцины и клетки, относится к введению с интервалом не более 48 ч. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и клетку вводят с интервалом не более 36 ч, с интервалом не более 24 ч, с интервалом не более 12 ч, с интервалом не более 10 ч, с интервалом не более 8 ч, с интервалом не более 6 ч, с интервалом не более 4 ч, с интервалом не более 2 ч, с интервалом не более 1 ч.

Термины "аутологичный", "аутологичная клетка" или "аутологичная трансплантация", использованные в настоящем документе в отношении клеточной трансплантации, указывают на то, что донором и реципиентом клеток является один и тот же индивидуум. Термин "аллогенный", "аллогенная клетка" или "аллогенная трансплантация", использованные в настоящем документе в отношении клеточной трансплантации, указывают на то, что донором и реципиентом клеток являются разные индивидуумы одного и того же вида.

Использованный в настоящем документе термин "жировая ткань" относится к жировой ткани организма, которая представляет собой рыхлую соединительную ткань, состоящую преимущественно из адипоцитов. Помимо адипоцитов жировая ткань содержит стромально-васкулярную фракцию (SVF) кле-

ток, включающих преадипоциты, фибробласты, сосудистые эндотелиальные клетки, множество иммунных клеток, а также регенеративные стволовые клетки.

Использованный в настоящем документе термин "адипозная стволовая клетка" или "стволовая клетка взрослых адипозного происхождения" (ADASC) относится к стволовым клеткам, выделенным из жировой ткани, являющимся плюрипотентными стволовыми клетками, способным дифференцироваться в различные типы клеток. Адипозные стволовые клетки оказались эквивалентными, даже превосходящими стволовые клетки костного мозга с точки зрения потенциала клеточной дифференцировки, ангиогенеза и противовоспалительных эффектов.

Использованный в настоящем документе термин "опухоль" или "опухолевая клетка" относится к любому типу опухоли, включая солидные опухоли или несолитные опухоли, рассеянные опухоли, метастатические или диссеминированные опухоли или опухолевые клетки из любой формы опухоли.

Использованный в настоящем документе термин "вакцина" относится к любому типу биологического препарата, способствующему или вызывающему активный иммунный ответ против конкретного заболевания или патогена. Такой биологический препарат может включать без ограничения антиген, полученный из патогенного агента, или часть антигена, полученную из патогенного агента. Такой биологический препарат также может быть в форме живого ослабленного препарата, в том числе в виде живых или ослабленных или модифицированных болезнетворных агентов или патогенов; или в форме инактивированных или убитых болезнетворных агентов или патогенов. Альтернативные формы такого биологического препарата также включают, без ограничения, формы субъединиц, токсоидов, конъюгатов, ДНК и рекомбинантных векторов или любые подходящие формы, которые могут быть разработаны или могут быть доступны в будущем для активации активного иммунного ответа против них.

Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления, когда в настоящем документе используется термин "вакцина", вакцина не должна обеспечивать сильный иммунный ответ против оспы (или любого другого патогена), при условии, что она эффективна против рака или пролиферативного заболевания, как описано в настоящем документе. Например, вакцина может быть иммуногенной или инфекционной композицией, которая лечит рак. В некоторых случаях термин используется для идентификации некоторых материалов или композиций, и не обязательно означает способность материала или композиции обеспечивать иммунный ответ против оспы, например. В некоторых вариантах осуществления вводимые композиция или материал могут представлять собой вирус, который вызывает иммуногенную реакцию против опухолевой клетки, и/или который вызывает иммуногенную реакцию против оспы. Вирус может представлять собой любой штамм вируса, в том числе, например, один или несколько из перечисленных ниже и в других местах в настоящем документе, включая вирусы, не являющиеся частью одобренных или предполагаемых вакцин. В некоторых вариантах осуществления, например, вирус может представлять собой вирус осповакцины или любой другой тип вируса, описанный в настоящем документе, или имеющий аналогичные характеристики.

Использованный в настоящем документе термин "вирус" относится к любому из большой группы объектов, называемых вирусами. Вирусы, как правило, содержат белковую оболочку, окружающую кольцевой генетический материал - РНК или ДНК, но не полупроницаемую мембрану, и способны к росту и размножению только внутри живых клеток. Вирусы для применения в способах, предусмотренных в настоящем документе, включают поксвирус, аденовирус, вирус простого герпеса, вирус болезни Ньюкасла, вирус везикулярного стоматита, вирус эпидемического паротита, вирус гриппа, вирус кори, реовирус, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), хантавирус, вирус миксомы, цитомегаловирус (ЦМВ), лентивирус и любой вирус растений или насекомых, но не ограничиваются ими.

Использованный в настоящем документе термин "гематологическое злокачественное заболевание" относится к опухолям крови и лимфатической системы (например, болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта, СПИД-ассоциированные лимфомы, злокачественные иммунопролиферативные заболевания, множественная миелома и злокачественные новообразования плазматических клеток, лимфоидный лейкоз, миелоидный лейкоз, острый или хронический лимфоцитарный лейкоз, моноцитарный лейкоз, другие лейкемии определенного типа клеток, лейкемии неопределенного типа клеток, другие и неуточненные злокачественные новообразования лимфоидных, гематопоэтических и родственных тканей, например, диффузная крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома или кожная Т-клеточная лимфома).

Использованный в настоящем документе термин "гетерологичная нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, ДНК или РНК, которые были введены в вирус или клетку (или клетку-предшественник). Такая гетерологичная нуклеиновая кислота может включать последовательность и функционально регуляторные элементы для генов. Например, гетерологичная нуклеиновая кислота может включать ген селективного маркера, суицидальный ген или ген, экспрессирующий нужный белковый продукт, который не экспрессируется эндогенно или экспрессируется эндогенно на низком уровне.

#### **Оспенные вакцины и противораковые композиции**

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту оспенной вакцины, другой оспенной иммуногенной композиции или другой композиции (иммуногенной

или другой), способной вызывать аналогичный ответ. Несмотря на то, что термины "оспенные вакцины" могут использоваться по всему тексту, следует понимать, что также могут быть использованы другие композиции, которые не могут быть официально одобрены или названы "вакцинами". Например, могут быть использованы другие оспенные иммуногенные композиции или другие иммуногенные композиции. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина не содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину вводят путем внутриопухолевой, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной или внутриглазной инъекции, или путем внутрикожной инъекции или с помощью любых подходящих способов ее доставки.

Вирус натуральной оспы является причиной оспы. В отличие от вируса натуральной оспы, вирус осповакцины, который использовался для вакцинации против оспы, обычно не вызывает системного заболевания у иммунокомпетентных индивидуумов, и поэтому он использовался в качестве живой вакцины для иммунизации против оспы. Успешная всемирная вакцинация вирусом осповакцины привела к ликвидации оспы как естественного заболевания в 1980-х гг. С тех пор на протяжении многих лет вакцинация не проводилась, за исключением случаев высокого риска заражения поксвирусом (например, вакцинация лабораторных работников). Хотя в 1972 году Соединенные Штаты прекратили плановую иммунизацию детей против оспы, использование оспенной вакцины обычно считается безопасным для лечения детей.

В некоторых вариантах осуществления для создания живой вакцины используется ослабленный штамм, полученный из патогенного вируса. Неограничивающие примеры вирусных штаммов, которые были использованы в качестве оспенной вакцины, включают штаммы Lister (также известный как Elstree), New York City Board of Health ("штамм NYCВН"), Dairen, Ikeda, LC16M8, Western Reserve (WR), Copenhagen, Tashkent, Tian Tan, Wyeth, IND-J и IND-W, Brighton, Ankara, MVA, Dairen I, LIPV, LC16MO, LIPV, WR 65-16, EM63 и Connaught, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина, используемая в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ослабленный штамм вируса осповакцины из Департамента здравоохранения Нью-Йорка (New York City Board of Health (NYCВОН)). В некоторых вариантах осуществления штамм вируса осповакцины NYCВОН может представлять собой ATCC VR-118 или CJ-MVB-SPX.

В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина является неослабленной.

В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина выбрана из Dryvax, ACAM1000, ACAM2000, Lister, EM63, LIPV, Tian Tan, Copenhagen, Western Reserve или модифицированной вакцины вируса Анкара (MVA). В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина не является дефектной по каким-либо генам, присутствующим в одном или нескольких из этих штаммов.

В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина представляет собой компетентный по репликации вирус. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина является дефектной по репликации.

Способы, раскрытые в настоящем документе, могут быть использованы для лечения любой солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли. Опухоли, которые можно лечить способами, раскрытыми в настоящем документе, включают опухоль мочевого пузыря, опухоль молочной железы, опухоль предстательной железы, карциному, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного мозга, рак ЦНС, глиому, рак шейки матки, хориокарциному, рак ободочной и прямой кишки, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаза, рак головы и шеи, рак желудка, внутриэпителиальное новообразование, рак почки, рак гортани, лейкемию, рак печени, рак легкого, лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, меланому, миелому, нейробластому, рак полости рта, рак яичника, рак поджелудочной железы, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак прямой кишки, рак почки, рак дыхательной системы, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы, такие как лимфосаркома, остеосаркома, опухоли молочной железы, мастоцитомы, опухоль головного мозга, меланома, аденосквамозная карцинома, карциноидная опухоль легкого, опухоль бронхиальных желез, бронхиолярная аденокарцинома, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточные раки легкого, фиброма, миксохондрома, саркома легкого, нейросаркома, остеома, папиллома, ретинобластома, саркома Юинга, опухоль Вильма, лимфома Беркитта, микроглиома, нейробластома, остеокластома, оральная неоплазия, фибросаркома, остеосаркома и рабдомиосаркома, плоскоклеточная карцинома гениталий, трансмиссивная венерическая опухоль, опухоль яичка, семинома, опухоль из клеток Сертоли, гемангиоперицитомы, гистиоцитомы, хлоромы, гранулоцитарная саркома, корнеальная папиллома, корнеальная плоскоклеточная карцинома, гемангиосаркома, мезотелиома плевры, базальноклеточная опухоль, тимомы, опухоль желудка, карцинома надпочечника, оральная папилломатоз, гемангиоэндотелиома, цистаденома, фолликулярная лимфома, лимфосаркома кишечника, фибросаркома и плоскоклеточная карцинома легкого, лейкемия, гемангиоперицитомы, неоплазия глаза, препуциальная фибросаркома, язвенная плоскоклеточная карцинома, препуциальная карцинома, неоплазия соединительной ткани, мастоцитомы, гепатоклеточная карцинома, лимфома, аденоматоз легких, саркома легких, саркома Рауса, ретикулоэндотелиоз, фибросаркома, нефробластома, В-клеточная лимфома, лимфоидный лейкоз, ретинобла-

стома, печеночная неоплазия, лимфосаркома, плазмацитоидная лейкемия, саркома плавательного пузыря (у рыб), казеозный лимфаденит, карцинома легкого, инсулинома, лимфома, саркома, опухоли слюнных желез, неврома, опухоль островков Лангерганса поджелудочной железы, MALT лимфома желудка и аденокарцинома желудка, но не ограничиваясь ими.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из метастатической меланомы; аденокарциномы пищевода и желудка; холангиокарциномы (любой стадии); аденокарциномы поджелудочной железы (любой стадии); рака желчного пузыря (любой стадии); муцинозного рака аппендикса высокой злокачественности (любой стадии); желудочно-кишечного нейроэндокринного рака высокой злокачественности (любой стадии); мезотелиомы (любой стадии); саркомы мягких тканей; рака предстательной железы; почечно-клеточной карциномы; мелкоклеточной карциномы легкого; немелкоклеточной карциномы легкого; плоскоклеточной карциномы головы и шеи; колоректального рака; карциномы яичника; гепатоклеточной карциномы и глиобластомы.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из глиобластомы, карциномы молочной железы, карциномы легких, карциномы предстательной железы, карциномы толстой кишки, карциномы яичника, нейробластомы, опухоли центральной нервной системы и меланомы.

В некоторых вариантах осуществления опухоль или рак, которые можно лечить, представляют собой детскую или педиатрическую опухоль или рак. Например, опухоль или рак может представлять собой лейкемию, лимфому, саркому и тому подобное. Неограничивающие примеры лейкемии включают острый лимфобластный лейкоз (ALL) и острый миелобластный лейкоз (AML). Неограничивающие примеры типов лимфом включают болезнь Ходжкина (или лимфому Ходжкина) и неходжкинскую лимфому, В- и Т-клеточные лимфомы. Неограничивающие примеры солидных опухолей или раков у пациентов детского возраста включают опухоли головного мозга, саркому Юинга, рак глаза (ретинобластому), эмбрионально-клеточные опухоли, опухоли почки (например, опухоль Вильма), рак печени, нейробластому, остеосаркому, рабдомиосаркому, рак кожи (например, меланома), саркому мягких тканей и рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент детского возраста. В некоторых вариантах осуществления субъектом является новорожденный. В некоторых вариантах осуществления субъектом является младенец. В некоторых вариантах осуществления субъектом является ребенок. В некоторых вариантах осуществления субъектом является подросток. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта больше 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта меньше 18 лет.

#### **Оспенная вакцина и носители композиции**

Иммуногенные индукторы гибели клеток, такие как вирусы, подвергаются значительной элиминации и/или нейтрализации после системного применения. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты подходящие носители для защиты раскрытых оспенных вакцин от элементов гуморального и клеточного иммунитета в кровотоке, а также способы их направленной доставки к опухолевым очагам.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту оспенной вакцины одновременно с клеткой-носителем. В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой аутологичную клетку из субъекта. В других вариантах осуществления клетка может быть не аутологичной или аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой клетку насекомого, клетку рептилии, клетку амфибии, клетку птицы или клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой иммортализованную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой неопластическую клетку, полученную из опухоли. В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой человеческую клетку.

В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину или другую композицию, описанную в настоящем документе, и клетку-носитель вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и клетку-носитель вводят одновременно с помощью одного средства введения. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и клетку-носитель вводят одновременно с помощью одного сосуда, например, шприца, путем внутриопухолевой, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной, или внутриглазной, или внутрикожной инъекции или любым подходящим способом доставки.

#### **Стволовые клетки**

Недавние исследования показали, что для стволовых клеток характерен выраженный хоминг в глиому, кроме того, была продемонстрирована возможность помещения генов в стволовые клетки с помощью вирусных векторов. Эти исследования свидетельствуют о том, что стволовые клетки являются перспективным кандидатом на роль средства доставки носителя противоракового средства в опухолевые очаги.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыто применение стволовых клеток в качестве носителей для *in vivo* доставки оспенной вакцины к раковым клеткам или опухоли. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина смешивается со стволовыми

клетками-носителями, чтобы избежать клиренса вируса со стороны иммунной системы до того, как вирус достигнет опухоли. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту оспенной вакцины одновременно со стволовой клеткой. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина не содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает одновременное введение субъекту генетически сконструированного вируса. Некоторые варианты осуществления относятся к способам создания композиций стволовой клетки и оспенной вакцины перед введением.

В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка-носитель представляет собой аутологичную стволовую клетку. В других вариантах осуществления стволовая клетка-носитель является неаутологичной или аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки-носители выбраны из группы, состоящей из стволовых клеток взрослых, эмбриональных стволовых клеток, фетальных стволовых клеток, мезенхимальных стволовых клеток, нейтральных стволовых клеток, тотипотентных стволовых клеток, плюрипотентных стволовых клеток, мультипотентных стволовых клеток, олигопотентных стволовых клеток, унипотентных стволовых клеток, адипозных стромальных клеток, эндотелиальных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, стволовых клеток костного мозга, стволовых клеток из пуповинной крови, стволовых клеток периферической крови взрослых, миобластных стволовых клеток, малых ювенильных стволовых клеток, стволовых клеток фибробластов кожи и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка представляет собой мезенхимальноподобную клетку, полученную из пуповины. В некоторых вариантах осуществления мезенхимальноподобная клетка, полученная из пуповины, представляет собой клетку Immstem™. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой адипозную стромальную клетку. Одна или несколько из выше перечисленных клеток могут быть специально исключены из композиций и способов некоторых вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки-носители являются модифицированными. В частности, в некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка представляет собой стволовую клетку взрослых (ASC). В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка трансформирована вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка трансформирована лентивирусом или ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка трансформирована рекомбинантным вирусом. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка временно трансфицирована искусственной хромосомой, ДНК вируса или плазмидной ДНК. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой онколитический вирус. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус осповакцины. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой способный реплицироваться онколитический вирус осповакцины (VACV). В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка способна локализоваться в опухоли. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка представляет собой стволовую клетку взрослых. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка трансформирована лентивирусом или ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка временно трансфицирована искусственной хромосомой, ДНК вируса или плазмидной ДНК. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка способна локализоваться в опухоли. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из стволовых клеток взрослых, эмбриональных стволовых клеток, фетальных стволовых клеток, мезенхимальных стволовых клеток, нейтральных стволовых клеток, тотипотентных стволовых клеток, плюрипотентных стволовых клеток, мультипотентных стволовых клеток, олигопотентных стволовых клеток, унипотентных стволовых клеток, адипозных стромальных клеток, эндотелиальных стволовых клеток и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка представляет собой мезенхимальноподобную клетку, полученную из пуповины. В некоторых вариантах осуществления мезенхимальноподобная клетка, полученная из пуповины, представляет собой клетку Immstem™.

ImmStem представляет собой мезенхимальноподобные клетки, полученные из пуповины, которые обладают плюрипотентной способностью к дифференцировке и характеризуются уникальными поверхностными маркерами и продукцией факторов роста. ImmStem обладает многочисленными преимуществами по сравнению с другими источниками стволовых клеток, включая простоту получения, более высокую скорость пролиферации, очень низкую иммуногенность и способность дифференцироваться в ткани, представляющие собой компоненты всех трех зародышевых слоев. По сравнению с другими подтипами



мезенхимальных стволовых клеток (MSC) ImmStem продемонстрировали повышенную противовоспалительную и миграционную способность благодаря стадии "праймирования цитокинами", которая предшествует введению. Клетки ImmStem высевают из человеческой пуповины, которую получают от женщин, родивших в срок, сразу после родов. Чтобы стимулировать реакцию стресса, клетки культивируют в течение приблизительно 48 ч с интерфероном гамма. В некоторых вариантах осуществления культивирование с IFN-гамма может длиться от 1 до 72 ч или в течение любого времени в пределах данного диапазона.

В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и/или стволовую клетку вводят субъекту любым подходящим способом введения. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и/или стволовую клетку вводят путем внутрипухоловой, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной или внутриглазной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и стволовую клетку вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и стволовую клетку вводят одновременно с помощью одного средства введения. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и стволовую клетку вводят одновременно с помощью одного сосуда, например шприца, путем внутрипухоловой, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной, или внутриглазной, или внутрикожной инъекции или любым подходящим способом доставки.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из метастатической меланомы; аденокарциномы пищевода и желудка; холангиокарциномы (любой стадии); аденокарциномы поджелудочной железы (любой стадии); рака желчного пузыря (любой стадии); муцинозного рака аппендикса высокой злокачественности (любой стадии); желудочно-кишечного нейроэндокринного рака высокой злокачественности (любой стадии); мезотелиомы (любой стадии); саркомы мягких тканей; рака предстательной железы; почечно-клеточной карциномы; мелкоклеточной карциномы легкого; немелкоклеточной карциномы легкого; плоскоклеточной карциномы головы и шеи; колоректального рака; карциномы яичника; гепатоклеточной карциномы и глиобластомы.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из глиобластомы, карциномы молочной железы, карциномы легких, карциномы предстательной железы, карциномы толстой кишки, карциномы яичника, нейробластомы, опухоли центральной нервной системы и меланомы. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из перечисленных опухолей, видов рака или злокачественных новообразований могут быть специально исключены из композиций и/или способов, описанных в настоящем документе.

#### **Иммунные клетки**

Дополнительно в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыто применение иммунных клеток в качестве носителя для *in vivo* доставки оспенной вакцины к раковым клеткам или опухоли. В некоторых вариантах осуществления противораковый агент смешивается с иммунными клетками-носителями, чтобы избежать клиренса вируса со стороны иммунной системы до того, как вирус достигнет опухоли. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту оспенной вакцины одновременно с иммунной клеткой, выбранной из гранулоцита, тучной клетки, моноцита, дендритной клетки, естественного киллера и лимфоцита. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой аутологичную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина и иммунная клетка культивируются вместе *in vitro* перед введением субъекту.

В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и иммунную клетку вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и иммунную клетку вводят одновременно с помощью одного средства введения. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и иммунную клетку вводят одновременно с помощью одного сосуда, например, шприца, путем внутрипухоловой, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной, или внутриглазной, или внутрикожной инъекции или любым подходящим способом их доставки.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из метастатической меланомы; аденокарциномы пищевода и желудка; холангиокарциномы (любой стадии); аденокарциномы поджелудочной железы (любой стадии); рака желчного пузыря (любой стадии); муцинозного рака аппендикса высокой злокачественности (любой стадии); желудочно-кишечного нейроэндокринного рака высокой злокачественности (любой стадии); мезотелиомы (любой стадии); саркомы мягких тканей; рака предстательной железы; почечно-клеточной карциномы; мелкоклеточной карциномы легкого; немелкоклеточной карциномы легкого; плоскоклеточной карциномы головы и шеи; колоректального рака; карциномы яичника; гепатоклеточной карциномы и глиобластомы. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из перечисленных опухолей, видов рака или злокачественных новообразований могут быть специально исключены из композиций и/или способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из глиобластомы, карциномы молочной

железы, карциномы легких, карциномы предстательной железы, карциномы толстой кишки, карциномы яичника, нейробластомы, опухоли центральной нервной системы и меланомы.

#### **Адиipoзная стромально-васкуляpная фракция**

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения пролиферативного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту оспенной вакцины одновременно со стромально-васкуляpной фракцией (SVF) адипозного происхождения, где SVF адипозного происхождения является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления SVF адипозного происхождения вводят субъекту в течение примерно 24 ч после того, как жировая ткань была взята. В некоторых вариантах осуществления SVF адипозного происхождения можно вводить через любое время после получения вплоть до примерно 48 ч после получения или через любое время в пределах этого диапазона. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину вводят путем внутриопухолево́й, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной, или внутриглазной, или внутрикожной инъекции или любым подходящим способом доставки.

Жировая ткань является альтернативой костному мозгу в качестве источника стволовых клеток по следующим причинам: а) выделение клеток из жировой ткани является более простой и менее инвазивной процедурой, чем экстракция клеток из костного мозга; б) содержание мезенхимальных стволовых клеток (MSC) в жировой ткани выше, чем в костном мозге; в) число MSC из жировой ткани не уменьшается с возрастом и поэтому MSC из жировой ткани могут служить источником аутологичных клеток для всех пациентов и д) жировая ткань также является источником уникальных популяций клеток в дополнение к MSC, которые обладают терапевтическим потенциалом, включая эндотелиальные клетки и регуляторные Т-клетки.

MSC слабо иммуногенны и обладают иммуномодулирующей активностью, данные свойства являются общими для MSC из разных тканей. Считается, что благодаря слабой иммуногенности аллогенные MSC выживают и сохраняют активность при терапевтическом введении.

Известно, что SVF адипозного происхождения помимо стволовых клеток/клеток-предшественников также содержит моноциты/макрофаги и эндотелиальные клетки.

Для клеток SVF, полученной из цельного липоаспирата, нет необходимости проводить интенсивную обработку, благодаря чему минимизируется число стадий, на которых может произойти контаминация (Kurita et al., *Plast Reconstr Surg* 2008, 121:1033-1041; обсуждение 1042-1033; Yoshimura et al., *Aesthetic Plast Surg* 2008, 32: 48-55; обсуждение 56-47). Безопасность введения клеток, полученных из жировой ткани, подтверждается аутологичной трансплантацией жира, обычной практикой в косметической хирургии (Hang-Fu et al., *Aesthetic Plast Surg* 1995, 19:427-437). Каждая из вышеупомянутых ссылок включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления SVF адипозного происхождения получена способами и в соответствии со знаниями, известными специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления SVF адипозного происхождения выделяют из субъекта с помощью устройства Time Machine™. В некоторых вариантах воплощения SVF адипозного происхождения выделяют из субъекта, используя канюлю размером от 2,5 до 3 мм. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы одно или несколько из следующих устройств: PNC's Multi Station, CHA Biotech Cha-Station, Cytori Celution 800/CRS System и Medi-Khan's Lipokit с MaxStem.

В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и SVF адипозного происхождения вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и SVF адипозного происхождения вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и SVF адипозного происхождения вводят одновременно с помощью одного средства введения. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и SVF адипозного происхождения вводят одновременно с помощью одного сосуда, например, шприца, путем внутриопухолево́й, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной, или внутриглазной, или внутрикожной инъекции или любым подходящим способом их доставки.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из метастатической меланомы; аденокарциномы пищевода и желудка; холангиокарциномы (любой стадии); аденокарциномы поджелудочной железы (любой стадии); рака желчного пузыря (любой стадии); муцинозного рака аппендикса высокой злокачественности (любой стадии); желудочно-кишечного нейроэндокринного рака высокой злокачественности (любой стадии); мезотелиомы (любой стадии); саркомы мягких тканей; рака предстательной железы; почечно-клеточной карциномы; мелкоклеточной карциномы легкого; немелкоклеточной карциномы легкого; плоскоклеточной карциномы головы и шеи; колоректального рака; карциномы яичника; гепатоклеточной карциномы и глиобластомы. Одна или несколько из вышеупомянутых опухолей могут быть специально исключены из композиций и способов некоторых вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из глиобластомы, карциномы молочной железы, карциномы легких, карциномы предстательной железы, карциномы толстой кишки, карциномы яичника, нейробластомы, опухоли центральной нервной системы или меланомы. Один или несколько из вышеупомянутых компонентов могут быть специально исключены из композиций и способов некоторых вариантов осуществления.

### Композиции

В настоящем документе раскрыты различные композиции, используемые в описанных в настоящем документе способах лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта композиция, включающая оспенную вакцину и клетку-носитель, раскрытые в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта композиция, включающая (а) оспенную вакцину и (b) стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка выбрана из группы, состоящей из стволовых клеток взрослых, эмбриональных стволовых клеток, фетальных стволовых клеток, мезенхимальных стволовых клеток, нейральных стволовых клеток, тотипотентных стволовых клеток, плюрипотентных стволовых клеток, мультипотентных стволовых клеток, олигопотентных стволовых клеток, унипотентных стволовых клеток, адипозных стромальных клеток, эндотелиальных стволовых клеток и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой адипозную стромальную клетку. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой модифицированную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка представляет собой стволовую клетку взрослых. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка трансформирована лентивирусом или ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления модифицированная стволовая клетка временно трансфицирована искусственной хромосомой, ДНК вируса или плазмидной ДНК. В некоторых вариантах осуществления оспенная вакцина не содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает генетически сконструированный вирус. Один или несколько из вышеупомянутых компонентов могут быть специально исключены из композиций и способов некоторых вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта композиция, включающая: (а) оспенную вакцину и (b) иммунную клетку, выбранную из гранулоцита, тучной клетки, моноцита, дендритной клетки, естественного киллера и лимфоцита. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой лимфоцит.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта композиция, включающая: (а) оспенную вакцину и (b) выделенную адипозную стромально-васкулярную фракцию (SVF).

В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в настоящем документе, включают фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к растворителям, разбавителям, консервантам, диспергирующим или суспендирующим добавкам, изотоническим агентам, загустителям или эмульгирующим агентам, связывающим веществам и смазывающим веществам, подходящим для конкретной лекарственной формы. Специалисту в данной области известно множество различных носителей, которые могут быть использованы при получении фармацевтических композиций и в известных методах их получения (см. Remington's Pharmaceutical Sciences Ed. by Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995; которая включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). Фармацевтически приемлемые носители могут включать раствор Рингера, изотонический солевой раствор, крахмал, картофельный крахмал, сахара, глюкозу, порошкообразный трагакант, солод, желатин, тальк, целлюлозу и ее производные, этилцеллюлозу, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, наполнители из ацетат целлюлозы, какао-масло, суппозиторные воски, агар, альгиновую кислоту, масла, хлопковое масло, арахисовое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, кукурузное масло, гликоли, пропиленгликоль, сложные эфиры, этиллаурат, этилолеат, буферные агенты, гидроксид алюминия, гидроксид магния, фосфатно-буферные растворы, апирогенную воду, этиловый спирт, другие нетоксичные совместимые смазки, лаурилсульфат натрия, стеарат магния, красители, высвобождающие агенты, покрывающие агенты, подслащивающие, вкусовые и ароматизирующие агенты, но не ограничиваясь ими. Фармацевтически приемлемые носители могут также включать консерванты и антиоксиданты. Один или несколько из вышеупомянутых материалов могут быть специально исключены из композиций и способов некоторых вариантов осуществления.

Композиция, раскрытая в настоящем документе, включающая живую оспенную вакцину, может включать адъювант. Необязательно, одно или несколько соединений, обладающих адъювантной активностью, могут быть включены в вакцину. Адъюванты являются неспецифическими стимуляторами иммунной системы. Они усиливают иммунный ответ хозяина на вакцину. Примерами адъювантов, известных в данной области, являются полный и неполный адъювант Фрейнда, витамин Е, неионные блок-полимеры, мурамилдипептиды, ISCOM (иммуностимулирующие комплексы), сапонины, минеральное масло, растительное масло и карбопол. Адъювантами, особенно подходящими для применения в слизистой оболочке, являются, например, термолабильный токсин *E.coli* (LT) или холерный токсин (СТ). Другими подходящими адъювантами являются, например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия или оксид алюминия, масляные эмульсии (например, Bayol F® или Marcol 52®, сапонины или солюбилизат витамина Е). Один или несколько из вышеупомянутых материалов могут быть специально исключены из

композиций и способов некоторых вариантов осуществления.

### **Введение лечебных средств**

Эффективная доза каждого из раскрытых в настоящем документе лечебных средств может варьировать в зависимости от различных факторов, включая, но не ограничиваясь конкретным лечением, используемым соединением или фармацевтической композицией, способом введения, состоянием, подлежащим лечению, и/или тяжестью состояния, подлежащего лечению. Таким образом, режим дозирования комбинации по изобретению выбирают в соответствии с множеством факторов, включая способ введения и функцию почек и печени пациента. Врач, клиницист или ветеринар обычной квалификации может легко определить и назначить эффективное количество отдельных активных ингредиентов, необходимых для предотвращения, противодействия или остановки прогрессирования заболевания. Для оптимальной точности достижения концентрации активных ингредиентов в диапазоне, обеспечивающем эффективность без токсичности, требуется режим, основанный на кинетике доступности активных ингредиентов для целевых областей.

Способы получения фармацевтических композиций, включающие соответствующие средства для лечения, раскрытые в настоящем документе, известны в данной области и будут очевидны из уровня техники, из известных стандартных ссылок, таких как Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 18th edition (1990), которые включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и/или клетки, раскрытые в настоящем документе, вводят субъекту любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления оспенную вакцину и/или клетки, раскрытые в настоящем документе, вводят путем внутриопухолевой, внутривенной, внутривнутрибрюшинной, интратекальной, внутрижелудочковой, внутрисуставной, внутриглазной, или внутрикожной инъекции или любым подходящим способом их доставки.

Количество вакцины, вводимой взрослым среднего размера, может составлять, например, от  $1 \times 10^2$  до  $1 \times 10^{10}$  бляшкообразующих единиц, от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  бляшкообразующих единиц, от  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^6$  бляшкообразующих единиц или любое другое значение или поддиапазон в пределах приведенных значений. В качестве конкретного примера можно использовать около  $2,5 \times 10^5$  бляшкообразующих единиц.

Следует понимать, что варианты осуществления, описанные в настоящем документе, не ограничены вакцинацией или по существу вакцинацией, но также связаны с активацией иммунного ответа или реакции на раковые клетки. Несмотря на то, что слова "вакцина", "вакцинация" или другие подобные термины используются из соображения удобства, следует понимать, что такие варианты осуществления также относятся к иммунным композициям, иммуногенным композициям, активации иммунного ответа, иммунизации, и т.п., когда полный профилактический иммунитет не требуется или не активируется. Например, варианты осуществления, относящиеся к вакцинации, также могут относиться к активации или способствовать запуску иммуногенного или иммунного ответа против опухолевой клетки или опухоли независимо от того, приводит ли этот ответ к полной эрадикации или иммунизации против такой опухолевой клетки, опухоли или рака.

Раскрытия, описанные в настоящем документе с целью иллюстрации, могут быть соответствующим образом реализованы на практике без какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, специально не раскрытых в настоящем документе. Таким образом, например, термины "включая", "в том числе", "содержащий" и т.п. должны пониматься в широком смысле и без ограничений. Кроме того, используемые в настоящем документе термины и выражения были использованы с целью описания, а не ограничения, и использование таких терминов и выражений не означает исключения любых эквивалентов показанных и описанных свойств или их частей, но при этом следует понимать, что возможны различные модификации в объеме заявленной сущности изобретения.

Другие варианты осуществления изложены в формуле изобретения.

### **Примеры**

#### **Пример 1. Получение вакцины ACAM2000**

Флакон с вакциной следует достать из холодильной камеры и согреть до комнатной температуры перед восстановлением. Отгибающиеся колпачки флаконов с вакциной и разбавителем удаляют, каждую резиновую пробку протирают тампоном с изопропиловым спиртом и полностью высушивают.

Используя асептическую технику и стерильный 1 мл шприц, снабженный иглой 25 G  $\times$  5/8 дюймов (поставляется вместе со шприцем), отбирают 0,3 мл разбавителя и переносят все содержимое шприца во флакон с вакциной. Аккуратно взбалтывают, чтобы перемешать, стараясь, чтобы продукт не попал на резиновый колпачок. Восстанавливаемая вакцина должна представлять собой прозрачную или немного мутную, бесцветную или соломенно-желтого цвета жидкость, не содержащую посторонних включений. Цвет восстановленной вакцины и наличие в ней твердых частиц следует проверять визуально перед введением. Если твердые частицы или изменение цвета зафиксированы, вакцина не должна использоваться, и флакон с вакциной должен быть безопасно утилизирован.

После восстановления лиофилизированного препарата каждый флакон содержит приблизительно  $2,5-12,5 \times 10^7$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) вируса осповакцины (живого). После восстановления

вакцина АСАМ2000 может быть использована в течение 6-8 ч, если хранится при комнатной температуре (20-25°C, 68-77°F). Неиспользованная восстановленная вакцина АСАМ2000 может храниться в холодильнике (2-8°C, 36-46°F) до 30 дней, после чего ее следует утилизировать как биологически опасный материал.

Специалисты, осуществляющие получение и введение вакцины, должны носить хирургические или защитные перчатки и избегать контакта вакцины с кожей, глазами или слизистыми оболочками.

Флакон из-под вакцины, резиновый колпачок, шприц из-под разбавителя, иглу с выпускным отверстием, используемую для восстановления, иглу, используемую для введения, и любой материал, который контактировал с вакциной, следует выбрасывать в герметичные, защищенные от проколов контейнеры для биологически опасных отходов. Затем эти контейнеры должны быть соответствующим образом утилизированы.

Перед использованием флакон с вакциной аккуратно взбалтывают, чтобы перемешать, стараясь, чтобы продукт не попал на резиновый колпачок.

Используя асептическую технику и стерильный 1 мл шприц, снабженный иглой 25 G × 5/8 дюймов, отбирают все содержимое флакона и переносят его в меченый шприц 20сс, содержащий фракцию SVF.

Аккуратно взбалтывают, чтобы хорошо перемешать, и инкубируют шприц при 37°C в течение 2-4 ч.

Пример 2. Выделение и получение адипозной стромально-васкулярной фракции

Пациент получает местную анестезию, включающую 0,5% лидокаин с адреналином в соотношении 1:400000 с 8,4% HCO<sub>3</sub>, оттитрованной до pH 7,4 (обычно 5 см<sup>3</sup> HCO<sub>3</sub> в общем объеме 60 см<sup>3</sup>), и проходит стерильную подготовку. Далее пациент подвергается процедуре липосакции с использованием устройства Time-Machine™, установки для забора жира (шприца) и канюли 2,5-3 мм. Мазь и пластырь с бацитрацином закрепляют на ране вместе с давящей повязкой.

SVF (ADSC) получают в закрытой системе в соответствии со следующим протоколом:

с помощью TimeMachine® отобрать жир в шприц 60сс TP-101 (одноразовый стерильный шприц для забора жира);

центрифугировать при 2800 rpm в течение 3 мин;

удалить свободные жирные кислоты и осадок (локальный/кровь) с помощью закрытой системы TP-109;

перенести 25 см конденсированного жира в шприц TP-102 (шприц для обработки SVF);

добавить предварительно нагретые (38°C) 25 см<sup>3</sup> ускорителя Roche T-MAX® Time Machine Accelerator (коллагеназа, соответствующая GMP), содержащие 12,5 единиц Wunsch;

инкубировать при 38°C в течение 30-45 мин;

центрифугировать при 200 g в течение 4 мин;

удалить надосадочную жидкость за исключением нижних 3-10 см<sup>3</sup>;

добавить 50 см<sup>3</sup> D5LR в качестве промывочного раствора для удаления остатков коллагеназы и центрифугировать при 200 g в течение 4 мин;

повторить отмывку еще два раза (суммарно 3 отмывки);

удалить всю надосадочную жидкость, оставив 3-10 см<sup>3</sup> осадка, - это стромально-васкулярная фракция;

перенести SVF в меченый 20сс шприц через 100-микронный фильтр;

образец SVF собрать и определить количество клеток в нем, их жизнеспособность, проверить отсутствие комков и осадка;

из каждой клеточной суспензии отобрать аликвоты для проверки на эндотоксины и стерильность; SVF будет доступна для инъекции только после того, как результаты анализа на эндотоксины подтвердят, что уровень EU меньше или равен 5 EU/кг/ч и результаты окрашивания по Граму отрицательные;

клетки ресуспендировать в 20 мл Isolyte;

клеточные суспензии отбирать шприцом для инъекций 18G;

для инъекций может быть использовано до 100 млн жизнеспособных клеток;

затем шприц поместить в герметичный мешок для образцов, на котором написано имя пациента и номер медицинской карты, для транспортировки в процедурный кабинет для осуществления инъекции.

Пример 3. Введение адипозной SVF с оспенной вакциной

#### Способы введения

Внутривенный: невспененную аутологичную стромально-васкулярную фракцию (SVF), экстрагированную из 500 мл или менее липоаспирата, очищенную расщеплением коллагеназой с последующей серией промывок и содержащую до 100 млн клеток, инкубированных с вирусом осповакцины, доставляют путем внутривенной инъекции в объем 20 мл.

Внутриопухолевый: невспененную аутологичную стромально-васкулярную фракцию (SVF), экстрагированную из 500 мл или менее, липоаспирата очищенную расщеплением коллагеназой с последующей серией промывок и содержащую клетки, инкубированные с вирусом осповакцины, доставляют путем внутриопухолевой инъекции. Объем инъекции и количество инъекцируемых клеток будет варьироваться и зависеть от типа опухоли, ее размера и локализации.

Пример 4.

Онколизис линий опухолевых клеток человека после инфекции вирусными штаммами Lister и ACAM2000 *in vitro* и сравнение регрессии солидной опухоли у голых (безтимусных) мышей A549 и PC3, несущих опухоль, колонизированных штаммами вируса осповакцины ACAM2000 или Lister *in vivo* и в рамках клинических исследований.

#### Исследование *in vitro*

Для сравнительного исследования противоопухолевой активности оспенной вакцины ACAM2000 панель линий раковых клеток человека инфицировали штаммами вируса осповакцины ACAM2000 и Lister с MOI, равным 0,01.

Клетки рака молочной железы MDA-MB-231, клетки аденокарциномы легких A549 и NCI-H1299, клетки рака предстательной железы PC3 и клетки рака шейки матки SiHa высевали в 96-луночные планшеты за 24 ч перед инфицированием. На следующий день клетки образовали почти сплошной слой и были инфицированы 50 мкл DMEM, дополненной 2% фетальной бычьей сывороткой (FBS), содержащей соответствующее количество вируса осповакцины (MOI составляет 0,01). Контрольные клетки оставляли необработанными. Спустя 1 ч инкубации среду заменяли на DMEM, дополненную 10% FBS. Через 96 ч анализировали гибель опухолевых клеток методом МТТ.

Гибель клеток измеряли через 96 ч после инфицирования вирусами осповакцины ACAM2000 или Lister (MOI составляет 0,01). Жизнеспособность измеряли с помощью колориметрического МТТ теста. Оптическую плотность измеряли при 570 нм.  $n=3$ . (А) Результаты представлены в виде процента (%) погибших клеток, нормированного на необработанные клетки. (В) В таблице сравнивается эффективность уничтожения клеток вирусами ACAM2000 и Lister (+ = 1-25%, ++ = 26-50%, +++ = 51-75%, ++++ = 76-100%).

Как показано на фиг. 1А и 1В, вирусный штамм ACAM2000 эффективно уничтожает клетки всех линий раковых клеток человека, за исключением NCI-H1299, что сопоставимо с данными для вирусного штамма Lister (фиг. 1А и В). Аналогичные данные были получены для Copenhagen, MVA и других выбранных штаммов вируса осповакцины.

#### Исследование *in vivo*

Для дальнейшего сравнительного исследования противоопухолевой активности оспенных вакцин ACAM2000 и Lister опухолевые клетки A549 и PC-3 инъецировали подкожно голым (безтимусным) мышам. После того, как объем опухоли достигал 350 мм<sup>3</sup>, животным путем ретроорбитальной инъекции вводили вирусный инокулят ( $5 \times 10^6$  БОЕ) ( $n=5$ ). Контрольных мышей, несущих опухоль, инъецировали солевым буферным раствором. Сопоставимое ингибирование роста опухоли наблюдается для обоих образцов вируса осповакцины через 20 дней после инъекции у мышей, несущих опухоль A549, и через 14 дней после инъекции вируса у мышей, несущих опухоль PC-3 (данные не показаны).

#### Клинические исследования

Двадцать пять пациентов с метастатическими солидными опухолями на поздней стадии и гематологическими злокачественными опухолями получали комбинацию аутологичных стволовых клеток/вируса осповакцины в недавнем исследовании StemImmune. Ни у одного из 25 пациентов в этом исследовании не наблюдалось никаких побочных эффектов, возникающих в результате введения стволовой клетки/вируса осповакцины. В частности, не сообщалось о жаре, ознобе или других побочных эффектах, связанных с вирусом, тогда как в предыдущих клинических исследованиях такие побочные эффекты наблюдались через 6-12 ч после введения голого вируса без стволовых клеток. Важно отметить, что все пациенты в текущем исследовании испытывали "ощущение жжения", локализованное в месте расположения опухоли, примерно через 1-3 недели после введения стволовой клетка/онколитического вируса, что демонстрирует эффективную доставку вируса в опухолевые очаги и успешное инфицирование целевых опухолей. У некоторых пациентов наблюдалось уменьшение размера опухоли и полное исчезновение опухоли.

У пациентов, подвергнутых лечению, была взята серия образцов крови: до лечения (фоновый образец), а также через 1 день, 1 неделю, 1 месяц, 3 месяца и 6 месяцев после начала лечения. Анализ этих образцов показал эффективную индукцию высвобождения цитокинов примерно через 1 неделю после начала лечения. Важно отметить, что анализ методом проточной цитометрии подтвердил индукцию активированных Т-клеток и Т-клеток памяти через один месяц после начала лечения.

Таким образом, эти результаты подтвердили i) высокую безопасность данного лечения без каких-либо побочных эффектов, связанных с лечением; ii) документально подтвержденную эффективность в отношении уменьшения размера опухоли и даже полного исчезновения опухоли у некоторых пациентов; и iii) эффективную индукцию высвобождения цитокинов и выраженный клеточный ответ после этого лечения.

Пример 5. Клинические исследования SVF адипозного происхождения с вирусом осповакцины

#### Дизайн исследования

В исследовании на основании оценки субъективных и объективных результатов у пациентов оценивается безопасность введения SVF адипозного происхождения в комбинации с ACAM2000 (SVF/ACAM2000) пациентам с солидными опухолями на поздней стадии. Также, когда это возможно, путем исследования резецированного/биопсийного образца опухоли оценивают противоопухолевые эф-

факты введения SVF адипозного происхождения/ACAM200, а также присутствия вируса осповакцины в злокачественных опухолях после инъекции SVF/ACAM200. Кроме того, оценивают иммунную реакцию против вируса осповакцины и противоопухолевую иммунную реакцию после введения SVF/ACAM2000.

Все методы введения (внутривенные и внутриопухолевые) будут классифицированы независимо от состояния, чтобы получить информацию о конкретных методах введения. В ходе исследования будет продолжено наблюдение за каждым пациентом, чтобы можно было определить, возникают ли какие-либо побочные эффекты после лечения SVF/ACAM2000.

#### Критерии включения

Включали пациентов (>18 лет) с подтвержденным гистологически первичным или рецидивирующим раком солидных органов на стадии III или IV (стадии определены согласно Американскому объединенному комитету по раку, American Joint Committee on Cancer (AJCC; 7-ое издание)), и/или агрессивным раком солидных органов (агрессивный рак определяется, если опубликованные показатели выживаемости, зависящей непосредственно от основного заболевания, составляют менее 20% в течение 5 лет, несмотря на лучшую доступную в настоящее время терапию).

Пациенты предоставляют письменное согласие на взятие образцов пункционной биопсии опухолевой ткани (первичной или метастатической) до начала исследования для анализа мутаций, связанных со злокачественной опухолью пациента, для анализа чувствительности опухолевых клеток к вирусу осповакцины и для корреляционных исследований. Вместо этого, при возможности, пациент может предоставить блок ткани, фиксированной в формалине и залитой в парафин (из его/ее первичной или метастатической опухоли), полученный за 45 дней или меньше до письменного согласия на участие в клиническом исследовании, предусматривающем работу с парафиновыми блоками.

Критерии включают:

1) Способность понять и готовность подписать письменное информированное согласие.

2) Гистологически подтвержденный диагноз рака солидного органа на поздней стадии (AJCC, 7-ое издание: стадия III или IV) или агрессивного рака солидного органа (агрессивный рак определяется, если опубликованные показатели выживаемости, зависящей непосредственно от основного заболевания, составляют менее 20% в течение 5 лет, несмотря на лучшую доступную в настоящее время терапию).

Такой рак включает метастатическую меланому; аденокарциному пищевода и желудка (стадия III/IV); холангиокарциному (любая стадия); аденокарциному поджелудочной железы (любая стадия); рак желчного пузыря (любая стадия); муцинозный рак аппендикса высокой злокачественности (любая стадия); желудочно-кишечный нейроэндокринный рак высокой злокачественности (любая стадия); мезотелиому (любая стадия); саркому мягких тканей высокой злокачественности (любая стадия); рак предстательной железы; почечно-клеточную карциному; мелкоклеточную карциному легкого; немелкоклеточную карциному легкого; плоскоклеточный рак головы и шеи; колоректальный рак; карциному яичника; гепатоклеточную карциному; глиобластому, но не ограничивается ими.

3) Отсутствие непрекращающихся острых токсических эффектов вследствие любой предшествующей терапии, включая биологическую терапию, радиотерапию, химиотерапию или хирургические вмешательства, но не ограничиваясь ими, т.е. все такие эффекты должны быть определены согласно Общей терминологии критериев нежелательных явлений (Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE, версия 4.0) как имеющие степень < 1. Любая другая операция (за исключением биопсии) должна быть проведена не менее чем за 28 дней до начала исследования.

4) Общее состояние по шкале ECOG составляет от 0 до 2.

5) Ожидаемая продолжительность жизни составляет не менее 3 месяцев.

6) Надлежащее функционирование органов и костного мозга в соответствии с показателями ниже:

абсолютное число нейтрофилов (ANC) >  $1,5 \times 10^9$ ;

тромбоцитов >  $100 \times 10^9$  (без переливания тромбоцитов);

гемоглобин > 9,0 г/дл (при переливании красных кровяных телец (RBC) или без него);

сывороточный креатинин <  $1,5 \times$  верхняя граница нормы (ULN);

билирубин <  $1,5 \times$  ULN;

ALT и AST <  $2,5 \times$  ULN (в случае метастаз в печень AST/ALT <  $5,0 \times$  ULN);

LDH <  $1,5 \times$  ULN.

7) Женщины детородного возраста и мужчины, имеющие партнеров детородного возраста, должны быть согласны использовать адекватную контрацепцию (гормональный или барьерный метод предупреждения беременности, воздержание) до начала исследования, во время участия в исследовании и в течение 90 дней после завершения терапии. Если женщина забеременела или подозревает, что она беременна, во время участия в данном исследовании, она должна незамедлительно сообщить об этом врачу.

Женщиной детородного возраста является любая женщина (независимо от сексуальной ориентации, перевязки маточных труб или не состоящей в браке), которая удовлетворяет следующим критериям:

не подвергалась гистерэктомии или двусторонней овариэктомии или

не находится в периоде естественной менопаузы в течение не менее 12 последовательных месяцев (т.е., в любое время на протяжении предшествующих 12 месяцев наступала менструация).

8) Женщины детородного возраста имеют отрицательный результат теста на беременность до начала дозирования исследуемого препарата

9) Согласие и способность выполнять плановые визиты, план лечения, визуализацию и лабораторные тесты.

#### **Критерии исключения**

1) Использование в данный момент или предполагаемое использование других исследуемых препаратов или продаваемых противоопухолевых препаратов во время исследования.

2) Пациенты, подвергнутые химиотерапии или лучевой терапии в течение 4 недель до начала исследования или не восстановившиеся от нежелательных явлений из-за агентов, которые вводили более чем за 4 недели до начала исследования.

3) Пациенты, которые меньше чем за 4 недели до начала исследования подвергались хирургическому вмешательству (исключая биопсию) или недостаточно восстановились после хирургической травмы или после заживления ран.

4) Имеющие известные расстройства иммунной системы (включая синдром приобретенного иммунодефицита (AIDS), ВИЧ инфекция или гепатит В или С). Подходящие пациенты должны иметь отрицательный результат теста на ВИЧ в течение 4 недель до начала исследования.

5) Пациенты, получающие дополнительную иммуносупрессивную терапию или любые стероиды (за исключением одновременного использования кортикостероидов при условии применения не более 20 мг в день эквивалента преднизолона).

6) Ранее подвергнутые генной терапии или терапии цитолитическим вирусом любого типа.

7) Имеющие клинически значимые сердечно-сосудистые заболевания (New York Heart Association класс III или IV), включая предшествующую аритмию, неконтролируемую стенокардию и инфаркт миокарда за год до начала исследования, или сниженную фракцию выброса левого желудочка 2 степени или выше.

8) Пульсовая оксиметрия насыщения кислородом < 90% в состоянии покоя.

9) Имеющие слабоумие или измененное психическое состояние, которое не позволяет дать информированное согласие.

10) Тяжелое или неконтролируемое медицинское расстройство, которое по мнению исследователя ухудшало бы способность получать исследуемое лечение (т.е. неконтролируемый диабет, хроническая болезнь почек, хроническая или активная болезнь легких, лихорадка, системные и/или неконтролируемые инфекции, психическая болезнь/социальные ситуации, которые ограничивают соблюдение требований к лечению).

11) Одновременно получающие противовирусный препарат против вируса осповакцины (например, цидофовир, иммуноглобулин к вирусу осповакцины, иматиниб, ST-246) на протяжении периода лечения.

12) Имеющие известную аллергию на овальбумин или другие яичные продукты.

13) Имеющие клинически значимые дерматологические расстройства (например, экзема, псориаз или любые незаживающие кожные раны или язвы) по мнению руководителя клинического исследования во время скрининга и во время исследования.

14) Имеющие в анамнезе аллергию на йодированную контрастную среду.

15) Пациентов с известными метастазами в головной мозг следует исключить из данного клинического исследования из-за плохого прогноза для них и потому, что у них часто развивается прогрессирующая неврологическая дисфункция, которая может мешать оценке неврологических и других нежелательных явлений.

16) Беременные или кормящие. Данное лечение может повлечь за собой врожденные аномалии и навредить грудным детям.

17) Пациенты, которые не принимаются в данное исследование по причине того, что их состояние не может быть улучшено с помощью SVF/ACAM2000 по мнению одного или нескольких врачей-специалистов, входящих в группу специалистов, проводящих исследование.

#### **Процедуры, введение и продолжительность лечения**

Предусмотрены следующие процедуры

Пациент получает местную анестезию, включающую 0,5% лидокаин с адреналином в соотношении 1:400000 с 8,4%  $\text{HCO}_3$ , оттитрованной до pH 7,4 (обычно  $5 \text{ см}^3 \text{ HCO}_3$  в общем объеме  $60 \text{ см}^3$ ).

Пациент проходит стерильную подготовку.

Пациент подвергается процедуре липосакции с использованием устройства Time-Machine™, установки для забора жира (шприца) и канюли 2,5-3 мм.

Мазь и пластырь с бацитрацином закрепляют на ране вместе с давящей повязкой.

SVF (ADSC) получают в закрытой системе в соответствии с установленным протоколом (см. стр. 26-27).

#### **Способы введения**

Внутривенный: невспененную аутологичную стромально-васкулярную фракцию (SVF), экстрагированную из 500 мл или менее липоаспирата, очищенную расщеплением коллагеназой с последующей



серией промывок и содержащую до 100 миллионов клеток, инкубированных с вирусом осповакцины, доставляют путем внутривенной инъекции в объем 20 мл.

Внутриопухолевый: SVF, инкубированную с вирусом осповакцины, доставляют путем внутриопухолевой инъекции в Desert Medical Imaging в Palm Desert, CA. Объем инъекции и количество инъецируемых клеток будет варьировать и зависеть от типа опухоли, ее размера и локализации. Дозировка будет зависеть от индивидуальных выходов. Если мы обнаружим конкретные корреляции с определенным числом клеток, тогда можно попытаться оптимизировать такие показатели для будущих пациентов. Это, тем не менее, не имеет решающего значения для сущности данного исследования и не должно влиять на его исход.

#### **Разрешенная сопутствующая терапия**

Разрешено применение лекарств, необходимых для лечения нежелательных явлений и контроля симптомов рака, сопутствующего стабильного заболевания (например, контролируемая гипертензия), и средств поддерживающей терапии, таких как эритропоэтин или переливание крови, и обезболивающих препаратов. Пациент должен уведомить исследовательский центр о любых новых лекарственных средствах (отличных от исследуемого препарата) и значимая безмедикаментозная терапия (включая физиотерапию и переливание крови), применяемые после того, как пациент начинает лечение исследуемым препаратом, должны быть отмечены в медицинской карте пациента.

Ниже перечислены разрешенные сопутствующие терапии/процедуры:

- противорвотные средства;
- противодиарейные средства;
- анальгетики (например, нестероидные противовоспалительные препараты (NSAID) или оральные или чрескожные наркотические анальгетики);
- антибиотики;
- пищевые и жидкие добавки;
- миелоидные факторы роста (исключая обычное использование G-CSF и GM-CSF);
- бисфосфонаты;
- переливание крови и использование эритропоэтина допускается по усмотрению лечащего врача;
- допускается профилактическая антикоагулянтная терапия (низкая доза) и полное угнетение свертывания крови.

#### **Запрещенная сопутствующая терапия**

Другие экспериментальные методы лечения не должны применяться, пока пациент участвует в данном исследовании. Пациенты, принимая исследуемый препарат, не должны подвергаться другой противораковой терапии (например, химиотерапия, биологическая или лучевая терапия, хирургическое вмешательство), отличной от применяемого лечения. Если такие агенты необходимы для пациента, то пациент должен быть исключен из лечебной части исследования.

Ниже перечислены запрещенные виды сопутствующей терапии:

- хирургическое вмешательство (кроме разрешенной хирургической резекции первичной опухоли);
- другое экспериментальное лечение;
- другое противораковое лечение;
- системные иммунодепрессанты (за исключением одновременного использования кортикостероидов при условии применения не более 20 мг в день эквивалента преднизолона);
- иммунотерапия;
- регулярное профилактическое использование фактора роста (G-CSF или GM-CSF).

#### **Токсичность и задержка дозирования/изменение дозы**

Любой пациент, получающий лечение по этому протоколу, будет подвергнут анализу на предмет токсичности. Каждый пациент будет оцениваться на предмет развития токсичности в соответствии с критериями общей токсичности NCI для нежелательных явлений (CTCAE), версия 4.03. Задержка лечения, связанная с токсичностью, более чем на 2 недели, считается DLT, требующей отмены лечения.

#### **Безопасность/переносимость I**

Анализы будут проведены для всех пациентов, получающих, по меньшей мере, одну дозу исследуемого лекарства. В исследовании будут использованы CTCAE версии 4.03 (<http://ctep.cancer.gov/repordng/ctc.html>) для регистрации нежелательных явлений (приложение В).

Противоопухолевый эффект - солидные опухоли

Состояние заболевания у пациентов будет контролироваться поперечной визуализацией.

Оценка ответа опухоли (из исследования Stanford I.T.)

Скорость ответа опухоли будет рассчитываться на основе иммуноопосредованных критериев ответа (irRC) (Wolchok et al., Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria, Clin. Cancer Res. 2009, 15:7412-7420) солидных опухолей, и во вторую очередь с помощью post-hoc оценки ответа на основе критерия Choi для гастроинтестинальных стромальных опухолей (GIST). Смотрите Choi et al., Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: pro-

posal of new computed tomography response criteria, J. Clin. Oncol. 2007, 25:1753-1759. Необходимые визуализационные исследования опухолей будут проведены до начала исследования, в процессе лечения и через 1 месяц, 3 месяца и далее через каждые 3 месяца после лечения на протяжении 12 месяцев и впоследствии ежегодно.

Поскольку иммунотерапия может приводить к увеличению опухолевой массы (1) либо из-за продолжающегося роста опухоли до появления иммунного ответа, либо из-за транзиторного иммунноклеточного инфильтрата с отеком или без отека, либо (2) из-за появления новых очагов (имеются трудности с дифференциацией новых очагов от исходных необнаруживаемых очагов вследствие инфильтрации Т-клеток в имеющиеся рентгенографически необнаруживаемые метастазы опухоли), лечение должно продолжаться, так как опухоли могут начать сокращаться после врачебного наблюдения в последующий момент времени для подтверждения PD. Пациенты со стабильным общим состоянием и не сильно ухудшившимися лабораторными показателями или пациенты, у которых наблюдается умеренный рост опухоли при врачебном осмотре или рентгенографической визуализации, должны повторить сканирование для определения истинного прогрессирования заболевания и отмены лечения. Для длительного лечения нужно оценить потенциальные риски токсичности от продолжительного лечения.

Первичный анализ активности основан на иммуноопосредованных критериях ответа. Наилучший общий ответ (BORR) рассчитывается как число пациентов с BOR по CR или PR, деленное на число пациентов, подвергнутых лечению. Частота контроля заболевания (DCR) рассчитывается как число пациентов с CR, PR или SD, деленное на число пациентов, подвергнутых лечению.

Общая выживаемость (OS) определяется как период времени от рандомизации до смерти по любой причине.

Безрецидивная выживаемость (DFS) определяется как период времени от рандомизации до рецидива опухоли или смерти по любой причине.

Время до рецидива определяется как период времени от начала лечения до первого появления рецидива. Рецидив определяется как клиническое, рентгенологическое или патологическое свидетельство наличия нового или постоянного локального, местного или отдаленного по месту возникновения заболевания.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту онколитического вируса, представляющего собой вирус осповакцины, и стромально-васкулярной фракции (SVF) адипозного происхождения, где вирус осповакцины и SVF адипозного происхождения инкубируют совместно до введения.

2. Способ лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающий введение субъекту вируса осповакцины, представляющего собой оспенную вакцину, и адипозных стромальных клеток, где вирус и клетки были совместно инкубированы.

3. Способ по п.2, где адипозные стромальные клетки получены из стромально-васкулярной фракции (SVF) адипозного происхождения.

4. Способ по п.2 или 3, где адипозные стромальные клетки являются аутологичными для субъекта.

5. Способ по п.2 или 3, где адипозные стромальные клетки являются аллогенными для субъекта.

6. Способ по любому из пп.2-5, где адипозные стромальные клетки содержат искусственную хромосому, вирус или плазмиду.

7. Способ по любому из пп.1-6, где онколитический вирус осповакцины не содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, которая кодирует гетерологичный продукт.

8. Способ по любому из пп.1-7, где вирус осповакцины представляет собой ослабленный штамм вируса осповакцины из Департамента здравоохранения Нью-Йорка (New York City Board of Health (NYCBOH)).

9. Способ по п.8, где штамм вируса осповакцины NYCBOH обладает всеми отличительными характеристиками штамма, известного как ATCC VR-118 или CJ-MVB-SPX.

10. Способ по любому из пп.1-9, где вирус осповакцины выбран из штаммов Dryvax, ACAM1000, ACAM2000, Lister, EM63, LIVP, Tian Tan, Copenhagen, Western Reserve, Modified Vaccinia Ankara (MVA), New York City Board of Health, Dairen, Ikeda, LC16M8, Tashkent, Wyeth, IHD-J, IHD-W, Brighton, Dairen I и Connaught.

11. Способ по любому из пп.1-10, где солидная опухоль представляет собой глиобластому, карциному молочной железы, карциному легких, карциному предстательной железы, карциному толстой кишки, карциному яичника, нейробластому, опухоль центральной нервной системы или меланому.

12. Способ по любому из пп.1-6 и 8-11, где онколитический вирус осповакцины кодирует продукт гетерологичного гена.

13. Способ по любому из пп.1-12, где субъектом является человек.

14. Способ по п.13, где субъектом является пациент детского возраста.

15. Способ по п.1, где SVF адипозного происхождения является аутологичной для субъекта.

16. Способ по любому из пп.2-14, где онколитический вирус осповакцины и адипозные стромальные клетки культивируют вместе in vitro перед введением субъекту.

17. Способ по любому из пп.1-16, где онколитический вирус осповакцины представляет собой ос-

пенную вакцину.

18. Способ по п.17, где оспенная вакцина представляет собой ACAM2000.

19. Способ по любому из пп.1-18 где вирус осповакцины и SVF адипозного происхождения или адипозные стромальные клетки вводят путем внутриопухолевой, внутривенной, внутрибрюшинной, интраклеточной, внутрижелудочковой, внутрисуставной или внутриглазной инъекции.

20. Способ по любому из пп.2-19, где адипозные стромальные клетки содержат вирус, плазмиду или искусственную хромосому.

21. Способ по любому из пп.1-20, где опухоль представляет собой солидную опухоль.

22. Композиция для лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающая:

(a) вирус осповакцины и

(b) стромально-васкулярную фракцию (SVF) адипозного происхождения, где вирус осповакцины и SVF адипозного происхождения инкубируют совместно до введения субъекту.

23. Композиция по п.22, где вирус осповакцины представляет собой оспенную вакцину.

24. Композиция по п.23, где оспенная вакцина представляет собой ослабленный штамм, выбранный из штаммов Dryvax, ACAM1000, ACAM2000, Lister, EM63, LIVP, Tian Tan, Copenhagen, Western Reserve, Modified Vaccinia Ankara (MVA), New York City Board of Health, Dairen, Ikeda, LC16M8, Tashkent, Wyeth, IHD-J, IHD-W, Brighton, Dairen I и Connaught.

25. Композиция по п.23, где оспенная вакцина представляет собой Dryvax, ACAM2000 или ACAM1000.

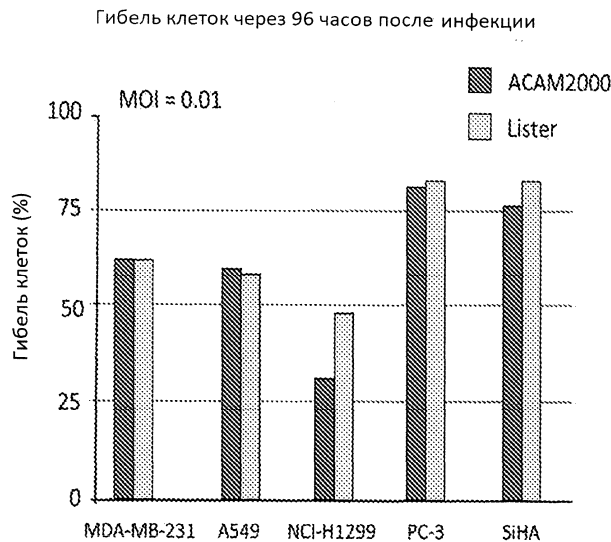
26. Композиция по п.23, где оспенная вакцина представляет собой ACAM2000.

27. Композиция для лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающая:

(a) вирус осповакцины и

(b) адипозные стромальные клетки, где

вирус осповакцины и адипозные стромальные клетки инкубируют совместно до введения субъекту.



Гибель клеток через 96 часов после инфекции

	АСМ7000	1.10.1
MDA-MB-231	+++	+++
A549	+++	+++
NCI-H1299	++	++
PC-3	++++	++++
SiHA	++++	++++

Фиг. 1В

