

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202000353 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.14

(22) Дата подачи заявки
2019.06.04

(51) Int. Cl. *A61K 35/768* (2015.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ОСНОВАННЫЕ НА КЛЕТКАХ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ПОТЕНЦИАЛИЗАЦИИ ВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

(31) 62/680,570

(32) 2018.06.04

(33) US

(86) PCT/US2019/035464

(87) WO 2019/236633 2019.12.12

(88) 2020.04.09

(71) Заявитель:

КАЛИДИ БИОТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Драганов Добрин, Сзалай Аладар (US)

(74) Представитель:

Стояченко И.Л. (RU)

(57) Изобретение относится к комбинациям клеточных носителей и вирусов, а также способам лечения рака. Также представлены модифицированные клеточные носители для такого лечения и способы подбора клеточных носителей, которые были бы иммунологически совместимыми с субъектом, нуждающимся в таком лечении.

202000353

A1

A1

202000353

ОСНОВАННЫЕ НА КЛЕТКАХ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ПОТЕНЦИАЛИЗАЦИИ ВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка претендует на приоритет предварительной заявки США № 62/680,570, поданной 04 июня 2018 года (Добрин Драганов и Аладар А. Салай) под названием и озаглавленной "КЛЕТОЧНЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ ВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ". Полное содержание данной заявки включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Представлены комбинации клеточных носителей и онколитических вирусов, способы лечения раковых заболеваний такими комбинациями, а также способы подбора таких комбинаций субъектам для лечения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Онколитические вирусы показали себя в качестве перспективного средства для лечения рака. Онколитические вирусы предназначены для накопления и размножения в раковых клетках. Онколитические вирусы могут лизировать раковые клетки, а также использоваться для кодирования и доставки противораковых агентов. Однако эффективность онколитических вирусов может быть снижена циркулирующими нейтрализующими антителами, врожденными и приобретенными иммунными механизмами и другими механизмами очистки, которые препятствуют доставке и/или накоплению вирусов в раковых опухолях/клетках. Существует потребность в усовершенствованных методах доставки для проведения онколитической терапии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Проблема онколитической терапии заключается в том, что вне зависимости от назначения и применения вирусов иммунная система организма воспринимает их враждебно и стремится уничтожить. Онколитические вирусы преимущественно реплицируют в опухолевой ткани и других иммунопривилегированных средах, в частности при системном введении, они должны избегать, маскироваться или иным образом защищаться от иммунных (врожденных и приобретенных) реакций хозяина, чтобы достаточное количество вируса достигло опухолей и метастаз. Это было устранено путем инфицирования клеток и использования их в качестве средств доставки вируса (также называемых здесь клетками-носителями или клеточными носителями). Раковые клетки, опухолевые клетки, а также различные типы стволовых клеток и нормальных клеток могут переносить онколитические вирусы, чтобы помочь защитить их от нейтрализации комплементами и антителами в кровообращении. Вирус

должен быть способен реплицировать в клетках, которые в этот момент избегают иммунной системы хозяина на время, достаточное для достижения опухоли или опухолевых клеток, и доставляют вирус. Именно эти свойства делают клетки пригодными в качестве клеток-носителей для онколитических или терапевтических вирусов. В целом, однако, когда клетки вводятся, особенно системно, или даже местно, возникают проблемы, в том числе, но не ограничиваясь ими:

- ограниченная эффективность доставки, несмотря на преимущественное самонаведение в опухолевую среду: большинство инфицированных клеток попадают в ловушку в легких или других органах, и только небольшой процент успешно добирается до опухоли. Внутриопухолевая инъекция лишь частично улучшает доставку по причинам плохого удержания введенных клеток-носителей в опухоли или утечку в кровотоки.
- большинство раковых заболеваний имеют индивидуальную для субъекта или специфичную для вида рака пермиссивность или резистентность к онколитическим вирусам
- эффективный контроль и элиминация вируса с помощью врожденного и приобретенного иммунитета, включая выработку интерферона-гамма ($IFN\gamma$), когда только ограниченное количество вирусов или инфицированных клеток-носителей колонизируют опухоль.
- правильная колонизация опухоли требует не только доставки, но и начальной стимуляции или критической амплификации стадии вируса для преодоления внутренней резистентности опухолевых клеток, а также врожденных и приобретенных иммунных барьеров.
- на выживаемость и возможность амплификации вируса готовых стволовых или раковых клеток, если их использовать в качестве средств доставки, будут влиять аллогенные иммунные реакции, включая, *например*, инактивацию и/или иммунологическое отторжение.

Здесь представлены методы, клетки и стратегии для решения этих проблем и получение улучшенных клеток-носителей и клеток, содержащих вирус, для онколитической терапии. Эти клетки включают в себя все, что может быть использовано для доставки вируса в опухоли, и включают стволовые клетки, опухолевые клетки, клеточные линии, первичные клетки и культивированные первичные клетки. Эти клетки включают стволовые клетки с тем условием, что в тех случаях, когда эмбриональные стволовые клетки или клетки, полученные из эмбриональных стволовых клеток или клеточных линий, не допускаются, ссылка на стволовые клетки не включает такие

клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клетки включают любые стволовые клетки, за исключением эмбриональных стволовых клеток и/или клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток или клеточных линий. Клетки могут быть аутологичными или аллогенными. Описанные методы позволяют использовать аллогенные клетки, в том числе готовые аллогенные стволовые и раковые клеточные линии, не только для доставки, но и для обеспечения мощной внутриопухолевой амплификации онколитических вирусов, тем самым преодолевая существующие аллогенные барьеры. Представленные здесь клетки обладают улучшенными свойствами для доставки онколитических вирусов в опухоли. Хотя предполагается любой способ введения, клетки можно вводить с помощью системного введения. Клетки модифицируют и/или обрабатывают (сенсibilизация), чтобы избежать реакции иммунной системы хозяина, включая комплемент. Клетки также модифицируют, конструируют или отбирают таким образом, чтобы конкретный представляющий интерес онколитический вирус мог реплицироваться в клетках до достижения необходимого для лечения количества, и доставленного в опухоли, метастазы и/или микроокружение опухоли.

Из этого всего можно сделать вывод, что:

Высокая внутренняя способность вирусной амплификации клеточного носителя (стволовых или раковых клеток) недостаточна для обеспечения способности к внутриопухолевой амплификации онколитического вируса клетками-носителями *in situ/in vivo*. Потенциал амплификации клеточного носителя может быть ограничен или полностью заблокирован иммунными реакциями против вируса или клеток отдельных субъектов, в частности аллогенных клеточных носителей. Эта проблема может быть преодолена путем использования альтернативных и дополняющих стратегий, включающих одно или несколько из: 1) сопоставление на основе анализа между пациентом и аллогенным клеточным носителем; 2) повышение чувствительности и защита клеточного носителя для улучшения амплификации и доставки онколитического вируса; и 3) конструкционная устойчивость к врожденным и приобретенным иммунным барьерам путем введения специфических генетических модификаций в клеточный носитель.

В данном документе показаны способы улучшения онколитической терапии и решение некоторых проблем с помощью факторов и обработки и/или модификаций, которые увеличивают или поддерживают амплификацию вируса в клетке, и/или которые могут снижать иммунный ответ хозяина, такой как комплемент или аллогенное распознавание, и/или которые сенсibilизируют или модифицируют клетки, чтобы

уклониться от аллогенного распознавания или комплемента, и/или других таких реакций, чтобы дать клеткам достаточно времени для доставки вируса в опухоли и для репликации вируса. Интерфероны типа I и типа II (IFN) являются мощными индукторами антивирусного состояния стволовых клеток и некоторых опухолевых клеток. Это препятствует способности этих клеток к инфицированию и поддержанию амплификации вируса. Показано, что блокирование обнаружения вирусной инфекции и индукции противовирусного состояния может увеличить терапевтический потенциал различных стволовых и опухолевых клеток, чтобы они функционировали в качестве носителей онколитических вирусов, сенсibiliзируя их к вирусной инфекции, амплификации и распространению. Клеточные транспортные средства могут быть сенсibiliзированы, *например*, обработаны или предварительно обработаны и/или спроектированы для усиления амплификации вируса и/или подавления индукции противовирусного состояния при введении клеток, содержащих вирус, хозяину. Цель (и) для достижения этого включают, *например*, ингибирование передачи сигналов интерферона и/или ингибирование сигнального пути JAK-STAT, такого как ингибитор JAK1/2. Клетки могут быть обработаны или сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать ингибиторы интерферона или интерфероновых сигнальных путей. Например, клетки, опухолевые клетки и/или стволовые клетки могут быть предварительно обработаны перед введением ингибитором JAK1/2 и/или ингибитором интерферона. Примерами таких препаратов являются Раксолинтиб, Оклактиниб и Барицитиниб.

Человеческая сыворотка может оказывать многочисленные вредные эффекты на носители стволовых клеток, в том числе непосредственно атаковать и убивать инфицированные вирусом клетки-носители до того, как они завершат свою амплификацию вируса и/или высвобождение вирусных частиц, тем самым ограничивая распространение вируса в опухолевые клетки-мишени. Клетки могут быть предварительно обработаны или сконструированы для защиты от комплемента или уклонения от него. Мишени включают классические и альтернативные пути активации комплемента, такие как белки комплемента C3 или C5. Ингибирующие антитела, такие как антитело анти-C5, продаваемое под названием Soliris® (Alexion), и ингибиторы расщепления C3, такие как компстатин и другие подобные ингибиторы активации комплемента, могут быть использованы для защиты клеток от комплемента. В данной области хорошо известны различные ингибиторы активации комплемента.

Клетки могут быть обработаны или сконструированы таким образом, чтобы подавлять и/или устранять детерминанты, ответственные за аллогенное распознавание и

отторжение. Это может увеличить терапевтический потенциал аллогенных стволовых или опухолевых клеток для доставки онколитических вирусов в готовом виде, избегая аллогенного распознавания и отторжения. Такие аллогенные детерминанты отторжения включают высокополиморфные и специфичные для пациента молекулы МНС класса I и класса II, распознаваемые Т-клетками CD8 и CD4, и широкий спектр низкополиморфных детерминант, распознаваемых различными субпопуляциями врожденных Т-клеток, такими как NKT, iNKT, и смешанными врожденными / приобретенными популяциями, такими как $\gamma\delta$ (gd) Т-клетки, включая, помимо прочего, МНС-подобные молекулы MICA/MICB и CD1a,b,c, d, а также различные другие связанные со стрессом или чувствительные к стрессу молекулы, такие как бутирофилины и Аннексин А2. Таким образом, клетки могут быть сенсibilизированы / сконструированы для уклонения или ингибирования аллогенных мишеней распознавания / отторжения. Такие мишени включают, *например*, детерминанты аллогенного отторжения Т-и NK-клетками, включая HLA-A, HLA-B, HLA-C и NKG2D, который является активирующим рецептором, экспрессируемым на NK-клетках, CD8+ - клетках, клетках подмножества CD4+ и гамма-дельта-Т-клетках (gd Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки). Иммунные ответы на детерминанты HLA могут быть заблокированы, *например*, блокадой рап HLA-A,B,C, блокирующим рап-HLA антителом, таким как Tü39 (BioLegend).

Иммунологические реакции и отторжение аллогенных и инфицированных вирусом стволовых или опухолевых клеток-носителей могут быть усилены путем задействования различных маркеров, не относящихся к МНС, которые обычно активируются на поверхности инфицированных вирусом или трансформированных опухолевых клеток и служат совместно стимулирующими иммунными молекулами. Такие маркеры могут напрямую модулировать способность клеток-носителей избегать иммунологического отторжения. Например, молекулы NKG2D (рецепторы) распознают различные белки, связанные с МНС класса I, такие как MICA и MICB человека, которые функционируют как ко-стимулирующие молекулы, участвующие в распознавании и отторжении инфицированных вирусом и трансформированных опухолевых клеток. Как показано здесь, они играют роль в регулировании иммунного уклонения носителей онколитического вируса. Молекулы NKG2D имеют сложную биологию и могут сенсibilизировать клетки, на которые нацеливается врожденный и приобретенный клеточный иммунитет, опосредованный NK и CD8 Т-клетками, также действующие как мощные иммуносупрессоры. NKG2D можно ингибировать напрямую, блокируя его активацию и/или ингибируя его лиганды, такие как MICA, MICB и другие. Блокада HLA

усиливает уклонение клеток от иммунитета; Присутствие NKG2D ставит под угрозу уклонение клеток от иммунитета.

Стволовые и опухолевые клетки используют различные стратегии иммунного подавления и уклонения, включая экспрессию IDO и секрецию IL-10. Амплификация вируса в клетках-носителях вызывает постепенную потерю жизнеспособности клеток и иммуносупрессивного потенциала. Чтобы преодолеть это ограничение, клетки обрабатывают или конструируют для экспрессии иммуносупрессивных агентов. Например, клетки обрабатывают высокой дозой иммуносупрессивного цитокина IL-10, чтобы обратить вспять опосредованную вирусом потерю иммуносупрессивных свойств и улучшить способность инфицированных вирусом клеток-носителей избегать аллогенного отторжения/реакций или раннего иммунного распознавания. Клетки могут быть сенсibilизированы или сконструированы для секреции иммуносупрессивных факторов, таких как IL-10 или PDL-1/PD-1. Например, предварительная обработка клеток или их инжинерия для экспрессии IL-10, который подавляет иммунные реакции на клетки.

Выше приведены примеры способов, которыми клеточные носители, включая опухолевые клетки и стволовые клетки, включая аллогенные стволовые и опухолевые клетки, могут быть обработаны или модифицированы для улучшения или увеличения доставки терапевтически эффективных количеств вируса к целевым опухолевым клеткам, а также могут быть обработаны/сконструированы для увеличения или поддержания вирусной амплификации. Обработка может быть осуществлена до введения клеток или путем совместного введения агента(агентов). В следующих таблицах приведены примеры целей, обработок и модификаций. Эти и другие подробно описаны в описании и примерах ниже.

Клеточные носители, сенсibilизированные для улучшения вирусной амплификации и/или иммуномодуляции

Улучшение/ Модификация	Механизм действия или цель	Примеры обработки
Повышение способности клеток к амплификации вируса	Иммуносупрессия для защиты клеток, использующих иммуносупрессивные факторы и/или ингибиторы	Предварительная обработка / загрузка клеточных носителей одним или несколькими из: IL-10; Tgfβ; VEGF; FGF-2; PDGF; HGF; IL-6; GM-CSF; Факторы роста; агонисты рецепторной тирозинкиназы (RTK) / mTOR лиганды

Улучшение/ Модификация	Механизм действия или цель	Примеры обработки
	иммунной активации	белка wnt; и GSK3 ингибиторы/антагонисты (например, тидеглусиб, вальпроевая кислота).
Подавление / блокирование индукции антивирусного состояния	Ингибирование рецепторов IFN типа I / типа II и нисходящая сигнальный путь/ реактивность	- Предварительная обработка / загрузка клеточных носителей низкомолекулярными или белковыми ингибиторами, например, IFNAR1/IFNAR2 сигнальный путь; IFNGR1/IFNGR2 сигнальный путь; STAT1/2 сигнальный путь; Jak1 сигнальный путь (например, тофацитиниб, руксолитиниб, барицитиниб); Jak2 сигнальный путь (например, SAR302503, LY2784544, CYT387, NS-018, BMS-911543, AT9283); сигнальный путь IRF3; сигнальный путь IRF7; сигнальный путь IRF9; сигнальный путь TYK2 (например, BMS-986165); и сигнальный путь TBK1 (например, BX795, CYT387, AZ13102909). - Предварительная обработка / загрузка ингибиторами HDAC, например, воринонестат, ромидепсин, хидамид, панобинонестат, белинонестат, вальпроевая кислота, моцетинестат, абексинестат, энтинестат, SB939, резминестат, гивинестат, хизинестат, HBI-8000, кеветрин, CUDC-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, ACY-1215, ME-344, сульфорафан и/или трихостатин.
	Ингибирование чувствительности к вирусу и/или путей	Предварительная обработка / загрузка клеток антагонистами вирусного происхождения, включая, но не ограничиваясь, одним или несколькими из:

Улучшение/ Модификация	Механизм действия или цель	Примеры обработки
	антивирусной защиты, опосредством, <i>например</i> , STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3, DAI (ZBP1)	белков K1, E3L, K3L (осповакцина); Белки NS1 / NS2 (грипп); NS3-4A (гепатит C); белки NP и Z (аренавирус); VP35 (вирус Эбола); US11, ICP34.5, ICP0 (HSV); M45 (MCMV); и белок X (BDV: вирус болезни Борна).
Защита от аллогенной инактивации / детерминантов отторжения	Антагонизм МНС / HLA	Предварительная обработка / загрузка клеток антагонистами МНС вирусного происхождения, <i>например</i>, одним или несколькими из: A40R (осповакцина); Nef и TAT (HIV); E3-19K (аденовирус); ICP47 (HSV-1/2); CPXV012, CPXV203 (коровья оспа); ORF66 (VZV); EBNA1, BNLF2a, BGLF5, BILF1 (EBV); US2/gp24, US3/gp23, US6/gp21, US10, US11/gp33 (hCMV); Rh178/VINCE (RhCMV); U21 (HHV-6/7); LANA1, ORF37/SOX, kK3/MIR1, kK5/MIR2 (KSHV); mK3 (MHV-68); UL41/vhs(a-герпесвирус, HSV, BHV-1, PRV); UL49.5 (варицелловир, BHV-1, EHV-1/4, PRV); m4/gp34, m6/gp48, m27, m152/gp40 (mCMV); and UL18 (HCMV; антагонист β_2 микроглобулина).
	Антагонизм модуляции MICA и MICB / NKG2D	Предварительная обработка / загрузка клеток антагонистами MICA и MICB, <i>например</i> kK5 (KHSV).
Подавление иммунитета и уклонение	Иммуносупрессия с использованием различных иммуносупрессивных факторов	Предварительная обработка / загрузка одним или несколькими иммуносупрессивными факторами вирусного происхождения, включая, но не ограничиваясь ими: ингибиторы иммунного

Улучшение/ Модификация	Механизм действия или цель	Примеры обработки
		FAS/TNF/гранзим В-индуцированного апоптоза (например, вирус экстремелии/осповакцины SP1-2/CrmA); антагонисты IL-1 / NFkB / IRF3 (например, N1, кодируемый вирусом осповакцины); антагонисты IL-1 и TLR (например, IL-18 связывающий белок, A46R, A52R); антагонисты IL-1β (например, B15R / B16R); блокаторы TNFα (например, CmrC / CmrE вируса осповакцины); блокаторы IFNα / β (например, вирус осповакцины B18R / B19R); и блокаторы IFNγ (например, вирус осповакцины B8R). Предварительная обработка / загрузка низкомолекулярными ингибиторами TAP1 / 2 и/или тапазина.
Защита от комплемента	Ингибирование факторов комплемента (например, C1, C2, C3, C4, C5, MBL)	Предварительная обработка / загрузка клеток ингибиторами факторов комплемента, включая, помимо прочего, один или несколько из: VCP (комплементсвязывающий белок ортопоксвирусов); B5R (ингибитор комплемента вируса осповакцины scFv анти-CD1q/CD1r/CD1s; анти-C3 антитела; анти-C5 антитела (например, экулизумаб); пептидные ингибиторы C3 семейства компстатина (например, Cp40); человеческие растворимые мембранные (s / m) белки (например, s/mCR1 (CD35), s/mCR2 (CD21), s/mCD55, s/mCD59); человеческий фактор H и его производные; факторы и производные яда кобры с

Улучшение/ Модификация	Механизм действия или цель	Примеры обработки
		ингибирующей активностью комплемента.

Клеточные носители сенсibilизированные для устойчивости к уничтожению посредством вирусов

Улучшение / Модификация	Механизм действия	Обработка
Предварительная обработка интерферонами типа I и/или типа II	Обеспечивает длительную выживаемость и/или улучшенную местную иммуносупрессию.	Предварительная обработка / загрузка IFN типа I (например, IFN α , IFN β) и/или IFN типа II (например, IFN γ).
Предварительная обработка агонистами / индукторами противовирусного состояния	Обеспечивает длительную выживаемость и/или улучшенную местную иммуносупрессию.	Предварительная обработка / загрузка агонистами путей STING, PKR, RIG-I, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM-2, MAVS, RIP-1/3 и/или DAI (ZBP1).

Клеточные носители, разработанные для улучшенной вирусной амплификации и/или иммуномодуляции

Улучшение/ Модификация	Механизм действия	Примеры генетической модификации
Сконструировано так, чтобы быть невосприимчивым к IFN - индуцированному противовирусному состоянию	Временное или постоянное подавление рецепторов IFN типа I / типа II и/или нисходящей сигнализации	Конструирование клеток для подавления экспрессии одного или нескольких из: рецепторов IFNα, IFNβ, IFNγ; рецепторов IFNAR1/IFNAR2; рецепторов IFNGR1/IFNGR2; рецепторов STAT1/2; рецепторов Jak1/2; рецепторов IRF3; рецепторов IRF7; рецепторов IRF9; киназы TYK2; и киназы TBK1.
	Временное или постоянное подавление	Конструирование клеток для подавления экспрессии одного или

Улучшение/ Модификация	Механизм действия	Примеры генетической модификации
	элементов цитозольного вирусного ДНК / РНК- чувствительного и противовирусного механизма защиты	нескольких из следующих: PKR, RIG-I, MDA-5, cGAS, STING, TBK1, IRF3, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP- 1/3 и DAI (ZBP1).
	Временная или постоянная экспрессия антагонистов вирусочувствительных и противовирусных защитных путей, посредством, например, STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3, DAI (ZBP1)	• Конструирование клеток для экспрессии одного или нескольких из K1, E3L, K3L (осповакцина); NS1 / NS2 (грипп А); NS3-4A (гепатит С); белок NP, Z (аренавирус); VP35 (вирус Эбола); US11, ICP34.5, ICP0 (HSV); M45 (MCMV); и белок X (BDV: вирус болезни Борна).
Сконструировано таким образом, чтобы избежать аллогенного распознавания Т- клетками и/или NKT-клетками и/или приобретенных иммунных реакций γδ-Т-клеток.	Временное или постоянное подавление экспрессии молекул МНС класса I	• Конструирование клеток для подавления экспрессии молекул HLA-A, B, C.
	Временное или постоянное подавление экспрессии молекул МНС класса II	• Конструирование клеток для подавления экспрессии молекул HLA-DP, DQ, DR.
	Временное или постоянное подавление экспрессии молекул, МНС-подобных	• Конструирование клеток для подавления экспрессии молекул CD1a / b / c / d.
	Временное или постоянное подавление экспрессии регуляторов	• Конструирование клеток для подавления экспрессии, например, TAP1 / 2, тапасина, бета-2

Улучшение/ Модификация	Механизм действия	Примеры генетической модификации
	транскрипции или экспрессии МНС класса I, МНС класса II и МНС-подобных молекул	микроглобулина, СИТА, RFXANK, RFX5 и RFXAP.
	Временная или постоянная экспрессия антагонистов в МНС и МНС-подобных молекул	• Конструирование клеток для экспрессии антагонистов β_2 М вирусного происхождения, например UL18 (НС MV). • Конструирование клеток для экспрессии антагонистов МНС вирусного происхождения, например, одного или нескольких из: A40RMHCI (осповакцина); Nef, TAT (HIV); E3-19K (аденовирус); ICP47 (HSV-1/2); CPXV012, CPXV203 (коровья оспа); EBNA1, BNLF2a, BGLF5, BILF1 (EBV); ORF66 (VZV); US2/gp24, US3/gp23, US6/gp21, US10, US11/gp33 (hCMV); rh178/VIHCE (RhCMV); U21 (HHV-6/7); LANA1, ORF37/SOX, kK3/MIR1, kK5/MIR2 (KHSV); mK3 (MHV-68); UL41/vhs (а-герпесвирус, HSV, BHV-1, PRV); UL49.5 (варицелловир, BHV-1, EHV-1/4, PRV); и m4/gp34, m6/gp48, m27, m152/gp40 (mCMV). • Конструирование клеток для экспрессии анти-HLA, анти-МНС и/или анти-МНС-подобной молекулы

Улучшение/ Модификация	Механизм действия	Примеры генетической модификации
		антител.
Сконструировано, чтобы избежать аллогенного распознавания НК- клетками и/или врожденных иммунных реакций $\gamma\delta$ Т-клеток.	Временное или постоянное подавление экспрессии лигандов НК-клеток и/или $\gamma\delta$ Т- клеточных рецепторов	Конструирование клеток для подавления экспрессии, например, мембраносвязанного MICA / B (лиганды NKG2D); мембраносвязанного PVR (лиганд DNAM-1); и/или мембраносвязанного нектин-2 (лиганд DNAM-1).
	Временная или постоянная экспрессия антагонистов NK рецептора и/или лигандов $\gamma\delta$ Т- клеточного рецептора	Конструирование клеток для экспрессии антагонистов MICA и MICB (лиганды NKG2D), например kK5 (KHSV).
	Временная или постоянная экспрессия антагонистов NK- клеток и/или $\gamma\delta$ Т- клеточных рецепторов	- Конструирование клеток для экспрессии антагонистов рецепторов NKG2D, например, OMCP коровьей оспы. - Конструирование клеток для экспрессии антагонистов NCR – таргетированные рецепторы NKp30, NKp44, NKp46, например HA (гемагглютинин - у вирусов коровьей оспы и других вирусов).
	Временная или постоянная экспрессия лигандов NK и/или $\gamma\delta$ Т-клеточных ингибиторных рецепторов	- Конструирование клеток для экспрессии лигандов KIR (NK ингибиторные рецепторы), например, HLA-Bw4; HLA-C2. - Конструирование клеток для экспрессии лигандов NKG2a/CD94

Улучшение/ Модификация	Механизм действия	Примеры генетической модификации
		(НК-ингибиторные рецепторы), например, HLA-E и его производные по отдельности или в сочетании с лигандами 21M HLA-B для генерации HLA-E связывающих пептидов и стабилизации поверхностной экспрессии HLA-E.
Сконструировано для экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого или вирусного происхождения	Предотвращение ингибирование аллогенного антиклеточного носителя или противовирусных иммунных реакций	• Конструирование клеток для экспрессии факторов человеческого происхождения, включая, помимо прочего, IDO, аргиназу, TRAIL, iNOS, IL-10, TGFβ, VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, sMICA, sMICB, sHLA-G, HLA-E, PD-L1, FAS-L, B7-H4 и одноцепочечные антитела (scFv), которые нацелены или истощают NK и/или NKT-клетки. • Конструирование клеток для экспрессии факторов вирусного происхождения, включая, но не ограничиваясь ими, экстремелию/вирус осповакцины SPI-2 / CrmA (ингибиторы иммунного FAS/TNF/гранзим B-индуцированного апоптоза вирус осповакцины, кодируемый N1 (антагонист IL-1/NFkB/IRF3); HA (антагонисты NCR, нацеленные на NKp30, NKp44, NKp46); IL-18 связывающий белок; A40R; A46R; A52R; B15R/B16R; блокаторы TNFα (например, CmrC / CmrE вируса

Улучшение/ Модификация	Механизм действия	Примеры генетической модификации
		осповакцины); блокаторы IFN α / β (например, вирус осповакцины B18R / B19R); блокаторы IFN γ (например, вирус осповакцины B8R); и другие антагонисты IL-1 / IL-1 β / NFKB / IRF3 / NCR / MHCI / TLR / NKG2D.
Сконструировано для экспрессии факторов, полученных из раковых или стволовых клеток, которые способствуют вирусному инфицированию в противном случае недопускающие проникновение	Облегчение вирусной инфекции в противном случае недопускание проникновения клеточных носителей и/или опухолевых клеток	• Конструирование клеток для экспрессии одного или нескольких из: связанных с раком антигенов, например, рака яичка антигены (MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, NY-ESO-1, PRAME, CT83, SSX2, семейство BAGE, семейство CAGE) ; онкофетальные антигены (AFP, CEA); супрессоры онкогенов / опухолей (myc, Rb, Ras, p53, теломераза); антигены дифференцировки (MELAN, тирозиназа, TRP-1/2, gp100, CA-125, MUC-1, ETA); GM-CSF; IL-10; TGFβ; VEGF; FGF-2; PDGF; HGF; IL-6; факторы роста; агонисты RTK / mTOR; и лиганды белка wnt.
Сконструировано для экспрессии факторов, влияющих на функцию комплемента и/или нейтрализующих антител	Защита клеток от комплемента и сывороточных нейтрализующих антител	• Конструирование клеток для экспрессии одного или нескольких из: белковых антагонистов факторов комплемента (например, антагонистов C1, C2, C3, C4, C5, MBL); комплементсвязывающий белок ортопоксвирусов

Улучшение/ Модификация	Механизм действия	Примеры генетической модификации
		(VCP); Ингибитор комплемента вируса осповакцины (B5R); scFv анти-CD1q/CD1r/CD1s; анти-C3 антитела; анти-C5 антитела (например, экулизумаб); пептидные ингибиторы C3 семейства компстатинов (например, Cp40); человеческие растворимые мембранные (s/m) белки (например, s/mCR1 (CD35), s/mCR2 (CD21), s/mCD55, s/mCD59); человеческий фактор H и производные; факторы и производные яда кобры с ингибирующей активностью комплемента.

Здесь представлены методы, которые фиксируют специфические для пациента различия в иммунных реакциях на вирус и стволовые клетки, обеспечивая надлежащий подбор клеток-носителей и позволяя эффективно использовать готовые средства доставки на основе аллогенных клеток и/или разработку аллогенных клеток для использования в качестве носителей вирусных клеток, которые решают проблемы, рассмотренные выше. Использование аллогенных стволовых клеток для доставки онколитического вируса облегчается отсутствием требований к длительному выживанию и привыканию клеток. Субъекты и клетки-носители могут быть обработаны и модифицированы, как описано здесь, и подобраны к субъектам для эффективной доставки вируса. Таким образом, обеспечивается жизнеспособная альтернатива подходу к аутологичным стволовым клеткам.

В данном документе представлены способы улучшения доставки онколитических вирусов к опухолевым клеткам. Клеточные носители использовались в качестве транспортного средства (клеток-носителей) для доставки вируса, помогая вирусу

уклоняться от циркулирующих антител и иммунных механизмов и доставляя вирус к раковым опухолям/клеткам. Клеточные носители могут усиливать амплификацию вируса на участке опухоли, тем самым повышая его терапевтическую эффективность и позволяя вирусу преодолевать внутреннюю резистентность опухолевых клеток, а также врожденные и приобретенные иммунные барьеры. Здесь представлены клетки-носители (клеточные носители), которые улучшили способность уклоняться от иммунных реакций субъекта лечения. Приведены методы подбора клеток-носителей к субъекту, чтобы наилучшим образом избежать клиренса со стороны иммунной системы, подбора клетки-носителя с вирусом, а также подбора клетки-носителя и вируса к субъекту, подлежащему лечению. В частности, приведены методы лечения субъектов с аллогенными клетками-носителями, содержащими онколитический вирус. Аллогенные клетки-носители подбираются к субъектам методами, описанными в настоящем документе. Вирус и клетки-носители обычно культивируют совместно перед введением, но также их можно вводить отдельно, *например*, последовательно, в разных композициях. Кроме того, могут быть введены клетки-носители, совместно культивируемые с вирусом или инфицированные им, и могут быть введены дополнительные клетки-носители, которые не были совместно культивированы с вирусом или инфицированы им.

В настоящем документе показано улучшение и решение проблем онколитической терапии факторами и методами обработки и/или модификациями клеток, которыми увеличивают или поддерживают вирусную амплификацию в клетке и/или уменьшают иммунный ответ хозяина, такой как комплементарные и/или HLA-ответы и другие подобные ответы, против клеток, чтобы обеспечить достаточное время для доставки вируса в опухоли.

Кроме того, предусмотрены методы подбора аллогенных клеток к субъекту, чтобы избежать или уменьшить реакции со стороны его иммунной системы, которая уничтожает или ингибирует клетки до того, как они смогут амплифицировать и доставить вирус в место назначения. Эти методы также могут помочь в выборе подходящего вируса для конкретного типа клеток.

Здесь представлены клетки-носители, которые содержат онколитический вирус, в котором: вирус может реплицироваться в клетке; клетка может быть введена субъекту-человеку; клетка была обработана или модифицирована или и то, и другое для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки для введения субъекту-человеку; и, дополнительно, клетка была обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке. Были предоставлены клетки-носители, которые были обработаны или модифицированы или и то и другое для

усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки для введения субъекту-человеку; и которые были обработаны или модифицированы для усиления амплификации вируса в клетке. Также предоставлены клетки-носители, которые являются перmissive для амплификации онколитического вируса и которые накапливаются в опухолях и/или клетках-носителях, которые не распознаются иммунной системой субъекта в течение времени, достаточного для доставки вируса в опухоль субъекта. Цель состоит в том, чтобы клетки выжили достаточное время, чтобы амплифицировать вирус и доставить вирус в опухоли и метастазы. В конечном итоге количество клеток уменьшится, поскольку они лизируются вирусом. Клетки-носители представляют собой обработанные или модифицированные стволовые клетки, иммунные клетки и опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления, в которых клетки-носители представляют собой стволовые клетки, клетки не являются эмбриональными или фетальными стволовыми клетками или полученными из эмбриональной клеточной линии. Клетки-носители могут быть удалены или собраны у субъекта и инфицированы онколитическим вирусом, или они могут быть аллогенными. Стволовыми клетками могут быть стволовые клетки взрослых или, если это разрешено, эмбриональные или фетальные стволовые клетки. Примеры клеток-носителей могут быть выбраны из мезенхимальных, нервных, тотипотентных, плюрипотентных, индуцированных плюрипотентных, мультипотентных, олигопотентных, унипотентных, адипозных, стромальных, эндотелиальной, костного мозга, пуповинной крови, периферической крови взрослых, миобластов, малых ювенильных клеток, эпителиальных, эмбриональных эпителиальных клеток и стволовых клеток фибробластов. В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой мезенхимальную стволовую клетку. Примерами мезенхимальных стволовых клеток являются мезенхимальные клетки из взрослого костного мозга, жировой ткани, крови, пульпы зубов, неонатальной пуповины, пуповинной крови, плаценты, стромальные плацентарные адгезивные клетки, плацентарные децидуальные стромальные клетки, эндометриальные регенеративные клетки, плацентарные бипотентные эндотелиальные/мезенхимальные клетки-предшественники, мезенхимальные стволовые клетки из амниотической мембраны или жидкости, клетки-предшественники из амниотической жидкости, мезенхимальные стволовые клетки желе Уортона, стволовые клетки тазового пояса, мезенхимальные стромальные клетки ворсинок хориона, мезенхимальные стволовые клетки подкожной жировой ткани, перициты, адвентициальные ретикулярные стволовые клетки, стволовые клетки, полученные из волосных фолликулов, гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые

клетки надкостницы, мезенхимальные стволовые клетки боковых пластин, стволовые клетки выпавших молочных зубов, стволовые клетки периодонтальной связки, клетки-предшественники зубных фолликулов, стволовые клетки из апикального сосочка или мышечные сателлитные клетки или их смеси.

В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой жировую стромальную клетку, такую как жировая стромальная мезенхимальная клетка. Например, клетки могут быть супраадвентициально-жировыми стромальными клетками (SA-ASC; CD235a⁻/CD45⁻/CD34⁺/CD146⁻/CD31⁻) и/или перицитами (CD235a⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD146⁺/CD31⁻), в частности супраадвентициально-жировые стромальные клетки (CD34⁺ SA-ASC). В других вариантах осуществления клетки-носители могут быть выбраны из эндотелиальных клеток-предшественников, плацентарных эндотелиальных клеток-предшественников, ангиогенных эндотелиальных клеток и перицитов. Клетки-носители могут быть эмбриональными эпителиальными клетками, но только там, где их разрешено использовать.

В других вариантах осуществления клетками-носителями могут быть иммунные клетки. Иммунные клетки могут быть выбраны из числа гранулоцитов, тучных клеток, моноцитов, дендритных клеток, натуральных киллеров, лимфоцитов, трансгенных клеток Т-клеточного рецептора (TCR), нацеленных на специфические антигены опухоли, и CAR-T-клетки, нацеленных на специфические антигены опухоли.

В некоторых вариантах осуществления клетка-носитель представляет собой модифицированную или обработанную клетку линии гематологических злокачественных клеток. Как правило, злокачественные клетки обрабатывают так, чтобы они не могли размножаться.

Во всех вариантах осуществления клетки-носители могут быть аллогенными для субъекта, подлежащего лечению, или они могут быть аутологичными. Там, где они аллогенны, они могут быть обработаны, сенсибилизированы или сконструированы таким образом, чтобы избегать или не подвергаться реакции иммунитета лечаемого субъекта, и/или подобраны так, чтобы избежать такой реакции в течение времени, достаточного для доставки вируса в опухоль.

Клетки-носители могут быть выбраны из линий клеток, которые включают, но не ограничиваются ими, линии клеток лейкоза человека, Т-клеточного лейкоза, миеломоноцитарного лейкоза, лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза, хронического миелолейкоза, острого лимфобластного лейкоза, эритролейкемии, миеломонобластного лейкоза, злокачественной неходжкинской НК-лимфомы,

миеломы/плазмацитомы, множественной миеломы и клеточной линии макрофагов. Примером таких клеточных линий является одна выбранная из перечисления линия:

линия клеток лейкоза, представляющая собой KASUMI-1, HL-60, THP-1, K-562, RS4;11, MOLT-4, CCRF-CEM, JVM-13, 31E9, ARH-77, MoB, JM1, NALM-1, или ProPak-X.36;

линия клеток Т-клеточного лейкоза, представляющая собой HM-2, CEM-CM3, Jurkat/Jurkat клон E6-1, J.CaM1.6, BCL2 Jurkat, BCL2 S87A Jurkat, BCL2 S70A Jurkat, Neo Jurkat, BCL2 AAA Jurkat, J.RT3-T3.5, J45.01, J.gamma1, J.gamma1.WT, JK28, P116, P116.cl39, A3, JX17, D1.1, I 9.2, или I 2.1;

линия клеток миеломоноцитарного лейкоза, представляющая собой MV-4-11;

линия клеток лимфомы, представляющая собой HT, BC-3, CA46, Raji, Daudi, GA-10-Clone-4, HH или H9;

линия клеток неходжкинской лимфомы, представляющая собой SU-DHL-1, SU-DHL-2, SU-DHL-4, SU-DHL-5, SU-DHL-6, SU-DHL-8, SU-DHL-10, SU-DHL-16, NUDL-1, NCEB-1, EJ-1, BCP-1, TUR или U-937;

линия клеток лимфомы Беркитта, представляющая собой Ramos/RA 1, Ramos.2G6.4C10, P3HR-1, Daudi, ST486, Raji, CA46, человеческий гамма-герпесвирус 4 / HHV-4 опухоли щеки от пациента с лимфомой Беркитта, DG-75, GA-10, NAMALWA, HS-Sultan, Jiyoye, NC-37, 20-B8, EB2, 1G2, EB1, EB3, 2B8, GA-10 клон 20, или HKB-11 / Kidney-B cell Hybrid;

линия клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, представляющая собой Толедо или Пфайффера;

линия клеток лимфомы клеток мантии, представляющая собой JeKo-1, JMP-1, PF-1, JVM-2, REC-1, Z-138, Mino или MAVER-1;

линия клеток острого миелоидного лейкоза, представляющая собой AML-193, BDCM, KG-1, KG-1a, Kasumi-6 или HL-60/S4;

линия клеток хронического миелолейкоза, представляющая собой K562, K562-r, K562-s, LAMA84-r, LAMA84-s, AR230-r или AR230-s;

линия клеток острого лимфобластного лейкоза, представляющая собой N6/ADR, RS4;11, NALM6 клон G5, Loucy, SUP-B15 или CCRF-SB;

линия клеток эритролейкемии, представляющая собой IDH2-mutant-TF-1 Isogenic линия клеток;

линия клеток миеломонобластного лейкоза, представляющая собой GDM-1;

линия клеток злокачественной неходжкинской NK-лимфомы, представляющая собой NK-92 или NK-92MI;

линия клеток миеломы/плазматомы, представляющая собой U266B1/U266, HAA1, SA13, RPMI-8226, NCI-H929 или MC/CAR;

линия клеток множественной миеломы, представляющая собой MM. 1R, IM-9 или MM. 1S;

линия клеток макрофагов, представляющая собой MD, SC или WBC264-9C.

Клетки-носители могут быть модифицированными или обработанными клетками, выбранными из перечисления:

мезенхимальная линия стволовых клеток, представляющая APCETH-201 (APCETH), APCETH-301 (APCETH), Cx601 (TIGENIX), TEMCELL, MSC-100-IV или Prochymal (MESOBLAST); или

индуцированная плюрипотентная стволовая клетка, представляющая собой ToleraCyte (Fate Therapeutics); или

клеточная линия фибробластов, представляющая собой CCD-16Lu или WI-38; или

клеточная линия ассоциированных с опухолью фибробластов, представляющая собой Malme-3M, COLO 829, HT-144, Hs 895.T, hTERT или PF179T CAF; или

линия эндотелиальных клеток, представляющая собой HUVEC, HUVEC/TERT 2 или TIME; или

линия эмбриональных эпителиальных клеток, представляющая собой HEK-293, HEK-293 STF, 293T/17, 293T/17 SF или HEK-293.2 sus; или

линия эмбриональных стволовых клеток, представляющая собой hESC BG01V; или

линия эпителиальных клеток, представляющая собой NuLi-1, ARPE-19, VK2/E6E7, Ect1/E6E7, RWPE-2, WPE-stem, End1/E6E7, WPMY-1, NL20, NL20-TA, WT 9-7, WPE1-NB26, WPE-int, RWPE2-W99 или BEAS-2B.

Клетки-носители могут быть модифицированными или обработанными клетками из линии клеток гематологической злокачественной опухоли человека. Клетки-носители могут быть модифицированными или обработанными клетками из линии опухолевых клеток человека. Клеточные линии включают, но не ограничиваются ими, клеточную линию, выбранную из NCI-60-панели, фибросаркомы, гепатокарциномы, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака головы и шеи, рака легких, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака толстой кишки, рака желудка, гинекологического рака, саркомы, меланомы, плоскоклеточного рака, гепатоцеллюлярной карциномы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточного рака,

эмбрионального рака, тератомы яичек, глиобластомы, астроцитомы, рака щитовидной железы или клеточной линия мезотелиомы.

Клетки-носители могут быть модифицированными или обработанными клетками из вакцины цельных опухолевых клеток GM-CSF (GVAX). GVAX может быть модифицирован или обработан, как описано в настоящем документе, так что он не будет индуцировать противовирусный ответ или другой иммунный ответ в течение времени, достаточного для доставки вируса к опухоли. Примеры GVAX включают в себя GVAX простаты; GVAX поджелудочной железы; GVAX легких; или GVAX почечных клеток, каждый из которых модифицирован или обработан, как описано в настоящем документе.

Онколитический вирус может быть любым из известных специалистам в данной области техники вирусом. Сюда входят онколитические вирусы, отобранные из числа вирусов болезни Ньюкасла, парвовируса, вируса кори, реовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV), аденовируса, полиовируса, вируса простого герпеса (HSV), поксвируса, вируса Коксаки (CXV) и вируса Сенека-Валли (SVV). В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой вирус осповакцины, такой как вакцина против оспы. Примеры вирусов осповакцины включают вирусы, полученные из штамма Lister, штамма Western Reserve (WR), штамма Copenhagen (Cop), штамма Bern, штамма Paris, штамма Tashkent, штамма Tian Tan, штамма Wyeth (DRYVAX), штамма IHD-J, штамма IHD-W, штамма Brighton, штамма Ankara, штамма CVA382, штамма Dairen I, штамма LC16m8, штамма LC16M0, модифицированного штамма осповакцины Ankara (MVA), штамма ACAM, штамма WR 65-16, штамма Connaught, штамма департамента здравоохранения Нью-Йорка (NYCBH), штамма EM-63, штамма NYVAC, штамма Lister LVP, штамма JX-594, штамма GL-ONC1 и мутантного штамма vvDD TK с делециями в VGF и TK (*см., например, McCart et al. (2001) Cancer Res 61:8751-8757*). Например, вирусом осповакцины может быть ACAM2000 или ACAM1000.

Вирусы могут быть онколитическими аденовирусами, такими как, *например*, ONYX-015, CG00070, Oncorin (H101), ColoAd1, ONCOS-102 или Delta24-RGD/DNX-2401. Вирус может быть модифицированным вирусом HSV-1 или вирусом кори.

Онколитические вирусы можно модифицировать так, чтобы они экспрессировали продукт гетерологичного гена и/или имели повышенную онкогенность и/или снижали токсичность (повышенная аттенуация). Вирусы могут кодировать детектируемый маркер для обнаружения в культуре клеток или у субъекта. Например, маркер может быть флуоресцентным белком, таким как Turbo-Red или GFP.

Клетки-носители могут быть сенсibilизированы или обработаны или сконструированы для достижения, усиления или улучшения (по сравнению с несенсибилизированным, обработанным или сконструированным вирусом) одного или нескольких из: амплификации вируса в клетке, блокирования индукции противовирусного состояния в субъекте или в микроокружении опухоли, иммунного подавления/иммунного уклонения, защиты от аллогенных детерминантов инактивации/отторжения и/или защиты от комплемента. При условии, что клетки-носители сенсibilизированы или сконструированы для усиления или улучшения амплификации вируса; или сенсibilизированы или обработаны или сконструированы для блокирования индукции противовирусного состояния в субъекте или в микроокружении опухоли; или обработаны, сенсibilизированы или сконструированы для усиления амплификации вируса путем предварительной обработки или лечения одним или несколькими цитокинами или факторами роста. Например, клетки-носители могут быть обработаны для ингибирования или модифицированы для экспрессии ингибитора интерферона- γ и/или интерферона- β . В некоторых вариантах осуществления вместо обработки клеток агентом агент и клетка могут быть совместно введены хозяину.

Примером клеток-носителей, сенсibilизированных для усиления амплификации вируса, являются клетки, сенсibilизированные предварительной обработкой или обработкой для загрузки клетки одним или несколькими из IL-10, Tgf β , VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, GM-CSF, агонистом RTK/mTOR, лигандом белка Wnt и ингибитором/антагонистом GSK3. Примерами клеток-носителей, которые были сенсibilизированы для блокирования индукции противовирусного состояния, являются клетки, сенсibilизированные предварительной обработкой или обработкой для загрузки клетки одним или несколькими мелкомолекулярными или белковыми ингибиторами, которые подавляют IFN типа I/типа II рецепторы, подавляют нисходящий сигнальный путь IFN, подавляют сигнальный путь IFNAR1/IFNAR2, подавляют сигнальный путь IFNGR1/IFNGR2, подавляют сигнальный путь STAT1/2, подавляют сигнальный путь Jak1, подавляют сигнальный путь Jak2, подавляют сигнальный путь IRF3, подавляют сигнальный путь IRF7, подавляют сигнальный путь IRF9, подавляют сигнальный путь TYK2, подавляют сигнальный путь TBK1 или подавляют другие сигнальные пути, которые влияют на иммунный ответ против онколитического вируса в клетке или субъекте. Примером клеток-носителей, сенсibilизированных для блокированию индукции противовирусного состояния, являются те, которые сенсibilизированы предварительной обработкой или обработкой для загрузки клетки одним или несколькими ингибиторами HDAC, для вмешательства/дерегуляции передачи сигналов

IFN/реактивности. Примерные ингибиторы HDAC включают, но не ограничиваются ими, те, которые выбраны из числа вориностата, ромидепсина, хидамида, панобиностата, белиностата, вальпроевой кислоты, моцетиностата, абексинастата, энтиностата, SB939, ресминостата, гивиностата, квизиностата, HBI-8000, Кеветрина, CUDC-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, ACY-1215, ME-344, сульфорафан или трихостатин. Примером клеток-носителей, сенсibilизированных для блокирования индукции противовирусного состояния или усиления амплификации вируса, являются клетки, которые сенсibilизированы предварительной обработкой или обработкой для загрузки клетки антагонистами вирусного чувствительного и/или антивирусной путей. К вирусным чувствительным и/или защитным путям относятся те, которые индуцируются или модулируются одним или несколькими из STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3 и DAI (ZBP1). Антагонисты, которые влияют на один или несколько из этих путей, включают, *например*, один или несколько белков осповакцины K1, E3L и K3L; белки гриппа NS1/NS2; белки гепатита С NS3-4A; белки аренавируса NP и Z; Вирус Эбола VP35; HSV US11, ICP34.5 и ICP0; MCMV M45; и белок вируса болезни Борна X.

Примерами клеток-носителей, которые были сенсibilизированы для защиты их от детерминант инактивации/отторжения, являются клетки, сенсibilизированные предварительной обработкой или обработкой для загрузки клетки одним или несколькими основными антагонистами гистосовместимости вируса (MHC). К примерам антагонистов MHC относятся те, которые выбраны из числа одного или нескольких антагонистов MHC1 A40R из осповакцины; Nef и TAT от HIV; E3-19K из аденовируса; ICP47 от HSV 1 и HSV2; CPXV012 и CPXV203 от коровьей оспы; ORF66 вируса ветряной оспы (VZV); EBNA1, BNLF2a, BGLF5 и BILF1 из вируса Эпштейна-Барра (EBV); US2/gp24, US3/gp23, US6/gp21, US10 и US11/gp33 из цитомегаловируса человека (hCMV); Rh178/VIHCE из CMV-резуса (RhCMV); U21 из вируса герпеса человека-6 или HHV7; LANA1, ORF37/SOX, kK3/MIR1 и kK5/MIR2 из вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши (KSHV); mK3 из вируса гепатита мышей-68 (MHV-68); UL41/vhs из альфа-вируса герпеса, вируса простого герпеса (HSV), вируса герпеса крупного рогатого скота-2 (BHV-1) и вируса псевдобешенства (PRV); UL49.5 из вируса ветряной оспы, BHV-1, вируса герпеса лошадей 1 и 4 (EHV-1/4) и PRV; и m4/gp34, m6/gp48, m27 и m152/gp40 из мышинового CMV (mCMV). Другими антагонистами для предварительной обработки или лечения являются те, которые обрабатываются для загрузки клетки антагонистами генов, связанных с цепью MHC

человека класса I, MICA и MICB, или антагонистами бета-2 микроглобулина (B2M) вирусного происхождения.

Примерами клеток-носителей, которые были сенсibilизированы для усиления иммунной супрессии/уклонения от иммунитета, являются клетки, сенсibilизированные предварительной обработкой или обработкой для загрузки клетки иммуносупрессивными факторами вирусного происхождения. Примером таких факторов является/являются один или несколько ингибиторов иммунного апоптоза, индуцированного FAS/TNF/гранзимом B, антагонист IL-1/NFkB/IRF3, антагонист IL-1 и toll-подобных рецепторов (TLR), антагонист IL-1 β , блокатор TNFa, блокатор IFNa/ β и блокатор IFNy.

Примером клеток-носителей, которые были сенсibilизированы для усиления иммунного подавления/иммунного уклонения, являются те, которые сенсibilизированы предварительной обработкой или обработкой для загрузки клетки одним или несколькими низкомолекулярным(-и) ингибитор(-ами) одного или нескольких антигенных пептидных транспортеров-1/2 (TAP-1 и TAP-2) и тапазина.

Клетки-носители также могут быть сенсibilизированы для защиты от комплемента. Это может быть достигнуто, *например*, путем предварительной обработки или обработки для загрузки клетки антителом или небольшой молекулой или другим ингибитором белка комплемента. Белки комплемента, которые могут быть нацелены, включают C3 и C5. Как описано выше и ниже, и приведено здесь на примере, существует множество известных ингибиторов C3 и C5, включая антитела-антагонисты, специфичные для каждого, и низкомолекулярные ингибиторы.

Клетки-носители обычно предварительно обрабатываются агентом, который сенсibilизирует или защищает. Предварительную обработку можно проводить за 15 мин до 48 ч до вирусной инфекции, после вирусной инфекции, или перед введением субъекту, или перед хранением.

Клетки-носители также могут быть сенсibilизированы или сконструированы для длительного выживания и улучшенной местной иммуносупрессии, чтобы уменьшить или ограничить опосредованное вирусом убийство. Агенты для осуществления этого включают агонист(-ы), один или несколько STING, PKR, RIG-I, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3, и DAI (ZBP1) которые могут быть сконструированы для экспрессии клеткой или вирусом под контролем промотора, который соответствующим образом увеличивает экспрессию, или путем введения субъекту, чтобы клетки-носители не были убиты вирусом слишком рано, но не были убиты или ингибированы иммунной системой хозяина до доставки вируса в опухоли.

Клетки-носители, представленные в настоящем документе, также могут быть сконструированы для улучшенной вирусной амплификации и/или иммуномодуляции. Это может быть осуществлено, *например*, одним или несколькими из следующих способов: а) конструирование для предотвращения или невосприимчивости к индуцированному интерфероном противовирусному состоянию; б) конструирование для уклонения от аллогенного распознавания одной или несколькими Т-и НКТ-клетками и/или приобретенных иммунных реакций $\gamma\delta$ Т-клеток; в) конструирование для уклонения от аллогенного распознавания NK-клетками и/или врожденных иммунных реакций $\gamma\delta$ Т-клеток г) конструирование экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого или вирусного происхождения для предотвращения/ингибирования аллогенных анти-клеточных или противовирусных иммунных реакций; д) конструирование для экспрессии факторов, происходящих из раковых или стволовых клеток, которые облегчают вирусную инфекцию иначе не допускают инфицирование; е) конструирование для экспрессии факторов, препятствующих функции комплемента и/или нейтрализующих антител.

Например, для а) клетки - носители могут быть сконструированы для предотвращения или невосприимчивости к индуцированному интерфероном противовирусному состоянию путем временного или постоянного подавления рецепторов IFN типа I/типа II и/или нисходящего сигнального пути, причем постоянное подавление может быть осуществлено путем удаления подавляемого локуса. Подавление может быть осуществлено путем подавления экспрессии одного или нескольких рецепторов интерферона типа I/типа II, экспрессии рецептора IFN α/β , экспрессии рецептора IFN γ , экспрессии рецептора IFNAR1/IFNAR2, экспрессии рецептора IFNGR1/IFNGR2, экспрессии рецептора STAT1/2, экспрессии рецептора Jak1/2, экспрессии рецептора IRF3, экспрессии рецептора IRF7, экспрессии рецептора IRF9, экспрессии киназы TYK2 и экспрессии киназы TBK1. В другом примере для а) клетки-носители могут быть сконструированы, чтобы предотвратить или быть невосприимчивым к индуцированному интерфероном противовирусному состоянию путем временного или постоянного подавления элементов цитозольной вирусной ДНК/РНК – чувствительного и противовирусного защитного механизма. Это может быть достигнуто подавлением одного или нескольких STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3 и DAI (ZBP1). В других вариантах а) осуществления клетки-носители могут быть сконструированы для предотвращения или невосприимчивости к индуцированному интерфероном противовирусному состоянию путем временной или постоянной экспрессии антагонистов вирусочувствительных и противовирусных

защитных путей, опосредованных STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3, DAI (ZBP1). Антагонисты включают, но не ограничиваются ими, один или более белков осповакцины K1, E3L и K3L; белки гриппа NS1/NS2; белки гепатита С NS3-4A; белки аренавируса NP и Z; Вирус Эбола VP35; HSV US11, ICP34.5 и ICP0; MCMV M45; и белок вируса болезни Борна X.

Например, для b) клетки-носители могут быть сконструированы, чтобы избежать аллогенного распознавания одной или более Т-и NKT-клетками и/или приобретенными иммунными реакциями $\gamma\delta$ Т-клеток. Это может быть осуществлено, *например*, одним или обоими из следующих способов: (i) временным или постоянным подавлением одной или нескольких молекул МНС класса I, молекул МНС класса II, МНС-подобных молекул и регуляторов транскрипции или экспрессии МНС класса I, МНС класса II и МНС-подобных молекул; и/или (ii) временной или постоянной экспрессией антагонистов В2М вирусного происхождения и/или антагонистов МНС вирусного происхождения. Временное или постоянное подавление одной или нескольких молекул МНС класса I может осуществляться, *например*, путем постоянного или временного подавления HLA-A, В и/или С; временное или постоянное подавление одной или нескольких молекул МНС класса II осуществляется путем подавления одного или нескольких из HLA-DP, DQ и DR; временное или постоянное подавление одной или нескольких молекул, подобных МНС, осуществляется путем подавления CD1a / b / c / d; временное или постоянное подавление одного или нескольких регуляторов транскрипции или экспрессии МНС класса I, МНС класса II и МНС-подобных молекул осуществляется путем подавления одного или нескольких из TAP1/2, Тапасин, Beta-2 микроглобулин, СИТА, RFXANK, RFX5 и RFXAP.

Временное или постоянное подавление В2М и/или МНС может осуществляться, *например*, посредством временной или постоянной экспрессии одного или нескольких антагонистов В2М вирусного происхождения, выбранных из UL18 из hCMV, и одного или нескольких антагонистов МНС, выбранных из одного или больше антагониста МНСI A40R из осповакцины; Nef и TAT от HIV; E3-19K из аденовируса; ICP47 от HSV 1 и HSV2; CPXV012 и CPXV203 от коровьей оспы; ORF66 вируса ветряной оспы (VZV); EBNA1, BNLF2a, BGLF5 и BILF1 из вируса Эпштейна-Барра (EBV); US2/gp24, US3/gp23, US6/gp21, US10 и US11/gp33 из цитомегаловируса человека (hCMV); Rh178/VIHCE из CMV-резуса (RhCMV); U21 из вируса герпеса человека-6 или HHV7; LANA1, ORF37/SOX, kK3/MIR1 и kK5/MIR2 из вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши (KSHV); mK3 из вируса гепатита мышей-68 (MHV-68); UL41/vhs из альфа-вируса герпеса, вируса простого герпеса (HSV), вируса герпеса крупного рогатого

скота-2 (BHV-1) и вируса псевдобешенства (PRV); UL49.5 из вируса ветряной оспы, BHV-1, вируса герпеса лошадей 1 и 4 (EHV-1/4) и PRV; и m4/gp34, m6/gp48, m27 и m152/gp40 из мышинового CMV (mCMV).

Например, для с) клетки-носители могут быть сконструированы так, чтобы уклоняться от аллогенного распознавания NK-клетками и/или врожденных иммунных ответов $\gamma\delta$ Т-клеток посредством одного или обоих: (i) временного или постоянного подавления: мембраносвязанного MICA/B или мембраносвязанный PVR или мембраносвязанный нектин-2, где постоянное подавление может быть достигнуто путем делеции локуса; и (ii) временную или постоянную экспрессию: антагонистов MICA и MICB, антагонистов рецептора NKG2D, антагонистов NCR, лигандов рецепторов, ингибирующих NK (KIR), и лигандов рецепторов, ингибирующих NK, NKG2a/CD94. Например, клетки-носители могут быть сконструированы так, чтобы уклоняться от аллогенного распознавания NK-клетками и/или врожденных иммунных ответов $\gamma\delta$ Т-клеток посредством одного или обоих из: (i) временного или постоянного подавления лигандов NKG2D и/или лигандов DNAM-1; и (ii) временная или постоянная экспрессия антагониста MICA и MICB, kK5 (из вируса саркомы Капоши (KHSV)); антагонист рецептора NKG2D Cowpox OMCP; антагонисты NCR, нацеленные на рецепторы NKp30, NKp44, NKp46, гемагглютинин (HA из вирусов коровьей оспы и других вирусов); лиганды для рецепторов, ингибирующих NK (KIR), выбранные из HLA-Bw4 и HLA-C2; и лиганды для рецепторов, ингибирующих NK (NKG2a / CD94), выбранные из HLA-E и его производных по отдельности или в сочетании с лигандами 21M HLA-B для образования HLA-E-связывающих пептидов и стабилизации поверхностной экспрессии HLA-E.

Например, для г), клетки-носители могут быть сконструированы для экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого или вирусного происхождения для предотвращения/ингибирования аллогенных антиклеточных или противовирусных иммунных ответов. Это может быть осуществлено, *например*, путем конструирования клеток-носителей для экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого или вирусного происхождения для предотвращения/ингибирования аллогенного антиклеточного носителя или противовирусных иммунных ответов. Факторы человеческого происхождения включают, но не ограничиваются ими, один или несколько из следующих: IDO, аргиназа, TRAIL, iNOS, IL-10, TGF β , VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, sMICA, sMICB, sHLA-G, HLA-E, PD-L1, FAS-L, B7-H4 и одноцепочечные антитела (scFv), которые нацелены или истощают NK- и/или NKT-клетки, и/или $\gamma\delta$ Т-клетки. F- субъекты вирусного происхождения включают, но не

ограничиваются ими, один или несколько из: экстремелии / вируса коровьей оспы SPI-2 / CtmA (ингибитор иммунного FAS / TNF / гранзима В-индуцированного апоптоза), вируса осповакцины, кодируемого N1 (IL-1 / NFkB / IRF3 антагонист), HA (антагонисты NCR, нацеленные на NKp30, NKp44, NKp46), IL-18-связывающий белок, A40R, A46R, A52R, B15R / B16R, блокаторы TNF α (*например*, CmrC / CmrE вируса осповакцины), IFN α/β -блокаторы (*например*, вирус осповакцины B18R / B19R), блокаторы IFN γ (*например*, вирус осповакцины B8R) и другие антагонисты IL-1 / IL-1 β / NFkB / IRF3 / NCR / MHCI / TLR / NKG2D.

Например, для е) клетки-носители могут быть сконструированы для экспрессии факторов, происходящих от рака или стволовых клеток, которые облегчают вирусную инфекцию, в противном случае не допускают инфицирование (непермиссивные) клеточных носителей и/или опухолевых клеток. Это может быть достигнуто, *например*, путем конструирования клеток-носителей для экспрессии факторов рака или стволовых клеток, которые способствуют вирусной инфекции, в противном случае не допускают инфицирование клеточных носителей и/или опухолевых клеток, при этом факторы выбираются из одного или более факторов роста и цитокинов, способствующих вирусной инфекции. Примеры факторов включают, но не ограничиваются ими, один или несколько из антигенов, связанных с раком, онкофетальных антигенов, онкогенов/супрессоров опухолей, дифференцирующих антигенов, GM-CSF, IL-10, TGF β , VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL -6, агонисты RTK / mTOR и белковые лиганды Wnt.

Например, для f) клетки-носители могут быть сконструированы для экспрессии факторов, влияющих на функцию комплемента и/или нейтрализующих антител. Это может быть осуществлено, *например*, путем создания клеток-носителей для экспрессии факторов, влияющих на функцию комплемента и/или нейтрализующих антител, выбранных из белковых антагонистов белка комплемента и/или антитела, которое ингибирует белок комплемента. Например, факторы, влияющие на функцию комплемента и/или нейтрализующих антител, включают, но не ограничиваются ими, белковые антагонисты факторов комплемента (*например*, белки комплемента C1, C2, C3, C4, C5, MBL), контроль комплемента вируса осповакцины. белок (VCP), ингибитор комплемента вируса осповакцины (B5R), scFv анти-CD1q/CD1r/CD1s, анти-C3-антитела, анти-C5-антитела (*например*, экулизумаб), пептидные C3-ингибиторы семейства компстатина (*например*, Cp40), человеческие растворимые мембранные (s/m) белки (*например*, s/mCR1 (CD35), s/mCR2 (CD21), s/mCD55, s/mCD59), человеческий фактор H и его производные, а также факторы и производные яда кобры с ингибирующей активностью комплемента.

Также предусмотрены модифицированные клеточные носители или клетки-носители, которые включают одну или несколько модификаций, выбранных из числа: а) сенсibilизации клеточного носителя для усиления способности вируса к амплификации; б) сенсibilизации клеточного носителя для блокирования индукции противовирусных реакций и/или улучшения иммунного уклонения/иммунного подавления; в) защиты клеточного носителя от аллогенной инактивации и/или отторжения субъектом; г) защиты клеточного носителя от комплемента; и/или д) придания клеточному носителю устойчивости к опосредованному вирусом убийству.

Также предоставлены клетки-носители, сконструированные для: а) временной или постоянной экспрессии или подавления гена, который делает клеточный носитель невосприимчивым к индуцированному интерфероном антивирусному ответу; б) временная или постоянная экспрессия или подавление гена для облегчения уклонения от аллогенного распознавания Т-клетками и НКТ-клетками и $\gamma \delta$ Т-клетками; в) временная или постоянная экспрессия или подавление гена для облегчения уклонения от аллогенного распознавания НК-клетками; г) временная или постоянная экспрессия иммуносупрессивных факторов; д) временная или постоянная экспрессия факторов, которые способствуют ассоциации вируса с клеточным носителем; е) временная или постоянная экспрессия факторов, которые мешают функции комплемента и/или нейтрализующих антител. Дополнительные модификации могут включать в себя одно или несколько из: а) сенсibilизацию клеточного носителя для повышения способности амплификации вируса; б) сенсibilизация клеточного носителя для блокирования индукции противовирусных ответов и/или для усиления иммуносупрессии / иммунного уклонения от клеточного носителя; с) защита клеточного носителя от аллогенной инактивации и/или отторжения субъектом; г) защита клеточного носителя от комплемента; и/или д) придание клеточному носителю устойчивости к опосредованному уничтожению вирусом.

Любая из клеток-носителей, содержащих онколитический вирус, представленных в настоящем документе, может быть использована в способах лечения, включающих введение клеток-носителей субъекту, страдающему раком. Также предоставлено использование клеток для лечения рака. Введение может быть системным или местным, а также парентеральным, *например*, внутривенным. Раки включают солидные опухоли и гематологические злокачественные новообразования, а также метастатический рак. Клетки-носители могут быть аллогенными или аутологичными по отношению к субъекту. Если выбраны аллогенные, клетки-носители могут быть сопоставлены с субъектом. В частности, сопоставление может быть выполнено способами, описанными

ниже. Следовательно, предусмотрены применения и способы лечения рака, в которых клетки-носители, которые содержат онколитический вирус, вводят субъекту, и клетка-носитель совпадает или была сопоставлена с субъектом; а клетка-носитель представляет собой: клетку, в которой вирус может реплицироваться; и клетка, которая была обработана или модифицирована, или и то, и другое (либо то же самое: и клетка, которая была обработана и/или модифицирована), для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки, и/или была обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке, посредством чего клетка преодолевает врожденные/приобретенные иммунные барьеры субъекта, чтобы доставить вирус к опухоли. Такими клетками являются любые описанными в данном документе клетки-носители.

Субъекты для лечения включают животных, особенно млекопитающих, включая домашних животных, животных из зоопарков и сельскохозяйственных животных, а также людей. Не относящиеся к человеку, включают, *например*, собак, кошек, лошадей, свиней, коров, коз и нечеловеческих приматов, таких как шимпанзе, гориллы, бонобо и бабуины.

Способы лечения и применения клеток-носителей включают те, в которых клетки-носители, содержащие онколитический вирус, вводят субъекту, страдающему раком, где: клетки-носители являются аллогенными для субъекта и сопоставлены с субъектом; а клетка-носитель представляет собой: клетку, в которой вирус может реплицироваться; и клетка, которая была обработана или модифицирована, или и то, и другое для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки, и/или была обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке, посредством чего клетка преодолевает врожденные/приобретенные иммунные барьеры субъекта, чтобы доставить вирус к опухоли.

Способы лечения и применения клеток-носителей включают те, в которых клетки-носители, содержащие онколитический вирус, вводят субъекту, страдающему раком, где клетки-носители являются аллогенными для субъекта и сопоставлены с субъектом. Сопоставление может быть выполнено способами, описанными в данном документе.

Также предложены применения клеток-носителей для лечения рака, где: клетка-носитель включает онколитический вирус; клетка-носитель совпадает или была сопоставлена с субъектом; а клетка-носитель представляет собой: клетку, в которой вирус может реплицироваться; и клетка, которая была обработана или модифицирована,

или и то, и другое для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки, и/или была обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке, посредством чего клетка преодолевает врожденные/приобретенные иммунные барьеры субъекта, чтобы доставить вирус к опухоли. Предусмотрено использование, при котором: клетки-носители содержат онколитический вирус; клетки-носители соответствуют или были сопоставлены с субъектом; и клетки-носители описаны здесь. Клетки-носители могут быть аутологичными или аллогенными. Когда они аллогенные, они могут быть сопоставлены субъекту, *например*, способами сопоставления, описанными в данном документе.

Раки, которые можно лечить с помощью клеток-носителей, способов и применений, представленных в настоящем документе, включают солидные опухоли, гематологические злокачественные новообразования и метастатические раковые образования. Раковые опухоли включают, но не ограничиваются ими, опухоли, выбранные из лейкозов, лимфом, меланом, карцином, сарком, миелом и нейробластом. Другие виды рака включают, но не ограничиваются ими, рак поджелудочной железы, рак легких, рак яичников, рак груди, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак простаты, рак мозга, рак центральной нервной системы, аденокарциномы, рак печени, рак кожи, гематологические раковые заболевания, рак желчных путей, рак костей, хориокарцинома, рак толстой и прямой кишки, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаз, рак головы и шеи, рак желудка, внутриэпителиальное новообразование, рак почки, гортани рак, рак полости рта, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак дыхательной системы, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы. Другие включают, помимо прочего, лимфому Ходжкина, неходжкинские лимфомы, рак толстой кишки, базальноклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак губы, рак языка, рак ротовой полости, глиомы и рак глотки.

Как описано в данном документе, клетки-носители можно обрабатывать или модифицировать, чтобы они имели улучшенные свойства вирусной амплификации и/или имели улучшенные иммуносупрессивные или иммунные привилегированные свойства. Клетки-носители можно сенсibilизировать путем предварительной обработки факторами, которые способствуют амплификации вируса и/или иммуносупрессивным или иммунопривилегированным свойствам клеток-носителей. Клетки-носители могут быть сконструированы для улучшения их потенциала амплификации вируса.

В способах и применениях клетки-носители с вирусом можно вводить вместе, последовательно или после введения клеток-носителей, не инфицированных вирусом, которые сначала предварительно обрабатывают IFN-гамма и вводят или используют перед введением клетки-носителя, содержащей вирус или одновременно с клеткой-носителем, содержащей вирус.

Клетки-носители, способы и применения, представленные в настоящем документе, могут быть использованы в комбинированной терапии с другим противораковым агентом или лечении с помощью другой противораковой терапии, такой как лучевая терапия и/или хирургия. Примеры дополнительных противораковых агентов или методов лечения включают, но не ограничиваются ими, агонисты иммунной стимуляции, BiTE, клетки CAR-T и трансгенные T-клетки TCR, нацеленные на опухолеспецифические антигены, ингибиторы контрольных точек, химиотерапевтические соединения/антитела и иммунодепрессанты. Дополнительные противораковые агенты включают, но не ограничиваются ими, иммунотерапию и/или иммунодепрессивное лекарство. Дополнительные противораковые агенты или методы лечения включают, но не ограничиваются ими, агенты, выбранные из семейства B7 (CD28, ICOS); семейство TNFR, выбранное из 4-1BB, OX40, GITR, CD40, CD30 и CD27; LIGHT; LT-alpha; ингибиторы контрольных точек, которые нацелены на один или несколько из PD-1, PD-2, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, IDO 1 и 2, CTNNB1 (β -катенин), SIRP α , VISTA, LIGHT, HVEM, LAG3, TIM3, TIGIT, галектин-9, KIR, GITR, TIM1, TIM4, CEACAM1, CD27, CD40 / CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD112, CD137 (4-1BB), CD155, CD160, CD200, CD226, CD244 (2B4), CD272 (BTLA), B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, ICOS, A2aR, A2bR, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B, HLA-G, ILT-2/4 и OX40 / OX-40L, MDR1, аргиназа1, iNOs, IL-10, TGF- β , pGE2, STAT3, VEGF, KSP, HER2, Ras, EZH2, NIPP1, PP1, TAK1 и PLK1a; химиотерапевтические соединения и антитела, выбранные из цитокинов, хемокинов, факторов роста, фотосенсибилизирующих агентов, токсинов, противораковых антибиотиков, химиотерапевтических соединений, радионуклидов, ингибиторов ангиогенеза, модуляторов передачи сигналов, антиметаболитов, противораковых вакцин, противораковых олигопептидов, белков-ингибиторов митоза, антимиотические олигопептиды, противораковые антитела, иммунотерапевтические агенты; и иммунодепрессанты, выбранные из глюкокортикоидов (например, преднизона, дексаметазона, гидрокортизона), ингибиторов кальциневрина (например, циклоспорина, такролимуса), ингибиторов mTOR (например, сиролимуса, эверолимуса), метотрексата, флуклофоприломида,

леналидоспуриномида, блокирующие TNF α антитела (*например*, инфликсимаб / ремикейд, этанерцепт / энбрел, адалимумаб / хумира) и флударабин.

Как обсуждалось выше, для использования в способах и применениях клетки-носители, когда они аллогенные, могут быть сопоставлены с субъектом, которому они должны вводиться или которому они вводятся. Также предусмотрены методы сопоставления.

Клетки-носители могут быть сопоставлены с иммунными клетками от субъекта, которому эта клетка вводится, для идентификации клетки-носителя, которая достаточно иммунологически совместима с иммунными клетками от субъекта для доставки вируса субъекту. Кроме того, клетки-носители могут быть сопоставлены с вирусом, при этом измеряется способность клетки к амплификации вируса. Комбинацию клетки-носителя/вируса также можно сопоставить с субъектом. Иммунные клетки субъекта включают, *например*, моноклеарные клетки периферической крови (РВМС). Метод сопоставления может включать тестирование способности вируса к репликации в клетке и/или способности клетки способствовать амплификации вируса. Способы и методы использования клетки включают методы сопоставления, при которых способность вируса к репликации в клетке и/или способность клетки способствовать амплификации вируса проверяется путем совместного культивирования клетки и вируса и измерения скорости распространения вируса. Способность вируса к репликации в клетке и/или способность клетки способствовать амплификации вируса измеряется, *например*: а) измерением скорости амплификации вируса с использованием множественности инфекции (МОИ), равной или приблизительно 0,01- 10, и совместное культивирование в течение периодов от 1 дня до примерно 1 недели (24 часа-1 неделя) в эквивалентных условиях анализа; б) нормализация относительно количества инфицированных клеток-носителей, где: нормализованные значения БОЕ на клетку, измеренные в эквивалентных условиях анализа, могут использоваться для вычисления показателя амплификации вируса (VAS), который предназначен для ранжирования комбинации клетка-носитель + вирус как подходящая (или нет) для терапии; количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) на клетку-носитель, равное 1-10, считается ограниченной эффективностью (в качестве клеточного носителя для конкретного вируса); 10-100 БОЕ на клетку - хорошая активность; 100-1000 БОЕ на клетку - очень хорошая активность; БОЕ на клетку более 1000 - чрезвычайно высокая эффективность; и в) комбинации клеток-носителей и вирусов, демонстрирующие, что БОЕ/клетка составляет по меньшей мере 10, рассматриваются для тестирования в скринингах совместимости клеток с субъектом.

В соответствии с этими методами: комбинация клетки-носителя/вируса подбирается для субъекта, подлежащего лечению, путем а) оценки специфичного для пациента генетического полиморфизма для идентификации гаплотипа МНС I/II, гаплотипа KIR и лигандов и неклассического гаплотипа МНС, включая один или несколько из HLA-E, CD1a, b, c, d, MICA/B; б) сравнение профиля генетического полиморфизма субъекта с профилем доступных клеток-носителей для идентификации среди клеток-носителей клеток, наиболее совместимых с субъектом; в) оценка совместимости клеток-носителей и иммунных клеток-субъектов путем совместного культивирования клеток, вирусов и иммунных клеток; г) оценка уровня вирусной амплификации. Таким образом, способ сопоставления может дополнительно включать: д) измерение клетки-носителя + биопсии живой опухоли +/- вируса путем обнаружения носителя направленной миграции опухолевых клеток и амплификации вируса для идентификации клеток-носителей/вируса для введения, где: амплификация вируса у субъекта. биопсия опухоли + клеточные носители: на 5% или больше, чем сумма вирусной амплификации в одной биопсии опухоли при эквивалентных условиях + вирусная амплификация только на клеточных носителях в эквивалентных условиях; или по меньшей мере на 5% или больше, чем амплификация вируса при биопсии одной опухоли в эквивалентных условиях.

Способ сопоставления может дополнительно включать анализ совместного культивирования для оценки восприимчивости субъекта к виротерапии, опосредованной клетками-носителями, путем культивирования полученных от субъекта РВМС + клетки-носителя + вируса. Способы, применение, клетки могут включать: измерение амплификации вируса в совместных культурах РВМС, полученных от субъекта, + клетка-носитель + вирус, где соответствие: совместимо, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента превышает 80% амплификации вируса, когда та же самая клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС; умеренно совместимый, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента находится в диапазоне 30-80% амплификации вируса, когда одна и та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС; минимально совместимый, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента находится в диапазоне 10-30% амплификации вируса, когда одна и та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС; несовместимо, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента составляет менее 10% от амплификации вируса, когда одна и та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС; и% совместимости можно использовать для

ранжирования клеток-носителей от наименее до наиболее совместимых клеток-носителей для каждого отдельного пациента и для каждого конкретного вируса.

В настоящем документе предоставлены способы, включая методы сопоставления и применения, где соответствие между клеткой-носителем и субъектом путем выбора клеточного носителя, подходящего для доставки онколитического вируса субъекту, страдающему раком, осуществляется способом, включающим идентификацию одного или нескольких из следующих детерминант (а) - (е) как указывающих на совпадение между клеткой-носителем и субъектом:

а) клеточный носитель и субъект имеют идентичные аллели на 50% или более из следующих генетических локусов в сочетании:

(i) гаплотипы МНС I и/или МНС II;

(ii) гаплотип KIR и/или гаплотип лиганда KIR; и

(iii) гаплотипы HLA-E, CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d;

б) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции клетки в опухоль (CTMS), составляющий 20% или более клеток-носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(ii) показатель миграции от опухоли к клеткам (TCMS), составляющий 20% или более раковых клеток, мигрирующих к клеткам-носителям; и/или

(III) совокупная оценка миграции (MPC) из $[(I) + (II)] / 2$, по меньшей мере, на 20%;

в) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с онколитическим вирусом и раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции нагруженных вирусом клеток к опухоли (V-CTMS), составляющий 20% или более клеток-носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(II) показатель миграции нагруженных вирусом клеток от опухоли (V-TCMS) 20% или более раковых клеток, мигрирующих в сторону клеток-носителей; и/или

(III) совокупный показатель миграции (V-MRS) из $[(I) + (II)] / 2$, по меньшей мере на 20%;

г) когда клеточный носитель инкубируется в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, показатель иммунологической вирусной амплификации (IVAS), представляющий количество вирусной амплификации в присутствии иммунных клеток, полученных от субъекта, родственника к количеству вирусной амплификации, полученной в эквивалентных

условиях, за исключением отсутствия иммунных клеток, полученных от субъекта, составляет не менее 20%;

д) когда клеточный носитель инкубируют в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, показатель иммунологической совместимости (ICS), представляющий иммунный ответ в присутствии клеточного носителя относительно иммунного ответа при эквивалентных в условиях, за исключением отсутствия клеточного носителя, составляет $\leq 200\%$, при этом иммунный ответ определяется степенью экспрессии одного или нескольких из следующих факторов:

(i) $IFN\gamma$;

(ii) один или несколько маркеров, связанных с цитотоксичностью, опосредованной Т-клетками, $\gamma\delta$ Т-клетками, НК-клетками и/или NKT-клетками; и/или

(iii) один или несколько маркеров, связанных с Т-клеткой, $\gamma\delta$ Т-клеткой, НК-клеткой и/или активаторной/эффекторной функцией (ами) NKT-клеток;

е) когда клеточный носитель инкубируется в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, клеточный носитель не усиливает противовирусный иммунный ответ и/или подавляет противовирусный иммунный ответ по сравнению с идентичным условием, за исключением отсутствия клеточного носителя, что определяется по шкале иммунологического подавления (ISS) $\geq 0\%$ в соответствии с уравнением:

$$ISS\% = [(IV + IC) - ICV] / (IV + IC) \times 100, \text{ где:}$$

IV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре вируса + иммунных клеток, полученной от субъекта;

IC = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта + клеточный носитель;

ICV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта + клеточный носитель + вирус; и

уровень экспрессии маркера представляет собой уровень экспрессии одного или нескольких маркеров, указанных в (i), (ii) и (iii) из д);

если удовлетворяет одно или несколько из а) - е), то идентифицируют соответствия между клеточным носителем и субъектом и выбор клеточного носителя как подходящего для доставки онколитического вируса субъекту.

Способ сопоставления может включать дополнительные один или несколько пунктов а) - е): определение показателя вирусной амплификации (VAS) как БОЕ/клетки, когда клеточный носитель инкубируется с вирусом; и если оценка по VAS составляет не

менее 10, выбор клеточного носителя для дальнейшего тестирования с использованием одного или нескольких детерминант (а) - (е) и определение, есть ли совпадение между клеточным носителем и субъектом.

Способы сопоставления могут быть мультиплексированы на панели из нескольких вариаций возможных клеток-носителей, чтобы ранжировать их на основе эффективности или доставки онколитического вируса субъекту, при этом ранг 1 является наиболее желательным, наивысший ранг и большие числа представляют меньшие желаемые ранги мультиплексным методом, включающим:

(i) измерение значения (значений) одного или нескольких из а) - е) для каждого клеточного носителя на панели и ранжирование клеточного носителя в соответствии с измеренным значением(-ями), при этом:

для а), чем выше идентичность аллелей между клеточным носителем и субъектом, тем выше ранг клеточного носителя;

для б) чем выше баллы CTMS, TCMS и/или MRS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для в), чем выше баллы V-CTMS, V-TCMS и/или V-MRS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для г), чем выше оценка IVAS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для д) чем ниже балл ICS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя; и

для е), чем выше оценка ISS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя; и/или

(ii) для каждого клеточного носителя в панели, получение совокупного ранга, который представляет собой среднее значение двух или более рангов на основе измерения значения (значений) двух или более из а) - е), и ранжирование клеточного носителя в панель в соответствии с их совокупным рангом.

Мультиплексный способ может дополнительно включать:

(i) для каждого клеточного носителя в панели получение показателя вирусной амплификации (VAS) как БОЕ/клетка, когда клеточный носитель инкубируют с вирусом;

(ii) для каждого клеточного носителя в панели получение совокупного ранга, который представляет собой среднее значение двух или более рангов на основе измерения оценки VAS и значения одного или более из а) - е); и

(iii) ранжирование группы клеточных носителей в соответствии с их совокупным рангом.

В способах сопоставления оценка ICS и/или оценка ISS получают на основе измерения экспрессии маркера в совместной культуре клеток.

Показатель ICS и/или показатель ISS можно получить на основании измерения экспрессии маркера в супернатантах совместной(-ых) культуры(-ах); и/или показатель IVAS, скорректированный на влияние сыворотки субъекта на вирусную амплификацию способом, включающим: (i) совместное культивирование г), добавление сыворотки от субъекта в количестве от 10 до 50% по весу. (или об./об.) объема совместного культивирования; (ii) вычисление шкалы устойчивости испытуемых к сыворотке (SSRS) по формуле:

$$SSRS = \frac{\text{БОЕ/клетка без сыворотки} - \text{БОЕ/клетка с сывороткой}}{\text{БОЕ/клетка без сыворотки}}; \text{ и}$$

(iii) вычисление процентной оценки IVAS, скорректированной по SSRS, по формуле: $IVAS \text{ (с поправкой на SSRS)} = IVAS \times (1 - SSRS) \times 100$.

Предоставлены способы выбора клеточного носителя, подходящего для доставки онколитического вируса субъекту, страдающему раком (методы сопоставления). Эти методы включают определение одного или нескольких из следующих детерминант (а) - (е), указывающих на соответствие между клеточным носителем и субъектом:

а) клеточный носитель и субъект имеют идентичные аллели на 50% или более из следующих генетических локусов в сочетании:

(i) гаплотипы МНС I и/или МНС II;

(ii) гаплотип KIR и/или гаплотип лиганда KIR; и

(iii) гаплотипы HLA-E, CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d;

б) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции клетки в опухоль (CTMS), составляющий 20% или более клеток носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(ii) показатель миграции от опухоли к клеткам (TCMS), составляющий 20% или более раковых клеток, мигрирующих к клеткам-носителям; и/или

(III) совокупная оценка миграции (MPC) из $[(I) + (II)] / 2$, по меньшей мере, на 20%;

в) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с онколитическим вирусом и раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции нагруженных вирусом клеток к опухоли (V-CTMS), составляющий 20% или более клеток-носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(II) показатель миграции нагруженных вирусом клеток от опухоли (V-TCMS) 20% или более раковых клеток, мигрирующих в сторону клеток-носителей; и/или

(III) совокупный показатель миграции (V-MRS) из $[(I) + (II)] / 2$, по меньшей мере на 20%;

г) когда клеточный носитель инкубируется в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, показатель иммунологической вирусной амплификации (IVAS), представляющий количество вирусной амплификации в присутствии иммунных клеток, полученных от субъекта, родственника к количеству вирусной амплификации, полученной в эквивалентных условиях, за исключением отсутствия иммунных клеток, полученных от субъекта, составляет не менее 20%;

д) когда клеточный носитель инкубируют в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, показатель иммунологической совместимости (ICS), представляющий иммунный ответ в присутствии клеточного носителя относительно иммунного ответа при эквивалентных в условиях, за исключением отсутствия клеточного носителя, составляет $\leq 200\%$, при этом иммунный ответ определяется степенью экспрессии одного или нескольких из следующего:

(i) IFN γ ;

(ii) один или несколько маркеров, связанных с цитотоксичностью, опосредованной Т-клетками, $\gamma\delta$ Т-клетками, NK-клетками и/или NKT-клетками; и/или

(iii) один или несколько маркеров, связанных с Т-клеткой, $\gamma\delta$ Т-клеткой, NK-клеткой и/или активаторной / эффекторной функцией (ами) NKT-клеток;

е) когда клеточный носитель инкубируется в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, клеточный носитель не усиливает противовирусный иммунный ответ и/или подавляет противовирусный иммунный ответ по сравнению с идентичным условием, за исключением отсутствия клеточного носителя, что определяется по шкале иммунологического подавления ($ISS \geq 0\%$ в соответствии с уравнением:

$$ISS\% = [(IV + IC) - ICV] / (IV + IC) \times 100, \text{ где}$$

IV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре вируса + иммунных клеток, полученной от субъекта;

IC = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта + клеточный носитель;

ICV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта + клеточный носитель + вирус; и

уровень экспрессии маркера представляет собой уровень экспрессии одного или нескольких маркеров, указанных в (i), (ii) и (iii) из д); и

если удовлетворяется одно или несколько из а) - е), определение соответствия между клеточным носителем и субъектом и выбор клеточного носителя как подходящего для доставки онколитического вируса субъекту, страдающему раком.

Как указано выше, способ сопоставления может дополнительно включать до одного или нескольких из а) - е): определение показателя вирусной амплификации (VAS) как БОЕ/клетка, когда клеточный носитель инкубируется с вирусом; и если оценка по VAS составляет не менее 10, выбор клеточного носителя для скрининга с использованием одного или нескольких детерминант (а) - (е) и определение, есть ли совпадение между клеточным носителем и субъектом. Также предусмотрены мультиплексированные методы, описанные выше.

Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие любую из клеток-носителей, представленных в настоящем документе, в фармацевтически приемлемом носителе. Фармацевтические композиции предназначены для лечения рака и в способах лечения рака, как описано выше и ниже. Композиции можно вводить системно, местно, внутриопухолево, внутripеченочно, внутривенно, ректально или подкожно. Клетки-носители могут быть сопоставлены субъекту способами сопоставления, описанными в данном документе.

В тех случаях, когда это допускается, формула изобретения, изложенная ниже и в приоритетной заявке США № 62/680,570, включается в настоящий раздел путем ссылки.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Оглавление

А. Определения

Б. Выбор компонентов для вирусной терапии с использованием системы доставки на основе клеток ("клеточные носители")

(1) Системы доставки на основе клеток

-Типы клеточных носителей (аутологичные или аллогенные)

(2) Вирусы

-Типы вирусов

В. Анализ соответствия клеточных носителей и вирусов

(I) Отбор иммунных клеток субъекта лечения

-Типы клеток

- Способы получения клеток

(II) Общие методы культивирования и маркировки

(III) Сопоставление клеточного носителя («клетки-носителя») с вирусом

(IV) Сопоставление комбинации клеточного носителя/вируса с субъектом лечения

1. Сопоставление Гаплотипов

2. Условия и способы совместного культивирования клеточных носителей, вирусов и иммунных клеток субъекта лечения

3. Способность рекрутировать / сенсibilизировать резистентные опухолевые клетки и/или способствовать амплификации вируса

4. Метод соответствия субъект / клетка-носитель

а. Измерение вирусной амплификации

б. Измерение иммуномодуляции совместных культур

в. Измерение иммуномодуляции супернатантов совместных культур

г. Выбор совместного с субъектом клеточного носителя

Г. Модифицированные клеточные носители с улучшенными возможностями

(i) Сенсibilизация как улучшение амплификации вируса и/или иммуномодуляции

1. Типы

а. Сенсibilизация клеточных носителей для повышения амплификации вируса

б. Сенсibilизация клеточных носителей для блокирования индукции противовирусного состояния

в. Защита клеточных носителей от аллогенных детерминантов инактивации/отторжения

г. Защита клеточных носителей от комплемента

2. Способы изготовления

(ii) Сенсibilизация для устойчивости к уничтожению посредством вируса

а. Предварительная обработка клеточных носителей интерферонами типа I и/или типа II

б. Предварительная обработка клеточных носителей агонистами/индукторами противовирусного состояния (STING, PKR, RIG-I, MDA-5 и др.)

2. Методы изготовления

(iii) Конструирование для улучшения вирусной амплификации и/или иммуномодуляции

1. Типы

- а. Конструирование для невосприимчивости к индуцированному интерфероном противовирусному состоянию;
- б. Конструирование для избегания аллогенного распознавания Т-клетками, $\gamma\delta$ (gd) Т-клетками (приобретенные иммунные реакции) и NKT-клетками.
- в. Конструирование для избегания аллогенного распознавания NK-клетками и $\gamma\delta$ (gd) Т-клетками (врожденные иммунные реакции)
- г. Конструирование для экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого или вирусного происхождения.
- д. Конструирование для экспрессии факторов рака или стволовых клеток, которые способствуют вирусному инфицированию опухолевых клеток, которые в противном случае не допустят проникновения.
- е. Конструирование для экспрессии факторов, препятствующих функции комплемента и/или нейтрализующих антител

2. Способы изготовления

Д. Способы введения клеточного носителя / вируса для терапии

Е. Способы лечения и контроль в координации с лечением

Ж. Фармацевтические композиции, комбинации и наборы

З. Дополнительные методы лечения с помощью клеточного носителя и вируса

И. Виды рака, подлежащие лечению

К. Примеры

Л. Претензии

А. Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится изобретение(я). Все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности GENBANK, веб-сайты и другие опубликованные материалы, на которые есть ссылки во всем раскрытии настоящего документа, если не указано иное, включены в качестве ссылки во всей их полноте. В случае если в настоящем документе существует множество определений терминов, они приводятся в этом разделе. В тех случаях, когда ссылка делается на URL-адрес или другой такой идентификатор или адрес, подразумевается, что такие идентификаторы могут изменяться и конкретная информация в Интернете может приходить и уходить, но эквивалентная информация известна и может быть легко доступна, *например*, путем поиска в Интернете и/или соответствующих базах данных. Ссылка на подобные источники свидетельствует о наличии и публичном распространении такой информации.

Использованный в настоящем документе термин «вирус» относится к любому из большой группы инфекционных объектов, называемых вирусами. Вирусы, как правило, содержат белковую оболочку, окружающую коровый генетический материал – РНК или ДНК, но не имеют полупроницаемой мембраны, и способны к росту и размножению только внутри живых клеток. Вирусы включают, но не ограничиваются ими, поксвирус, герпесвирус, аденовирус, адено-ассоциированный вирус, лентивирус, ретровирус, рабдовирус, папилломавирус, вирус везикулярного стоматита, вирус кори, вирус болезни Ньюкасла, пикорнавирус, вирус Синдбис, папилломавирус, парвовирус, реовирус, вирус Коксаки, вирус гриппа, вирус эпидемического паротита, полиовирус, вирус Сенека-Валли и Вирус леса Семлики.

Как используется в настоящем документе, «онколитический вирус» относится к вирусу, который избирательно реплицируется в опухолевых клетках у субъекта, имеющего опухоль. Некоторые онколитические вирусы могут убить опухолевую клетку после инфицирования опухолевой клетки. Например, онколитический вирус может вызвать гибель опухолевой клетки, лизируя опухолевую клетку («онколизис») или индуцируя клеточную гибель опухолевой клетки.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтический вирус» относится к вирусу, который вводят для лечения заболевания, нарушения или расстройства, такого как неопластическое заболевание, такого как рак, опухоль и/или метастазы (метастазирование), или воспаление, или рана, или для их диагностики, или и того и другого. Как правило, используемый в настоящем документе терапевтический

вирус – это вирус, который проявляет противоопухолевую активность и минимальную токсичность. В контексте настоящего документа, лечение неопластического заболевания введением терапевтического вируса может быть обозначено как «виротерапия».

Используемый в настоящем документе термин «вирус осповакцины» или «VACV» или «VV» обозначает большой, сложный, имеющий оболочку вирус, принадлежащий к семейству поксвирусов. Он имеет линейный двухцепочечный ДНК-геном длиной около 190 т.п.о., который кодирует около 200 белков. Штаммы вируса осповакцины включают, но не ограничиваются ими, штаммы, полученные из следующих штаммов или их модифицированных форм: Western Reserve (WR), Copenhagen (Cop), Bern, Paris, Tashkent, Tian Tan, Lister, Wyeth, IHD-J, IHD-W, Brighton, Ankara, модифицированной осповакцины Ankara (MVA), CVA382, Dairén I, LIPV, LC16M8, LC16M0, LIVP, ACAM, WR 65-16, Connaught, JX-594, GL-ONC1, мутанта vvDD TK, штаммов вируса Нью-Йоркского городского совета здравоохранения (NYCBH), штаммов осповакцины EM-63 и NYVAC.

Как используется в настоящем документе, штамм Листеринститута вирусных препаратов (LIVP) или штамм вируса LIVP относится к вирусному штамму, который является аттенуированным штаммом Lister (по каталогу ATCC № VR-1549), который был получен путем адаптации к коже теленка в Институте вирусных препаратов, Москва, Россия (Al'tshtein *et al.* (1985) *Dokl. Akad. Nauk USSR* 285:696-699). Штамм LIVP может быть получен, *например*, из коллекции института вирусных препаратов, Москва, Россия (см., *например*, вакцина Kutinova *et al.* (1995) *Vaccine* 13:487-493); из коллекции микроорганизмов ФНИИ НИЦ ВБ «Вектор» (Kozlova *et al.* (2010) *Environ. Sci. Technol.* 44:5121-5126); или из коллекции Московского института вирусологии им. Ивановского (C0355 K0602; Agranovski *et al.* (2006) *Atmospheric Environment* 40:3924-3929). Он также хорошо известен специалистам в этой области, так как это был вакцинный штамм, используемый для вакцинации в СССР, по всей Азии и в Индии. В настоящее время, штамм используется исследователями и хорошо известен (см., *например*, Altshteyn *et al.* (1985) *Dokl. Akad. Nauk USSR* 285:696-699; Kutinova *et al.* (1994) *Arch. Virol.* 134:1-9; Kutinova *et al.* (1995) *Vaccine* 13:487-493; Shchelkunov *et al.* (1993) *Virus Research* 28:273-283; Sroller *et al.* (1998) *Archives Virology* 143:1311-1320; Zinoviev *et al.*, (1994) *Gene* 147:209-214; and Chkheidze *et al.* (1993) *FEBS* 336:340-342). Штамм вируса LIVP включает в себя любой штамм вируса или вирусный препарат, полученный путем размножения LIVP посредством повторного пассажа в клеточных линиях.

Используемый в настоящем документе термин «модифицированный вирус» относится к вирусу, который изменен по сравнению с родительским штаммом

вируса. Обычно модифицированные вирусы имеют одно или несколько усечений, мутаций, вставок или делеций в геноме вируса. Модифицированный вирус может иметь один или несколько модифицированных эндогенных вирусных генов и/или одну или несколько измененных межгенных областей. Типичные модифицированные вирусы могут иметь одну или несколько гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот, встроенных в геном вируса. Модифицированные вирусы могут содержать одну или несколько последовательностей гетерологичных нуклеиновых кислот в форме экспрессионной кассеты для экспрессии гетерологичного гена.

В контексте настоящего документа, «клетка-носитель», «клеточный носитель», «клеточная система доставки», «носитель доставки», «средство доставки на основе клеток» и «система доставки на основе клеток» используются взаимозаменяемо, являются выражением одного и того же термина и относятся к любой клетке, которая может быть инфицирована вирусом или иным образом ассоциирована с вирусом, *например*, посредством химического или физического взаимодействия между вирусом и поверхностным белком или путем инфицирования цитоплазмы или ядра клетки вирусом.

Используемый в настоящем документе термин «сенсibilизированный», «сенсibilизировать» или «сенсibilизация клетки» относится к изменению свойства клетки посредством ее обработки, обычно перед использованием, агентом для изменения свойства клетки, такому как индукция экспрессии гена.

Как используется в настоящем документе, соответствие между конкретным клеточным носителем (также называемым в настоящем документе клеткой-носителем) и субъектом, имеющим онкологическое заболевание, подлежащее лечению клеткой-носителем и вирусом, означает, что клеточный носитель достаточно совместим с иммунной системой хозяина, чтобы уклониться от иммунной системы до того, как вирус достигнет опухоли. В настоящем документе представлены анализы для идентификации соответствующих клеток-носителей, подходящих для объекта, нуждающегося в лечении. Клетка-носитель также может быть подобрана к вирусу, где соответствующий вирус может реплицироваться в клетке. Подобранная клетка-носитель с вирусом является подходящей для введения субъекту, если вирус амплифицируется/реплицируется в клетке и клетка доставляет вирус к опухоли субъекта. В настоящем документе также представлены анализы для подбора совместимых комбинаций клеток-носителей и вирусов.

Как используется в настоящем документе, амплификация вируса в клетке-носителе означает, что вирус реплицируется в клетке для поддержания вируса или увеличения количества вируса в клетке.

Как используется в настоящем документе, «клетка-хозяин» или «клетка-мишень» используются взаимозаменяемо для обозначения клетки, которая может быть инфицирована вирусом.

Используемый в настоящем документе термин «ткань» относится к группе, набору или совокупности подобных клеток, обычно действующих для выполнения определенной функции в организме.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтический генный продукт» или «терапевтический полипептид» или «терапевтический агент» относится к любому гетерологичному белку, экспрессируемому терапевтическим вирусом, который уменьшает симптомы заболевания или расстройства или ослабляет заболевание или расстройство. Терапевтические агенты включают, но не ограничиваются ими, группы, которые ингибируют рост клеток или способствуют гибели клеток, которые могут быть активированы для ингибирования роста клеток или промотирования гибели клеток, или которые активируют другой агент для ингибирования роста клеток или промотирования гибели клеток. Необязательно, терапевтический агент может проявлять или обладать дополнительными свойствами, такими как свойства, которые позволяют использовать его в качестве агента визуализации, как описано в другом месте настоящего документа. Примеры терапевтических агентов включают, *например*, цитокины, факторы роста, фотосенсибилизирующие агенты, радионуклиды, токсины, антиметаболиты, модуляторы передачи сигналов, противораковые антибиотики, противораковые антитела, ингибиторы ангиогенеза, химиотерапевтические соединения или их комбинации.

Как используется в настоящем документе, «терапевтические агенты» представляют собой агенты, которые облегчают симптомы заболевания или расстройства или облегчают течение заболевания или расстройства. Терапевтический агент, терапевтическое соединение или терапевтические схемы включают обычные лекарственные средства и лекарственные препараты, включая вакцины для лечения или профилактики (*т.е.* снижения риска получения определенного заболевания или расстройства), которые известны специалистам в данной области и описаны в других разделах настоящего документа. Терапевтические агенты для лечения неопластических заболеваний включают, но не ограничиваются ими, компоненты, которые ингибируют рост клеток или способствуют гибели клеток, которые могут быть активированы для подавления роста клеток или способствовать их гибели, или которые активируют другой агент для ингибирования роста клеток или стимулирования смерти клетки. Терапевтические агенты для использования в способах, представленных в

настоящем документе, могут представлять собой, *например*, противораковые агенты. Примеры терапевтических агентов включают, *например*, терапевтические микроорганизмы, такие как терапевтические вирусы и бактерии, цитокины, факторы роста, фотосенсибилизирующие агенты, радионуклиды, токсины, антиметаболиты, модуляторы передачи сигналов, противораковые антибиотики, противораковые антитела, ингибиторы ангиогенеза, лучевая терапия, химиотерапевтические соединения или их комбинации.

Как используется в настоящем документе, опухолевая клетка или раковая клетка относится к клетке, которая делится и размножается ненормально, потому что рост и деление не регулируются или не контролируются, то есть к клеткам, которые восприимчивы к неконтролируемому росту. Опухолевая клетка может быть доброкачественной или злокачественной. Как правило, опухолевая клетка представляет собой злокачественную клетку, которая может распространяться на другие части тела – процесс, известный как метастазирование.

Как используется в настоящем документе, «вирусный препарат» или «вирусная композиция» относится к вирусной композиции, полученной путем размножения вирусного штамма, *например*, штамма вируса осповакцины, клонального штамма вируса осповакцины, модифицированного или рекомбинантного штамма вируса *in vivo* или *in vitro* в культуральной системе.

Например, препарат вируса осповакцины относится к вирусной композиции, полученной путем размножения штамма вируса в клетках-хозяевах, обычно после очистки из культуральной системы с использованием стандартных методов, известных в данной области. Вирусный препарат обычно состоит из ряда вирусных частиц или вирионов. При желании количество вирусных частиц в образце или препарате может быть определено с использованием метода образования бляшек посредством подсчета количества бляшек (бляшкообразующих единиц) на единицу объема образца (БОЕ/мл), предполагая, что каждая образованная бляшка представляет собой одну инфекционную вирусную частицу. Каждая вирусная частица или вирион в препарате может иметь ту же геномную последовательность, что и другие вирусные частицы (т.е. препарат является гомогенным по последовательности) или может иметь разные геномные последовательности (т.е. препарат является гетерогенным по последовательности). Специалистам в данной области понятно, что в отсутствие клональной изоляции гетерогенность или разнообразие в геноме вируса может возникать по мере размножения вирусных частиц, *например*, в результате событий гомологичной рекомбинации, которые происходят в процессе естественного отбора в вирусных

штаммах(Plotkin & Orenstein (eds) "Recombinant Осповакцины Virus Vaccines" in Vaccines, 3rd edition (1999)).

Используемый в настоящем документе термин «бляшкообразующая единица» (БОЕ) или «инфекционная единица» (МЕ) относится к количеству инфекционных или живых вирусов. Таким образом, он отражает количество активного вируса в препарате. БОЕ можно определить посредством подсчета вирусных бляшек (метод образования бляшек/стерильного пятна) или титрованием до конечной точки разведения, которые являются стандартными анализами, известными специалистам в данной области.

Используемый в настоящем документе термин «наночастица» относится к коллоидной частице для доставки молекулы или агента, которая имеет микроскопический размер от 1 до 1000 нанометров (нм), например от 1 до 100 нм, и ведет себя как единое целое с точки зрения транспорта и свойств. К наночастицам относятся те частицы, которые однородны по размеру. К наночастицам относятся те частицы, которые содержат молекулу-мишень, прикрепленную снаружи.

Используемый в настоящем документе термин «нацеливающая молекула» или «нацеливающий лиганд» относится к любому молекулярному сигналу с направленной локализацией(самонаведением) к конкретным клеткам, тканям или органам. Примеры нацеливающих лигандов включают, но не ограничиваются ими, белки, полипептиды или их части, которые связываются с молекулами поверхности клетки, включая, но не ограничиваясь ими, белки, углеводы, липиды или другие подобные фрагменты. Например, нацеливающие лиганды включают белки или их части, которые связываются с рецепторами поверхности клетки, или антитела, направленные на антигены, избирательно экспрессируемые на клетке-мишени. Нацеливающие лиганды включают, но не ограничиваются ими, факторы роста, цитокины, молекулы адгезии, нейропептиды, белковые гормоны и одноцепочечные антитела (scFv).

Используемый в настоящем документе термин «антитело» используется в самом широком смысле(например, антитело, направленное на антиген, экспрессируемый на популяции иммунных клеток, таких как, например, Т-клетки, $\gamma\delta$ (gd) Т-клетки, НК-клетки, НКТ-клетки, подлежащие истощению или ингибированию для подавления иммунного ответа), и включает полноразмерные антитела и их части, включая фрагменты антител. Фрагменты антител, включают, но не ограничиваются ими, Fab-фрагменты, Fab-фрагменты, F(ab)2-фрагменты, Fv-фрагменты, дисульфид-связанные Fvs (dsFv), Fd-фрагменты, Fd-фрагменты, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные Fabs (scFab), диабетические, антиидиотипические антитела (anti-Id) или антигенсвязывающие

фрагменты любого из вышеперечисленных фрагментов антител. Антитела также включают синтетические антитела, рекомбинантно продуцируемые антитела, мультиспецифические антитела (*например*, биспецифические антитела), человеческие антитела, нечеловеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и внутриклеточные антитела. Антитела, используемые в настоящем документе, включают представителей любого типа иммуноглобулинов (*например*, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY), любого класса (*например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса (*например*, IgG2a и IgG2b).

Антитела, такие как моноклональные антитела, могут быть получены с использованием стандартных методов, известных специалистам в данной области техники (*см.*, *например*, Kohler et al., Nature 256:495-497 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511-519 (1976); и WO 02/46455). Например, животное иммунизируют стандартными методами, для получения секретирующих антитела соматических клеток. Затем эти клетки выделяют из иммунизированного животного для слияния с клетками миеломы. Соматические клетки, способные продуцировать антитела, особенно В-клетки, могут быть использованы для слияния с клеточной линией миеломы. Эти соматические клетки могут быть получены из лимфатических узлов, селезенки и периферической крови зараженных животных. Специализированные клеточные линии миеломы были разработаны из лимфоцитарных опухолей для использования в процедурах слияния с получением гибридом (Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519 (1976); Shulman et al., Nature, 276:269-282 (1978); Volk et al., J. Virol., 42:220-227 (1982)). Эти клеточные линии обладают тремя полезными свойствами. Во-первых, они облегчают отбор слитых гибридом из неслитых и точно так же бесконечно делящихся клеток миеломы за счет дефицита ферментов, который делает их неспособными расти в селективной среде, поддерживающей рост гибридом. Во-вторых, они обладают способностью продуцировать антитела и не способны продуцировать эндогенные легкие или тяжелые цепи иммуноглобулинов. Третье свойство состоит в том, что они эффективно сливаются с другими клетками. Другие способы получения гибридом и моноклональных антител хорошо известны специалистам в данной области. Продуцирование антител против любого полипептида, *например* антигенного маркера, в популяции иммунных клеток является рутинной процедурой.

Примеры антител, истощающих иммунные клетки, включают, но не ограничиваются ими:

– анти-asialo GM1 (Thermofisher Scientific), антитела для истощения NK-клеток у мышей *in vivo* и у различных видов, включая человека, *in vitro*;

– анти-NK1.1, антитела для истощения NK-клеток у мышей, а также истощения NKT-клетки;

– ОКМ1 (анти-CD11b, человек) и B73.1 (анти-CD16, человек) антитела для истощения NK-клеток (Strassmann *et al.*, *J. Immunol.*, 130(4):1556-60 (1983));

– DJ130с или 3G8 (анти-CD16, человек) антитела для истощения NK-клеток (Choi *et al.*, *Immunology*, 124(2): 215-222 (2008));

– IMMU510 или B1.1 (анти-TCR $\gamma\delta$), которые блокируют $\gamma\delta$ (gd) Т-клетки. Также, для блокирования рецепторов, $\gamma\delta$ ЛПК инкубировали с блокирующими антителами анти-NKp30 (клон F252), анти-NKp44 (клон KS38), анти-NKp46 (клон KL247), анти-TCR $\gamma\delta$ (Beckman Coulter, клоны IMMU510 или B1.1), или анти-V δ 1 ТКК (Fisher Scientific, клоны TCS1 или TS8.2) (Correia *et al.*, *Blood*, 118:992-1001 (2011))

– антитело B1, блокирующее антиген-опосредованную активацию ТКР;

– GL3 и UC7-13D5 антитела, истощающие $\gamma\delta$ (gd) Т-клетки или интернализирующие их *in vivo* у мышей (Koenecke *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 39(2):372-9 (2009));

– анти-CD1d, клон 1B1, антитела для истощения NKT-клеток у мышей (Christaki *et al.*, *J. Immunol. Res.*, 2015, ArticleID 532717);

– NKTT120, антитела для истощения iNKT-клеток у человека. NKTT120-это гуманизированное моноклональное антитело IgG1k, нацеленное на перестроенный инвариантный TCR Гена Va24-Ja18, которое обладает потенциалом быстрого и специфичного истощения iNKT-клетки (Field *et al.*, *PLoS One*, 12,2.e0171067 (2017)).

Как используется в настоящем документе, носитель доставки для введения относится к композиции на основе липидов или другой полимерной основы, такой как липосома, мицелла или обратная мицелла, которая связывается с агентом, таким как вирус, представленный в настоящем документе, для доставки субъекту-хозяину.

Как используется в настоящем документе, накопление вируса в конкретной ткани относится к распространению или колонизации вируса в конкретных тканях организма-хозяина по прошествии периода времени после введения вируса хозяину, достаточного для того, чтобы вирус заразил органы или ткани хозяина. Как будет понятно специалисту в данной области, период времени для заражения вирусом будет варьироваться в зависимости от вируса, органа(ов) или ткани(ей), которые будут инфицированы, иммунокомпетентности хозяина и дозы вируса. Как правило, может определяться в моменты времени от примерно менее 1 дня, от примерно 1 дня до примерно 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, от примерно 1 недели до примерно 2, 3 или 4 недель, от примерно 1 месяца до примерно 2, 3, 4, 5, 6 месяцев или дольше после заражения вирусом. Для целей

настоящего изобретения, вирусы преимущественно накапливаются в иммунопривилегированной ткани, такой как воспаленная ткань или опухолевая ткань, но выводятся из других тканей и органов, таких как неопухолевые ткани, в организме хозяина в той степени, в которой токсичность вируса является легкой или терпимой и, в большинстве случаев, не смертельной.

Используемый в настоящем документе термин «преимущественное накопление» относится к накоплению вируса в первом местоположении на более высоком уровне, чем накопление вируса во втором местоположении (*т.е.*, концентрация вирусных частиц или титр вируса в первом местоположении выше, чем концентрация вирусных частиц во втором местоположении). Таким образом, вирус, который преимущественно накапливается в иммунопривилегированной ткани (ткани, защищенной от иммунной системы), такой как воспаленная ткань и опухолевая ткань, по сравнению с нормальными тканями или органами, относится к вирусу, который накапливается в иммунопривилегированной ткани, такой как опухоль, на более высоком уровне (*т.е.*, концентрации или вирусном титре), чем в нормальных тканях или органах.

Используемый в настоящем документе термин «активность» относится к активности *in vitro* или *in vivo* соединения или вируса, представленных в настоящем документе. Например, активность *in vivo* относится к физиологическим ответам, которые возникают после введения *in vivo* соединения или вируса, представленных в настоящем документе (или композиции или другой их смеси). Таким образом, активность включает результирующие терапевтические эффекты и фармацевтическую активность таких соединений, композиций и смесей. Активности можно наблюдать в системах *in vitro* и/или *in vivo*, предназначенных для тестирования или использования такой активности.

Используемый в настоящем документе термин «противоопухолевая активность» или «противоопухолевый» относится к вирусным штаммам, которые предотвращают или ингибируют образование или рост опухолей *in vitro* или *in vivo* у субъекта. Противоопухолевая активность может быть определена путем оценки параметра или параметров, указывающих на противоопухолевую активность.

Как используется в настоящем документе, «большая» или «улучшенная» активность в отношении противоопухолевой активности или анти-онкогенности (противоонкогенности) означает, что штамм вируса способен предотвращать или ингибировать образование или рост опухолей *in vitro* или *in vivo* у субъекта в большей степени, чем эталонный или контрольный вирус, или в большей степени, чем при отсутствии лечения вирусом. «Увеличение» или «улучшение» противоопухолевой активности можно определить, оценивая действие вируса и, при

необходимости, контрольного или эталонного вируса на параметр, указывающий на противоопухолевую активность. Понятно, что при сравнении активности двух или более разных вирусов количество вируса (*например*, БОЕ), используемое в анализе *in vitro* или вводимое *in vivo*, является одинаковым или аналогичным, а условия (*например*, режим дозирования *in vivo*) анализа *in vitro* или оценки *in vivo* одинаковы или похожи.

Используемый в настоящем документе термин «токсичность» (также называемая в настоящем документе «вирулентностью» или «патогенностью») применительно к вирусу относится к вредным или токсическим эффектам на хозяина при введении вируса. Для онколитического вируса, такого как вирус осповакцины, токсичность вируса связана с его накоплением в неопухолевых органах или тканях, что может повлиять на выживаемость хозяина (субъекта) или привести к пагубным или токсическим эффектам. Токсичность может быть измерена путем оценки одного или нескольких параметров, указывающих на токсичность. К ним относятся накопление в неопухолевых тканях и влияние на жизнеспособность или здоровье субъекта, которому его вводили, *например*, влияние на массу тела.

Используемый в настоящем документе термин «пониженная токсичность» или «сниженная токсичность» означает, что токсические или вредные эффекты при введении вируса хозяину (субъекту) ослабляются или уменьшаются по сравнению с хозяином (субъектом), не обработанным вирусом, или по сравнению с хозяином (субъектом), которому вводили другой эталонный или контрольный вирус. Снижение или уменьшение токсичности может быть определено путем оценки воздействия вируса и, при необходимости, контрольного или эталонного вируса на параметр, указывающий на токсичность. Понятно, что при сравнении активности двух или более различных вирусов количество вируса (*например*, БОЕ), используемое в анализе *in vitro* или вводимое *in vivo*, является одинаковым или аналогичным, а условия (*например*, режим дозирования *in vivo*) анализа *in vitro* или оценки *in vivo* одинаковы или похожи. Например, при сравнении эффектов *in vivo* при введении вируса и контрольного или референтного вируса у субъектов, они являются субъектами одного вида, размера, пола, а вирус вводят в том же или подобном количестве при том же или подобном режиме дозирования. В частности, пониженная токсичность вируса может означать, что при введении вируса хозяину, *например*, для лечения заболевания, вирус не накапливается в неопухолевых органах и тканях хозяина в такой степени, которая наносит ущерб или вред хозяину (субъекту), или которая влияет на выживаемость хозяина в большей степени, чем заболевание, которое лечат, или в большей степени, чем контрольный или эталонный

вирус. Например, вирус с пониженной токсичностью включает в себя вирус, который не приводит к смерти субъекта в течение курса лечения.

Используемый в настоящем документе термин «контроль» или «стандарт» относится к образцу, который по существу идентичен тестируемому образцу, за исключением того, что он не обрабатывается тестовым параметром, или, если это образец плазмы, он может быть от нормального добровольца, не затронутого интересующим состоянием. Контроль также может быть внутренним контролем. Например, контроль может быть образцом, таким как вирус, который обладает известным свойством или активностью.

Как используется в настоящем документе, режим дозирования относится к количеству вводимого агента, *например*, клетки-носителя или вируса или другого агента, и частоте введения в течение цикла введения. Режим дозирования зависит от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и, таким образом, может варьироваться.

Как используется в настоящем документе, частота введения относится к количеству раз, которое агент вводится субъекту в течение цикла введения. Например, частота может составлять дни, недели или месяцы. Например, частота введения может составлять один раз в течение цикла введения, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или семь раз. Частота введения может относиться к последовательным дням в течение цикла введения. Конкретная частота введения зависит от конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению.

Используемый в настоящем документе термин «цикл введения» относится к повторяющемуся графику режима дозирования введения вируса, который повторяется в течение последовательных введений. Например, примерным циклом введения является 28-дневный цикл.

Используемые в настоящем документе термины «иммунопривилегированные клетки» и «иммунопривилегированные ткани» относятся к клеткам и тканям, таким как солидные опухоли, которые изолированы от иммунной системы. Как правило, введение вируса субъекту вызывает иммунный ответ, который очищает организм субъекта от вируса. Иммунопривилегированные зоны организма, однако, защищены или изолированы от иммунного ответа, что позволяет вирусу выживать и, как правило, реплицироваться. Иммунопривилегированные ткани включают пролиферирующие ткани, такие как опухолевые ткани и другие ткани и клетки, вовлеченные в другие пролиферативные нарушения, раны и другие ткани, участвующие в воспалительных ответах.

Используемые в настоящем документе термины «рана», «повреждение» или «поражение» относятся к любому повреждению любой ткани в живом организме. Ткань может быть внутренней тканью, такой как слизистая оболочка желудка или кость, или внешней тканью, такой как кожа. По существу, рана или поражение могут включать, но не ограничиваются ими, язву желудочно-кишечного тракта, сломанную кость, новообразование и порезанную или истерзанную кожу. Таким образом, рана или повреждение могут включать, но не ограничиваются ими, язву желудочно-кишечного тракта, сломанную кость, неоплазию и порезанную или истертую кожу. Рана или поражение могут быть в мягких тканях, таких как селезенка, или в твердых тканях, таких как кость. Рана или поражение могут быть вызваны любым агентом, включая травматическое повреждение, инфекцию или хирургическое вмешательство.

Используемый в настоящем документе термин «опухоль» или «новообразование», представляет собой аномальную массу ткани, которая возникает, когда клетки пролиферируют с аномально высокой скоростью. Опухоли могут демонстрировать частичное или полное отсутствие структурной организации и функциональной координации с нормальной тканью. Опухоли могут быть доброкачественными (не злокачественными) или злокачественными (злокачественными). Как используется в настоящем документе, «опухоль» включает кроветворные опухоли, а также солидные опухоли.

Злокачественные опухоли можно условно разделить на три основных типа. Карциномы – это злокачественные опухоли, возникающие из эпителиальных структур (*например*, молочной железы, предстательной железы, легких, толстой кишки и поджелудочной железы). Саркомы – это злокачественные опухоли, которые происходят из соединительных тканей или мезенхимальных клеток, таких как мышцы, хрящи, жир или кости. Лейкемии и лимфомы – это злокачественные опухоли, поражающие кроветворные структуры (структуры, относящиеся к образованию клеток крови), включая компоненты иммунной системы. Другие злокачественные опухоли включают, но не ограничиваются ими, опухоли нервной системы (*например*, нейрофиброматомы), опухоли зародышевых клеток и бластные опухоли.

Как используется в настоящем документе, резецированная опухоль относится к опухоли, в которой значительная часть опухоли была иссечена. Иссечение может быть произведено хирургическим путем (*т.е.*, хирургически резецированной опухолью). Резекция может быть частичной или полной.

Как используется в настоящем документе, «заболевание», «нарушение» или «расстройство» относится к патологическому состоянию в организме, возникающему,

например, в результате инфекции или генетического дефекта и характеризующемуся идентифицируемыми симптомами. Типичным заболеванием, описанным в настоящем документе, является неопластическое заболевание, такое как рак.

Как используется в настоящем документе, клетка, вовлеченная в заболевание или процесс заболевания, относится к клеткам, присутствие которых способствует, усугубляет, обостряет, вызывает или иным образом участвует в этиологии заболевания или процесса заболевания. Ингибирование или уничтожение таких клеток может ослабить симптомы заболевания или облегчить течение болезни. Примерами таких клеток являются опухолевые клетки. Уничтожение(онколизис) или ингибирование роста или пролиферации опухолевых клеток влияет на лечение опухолей. Другими примерами являются иммунные эффекторные клетки, которые участвуют в воспалительных реакциях, способствующих патологии различных заболеваний. Ингибирование или уничтожение эффекторных иммунных клеток может лечить заболевания, которые имеют воспалительный компонент.

Как используется в настоящем документе, «уничтожение (элиминация) или ингибирование роста или пролиферации клеток» означает, что клетки умирают или уничтожаются (элиминируются). Ингибирование роста или пролиферации клеток означает, что количество таких клеток не увеличивается, а может уменьшаться.

Использованный в настоящем документе термин «опухолевая клетка» означает любую клетку, которая является частью опухоли. Как правило, клетки-носители, представленные в настоящем документе, предпочтительно являются домом для опухолевых клеток, а вирусы, представленные в настоящем документе, предпочтительно инфицируют опухолевые клетки у субъекта по сравнению с нормальными клетками.

Использованный в настоящем документе термин «метастатическая клетка» означает клетку, которая имеет потенциал для метастазирования. Метастатические клетки обладают способностью метастазировать из первой опухоли у субъекта и могут колонизировать ткань в другом участке организма у субъекта с образованием второй опухоли на этом участке.

Используемый в настоящем документе термин «онкогенная клетка» или «опухолегенная клетка» означает клетку, которая при введении в подходящее место у субъекта может образовывать опухоль. Клетка может быть неметастатической или метастатической.

Используемый в настоящем документе термин «нормальная клетка» означает клетку, которая не происходит из опухоли.

Используемый в настоящем документе термин «неопластическое заболевание» относится к любому расстройству (нарушению), связанному с раком, включая развитие, рост, метастазирование и прогрессирование опухоли.

Используемый в настоящем документе термин «рак» означает заболевания, вызванные или характеризующиеся злокачественной опухолью любого типа, включая метастатический рак, лимфатические опухоли и рак крови. Примеры видов рака включают, но не ограничиваются ими, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, аденокарциному, аденому, рак надпочечников, рак коры надпочечников, рак, связанный со СПИДом, связанную со СПИДом лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, базально-клеточную карциному, рак желчных путей, рак мочевого пузыря, рак костей, остеосаркома, глиома ствола головного мозга, рак головного мозга, карцинома, астроцитома мозжечка, церебральная астроцитома/злокачественная глиома, эпендимома, медуллобластома, супратенториальная примитивная нейроэктодермальная опухоль, глиома зрительного пути или гипоталамуса, рак молочной железы, бронхиальная аденома/карциноид, лимфома Беркитта, карциноидная опухоль, лимфома центральной нервной системы, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз (хронический лимфолейкоз), хронический миелоидный лейкоз (хронический миелолейкоз), хроническое миелопролиферативное заболевание, рак толстой кишки, кожная Т-клеточная лимфома, десмопластическая мелкоклеточная опухоль, рак эндометрия, эпидермоидная карцинома, рак пищевода, саркома Юинга, экстракраниальная зародышевая клеточная опухоль, экстрагонадная зародышевая клеточная опухоль, внепеченочный рак желчных протоков, рак глаза/внутриглазная меланома, рак глаза, рак желчного пузыря, рак желудка, желудочно-кишечная карциноидная опухоль, желудочно-кишечная стромальная опухоль, гигантоклеточная опухоль, мультиформная глиобластома, глиома, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак/рак печени, лимфома Ходжкина, гиперплазия, гиперплазия зрительного нерва, карцинома *in situ*, рак глотки, кишечная ганглионеврома, опухоли островковых клеток, саркома Капоши, рак почек, рак гортани, лейомиомы, рак губ и полости рта, липосаркома, рак печени, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, лимфомы, макроглобулинемия, злокачественный карциноид, злокачественная фиброзная гистиоцитома кости, злокачественная гиперкальциемия, медуллярная карцинома, меланома, карцинома Меркеля (карцинома из клеток Меркеля), мезотелиома, метастатическая карцинома кожи, метастатический плоскоклеточный рак шеи, рак рта, невромы слизистой оболочки, множественные миелома, грибовидный

микоз, миелодиспластический синдром, миелома, миелопролиферативное расстройство, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, рак нервной системы, нейробластома, рак ротоглотки, рак яичников, опухоль эпителия яичников, опухоль зародышевых клеток яичников, рак поджелудочной железы, рак парашитовидной железы, рак полового члена, феохромоцитомы, астроцитомы шишковидной железы, герминома шишковидной железы, пинеобластома, аденома гипофиза, плевропульмональная бластома, истинная полицитемия, первичная опухоль головного мозга, рак предстательной железы, прямой кишки рак, ретикулум клеточная саркома, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак слюнных желез, семинома, синдром Сезари, рак кожи, рак тонкой кишки, саркома мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак яичка, рак горла, тимомы, рак щитовидной железы, местное поражение кожи, трофобластическая опухоль, рак уретры, рак эндометрия матки, саркома матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемия Вальденстрема или опухоль Вильма. Примерные виды рака обычно диагностируемые у людей включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, головного мозга, молочной железы, костного мозга, шейки матки, толстой/прямой кишки, почек, печени, легких/бронхов, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, кожи, желудка, щитовидной железы или матки. Типичные виды рака, обычно диагностируемые у собак, кошек и других домашних животных, включают, но не ограничиваются ими, лимфосаркому, остеосаркому, опухоли молочной железы, мастоцитому, опухоль головного мозга, меланому, аденосквамозную карциному, карциноидную опухоль легкого, опухоль бронхиальной железы, бронхиальную аденокарциному, фиброму, миксохондрому, саркому легких, нейросаркому, остеому, папиллому, ретинобластому, Юинга саркому, опухоль Вильма, лимфома Буркитта, микроглиома, нейробластома, неоплазия полости рта, фибросаркома, остеосаркома и рабдомиосаркома, плоскоклеточный рак гениталий, трансмиссивная венерическая опухоль, опухоль яичек, семинома, опухоль клеток Сертоли, гемангиоперитомы, гистиоцитомы, хлоромы (например, гранулоцитарная саркома), папиллома роговицы, плоскоклеточный рак роговицы, гемангиосаркома, мезотелиома плевры, базально-клеточная опухоль, тимомы, опухоль желудка, карцинома надпочечников, папилломатоз полости рта, гемангиоэндотелиома и цистаденома, фолликулярная лимфома, лимфосаркома кишечника, фибросаркома и плоскоклеточный рак легких. Примеры видов рака, диагностируемых у грызунов, таких как хорек, включают, но не ограничиваются ими, инсулиному, лимфому, саркому, невриому, опухоль островковых клеток поджелудочной железы, MALT -лимфому желудка и аденокарциному желудка. Примерные неоплазии, поражающие сельское-хозяйственный

домашний скот включает, но не ограничивается ими, лейкемию, гемангиоперицитому и глазную неоплазию крупного рогатого скота; препуциальную фибросаркому, язвенную плоскоклеточную карциному, препуциальную карциному, неоплазию соединительной ткани и мастоцитому (у лошадей); гепатоцеллюлярную карциному (у свиней); лимфому и аденоматоз легких (у овец); легочную саркому, лимфому, саркому Рауса, ретикуло-эндотелиоз, фибросаркому, нефробластома, В-клеточная лимфома и лимфоидный лейкоз (у птиц); ретинобластома, неоплазия печени, лимфосаркома (лимфобластная лимфома), плазмацитоидный лейкоз и саркома плавательного пузыря (у Рыб), казеозный лимфаденит (CLA): хроническое, инфекционное, заразное заболевание овец и коз, вызываемое бактерией *Corynebacterium pseudotuberculosis*, и заразная опухоль легких овец, вызываемая «jaagsiekte» (JSRV).

Используемый в настоящем документе термин «метастаз» или «метастазирование» относится к распространению рака из одной части тела в другую. Например, при метастатическом процессе злокачественные клетки могут распространяться от очагапервичной опухоли, в котором возникли, и проникать в лимфатические и кровеносные сосуды, по которым злокачественные клетки могут переноситься в нормальные ткани в другом участке организма, где будут продолжать пролиферировать. Опухоль, образованная клетками, которые распространились в результате метастазирования, называется «метастатической опухолью», «вторичной опухолью» или «метастазом».

В контексте настоящего описания противоопухолевый агент или соединение (используется взаимозаменяемо с «противоопухолевым или противоопухолевым агентом») относится к любому агенту или соединению, используемому в противоопухолевом лечении. К ним относятся любые агенты, при использовании отдельно или в сочетании с другими соединениями или методами лечения, которые могут облегчить, уменьшить, улучшить, предотвратить или поместить или поддерживать в состоянии ремиссии клинические симптомы или диагностические маркеры, связанные с неопластическими заболеваниями, опухолями и раком, и могут быть использованы в способах, комбинациях и композициях, представленных в настоящем документе. Противораковые агенты включают антиметастатические агенты. Примеры противораковых агентов включают, но не ограничиваются ими, химиотерапевтические соединения (например, токсины, алкилирующие агенты, нитрозомочевины, противораковые антибиотики, антиметаболиты, антимитотики, ингибиторы топоизомеразы), цитокины, факторы роста, гормоны, фотосенсибилизирующие агенты, радионуклиды, модуляторы сигналов, противораковые антитела, противоопухолевые

олигопептиды, противоопухолевые олигонуклеотиды (*например*, антисмысловые РНК и миРНК), ингибиторы ангиогенеза, лучевая терапия или их комбинация. Примеры химиотерапевтических соединений включают, но не ограничиваются ими, Ага-С, цисплатин, карбоплатин, паклитаксел, доксорубин, гемцитабин, камптотecin, иринотекан, циклофосфамид, 6-меркаптопурин, винкристин, 5-фторурацил и метотрексат. В данном контексте ссылка на противораковый или химиотерапевтический агент включает комбинации или множество противоопухолевых или химиотерапевтических агентов, если не указано иное.

Как используется в настоящем документе, противоопухолевое средство или соединение (используемое взаимозаменяемо с противораковым или антинеопластическим средством или соединением) относится к любому средству или соединению, используемому в противоопухолевом лечении. К ним относятся любые агенты, при использовании отдельно или в сочетании с другими соединениями или методами лечения, которые могут облегчить, уменьшить, улучшить, предотвратить, поместить или поддерживать в состоянии ремиссии клинические симптомы или диагностические маркеры, связанные с неопластическими заболеваниями, опухолями и раком. и могут быть использованы в способах, комбинациях и композициях, представленных в настоящем документе. Противораковые агенты включают антиметастатические агенты. Они включают любые агенты, когда они используются отдельно или в комбинации с другими соединениями или методами лечения, которые могут облегчить, уменьшить, улучшить, предотвратить или поместить или поддерживать в состоянии ремиссии клинические симптомы или диагностические маркеры, связанные с неопластическим заболеванием, опухолями и раком, и могут быть использованы в способах, комбинациях и композициях, представленных в настоящем документе. Противоопухолевые средства включают в себя антиметастатические средства. Типичные противоопухолевые средства включают, но не ограничиваются ими, химиотерапевтические соединения (*например*, токсины, алкилирующие агенты, нитрозомочевины, противоопухолевые антибиотики, антиметаболиты, антимитотики, ингибиторы топоизомеразы), цитокины, факторы роста, гормоны, фотосенсибилизаторы, радионуклиды, модуляторы сигналов, противоопухолевые антитела, противоопухолевые олигопептиды, противоопухолевые олигонуклеотиды (*например*, антисмысловые РНК и миРНК), ингибиторы ангиогенеза, лучевую терапию или их комбинации. Примеры химиотерапевтических соединений включают, но не ограничиваются ими, Ага-С, цисплатин, карбоплатин, паклитаксел, доксорубин, гемцитабин, камптотecin, иринотекан, циклофосфамид, 6-меркаптопурин, винкристин, 5-фторурацил и

метотрексат. Как используется в настоящем документе, ссылка на противоопухолевое или химиотерапевтическое средство включает комбинации или множество противоопухолевых или химиотерапевтических средств, если не указано иное.

Как используется в настоящем документе, термин «субъект» включает в себя любой организм, в том числе животное, для которого предполагается диагностика, скрининг, мониторинг или лечение. Животные включают млекопитающих, таких как приматы и домашние животные. Типичный примат-человек. Термин «пациент» относится к субъекту, такому как млекопитающее, примат, человек или домашний скот, страдающий заболеванием или для которого должно быть определено заболевание или риск заболевания.

В контексте настоящего изобретения, «пациент» представляет собой человека, проявляющего симптомы заболевания или расстройства.

Как используется в настоящем документе, «лечение» субъекта, имеющего состояние, расстройство или заболевание, включает любой способ лечения, при котором симптомы состояния, расстройства или заболевания улучшаются или иным образом благоприятно изменяются. Лечение включает любое фармацевтическое использование вирусов, описанных и представленных в настоящем документе

Как используется в настоящем документе, лечение субъекта, страдающего неопластическим заболеванием, включая опухоль или метастазы, означает любой способ лечения, при котором симптомы опухолевого заболевания улучшаются или иным образом благоприятно изменяются. Как правило, лечение опухоли или метастазов у субъекта включает любой способ лечения, который приводит к замедлению роста опухоли, лизису опухолевых клеток, уменьшению размера опухоли, предотвращению роста новой опухоли или предотвращению метастазирования первичной опухоли, включая ингибирование васкуляризации опухоли, деления опухолевых клеток, миграции опухолевых клеток или деградации базальной мембраны или внеклеточного матрикса.

Как используется в настоящем документе, терапевтический эффект означает эффект, возникающий в результате лечения субъекта, который изменяет, обычно улучшает или облегчает симптомы заболевания, состояния или расстройства или излечивает заболевание, состояние или расстройство.

Как используется в настоящем документе, терапевтически эффективное количество относится к количеству композиции, молекулы или соединения, которое приводит к терапевтическому эффекту после введения субъекту.

Как используется в настоящем документе, «улучшение или облегчение симптомов» конкретного расстройства, *например*, путем введения определенной

фармацевтической композиции, относится к любому уменьшению симптомов, будь то постоянное или временное, длительное или преходящее, которое может быть связано с введением композиции или связано с ним.

Используемый в настоящем документе термин «эффективность» означает, что при введении вируса или вирусной композиции, вирус колонизирует пролиферирующие или иммунопривилегированные клетки, такие как опухолевые клетки, и реплицируется. Колонизация и репликация в опухолевых клетках свидетельствует о том, что лечение является или будет эффективным лечением.

Как используется в настоящем документе, эффективное лечение клеточным носителем/вирусом представляет собой лечение, которое может увеличить выживаемость по сравнению с отсутствием лечения. Например, вирус является эффективным средством лечения, если он стабилизирует заболевание, вызывает регрессию опухоли, снижает тяжесть заболевания или замедляет или уменьшает метастазирование опухоли.

Как используется в настоящем документе, эффективное количество или терапевтически эффективное количество вируса или соединения для лечения конкретного заболевания представляет собой количество, облегчающее или каким-либо образом уменьшающее симптомы, связанные с заболеванием. Эффективное количество будет варьироваться от одного индивидуума (пациента) к другому, и будет зависеть от целого ряда факторов, включая, но не ограничиваясь ими, возраст, вес, общее физическое состояние пациента и тяжесть заболевания. Терапевтически эффективное количество можно вводить в виде разовой дозы или в виде нескольких доз в соответствии с режимом дозирования, при котором он будет эффективен. Эффективное количество может вылечить заболевание, но, как правило, его вводят для облегчения симптомов заболевания. Для достижения желаемого улучшения симптомов может потребоваться повторное введение.

Как используется в настоящем документе, эффективное количество или терапевтически эффективное количество вируса или соединения для лечения неопластического заболевания, включая опухоль или метастаз, представляет собой количество для улучшения или некоторого уменьшения симптомов, связанных с неопластическим заболеванием, включая, но не ограничиваясь ими, замедление роста опухоли, лизис опухолевых клеток, уменьшение размера опухоли, предотвращение роста новой опухоли или предотвращение метастазирования первичной опухоли.

Используемый в настоящем документе термин «композиция» относится к любой смеси двух или более продуктов или соединений. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водные или неводные составы, или любая их комбинация.

Как используется в настоящем документе, состав относится к композиции, содержащей по меньшей мере одно фармацевтически или терапевтически активное средство и одно или несколько вспомогательных веществ.

Как используется в настоящем документе, совместный состав или совокупный состав относится к композиции, содержащей два или более фармацевтически или терапевтически активных агента и одно или несколько вспомогательных веществ.

Как используется в настоящем документе, «комбинация» относится к любой ассоциации между двумя или более элементами или среди них. Комбинация может состоять из двух или более отдельных элементов, например двух композиций или двух коллекций, может быть их смесью, например единой смесью двух или более элементов, или любой их вариации. Элементы комбинации обычно функционально ассоциированы или связаны. Примеры комбинаций включают, но не ограничиваются ими, две или более фармацевтические композиции, композицию, содержащую два или более активных ингредиента, таких как два вируса, или вирус и противоопухолевое средство, такое как химиотерапевтическое соединение, два или более вирусов, вирус и терапевтический агент, вирус и агент визуализации, вирус и множество терапевтических агентов и/или агентов визуализации или любую их ассоциацию. Такие комбинации могут быть упакованы в виде наборов.

Как используется в настоящем документе, прямое введение относится к введению композиции без разбавления.

Как используется в настоящем документе, набор представляет собой упакованную комбинацию, необязательно, включающую инструкции по применению комбинации и/или других реакций и компонентов для такого применения.

Как используется в настоящем документе, «промышленное изделие» означает продукт, который производится и продается. Используемый в настоящем документе термин предназначен для охвата изделий, содержащих клетку-носитель и вирус осповакцины по отдельности или в комбинации со второй терапией или терапевтическим источником энергии, содержащимся в тех же или отдельных изделиях упаковки.

Как используется в настоящем документе, устройство представляет собой вещь (предмет или объект), сделанную или приспособленную для выполнения конкретной задачи. Примеры устройств в настоящем документе включают устройства, которые

покрывают или накрывают эпидермис или поверхность кожи или могут контактировать с ними. Примеры таких устройств включают, но не ограничиваются ими, пленку, обертывание, повязку, перевязку, салфетку, шов, пластырь, марлю или покрытие.

Используемые в настоящем документе формы единственного числа включают в себя множественное число, если контекст явно не диктует иное.

Как используется в настоящем документе, диапазоны и количества могут быть выражены как «примерно», «около» или «приблизительно» точное значение или диапазон. «Примерно», «около» или «приблизительно» также включает точную сумму. Следовательно, «около 5 миллилитров» означает «около 5 миллилитров», а также «5 миллилитров». Обычно «примерно» включает сумму, которая, как ожидается, находится в пределах экспериментальной ошибки.

Используемый в настоящем документе термин «примерно такой же», «примерно столько же» или «примерно то же самое» означает в пределах количества, которое специалист в данной области техники счел бы таким же или находящимся в пределах допустимого диапазона погрешности. Например, как правило, варьирование количества для фармацевтических композиций, по меньшей мере, в пределах 1%, 2%, 3%, 4%, 5% или 10% считается примерно одинаковым и допустимым. Такие количества могут варьироваться в зависимости от толерантности субъектов к изменению конкретного состава композиции.

Используемый в настоящем документе термин «необязательный» или «необязательно» означает, что описываемое далее событие или обстоятельство происходит или не происходит, и что описание включает в себя случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда это не происходит.

Как используется в настоящем документе, сокращения для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, если не указано иное, приводятся в соответствии с их общим использованием, признанными сокращениями, или комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре (см., (1972) *Biochem.* 11:1726).

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит изобретение(я). Все патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки и публикации, веб-сайты и другие опубликованные материалы, на которые имеется ссылка в настоящем описании, если не указано иное, включены в качестве ссылки во всей своей полноте. В случае наличия множества определений терминов в настоящем документе, преобладают определения, приведенные в настоящем разделе. Если делается ссылка на URL-адрес или другой такой

идентификатор или адрес, подразумевается, что такие идентификаторы могут изменяться, и конкретная информация в Интернете может приходить и уходить, но эквивалентная информация известна и может быть легко доступна, *например*, путем поиска в Интернете и/или соответствующих базах данных. Ссылка на нее свидетельствует о доступности и публичном распространении такой информации.

Как используется в настоящем документе, «аллогенные клетки» представляют собой клетки, которые генетически различаются по отношению к конкретному субъекту, поскольку они происходят от генетически различных особей (индивидуумов) одного и того же вида. Например, аллогенные стволовые клетки – это стволовые клетки, полученные от донора, отличного от пациента (или идентичного близнеца).

Как используется в настоящем документе, «аутологичные клетки» представляют собой клетки, полученные от одного и того же индивидуума, *например*, субъекта, подлежащего лечению (*т.е.*, пациента). Например, аутологичные стволовые клетки – это стволовые клетки, полученные от пациента.

Используемый в настоящем документе термин «сконструированный» по отношению к клеточным носителям или клеткам-носителям означает генетическую модификацию клеток, такую что они экспрессируют белки, которые могут улучшать или повышать характеристики клеток. Например, сконструированные клетки могут обладать улучшенной вирусной амплификацией и/или улучшенной иммуномодуляцией.

Используемый в настоящем документе термин «иммуномодуляция» относится к любому процессу, в котором иммунный ответ модифицируется до желаемого уровня, *например*, путем индукции, усиления или подавления иммунного ответа.

Используемые в настоящем документе термины «иммуносупрессия» или «иммунное подавление» относятся к подавлению или снижению иммунного ответа.

Как используется в настоящем документе, «иммунные привилегированные» или «иммунопривилегированные» относятся к клеткам или тканям, которые не вызывают иммунного ответа и могут уклоняться от иммунной системы. Иммунопривилегированные клетки и ткани относятся к клеткам и тканям, таким как солидные опухоли и микроокружение опухоли, которые изолированы от иммунной системы благодаря иммуносупрессивным свойствам опухолей. В результате онколитические вирусы преимущественно накапливаются в опухолях в микроокружении опухоли, поскольку они защищены от иммунной системы. Однако иммунопривилегированные ткани и клетки защищены или изолированы от иммунного ответа, что позволяет вирусам выживать и, как правило, реплицироваться.

Как используется в настоящем документе, онколитические вирусы относятся к вирусам, которые селективно реплицируются в опухолевых клетках.

Используемые в настоящем документе термины «заболевание» или «расстройство» или «нарушение» относятся к патологическому состоянию в организме, возникающему, *например*, в результате инфекции или генетического дефекта и характеризующемуся идентифицируемыми симптомами.

Как используется в настоящем документе, «рак» представляет собой общий термин для обозначения заболеваний, вызванных или характеризующихся любым типом злокачественной опухоли или гематологической злокачественной опухоли, например лейкозом.

Используемый в настоящем документе термин «злокачественные» применительно к опухолям относится к первичным опухолям, которые обладают способностью к метастазированию с потерей контроля роста и клеточной полярности.

Используемый в настоящем документе термин «метастазирование» относится к росту аномальных или неопластических клеток, удаленных от участка, в первую очередь вовлеченного в патологический процесс.

Используемый в настоящем документе термин «противораковый агент или соединение» (используемый взаимозаменяемо с «противоопухолевым агентом или соединением») относится к любым агентам или соединениям, используемым в противораковом лечении. К ним относятся любые агенты, при их использовании по отдельности или в комбинации с другими соединениями, которые могут облегчить, уменьшить, улучшить, предотвратить, поместить или поддерживать в состоянии ремиссии клинические симптомы или диагностические маркеры, связанные или ассоциированные с неопластическим заболеванием, опухолями и раком, и которые могут быть использованы в способах, комбинациях и композициях, представленных в настоящем документе.

Как используется в настоящем документе, термин «резистентная» или «устойчивая» по отношению к вирусной инфекции относится к клетке, которая не инфицирована или инфицирована в очень низкой степени вирусом при воздействии вируса.

Как используется в настоящем документе, термин «пермиссивный» по отношению к вирусной инфекции относится к клетке, которая легко инфицируется при воздействии вируса.

Используемый в настоящем документе термин «гаплотип» представляет собой набор вариаций или полиморфизмов ДНК, которые наследуются вместе, и может

относиться к группе аллелей или набору однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), расположенных на одной хромосоме.

Используемый в настоящем документе термин «подобранный гаплотип» означает иммунологическую совместимость между гаплотипом донора и гаплотипом реципиента или пациента, такую что гаплотип донора достаточно совместим с иммунной системой реципиента или пациента, чтобы избежать клиренса со стороны иммунной системы реципиента.

Используемый в настоящем документе термин «несовпадающий гаплотип» означает иммунологическую несовместимость между гаплотипом донора и гаплотипом реципиента или пациента, такую что гаплотип донора недостаточно совместим с иммунной системой реципиента или пациента и донорские клетки не могут избежать клиренса со стороны иммунной системы реципиента. «Иммунокомпрометирующее несоответствие» определяется как несоответствие между субъектом и клетками-носителями в локусе генетического полиморфизма, которое связано со значительным (например, 10% или более) снижением % совместимости, как определено соответствующими методами анализа, представленными в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «иммунологически совместимый» или «иммунокомпетентный» относится к клетке-носителю или вирусу, которые достаточно совместимы с иммунной системой субъекта/хозяина, чтобы избежать клиренса со стороны иммунной системы субъекта в течение времени, достаточного для доставки вируса к опухоли или раковой клетке субъекта.

Используемый в настоящем документе термин «ко-культура» или «совместное культивирование» относится к культуре клеток, в которой выращивают две или более различных популяций клеток.

Используемый в настоящем документе термин «загрузка» по отношению к клеткам может относиться к ассоциации клетки с агентом, таким как вирус, небольшая молекула, терапевтический агент, антитело и т.д., посредством химического или физического взаимодействия между клеткой и агентом на поверхности клетки или внутри клетки.

Как используется в настоящем документе, стволовые клетки, полученные из жировой ткани, или ADSC, представляют собой мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани донора.

Как используется в настоящем документе, мононуклеарная клетка периферической крови или PBMC представляет собой любую клетку периферической крови, имеющую круглое ядро, например лимфоциты, моноциты или макрофаги.

Как используется в настоящем документе, «L14 VV» представляет собой сконструированный штамм LIVP вируса осповакцины со встроенным ТК Turbo-FP635 (содержащий вставку ТК Turbo-FP635).

Как используется в настоящем документе, «WT1», также называемый «АСАМ2000», представляет собой тимидинкиназу (ТК) -позитивный штамм Wyeth вируса осповакцины дикого типа. Это штамм противооспенной вакцины, доступный в ЦКЗ США (CDCUSA).

Как используется в настоящем документе, метод образования бляшек (VPA) представляет собой анализ, используемый для определения количества инфекционного вируса или вирусного титра, выраженного в виде бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл или на образец.

Как используется в настоящем документе, «привилегированная» или «защищенная» клетка-носитель или клеточный носитель представляет собой клетку, которая была предварительно обработана и/или предварительно загружена агентом, таким как цитокин, *например*, интерферон (IFN или IFN), или антагонистами аллогенных детерминант инактивации/отторжения, чтобы защитить клетку от иммунного ответа.

Как используется в настоящем документе, «лечение» относится к облегчению симптомов заболевания или расстройства.

Используемый в настоящем документе термин «профилактика» относится к профилактическому лечению для снижения риска заболевания или расстройства или уменьшения их тяжести.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к любому млекопитающему, которого можно лечить способами и применениями, описанными в настоящем документе. Млекопитающие включают людей, других приматов, таких как шимпанзе, бонобо и гориллы, собак, кошек, коров, свиней, коз и других сельскохозяйственных животных и домашних животных. «Пациент» относится к людям.

Для ясности раскрытия, но не в качестве ограничения, подробное описание разделено на следующие подразделы.

Б. Выбор компонентов для вирусной терапии с использованием системы доставки на основе клеток ("клеточные носители")

(1) Системы доставки на основе клеток

Онколитические вирусы (OV) обладают способностью преимущественно инфицировать, накапливаться и убивать опухолевые клетки по сравнению с нормальными клетками. Эта способность может быть природной особенностью вируса

(например, реовируса, вируса болезни Ньюкасла и вируса эпидемического паротита), или вирусы могут быть генетически аттенуированы (ослаблены) таким образом, чтобы обходить противовирусный иммунитет и другие защитные механизмы организма субъекта (например, вирус везикулярного стоматита, вирус простого герпеса, аденовирус) или вирус может быть отобран или сконструирован с учетом предпочтительных опухолевых клеток с использованием, например, опухолеспецифических молекул поверхности клетки, факторов транскрипции и тканеспецифичных микроРНК (см., например, Cattaneo *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(7):529-540 (2008); Dorer *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(7-8):554-571 (2009); Kelly *et al.*, *Mol. Ther.*, 17(3):409-416 (2009) and Naik *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 9(9):1163-1176 (2009)).

Доставка онколитических вирусов может осуществляться путем прямой внутриопухолевой инъекции. Хотя прямая внутриопухолевая доставка может минимизировать воздействие вируса на нормальные клетки, часто существуют ограничения, связанные, например, с недоступностью очага опухоли (например, опухоли головного мозга) или для опухолей, которые имеют форму нескольких небольших узелков, разбросанных по большой площади. С другой стороны, при системной доставке вирус может достичь не только первичного очага опухоли, но и диссеминированных (распространившихся) метастазов.

Однако, независимо от способа доставки, успех лечения с использованием онколитических вирусов может быть поставлен под угрозу иммунной системой хозяина, которая быстро вызывает иммунный ответ и нейтрализует вирус (Kerrigan *et al.* (2017) *Cytotherapy* 19(4):445-457; Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56). К примеру, внутривенно доставленные вирусы подвергаются воздействию нейтрализующих антител, комплемента и различных иммунных клеток, а затем разрушаются (секвестрируются) и впоследствии очищаются такими органами, как легкие, селезенка и печень (Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56). Нейтрализующие антитела (NAb) связывают вирусы, блокируют их прикрепление к рецепторам поверхности клетки и ингибируют вирусную инфекцию, тем самым ограничивая терапевтический потенциал ОВ (Jennings *et al.* (2014) *Int. J. Cancer* 134: 1091-1101). В дополнение к врожденному иммунному ответу предыдущее воздействие, приводящее к адаптивному иммунитету, может быть более специфичным и сильным, а также ограничивающим терапевтический потенциал ОВ. Кроме того, физические барьеры, такие как внеклеточный матрикс и высокое давление интерстициальной жидкости опухолей, могут препятствовать эффективной доставке вирусных частиц к опухолевым клеткам (Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56).

Большинство людей подвергались воздействию ряда вирусов, включая вирус кори, аденовирус, вирус осповакцины и реовирус, в результате чего проявляют первичный иммунитет против вируса, который может снизить терапевтический потенциал онколитической вирусной терапии (виротерапии). Например, большинство пожилых людей ранее были вакцинированы против оспы, в результате чего у них уже существует первичный иммунитет против ортопоксвирусов, включая вирус коровой оспы. Даже если у субъекта еще не существует первичного иммунитета к конкретному OV, то начальная доза вируса приведет к возникновению устойчивого противовирусного иммунного ответа, ограничивая эффективность повторных доз, которые часто требуются для достижения сильного противоопухолевого ответа. Стратегии обхода данной проблемы включают использование иммуносупрессоров, таких как циклофосфамид, и использование клеток-носителей (клеточных систем доставки) для обхода иммунной системы и доставки OV к участкам опухоли.

Временная иммуносупрессия с использованием иммунодепрессантов, таких как циклофосфамид, такролимус, микофенолятмофетил и метилпреднизолона натрия сукцинат, успешно использовалась при трансплантации органов, но продемонстрировала ограниченный успех в улучшении доставки в опухоль системно вводимых OV (Guo *et al.* (2010) *Gene Ther.* 17(12):1465-1475; Guo *et al.* (2010) *Gene Ther.* 17(12):1465-1475). Использование иммуносупрессивных препаратов также может увеличить потенциальную токсичность вирусов и, кроме того, может снизить любые противоопухолевые реакции иммунной системы, которые в противном случае способствовали бы онколизу (Thorne *et al.* (2010) *Molecular Therapy* 18(9):1698-1705).

Использование клеточных носителей (клеток-носителей) для доставки OV может имитировать эволюцию вирусов для распространения в организме хозяина. Например, вирус иммунодефицита человека связывает циркулирующие дендритные клетки (DC) и макрофаги, которые могут мигрировать в лимфатические узлы и позволить вирусу достичь своей цели: CD4⁺ Т-клетки. Кроме того, вирусы, которые размножаются путем распространения от клетки к клетке, могут успешно уклоняться от нейтрализующих антител. Клинические испытания показали, что онколитический реовирус при внутривенном введении связывает циркулирующие клетки, сохраняя свою инфекционность и достигая опухолевых клеток даже в присутствии нейтрализующих антител (Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56). Преимущества использования клеточных носителей включают специфическую доставку OV к опухолевым клеткам, повышение их терапевтического потенциала и предотвращение токсичности вне клеточных мишеней, а также способность защищать OV от первичного противовирусного

иммунитета. Хемокины и молекулы адгезии, такие как интегрины, играют жизненно важную роль в перемещении клеток внутри иммунной системы и в опухоли. Было показано, что раковые клетки секретируют различные цитокины и хемокины, которые привлекают клетки-носители в опухоль. Другие факторы, такие как гипоксия, также могут способствовать способности клеток-носителей к самонаведению на клетки опухоли.

OV могут быть связаны с клеточными носителями за счет прикрепления к поверхности клеток-носителей посредством специфических или неспецифических взаимодействий или могут быть ими интернализованы. Интернализация OV иногда обеспечивает лучшую защиту от циркулирующих NAb и позволяет репликацию вируса внутри клеток, увеличивая количество доставляемого вируса. Однако вирусная инфекция может убить клетки-носители до того, как они достигнут своего целевого сайта(-ов), что предотвращая успешную доставку OV для онколизиса. С другой стороны, загрузка на поверхность клетки-носителя предотвращает амплификацию вируса до прибытия в очаг опухоли и может уменьшить количество доставленного вируса (Jennings *et al.* (2014) *Int. J. Cancer* 134:1091-1101; Willmon *et al.* (2009) *Molecular Therapy* 17(10):1667-1676).

Эффективность клетки-носителя для доставки OV зависит от нескольких факторов, включая: (1) успешное прикрепление (загрузка) вируса *ex vivo*; (2) накопление вируса *in vivo* в очаге опухоли; и (3) амплификацию/продуцирование вируса на участке опухоли (Guo *et al.* (2010) *Gene Ther.* 17(12):1465-1475). Идеальная клетка-носитель не только защищает OV от нейтрализации иммунной системой, но и специфически доставляет его в опухоль и обладает собственной противоопухолевой активностью. Клетка-носитель должна быть безопасной для введения, легко выделяемой и/или производимой, быть восприимчивой к инфицированию (заражению) вирусом, позволять вирусу профилироваться (размножаться, реплицироваться) и высвободить вирус в очаге опухоли перед уничтожением. Различные вирусы реплицируются с разной скоростью, и в идеале кинетика переноса клеток и репликации вируса должна быть совместимой, чтобы клетка-носитель достигала опухолевого участка, пока вирус реплицируется. Например, вирус везикулярного стоматита (VSV) – это быстро реплицирующийся вирус, и успешная доставка через клетки-носители может быть достигнута, если клетки вводятся через 1-2 часа после заражения. При более медленной репликации вирусов, таких как вирус осповакцины, появляется большая гибкость в оптимизации сроков заражения и доставки клеток-носителей (Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56). Выбор совместимой пары вируса и клетки-

носителя также может гарантировать, что репликация вируса не окажет отрицательного воздействия на циркуляцию и эффекторные функции клетки-носителя и не затруднит транспортировку опухоли. Так, *например*, преждевременная вирусная репликация и/или экспрессия может привести к разрушению клеток-носителей за счет прямой цитотоксичности или в результате косвенного клиренса со стороны иммунной системы, как только клетки-носители были идентифицированы как "инфицированные" (Willmon *et al.* (2009) *Molecular Therapy* 17(10):1667-1676). В тех случаях, когда вирусная инфекция вызывает экспрессию вирусных антигенов на поверхности клеток-носителей, можно сконструировать вирус таким образом, чтобы он реплицировался, как только достигнет опухоли, чтобы уменьшить или предотвратить иммуноопосредованное разрушение клеточных носителей. Например, опухолеспецифические и индуцированные гипоксией промоторы могут быть использованы можно использовать для управления репликацией вируса в участке опухоли (Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56).

В дополнение к соображениям о совместимости клеток-носителей вируса в отношении кинетических параметров, как обсуждалось выше, клетка-носитель, как и ассоциированный с ней онколитический вирус, должна быть способна преодолевать врожденные и адаптивные иммунные барьеры, одновременно способствуя амплификации вируса в опухолевых/раковых клетках. Использование аутологичных клеток-носителей (клеток, полученных от субъекта, подлежащего лечению) может минимизировать врожденные и иммунные ответы, направленные против клеток-носителей, но может быть обременительным для субъекта, дорогостоящим и ограничивающим их доступность. Аллогенные клетки-носители, которые могут включать в себя множество легко изолируемых и/или коммерчески доступных клеток/клеточных линий, обеспечивают легкость доступности и неинвазивность для субъекта; однако большая часть врожденных и/или адаптивных иммунных ответов может поставить под угрозу их терапевтическую эффективность и клиническую применимость. Представленные в настоящем документе способы позволяют проводить скрининг, идентификацию и отбор «подходящих» клеточных носителей, которые могут потенцировать вирусную терапию специфичным для рака образом и/или индивидуально для субъекта. Согласно представленным в настоящем документе способам, доступные потенциальные кандидаты в клеточные носители подвергаются скринингу таким образом, чтобы выявлять клетки-носители, чья способность стимулировать амплификацию вируса и/или проявлять терапевтическую эффективность вируса у субъекта не подвергается значительному снижению иммунными ответами против клеточного носителя и/или комбинации клетки-носителя и

вируса. Идентифицированные таким образом клеточные носители затем могут быть использованы для виротерапии, опосредованной субъектом и/или специфичными для рака клетками-носителями, в соответствии со способами лечения, представленными в настоящем документе.

Способы выбора клеток-носителей, представленные в настоящем документе, могут быть использованы для скрининга любых типов клеток, которые использовались в качестве клеток-носителей для доставки OV. Как описано в настоящем документе, отобранные типы клеток-носителей скрининга могут быть ранжированы на основе их способности способствовать вирусную амплификацию и/или уклоняться от атаки со стороны иммунной системы у конкретного субъекта, который подлежит лечению с использованием опосредованной клетками-носителями вирусной онкотерапии; чем выше способность, тем выше «ранг». Затем один или несколько типов клеточных носителей, оцененных как «высокие», выбирают как соответствующие конкретному субъекту и/или конкретному раку, подлежащему лечению. В настоящем документе также представлены способы лечения с использованием выбранных таким образом типов клеток-носителей.

В качестве клеточных носителей использовались различные типы клеток, и любой из них может быть подвергнут скринингу (отбору/подбору) с помощью способов, представленных в настоящем документе. В некоторых примерах, как обсуждается в настоящем документе, клетки-носители могут быть модифицированы для обеспечения лучшей совместимости с интересующим объектом. Далее выбранные и/или модифицированные клетки-носители могут быть использованы в способах лечения, предусмотренных в настоящем документе. Ниже описаны примеры типов клеток-носителей для доставки OV, которые могут включать, *например*, стволовые клетки/клетки-предшественники, иммунные клетки и раковые/трансформированные клетки. Клеточные носители, подвергнутые скринингу в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, могут быть аутологичными, *т.е.* происходить от субъекта, подлежащего лечению, или аллогенными, *т.е.* происходить от донора, отличного от субъекта, подлежащего лечению. Примеры клеток-носителей для использования в способах, комбинациях и композициях, представленных в настоящем документе, приводятся ниже.

–Типы клеточных носителей (аутологичные или аллогенные)

Стволовые Клетки, Иммунные Клетки, Линии Раковых Клеток

Стволовые клетки, иммунные клетки и опухолевые/раковые клетки могут использоваться в качестве средств доставки онколитических вирусов (OV), включая вирус простого герпеса (HSV-1), парвовирус, вирус кори, вирус везикулярного стоматита

(VSV), вирус осповакцины, реовирус, вирус болезни Ньюкастла и аденовирус, и другие. Системы доставки, используемые в композициях и способах, предусмотренных в настоящем документе, выделяют в виде композиций, образованных путем инкубации изолированных клеток-носителей/средств доставки на основе клеток с онколитическими вирусами; они не являются частью растений или животных. В вариантах осуществления изобретения клетки можно культивировать для использования в качестве носителей.

Эти клетки демонстрируют способность к нацеливанию (самонаведению) на опухоли, что усиливает терапевтический эффект OV. Подобная опухолевая селективность обусловлена притяжением таких клеток к микроокружению опухоли, которое характеризуется гипоксией, воспалением и обилием молекул хемоаттрактантов, таких как цитокины и хемокины.

Стволовые Клетки

Стволовые клетки обладают врожденной способностью к самонаведению на опухоль, что делает их привлекательными кандидатами в качестве клеток-носителей для онколитической вирусной терапии (виротерапии). Это связано с тем, что микроокружение опухоли богато различными факторами роста, ангиогенными факторами, цитокинами и хемокинами, которые поддерживают неконтролируемый рост опухолей. Гипоксическая природа TME также способствует миграции стволовых клеток в сторону опухолей. Стволовые клетки также привлекательны в качестве клеток-носителей еще и потому, что они обладают высокой иммуносупрессивностью и экспрессируют более низкие уровни молекул, необходимых для процессинга и презентации антигена, что задерживает распознавание переносимых ими вирусов иммунной системой (Kimetal.(2015) *Viruses* 7:6200-6217). Примеры стволовых клеток, которые могут быть использованы в качестве клеточных носителей (систем доставки) для онколитических вирусов (OV), включают эндотелиальные клетки-предшественники, нервные стволовые клетки и мезенхимальные стволовые клетки.

Было показано, что эндотелиальные клетки-предшественники являются домом для участков новой сосудистой сети опухоли (опухолевой неоваскуляризации) и могут успешно использоваться для доставки онколитического вируса кори в мышинной модели глиомы человека (Guoetal. (2008) *BiochimBiophysActa* 1785(2):217-231). Эти клетки быстро делятся *in vivo*, но не являются бессмертными, и новые клетки необходимо выделять повторно из клинических образцов (Kimetal. (2015) *Viruses* 7:6200-6217).

Нервные стволовые клетки (NSC), которые дифференцируются в различные клетки нервной системы, включая нейроны и глиальные клетки, были первыми

стволовыми клетками, исследованными в качестве клеточных носителей для доставки терапевтических агентов к опухолям головного мозга (Kerrigan *et al.* (2017) *Cytotherapy* 19(4):445-457). NSC проявляют сильный тропизм к опухолям глиобластомы из-за опосредованной гипоксией фактора (HIF) экспрессии фактора-1, происходящего из стромальных клеток (SDF-1), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и активатора урокиназы плазминогена (uPA) в клетках глиомы (Kim *et al.* (2015) *Viruses* 7:6200-6217). NSC используются для доставки, например, IL-4, IL-12, IL-23, цитозиндезаминазы, антиангиогенного белка тромбоспонина и OV, таких как аденовирус, в глиомы. Тем не менее, NSC должны быть изолированы от тканей мозга зародыша или из перивентрикулярной зоны мозга взрослого человека во время операции, что является недостатком для их использования в качестве клеток-носителей.

Костный мозг взрослого человека был использован в качестве альтернативного источника стволовых клеток, поскольку стволовые клетки костного мозга легко приобретаются и могут быть получены от самих пациентов для аутологичной трансплантации, исключая иммунное отторжение (Kerrigan *et al.* (2017) *Cytotherapy* 19(4):445-457). Из различных доступных стволовых клеток костного мозга мезенхимальные стволовые клетки (MSK) привлекательны в качестве клеток-носителей, поскольку они легко выделяются у пациентов и размножаются *in vitro*, при этом они поддерживают репликацию (OV) и защищают его от немедленной нейтрализации иммунной системой, их можно легко сконструировать, и они по своей природе являются домом для опухолей *in vivo* из-за связанной с опухолью экспрессии воспалительных цитокинов. MSK можно использовать даже в качестве автономных противораковых агентов. Например, исследования продемонстрировали способность к самонаведению на опухоль и онколитические эффекты у MSK, экспрессирующих IFN- β (IFN- β) (Nakashima *et al.* (2010) *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(2-3):119-126).

MSK экспрессируют низкие уровни молекул МНС класса I и не экспрессируют молекулы МНС класса II на своей поверхности клетки, что делает возможной аллогенную трансплантацию. MSK также могут ингибировать пролиферацию Т-клеток и дифференцировку моноцитов в дендритные клетки (DC) и могут подавлять экспрессию гамма-интерферона IFN- γ и фактора некроза опухоли, продуцируемого CD4⁺ Т-хелперами (Kim *et al.* (2015) *Viruses* 7:6200-6217). MSK также способны разрушать внеклеточный матрикс посредством секреции протеаз, что может помочь преодолеть физические барьеры на пути доставки онколитических вирусов (Ramirez *et al.* (2015) *Oncolytic Virotherapy* 4:149-155). Еще одним преимуществом использования MSK является то, что они могут быть заморожены после вирусной инфекции и после

размораживания сохраняют активную репликацию вируса и противоопухолевую активность, что позволяет хранить их (RoyandBell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56). Помимо костного мозга, MSK также можно выделить из жировой ткани, пуповинной крови, периферической крови, мышц, хрящей и околоплодных вод, причем жировая ткань является наиболее привлекательным источником из-за легкости доступа и обилия жировой ткани (Kerrigan *et al.* (2017) *Cytotherapy* 19(4):445-457; Nakashima *et al.* (2010) *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(2-3):119-126).

MSK могут служить переносчиками онколитического аденовируса для лечения рака поджелудочной железы, рака мозга, почечно-клеточного рака, глиобластомы и рака яичников, а также в качестве переносчиков вируса кори для лечения рака яичников и гепатоцеллюлярной карциномы (Kim *et al.* (2015) *Viruses* 7:6200-6217). Например, MSK использовались в качестве клеточных носителей онколитического аденовируса ICOVIR-5 для лечения детей с прогрессирующей метастатической нейробластомой (Kerrigan *et al.* (2017) *Cytotherapy* 19(4):445-457; Ramirez *et al.* (2015) *Oncolytic Virotherapy* 4:149-155).

Однако одним из недостатков использования MSK является их способность стимулировать рост опухоли, что было продемонстрировано на моделях рака молочной железы, опухолей эндометрия и глиомы. Чтобы преодолеть это потенциальное падение, MSK могут быть сконструированы таким образом, чтобы гарантировать их разрушение при доставке OV к опухоли, например, путем переноса генов самоубийства (суицидные гены) (Kerrigan *et al.* (2017) *Cytotherapy* 19(4):445-457).

Примеры стволовых клеток (аутологичных или аллогенных), которые могут быть использованы в качестве клеток-носителей, включают: взрослые стволовые клетки; эмбриональные стволовые клетки; фетальные стволовые клетки; нервные стволовые клетки; мезенхимальные стволовые клетки (например, выделенные/полученные из: костного мозга взрослого человека, жировой ткани, пульпы зуба, пуповины новорожденного, пуповинной крови, плаценты, адгезивных стромальных клеток из плаценты, децидуальных стромальных клеток из плаценты, регенеративных клеток эндометрия клетки, бипотентные эндотелиальные/мезенхимные клетки-предшественники плаценты, мезенхимальные стволовые клетки амниотической мембраны или жидкости, предшественники амниотической жидкости, мезенхимальные стволовые клетки Wharton's Jelly, стволовые клетки тазового пояса, мезенхимальные стволовые клетки ворсин хориона, мезенхимальные клетки стромы подкожной белой жировой ткани ретикулярные стволовые клетки, стволовые клетки из волосяного фолликула, гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, полученные из надкостницы, мезенхимальные стволовые клетки латеральной пластинки,

стволовые клетки слущенных молочных зубов, стволовые клетки периодонтальной связки, клетки-предшественники зубных фолликулов, стволовые клетки апикального сосочка, мышечные сателлитные клетки и др.); нервные стволовые клетки; тотипотентные стволовые клетки; плюрипотентные стволовые клетки; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; мультипотентные стволовые клетки; олигопотентные стволовые клетки; унипотентные стволовые клетки; стволовые клетки стромы жировой ткани; эндотелиальные стволовые клетки (*например*, эндотелиальные клетки-предшественники, клетки-предшественники эндотелия плаценты, ангиогенные эндотелиальные клетки, перициты); стволовые клетки периферической крови взрослых; миобласты; мелкие ювенильные стволовые клетки; стволовые клетки фибробластов кожи; фибробласты, ассоциированные с тканью/опухолью; эпителиальные стволовые клетки; и, *например*, эмбриональные эпителиальные стволовые клетки. В вариантах осуществления композиций и способов, представленных в настоящем документе, клетки-носители не являются одними или несколькими эмбриональными стволовыми клетками, эмбриональными стволовыми клетками, стволовыми клетками пуповинной крови, стволовыми клетками, полученными из околоплодных вод, или стволовыми клетками, полученными из плаценты.

Иммунные Клетки

Иммунные клетки, которые реагируют на «сигналы опасности», высвобождаемые опухолями при транспортировке в раковые очаги, широко исследовались в качестве клеток-носителей для OV. Эти иммунные клетки включают Т-клетки, включая $\gamma\delta$ Т-клетки, CAR-Т-клетки, нацеленные на опухолеспецифические антигены, трансгенные клетки TCR, нацеленные на опухолеспецифические антигены; NKT-клетки, лимфоциты, моноциты, макрофаги, тучные клетки, гранулоциты, дендритные клетки (DC), естественные киллеры (NK), миелоидные супрессорные клетки, лимфокин-активированные киллеры (LAK) и цитокин-индуцированные киллеры (CIK) клетки, *например*. Иммунные клетки привлекательны в качестве клеточных носителей, поскольку они циркулируют системно и могут распознавать опухоли (Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56). Использование иммунных клеток в качестве носителей для OV может также обеспечить дополнительную противоопухолевую активность в виде прямой цитотоксичности или за счет первичных адаптивных противоопухолевых иммунных ответов (Jennings *et al.* (2014) *Int. J. Cancer* 134:1091-1101).

Например, опухолевые антиген-специфические Т-клетки обладают прямыми противоопухолевыми эффекторными функциями, и активированные Т-клетки широко исследовались при доставке OV к опухолям. Было показано, что загрузка адоптивно

перенесенных Т-клеток OV может помочь бороться с иммуносупрессивной природой микроокружения опухоли, поскольку провоспалительная природа вирусной инфекции может предотвратить подавление и инактивацию Т-клеток (Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56). Внутриопухолевая экспрессия хемокинов, таких как CCL3, CCL21 и CXCL10 (IP-10), усиливает опухолеспецифический транспорт адаптивных Т-клеток. Т-клетки также могут быть генетически сконструированы для экспрессии хемокиновых рецепторов, таких как CXCR2, чтобы помочь направить их к опухолям (Guo *et al.* (2008) *BiochimBiophysActa* 1785(2):217-231). Исследования показали, что вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус простого герпеса, вирус болезни Ньюкасла и частицы ретровируса могут прикрепляться к поверхности Т-клеток и доставляться к опухолевым клеткам либо пассивно, либо через клеточные синапсы между носителем и опухолевыми клетками (Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56). Несмотря на преимущества использования Т-клеток в качестве носителей OV, выращивание популяции Т-клеток против высокоспецифичных опухолевых антигенов у пациентов по-прежнему остается очень дорогостоящим и трудным, что ограничивает их использование (Willmon *et al.* (2009) *Molecular Therapy* 17(10):1667-1676).

Активированные лимфокинами клетки-киллеры (клетки LAK) показали себя многообещающими в сочетании с IL-2 при лечении рака яичников. Незрелые дендритные клетки (iDC), клетки LAK и их совместные культуры (LAKDC) тестировали в качестве клеточных носителей реовируса при лечении рака яичников, и было показано, что LAKDC, загруженные реовирусом, способны защищать реовирус от нейтрализующих антител, индуцировать провоспалительный цитокин milieu и формирует врожденный и адаптивный противоопухолевый иммунный ответ (Jenning *et al.* (2014) *Int. J. Cancer* 134:1091-1101). Клетки DC также успешно использовались в качестве носителей реовируса для лечения меланомы (Jenning *et al.* (2014) *Int. J. Cancer* 134:1091-1101).

Клетки CIK представляют собой еще один тип иммунных клеток, которые могут использоваться в качестве носителей для OV. В то время как опухолевые антиген-специфические Т-клетки распознают один антиген, клетки CIK распознают лиганды NKG2D, которые часто активируются на различных опухолевых клетках, что делает их более универсальными. Клетки CIK также легче изолировать (выделить) от пациентов и размножить *ex vivo*, при этом они могут продуцировать высокие титры вируса и успешно использоваться для доставки вирусов кори и коровьей оспы в опухоли (Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56; Willmon *et al.* (2009) *Molecular Therapy* 17(10):1667-1676; Power and Bell (2007) *Mol. Ther.* 15(4):660-665). Однако одним из недостатков

использования клеток СИК является то, что для их образования требуется увеличение количества первичных лейкоцитов с использованием цитокинов *in vivo* (Kimetal. (2015) *Viruses* 7:6200-6217).

Макрофаги представляют собой еще один потенциальный класс клеточных носителей для ОВ. Поскольку опухоли часто секретируют хемотаксический белок-1 моноцитов, макрофагальный колониестимулирующий фактор и VEGF, моноциты естественным образом мигрируют к участкам опухоли, локализуются в гипоксических областях и дифференцируются в связанные с опухолью макрофаги, которые могут усиливать ингибирование роста опухоли (RoyandBell (2013) *OncolyticVirotherapy* 2:47-56). В результате были проведены доклинические исследования макрофагов на предмет их применения в качестве клеточных носителей для доставки онколитического аденовируса и вируса кори. В дополнение к другим обсуждаемым типам иммунных клеток, клетки-супрессоры миелоидного происхождения также были исследовали в качестве клеток-носителей для доставки онколитического VSV.

Раковые Клетки

Раковые клетки, часто инактивированные γ -облучением перед введением в целях безопасности, также успешно использовались в качестве клеток-носителей для ОВ. γ -облучение может предотвратить туморогенность, но сохранить продуцирование вируса. Другая мера безопасности включает в себя разработку ОВ для экспрессии суицидных генов (генов самоубийства), таких как тимидинкиназа, чтобы гарантировать, что раковые клетки не останутся в организме субъекта на неопределенный срок (*m.e.*, погибнут и больше не будут бессмертными). В качестве альтернативы можно использовать аллогенные раковые клетки, которые обычно очищаются иммунной системой реципиента (PowerandBell (2007) *Mol. Ther.* 15(4):660-665).

Раковые клетки могут быть легко получены в больших количествах и демонстрируют более высокие уровни вирусной инфекционности и амплификации, чем нормальные клетки (Guo *et al.* (2010) *Gene Ther.* 17(12):1465-1475; Roy and Bell (2013) *Oncolytic Virotherapy* 2:47-56). Кроме того, некоторые опухолевые клетки мигрируют специально в определенные органы, как это наблюдается при метастатическом заболевании. Например, клетки миеломы экспрессируют высокие уровни хемокинового рецептора CXCR4, что приводит к метастазам в костном мозге, и были использованы для доставки онколитического вируса кори (RoyandBell (2013) *OncolyticVirotherapy* 2:47-56). Было показано, что различные трансформированные клеточные линии успешно доставляют онколитический парвовирус, вирус кори и вирус везикулярного стоматита как у иммунокомпетентных, так и у иммунодефицитных

животных. Например, клетки карциномы, инфицированные VSV или аденовирусом, использовались для эффективной доставки вируса к метастазам в легких у мышей (Willmon *et al.* (2009) *Molecular Therapy* 17(10):1667-1676; Power and Bell (2007) *Mol. Ther.* 15(4):660-665). Однако было показано, что клетки, полученные из солидных опухолей, накапливаются в легких мышей после внутривенного введения из-за их большого диаметра. В результате раковые клетки кроветворного/гематологического происхождения могут быть лучшей альтернативой, поскольку они более широко распространены в организме и могут доставлять OV в анатомические места за пределами легких (Power and Bell (2007) *Mol. Ther.* 15(4):660-665).

Примеры линий аллогенных гематологических злокачественных клеток человека, которые могут использоваться в качестве клеток-носителей, включают: лейкозные клетки (такие как, *например*, KASUMI-1, HL-60, THP-1, K-562, RS4; 11, MOLT-4, CCRF-CEM, JVM-13, 31E9, ARH-77, MoB, JM1, NALM-1, ProPak-X.36); Т-клеточные лейкозные клетки (такие как, *например*, HM-2, CEM-CM3, Jurkat/Jurkat clone E6-1, J.CaM1.6, BCL2 Jurkat, BCL2 S87A Jurkat, BCL2 S70A Jurkat, Neo Jurkat, BCL2 AAA Jurkat, J.RT3-T3.5, J45.01, J.gamma1, J.gamma1.WT, JK28, P116, P116.cl39, A3, JX17, D1.1, I 9.2, I 2.1); клетки миеломоноцитарного лейкоза (*например*, MV-4-11); клетки лимфомы (*например*, HT, BC-3, CA46, Raji, Daudi, GA-10-Clone-4, HH, H9); клетки неходжкинской лимфомы (*например*, SU-DHL-1, SU-DHL-2, SU-DHL-4, SU-DHL-5, SU-DHL-6, SU-DHL-8, SU-DHL-10, SU-DHL-16, NU-DUL-1, NCEB-1, EJ-1, BCP-1, TUR, U-937); клетки лимфомы Беркитта (*например*, Ramos/RA 1, Ramos.2G6.4C10, P3HR-1, Daudi, ST486, Raji, CA46, опухоль щеки человеческого гаммагерпеса 4/HHV-4 от пациента с лимфомой Беркитта, DG-75, GA-10, NAMALWA, HS-Sultan, Jiyoue, NC-37, 20-B8, EB2, 1G2, EB1, EB3, 2B8, GA-10 клон 20, гибрид НКВ-11/В-клеток почки); диффузные большие клетки лимфомы В-клеток (*например*, Toledo, Pfeiffer); клетки лимфомы из клеток мантии (*например*, JeKo-1, JMP-1, PF-1, JVM-2, REC-1, Z-138, Mino, MAVER-1); клетки AML (*например*, AML-193, BDCM, KG-1, KG-1a, Kasumi-6, HL-60/S4); клетки CML (*например*, K562, K562-r, K562-s, LAMA84-r, LAMA84-s, AR230-r, AR230-s); BCE клетки (*например*, N6/ADR, RS4; 11, клон NALM6 G5, Loucy, SUP-B15, CCRF-SB); клетки эритролейкемии (*например*, линия изогенных клеток IDH2-мутант-TF-1); клетки миеломонобластного лейкоза (*например*, GDM-1); клетки злокачественной неходжкинской лимфомы NK (*например*, NK-92, NK-92MI); клетки миеломы/плазмцитомы (*например*, U266B1/U266, HAA1, SA13, RPMI8226, NCI-H929, MC/CAR); клетки множественной миеломы (*например*, MM.1R, IM-9, MM.1S); и клеточные линии макрофагов (*например*, MD, SC, WBC264-9C).

Коммерческие аллогенные клеточные линии включают: мезенхимальные стволовые клетки, такие как, *например*, APCETH-201, APCETH-301 (APCETH), Cx601 (TIGENIX), TEMCELL, MSC-100-IV, Prochymal (MESOBLAST); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), такие как, *например*, ToleraCyte (Fate Therapeutics); клетки фибробластов, *например*, CCD-16Lu, WI-38; ассоциированные с опухолью фибробласты, *например*, Malme-3M, COLO 829, HT-144, Hs 895.T, hTERT PF179T CAF и т.д.; эндотелиальные клетки, *например*, HUVEC, HUVEC/TERT 2, TIME; эмбриональные эпителиальные клетки, *например*, HEK-293, HEK-293 STF, 293T/17, 293T/17 SF, HEK-293.2sus; эмбриональные стволовые клетки, *например*, hESC BG01V; и эпителиальные клетки, *например*, NuLi-1, ARPE-19, VK2/E6E7, Ect1/E6E7, RWPE-2, WPE-stem, End1/E6E7, WPMY-1, NL20, NL20-TA, WT 9-7, WPE1-NB26, WPE-int, RWPE2-W99, BEAS-2B. В вариантах осуществления представленных в настоящем документе композиций и способов клетки-носители не имеют эмбрионального происхождения, *например*, эмбриональные эпителиальные клетки, эмбриональные стволовые клетки, фетальные клетки и т.д.

Аутологичные или аллогенные цельноклеточные вакцины включают GM-CSF секретирующие цельноклеточные вакцины (GVAX), такие как, *например*, GVAX простаты (на основе PC3/LNCaP); GVAX поджелудочной железы; GVAX легкого; и GVAX почечной клетки и т.д., от CellGenesys/BioSante/AduroBiotech.

Аллогенные линии опухолевых клеток человека включают, *например*, панель NCI-60 (BT549, HS 578T, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T-47D, SF268, SF295, SF539, SNB-19, SNB-75, U251, Colo205, HCC 2998, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW620, 786-O, A498, ACHN, CAKI, RXF 393, SN12C, TK-10, UO-31, CCRF-CEM, HL-60, K562, MOLT-4, RPMI-8226, SR, A549, EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H322M, NCI-H460, NCI-H522, LOX IMVI, M14, MALME-3M, MDA-MB-435, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62, IGROV1, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVKAR-8, SK-OV-3, НЦИ-АДР-РЭС, ДУ145, ПК-3). Другие аллогенные линии опухолевых клеток человека включают, *например*, линии клеток фибросаркомы (HT-1080); клеточные линии гепатокарциномы (Hih-7); линии клеток рака простаты (LAPC4, LAPC9, VCaP, LuCaP, MDA PCa 2a/2b, C4, C4-2, PTEN-CaP8, PTEN-P8); линии клеток рака молочной железы (HCC1599, HCC1937, HCC1143, MDA-MB-468, HCC38, HCC70, HCC1806, HCC1187, DU4475, BT-549, Hs 578T, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-157, MDA-MB-453, HCC1599, HCC1937, HCC1143, MDA-MB-468, HCC38, HCC70, HCC1806, HCC1187, DU4475, BT-549, Hs 578T, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-157, MDA-MB-453, BT-20, HCC1395, MDA-MB-361, EMT6, T-47D,

HCC1954); линии клеток рака головы и шеи (A-253, SCC-15, SCC-25, SCC-9, FaDu, Detroit 562); линии клеток рака легких (NCI-H2126, NCI-H1299, NCI-H1437, NCI-H1563, NCI-H1573, NCI-H1975, NCI-H661, Calu-3, NCI-H441); линии клеток рака поджелудочной железы (Capan-2, Panc 10.05, CFPAC-1, HPAF-II, SW 1990, BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2, Hs 766T, Panc 05.04, PL45); линии клеток рака яичников (PA-1, Caov-3, SW 626, SK-OV-3); линии клеток рака костей (HOS, A-673, SK-PN-DW, U-2 OS, Saos-2); линии клеток рака толстой кишки (SNU-C1, SK-CO-1, SW1116, SW948, T84, LS123, LoVo, SW837, SNU-C1, SW48, RKO, COLO 205, SW1417, LS411N, NCI-H508, HT-29, Caco-2, DLD-1); клеточные линии рака желудка (KATOIII, NCI-N87, SNU-16, SNU-5, AGS, SNU-1); линии клеток гинекологического рака (SK-LMS-1, HT-3, ME-180, Caov-3, SW626, MES-SA, SK-UT-1, KLE, AN3-CA, HeLa); линии клеток саркомы (SW684, HT-1080, SW982, RD, GCT, SW872, SJSA-1, MES-SA/MX2, MES-SA, SK-ES-1, SU-CCS-1, A-673, VA-ES-BJ, HS 822.T, RD-ES, HS 132.T, HS 737.T, HS 863.T, HS 127.T, HS 324.T, HS 821.T, HS 706.T, HS 707 (B) .Ep, LL 86/LeSa, Hs 57.T, HS 925.T, GCT, KHOS-312H, KHOS/NP R-970-5, SK-LMS-1, HOS); линии клеток меланомы (SK-MEL-1, A375, G-361, SK-MEL-3, SH-4, SK-MEL-24, RPMI-7951, CHL-1, Hs 695T, A2058, VMM18, A375.S2, Hs 294T, VMM39, A375-P, VMM917, VMM5A, VMM15, VMM425, VMM17, VMM1, A375-MA1, A375-MA2, SK-MEL-5, Hs 852.T, LM-MEL-57, A101D, LM-MEL-41, LM-MEL-42, MeWo, LM-MEL-53, MDA-MB-435S, C32, SK-MEL-28, SK-MEL-2, MP38, MP41, C32TG, NM2C5, LM-MEL-1a, A7/M2A7); линии клеток плоскоклеточного рака (SiHa, NCI-H520, SCC-15, NCI-H226, HCC1806, SCC-25, FaDu, SW 954, NCI-H2170, SCC-4, SW 900, NCI-H2286, NCI-H2066, SCC-9, SCaBER, SW579, SK-MES-1, 2A3, UPCI: SCC090, UPCI: SCC152, CAL 27, RPMI 2650, UPCI: SCC154, SW756, NCI-H1703, ME-180, SW962); линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы (Hep G2, Hep 3B2.1-7/Hep 3B, C3A, Hep G2/2.2.1, SNU-449, SNU-398, SNU-475, SNU-387, SNU-182, SNU-423, PLC/PRF/5); линии клеток рака мочевого пузыря (5637, HT-1197, HT-1376, RT4, SW780, T-24, TCCSUP, UM-UC-3); линии клеток почечно-клеточной карциномы (ACHN, 786-O/786-0, 769-P, A-498, Hs 891.T, Caki-2, Caki-1); клеточные линии эмбриональной карциномы/тератомы яичка (NTERA-2 cl.D1, NCCIT, Tera-2, Tera-1, Cates-1B); линии клеток глиобластомы (LN-229, U-87 MG, T98G, LN-18, U-118 MG, M059K, M059J, U-138 MG, A-172); линии клеток астроцитомы (SW 1088, CCF-STTG1, SW 1783, CHLA-03-AA); линии клеток рака мозга (PFSK-1, Daoy); линии клеток карциномы щитовидной железы (TT, MDA-T68, MDA-T32, MDA-T120, MDA-T85, MDA-T41) и линии клеток мезотелиомы (NCI-H28, NCI-H226, NCI-H2452, NCI-H2052, MSTO-211H).

(2) Выбор вирусов

Клетки-носители, отобранные и/или модифицированные в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, могут быть использованы для виротерапии любым вирусом, идентифицированным как обладающий онколитическими свойствами. В некоторых примерах представленных в настоящем документе способов выбора клетки-носителя, которая соответствует определенному субъекту и/или типу рака, подлежащему лечению, клетка-носитель также может быть выбрана на основе ее способности стимулировать амплификацию онколитического вируса, который будет использоваться для лечения. Комбинация клетка-носитель-вирус, выбранная в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, для идентификации субъекта и/или совпадения, специфичного для рака, может использоваться в способах лечения, предусмотренных в настоящем документе. Примеры онколитических вирусов, которые могут быть использованы в способах, комбинациях и композициях, предусмотренных в настоящем документе, указаны ниже.

– Типы вирусов

Онколитические вирусы характеризуются в значительной степени специфичной для опухолевых клеток репликацией, что приводит к лизису опухолевых клеток и эффективной регрессии опухоли. Онколитические вирусы осуществляют лечение путем колонизации или накопления в опухолевых клетках, включая метастатические опухолевые клетки, такие как циркулирующие опухолевые клетки, и репликации в них. Описанное в настоящем документе изобретение можно использовать с любой противораковой вакциной или вирусом. Например, онколитический вирус может быть любым природным или сконструированным рекомбинантным вирусом, таким как, но не ограничиваясь ими, вирус осповакцины, поксвирус, вирус простого герпеса, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус кори, реовирус, вирус везикулярного стоматита, вирус Коксаки, вирус леса Семлики, вирус Сенека-Валли, вирус болезни Ньюкасла, вирус Сендай, вирус денге, пикорнавирус, полиовирус, парвовирус, ретровирус, лентивирус, альфавирус, флавивирус, рабдовирус, папилломавирус, вирус гриппа, вирус паротита, вирус эпидемии паротита и вирус Синдбис, среди прочих. Во многих случаях опухолевая селективность является неотъемлемым свойством вируса, такого как вирусы осповакцины и другие онколитические вирусы. Обычно онколитические вирусы осуществляют лечение путем репликации в опухолях или опухолевых клетках, что приводит к лизису (гибели) опухолевых клеток.

В некоторых вариантах реализации аттенуированный штамм, полученный из патогенного вируса, используется для производства живой вакцины. Неограничивающие

примеры вирусов осповакцины включают, но не ограничиваются ими, Lister (также известный как Elstree), New York City Board of Health (NYCBH), Dairen, Ikeda, LC16M8, Western Reserve (WR), Copenhagen (Cop), Tashkent, Tian Tan, Wyeth, Dryvax, IHD-J, IHD-W, Brighton, Ankara, модифицированной осповакцины Ankara (MVA), Dairen I, LIPV, LC16M0, LIPV, WR 65-16, EM63, Bern, Paris, CVA382, штаммы NYVAC, ACAM2000 и Connaught. Вирусы могут быть клональными штаммами онколитического вируса. Последовательность нуклеотидов, кодирующих фермент, продуцирующий хромофор, может быть вставлена в несущественный ген или область в геноме немодифицированного онколитического вируса или вместо него, или вставлена в нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный ген, или вместо нее. продукт в геноме немодифицированного онколитического вируса.

В некоторых вариантах реализации вирус осповакцины, используемый в раскрытых в настоящем документе способах, представляет собой аттенуированный штамм департамента здравоохранения Нью-Йорка (NYCBH). В некоторых вариантах реализации штамм вируса осповакцины NYCBH может представлять собой ATCC VR-118 или CJ-MVB-SPX.

В некоторых вариантах реализации вирус осповакцины выбран из Dryvax, ACAM1000, ACAM2000, Lister, EM63, LIPV, Tian Tan, Copenhagen, Western Reserve или модифицированной осповакцины Ankara (MVA). В некоторых вариантах реализации онколитический вирус не является дефицитным по каким-либо генам, присутствующим в одном или нескольких из этих штаммов.

В некоторых вариантах реализации вирус или вакцина представляет собой вирус, способный к репликации. В некоторых вариантах реализации вирус или вакцина имеет недостаточную репликацию.

В некоторых вариантах реализации вирус или вакцина не аттенуированы.

Другие немодифицированные онколитические вирусы включают любые, известные специалистам в данной области техники, включая вирусы, выбранные из вирусов, обозначенных как GLV-1h68, JX-594, JX-954, ColoAd1, MV-CEA, MV-NIS, ONYX-015, B18R, H101, OncoVEX GM-CSF, Reolysin, NTX-010, CCTG-102, Cavatak, Oncorine и TNFerade.

Онколитические вирусы для использования в способах, представленных в настоящем документе, включают несколько хорошо известных специалисту в данной области техники и включают, *например*, вирус везикулярного стоматита, *см.*, *например*, патенты США № 7,731,974, № 7,153,510, № 6,653,103 и опубликованные заявки США № 2010/0178684, № 2010/0172877, № 2010/0113567, № 2007/0098743, № 20050260601, №

20050220818 и патенты ЕР № 1385466, № 1606411 и 1520175; вирус простого герпеса, см., например, патенты США № 7,897,146, № 7,731,952, № 7,550,296, № 7,537,924, № 6,723,316, № 6,428,968 и опубликованные заявки США № 2011/0177032, № 2011/0158948, № 2010/0092515, № 2009/0274728, № 2009/0285860, № 2009/0215147, № 2009/0010889, № 2007/0110720, № 2006/0039894 и № 20040009604; ретровирусы, см., например, патенты США № 6,689,871, № 6,635,472, № 6,639,139, № 5,851,529, № 5,716,826, № 5,716,613 и опубликованную заявку США № 20110212530; и аденоассоциированные вирусы, см., например, патенты США № 8,007,780, № 7,968,340, № 7,943,374, № 7,906,111, № 7,927,585, № 7,811,814, № 7,662,627, № 7,241,447, № 7,238,526, № 7,172,893, № 7,033,826, № 7,001,765 и 6,897,645.

- **Вирус болезни Ньюкасла**

Вируса ньюкаслской болезни (NDV) представляет собой птичий парамиксовирус с одноцепочечным РНК-геномом отрицательной полярности, который инфицирует домашнюю птицу и, как правило, не является патогенным для человека, но может вызывать симптомы гриппа (Tayebetal. (2015) *OncolyticVirotherapy* 4:49-62; Chengetal. (2016) *J. Virol.* 90:5343-535). Благодаря своей цитоплазматической репликации, отсутствию интеграции и рекомбинации генома хозяина и высокой стабильности генома, NDV и другие парамиксовирусы представляют собой более безопасные и привлекательные альтернативы другим онколитическим вирусам, таким как ретровирусы или некоторые ДНК-вирусы (Matveevaetal. (2015) *MolecularTherapy - Oncolytics* 2, 150017). Было показано, что NDV демонстрирует опухолевую селективность, при этом репликация в опухолевых клетках в 10000 раз выше, чем в нормальных клетках, что приводит к онколизу из-за прямых цитопатических эффектов и индукции иммунных ответов (Tayebetal. (2015; Lam et al. (2011) *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 718710). Хотя механизм опухолевой селективности NDV не совсем ясен, дефектная продукция интерферона и ответы на передачу сигналов IFN в опухолевых клетках позволяют вирусу реплицироваться и распространяться (Chengetal. (2016); Gintingetal. (2017) *OncolyticVirotherapy* 6:21-30). Высокое сродство парамиксовирусов к раковым клеткам также может быть связано со сверхэкспрессией вирусных рецепторов на поверхности раковых клеток, в том числе сиаловой кислоты (Chengetal. (2016); Matveeva et al. (2015); Tayeb et al. (2015)).

Несконструированные штаммы NDV классифицируются как лентогенные (авирулентные), мезогенные (промежуточные) или велогенные (вирулентные) в зависимости от их патогенности для цыплят, при этом велогенные и мезогенные штаммы способны реплицироваться в (и лизировать) множественные раковые клетки линий

человека, но не лентогенных штаммов (Chengetal. (2016); Matveevaetal. (2015)). Штаммы NDV также классифицируются как литические или нелитические, причем только литические штаммы способны продуцировать жизнеспособное и инфекционное потомство (Gintingetal. (2017); Matveevaetal. (2015)). С другой стороны, онколитические эффекты нелитических штаммов обусловлены, главным образом, их способностью стимулировать иммунные ответы, которые приводят к противоопухолевой активности (Gintingetal. (2017) *OncolyticVirotherapy* 6:21-30). Мезогенные литические штаммы, обычно используемые в онкотерапии, включают PV701 (МК107), МТН-68/Н и 73-Т, а обычно используемые лентогенные нелитические штаммы включают HUI, Ulster и Hitchner-B1 (Tayebetal. (2015); Lametal. (2011); Becketal. (2006) *Mol. Ther.* 13(1):221-228).

Впервые об использовании NDV в качестве онколитического вируса было сообщено в начале 1950-х годов, когда аденовирус и NDV были введены непосредственно в карциному матки, что привело к частичному некрозу. Однако наблюдался рост опухоли, вероятно, из-за подавления онколитической активности путем выработки нейтрализующих антител против вируса (Lam et al. (2011) *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 718710). Совсем недавно штамм NDV PV701 продемонстрировал многообещающую активность против колоректального рака в 1 фазе исследований (Laurieetal. (2006) *Clin. CancerRes.* 12(8):2555-2562), в то время как штамм NDV 73-Т продемонстрировал онколитические свойства *in vitro*, активность против различных линий раковых клеток человека, включая фибросаркому, остеосаркому, нейробластому и карциному шейки матки, а также терапевтические эффекты *in vivo* у мышей, несущих человеческие нейробластомы, ксенотрансплантаты фибросаркомы и несколько ксенотрансплантатов карциномы, включая ксенотрансплантаты рака толстой кишки, легких, молочной железы и простаты (Lametal. (2011)). Штамм NDV МТН-68/Н привел к значительной регрессии линий опухолевых клеток, включая PC12, MCF7, HCT116, DU-145, HT-29, A431, HELA и PC3-клетки, и продемонстрировал благоприятный ответ у пациентов с прогрессирующим раком при ингаляционном введении (Lam et al., 2011). Нелитический штамм Ulster продемонстрировал цитотоксические эффекты против карциномы толстой кишки, в то время как литический штамм Italien эффективно убивал меланому человека (Lam et al. (2011)). Лентогенный штамм NDV HUI демонстрировал онколитическую активность в отношении рецидивирующей мультиформной глиобластомы при внутривенном введении пациентам, в то время как лентогенный штамм LaSota продлевал выживаемость у больных колоректальным раком (Lam et al. (2011); Freeman et al. (2006) *Mol. Ther.* 13(1):221-228) и был способен инфицировать и убивать линии клеток немелкоклеточной карциномы

легкого (A549), глиобластомы (U87MG и T98G), аденокарциномы молочной железы (MCF7 и MDA-MB-453) и гепатоцеллюлярной карциномы (Huh7) (Ginting *et al.* (2017) *Oncolytic Virotherapy* 6:21-30).

Генно-инженерные штаммы NDV также оценивались для применения в онколитической терапии. Например, ген NS1 гриппа, антагонист IFN, был введен в геном штамма NDV Hitchner-B1, что привело к усилению онколитического эффекта в различных линиях опухолевых клеток человека и на мышинной модели меланомы B16 (Tayeb *et al.* (2015)). Противоопухолевый/иммуностимулирующий эффект NDV был усилен введением генов IL-2 или GM-CSF в вирусный геном (Lam *et al.* (2011)).

Помимо использования свободного вируса, исследования оценивали использование онколизатов NDV, носителей на основе инфицированных NDV клеток и комбинированную терапию с другими нераковыми агентами для лечения рака. В нескольких клинических испытаниях онколизаты NDV продемонстрировали онколитическую активность против злокачественных меланом (Lam *et al.*, 2011). Также было успешно продемонстрировано использование NDV-инфицированных клеточных носителей. Использование инфицированных NDV носителей клеток также было успешно продемонстрировано. Аутологичные опухолевые клеточные линии, инфицированные NDV, были успешно использованы против колоректального рака (рака толстой кишки), рака молочной железы, яичников, почек, головы и шеи и глиобластом (Lam *et al.* (2011)). MSK, полученные из костного мозга, жировой ткани и пуповины, которые были инфицированы штаммом NDV MTH-68/H, доставляли вирус к совместно культивированным клеткам глиомы A172 и U87 и стволовым клеткам глиомы, что приводило к дозозависимой гибели клеток в клетках глиомы, а низкий уровень апоптоза и ингибирование самообновления в стволовых клетках глиомы и более высокий уровень апоптоза, чем прямое инфицирование голым вирусом (Kazimirsky *et al.* (2016) *Stem Cell Research & Therapy* 7:149). Комбинированная терапия с использованием внутриопухолевой инъекции NDV с системным введением антител CTLA-4 приводила к эффективному отторжению заранее установленных отдаленных опухолей (Matveeva *et al.* (2015)).

• Парвовирус

H-1 parvovirus (H-1PV) представляет собой небольшой одноцепочечный ДНК-вирус без оболочки, принадлежащий к семейству *Parvoviridae*, естественным хозяином которого является крыса (Angelova *et al.* (2017) *Front. Oncol.* 7:93; Angelova *et al.* (2015) *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3:55). H-1PV непатогенен для человека и привлекателен как онколитический вирус благодаря своему благоприятному профилю

безопасности, отсутствию первичного иммунитета Н-1РV у человека и отсутствию интеграции генома клеток-хозяев (Angelova *et al.* (2015)). Н-1РV показал широкий онкосупрессивный потенциал против обеих солидных опухолей, включая доклинические варианты рака груди, желудка, шейки матки, мозга, поджелудочной железы и колоректального рака, а также гематологических злокачественных новообразований, включая лимфому и лейкоз (Angelova *et al.* (2017)). Н-1РV стимулирует противоопухолевые ответы за счет увеличения количества ассоциированных с опухолью антигенов, созревания дендритных клеток и высвобождения провоспалительных цитокинов (Moehler *et al.* (2014) *Frontiers in Oncology* 4:92). Н-1РV также проявляет опухолевую селективность, которая, как считается, связана с доступностью клеточных факторов репликации и транскрипции, сверхэкспрессией клеточных белков, которые взаимодействуют с парвовирусным белком NS1, и активацией метаболических путей, участвующих в функциональной регуляции NS1 в опухолевых клетках, но не в нормальных клетках (Angelova *et al.* (2015) *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3:55). Из-за безвредной природы Н-1РV и отсутствия необходимости ослабления с помощью генной инженерии, очень часто используют штамм Н-1РV дикого типа (Angelova *et al.* (2015)).

Исследования показали, что онколитическая Н-1РV инфекция клеток глиомы человека приводит к эффективному уничтожению клеток, а модели стволовых клеток глиомы высокой степени злокачественности, они также являлись перmissive для литической инфекции вирусом Н-1РV. Усиленное уничтожение клеток глиомы наблюдалось при применении вируса вскоре после облучения опухолевых клеток, что указывает на то, что этот протокол может быть полезен при неоперабельной рецидивирующей глиобластоме (Angelova *et al.* (2017)). Внутримозговая или системная инъекция Н-1РV приводила к регрессии глиом без токсических побочных эффектов у иммунокомпетентных крыс с ортотопическими опухолями RG-2, а также иммунодефицитных животных, которым имплантировали глиомы U87 человека (Angelova *et al.* (2015)). Del Н-1РV, фитнес-вариант с более высокой инфекционностью и распространением в трансформированных клеточных линиях человека, продемонстрировал онколитические эффекты *in vivo* на моделях ксенотрансплантата рака поджелудочной железы и карциномы шейки матки (Geiss *et al.* (2017) *Viruses* 9, 301). Н-1РV также продемонстрировали онколитической активностью в отношении группы из пяти линий клеток остеосаркомы человека (CAL 72, H-OS, MG-63, SaOS-2, U-2OS) (Geiss *et al.* (2017) *Viruses* 9, 301) и в отношении клеток меланомы человека (SK29-мел-1, SK29-Мел-1.22) (Moehler *et al.* (2014) *Frontiers in Oncology* 4:92). В другом исследовании

на голых крысах, несущих ксенотрансплантаты рака шейки матки, наблюдалась дозозависимая остановка роста и регрессия опухоли после лечения H-1PV (Angelova *et al.* (2015)). Внутриопухолевое и внутривенное введение H-1PV также продемонстрировало значительное подавление роста ксенотрансплантатов карциномы молочной железы человека у мышей с ослабленным иммунитетом (Angelova *et al.* (2015)). Внутриопухолевая инъекция H-1PV мышам с карциномой желудка человека или лимфомой Беркитта человека приводила к регрессии опухоли и подавлению ее роста (Angelova *et al.* (2015)).

Первая фаза I/IIA клинического испытания онколитического H-1PV (ParvOryx01) у пациентов с рецидивирующей мультиформной глиобластомой, завершенная в 2015 году (клиническое испытание NCT01301430), показала благоприятный профиль выживаемости пациентов без прогрессирования заболевания, а также клиническую безопасность и переносимость пациентами внутриопухолевых или внутривенных инъекций (Angelova *et al.* (2017); Geissetal. (2017) *Viruses* 9, 301; Geletnekyetal. (2017) *Mol. Ther.* 25(12):2620-2634). Это исследование продемонстрировало, что H-1PV обладает доза-зависимой способностью пересекать гематоэнцефалический барьеры вызывать иммуногенный противоопухолевый ответ, характеризующийся лейкоцитарной инфильтрацией, преимущественно CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов, а в опухолях, подвергнутых местной терапии, было обнаружено несколько маркеров активации иммунных клеток, включая перфорин, гранзим В, IFN γ , IL-2, CD25 и CD40L (Geletnekyetal. (2017) *Mol. Ther.* 25(12):2620-2634).

H-1PV также продемонстрировал эффективное уничтожение *in vitro* высокоагрессивных клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (PDAC), в том числе резистентных к гемцитабину, а внутриопухолевое введение H-1PV привело к регрессии опухоли и увеличению выживаемости животных на модели PDAC на ортотопических крысах (Angelova *et al.* (2017); Angelova *et al.* (2015)). Сходные результаты, включая избирательное нацеливание на опухоль и отсутствие токсичности, наблюдались на модели PDAC у голых крыс с иммунодефицитом (Angelova *et al.* (2015)). Комбинация H-1PV и цитостатических (цисплатин, винкристин) или таргетных (сунитиниб) препаратов приводила к синергической индукции апоптоза в клетках меланомы человека (Moehleretal. (2014)). Комбинация H-1PV и вальпроевой кислоты, ингибитора HDAC, привела к синергической цитотоксичности в отношении клеток шейки матки и поджелудочной железы (Angelova *et al.* (2017)), в то время как терапевтическая эффективность гемцитабина была значительно улучшена при сочетании с H-1PV в двухэтапном протоколе (Angelova *et al.* (2015)). Как и в случае с другими

вирусами, H-1PV также может быть сконструирован для экспрессии противораковых молекул. Например, исследования показали, что происходящий от парвовируса H1-связанный вектор, экспрессирующий апоптин, обладал большей способностью вызывать апоптоз, чем H-1PV дикого типа (Geissetal. (2017)).

Как и у других онколитических вирусов, терапевтический потенциал парвовирусов ограничен неспецифическим поглощением (проникновением в клетку) из-за повсеместной экспрессии распознающих их рецепторов клеточной поверхности, а также из-за выработки нейтрализующих антител после повторного введения. Однако H-1PV в сочетании с клеточными носителями успешно показали противоопухолевый эффект, что позволяет обойти эти потенциальные проблемы. В одном исследовании аутологичные клетки гепатомы МН3924А крыс успешно использовались для адресной доставки H-1PV и подавления метастазов, образуемых теми же клетками (Raykovetal. (2004) *Int. J. Cancer* 109:742-749). Клетки гепатомы были инактивированы γ -излучением через 24 часа после заражения H-1PV, что только снижало выход вирусных вирионов в 2 раза или менее. По сравнению с прямой инъекцией вируса терапия на основе клеточных носителей приводила к улучшенному подавлению метастазов и генерации меньшего количества нейтрализующих антител, поддерживая использование клеток-носителей для системной доставки онколитических парвовирусов (Raykovetal. (2004)).

• Вирус Кори

Вирус кори (MV) представляет собой имеющий обочку вирус с негативным одноцепочечным РНК-геномом, относящийся к семейству *Paramyxoviruses* или *парамиксовирусов* (Arefetal. (2016) *Viruses* 8:294; Hutzenetal. (2015) *Oncolytic Virotherapy* 4:109-118). Его несегментированный геном стабилен, с низким риском мутации и возврата к своей патогенной форме, а благодаря репликации в цитоплазме не представляет риска инсерционного мутагенеза ДНК в инфицированных клетках (Arefetal. (2016); Hutzen et al. (2015)). MV была впервые выделена от пациента по имени Эдмонстон в 1954 году и превратилась в живую вакцину с отличным профилем безопасности, которая успешно защищала более миллиарда человек во всем мире в течение 50 лет путем ослабления после нескольких *in vitro* проходов (Arefetal.(2016) *Viruses* 8:294; Hutzen et al. (2015) *Oncolytic Virotherapy* 4:109-118). Производные этого штамма, обозначаемые как MV-Edm, являются наиболее часто используемыми штаммами MV в исследованиях онколитической терапии. Однако вакцинный штамм Кори Schwarz/Moraten является более аттенуированным и иммуногенным, чем производные Edm, что делает их более безопасными и иммуномодулирующими (Veinaldeetal.(2017) *Oncoimmunology* 6(4):e1285992). Онколитические эффекты MV

дикого типа были задокументированы в 1970-х годах, когда появились сообщения об улучшении состояния пациентов с острым лимфобластным лейкозом, лимфомой Беркитта и лимфомой Ходжкина (Arefetal. (2016)).

MV использует три основных рецептора для входа в клетки-мишени: CD46, нектин-4 и сигнальную молекулу активации лимфоцитов (SLAM) (Arefetal. (2016); Hutzenetal. (2015)). А шлема, которые экспрессируются на активированных в-и Т-клетки, незрелые тимоциты, моноциты и дендритные клетки, является основным рецептором для диких штаммов, ослабленных и онкологических выборочный MV-CEA штаммов, в первую очередь, нацелены на рецептор CD46, регулятор дополнит активации, который экспрессируется во многих клетках опухоли (Arefetal. (2016); Hutzen et al. (2015); Jacobson et al. (2017) *Oncotarget* 8(38):63096-63109; Msaouel et al. (2013) *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(4)). Нектин-4, который преимущественно экспрессируется в респираторном эпителии, используется как дикими, так и аттенуированными штаммами MV (Arefetal. (2016); Msaouel et al. (2013) *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(4)). Как и в случае с другими онколитическими вирусами, дефекты IFN противовирусного ответа опухолевых клеток также способствуют опухолевой селективности MV (Arefetal. (2016); Jacobsonetal. (2017) *Oncotarget*8(38):63096-63109). В настоящее время существует несколько клинических испытаний, изучающих потенциал MV в лечении нескольких видов рака, включая множественную миелому (NCT02192775, NCT00450814), рак головы и шеи (NCT01846091), мезотелиому (NCT01503177) и рак яичников (NCT00408590, NCT02364713).

MV генетически конструировали дляэкспрессии иммуностимулирующих и иммуномодулирующих генов, в том числе кодирующих, например, IL-13, INF- β , GM-CSF и активирующий нейтрофилы белок (NAP) *Helicobacter pylori* (Arefetal. (2016), Hutzenetal. (2015); Msaoueletal. (2013) *ExpertOpin. Biol. Ther.* 13(4)). Комбинированная терапия с использованием онколитического MVи антителами против CTLA4 и PD-L1 оказалась успешной на моделях меланомы мышей ((Arefetal. (2016); Hutzenetal. (2015)). Из-за широко распространенной вакцинации или предшествующей естественной инфекции большинство пациентов имеют первичный иммунитет к MV, что препятствует его терапевтическому потенциалу. Чтобы обойти его, MV доставляли в опухоли в клеточных носителях, таких как мезенхимальные стромальные клетки, эффективно избегавших нейтрализующих антител хозяина и доказавших свою эффективность в доклинических моделях острого лимфобластного лейкоза, гепатоцеллюлярной карциномы и карциномы яичников (Arefetal. (2016)). Несколько других клеточных носителей показали многообещающие результаты для доставки MV, включая линию моноцитарных клеток

U-937, незрелые и зрелые первичные дендритные клетки, PMBC, активированные Т-клетки, первичные CD14⁺ клетки, линию клеток множественной миеломы MM1 и эндотелиальные клетки пупочной вены (Msaouetal. (2013) *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(4)). В настоящее время в рамках клинического испытания (NCT02068794) изучается применение использование мезенхимальных стволовых клеток, инфицированных онколитическими MV, в лечении пациентов с рецидивирующим раком яичников. Другая стратегия преодоления первичного иммунитета включает комбинацию терапии MV с иммуносупрессантами, такими как циклофосфамид (Hutzenetal. (2015)).

- MV-CEA

Вирус MV-CEA, генетически сконструированный для экспрессии онкомаркера карциноэмбрионального антигена (CEA), приводит к высвобождению CEA в кровоток пациентов после инфицирования раковых клеток, что позволяет определять уровни CEA и, таким образом, отслеживать *in vivo* вирусную инфекцию (Arefetal. (2016); Hutzenetal. (2015)). Терапевтический потенциал MV-CEA был показан в доклинических исследованиях и в настоящее время исследуется в рамках клинических испытаний I фазы для лечения рака яичников (NCT00408590).

- MV-NIS

MV-NIS является еще одним прослеживаемым онколитическим MV из линии вакцины Эдмонстона (Edmonston), разработанным для экспрессии симпортера йодида натрия (NIS), демонстрирующим более высокую вирусную профиляцию по сравнению с MV-CEA благодаря расположению трансгена *NIS* после гена гамагглютина (H) в геноме MV, а не перед геном нуклеокапсида (N), как в конструкции MV-CEA (Arefetal. (2016); Galanisetal. (2015) *Cancer Res.* 75(1):22-30). Радиоизотопы, такие как ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I и ^{99m}Tc транспортируются через NIS, экспрессирующийся на инфицированных клетках MV-NIS, что позволяет проводить неинвазивную визуализацию с использованием, например, PET, SPECT/CT и γ-камеры (Msaouetal. (2013) *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(4)). Также, экспрессия NIS может повышать эффективность онколитических MV, облегчая проникновение β-излучающих радиоизотопов, таких как I-131, в опухолевые клетки для радиовиротерапии, и продемонстрировала многообещающие доклинические результаты на моделях множественной миеломы, мультиформной глиобластомы, рака головы и шеи, анапластического рака щитовидной железы и рака простаты (Arefetal. (2016); Hutzenetal. (2015); Msaouetal. (2013)). В некоторых клинических исследованиях I/II фазы в настоящее время изучается применение MV-NIS при множественной миеломе (NCT00450814, NCT02192775), мезотелиоме (NCT01503177), раке головы и шеи

(NCT01846091) и раке яичников с использованием инфицированных вирусом MSC (NCT02068794).

- **Реовирус**

Респираторно-кишечный орфанный вирус, широко известный как реовирус, представляет собой двухцепочечный РНК-вирус без оболочки семейства *Reoviridae*, который не является патогенным для человека. Реовирус дикого типа повсеместно распространен в окружающей среде, что приводит к 70-100% серопозитивности среди населения в целом (Gong *et al.* (2016) *World J. Methodol.* 6(1):25-42). Существует три серотипа реовируса, которые включают тип 1 Lang, тип 2 Jones, тип 3 Abney и тип 3 Dearing (T3D). T3D является наиболее часто используемым природным серотипом онколитического реовируса в доклинических и клинических исследованиях.

Считается, что онколитический реовирус является опухолеселективным благодаря активированной передаче сигналов *Ras*, характерной для раковых клеток (Gong *et al.* (2016)); Zhao *et al.* (2016) *Mol. Cancer Ther.* 15(5):767-773). Активация сигнального пути *Ras* нарушает противовирусные ответы (реакции) клетки, ингибируя фосфорилирование dsRNA-зависимой протеинкиназы (PKR), белка, который обычно отвечает за предотвращение синтеза вирусного белка (Zhao *et al.* (2016)). Активация *Ras* также усиливает распаковку и разборку вируса, что приводит к усиленному размножению вируса и повышению инфекционности, а также ускоряет высвобождение полученных вирионов за счет усиленного апоптоза (Zhao *et al.* (2016)). Подсчитано, что примерно 30% всех опухолей человека проявляют aberrантную передачу сигналов *Ras* (Zhao *et al.* (2016)). Например, большинство злокачественных глиом обладают активированными сигнальными путями *Ras*, а реовирус проявляет противоопухолевую активность в 83% клеток злокачественной глиомы *in vitro*, а также *in vivo* в моделях злокачественной глиомы человека и в 100% образцов глиомы *ex vivo* (Gong *et al.* (2016) *World J. Methodol.* 6(1):25-42). Кроме того, аденокарциномы поджелудочной железы проявляют очень высокую частоту мутаций *Ras* (примерно 90%), а реовирус показал сильную цитотоксичность в 100% линий клеток поджелудочной железы, испытанных *in vitro*, и индуцировал регрессию в 100% моделей подкожных опухолей у мышей *in vivo* (Gong *et al.* (2016)).

Реовирус показал широкую противораковую активность доклинически по всему спектру злокачественных новообразований, включая рак толстой кишки, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, рак кожи (меланома), неврологический рак, гематологический рак, рак простаты, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи (Gong *et al.* (2016)). Реовирусная терапия в настоящее время проходит испытания в сочетании с

лучевой терапией, химиотерапией, иммунотерапией и хирургией. Комбинация реовирусной и лучевой терапии доказала свою эффективность при лечении линий клеток рака головы и шеи, колоректального рака и рака молочной железы *in vitro*, а также моделей колоректального рака и меланомы *in vivo* (Gongetal. (2016)). Комбинация реовируса и гемцитабина, а также реовируса, паклитаксела и цисплатина оказалась успешной на моделях опухолей мышей (Zhaoetal. (2016)). Доклинические исследования на моделях мышей с меланомой B16 показали, что комбинация онколитического реовируса и анти-PD-1 терапии продемонстрировала улучшенную противоопухолевую эффективность по сравнению с одним только реовирусом (Gongetal. (2016); Zhaoetal. (2016); Kempetal. (2015) *Viruses* 8, 4).

Многообещающие доклинические результаты, продемонстрированные реовирусом, привели ко многим клиническим испытаниям. Реолизин®, разработанный канадской компанией Oncolytics Biotech Inc., является единственным терапевтическим реовирусом дикого типа, находящимся в клинической разработке, и продемонстрировал противоопухолевую активность при многих злокачественных опухолях как отдельно, так и в сочетании с другими терапевтическими средствами. Например, клиническое испытание фазы I Реолизина® при лечении рецидивирующих злокачественных глиом (NCT00528684) показало, что реовирус хорошо переносится, в то время как испытания фазы I/II показали, что Реолизин® способен убивать опухолевые клетки без повреждения нормальных клеток у пациентов с эпителиальным раком яичников, первичным перитонеальным раком или раком маточных труб, которые не реагировали на платиновую химиотерапию (NCT00602277). Клинические испытания фазы II Реолизина® показали, что он безопасен и эффективен при лечении пациентов с саркомами костей и мягких тканей, метастазирующими в легкие (NCT00503295). В настоящее время проводят клинические испытания фазы I Реолизина® в комбинации с FOLFIRI и бевацизумабом у пациентов с метастатическим колоректальным раком (NCT01274624). В клинических испытаниях фазы II изучали комбинацию Реолизина® с химиотерапевтическим лечением гемцитабином у пациентов с прогрессирующей аденокарциномой поджелудочной железы (NCT00998322), в клинических испытаниях фазы II изучали терапевтический потенциал Реолизина® в комбинации с доцетакселом при метастатическом кастрационно-резистентном раке предстательной железы (NCT01619813), а также в клинических испытаниях фазы II изучали комбинацию Реолизина® с паклитакселом у пациентов с прогрессирующим/метастатическим раком молочной железы (NCT01656538). В клинических испытаниях фазы III изучали эффективность Реолизина® в комбинации с паклитакселом и карбоплатином при

резистентном к платине раке головы и шеи (NCT01166542), в то время как клинические испытания фазы II с использованием этой комбинированной терапии проводили у пациентов с мелкоклеточным раком легкого (NCT00861627) и метастатической меланомой (NCT00984464). Продолжаются клинические испытания фазы I Реолизина® в комбинации с карфилзомибом и дексаметазоном у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой (NCT02101944).

Из-за наличия нейтрализующих антител у большей части населения, системное введение реовируса имеет ограниченный терапевтический потенциал, который можно преодолеть при совместном введении реовируса с иммуносупрессивными агентами, такими как циклоспорин А или циклофосфамид (Gong *et al.* (2016)). Введение GM-CSF перед внутривенным введением реовируса приводило к значительному уменьшению опухолей меланомы B16 и увеличению выживаемости мышей (Kemp *et al.* (2015) *Viruses* 8, 4). Клетки-носители также продемонстрировали успех в защите вируса от первичного иммунитета. Например, лимфокин-активированные клетки-киллеры (LAK) и DC, использованные в качестве клеточных носителей для реовируса, в модели рака яичников успешно защитили вирус от нейтрализующих антител (Zhao *et al.* (2016)). Было показано, что PMBC, включая NK-клетки, не только успешно доставляют реовирус, но также стимулируются реовирусом для уничтожения опухолей-мишеней (Zhao *et al.* (2016)). Другое исследование показало, что как DC, так и Т-клетки являются эффективными носителями реовируса *in vitro* в отсутствие человеческой сыворотки, но только DC успешно доставили вирус к клеткам меланомы в присутствии нейтрализующей сыворотки (Plett *et al.* (2011) *Clin. Cancer Res.* 17(9):2767-2776). DC также были способны доставлять реовирус мышам, несущим метастазы меланомы лимфатического узла B16tk, в то время как чистый реовирус был полностью неэффективен (Plett *et al.* (2009) *Gene Ther.* 16(5):689-699).

- **Вирус везикулярного стоматита (VSV)**

Вирус везикулярного стоматита (VSV) является представителем рода *Vesiculovirus* семейства *Rhabdoviridae*. Его геном, состоящий из одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью, содержит 11,161 нуклеотидов и кодирует пять генов: нуклеокапсидного белка (Н), фосфопротеина (Р), матричного белка (М), гликопротеина (G) и белок большой полимеразы (L) (Bishnoi *et al.* (2018) *Viruses* 10(2), 90). VSV передается насекомыми-переносчиками, и заболевание ограничивается его естественными хозяевами, включая лошадей, крупный рогатый скот и свиней, при легкой и бессимптомной инфекции у человека (Bishnoi *et al.* (2018) *Viruses* 10(2), 90). VSV является мощным и быстрым индуктором апоптоза в инфицированных клетках

и, как было показано, сенсibiliзирует резистентные к химиотерапии опухолевые клетки. Было показано, что VSV инфицирует сосудистую систему опухоли, что приводит к потере притока крови к опухоли, свертыванию крови и лизису новой сосудистой сети. Этот вирус также способен к репликации и индукции цитопатических эффектов и лизиса клеток в гипоксических тканях. Кроме того, VSV дикого типа (WT) растет до высоких титров в различных линиях клеток культур тканей, что способствует крупномасштабному производству вируса, он имеет небольшой и легко управляемый геном, а также он реплицируется в цитоплазме без риска трансформации клетки-хозяина (Bishnoi *et al.* (2018); FeltandGrdzlishvili (2017) *Journal of General Virology* 98:2895-2911). Эти факторы, а также тот факт, что он не является патогенным для человека и, как правило, у человека не существует первичного иммунитета к VSV, делают его хорошим кандидатом для вирусной онкотерапии.

Хотя VSV может прикрепляться к повсеместно экспрессируемым молекулам на поверхности клетки, делая его «пантропным», VSV дикого типа (WT) чувствителен к ответам IFN I типа и, таким образом, проявляет онкоселективность, основанную на дефектной или ингибированной передаче сигналов IFN I типа в опухолях (FeltandGrdzlishvili (2017)). Тем не менее, VSV может вызывать нейрпатогенез из-за своей способности инфицировать нормальные клетки, но его можно ослабить путем модификации его матричного белка и/или гликопротеина. Например, матричный белок может быть удален или остаток метионина в позиции 51 матричного белка может быть удален или заменен на аргинин (Bishnoi *et al.* (2018); FeltandGrdzlishvili (2017)). Другим подходом является замена гликопротеина VSV на гликопротеин вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) (rVSV-GP) (Bishnoi *et al.* (2018); FeltandGrdzlishvili (2017)). VSV также может быть генетически модифицирован для включения суицидных генов, таких как тимидинкиназа вируса герпеса (TK), или для экспрессии иммуностимулирующих цитокинов, таких как, IL-4, IL-12, IFN- β , или костимулирующих агентов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор 1 (GM-CSF1), для усиления онколитической активности (Bishnoi *et al.* (2018)). Симпортер VSV-IFN β -йодида натрия (VSV-IFN- β -NIS), который кодирует NIS и IFN- β , в настоящее время проходит испытания в США в нескольких клинических испытаниях фазы I (см. подробные сведения об испытаниях NCT02923466, NCT03120624 и NCT03017820 на сайте ClinicalTrials.gov).

Вирус везикулярного стоматита (VSV) является эффективным онколитическим терапевтическим средством при внутривенном введении (IV) на различных моделях рака мышей. В одном исследовании VSV-GP оказался успешным при внутриопухолевом

лечении подкожно привитых клеток глиомабластомы человека G62, а также при внутривенном лечении ортотопических клеток глиомы человека U87 на моделях иммунодефицитных мышей. Внутриопухолевое введение VSV-GP также было эффективным против внутричерепных клеток глиомы мыши CT2A (Muiketal. (2014) *CancerRes.* 74(13):3567-3578). Было обнаружено, что VSV-GP не вызывает детектируемого ответа нейтрализующих антител, и что этот генетически модифицированный онколитический вирус оказался нечувствителен к системе комплемента человека, оставаясь стабильным на протяжении всего эксперимента (Muiketal. (2014)). В другом примере было обнаружено, что внутриопухолевое введение VSV-GP эффективно инфицирует и убивает клетки злокачественной меланомы человека A375, трансплантированные в мышиную модель, а также клеточную линию мышинной меланомы B16 (Kimpeletal. (2018) *Viruses* 10, 108). Однако внутривенное введение онколитического вируса не увенчалось успехом, и даже в группах, получавших внутриопухолевое введение, все опухоли в конечном итоге выросли из-за ответов IFN типа I (Kimpeletal. (2018)). В другом исследовании на подкожной модели ксенотрансплантата на мышах с раковыми клетками яичников человека A2780, их лечили внутриопухоловой инъекцией VSV-GP, и хотя первоначально наблюдалась ремиссия опухоли без нейротоксичности, ремиссия была временной, и опухоли рецидивировали. Было обнаружено, что это связано с ответами IFN I типа с наблюдаемым изменением противовирусного состояния путем комбинирования VSV-GP с ингибитором JAK1/2 руксолитинибом. (Doldetal. (2016) *MolecularTherapy - Oncolytics* 3, 16021). Однако ингибирование ответов IFN I типа часто оказывается невозможным для аттенуированных вариантов VSV дикого типа *in vivo* из-за соображений безопасности, что приводит к необходимости альтернативного решения.

Исследования показали, что гуморальный иммунитет, порождая антивирусные антитела, ограничивает терапевтический потенциал VSV. Было обнаружено, что повторное введение VSV в клеточных носителях животным с метастатическими опухолями, привело к гораздо более высокой терапевтической эффективности по сравнению с инъекцией голых вирионов (Poweretal. (2007) *MolecularTherapy* 15(1):123-130), демонстрирующей, что клеточные носители способны уклоняться от циркулирующих антител. Сингенные клетки карциномы толстой кишки мыши CT26 легко инфицировались VSV и после внутривенного введения быстро накапливались в опухолях легких, но не в окружающей нормальной легочной ткани, где они оставались до высвобождения вируса и подвергались лизису в течение 24 часов (Poweretal. (2007) при доставке VSV для инфицирования опухолей легких у мышей. Система доставки на

основе клеток также была получена с использованием ксеногенных клеток A549 в качестве клеточных носителей, что свидетельствует о том, что опосредованной клетками доставки VSV можно добиться с использованием иммунологически совместимых сингенных клеткок CT26, а также иммунологически несовместимых ксеногенных клеток A549 (Power *et al.* (2007)). Клетки мышинного лейкоза L1210 также успешно доставляли VSV к опухолям легких, а также к подкожным опухолям, расположенным сзади на боку у мышей (Power *et al.* (2007)). Когда эти инфицированные VSV лейкозные клетки вводили мышам без опухолей, не обнаруживалось репликации вируса в нормальных тканях, что указывает на опухолевую селективность.

В другом исследовании, VSV- $\delta 51$ с отсутствующим метионином 51 матричного белка и, следовательно, не способный блокировать ядерный экспорт мРНК, кодирующих IFN, был загружен на OT-I CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие трансгенный Т-клеточный рецептор специфично для эпитопа SIINFEKL антигена овальбумина, который экспрессируется опухолями B16_{ova} (Qiao *et al.* (2008) *Gene Ther.* 15(8):604-616). Применение такой комбинации онколитического вируса и клеточного носителя против опухолей B16_{ova} в легких иммунокомпетентных мышей C57B1/6 привело к значительному повышению терапевтической эффективности по сравнению с применением только вируса или Т-клеток. Обнаруживаемая репликация VSV в клетках OT-I отсутствовала, но вирус высвобождался и эффективно заражал, реплицировался и убивал опухолевые клетки после совместного культивирования инфицированных Т-клеток с клетками B16_{ova}. Было показано, что загрузка VSV на Т-клетки увеличивает активацию Т-клеток *in vitro* и увеличивает транспорт Т-клеток к опухолям *in vivo* (Qiao *et al.* (2008)).

• Аденовирус

Аденовирусы (Ad) представляют собой ds-ДНК вирусы с линейным геномом без оболочки, которые были впервые обнаружены в 1953 году Уоллесом Роу и его коллегами и протестированы для лечения рака шейки матки еще в 1956 году (Cho *et al.* (2015) *J. Control. Release* 10(219):181-191). Человеческие Ad повсеместно распространены в окружающей среде и подразделяются на 57 серотипов (Ad1-Ad57), на основе перекрестной восприимчивости и на 7 подгрупп (A-G) на основе вирулентности и тропизма тканей. Аденовирус серотипа 5 (Ad5) является наиболее часто используемым аденовирусом для онколитической виротерапии. Инфекции у людей протекают в легкой форме и вызывают симптомы, напоминающие простуду (Yokoda *et al.* (2018) *Biomedicine* 6, 33), а системное введение приводит к тропизму печени и может привести к гепатотоксичности (Yamamoto *et al.* (2017) *Cancer Sci.* 108:831-837), но Ad считаются

безопасными для терапевтических целей. Ad попадают в клетки путем присоединения к рецептору (CAR) вируса Коксаки и аденовируса с последующим взаимодействием между интегринами $\alpha v\beta 3$ и $\alpha v\beta 5$ на поверхности клетки и трипептидным мотивом Arg-Gly-Asp (RGD) на аденовирусном основании пентона (Jiangetal. (2015) *Curr. Opin. Virol.* 13:33-39). CAR экспрессируется на поверхности большинства нормальных клеток, но его экспрессия сильно варьируется в разных типах раковых клеток. С другой стороны, интегрины, связанные с RGD, высоко экспрессируются раковыми клетками, но в нормальных клетках экспрессируются на гораздо более низких уровнях (Jiangetal. (2015)). В результате Ad часто нацелены на раковые клетки с помощью мотива RGD.

Ad привлекательны как онколитические вирусы в связи с высокой эффективностью трансдукции в трансформированных клетках, отсутствием интеграции в геном хозяина /отсутствием инсерционного мутагенеза, их геномной стабильностью, возможностью вставлять в их геном большие терапевтические гены и опухолевой селективностью за счет генетических манипуляций, таких как замена вирусных промоторов на опухолевые ткане-селективные промоторы (Yokodaetal. (2018) *Biomedicines* 6, 33; Choietal. (2015) *J. Control. Release* 10(219):181-191).

Примеры онколитических Ad с опухолеспецифичными промоторами включают CV706 для лечения рака предстательной железы, с геном ранней области аденовируса 1A (*E1A*) под контролем промотора специфичного антигена простаты, и OBP-301, который использует промотор обратной транскриптазы теломеразы (TERT) для регуляции экспрессии гена *E1A* (Yamamotoetal. (2017) *CancerSci.* 108:831-837). Другим методом индуцирования опухолевой селективности является введение мутаций в область *E1* генома Ad, где отсутствующие гены функционально дополняются генетическими мутациями, обычно встречающимися в опухолевых клетках, такими как аномалии пути ретинобластомы (Rb) или мутации p53 (Yamamotoetal. (2017) *CancerSci.* 108:831-837). Например, онколитические Ad ONYX-015 и H101 имеют делеции в гене *E1B55K*, который инактивирует p53. Эти мутанты не могут блокировать нормальный путь апоптотической защиты, что приводит к опухолевой селективности через инфицирование неопластических клеток с нарушенными путями опухолевого супрессора p53 (Yamamotoetal. (2017) *CancerSci.* 108:831-837; Uusi-Kerttulaetal. (2015) *Viruses* 7:6009-6042). *E1AΔ24* представляет собой онколитический Ad, содержащий мутацию длиной 24 п.н. в гене *E1A*, разрушающую Rb-связывающий домен и способствующую репликации вируса в раковых клетках с мутациями Rb-пути. ICOVIR-5 представляет собой онколитический Ad, который сочетает в себе контроль транскрипции *E1A* с помощью промотора E2F, мутацию $\Delta 24$ *E1A* и вставку RGD-4C в

аденовирусную (Yamamoto *et al.* (2017) *CancerSci.* 108:831-837; Uusi-Kerttula *et al.* (2015)). Дельта-24-RGD, или DNX-2401, представляет собой онколитический Ad, в котором осто́в $\Delta 24$ модифицирован путем вставки мотива RGD, и обладает усиленными онколитическими эффектами *in vitro* и *in vivo* (Jiang *et al.* (2015)).

Альтернативная стратегия повышения опухолевой селективности включает преодоление физического барьера в солидных опухолях путем воздействия на внеклеточный матрикс (ECM). Например, VCN-01, онколитический Ad, экспрессирующий гиалуронидазу, показал многообещающие результаты в моделях рака мышей. Ad также был сконструирован для экспрессии релаксина, разрушающего ECM (Yamamoto *et al.* (2017) *CancerSci.* 108:831-837; Shaw and Suzuki (2015) *Curr. Opin. Virol.* 21:9-15). Ad, экспрессирующие суицидальные гены, такие как цитозиндеаминаза (CD) и тимидинкиназа HSV-1 (TK), показали повышенную противоопухолевую эффективность *in vivo*, как и Ad, экспрессирующие иммуностимулирующие цитокины, такие как ONCOS-102, который экспрессирует GM-CSF (Yamamoto *et al.* (2017) *CancerSci.* 108:831-837; Shaw and Suzuki (2015) *Curr. Opin. Virol.* 21:9-15). Онколитический Ad на основе $\Delta 24$, экспрессирующий антитело против CTLA4, показал многообещающие результаты в доклинических исследованиях (Jiang *et al.* (2015)).

Аденовирус H101 (Oncorine®) был первым онколитическим Ad, одобренным для клинического применения в Китае в сочетании с химиотерапией для лечения пациентов с распространенным раком носоглотки в 2005 году. В связи с перспективами, показанными в доклинических исследованиях, многие клинические испытания изучали использование онколитических аденовирусов для лечения самых разных видов рака. Например, текущие и прошлые клинические испытания включают исследования с участием Ad5, кодирующего IL-12, у пациентов с метастатическим раком поджелудочной железы (NCT03281382); иммуностимулирующего Ad5 (LOAd703), экспрессирующего TMX-CD40L и 41BBL, у пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы, раком яичников, билиарной карциномой и колоректальным раком (NCT03225989); LOAd703 в комбинации с гемцитабином и пав-паклитакселом у пациентов с раком поджелудочной железы (NCT02705196); онколитического аденовируса, кодирующего человеческую PH20 гиалуронидазу (VCN-01) в комбинации с гемцитабином и Абраксаном® у пациентов с распространенными солидными опухолями, включая аденокарциному поджелудочной железы (NCT02045602; NCT02045589); теломелизина® (OBP-301), онколитического Ad с опухолевой селективностью, содержащего промотор обратной транскриптазы человеческой теломеразы (hTERT) у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (NCT02293850);

Ad5 с делетированным геном E1B в сочетании с трансартериальной химиоэмболизацией (TACE) у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (NCT01869088); CG0070, онколитического Ad, который экспрессирует GM-CSF и содержит специфичный для рака промотор E2F-1 для стимуляции экспрессии гена *E1A*, у пациентов с раком мочевого пузыря (NCT02365818; NCT01438112); Enadenotucirev (Colo-Ad1), химерного Ad11p/Ad3 онколитического вируса группы В, у пациентов с раком толстой кишки, немелкоклеточным раком легкого, раком мочевого пузыря и карциномой почки (NCT02053220); и DNX-2401 (Ad5 E1AΔ24RGD) в комбинации с темозоломидом (NCT01956734) или в комбинации с IFN γ (NCT02197169), у пациентов с глиобластомой.

Как и другие онколитические вирусы, Ad обладает низкой терапевтической эффективностью при системном введении из-за выработки нейтрализующих антител, а из-за их высокой серологической распространенности, по оценкам, до 90% некоторых популяций обладают первичным иммунитетом к Ad (Uusi-Kerttula *et al.* (2015) *Viruses* 7:6009-6042). Кроме того, неспецифическая секвестрация Ad в печени приводит к гепатотоксичности (Cho *et al.* (2015)). Полимеры, такие как ПЭГ (PEG), положительно заряженный биовосстанавливаемый полимер с привитым аргинином (ABP), PAMAMG5 и другие наноматериалы, можно использовать для маскировки вирусного капсидного белка, смягчения противовирусного иммунного ответа и уменьшения неспецифического накопления в печени, а также увеличения накопления в опухоли (Cho *et al.* (2015)). Другие подходы к уклонению от иммунной системы включают использование клеточных носителей для доставки онколитического Ad. Например, Т-клетки использовали для доставки Delta24-RGD Ad к клеткам глиобластомы *in vitro* и *in vivo* в модели ксенотрансплантата мыши на основе ортотопических стволовых клеток глиомы (GSC) (Balvers *et al.* (2014) *Viruses* 6:3080-3096). Системное введение загруженных вирусом Т-клеток приводило к внутриопухолевой доставке вируса (Balvers *et al.* (2014)). Клинические испытания, изучающие доставку Ad с помощью клеточных носителей/клеток-носителей, включают использование нервных стволовых клеток, загруженных онколитическим Ad, для лечения злокачественных глиом (NCT03072134); аутологичных дендритных клеток, инфицированных Ad, экспрессирующих Her2, у пациентов с метастатическим раком молочной железы (NCT00197522); и аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (MSK), инфицированных ICOVIR5, у детей и взрослых с метастатическими и рефрактерными солидными опухолями (NCT01844661).

• Полиовирус

Полиовирус (PV) относится к роду *энтеровирусов* (*Enterovirus*) семейства *Picornaviridae* и имеет позитивный (положительный) одноцепочечный РНК-

геном. PV инфекция приводит к развитию тяжелого неврологического синдрома полиомиелита, обусловленного тропизмом PV к спинному мозгу и двигательным нейронам (Brown and Gromeier (2015) *Discov. Med.* 19(106):359-365). PV полезны в клиническом применении благодаря сохранению высокой способности к репликации и цитотоксичности при наличии активного противовирусного IFN-ответа, что позволяет проводить несколько раундов репликации вируса для усиления иммуностимулирующих вирусных цитотоксических эффектов (Brown and Gromeier (2015) *Discov. Med.* 19(106):359-365). PV также не интегрируются в геном клетки-хозяина (Yla-Pelto et al. (2016) *Viruses* 8, 57).

Вход PV в клетку-хозяина опосредуется молекулой адгезии клеток суперсемейства Ig CD155, также известной как PV-рецептор (PVR) и нектин-подобная молекула 5 (Nectin5), которая широко сверхэкспрессируется при солидных новообразованиях, таких как глиобластома (Brown and Gromeier (2015) *Curr. Opin. Virol.* 13:81-85). CD155 также экспрессируется в колоректальной карциноме, аденокарциноме легких, раке молочной железы и меланоме, а также экспрессируется в антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как макрофаги и дендритные клетки (Brown et al. (2014) *Cancer* 120(21):3277-3286).

Внутренний сайт входа в рибосому (IRES) PV отвечает за инициацию трансляции генома РНК PV и участвует в нейропатогенности PV. Живые аттенуированные PV-вакцины, полученные из серотипов Sabin, несут критические аттенуирующие точечные мутации в IRES (Brown and Gromeier (2015) *Curr. Opin. Virol.* 13:81-85). Высокоаттенуированная полио-/риновирусная рекомбинантная PVSRIPO живая аттенуированная PV-вакцина типа 1 (Sabin), в которой IRES PV заменен на родственный из человеческого риновируса 2 (HRV2), не проявляла нейровирулентности/нейропатогенности по сравнению с исходным PV, но сохраняла цитотоксичность раковых клеток и специфичность по отношению к клеткам GBM (Brown and Gromeier (2015) *Curr. Opin. Virol.* 13:81-85; Brown and Gromeier (2015) *Discov. Med.* 19(106):359-365). PVSRIPO, вызывающий регрессию опухоли, за счет инициации противоопухолевого иммунного ответа, а не прямого лизиса основной массы опухоли, показал многообещающие результаты в клинических испытаниях при лечении рецидивирующей глиобластомы (GBM) (NCT01491893) (Brown and Gromeier (2015) *Curr. Opin. Virol.* 13:81-85; Brown and Gromeier (2015) *Discov. Med.* 19(106):359-365). В настоящее время в клинических испытаниях фазы 1b изучается применение PVSRIPO для лечения рецидивирующей злокачественной глиомы у детей (NCT03043391), а в клинических испытаниях фазы 2 изучается применение одного PVSRIPO или в

комбинации с химиотерапевтическим препаратом ломустин у взрослых пациентов с рецидивирующей злокачественной глиомой (NCT02986178).

- **Вирус Простого Герпеса**

Вирус простого герпеса (HSV) относится к семейству *Herpesviridae* и имеет большой линейный двухцепочечный ДНК-геном, включающий множество генов, не являющихся необходимыми для репликации вируса, что делает его идеальным кандидатом для генетических манипуляций. К другим его преимуществам относятся способность инфицировать широкий спектр типов клеток, чувствительность к противовирусным препаратам, таким как ацикловир и ганцикловир, и отсутствие инсерционного мутагенеза (Sokolowski *et al.* (2015) *Oncolytic Virotherapy* 4:207-219; Yin *et al.* (2017) *Front. Oncol.* 7:136). Существует два типа HSV: HSV типа I (HSV-1) и HSV типа II (HSV-2), причем большинство онколитических HSV происходит от HSV-1. У людей HSV-1 вызывает лихорадку и поражает эпителиальные клетки, нейроны и иммунные клетки путем связывания с нектинами, гликопротеинами и медиатором проникновения вируса герпеса (HVEM) на поверхности клетки (Kohlhapp and Kaufman (2016) *Clin. Cancer Res.* 22(5):1048-1054).

На сегодняшний день было создано множество различных онколитических вирусов HSV-1. Например, сконструированный HSV-1 для экспрессии анти-HER-2 антитела трастузумаба, нацеленного на опухоли, которые чрезмерно экспрессируют HER-2, такие как рак молочной железы и яичников, карциномы желудка и глиобластомы. Ген, кодирующий трастузумаб, был вставлен в две области в пределах гена гликопротеина gD HSV-1 с образованием двух онколитических HSV, R-LM113 и R-LM249. R-LM113 и R-LM249 продемонстрировали доклиническую активность против рака молочной железы и яичников человека, а также на модели глиобластомы HER2+ у мышей. R-LM249 вводили системно с использованием мезенхимальных стромальных клеток (MSK) в качестве клеток-носителей, оказывая терапевтическое воздействие на метастазы рака яичников и молочной железы в легких и головном мозге на модели у мышей (Campadelli-Fiume *et al.* (2016) *Viruses* 8, 63). Другой онколитический HSV-1, dlsptk HSV-1, содержит делецию в уникальном гене *long 23* (*UL23*), кодирующем вирусный гомолог тимидинкиназы (TK), в то время как мутантный hrR3 HSV-1 содержит инсерционную мутацию *LacZ* большой субъединицы рибонуклеотидредуктазы (RR), также известной как ICP6, кодируемой геном *UL39*. В результате мутанты dlsptk и hrR3 HSV-1 могут реплицироваться только в раковых клетках, которые сверхэкспрессируют TK и RR соответственно (Sokolowski *et al.* (2015) *Oncolytic Virotherapy* 4:207-219).

HF10 представляет собой спонтанно мутировавший онколитический HSV-1, в котором отсутствуют гены, кодирующие UL43, UL49.5, UL55, UL56 и связанные с латентностью транскрипты, и который сверхэкспрессирует UL53 и UL54. HF10 показал многообещающие результаты в доклинических исследованиях и продемонстрировал высокую опухолевую селективность, высокую вирусную репликацию, сильную противоопухолевую активность и благоприятный профиль безопасности (Eissa *et al.* (2017) *Front. Oncol.* 7:149). Клинические испытания HF10 включают: исследование фазы I у пациентов с рефрактерным раком головы и шеи, плоскоклеточным раком кожи, раком молочной железы и злокачественной меланомой (NCT01017185) и исследование фазы I на применение HF10 в сочетании с химиотерапией (гемцитабин, Nab-паклитаксел, TS-1) у пациентов с неоперабельным раком поджелудочной железы (NCT03252808). HF10 также комбинировали с анти-CTLA-4 антителом ипилимумабом, что приводило к повышению терапевтической эффективности у пациентов с неоперабельной или метастатической меланомой IIIb, IIIc или IV стадии (NCT03153085). В клиническом испытании фазы II в настоящее время изучается комбинация HF10 с анти-PD-1 антителом ниволумабом у пациентов с операбельной меланомой IIIb, IIIc и IV стадии (NCT03259425) и в сочетании с ипилимумабом у пациентов с неоперабельной или метастатической меланомой (NCT02272855). Комбинированная терапия паклитакселом и HF10 привела к повышению выживаемости в моделях колоректального рака по сравнению с лечением только одним из них, в то время как комбинированное лечение HF10 и эрлотинибом привело к повышению активности против ксенотрансплантатов поджелудочной железы *in vitro* и *in vivo*, по сравнению с лечением только HF10 или эрлотинибом (Eissa *et al.* (2017) *Front. Oncol.* 7:149).

Талимоген лахерпарепвек (Imlygic®, T-VEC), ранее известный как OncoVEX^{GM-CSF} является одобренным FDA онколитическим вирусом простого герпеса для лечения прогрессирующей меланомы, который был получен из штамма JS1 HSV-1 и генетически сконструирован для экспрессии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (Aref *et al.* (2016) *Viruses* 8:294). В T-VEC экспрессия GM-CSF усиливала противоопухолевый цитотоксический иммунный ответ, в то время как делеция обеих копий гена *ICP34.5* инфицированной клетки 34.5 (*ICP34.5*) подавляет репликацию в нормальных тканях, а делеция гена *ICP47* увеличивает экспрессию молекул МНС класса I, позволяя презентировать антиген на инфицированных клетках (Eissa *et al.* (2017)). T-VEC проявляет опухолевую селективность, связываясь с нектинами на поверхности раковых клеток, и преимущественно реплицируется в опухолевых клетках, используя нарушенные

онкогенные и противовирусные сигнальные пути, в частности путь протеинкиназы R (PKR) и IFN типа I. В нормальных клетках PKR активируется вирусной инфекцией, которая затем фосфорилирует белок эукариотического фактора инициации-2A (eIF-2A), инактивируя его и, в свою очередь, ингибируя синтез клеточного белка, что блокирует клеточную пролиферацию и предотвращает репликацию вируса. HSV дикого типа избегает противовирусного ответа благодаря экспрессии белка ICP34.5, который активирует фосфатазу, дефосфорилирующую eIF-2A, восстанавливая синтез белка в инфицированных клетках. Таким образом, делеция *ICP34.5* предотвращает вирусную репликацию T-VEC в нормальных клетках. Тем не менее, в раковых клетках путь PKR-eIF-2A нарушен, что делает возможным непрерывный рост клеток и неограниченную репликацию вируса (KohlhappandKaufman (2016) *Clin. CancerRes.* 22(5):1048-1054; Yinetal. (2017) *Front. Oncol.* 7:136). Экспрессия GM-CSF улучшает иммуногенность T-VEC, вызывая накопление дендритных клеток, способствуя презентации антигена и первичному T-клеточному ответу (KohlhappandKaufman (2016) *Clin. CancerRes.* 22(5):1048-1054).

T-VEC показал преимущественную репликацию в различных линиях раковых клеток, включая рак молочной железы, колоректальную аденокарциному, меланому, рак предстательной железы и глиобластому. Клинические испытания включают, например, изучение T-VEC при раке поджелудочной железы (NCT03086642, NCT00402025), рецидивирующем раке молочной железы (NCT02658812), прогрессирующих опухолях, не связанных с ЦНС, у детей (NCT02756845), немеланомном раке кожи (NCT03458117), немышечно-инвазивном переходноклеточном раке мочевого пузыря (NCT03430687) и злокачественной меланоме (NCT03064763), а также T-VEC в комбинации с атезолизумабом у пациентов с метастатическим тройным негативным раком молочной железы и метастатическим колоректальным раком с метастазами в печень (NCT03256344), в комбинации с паклитакселом у пациентов с тройным негативным раком молочной железы (NCT02779855), в комбинации с ниволумабом у пациентов с рефрактерными лимфомами или прогрессирующим/рефрактерным немеланомным раком кожи (NCT02978625), в комбинации с цисплатином и лучевой терапией у пациентов с прогрессирующим раком головы и шеи (NCT01161498), а также T-VEC в комбинации с пембролизумабом у пациентов с опухолями печени (NCT02509507), карциномой головы и шеи (NCT02626000), саркомой (NCT03069378) и меланомой (NCT02965716, NCT02263508).

В дополнение к GM-CSF в онколитические HSV вставляли множество других иммуностимулирующих генов, в частности, кодирующих IL-12, IL-15, IL-18, TNF α ,

IFN α/β и *fms*-подобный лиганд тирозинкиназы 3, что приводило к повышению терапевтической эффективности (Sokolowski *et al.* (2015); Yin *et al.* (2017)).

Другой онколитический HSV-1, R3616, содержит делеции в обеих копиях гена *RL1* (также известного как $\gamma_134.5$), который кодирует ICP34.5, нацеленный на раковые клетки с нарушенными путями PKR. Вирус NV1020 (или R7020) представляет собой мутантный HSV-1, который содержит делеции в генах *UL55*, *UL56*, *ICP4*, *RL1* и *RL2*, приводящие к снижению нейровирулентности и селективности в отношении рака. NV1020 показал многообещающие результаты на моделях плоскоклеточного рака головы и шеи, эпидермоидной карциномы и аденокарциномы предстательной железы у мышей (Sokolowski *et al.* (2015)). Кроме того, в клинических испытаниях изучалась безопасность и эффективность NV1020 при колоректальном раке с метастазами в печень (NCT00149396 и NCT00012155).

G207 (или MGH-1) является еще одним мутантом HSV-1 с делецией *RL1* ($\gamma_134.5$) и инактивирующей вставкой *LacZ* в гене нейровирулентности *UL39*. Клинические испытания с использованием G207 включают исследование введения только G207 или G207 совместно с разовой дозой облучения у детей с прогрессирующими или рецидивирующими супратенториальными опухолями головного мозга (NCT02457845), исследование безопасности и эффективности G207 у пациентов с рецидивирующим раком головного мозга (глиомой, астроцитомой, глиобластомой) (NCT00028158) и изучение эффектов введения G207 с последующей лучевой терапией у пациентов со злокачественной глиомой (NCT00157703).

G207 использовали для создания G47 Δ , содержащего дополнительную делецию в гене, кодирующем ICP47. Другие полученные от HSV-1 онколитические вирусы включают HSV1716, содержащий делеции в *RL1*, но имеющий интактный ген *UL39* и селективно реплицирующийся в активно делящихся клетках, а также мутантный KM100, имеющий вставки в генах *UL48* и *RL2*, которые приводят к потере экспрессии немедленных ранних генов вируса и селективности к раковым клеткам (Sokolowski *et al.* (2015); Yin *et al.* (2017) *Front. Oncol.* 7:136).

Поскольку большинство населения обладает первичным иммунитетом к HSV-1, использование клеточных носителей для доставки онколитических HSV может улучшить их терапевтический потенциал. Например, перитонеальные мезотелиальные клетки (MC) человека использовали в качестве клеток-носителей для HF10, что привело к эффективному уничтожению раковых клеток яичников *in vitro*, а также на модели ксенотрансплантата рака яичников у мышей (Fujiwara *et al.* (2011) *Cancer Gene Therapy* 18:77-86).

Онколитические вирусы также получали из HSV-2. Например, FusOn-H2 является онколитическим вирусом HSV-2 с делецией N-концевой области гена *ICP10*, кодирующего домен серин-треониновой протеинкиназы (PK). Эта PK отвечает за фосфорилирование активирующего ГТФазу белка Ras-FAP, который активирует митогенный путь Ras/MEK/MAPK, а также индуцирует и стабилизирует c-Fos, необходимый для эффективной репликации HSV-2. Нормальные клетки обычно имеют инактивированный сигнальный путь *Ras*. Таким образом, FusOn-H2 проявляет опухолевую селективность, реплицируясь только в опухолевых клетках с активированным сигнальным путем *Ras* (Fuetal. (2006) *Clin. CancerRes.* 12(10):3152-3157). FusOn-H2 продемонстрировал активность против ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы (Fuetal. (2006) *Clin. CancerRes.* 12(10):3152-3157), против ксенотрансплантатов карциномы легких Льюис в комбинации с циклофосфамидом, а также против сингенных опухолей молочной железы у мышей и нейробластомы (Lietal. (2007) *CancerRes.* 67:7850-7855).

- **Поксвирус**

Вирус Осповакцины

Примеры вирусов осповакцины включают, но не ограничиваются ими, штамм Lister (также известный как Elstree), штаммы департамента здравоохранения Нью-Йорка (NYCBH), штамм Dairen, штамм Ikeda, штамм LC16M8, штамм Western Reserve (WR), штамм Copenhagen (Cop), штамм Tashkent, штамм Tian Tan, штамм Wyeth, штамм Dryvax, штамм IND-J, штамм IND-W, штамм Brighton, штамм Ankara, штамм модифицированной вакцины Ankara (MVA), штамм Dairen I, штамм LIPV, штамм LC16M0, штамм LIVP, штамм WR 65-16, штамм EM63, штамм Bern, штамм Paris, штамм CVA382, штамм NYVAC, штамм ACAM2000 и штамм Connaught. Вирусы осповакцины представляют собой онколитические вирусы, обладающие множеством свойств, которые делают их особенно подходящими для использования в генной терапии ран и рака. Например, вирус осповакцины является цитоплазматическим вирусом, таким образом, он не встраивает свой геном в геном хозяина в течение своего жизненного цикла. В отличие от многих других вирусов, которые нуждаются в аппарате транскрипции хозяина, вирус осповакцины может поддерживать экспрессию собственного гена в цитоплазме клетки хозяина с помощью ферментов, кодируемых в вирусном геноме. Вирусы осповакцины также имеют широкий диапазон хозяев и типов клеток. В частности, вирусы осповакцины могут накапливаться в иммунопривилегированных клетках или иммунопривилегированных тканях, включая опухоли и/или метастазы, а также включая раненые ткани и клетки. Тем не менее, в

отличие от других онколитических вирусов, вирус осповакцины, как правило, может быть очищен из организма субъекта, которому вводили вирус, за счет активности иммунной системы субъекта и, следовательно, он менее токсичен, чем другие вирусы, такие как аденовирусы. Таким образом, хотя вирусы, как правило, могут уничтожаться в организме субъекта, которому их вводили, за счет активности его иммунной системы, вирусы, тем не менее, могут накапливаться, выживать и пролиферировать в иммунопривилегированных клетках и тканях, таких как опухоли, потому что такие иммунопривилегированные зоны изолированы от иммунной системы хозяина.

Вирусы осповакцины также могут быть легко модифицированы путем вставки гетерологичных генов. Это может привести к ослаблению вируса и/или позволить доставку терапевтических белков. Например, геном вируса осповакцины имеет большую потенциальную емкость для чужеродных генов, куда можно вставить до 25 т.п.н. экзогенных фрагментов ДНК (примерно 12% от размера генома осповакцины). Геномы нескольких штаммов осповакцины были полностью секвенированы и идентифицированы многие важные и второстепенные гены. Благодаря высокой гомологии последовательностей среди различных штаммов, геномная информация из одного штамма осповакцины может быть использована для конструирования и создания модифицированных вирусов в других штаммах. Наконец, методы получения модифицированных штаммов вируса осповакцины с помощью генной инженерии хорошо зарекомендовали себя (Moss (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:86-90; Broder and Earl, (1999) *Mol. Biotechnol.* 13:223-245; Timiryasova *et al.* (2001) *Biotechniques* 31:534-540).

Было показано, что различные вирусы осповакцины проявляют противоопухолевую активность. В одном исследовании, например, голым мышам, несущим неметастатические клетки аденокарциномы толстой кишки, системно вводили штамм вируса осповакцины WR, модифицированный делецией фактора роста осповакцины и усиленным зеленым флуоресцентным белком, вставленным в локус тимидинкиназы. Было обнаружено, что вирус обладает противоопухолевым действием, включая один полный ответ, несмотря на отсутствие экзогенных терапевтических генов в модифицированном вирусе (McCart *et al.* (2001) *Cancer Res.* 1:8751-8757). В другом исследовании онколизат вакцины меланомы (VMO) вводили в участки рядом с лимфатическими узлами с положительной реакцией на меланому в клинических испытаниях фазы III у пациентов с меланомой. В качестве контроля пациентам с меланомой вводили штамм вируса осповакцины (VV) департамента здравоохранения

Нью-Йорка. Пациенты с меланомой, получавшие VMO, имели более высокие показатели выживаемости, чем нелеченные пациенты, но аналогичные показателям выживаемости пациентов, получавших VV в качестве контроля (Kim *et al.* (2001) *Surgical Oncol.* 10:53-59).

Штаммы вируса осповакцины LIVP тоже использовали для диагностики и терапии опухолей, а также для лечения раненых и воспаленных тканей и клеток (см., например, Lin *et al.* (2007) *Surgery* 142:976-983; Lin *et al.* (2008) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93:4403-7; Kelly *et al.* (2008) *Hum. Gene Ther.* 19:774-782; Yu *et al.* (2009) *Mol. Cancer Ther.* 8:141-151; Yu *et al.* (2009) *Mol. Cancer* 8:45; патент США № 7,588,767; патент США № 8,052,968; и публикацию США № 2004/0234455). Например, при внутривенном введении штаммы LIVP, как было показано, накапливаются во внутренних опухолях в различных локусах *in vivo*, а также эффективно лечат опухоли человека различного тканевого происхождения, включая, но не ограничиваясь ими, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы, метастатические опухоли мезотелиомы плевры, плоскоклеточный рак, рак легких и рак яичников. Штаммы LIVP осповакцины, включая их аттенуированные формы, проявляют меньшую токсичность, чем штаммы WR вируса осповакцины, что приводит к увеличению показателей выживаемости и длительности выживания в моделях животных, несущих опухоли (см., например, публикацию США № 2011/0293527).

Вирус осповакцины не встраивает свой геном в геном хозяина в течение своего жизненного цикла, поскольку является цитоплазматическим вирусом. Вирус осповакцины имеет линейный двухцепочечный ДНК-геном длиной около 180 т.п.о., который состоит из одной непрерывной полинуклеотидной цепи (Baroudy *et al.* (1982) *Cell* 28:315-324). Такая структура обусловлена наличием инвертированного концевой повтора (ITR), состоящего из 10 т.п.о. и участвующего в репликации генома. Считается, что репликация генома включает в себя само-затравку, приводящую к формированию высокомолекулярных конкатемеров (выделенных из инфицированных клеток), которые впоследствии расщепляются и восстанавливаются с образованием вирусных геномов (см., например, Traktman, P., Chapter 27, *Poxvirus DNA Replication*, pp. 775-798, in *DNA Replication in Eukaryotic Cells*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Геном содержит примерно 250 генов. В общем, несегментированный неинфекционный геном устроен так, что центрально расположенные гены необходимы для репликации вируса (и, таким образом, являются консервативными), в то время как гены около двух концов влияют больше на второстепенные функции, такие как круг хозяев и вирулентность. Вирусы осповакцины

практикуют дифференциальную экспрессию генов за счет использования открытых рамок считывания (ORF), расположенных в наборах, которые, согласно общему принципу, не перекрываются.

Вирус осповакцины обладает целым рядом свойств для использования в генной терапии рака и вакцинации, включая широкий диапазон типов хозяина и клеток, а также низкую токсичность. Например, в то время как большинство онколитических вирусов являются естественными патогенами, вирус осповакцины имеет уникальную историю своего широкого применения в качестве вакцины против оспы, что привело к признанию устойчивых результатов безопасности для людей. Токсичность, связанная с введением осповакцины, встречается менее чем в 0,1% случаев и может быть эффективно устранена введением иммуноглобулина. Кроме того, вирус осповакцины обладает большой потенциальной емкостью (вместимостью) для чужеродных генов (в геном осповакцины можно вставить до 25 т.п.н. экзогенных фрагментов ДНК, т.е. примерно 12% от размера генома осповакцины) и высокой гомологией последовательностей среди различных штаммов для конструирования и создания модифицированных вирусов в других штаммах. Методы получения модифицированных штаммов осповакцины с помощью генной инженерии хорошо известны (Moss (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 86-90; Broder and Earl (1999) *Mol. Biotechnol.* 13: 223-245; Timiryasova *et al.* (2001) *Biotechniques* 31: 534-540). Было показано, что штаммы вируса осповакцины специфически колонизируют солидные опухоли, не заражая при этом другие органы (см., например, Zhan *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67:10038-10046; Yu *et al.* (2004) *Nat. Biotech.* 22:313-320; Heo *et al.* (2011) *Mol. Ther.* 19:1170-1179; Liu *et al.* (2008) *Mol. Ther.* 16:1637-1642; Park *et al.* (2008) *Lancet Oncol.* 9:533-542).

• Вирус Коксаки

Вирус Коксаки (CV) относится к роду *Enterovirus* и семейству *Picornaviridae* и имеет позитивный одноцепочечный РНК-геном, который не интегрируется в геном клетки-хозяина. CV подразделяются на группы А и В, в зависимости от их воздействия на мышей, и могут вызывать легкие инфекции верхних дыхательных путей у людей (Bradley *et al.* (2014) *Oncolytic Virotherapy* 3:47-55). Как правило, исследуемые вирусы Коксаки для онколитической виротерапии включают аттенуированный вирус Коксаки В3 (CV-B3), CV-B4, CV-A9 и CV-A21 (Yla-Pelto *et al.* (2016) *Viruses* 8, 57). CV-A21 заражает клетки через рецепторы ICAM-1 (или CD54) и DAF (или CD55), которые на гораздо более высоких уровнях экспрессируются в опухолевых клетках, включая меланому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы и рак легких, а также множественную миелому и

злокачественную глиому. CV-A21 показал многообещающую доклиническую противоопухолевую активность *in vitro* на линиях раковых клеток злокачественной миеломы, меланомы, простаты, легких, головы и шеи и молочной железы, а также *in vivo* на мышах, несущих ксенотрансплантаты меланомы человека, и на мышах первичными опухолями рака молочной железы, а также их метастазами (Yla-Pelto *et al.* (2016); Bradley *et al.* (2014)). Происходящий от CV-A21 вирус CV-A21-DAFv, также известный как SAVATAK™, был получен из штамма Kuykendall дикого типа путем последовательных пассажей CV-A21 на отрицательных по ICAM-1 клетках рабдомиосаркомы (RD), экспрессирующих DAF, и было обнаружено, что он обладает улучшенными онколитическими свойствами по сравнению с родительским штаммом. SAVATAK™ связывается только с рецептором DAF, что может способствовать усилению его тропизма по отношению к раковым клеткам (Yla-Pelto *et al.* (2016)).

CV-A21 также изучали в комбинации с хлоргидратом доксорубина, что показывало увеличение онколитической эффективности по сравнению лечением любым из них по отдельности на линиях клеток рака молочной железы, колоректального и рака поджелудочной железы, а также на модели ксенотрансплантата человеческого рака молочной железы у мышей (Yla-Pelto *et al.* др. (2016)). Поскольку у значительной части населения уже выработаны нейтрализующие антитела против CV, комбинированная терапия CV-A21 с иммуносупрессантами, такими как циклофосфамид (Bradley *et al.* (2014)), является хорошим кандидатом для доставки через клеточные носители.

В рамках клинических испытаний изучали применение SAVATAK™ у пациентов со злокачественной меланомой IIIc или IV стадии (NCT01636882; NCT00438009; NCT01227551), а также применение SAVATAK™ отдельно или в комбинации с низкими дозами митомицина у пациентов с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (NCT02316171). Клинические испытания также изучали эффекты внутривенного введения CV-A21 при лечении солидных опухолей, включая меланому, рак молочной железы и рак предстательной железы (NCT00636558). Текущие клинические испытания включают исследование SAVATAK™ отдельно или в комбинации с пембролизумабом для лечения пациентов с немелкоклеточным раком легких (NCT02824965, NCT02043665) и раком мочевого пузыря (NCT02043665); SAVATAK™ в комбинации с ипилимумабом у пациентов с увеальной меланомой и метастазами в печень (NCT03408587) и у пациентов с прогрессирующей меланомой (NCT02307149); и SAVATAK™ в комбинации с пембролизумабом у пациентов с прогрессирующей меланомой (NCT02565992).

• Вирус Сенека-Валли

Вирус Сенека-Валли (SVV) является представителем рода *Senecavirus* семейства *Picornaviridae*, имеет позитивный одноцепочечный РНК-геном и является селективным по отношению к нейроэндокринным видам рака, включая нейробластому, рабдомиосаркому, медуллобластому, опухоль Вильмса, глиобластому и мелкоклеточный рак легких (Miles *et al.* (2017) *J. Clin. Invest.* 127(8):2957-2967; Qian *et al.* (2017) *J. Virol.* 91(16):e00823-17; Burke, M. J. (2016) *Oncolytic Virotherapy* 5:81-89). В процессе исследований рецептор 1 сибирской язвы (ANTXR1) идентифицировали в качестве рецептора SVV, который часто экспрессируется на поверхности опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками, однако предыдущие исследования также показали, что сиаловая кислота может быть компонентом рецептора SVV в моделях детской глиомы (Miles *et al.* (2017)). Изолят 001 SVV (SVV-001) представляет собой сильный онколитический вирус, который при внутривенном введении может нацеливаться и проникать в солидные опухоли и является привлекательным из-за отсутствия инсерционного мутагенеза, а также из-за селективного тропизма к раковым клеткам и его непатогенности для человека и животных. Кроме того, первичное воздействие на человека встречается редко, в результате чего SVV имеет низкие показатели первичного иммунитета (Burke, M. J. (2016) *Oncolytic Virotherapy* 5:81-89).

SVV-001 продемонстрировал многообещающую активность *in vitro* против линий клеток мелкоклеточного рака легких, аденокарциномы, нейробластомы, рабдомиосаркомы и саркомы Юинга, а также активность *in vivo* на моделях ортотопического ксенотрансплантата детской глиобластомы, медуллобластомы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы и нейробластомы у мышей (Burke (2016)). NTX-010, онколитический SVV-001, разработанный Neotropix®, доказал свою применимость и переносимость для лечения пациентов детского возраста с рецидивирующими/рефрактерными солидными опухолями как отдельно, так и в комбинации с циклофосфамидом, но его терапевтическая эффективность была ограничена из-за развития нейтрализующих антител (Berglund *et al.* (2017) *Stem Cell Research & Therapy*, 8:288). Клинические испытания включают изучение применения SV-001 у пациентов с солидными опухолями с нейроэндокринными признаками (NCT00314925), NTX-010/SVV-001 в комбинации с циклофосфамидом у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной нейробластомой, рабдомиосаркомой, опухолью Вильмса, ретинобластомой, аденокарциномой или карциноидными опухолями (NCT01048892) и NTX-010/SVV-001 у пациентов с мелкоклеточным раком легкого после химиотерапии (NCT01017601).

В. Анализ соответствия клеточных носителей и вирусов

Для облегчения вирусной терапии клетки, которые служат в качестве носителей для доставки вирусов, выбираются на основе их способности проявлять определенные характеристики *in vivo*, такие как способствование амплификации вируса, тем самым увеличивая инфицирование опухоли/рака и последующий онколитический потенциал; и преодоление врожденных (*например*, опосредованных НК-клетками) и адаптивных (*например*, опосредованных Т-клетками) иммунных барьеров и/или смешанных врожденных/адаптивных иммунных барьеров (*например*, опосредованных $\gamma\delta$ Т-клетками). Т-клетки подразделяются на две основные популяции, отличающиеся поверхностной экспрессией Т-клеточных рецепторов $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ (TCR). Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки являются прототипом «нетрадиционных» Т-клеток и представляют собой относительно небольшое подмножество Т-клеток (для обзора см. Wu *et al.*, *Int. J. Biol. Sci.*, 10(2):119-135 (2014); Moser and Eberl, *Immunol. Reviews*, 215(1):89-102 (2007), содержание которых включено сюда в качестве ссылки). Они определяются экспрессией гетеродимерных Т-клеточных рецепторов (TCR), состоящих из γ - и δ -цепей. Это отличает их от более распространенных $CD4^+$ хелперных Т-клеток и $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток, которые экспрессируют $\alpha\beta$ TCR. Большинство $\gamma\delta$ Т-клеток активируются независимо от МНС, в отличие от ограниченных МНС $\alpha\beta$ Т-клеток. $\gamma\delta$ Т-клетки могут распознавать множество структурно отличных лигандов, которые различаются по размеру, составу и молекулярной структуре, включая, помимо прочего, непептидные антигены, МНС и не-МНС молекулы на поверхности клетки, растворимые белки, сульфатид и *т.п.* $\gamma\delta$ Т-клетки могут распознавать молекулы МНС, такие как молекулы CD1 группы 1 (CD1a, b, c) и группы 2 (CD1d) (адаптивный иммунитет). Однако NKG2D (связанный с иммунитетом, опосредованным НК-клетками), который экспрессируется на Т-клетках V γ 9V δ 2 (популяция $\gamma\delta$ Т-клеток), также играет роль в распознавании лиганда $\gamma\delta$ Т-клетками (врожденный иммунитет). Лиганды NKG2D не экспрессируются большинством нормальных тканей, но активируются многими типами опухолевых клеток, которые необходимы для распознавания опухолевых клеток Т-клетками V γ 9V δ 2. Некоторые растворимые белки также участвуют в распознавании $\gamma\delta$ Т-клетками, *например*, бактериальные белки, включая неродственный стафилококковый энтеротоксин А (SEA) и токсин Листерииолизин О (LLO). $\gamma\delta$ Т-клетки также могут распознавать белки теплового шока (HSP), которые не нуждаются в процессинге антигена и могут происходить в отсутствие каких-либо антигенпрезентирующих клеток (APC). Непептидные антигены могут быть важными мишенями для распознавания Т-клетками, *например*, при заражении грибами,

бактериями или простейшими. Бутирофилин (BTN3A1) был идентифицирован как фосфорилированная антигенпрезентирующая молекула (APM) для Т-клеток V γ 9V δ 2, которая принадлежит к семейству иммуноглобулиноподобных молекул с иммуномодулирующими функциями. Он играет важную роль в распознавании пренилпирофосфатов V γ 9V δ 2 TCR и может функционировать как датчик внутриклеточных уровней фосфорилированных антигенов.

Несмотря на то, что аутологичные клетки можно использовать в качестве систем доставки, их доступность может быть ограничена, а получение клеток от субъекта иногда может быть обременительным и/или дорогостоящим. Было показано, что определенные клеточные носители, такие как мезенхимальные стволовые клетки (MSK), способствуют амплификации вируса и преодолевают врожденные/адаптивные иммунные барьеры даже в аллогенных условиях, отчасти из-за своих иммуносупрессивных свойств. Например, в настоящем описании показано, что стволовые клетки, полученные из жировой ткани (ADSC), могут уничтожать даже резистентные опухолевые клетки благодаря своим комбинированным свойствам, а именно обеспечение высокого уровня вирусной амплификации и сенсibilизация опухолевых клеток к вирусной инфекции. Тем не менее, возможность использования «готовых» аллогенных клеточных линий, включая аллогенные мезенхимальные стволовые клетки, такие как ADSC, в качестве систем доставки, может быть ограничена индивидуальными различиями, которые иногда приводят к несовместимости (недостаточная амплификация вируса; недостаточное отклонение от иммунной системы субъекта и/или недостаточная иммуносупрессия, в том числе временная или местная иммуносупрессия), частично из-за цитотоксических IFN γ -опосредованных ответов антиклеточного носителя. Эти врожденные и/или адаптивные иммунные ответы могут поставить под угрозу терапевтическую эффективность, например, за счет уничтожения клеточных носителей или индукции противовирусного состояния. Другие исследования также показали, что MSK, несовместимые с МНС, иногда не являются иммуннопривилегированными (Berglund *et al.* (2017) *StemCellResearch&Therapy*, 8:288). Соответственно, существует потребность в тестах для подбора клеточных носителей, которые соответствуют конкретному субъекту для виротерапии и позволяют использовать «готовые» платформы доставки на основе аллогенных клеток. В настоящем документе представлены способы, которыми можно идентифицировать специфичные для субъекта «совместимые» клеточные носители для введения виротерапии субъекту. В настоящем документе также представлены модифицированные клеточные носители, которые сенсibilизированы и/или сконструированы одним или несколькими способами для улучшенной доставки клеток

(см, например, раздел ниже). Любой из представленных клеточных носителей, включая модифицированные клеточные носители (сенсibilизированные и/или сконструированные), можно протестировать на их совместимость с субъектом, подлежащим виротерапии посредством систем доставки на основе клеток, с использованием способов, представленных в настоящем описании.

Обзор

Общие сведения

В настоящем документе представлены способы (способы сопоставления или способы анализа соответствий), которые по отдельности или в комбинации могут использоваться для идентификации клеточного носителя как «совместимого» с субъектом для доставки субъекту онколитического вируса. Приведенные в настоящем документе способы измеряют индивидуальные ответы на доставку вируса, опосредованную клеточным носителем, тем самым определяя, подходит ли клеточный носитель для введения вируса конкретному субъекту, *т.е.* подходит ли он для этого субъекта. Любой из способов анализасоответствий (САС), кратко изложенных ниже, а затем более подробно разъясненных в настоящем документе, или любая их комбинация может использоваться для идентификации клеточного носителя, который совпадает с интересующим субъектом. Один или несколько анализов А-Е можно использовать для отбора единственного представляющего интерес клеточного носителя на предмет его соответствия в качестве подходящего субъекту, или можно провести отбор более чем одного или множества/группы клеточных носителей и ранжировать их в соответствии с их совместимостью как соответствие для объекта, №1 - это наивысший ранг, а последующие числа (2, 3, 4,... и *т.д.*) указывают более низкие ранги, хотя может использоваться любая подходящая система ранжирования для определения подходящего соответствия(-ий). Ранжирование может быть основано на одном анализе, если выполняется только один из анализов А-Е, или может быть комбинированным ранжированием, основанным на производительности клеточных носителей в более чем одном анализе. Обзор каждого из подходящих анализов А-Е представлен ниже:

А. Сопоставление Гаплотипов

(а) Обзор гаплотипов

Гаплотип - это набор вариаций или полиморфизмов ДНК, которые наследуются вместе и могут относиться к группе аллелей или набору однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), расположенных на одной хромосоме.

Главный комплекс гистосовместимости (МНС)

Главный комплекс гистосовместимости (МНС) на хромосоме 6 включает гены человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), которые кодируют набор белков поверхности клетки, необходимых для презентации антигена для адаптивной иммунной системы. Молекулы МНС связывают антигены, происходящие от патогенов, и отображают их на поверхности клетки для распознавания соответствующими Т-клетками, таким образом, опосредуя взаимодействия иммунных клеток друг с другом и с другими клетками. МНС определяет совместимость доноров для трансплантации органов, а также предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям посредством перекрестной иммунизации.

Семейство генов МНС делится на три подгруппы: класс I, класс II и класс III. Молекулы МНС класса I связывают пептиды в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, происходящие из внутриклеточных белков. Они обнаруживаются на всех содержащих ядро клетках и взаимодействуют с рецепторами CD8 на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), опосредуя клеточный иммунитет. Класс I МНС включает три гена α -цепи: HLA-A, HLA-B и HLA-C. Молекулы МНС класса II, которые связывают пептиды из фагоцитированных белков, экспрессируются антигенпрезентирующими клетками (APC), включая макрофаги и дендритные клетки (DC), и взаимодействуют с рецепторами CD4 на поверхности хелперных Т-клеток, опосредуя адаптивный иммунитет. МНС класса II включает три пары генов α - и β -цепей: HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR, причем кластер HLA-DR содержит дополнительную β -цепь, которая является парной к α -цепью DR, что приводит к четырем типам молекул МНС класса II. Комбинация аллелей HLA, присутствующая на одной хромосоме, называется гаплотипом HLA. Локусы HLA являются одними из самых полиморфных в геноме человека, с более чем 12 000 аллелей для класса I и более 4 000 аллелей для класса II. Таким образом, маловероятно, чтобы два человека обладали одним и тем же гаплотипом HLA (Meyer *et al.* (2018) *Immunogenetics* 70:5-27).

МНС Класс I

Класс I МНС включает молекулы HLA-A, HLA-B и HLA-C. Отдельные локусы обозначаются заглавными буквами, например HLA-A, а аллели обозначаются числами после звездочки, например HLA-A * 0201. Поскольку аллели МНС экспрессируются совместно, и каждый человек несет по 2 аллеля каждого из 3 генов МНС класса I, существует шесть возможных различных типов МНС класса I (Janeway CA Jr., *et al.*, "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The major histocompatibility complex and its functions. Available from ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/).

Молекулы МНС класса I экспрессируются большинством типов клеток и связывают пептиды, полученные из внутриклеточных белков, после того, как они были расщеплены протеасомой и перемещены в эндоплазматический ретикулум, затем переносят пептиды на поверхность клетки и представляют их цитотоксическим CD8 Т-клеткам. Эти пептиды короткие и обычно состоят из 8-11 аминокислот (Kaczmarek *et al.* (2017) *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 65:201-214; Reeves and James (2016) *Immunology* 150:16-24).

МНС Класс II

Класс II МНС включает изоформы HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR, каждый из которых содержит α - и β -цепи, которые являются высокополиморфными, за исключением α -цепи DR. Каждый человек наследует пару генов HLA-DP, пару генов HLA-DQ, один ген HLA-DRA и один или несколько генов HLA-DRB от своих родителей, так что гетерозигота может иметь 8 различных молекул МНС класса II на своей клетке. Различные комбинации α - и β -цепей, кодируемых разными хромосомами, может привести к еще большему числу различных молекул МНС класса II (Janeway CA Jr., *et al.*, "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The major histocompatibility complex and its functions. Available from ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/).

Молекулы МНС класса II экспрессируются антигенпрезентирующими клетками (APC), включая DC, В-клетки и моноциты/макрофаги, и связываются с пептидами из белков, полученных от фагоцитированных патогенов, после того, как они были расщеплены лизосомами, а затем переносят их на поверхность клетки и представляют хелперным Т-клеткам. Эти пептиды длиннее, чем пептиды, представленные молекулами МНС класса I, и обычно имеют длину 14-20 аминокислотных остатков (Kaczmarek *et al.* (2017) *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 65:201-214).

МНС класса IB (включая MIC, HLA-E)

В дополнение к классическим генам МНС класса I и класса II существуют гены, которые кодируют молекулы МНС класса I, проявляющие небольшой полиморфизм и известные как гены IB класса МНС, которые включают представителей семейства генов MIC, HLA-G и HLA-E. Только два из пяти MIC генов, MICA и MICB, экспрессируются, в частности в эпителиальных клетках и фибробластах, и играют роль во врожденном иммунитете. Рецептор MIC, который экспрессируется NK-клетками и Т-клетками, такими как $\gamma\delta$ Т-клетки, состоит из цепи NKG2D (активирующий представитель семейства NKG2 рецепторов NK-клеток) и сигнального белка, называемого DAP10. Комплексы HLA-E со специфической подгруппой пептидов, полученных

из лидерных пептидов других молекул HLA класса I, и пептид: HLA-E связывается с ингибирующим рецептором NKG2A на NK-клетках, что приводит к ингибированию цитотоксической активности NK-клеток (JanewayCAJr., *etal.*, "Immunobiology: TheImmuneSysteminHealthandDisease." 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The major histocompatibility complex and its functions. Availablefromncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/).

Семейство CD1

Семейство CD1, которое экспрессируется в основном на антигенпрезентирующих клетках и тимоцитах и предоставляет антигены к CD4⁺Т-клеткам, CD8⁺Т-клеткам, дважды отрицательным Т-клеткам, $\gamma\delta$ Т-клеткам, iNKT-клеткам и NKT-клеткам, представляет собой семейство генов, подобных MHC класса I, которые лежат вне области MHC. В отличие от молекул MHC класса I и класса II, молекулы CD1 способны связывать и представлять липидные антигены. Существует пять белков CD1, CD1a-e, с CD1a-d, отображающих липидные антигены на поверхности клетки. CD1a-c, которые экспрессируются в основном антигенпрезентирующими клетками, предоставляют антигены клонально разнородным Т-клеткам, которые обеспечивают адаптивный иммунитет, в то время как CD1d экспрессируются несколькими типами клеток, включая DC, В-клетки, моноциты, макрофаги, кератиноциты и эпителиальные клетки, желудочно-кишечный тракт, и предоставляют антигены NKT-клеткам (Kaczmarek*etal.* (2017) *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 65:201-214).

KIR и KIR-лиганды

NK-клетки экспрессируют киллерные Ig-подобные рецепторы (KIR), которые распознают и связывают молекулы MHC класса I (лиганды KIR). На хромосоме 19 рецепторного комплекса лейкоцитов обнаружено 17 генов *KIR*, и большинство из этих генов имеют несколько аллелей. Номенклатура генов *KIR* основана на количестве внеклеточных иммуноглобулиноподобных доменов (2D или 3D), длине (L = длинный, S = короткий) цитоплазматического хвоста и на том, является ли ген псевдогеном (P). В то время как большинство KIR являются ингибирующими, NK-клетки обладают также активирующими KIR. Связывание ингибирующих KIR с их лигандами инактивирует NK-клетки. В инфицированных или неопластических клетках экспрессия классических локусов класса I может снижаться, что уменьшает доступность лигандов для молекул KIR и активирует NK-опосредованный лизис клеток (BensonJr. andCaligiuri (2014) *CancerImmunolRes.* 2(2):99-104).

Молекулы KIR очень полиморфны, и кластеры генов *KIR* приводят к двум различным гаплотипам, известным как гаплотипы группы А и группы В. Гаплотипы

группы А состоят из фиксированного числа генов и имеют только ингибирующие KIR, в то время как гаплотипы группы В имеют вариабельный набор генов и включают как ингибирующие, так и активирующие KIR (Benson Jr. and Caligiuri (2014) *Cancer Immunol Res.* 2(2):99-104).

В то время как молекулы KIR и их лиганды (молекулы МНС класса I) наследуются независимо, наследование конкретных комбинаций KIR/HLA было связано с восприимчивостью или устойчивостью к вирусной инфекции, аутоиммунитету и раку. Например, ингибирующие взаимодействия KIR/HLA предотвращают лизис раковых клеток, но несоответствие лигандов KIR приводит к усилению лизиса опухолевых клеток у пациентов, получающих аллогенные донорские NK-клетки (Benson Jr. and Caligiuri (2014) *Cancer Immunol Res.* 2(2):99-104).

(б) Анализ соответствия гаплотипов

Анализ соответствия гаплотипов можно провести следующим образом:

i. Получите цельную кровь или альтернативный источник ДНК от субъекта (*например, образцы мягких тканей, сперму, слюну, клетки кожи, корни волос и т.д.*).

ii. Извлеките гДНК из цельной крови или другого источника.

iii. Проанализируйте генетический полиморфизм, специфичный для субъекта (используя, *например, секвенирование следующего поколения*) в одном или нескольких из следующих локусов:

a. Классические гаплотипы МНС I/II

б. Гаплотип KIR и лиганды

с. Неклассические гаплотипы МНС (*например, HLA-E, CD1a/b/c/d; MICA/B*)

iv. Сравните профиль генетического полиморфизма субъекта, определенный в iii выше, с профилями генетического полиморфизма клеточного носителя или более чем одного клеточного носителя или группы клеточных носителей. Клеточные носители, которые имеют, по меньшей мере, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более совпадающих локусов с субъектом, могут быть идентифицированы как подходящие для доставки вируса субъекту. В некоторых примерах профиль генетического полиморфизма клеточного носителя в одном или нескольких локусах, указанных в iii, на 100% совпадает с профилем генетического полиморфизма субъекта. В других примерах профиль генетического полиморфизма клеточного носителя в одном или нескольких локусах, указанных в iii, совпадает, по меньшей мере, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% с профилем генетического полиморфизма субъекта, или соответствует на примерно от 50% до или

около 99% профилю генетического полиморфизма субъекта, чтобы быть идентифицированным в качестве подходящего клеточного носителя для субъекта.

v. Если в анализе на соответствие гаплотипов, определенном в iii выше, участвует более одного клеточного носителя, то в качестве наиболее совместимого будет идентифицирован клеточный носитель с максимальным количеством совпадающих локусов, причем 100% соответствие является наилучшим.

vi. В некоторых вариантах осуществления алгоритм/программа *in silico* может использоваться для идентификации локусов, которые позволяют прогнозировать совместимость и направлять идентификацию наиболее совместимых совпадений.

Б. Способность рекрутировать/сенсibilизировать резистентные опухолевые клетки и/или способствовать амплификации вируса

В методе подбора соответствия выполняются анализы миграции для измерения способности клеточного носителя(-ей) рекрутировать/повышать чувствительность опухолевых/раковых клеток к вирусной инфекции и/или способствовать амплификации вируса. Анализы миграции могут быть организованы в стандартных системах Transwell, покрытых биогелем (гидрогель, Matrigel) или внеклеточным матриксом (коллаген/фибронектин) поверхностных системах, где каждый из компонентов анализа (*например*, биопсия солидной опухоли и клеточные носители) осаждаются в отдельных камерах (разделенных, *например*, полупроницаемой мембраной) или в соседних местах, в зависимости от типа системы. Метод выполняется следующим образом:

i. Получение биопсии опухоли субъекта, которое может включать хирургический разрез, тонкоигольный аспират, биопсию иглой или первичные опухолевые клетки/органоиды опухоли, полученные после обработки ткани (ферментативное расщепление коллагеназой, диспазой, ДНКазой и *т.д.*). Культивирование твердой биопсии/органоидов/опухолевых клеток в соответствующей поверхностной системе, покрытой Transwell/биогелем/внеклеточным матриксом.

ii. Выполнение анализа миграции с использованием биопсии опухоли и одного или нескольких клеточных носителей или панели клеточных носителей, причем каждый тип клеточного носителя (если проверяется более одного) помечен уникальным детектируемым маркером (*например*, флуоресцентным маркером). Процент меченых клеток (для каждого типа клеточного носителя), которые накапливаются/мигрируют в направлении/кластеризуются вокруг биопсии солидной опухоли, первичных опухолевых клеток или опухолевых органоидов, представляет собой показатель миграции клеток от переносчика к опухоли (CTMS), при этом 100% - лучшее, а 0% - худшее, с оценкой CTMS не менее или около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50%, которые

следует учитывать в подборе. В некоторых примерах оценка CTMS по меньшей мере 20% для клеточного носителя считается соответствием между клеточным носителем и субъектом (или типом опухоли/рака, подлежащего лечению). В других примерах получение показателя CTMS от около 20% до около 60% для клеточного носителя считается соответствием между клеточным носителем и субъектом (или типом опухоли/рака, подлежащего лечению).

iii. Пометка биопсии опухоли или полученных из биопсии первичных опухолевых клеткок/органовид (например, с помощью флуоресцентного маркера) и проведение анализа миграции с использованием меченой биопсии опухоли и каждого из клеточных носителей на части панели этапа (ii) выше или всей панели, если предварительный просмотр не выполнялся. Процент меченых опухолевых клеток или ассоциированных с опухолью стромальных клеток, мигрирующих из солидной опухоли к клеткам-носителям, представляет собой оценку миграции от опухоли к клетке (TCMS), при этом 100% является наилучшим, а 0% - оценкой. наихудший, с оценками TCMS не менее или около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50%, чтобы считаться совпадением. В некоторых примерах оценка TCMS по меньшей мере 20% для клеточного носителя считается соответствием между клеточным носителем и субъектом (или типом опухоли/рака, подлежащего лечению). В других примерах получение показателя TCMS от примерно 20% до примерно 60% для клеточного носителя считается соответствием между клеточным носителем и субъектом (или типом опухоли/рака, подлежащего лечению).

iv. Подготовка образцов, как в ii. и iii. выше, за исключением выполнения анализа миграции в присутствии различных вирусов, чтобы проверить, препятствуют ли некоторые вирусы миграции опухоли или клеток-носителей. Вирус можно добавлять непосредственно в совместное культивирование или предварительно загружать в клетки-носители перед их совместным культивированием с образцами биопсии. Расчет скорректированных на вирусы CTMS (VCTMS) и TCMS (VTCMS), как указано выше, отражает способность вирусов вмешиваться в миграцию и жизнеспособность клеток.

v. Суммарная средняя оценка миграции/рекрутирования (MRS) может быть рассчитана для каждой комбинации биопсии опухоли/клеточного носителя/вируса следующим образом:

MRS (биопсия, клеточный носитель, комбинация вирусов) = [VCTMS (биопсия, клеточный носитель, вирус) + VTCMS (биопсия, клеточный носитель, вирус)] / 2; или же

MRS (биопсия, комбинация клеточного носителя) = [CTMS (биопсия, клеточный носитель) + TCMS (биопсия, клеточный носитель)]/2.

Показатели MRS не менее или около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% для клеточного носителя могут считаться совпадением между клеточным носителем и субъектом (или тип опухоли/рака, подлежащего лечению). В некоторых примерах оценка MRS по меньшей мере 20% для клеточного носителя считается соответствием между клеточным носителем и субъектом (или типом опухоли/рака, подлежащего лечению). В других примерах получение показателя MRS от около 20% до около 60% для клеточного носителя считается соответствием между клеточным носителем и субъектом (или типом опухоли/рака, подлежащего лечению). Этот анализ сопоставления определяет клеточные носители с вирусом и без него, которые могут успешно перемещаться по направлению к массе опухоли или привлекать/рекрутировать мигрирующие опухолевые клетки, тем самым способствуя распространению вируса и инфицированию. Показатели MRS могут использоваться для ранжирования вирусов на основе их способности не мешать правильной миграции конкретных клеточных носителей или, альтернативно, для ранжирования клеточных носителей на основе их устойчивости к вирусопосредованному подавлению миграции клеток, что позволяет идентифицировать оптимальную для субъекта специфичную комбинацию вируса и носителя.

Один или несколько показателей, указанных в пунктах ii - v, можно измерить, чтобы определить приемлимое совпадение.

В. Способность иммунных клеток, полученных от субъектов, способствовать амплификации вируса

Этот анализ соответствия измеряет опосредованную клеточным носителем вирусную амплификацию в присутствии иммунных клеток, происходящих от субъекта. Анализ проводится следующим образом:

- i. Получение иммунных клеток субъекта (*например*, цельную кровь, PBMC).
- ii. Совместное культивирование PMBC с клеточным носителем и вирусом.

Порядок добавления может быть:

Одновременный, или

Сначала инкубируется клеточный носитель + вирус (диапазон от или около 15 минут до или около 48 часов; в некоторых вариантах реализации диапазон составляет от или около 1 часа до или около 5 часов; в конкретных вариантах осуществления время инкубации составляет 2 или около 2 часов), затем добавить к PBMC

Инкубируйте полученную совместную культуру от или около 24 часов до или около 1 недели (в вариантах реализации диапазон от или около 15 минут до или около 70 часов; в некоторых вариантах реализации диапазон составляет от или около 20 часов до

или около 60 часов; в конкретных вариантах реализации время инкубации составляет 48 или около 48 часов)

iii. Измерение амплификации вируса (*например*, с помощью флуоресцентной визуализации или анализа вирусных бляшек (VPA)), сравнение с контролем в эквивалентных условиях, за исключением отсутствия РВМС.

iv. Если амплификация вируса в присутствии РВМС составляет менее 10% от значения, полученного в отсутствие РВМС, клеточный носитель считается несовместимым или несовместимым с субъектом. Если амплификация вируса в присутствии РВМС составляет не менее или около 10% - 30% от значения, полученного в отсутствие РВМС, совпадение можно считать достаточным, если амплификация вируса в присутствии РВМС составляет не менее или около 30% - 80% значения, полученного в отсутствие РВМС, совпадение можно считать умеренным, если амплификация вируса в присутствии РВМС составляет не менее или около 80% или больше от значения, полученного в отсутствие РВМС, совпадение можно считать хорошим.

v. Оценка иммунологической амплификации вируса (IVAS) может быть вычислена для каждого субъекта, клетки-носителя, комбинации вируса, используя формулу:

$IVAS = (\text{БОЕ (или флуоресценция) вируса из клеточного носителя} + \text{совместные культуры РВМС/}(\text{БОЕ только вируса из клеточного носителя})).$ Отношение 0,1 или более можно считать совместимым со степенью соответствия, как описано в iv. выше (10% или более от значения, полученного в отсутствие РВМС, причем соотношение 1,0 является самым высоким).

vi. Показатель IVAS при желании может быть скорректирован с учетом эффекта сыворотки (Скрининг сопротивления сыворотки субъекта). Оценка IVAS учитывает только клеточный иммунитет; если сыворотка субъекта значительно подавляет амплификацию вируса, то даже если оценка IVAS является приемлемой (*например*, 0,1 или выше), она, тем не менее, не может быть приемлимым показателем совпадения. Коррекцию можно произвести следующим образом:

Добавить сыворотку от субъекта к совместной культуре ii. выше в количестве 10-50% от объема совместного культивирования.

Показатель резистентности сыворотки субъекта можно рассчитать по формуле:

$PSRS = (\text{БОЕ без сыворотки} - \text{БОЕ с сывороткой}) / \text{БОЕ без сыворотки} (\times 100\%,$
для преобразования отношения в процентное значение). Чем выше показатель резистентности сыворотки, тем сильнее сыворотка препятствует амплификации вируса.

IVAS (скорректированный PSRS) = IVAS x (1-PSRS) (x100, для преобразования отношения в процентное значение).

Г. Измерение иммунологической совместимости с субъектом

В этом анализе соответствия этапы i. и ii. соответствуют этапам i. и ii части В выше,

iii. Измерение в совместных культурах одного или несколько маркеров ниже (*например*, с помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченных антител с маркерами; специфичными маркерами перечисленными в подробном описании)

Добавление флуоресцентно меченые антитела с интересующими маркерами, измерение повышающейся регуляции (если есть) в присутствии клеточного носителя (контроль: только PBMC; образец: PBMC + клеточный носитель):

а. IFN γ

б. Маркеры, связанные с цитотоксичностью, опосредованной T/NK/NKT-клетками

в. Маркеры, связанные с экспрессией активаторной/эффекторной функции T/NK/NKT-клеток

iv. Измерение (с помощью проточной цитометрии) флуоресценции в образце и в контроле.

v. Вычисление показателя иммунологической совместимости (ICS): соотношение (флуоресценции в образце/флуоресценции в контроле). Если измеряется более одного маркера, средний балл ICS может быть вычислен как среднее значение измеренных баллов ICS, или некоторые из баллов могут быть взвешены, *например*, на основе их установленной связи со сниженной амплификацией вируса.

vi. Отношение 1-1,05 или меньше означает, что клеточный носитель не влияет на иммунный ответ субъекта, *т.е.* хорошее совпадение.

Отношение 1,05-1,5 указывает на умеренно совместимость клеточного носителя

Отношение 1,5-2 указывает на достаточную совместимость клеточного носителя.

Отношение больше 2 указывает на иммунологическую несовместимость.

Д. Измерение подавления противовирусного иммунитета посредством клеточного носителя

В этом анализе соответствия этапы i. - iv. соответствуют этапам i. - iv. в части Г выше, за исключением дополнений к контролям: только PBMC и PBMC + клеточный

носитель, также включают следующие образцы: PBMC + вирус; PBMC + клеточный носитель + вирус

v. Вычисление показателя иммунологического подавления (ISS) для одного или нескольких маркеров вычисляется по формуле;

$$[(\text{Уровень маркера в совместной культуре PBMC + вирус} + \text{уровень маркера в совместной культуре PBMC + клеточный носитель}) - \text{уровень маркера в совместной культуре PBMC + вирус} + \text{клеточный носитель}] / (\text{уровень маркера в совместной культуре PBMC + вирус} + \text{уровень маркера в совместной культуре PBMC + клеточный носитель}) \times 100, \text{ для \% иммуносупрессии}.$$

vi. Показатели ISS% выше 0% считаются благоприятными, *т.е.* указывающими на способность клеточного носителя подавлять противовирусный иммунитет и позволять вирусу инфицировать опухолевые клетки. Если измеряется более одного маркера, средний балл ISS может быть вычислен как среднее значение измеренных баллов ISS.

Е. Измерение иммуномодулирующих эффектов клеток-носителей путем анализа супернатантов

Измерения, описанные в разделах Г и Д выше, также могут быть выполнены с супернатантами совместных культур, *например*, с помощью ELISA или анализа Luminex. Хотя конкретная популяция отвечающих клеток не может быть идентифицирована (поскольку клетки/вирус в совместных культурах не анализируются напрямую), оценки ISS и ICS, измеренные в супернатантах, также могут быть информативными в отношении совместимости; эти оценки определяются, как описано ранее.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, клеточный носитель или носители могут быть подвергнуты, необязательно, предварительному скринингу для определения способности клеточного носителя стимулировать вирусную амплификацию в отсутствие индивидуально-специфических клеток. Для данной выбранной вирусной терапии (*например*, вируса осповакцины) клеточный носитель(-и) или панель доступных клеточных носителей (аутологичные/аллогенные/оригинальные/сенсibilизированные/сконструированные) могут быть проверены на их способность способствовать к амплификации вируса. Определение скорости вирусной амплификации (БОЕ/клетку) для каждого типа клеточного носителя, нормализованной по количеству инфицированных клеток, производят при эквивалентной множественности инфекции (MOI в диапазоне от 0,001 до 1) и условиях совместного культивирования (*например*, используя VPA - анализ вирусных бляшек). Оптимальный момент времени считывания для каждого типа используемого вируса (*например*, от или около 1 дня или до или около 5 дней). Расчет

БОЕ/клетку для каждого типа клеточного носителя используют в качестве показателя амплификации вируса клеточного носителя.

На предварительном скрининге клеточные носители, которые продуцируют не менее 10 БОЕ/клетку, могут быть выбраны для дальнейшего скрининга путем сопоставления с субъектом в соответствии с любым из методов, кратко изложенных в А-Е и описанных далее в настоящем документе (10-100 – хорошо, 100-1000 – очень хорошо, больше 1000 – отлично). Панель клеток-носителей (или выбранный клеточный носитель или система доставки) можно просмотреть для оптимального соответствия с субъектом

В способах, представленных в настоящем документе, соответствие между клеточным носителем и субъектом может быть идентифицировано с использованием одного или нескольких анализов А-Е, как обобщено выше. В некоторых вариантах реализации более одного клеточного носителя или множество или панель клеточных носителей анализируется согласно одному или нескольким анализам соответствия А-Е. Затем клеточные системы доставки ранжируются в соответствии с их совместимостью с субъектом, в диапазоне от «наилучшего соответствия» (*например*, ранг 1) до наихудшего соответствия (*например*, более высокое числовое значение). Для каждого клеточного носителя вычисляется совокупный ранг в зависимости от количества выполненных анализов:

Совокупный ранг = ранг (VAS) + ранг (IVAS) + ранг (ICS) + ранг (ISS) + ранг (MRS) / 5 (если все эти показатели получены; можно получить менее 5 показателей). Затем клеточные носители ранжируются в порядке их соответствия критериям соответствия. Анализ гаплотипов также может быть рассмотрен при ранжировании клеточных носителей.

Подробные методы подбора анализов

а. Общие методы измерений, выполняемых в анализах

Ниже приведены общие методы, используемые для измерения определенных параметров в анализах сопоставления, представленных в настоящем документе:

Анализ вирусных бляшек (VPA)

Анализ вирусных бляшек (VPA) (или метод вирусных бляшек) используется для измерения титра вируса или концентрации вирусов в образце. Например, VPA можно использовать для количественной оценки амплификации вирусных частиц в различных условиях и с различными комбинациями иммунных клеток, полученных от пациента, и систем доставки на основе клеток.

Образцы, содержащие вирус, хранят при -80°C и подвергают трехкратному циклу замораживания (-80°C)/оттаивания ($+37^{\circ}\text{C}$) с последующей обработкой ультразвуком в ледяной воде в течение трех 1-минутных интервалов с разницей между интервалами в 1 мин. Обработанные ультразвуком образцы последовательно разводят в среде для заражения вирусом осповакцины (DMEM с добавлением 2% FBS, L-глутамина и пенициллина/стрептомицина). Анализы бляшек проводят в 24-луночных планшетах в дублированных лунках. 200000 клеток почки обезьяны CV-1 помещают в 1 мл среды D10 на лунку в течение ночи. Удаляют супернатант и 10-кратным последовательным разведением вирусосодержащего образца наносят на монослой CV-1 в количестве 200 мкл/лунку. Планшеты инкубируют в течение 1 часа при 37°C (инкубатор) с ручным встряхиванием каждые 20 минут. 1 мл СМС аккуратно наслаивают поверх клеток, затем планшеты инкубируют в течение 48 часов. Накладку СМС готовят путем автоклавирования 15 г натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Sigma-Aldrich, cat. # C4888) и повторного суспендирования с перемешиванием в течение ночи при комнатной температуре в 1 л DMEM с добавлением пенициллина / стрептомицина, L-глутамина и 5% FBS. , с хранением при 4°C . Подсчет бляшек производится после фиксации клеток путем заполнения лунок раствором кристаллического фиолетового (1,3% кристаллический фиолетовый (Sigma-Aldrich, C6158), 5% этанола (Pure Ethanol, Molecular Biology Grade, VWR, 71006-012), 30% формальдегида (37 %v/v. формальдегида, Fisher, cat. # F79-9), и бидистиллированная вода) в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим промыванием планшетов в водопроводной воде и сушкой в течение ночи. Уровень вируса рассчитывается в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на образец.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

Проточная цитометрия может быть использована для подсчета клеток, сортировки клеток и обнаружения биомаркеров/поверхностных антигенов клеток. Например, проточная цитометрия может быть выполнена с использованием параметров стробирования для идентификации специфических популяций иммунных клеток, включая Т-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, CD3, CD4, CD8), NK-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, NKp46, CD16, CD56) и NKT-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, CD3, CD16, CD56, NKp46, тетрамеры aGalCer-CD1d). Реакции иммунной системы оцениваются путем анализа различных параметров активации/эффекторной функции, включая, но не ограничиваясь ими: CD69, CD25, CD71, CD27 (CD70L), CD154 (CD40L), CD137 (4-1BB), CD44, CD45RA, CD45RO, CD278 (ICOS), CD127 (IL-7RA), CD183 (CXCR3), CD197 (CCR7), CD39, CD73, CD314

(NKG2D), PD-1, CTLA-4, IFN α/β , IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, IL-17, IL-6, CD107a, CD107b, TGF β , перфорин, гранзим В, IL-1a/IL-1b, G-CSF, RANTES, EXOTAXIN, MIP-1b, MCP-1, EGF, HGF, VEGF, IL-1RA, IL-7, IP-10, IL-2R, MIG и IL-8, среди прочих. Проточная цитометрия также используется для обнаружения экспрессии генно-инженерных eGFP ADSC и для измерения процента клеток, инфицированных L14 VV (сконструированный штамм LIVP вируса осповакцины, содержащий вставку TK-inserted Turbo-FP635).

Если обнаруживаемый биомаркер/антиген находится на поверхности клетки, такой как CD-маркеры, используется окрашивание поверхности. Однако, если внутриклеточные белки, такие как цитокины или факторы транскрипции, должны быть обнаружены, то перед окрашиванием антител требуются дополнительные шаги фиксации и пермеабиллизации.

Поверхностное окрашивание

Для анализа совместных культур проточной цитометрией, *например*, совместные культуры РВМС и стволовых клеток извлекают пипетированием, переносят в планшеты с V-образным дном и промывают буфером FACS (1x PBS с 1% FBS). Затем клетки окрашивают поверхность в течение 30 мин при 4°C в буфере FACS с добавлением соответствующей смеси антител. Например, для обнаружения CD3 на поверхности Т-клеток или NKT-клеток используется античеловеческий CD3-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, cat. # 300328, в 1:50), для обнаружения CD335/NKp46 на поверхности NK-клеток, *например*, используют анти-человеческий CD335/NKp46-PE (BioLegend, cat. # 331908, в 1:50), и для обнаружения CD69 на поверхности Т-клеток, NK-клеток и NKT-клеток, *например*, используется анти-человеческий CD69-APC (BioLegend, cat. # 310910, в 1:50). Буфер FACS также может содержать зонд жизнеспособности (ThermoFisher Scientific, LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, for 405 nm, cat. # L34964, в 1:1000). После окрашивания клетки дважды промывают буфером FACS, фиксируют в 2% PFA в 1x PBS в течение 15 мин при комнатной температуре, снова промывают буфером FACS для удаления PFA, а затем анализируют на проточном цитометре BD FACSAria II (BD Biosciences, San Jose, CA).

Для оценки цитотоксических функций, *например*, путем обнаружения CD107a на поверхности иммунных клеток, анти-человеческий CD107a-Alexaflor 488 (BioLegend, cat. # 328610) добавляют непосредственно к совместным культурам в соотношении 1:20 (10 мкл/лунку) за 5 часов до выделения и окрашивания поверхности с последующим добавлением монензина (BioLegend, cat. # 420701-BL, 1000X) в соотношении 1: 1000 через час для дополнительной 4-часовой инкубации при 37°C.

Внутриклеточное окрашивание

Для оценки продукции IFN γ в активированных NK, NKT и Т-клетках, включая $\gamma\delta$ Т-клетки, *например*, требуется внутриклеточное окрашивание. Раствор брефельдина А (BioLegend, cat. # 420601-BL, 1000X) добавляют в соотношении 1: 1000 через час после стимуляции или за 4 часа до восстановления и окрашивания поверхности. Если необходимо оценить клетки как на продукцию IFN γ , так и на воздействие на поверхность CD107a, моненсин (BioLegend, cat. # 420701-BL, 1000X) и брефельдин А добавляют вместе. После стандартного окрашивания поверхности и жизнеспособности клетки обрабатывают с использованием набора буферов для внутриклеточного окрашивания eBioscience (ThermoFisher, cat. # 00-5523). Вкратце, после окрашивания поверхности анти-CD107a-AlexaFluor 488 или без него клетки фиксируют в течение 30 минут с помощью 1 части концентрата фиксации/проницаемости (ThermoFisher, cat. # 00-5123) и 3 частей разбавителя фиксации/проницаемости (ThermoFisher, cat. # 00-5223), дважды промывают 200 мкл/лунку буфера для пермеабилзации 10x (ThermoFisher, cat. # 00-8333), разведенного 1:10 в бидистиллированной воде, и окрашивали антителом античеловеческого IFN γ -APC (BioLegend, cat. # 502512, 1:50) в буфере для повышения проницаемости в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывают буфером для пермеабилзации, фиксируют 2% PFA в 1x PBS в течение 15 мин при комнатной температуре, снова промывают буфером FACS для удаления PFA и анализируют на проточном цитометре BD FACSAria II (BD Biosciences, San Jose, CA).

ELISPOT

Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT) - это иммуноферментный анализ, который широко используется для мониторинга клеточных иммунных ответов на основе его чувствительной и точной идентификации и количественной оценки редких антигенспецифических и цитокин-продуцирующих иммунных клеток, и обнаружения единичных положительных клеток внутри популяция PBMC. Как и проточная цитометрия, ELISPOT можно использовать для анализа активации иммунной системы и иммуносупрессии на основе панели маркеров, идентифицирующих специфические популяции иммунных клеток, такие как Т-клетки, включая $\gamma\delta$ Т-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, CD3, CD4, CD8), NK-клетки, включая $\gamma\delta$ Т-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, NKp46 (CD335), CD16, CD56) и NKT-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, CD3, CD16, CD56, NKp46, aGalCer-CD1d тетрамеры), а также панели маркеров активации/эффекторной функции, включая, но не ограничиваясь ими: CD69, CD25, CD71, CD27 (CD70L), CD154 (CD40L), CD137 (4-1BB), CD44, CD45RA, CD45RO, CD278 (ICOS), CD127 (IL-7RA), CD183 (CXCR3), CD197 (CCR7), CD39, CD73, CD314

(NKG2D), PD-1, CTLA-4, IFN α/β , IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, IL-17, IL-6, CD107a, CD107b, TGF β , перфорин, гранзим B, IL-1a/IL-1b, G-CSF, RANTES, EXOTAXIN, MIP-1b, MCP-1, EGF, HGF, VEGF, IL-1RA, IL-7, IP-10, IL-2R, MIG и IL-8.

Анализы ELISPOT очень похожи по методике на твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA). Сначала готовят мембраны из PVDF в 96-луночных планшетах путем инкубации в 35% этаноле в течение 30 секунд с последующей промывкой 200 мкл/лунку фосфатно-солевым буфером (PBS) 3 раза для удаления этанола. Затем планшеты покрывают захватывающим антителом (разведенным в PBS примерно до 2-15 мкг/мл, 100 мкл/лунку), специфичным для интересующего анализита, и инкубируют в течение ночи при 4°C. Затем лунки опорожняют и промывают 3 раза с 200 мкл/лунку PBS для удаления несвязанного захватывающего антитела, и мембраны блокируются, *например*, используя 100 мкл/лунку 2% сухого обезжиренного молока или 200 мкл/лунку 1% BSA в PBS. и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, чтобы предотвратить неспецифическое связывание с мембраной. Затем планшеты 3 раза промывают 200 мкл/лунку PBS и сушат на воздухе, затем используют на следующем этапе или хранят при 4°C с осушителем до 2 недель. Клетки, *например*, PBMC, разводят и пипетируют в лунки, обычно от 2×10^4 до 5×10^5 PBMC на лунку, добавляют соответствующую культуральную среду, и планшеты помещают в инкубатор, увлажненный CO $_2$ при 37°C, в течение определенного периода времени, обычно 24-72 часа, *например*, 24 часа для IFN γ , IL-2 и TNF α и 48 часов для IL-4, IL-5 и IL-10. Цитокины, такие как IFN γ , которые секретируются активированными клетками, связывают иммобилизованное антитело на мембране PVDF. Лунки промывают 3 раза 200 мкл/лунку PBS, затем 3 раза 200 мкл/лунку PBS/0,1% Tween-20 для смывания клеток и несвязанного анализита, а также добавляют биотинилированное детектирующее антитело (100 мкл/лунку) в PBS/1% BSA, специфичное для интересующего анализита и разбавленное приблизительно до 0,25-2 мкг/лунку, и инкубируют в течение 1-2 ч при комнатной температуре или при 4°C в течение ночи. Затем планшеты промывают 3-4 раза 200 мкл/лунку PBS 0,1% Tween-20 для удаления любых несвязанных биотинилированных антител, и добавляют в каждую лунку конъюгированные со стрептавидином ферменты, такие как пероксидаза хрена (HRP) или щелочная фосфатаза (AP) (100 мкл/лунку, разведенные до 1:500-1:2000 в PBS-Tween-BSA), и инкубируют планшеты при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Альтернативно, детектирующее антитело можно напрямую конъюгировать с ферментом. Несвязанный фермент смывают (3 x 200 мкл/лунку PBS/0,1% Tween-20 и 3 x 200

мкл/лунку PBS) и добавляют раствор осаждающего субстрата (*например*, АЕС для HRP или BCIP/NBT для AP). Образуется окрашенный осадок, красный для HRP или темносиний для AP, и каждое цветное пятно обычно представляет собой отдельную цитокин-секретирующую клетку. Реакцию останавливают осторожным промыванием дистиллированной водой, планшеты/мембраны сушат при комнатной температуре, а количество пятен подсчитывают вручную (*например*, с помощью рассеивающего микроскопа или стереомикроскопа) или с помощью автоматического считывателя ELISPOT. Если в одном анализе необходимо измерить несколько цитокинов, используются флуоресцентно меченые антицитокиновые антитела, и модифицированный анализ известен как анализ FluoroSpot.

(I) Отбор иммунных клеток субъекта лечения

1. PBMC - могут быть выделены, *например*, с помощью центрифугирования Ficoll-Paque.

2. Цельная кровь - цельная гепаринизированная кровь включает типы клеток крови, отличные от PBMC, *например*, нейтрофилы.

3. Цельная кровь с лизисом эритроцитов – удаляется большее количество эритроцитов, что позволяет достичь более высокой концентрации лимфоцитов и миелоидных клеток. После такого лизиса дополнительно могут быть выполнены несколько промываний для удаления сыворотки/плазмы субъекта, как во время выделения Ficoll-Paque PBMC.

4. PBMC/цельная кровь с лизисом эритроцитов, дополненная плазмой/сывороткой аутологичного субъекта. Плазма субъекта может быть выделена из гепаринизированной крови человека после высокоскоростного центрифугирования, сыворотка может быть выделена после высокоскоростного центрифугирования негепаринизированной и свернувшейся крови субъекта. PBMC или цельные клетки крови после лизиса эритроцитов можно затем инкубировать с добавлением 10-50% аутологичной сыворотки или плазмы субъекта в качестве добавки. В некоторых условиях анализа комплемент в сыворотке/плазме необязательно или по необходимости может быть дополнительно инактивирован термически или фармакологически.

5. Конкретные популяции иммунных клеток, субпопуляции и их комбинации.

(II) Сопоставление клеточного носителя с вирусом

Этот анализ может быть выполнен до культивирования иммунных клеток, полученных от субъекта. Скрининг совместимости клеточного носителя/вируса выполняется путем анализа совместных культур одного или нескольких клеточных носителей и вирусов, подлежащих анализу; когда оценивается более чем одна

комбинация клетка-носитель/вирус, методы выполняются в эквивалентных условиях анализа.

Для каждой из совместных культур способность клеточного носителя стимулировать вирусную амплификацию измеряется методами, известными специалистам в данной области, с использованием клеток-носителей/вирусов, которые сконструированы для экспрессии детектируемых белков, *например*, флуоресцентно меченных белков. Могут быть использованы методы, известные специалистам в данной области, включая, *например*:

1. Анализ вирусных бляшек (VPA)
2. Количественный ПЦР
3. Флуоресцентная визуализация (детектируемая метка или конструкция для экспрессии флуоресцентного белка)
4. ELISA (*например*, измерение кодируемой вирусом β -галактозидазы)
5. Биолюминесценция (*например*, вирус, сконструированный для экспрессии люциферазы репортерного гена)
6. Флуоресцентная микроскопия (программное обеспечение для визуализации измерения интенсивности флуоресценции) / считыватель флуоресцентных планшетов для отслеживания динамики вирусной инфекции (*например*, отслеживание клеточных транспортных средств по зеленому каналу (GFP), вируса по красному каналу (TurboFP635)).

Скорости амплификации вируса измеряются для каждого анализируемого клеточного носителя с использованием MOI (0,01-10) и периодов совместного культивирования примерно от 24 часов до 1 недели в эквивалентных условиях анализа. Измеренная скорость нормализована по отношению к количеству инфицированных клеточных носителей: БОЕ на клетку-носитель 1-10 может считаться ограниченной эффективностью (в качестве клеточного носителя для данного вируса); 10-100 БОЕ на клетку-носитель считается хорошей активностью; Раствор для клеток БОЕ 100-1000 считается очень хорошей активностью; БОЕ на клетку-носитель более 1000 считается чрезвычайно высокой активностью.

Комбинации клеточных носителей и вирусов, демонстрирующие БОЕ на клетку носитель не менее 10, могут рассматриваться для тестирования в соответствующих анализах с использованием клеток, полученных от субъекта. В качестве альтернативы, нормализованные значения БОЕ на клеточный носитель, измеренные в эквивалентных условиях анализа, можно использовать в качестве показателя амплификации вируса

(VAS), который способствует ранжированию комбинации клеточный носитель + вирус как подходящей (или нет) для терапии.

(IV) Сопоставление комбинации клеточного носителя/вируса с субъектом лечения

1. Данные гаплотипирования субъектов могут использоваться для прогнозирования совместимости пациента с конкретным клеточным носителем на основе более близкого или более отдаленного сопоставления. Сопоставление HLA-локусов (HLA-A, HLA-DP) и сопоставление гаплотипов KIR часто наводит на мысль о широкой терпимости субъекта к множеству аллогенных клеточных носителей, но не является окончательным. Однако прогностическая ценность данных может быть увеличена за счет накопления данных о сопоставлении/совместимости субъектов в базе данных и использования алгоритмов разработки для прогнозирования совместимости на основе подтвержденных анализом корреляций. Метод гаплотипирования может быть выполнен следующим образом:

- i. Изолируйте кровь пациента или другой источник ДНК.
 - ii. Извлеките гДНК, используя методы, известные в данной области техники.
 - iii. Проведите анализ релевантных локусов генетических полиморфизмов, специфичных для пациента, с использованием секвенирования следующего поколения или эквивалентного метода, известного в данной области техники.
 - Классический гаплотип MHC I / II
 - Гаплотип и лиганды KIR
 - Неклассический гаплотип MHC (*например*, HLA-E; CD1a, b, c, d; MICA/B)
 - iv. Сравните профиль генетического полиморфизма каждого пациента с профилем доступного клеточного носителя(-ей)
 - Выявите несоответствия MHC между пациентом и клетками-носителями
 - Выявите несоответствия KIR и лигандов KIR между пациентом и клетками-носителями
 - Выявление несоответствий в неклассических локусах MHC между пациентом и клеточными носителями
 - Сравните все доступные клеточные носители, чтобы определить, какие из них наиболее совместимы с пациентом на основе минимального количества несовпадений; или если используется только один клеточный носитель, выясните процент несоответствий, чтобы увидеть, есть ли по крайней мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или больше % несовпадений.
- Программный алгоритм/программа *insilico* может использоваться для прогнозирования наиболее совместимых совпадений на основе итеративного накопления данных анализа и демонстрации того, что несовпадения в определенных локусах

неблагоприятны и приводят к неспособности клеточных систем доставки амплифицировать вирус. Алгоритм прогнозирования силикосовместимости может итеративно обновляться с использованием новых данных отбора совместимости субъекта и переносчика клеток, а также может быть скорректирован *insilico* для прогнозирования совместимости клеточных носителей для различных онколитических вирусов (*например*, отличных от вируса осповакцины).

2. Измерение способности рекрутировать/сенсibiliзировать резистентные опухолевые клетки: клеточный носитель + биопсия живой опухоли +/- вирус

Полученные от субъекта иммунные клетки, клеточные носители и вирусы можно совместно культивировать одновременно, или клеточный носитель + вирус можно сначала инкубировать (*например*, от 15 минут до 48 часов), а затем добавить к полученным от субъекта иммунным клеткам. По истечении времени инкубации, *например*, от 24 часов до 1 недели, в некоторых вариантах реализации 48 часов), выполняются следующие измерения: т –

а. Флуоресцентная визуализация для визуализации и количественной оценки «направленной на опухоль миграции» меченых клеточных носителей.

б. Флуоресцентная визуализация для визуализации и количественной оценки направленной на клеточный носитель миграции немеченых или меченых опухолевых биопсийных раковых или стромальных клеток (*например*, ассоциированных с раком фибробластов, иммунных клеток и т. д.).

в. Флуоресцентная визуализация для визуализации и количественной оценки синергетического эффекта колонизации, усиленной клеточным носителем, и амплификации вируса в исследуемой биопсии опухоли, то есть амплификация вируса в исследуемой биопсии опухоли + клеточные носители:

- на 5% или более больше, чем сумма вирусной амплификации в одной биопсии опухоли в эквивалентных условиях + вирусная амплификация только в клеточных носителях в эквивалентных условиях;

- или по крайней мере на 5% или более больше, чем вирусная амплификация в одной биопсии опухоли в эквивалентных условиях.

г. Методы:

- биоптаты живых солидных опухолей, свежесыведенные от субъектов, могут быть разделены на эквивалентные по размеру/массе/объему реплицируемые части.

- миграционные анализы могут быть установлены с использованием стандартных трансвелл, биогеля (гидрогеля) или внеклеточного матрикса (коллагена/фибронектина)-покрытых поверхностных систем, где два компонента (твердая биопсия опухоли и

клетки-носители) будут депонированы в отдельных камерах или в смежных местах соответственно.

- эквивалентные реплицируемые части свежих и живых биопсий опухолей субъектов совместно культивируют с клеточными носителями, помеченными флуоресцентными маркерами, такими как CFSE, GFP, RFP и *т.д.*, в течение периода от 15 минут до одной недели.

- если биопсия опухоли культивируется совместно с более чем одним типом клеточного носителя, то клеточные носители могут быть помечены различными флуоресцентными маркерами, чтобы позволить идентифицировать и количественно определить, какой тип клеточного носителя предпочтительно используется для биопсии опухоли субъекта.

- процент флуоресцентно меченых клеток-носителей, накапливаемых в биопсии солидной опухоли, можно использовать как меру эффективности рекрутирования клеток-носителей, при этом 100% рекрутинг является лучшим, а 0% - худшим, и этот процент можно использовать в качестве показателя миграции клеток-носителей к опухоли (CTMS).

- в качестве альтернативы, свежая биопсия опухоли может быть флуоресцентно помечена нетоксичными индикаторными красителями, такими как CFSE, CYTO-ID Green/Red (Enzo), CellTracker (Thermofisher Scientific) или альтернативными, чтобы отслеживать направляемую клеточными носителями миграцию опухолевых или связанных с опухолью стромальных клеток из твердой биопсии опухоли к клеточным транспортерам.

- процент флуоресцентно меченых опухолевых или связанных с опухолью стромальных клеток, мигрирующих из опухоли в направлении клеточных носителей, может использоваться в качестве меры эффективности рекрутирования опухолевых/стромальных клеток клеточными носителями, при этом 100% рекрутирование является наилучшим и 0% рекрутмента является наихудшим, и этот% можно использовать в качестве показателя миграции клетки-носителя от опухоли к клетке (TCMS).

- параллельно некоторые реплицированные совместные культуры только биопсий опухолевых клеток, биопсий опухолевых клеток с клетками-носителями или только клеток-носителей могут быть инфицированы онколитическим вирусом, созданным с помощью флуоресцентных маркеров (*например*, TurboFP635), чтобы обеспечить визуализацию и количественную (интенсивность флуоресценции) оценку степени

амплификации вируса в биопсии опухоли по сравнению с флуоресцентно мечеными клеточными носителями, которые остаются вне биопсии опухоли;

- степень амплификации вируса в биоптате опухоли +/- клеточных носителях или только в клеточных носителях может быть оценена с использованием интенсивности флуоресценции вирусного маркера, а также с помощью стандартного VPA (анализа вирусных бляшек).

- также можно использовать анализ миграции в присутствии различных вирусов, чтобы проверить, мешают ли некоторые вирусы существенно мигрировать опухоли или клеточному носителю. Вирус можно добавлять непосредственно в совместную культуру (ко-культуру) или предварительно загружать в клетки-носители перед их совместным культивированием с образцами биопсии. Вычисление CTMS с вирусной коррекцией (VCTMS) и TCMS (VTCMS), как указано выше, отражает способность вирусов вмешиваться в миграцию и жизнеспособность клеток.

- Совокупный средний балл миграции/набора (MRS) для каждой комбинации биопсии опухоли-клеточного носителя-вируса можно рассчитать по формуле:

$$\text{MRS (биопсия, клеточный носитель, комбинация вирусов)} = [\text{VCTMS (биопсия, клеточный носитель, вирус)} + \text{VTCMS (биопсия, клеточный носитель, вирус)}] / 2; \text{ или же}$$

$$\text{MRS (биопсия, комбинация клеточного носителя)} = [\text{CTMS (биопсия, клеточный носитель)} + \text{TCMS (биопсия, клеточный носитель)}] / 2$$

- Клеточные носители впоследствии могут быть ранжированы для каждого субъекта и комбинации вирусов на основе средних баллов MRS.

3. Анализ совместных культур на соответствие субъекту/клетке-носителю, т.е. восприимчивость субъекта (пациента) к виротерапии, опосредованной клеточным носителем: РВМС субъекта + клеточный носитель + вирус.

(а) Измерение вирусной амплификации (см. анализы, известные специалистам в данной области техники и предоставленные в настоящем документе)

- Совместимое совпадение, если амплификация вируса в ко-культурах клеточного носителя и пациента РВМС превышает 80% амплификации вируса, когда один и тот же клеточный носитель заражен в отсутствие РВМС.

- Умеренно совместимое совпадение, если амплификация вируса в совместных культурах клеточного носителя и РВМС пациента находится в диапазоне 30-80% амплификации вируса, когда тот же самый клеточный носитель инфицирован в отсутствие РВМС.

- Достаточно совместимое совпадение, если амплификация вируса в совместных культурах клеточного носителя и РВМС пациента находится в диапазоне 10-30% от

амплификации вируса, когда тот же самый клеточный носитель инфицирован в отсутствие РВМС.

- Несовместимое совпадение, если амплификация вируса в совместных культурах клеточного носителя и РВМС пациента составляет менее 10% от амплификации вируса, когда один и тот же клеточный носитель инфицирован в отсутствие РВМС.

- % совместимости можно использовать для ранжирования клеточных носителей от наименее до наиболее совместимых клеточных носителей для каждого отдельного пациента и для каждого конкретного вируса.

- % совместимости также можно рассчитать как показатель иммунологической амплификации вируса (IVAS) для каждой комбинации пациента, клеточного носителя и онколитического вируса по формуле:

IVAS (% , пациент, клеточный носитель, вирус) = (БОЕ вируса из клеточного носителя + совместные культуры РВМС/БОЕ вируса только из клеточного носителя) x 100.

Оценки IVAS, например, 10% или выше, 20% и выше, 30% и выше или от 10% до 30% и выше, могут считаться адекватными для рассмотрения.

Когда проводится выбор более чем одного типа клеточного носителя, этот показатель IVAS (выше процент, выше совместимость) можно использовать для ранжирования клеточных носителей от наименее до наиболее совместимых клеточных носителей для каждого пациента и для каждого вируса.

- Оценка IVAS при желании может быть дополнительно скорректирована с учетом эффекта комплемента и нейтрализующих антител в сыворотке субъекта (дополнительный подбор устойчивости субъекта к сыворотке):

- Оценить % подавления амплификации вируса с помощью клеточных носителей в присутствии полученной от субъекта сыворотки с или без РВМС по шкале от 0 до 100% подавления и вычислить показатель устойчивости к сыворотке пациента (PSRS) можно, используя формулу:

PSRS = (БОЕ без сыворотки – БОЕ с сывороткой и без инактивации комплемента/БОЕ без сыворотки) x 100.

- Показатели PSRS более 95% будут указывать на сильное подавление, опосредованное сывороткой, предполагая, что вирус может быть несовместим с субъектом, несмотря на показатели приемлемой оценки IVAS, поскольку последняя (оценка IVAS) учитывает только клеточный иммунитет субъекта.

- Оценить вирусы, использованные в тесте на совместимость клеток -носителей, используя скорректированную оценку IVAS можно: $IVAS \text{ (с поправкой на PSRS)} = IVAS \times (100 - PSRS)/100$

- Вклад комплемента в подавление вирусной амплификации может быть оценен с использованием % подавления амплификации вируса клеточными носителями в присутствии полученной от субъекта сыворотки с РВМС субъекта или без него и с термической (температурной) или фармакологической инактивацией сыворотки или без нее по шкале от 0 до 100% по формуле:

% подавления комплемента = $(\text{БОЕ с сывороткой и с инактивацией комплемента} - \text{БОЕ с сывороткой и без инактивации комплемента}) / \text{БОЕ без сыворотки} \times 100$.

- Этот % подавления комплемента может использоваться в качестве показателя устойчивости к комплементу у субъекта (PCRS) и будет указывать на субъектов, имеющих более широкую устойчивость к множественным онколитическим вирусам, которая не зависит от наличия первичного воздействия/иммунитета, связанного с вирус-специфичными нейтрализующими антителами.

(б) Измерение иммунологической совместимости (иммунные привилегии/иммуносупрессивные эффекты)

(i) Измерение регуляции продукции интерферона (*например*, $IFN\gamma$), опосредованного вирусом/клеточным носителем (*например*, $IFN\gamma$) (диапазон допустимых параметров см. в описании баллов ICS в разделе (I) ниже)

$IFN\gamma$ ELISPOT

Проточная цитометрия

Используемое меченое антитело представляет собой антитело против человеческого $IFN\gamma$, *например*, против человеческого $IFN\gamma$ -APC.

(ii) Измерение регуляции маркеров, связанных с Т-клеткой, включая $\gamma\delta$ Т-клетку, НК-клетку и цитотоксичность, опосредованную НКТ-клетками.

Гранзим В ELISPOT

Проточной цитометрии

- используемые меченые антитела представляют собой антитела против CD107a/CD107b человека (*например*, антитела против человеческого CD107a-AlexaFluor 488)

(iii) Измерение регуляции других маркеров, связанных с Т-клетками, включая $\gamma\delta$ Т-клетки, НК-клетки и НКТ-клетки, опосредованные активацией/эффекторными

функциями(приемлемый диапазон параметров см. в описании баллов ICS в разделе (I) ниже)

-флуоресцентно меченые антитела можно использовать для измерения уровня поверхностной или внутриклеточной экспрессии различных маркеров активации/эффекторной функции на/в иммунных клетках, *например*:

Маркеры функций активатора/эффектора

CD69 (*например*, античеловеческий CD69-APC)

CD25

CD71

ICOS

CD314 (NKG2D)

PD-1

CTLA-4

IFN α / β

IFN γ

TNF α

IL-2

IL-4

IL-5

IL-6

IL-8

IL-9

IL-10

IL-12

IL-13

IL-15

IL-17

IL-18

IL-21

IL-22

IL-23

IL-25

GM-CSF

CD107a

CD107b

TGFβ
 Perforin
 Granzyme B
 CD27 (CD70L)
 CD154 (CD40L)
 CD137 (4-1BB)
 CD44
 CD45RA
 CD45RO
 CD278 (ICOS)
 CD127 (IL-7RA)
 CD183 (CXCR3)
 CD197 (CCR7)
 CD39
 CD73
 IL-1a/IL-1b
 G-CSF
 RANTES
 EXOTAXIN
 MIP-1b
 MCP-1
 EGF
 HGF
 VEGF
 IL-1RA
 IL-7
 IP-10
 IL-2R
 MIG

(iv) Меченные антитела (*например*, флуоресцентные) можно использовать для идентификации специфических популяций иммунных клеток, экспрессирующих различные характерные маркеры, *например*:

T-клетки/γδ T-клетки:

CD3 (*например*, анти-человеческий CD3-PerCP/Cy5.5)

CD69 (например, анти-человеческий CD69-APC)

CD4

CD8

NK-клетки/γδ T-клетки:

CD107a/CD107b (например, анти-человеческий CD107a-AlexaFluor 488)

CD335 (например, против CD335 человека или NKp46-PE)

CD16

CD56

NKT-клетки:

CD335 (например, против CD335 человека или NKp46-PE)

CD3

CD16

CD56

aGalCer-CD1d тетрамеры

(v) Анализ данных ELISPOT/проточной цитометрии от совместных культур (ко-культуры) для наилучшего совпадения может быть определен по следующим баллам:

(I) Оценка иммунологической совместимости (ICS)

- Когда соотношение параметров активации/эффекторной функции (по крайней мере, одного из вышеперечисленных) в совместной культуре относительно одного РВМС составляет около 1–1,05 или ниже, это указывает на то, что клеточный носитель не влияет на иммунный ответ или уменьшает ответ, *т.е.* является иммунологически совместимым совпадением.

- Умеренное иммунологически совместимое совпадение – это когда соотношение находится в диапазоне от 1,05 до 1,5.

- Минимальное иммунологически совместимое совпадение – это соотношение в диапазоне от 1,5 до 2.

- Иммунологически несовместимое совпадение – это соотношение больше 2.

- Параметры активации/эффектора могут быть взвешены на основе их установленной связи со снижением амплификации вируса, *например*, IFNγ и CD107a считаются значимыми по их влиянию на амплификацию вируса, и итеративно

обновляют уровень значимости/вес по мере поступления данных от других параметров активации/эффектора (см., раздел анализ «*In Silico* »).

- Популяции иммунных клеток, отвечающие на аллогенные клетки-носители, также могут быть взвешены на основе их установленной связи с уменьшенной амплификацией вируса, *например*, NK, NKT и Т-клетки, включая субпопуляции $\gamma\delta$ Т-клеток, считаются значимыми, и итеративно обновляют уровень значимости/веса субпопуляций по мере появления новых данных об ассоциациях с другими популяциями/субпопуляциями (см., раздел анализ «*In Silico* »).

- Расчет совокупного балла ICS выполняется на основе среднего значения коэффициентов ICS выбранных субпопуляций иммунных клеток и параметров активации/эффекторной функции (p1, 2,3 и т.д.) для каждой комбинации пациент-клеточный носитель следующим образом:

$$\text{NK-клетки: ICS (NK)} = [\text{ICS (p1)} + \text{ICS (p2)} + \text{ICS (p3)} + \dots \text{ICS (pn)}] / n$$

$$\text{Т-клетки: ICS (Т)} = [\text{ICS (p1)} + \text{ICS (p2)} + \text{ICS (p3)} + \dots \text{ICS (pn)}] / n$$

$$\text{NKT-клетки: ICS (NKT)} = [\text{ICS (p1)} + \text{ICS (p2)} + \text{ICS (p3)} + \dots \text{ICS (pn)}] / n$$

где «n» – общее количество рассматриваемых релевантных параметров активации/эффекторной функции (*например*, n = 2, если оцениваются только IFN γ и CD107a).

- Совокупный средний балл ICS для каждой комбинации пациент-клетка-носитель и объединение всех релевантных популяций эффекторов можно рассчитать по формуле:

$$\text{ICS [NK (1) + Т (2) + NKT (3) + ... Е (n)]} = [\text{ICS (NK, 1)} + \text{ICS (Т, 2)} + \text{ICS (NKT, 3)} + \dots \text{ICS (Е, n)}] / n,$$

где «n» – общее количество рассматриваемых релевантных популяций/субпопуляций эффекторных иммунных клеток (*например*, n = 3, если оцениваются только NK, Т и NKT-клетки; n = 4, если есть другие популяции, *например*, с учетом $\gamma\delta$ Т-клеток и др.).

(II) Оценка иммунологического подавления (ISS)

- Опосредованное клеточным носителем подавление противовирусного иммунитета можно оценить для каждой комбинации пациента и клеточного носителя, а также для каждого подтипа иммунных клеток и эффекторного параметра для вычисления показателя иммунологического подавления (ISS; % подавления противовирусного клеточного иммунитета) с использованием формулы:

$$\text{ISS} = (\% \text{ активированных эффекторов в совместных культурах PBMC + вируса} + \% \text{ активированных эффекторов в совместных культурах PBMC + клеточный носитель} - \% \text{ активированных эффекторов в совместных культурах PBMC + вирус + клеточный носитель}) / (\% \text{ активированных эффекторов в совместных культурах PBMC + вируса} + \% \text{ активированных эффекторов в совместных культурах PBMC + клеточный носитель}) \times 100$$

носитель / % активированных эффекторов в совместных культурах PBMC + вируса + % активированных эффекторов в совместных культурах PBMC + клеточный носитель) x 100,

где % активированных эффекторов сначала нормализуется путем вычитания фона или % активированных эффекторов в только контрольных PBMC.

- ISS 0% или выше является благоприятным. Хотя ISS 0% указывает на отсутствие иммуносупрессии, или отрицательные значения ISS могут указывать на то, что клеточные носители стимулируют, а не подавляют противовирусный иммунитет, такие выводы не являются окончательными, поскольку они могут просто отражать способность клеточного носителя амплифицировать вирус и, таким образом, можно ожидать, что нисходящий поток повысит, а не подавит противовирусный иммунитет.

- Отрицательные значения % неубедительны.

- Более высокие значения ISS указывают на более высокую способность клеточных носителей подавлять противовирусный иммунитет и улучшенную способность вируса распространяться на опухолевые клетки. Однако общая значимость также зависит от других критериев оценки, таких как IVAS и ICS, поскольку более высокие показатели IVAS и более низкие показатели ICS коррелируют с более высокой амплификацией вируса и могут затруднить подавление противовирусных ответов.

- Расчет совокупного балла ISS вычисляется на основе среднего значения ISS% подавления для каждой отвечающей субпопуляции иммунных клеток и ключевых параметров активации/эффектора (p1, 2, 3 и т.д.) Для каждой комбинации пациент-носитель клеток вычисляется следующим образом:

$$\text{NK-клетки: } \text{ICS (NK)} = [\text{ISS (p1)} + \text{ISS (p2)} + \text{ISS (p3)} + \dots \text{ISS (pn)}] / n$$

$$\text{T-клетки: } \text{ICS (T)} = [\text{ISS (p1)} + \text{ISS (p2)} + \text{ISS (p3)} + \dots \text{ISS (pn)}] / n$$

$$\text{NKT-клетки: } \text{ICS (NKT)} = [\text{ISS (p1)} + \text{ISS (p2)} + \text{ISS (p3)} + \dots \text{ISS (pn)}] / n,$$

где «n» – общее количество рассматриваемых релевантных параметров активации/эффекторной функции (например, n = 2, если оцениваются только IFN γ и CD107a).

- Суммарный средний балл по шкале ISS для каждой комбинации пациент-клетка-носитель и объединение всех релевантных популяций эффекторов можно рассчитать по формуле:

$$\text{ISS [NK (1) + T (2) + NKT (3) + \dots E (n)]} = [\text{ISS (NK, 1)} + \text{ISS (T, 2)} + \text{ISS (NKT, 3)} + \dots \text{ISS (E, n)}] / n,$$

где «n» – общее количество рассматриваемых релевантных популяций/субпопуляций эффекторных иммунных клеток (*например*, $n = 3$, если оцениваются только NK, T и NKT-клетки; $n = 4$, если есть другие популяции, *например*, с учетом gd ($\gamma\delta$) T-клеток и др.).

(в) Измерение иммуномодуляции (иммунные привилегии/иммуносупрессивные эффекты) производится путем анализа супернатантов совместных культур

Методы, известные в данной области техники, *например*, анализ ELISA и Luminex, могут быть использованы для измерения следующих параметров активатора/эффектора в супернатантах ко-культур:

IFN α/β

IFN γ

TNF α ,

IL-2

IL-4

IL-5

IL-9

IL-10

IL-12

IL-13

IL-15

IL-18

IL-21

IL-22

IL-23

IL-25

GM-CSF

IL-17

IL-6

TGF β

Perforin

Granzyme B

IL-1a/IL-1b

G-CSF

RANTES

EXOTAXIN

MIP-1b

MCP-1

EGF

HGF

VEGF

IL-1RA

IL-7

IP-10

IL-2R

MIG

IL-8

Хотя эти измерения (супернатанты) не могут идентифицировать исходную клетку, все же можно измерить совокупные баллы ICS (и/или ISS) способом, описанным для совместных культур.

- Подтвердить результаты проточной цитометрии или внести поправки в совокупные баллы для пациентов, у которых минимальное увеличение количества активированных/эффекторных иммунных клеток, индуцированных клеточным переносчиком, связано со значительным увеличением продукции эффекторных цитокинов/хемокинов. Это объясняет не только частоту иммунных эффекторов, но и величину их активности.

(г) Выбор подходящего клеточного носителя для вирусной терапии на основе индивидуальной совместимости

Клетка-носитель, выбранная как сопоставимая с субъектом в соответствии с методами, представленными в настоящем документе, обладает по меньшей мере одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью из следующих характеристик:

(1) Максимальная амплификация вируса в отсутствие клеток, полученных от субъекта (оценка по VAS)

(2) Максимальная амплификация вируса в присутствии полученных от субъекта клеток (оценка IVAS);

(3) Минимальная индукция противоклеточных иммунологических реакций (оценка ICS);

(4) Максимальная способность подавлять индукцию противовирусных иммунологических ответов (оценка ISS).

(5) Максимальная способность мигрировать к опухолям и привлекать опухоль и/или ассоциированные с опухолью стромальные клетки (когда такие клетки/опухоли доступны; оценка MRS).

(6) Минимальные несоответствия гаплотипов в определенных локусах, как предусмотрено в настоящем документе.

- Когда более одного или группы клеток-носителей проверяется на соответствие с субъектом, выбор клеточных носителей может быть ранжирован на основе количества несовпадений гаплотипов, одного из баллов, указанных в пунктах (1) - (5) выше, или комбинация двух или более любых оценок, указанных в пунктах (1) - (5) выше, если выполняется более одного типа анализа соответствия, может использоваться для получения совокупного ранга. Клетки-носители могут быть ранжированы, *например*, в соответствии с наилучшей комбинацией двух или более оценок VAS, IVAS, ICS, ISS и MRS.

Совокупный рейтинг $RANK = [RANK(VAS) + RANK(IVAS) + RANK(ICS) + RANK(ISS) + (\text{необязательно}) RANK(MRS)] / 5$ (если получены все 5 баллов; 2, 3 или 4, если получено меньше баллов)

Каждая из этих оценок может подвергаться дополнительным весовым коэффициентам в анализе *in silico*, когда в результате этих анализов собирается достаточный объем совпадающих данных.

(д) Анализ *InSilico* можно выполнить следующим образом:

Каждый субъект и клетка-носитель анализируются на предмет их типовых характеристик, *например*,

Классический гаплотип MHC I/II;

KIR гаплотип и лиганды;

Неклассический гаплотип MHC (HLA-E; CD1a, b, c, d ; MICA/B).

Данные собирают из каждого анализа совместного культивирования исследуемых иммунных клеток (РВМС/иммунные клетки/кровь) с конкретной парой вирус/клеточный носитель для создания банка данных.

Соответствующие оценки совместимости (IVAS, ICS, ISS), установленные в каждом анализе в банке данных, коррелируют со степенью соответствия между клеточным носителем и гаплотипом субъекта, чтобы установить отрицательную корреляцию между несоответствием(-ями) в конкретном локусе(-ах) и значительным отрицательным влиянием на один или все соответствующие показатели совместимости (IVAS, ICS, ISS).

Такие корреляции, когда они оказываются статистически значимыми, могут быть использованы для предварительного скрининга «*In Silico*» и исключения несоответствующих клеточных носителей на основании наличия нежелательных несовпадений с субъектом (связанных с плохими сопоставимыми оценками совместимости).

Кроме того, соответствующие показатели совместимости, установленные для каждой комбинации клеточного носителя и вируса, выбранной и используемой для лечения субъектов, собираются в базе данных и далее коррелируются с данными амплификации вируса, полученными из крови или опухоли субъектов в течение первых 48 часов лечения (диапазон, *например*, от 24 часов до 3 дней), который можно использовать в качестве меры фактической терапевтической эффективности *in vivo*.

Корреляционный анализ между сопоставимыми показателями совместимости и фактической терапевтической эффективностью *in vivo* можно использовать для корректировки/улучшения формулы совокупного ранжирования, используемой для выбора оптимальных клеток-носителей, путем присвоения более высоких весовых коэффициентов баллам IVAS, ICS или ISS, которые более тесно связаны/предсказывают терапевтическую эффективность *in vivo*.

Г. Модифицированные клеточные носители с улучшенными возможностями

В настоящем документе также представлены клеточные носители (клетки-носители), свойства которых изменены для облегчения доставки онколитического вируса субъекту и/или обеспечения улучшенного соответствия с субъектом. Любой из представленных в настоящем документе клеточных носителей (*например*, стволовые клетки, иммунные клетки, раковые клетки) можно модифицировать таким образом. Такие свойства могут включать, но не ограничиваются ими, улучшенное облегчение вирусной амплификации в носителе для доставки клеток, улучшенную способность уклоняться от иммунных ответов, направленных против носителя клеток и/или вируса, и/или улучшенную иммуносупрессию. В вариантах реализации изобретения иммуномодулирующие способности (*например*, уклонение от иммунных ответов, подавление иммунных ответов) могут быть локальными и/или временными, присутствуя в степени, необходимой для облегчения доставки, накопления и инфицирования вируса в опухоли или других раковых клетках.

В некоторых вариантах реализации модифицированный клеточный носитель, представленный в настоящем документе, может быть подвергнут скринингу с использованием анализа сопоставления, представленного в настоящем документе (Раздел В), для подтверждения его пригодности в качестве клеточного носителя для

доставки онколитического вируса конкретному субъекту и/или конкретному типу рака/опухоли. В вариантах осуществления множество/панель модифицированных клеточных носителей можно подвергнуть скринингу с помощью анализа сопоставления, представленного в настоящем документе, и ранжировать в порядке их возможности сопоставления. В некоторых примерах панель сотовых транспортных средств может включать немодифицированные сотовые транспортные средства.

Модифицированные клеточные носители, представленные в настоящем документе, могут содержать одну или несколько модификаций, изложенных в этом разделе и в других местах настоящего документа, как описано:

(i) Сенсibilизация как улучшение амплификации вируса и/или иммуномодуляции

В настоящем документе представлены клеточные носители, которые модифицированы для улучшенной вирусной амплификации и/или иммуномодуляции для облегчения доставки вируса и/или улучшенной совместимости с субъектом, которого лечат вирусной терапией. Модификации могут включать один или несколько из следующих вариантов осуществления. В вариантах осуществления клеточные носители могут быть сенсibilизированы для повышения способности к амплификации вируса путем предварительной обработки/загрузки клеточных носителей одним или несколькими из: IL-10, TGF β , VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, GM-CSF, факторы роста, агонисты RTK/mTOR, белковые лиганды wnt и ингибиторы/антагонисты GSK3 (*например*, тидеглусиб, вальпроевая кислота). В других вариантах осуществления клеточные носители могут быть сенсibilизированы для блокирования индукции противовирусного состояния, *например*, путем предварительной обработки/загрузки клеточных носителей небольшими молекулами или белковыми ингибиторами, которые мешают рецепторам IFN типа I/типа II и/или препятствуют передаче каскада сигналов по сигнальному пути, включая, помимо прочего, передачу сигналов IFNAR1/IFNAR2, передачу сигналов IFNGR1/IFNGR2, передачу сигналов STAT1/2, передачу сигналов Jak1 (*например*, тофацитиниб, Руксолитиниб, барицитиниб), передачу сигналов Jak2 (*например*, SAR302503, LY2784544 NS-018, BMS-911543, AT9283), передачу сигналов IRF3, передачу сигналов IRF7, передачу сигналов IRF9, передачу сигналов TYK2 (*например*, BMS-986165), передачу сигналов TBK1 (*например*, BX795, CYT387, AZ13102909).

В некоторых вариантах осуществления клеточные носители могут быть предварительно обработаны/загружены ингибиторами HDAC для нарушения/дерегулирования передачи сигналов IFN/чувствительности; такие

ингибиторы могут включать, но не ограничиваются ими, вориностат, ромидепсин, хидамид, панобиностат, белиностат, вальпроевую кислоту, моцетиностат, абексиностат, энтиностат, SB939, резминостат, гивиностат, хизиностат, HBI-8000, кеветрин, AR-CUDC-101.42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, ACY-1215, ME-344, сульфорафан и/или трихостатин. В других вариантах осуществления клеточные носители могут быть предварительно обработаны/загружены антагонистами антивирусного сигнального пути и/или путей антивирусной защиты, опосредованных STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3, DAI (ZBP1); такие антагонисты могут включать, но не ограничиваются ими, один или несколько белков K1, E3L, K3L (осповакцина), белков NS1/NS2 (грипп), NS3-4A (гепатит С), белков NP и Z (аренавирус), VP35 (Вирус Эбола), US11, ICP34.5, ICP0 (HSV), M45 (MCMV) и белок X (BDV: вируса болезни Борна). В вариантах реализации изобретения клеточные носители могут быть защищены от детерминант аллогенной инактивации/отторжения, *например*, путем предварительной обработки/загрузки клеток антагонистами МНС вирусного происхождения, *например*, одним или несколькими антагонистами МНСI A40R (осповакцина), Nef и TAT (HIV), E3-19K (аденовирус), ICP47 (HSV-1/2), CPXV012 и CPXV203 (коровья оспа), ORF66 (VZV), EBNA1, BNLF2a, BGLF5, BILF1 (EBV), US2/gp24, US3/gp23, US6/gp21, US10, US11/gp33 (hCMV), Rh178/VIHCE (RhCMV), U21 (HHV-6/7), LANA1, ORF37/SOX, kK3/MIR1, kK5/MIR2 (KSHV), mK3 (MHV- 68), UL41/vhs (а-герпесвирус, HSV, BHV-1, PRV), UL49.5 (Варицелловирус, BHV-1, EHV-1/4, PRV) и m4/gp34, m6/gp48, m27, m152/gp40 (mCMV).

В вариантах реализации изобретения модифицированные клеточные носители, представленные в настоящем документе, могут быть предварительно обработаны/загружены антагонистами В2М вирусного происхождения, *например*, UL18 (HCMV). В других вариантах осуществления клеточные носители могут быть предварительно обработаны/загружены антагонистами MICA и MICB (лиганды NKG2D), *например*, kK5 (KHSV). В некоторых вариантах осуществления клеточные носители могут быть предварительно обработаны/загружены одним или несколькими иммуносупрессивными факторами вирусного происхождения, включая, помимо прочего, ингибиторы иммунного FAS/TNF/гранзим В-индуцированного апоптоза (*например*, Ectromelia/Осповакцины virus SP1-2/CrmA), антагонисты IL-1/NFkB/IRF3 (*например*, N1, кодируемый вирусом осповакцины), антагонисты IL-1 и TLR (*например*, IL-18-связывающий белок, A46R, A52R), антагонисты IL-1 β (*например*, B15R/B16R), блокаторы TNF α (*например*, CmrC/CmrE вируса осповакцины), блокаторы IFN α/β (*например*, вирус осповакцины B18R/B19R) и блокаторы IFN γ (*например*, вирус

осповакцины B8R). В вариантах реализации изобретения клеточные носители могут быть предварительно обработаны/загружены низкомолекулярными ингибиторами TAP1/2 и/или тапазина.

В вариантах реализации изобретения модифицированные клеточные носители, представленные в настоящем документе, могут быть защищены от комплемента, *например*, путем предварительной обработки/загрузки клеточных носителей низкомолекулярными ингибиторами факторов комплемента (*например*, C1, C2, C3, C4, C5, MBL); такие ингибиторы могут включать, но не ограничиваться ими, один или несколько из VCP (белок контроля комплемента вируса осповакцины), B5R (ингибитор комплемента вируса осповакцины), scFv анти-CD1q/CD1r/CD1, анти-C3, анти-C5 (*например*, Eculizumab), пептидные ингибиторы C3 семейства компстатина (*например*, Cp40), растворимые мембранные белки (s/m) человека (*например*, s/mCR1 (CD35), s/mCR2 (CD21), s/mCD55, s/mCD59), Человеческий фактор Н и его производные, факторы яда кобры и производные с ингибирующей активностью комплемента.

Сенсибилизированные клеточные носители могут быть получены способами, известными в данной области. Например, клеточные носители можно предварительно обработать сенсибилизирующими агентами, *например*, белками или низкомолекулярными агонистами/антагонистами, путем инкубации в течение от 10 минут до 48 или более часов перед накоплением клеток, вирусной инфекцией или введением субъекту, *например*, примерно или по меньшей мере в течение 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 минут, или примерно или по меньшей мере 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 или более часов до накопления клеток, вирусной инфекции или введения субъекту. Для увеличения загрузки белков/нерастворимых в липидах малых молекул в клетки можно использовать липофектамин или альтернативные реагенты для трансфекции белков, такие как, *например*, Xfect (Takara), Pierce Pro-Ject (ThermoFisher), Pro-DeliverIN (OZ Biosciences), TurboFect (Fermentas) или альтернативу.

(ii) Сенсибилизация для устойчивости к уничтожению посредством вируса

Предлагаемые в настоящем документе модифицированные клеточные носители в некоторых вариантах осуществления могут быть предварительно обработаны/загружены одним или несколькими агентами, которые делают клеточные носители устойчивыми к опосредованному вирусом уничтожению. Например, в некоторых вариантах осуществления клеточные носители можно предварительно обработать интерферонами типа I и/или типа II. В других вариантах осуществления клеточные носители можно

предварительно обработать агонистами/индукторами противовирусного состояния (*например*, STING, PKR, RIG-I, MDA-5). Для создания таких «защищенных» клеточных носителей любые аутологичные или аллогенные клеточные носители можно обрабатывать интерфероном типа I (*например*, IFN α/β) и/или типа II (*например*, IFN γ) и/или агонистами STING, PKR, RIG-I, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM-2, MAVS, RIP-1/3, DAI (ZBP1) пути в течение от 30 минут до 48 или более часов, *например*, около или по крайней мере 30 минут или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 или более часов без заражения вирусом или до него.

Эти «защищенные» клеточные носители можно вводить в виде отдельной композиции одновременно с подобранными/сенситизированными/сконструированными клеточными носителями, которые не защищены таким образом и включают вирус; защищенные клеточные носители могут обеспечить увеличенную выживаемость и/или улучшенную местную иммуносупрессию. В некоторых вариантах реализации защищенные клеточные носители можно вводить, *например*, в пределах 10, 15, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, или, по меньшей мере, 10, 15, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 часов или 1, 2, 3, 4 или 5 дней до или после введения связанного/сенситизированного/сконструированного клеточного носителя который не так защищен и включает вирус.

(iii) Конструирование для улучшения вирусной амплификации и/или иммуномодуляции

В настоящем документе также представлены модифицированные клеточные носители, которые сконструированы для временной или постоянной экспрессии или подавления генов, чтобы способствовать улучшенной вирусной амплификации и/или иммуномодуляции. Клеточные носители могут быть сконструированы по одному или нескольким из следующих вариантов осуществления. Любой из представленных в настоящем документе клеточных носителей может быть модифицирован с использованием одного или комбинации вариантов осуществления для сенситизации, защиты и/или конструирования клеточных носителей, как предусмотрено в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления клеточные носители могут быть сконструированы так, чтобы не реагировать на антивирусное состояние, индуцированное интерфероном (IFN). Например, клеточные носители могут быть сконструированы для временного или постоянного (удаление локуса гена, *например*) подавления рецепторов

IFN типа I/типа II и/или передачи сигналов ниже по течению, такой как, *например*, подавление одного или нескольких рецепторов типа I/Экспрессия рецептора интерферона типа II; IFN α/β , экспрессия рецептора IFN γ ; Экспрессия рецептора IFNAR1/IFNAR2; Экспрессия рецептора IFNGR1/IFNGR2; Экспрессия рецептора STAT1/2; Экспрессия рецептора Jak1/2; Экспрессия рецептора IRF3; Экспрессия рецептора IRF7; Экспрессия рецептора IRF9; Экспрессия киназы TYK2 и экспрессия киназы TBK1.

В вариантах реализации изобретения клеточные носители могут быть сконструированы для временного или постоянного подавления элементов цитозольного вирусного ДНК/РНК-зондирования и механизма противовирусной защиты, включая, помимо прочего, один или несколько из PKR, RIG-I, MDA-5, cGAS, STING, TBK1, IRF3, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3 и DAI (ZBP1). В других вариантах осуществления клеточный носитель может быть сконструирован для временной или постоянной экспрессии антагонистов чувствительных к вирусу путей и путей противовирусной защиты, опосредованных, *например*, STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3, DAI (ZBP1); они могут включать, но не ограничиваются ими, один или несколько из K1, E3L, K3L (вирус осповакцины); NS1/NS2 (грипп А); NS3-4A (гепатит С); белок NP, Z (аренавирус); VP35 (вирус Эбола); US11, ICP34.5, ICP0 (HSV); M45 (MCMV); и белок X (BDV: вирус болезни Борна).

В некоторых вариантах реализации модифицированные клеточные носители, представленные в настоящем документе, могут быть сконструированы таким образом, чтобы избежать аллогенного распознавания одним или несколькими Т- и НКТ-клетками и адаптивного иммунного ответа (ов) $\gamma\delta$ Т-клеток. Например, клеточные носители могут быть сконструированы для временного или постоянного подавления экспрессии одного или нескольких из: молекул МНС класса I (HLA-A, B, C); Молекулы МНС класса II (HLA-DP, DQ, DR); Молекулы, подобные МНС (CD1a/b/c/d); или регуляторы транскрипции или экспрессии МНС Class I, МНС Class II, МНС-подобных молекул (*например*, TAP1/2, Tapasin, Beta-2 микроглобулин, СИТА, RFXANK, RFX5 и RFXAP). В других примерах клеточные носители могут быть сконструированы для временной или постоянной экспрессии одного или нескольких из: антагонистов В2М вирусного происхождения (*например*, UL18 (HCMV); и/или антагонистов МНС вирусного происхождения (*например*, одного или нескольких из A40R) МНСI (оспа); Nef, TAT (HIV); E3-19K (аденовирус); ICP47 (HSV-1/2); CPXV012, CPXV203 (коровья оспа); EBNA1, BNLF2a, BGLF5, BILF1 (EBV); ORF66 (VZV); US2/gp24, US3/gp23, US6/gp21, US10, US11/gp33 (hCMV); rh178/VIHCE (RhCMV); U21 (HHV-6/7); LANA1, ORF37/SOX,

kK3/MIR1, kK5/MIR2 (KHSV); mK3 (MHV-68); UL41/vhs (а-герпесвирус, HSV, BHV-1, PRV); UL49.5 (варицелловирус, BHV-1, EHV-1/4, PRV) и m4/gp34, m6/gp48, m27, m152/gp40 (мкМВ)).

В вариантах реализации изобретения клеточные носители могут быть сконструированы таким образом, чтобы избежать аллогенного распознавания НК-клетками и/или врожденного иммунного ответа(ов) $\gamma\delta$ Т-клеток. Например, клеточные носители могут быть сконструированы для временного или постоянного подавления экспрессии одного или нескольких из: связанного с мембраной MICA/B (лигандов NKG2D); PVR, связанный с мембраной (лиганд DNAM-1); Связанный с мембраной нектин-2 (лиганд DNAM-1). В других примерах клеточные носители могут быть сконструированы для временной или постоянной экспрессии одного или нескольких из:

антагонистов MICA и MICB (лигандов NKG2D) (*например*, kK5 (KHSV)); антагонистов рецептора NKG2D (*например*, коровьей оспы OMCP); антагонистов NCR - нацеленные на рецепторы NKp30, NKp44, NKp46 (*например*, гемагглютинирина(НА) - у вирусов коровьей оспы и других вирусов)); лигандов для рецепторов, ингибирующих NK (KIR) (*например*, HLA-Bw4; HLA-C2); лигандов для рецепторов, ингибирующих NK (NKG2a/CD94) (*например*, HLA-E и его производные по отдельности или в сочетании с лигандами 21M HLA-B для образования HLA-E-связывающих пептидов и стабилизации поверхностной экспрессии HLA-E).

В некоторых вариантах осуществления клеточные носители могут быть сконструированы для экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого или вирусного происхождения (*например*, для предотвращения/ингибирования аллогенного антиклеточного носителя или противовирусных иммунных ответов). Факторы человеческого происхождения включают, помимо прочего, IDO, аргиназу, TRAIL, iNOS, IL-10, TGF β , VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, sMICA, sMICB, sHLA-G, HLA-E, PD-L1, FAS-L, B7- H4 и одноцепочечные антитела (scFv), которые нацелены или истощают NK, и/или NKT, и/или $\gamma\delta$ Т-клетки. Факторы вирусного происхождения включают, но не ограничиваются ими, Ectromelia/Осповакцины virus SPI-2/CrmA (ингибиторы иммунного апоптоза, индуцированного FAS/TNF/гранзимом B); N1, кодируемый вирусом осповакцины (антагонист IL-1/NFkB/IRF3); HA (антагонисты NCR, нацеленные на NKp30, NKp44, NKp46); белок, связывающий IL-18; A40R; A46R; A52R; B15R/B16R; блокаторы TNF α (*например*, CmrC/CmrE вируса осповакцины); блокаторы IFN α/β (*например*, вирус осповакцины B18R/B19R); блокаторы IFN γ (*например*, вирус осповакцины B8R) и другие антагонисты IL-1/IL-1 β /NFkB/IRF3/NCR/MHCI/TLR/NKG2D.

В некоторых вариантах осуществления клеточные носители могут быть сконструированы для экспрессии факторов, происходящих от рака или стволовых клеток, которые облегчают вирусную инфекцию, в противном случае непермиссивные клеточные носители и/или опухолевые клетки. Например, клеточные носители могут быть сконструированы для экспрессии одного или нескольких из следующих: антигенов, связанных с раком (*например*, раковых антигенов яичка (MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, NY-ESO-1, PRAME, CT83, SSX2, семейство BAGE, семейство CAGE); онкофетальные антигенов (AFP, CEA); супрессоров онкогенов/опухолей (myc, Rb, Ras, p53, теломераза); антигенов дифференцировки (MELAN, тирозиназа, TRP-1/2, gp100, CA-125, MUC-1, ETA); GM-CSF; IL-10; TGF β ; VEGF; FGF-2; PDGF; HGF; IL-6; факторов роста; агонистов RTK/mTOR и лигандов белка Wnt.

В вариантах реализации изобретения модифицированные клеточные носители могут быть сконструированы для экспрессии факторов, которые влияют на функцию комплемента и/или нейтрализующих антител, включая, помимо прочего, один или несколько из: антагонистов белков факторов комплемента (C1, C2, C3, C4, C5, MBL); Белок контроля комплемента вируса осповакцины (VCP); Ингибитор комплемента вируса осповакцины (B5R); scFv анти-CD1q/CD1r/CD1s; анти-C3; анти-C5 (*например*, экулизумаб); пептидные ингибиторы C3 семейства компстатина (*например*, Cp40); человеческие растворимые мембранные (s/m) белки (*например*, s/mCR1 (CD35), s/mCR2 (CD21), s/mCD55, s/mCD59); Человеческий фактор Н и производные, а также факторы и производные яда кобры с ингибирующей активностью комплемента.

В данной области известен ряд методов клеточной инженерии, *например*, для создания систем доставки на основе сконструированных клеток, представленных в настоящем документе. Такие методы включают, но не ограничиваются:

(а) Целевое подавление CRISPR-CAS9 (постоянная делеция гена/локуса)

Клеточные носители можно трансфицировать ДНК-плазмидой, которая экспрессирует как белок CAS9, так и направляющую РНК (гРНК), специфичную для интересующего гена. Опосредованный gRNA-CAS9 разрез в геноме может быть восстановлен с использованием плазмиды донорской ДНК, что вызывает специфическую делецию целевого гена и постоянную и полную потерю кодируемого геном белка. Потеря экспрессии белка может быть подтверждена с помощью ПЦР (уровень ДНК), Нозерн-блоттинга/FISH (уровень РНК) или любого анализа белка, такого как, *например*, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

(b) Нацеленная экспрессия CRISPR-CAS9 (постоянная вставка гена/локуса)

Этот метод можно использовать для вставки интересующего гена в конкретное место генома клетки-переносчика. Клеточные носители можно трансфицировать ДНК-плазмидой, которая экспрессирует как белок CAS9, так и направляющую РНК (гРНК), специфичную для конкретного места вставки. GRNA-CAS9-опосредованный разрез в геноме может быть восстановлен с использованием плазмиды донорской ДНК, в которую вставлен интересующий ген, фланкированный последовательностями генома-носителя клетки по обе стороны от местоположения разреза ДНК/двухцепочечного разрыва, вызывая опосредованная гомологичной рекомбинацией вставка интересующего гена в конкретное место генома, а не случайным образом. Успешная вставка и экспрессия белка могут быть подтверждены с помощью ПЦР (уровень ДНК), Нозерн-блоттинга/FISH (уровень РНК) или любого анализа белка, такого как, *например*, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

(с) РНК-интерференция (ретровирусная/лентивирусная/опосредованная транспозоном трансдукция shРНК/микроРНК) (постоянное подавление гена)

shРНК/микроРНК, нацеленная на конкретный интересующий ген/белок, может быть сконструирована и клонирована в ретровирусный/лентивирусный/транспозонный вектор для стабильной интеграции в геном клеточного носителя. Клеточные носители могут быть трансдуцированы вектором, и успешно трансдуцированные клетки могут быть отобраны с использованием кодированных вектором маркеров селекции. shRNA-опосредованное подавление интересующего гена можно оценить с использованием, *например*, Нозерн-блоттинга и анализа белков.

(d) Лентивирус/ γ -ретровирус-опосредованная случайная/множественная вставка гена

Конкретный интересующий ген/белок может быть сконструирован и/или клонирован в ретровирусный или лентивирусный вектор для стабильной случайной интеграции в геном клеточного носителя. Клеточные носители могут быть трансдуцированы вирусным вектором, и успешно трансдуцированные клетки могут быть отобраны с использованием кодированных вектором маркеров селекции. shRNA-опосредованное подавление интересующего гена будет оцениваться с помощью нозерн-блоттинга и любых протеиновых анализов, таких как вестерн-блоттинг, проточная цитометрия и *т.д.*

(е) Транспозон-опосредованная случайная/множественная вставка гена

Конкретный интересующий ген/белок может быть сконструирован и/или клонирован в векторную систему транспозонов млекопитающих, такую как PiggyBac (SBI System Biosciences) или эквивалентную. Клеточные носители могут быть

котрансфицированы транспозонным вектором с интересующим геном (кДНК), фланкированным последовательностями инвертированного концевой повтора (ITR) и транспозазным вектором. Фермент транспозаза может опосредовать перенос интересующего гена в сайты хромосомной интеграции ТТАА. Успешно трансдуцированные клетки необязательно могут быть отобраны с использованием кодированных вектором маркеров отбора. Успешная вставка и экспрессия белка могут быть подтверждены с помощью ПЦР (уровень ДНК), Нозерн-блоттинга/FISH (уровень РНК) или любого анализа белка, такого как, *например*, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

(f) Временное подавление экспрессии интересующего белка геном может быть достигнуто, *например*, посредством РНК-интерференции. siRNA/MicroRNA можно трансфицировать в клеточные носители с помощью любой из установленных методологий, известных в данной области, *например*: трансфекция хлоридом кальция; липофекция; Xfect; электропорация; сонопорация и сжатие клеток (*например*, для введения миРНК).

(g) Временная экспрессия гена может быть достигнута, *например*, путем клонирования интересующего гена в соответствующий вектор экспрессии плазмиды млекопитающих, который можно трансфицировать в клеточные носители плазмидной ДНК, кодирующей желаемый продукт. Альтернативно, мРНК, кодирующая интересующий ген/белок, может быть трансфицирована непосредственно в клеточные носители. Трансфекцию можно проводить с использованием любой из установленных методологий, *например*: трансфекция хлоридом кальция; липофекция; Xfect; электропорация; сонопорация и сжатие клеток (*например*, для введения миРНК).

Примеры модификаций клеточных транспортных средств

1. Подавить индукцию антивирусного состояния.

Нетрансформированные стволовые клетки и несколько опухолевых клеток часто имеют неповрежденные противовирусные механизмы, которые ставят под угрозу их способность использовать их в качестве клеточных переносчиков/клеток-носителей онколитических вирусов. Интерфероны типа I и типа II являются мощными индукторами антивирусного состояния в стволовых клетках, а также в некоторых опухолевых клетках, которые могут препятствовать способности этих клеток инфицироваться и поддерживать амплификацию вируса. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления клеточные носители, представленные в настоящем документе и используемые в способах, предусмотренных в настоящем документе, загружены или сконструированы для экспрессии одного или нескольких ингибиторов передачи сигналов интерферона,

которые блокируют обнаружение вирусной инфекции и/или иницирование антивирусного состояния/иммунная реакция. Например, Руксолитиниб, низкомолекулярный ингибитор Jak1/Jak2, передающий сигналы интерферона, может успешно использоваться для увеличения терапевтического потенциала различных стволовых, а также опухолевых клеток для функционирования в качестве носителей онколитических вирусов путем их сенсibilизации, делая их восприимчивыми к вирусной инфекции, амплификации и распространению (см., например, Пример 6).

2. Защитите клеточные транспортные средства от дополнения.

Сыворотка человека может оказывать вредное воздействие на клетки-носители, включая прямую атаку и уничтожение инфицированных вирусом клеток-носителей до того, как вирусная амплификация начнется и/или достигнет своего пика, или путем нейтрализации голых вирусных частиц, высвобождаемых из клеток-носителей, что ограничивает распространение вируса в опухолевые клетки-мишени. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления клеточные носители, предоставленные в настоящем документе и используемые в способах, предоставленных в настоящем документе, загружены или сконструированы для экспрессии одного или нескольких факторов блокировки комплемента. Например, компстатин, пептидный ингибитор активации C3 комплемента или нейтрализующее антитело против C3a/C3a (desArg)/C3 человека, можно использовать для увеличения полезной нагрузки вируса в клетках-носителях, а также для получения усиленной амплификации вируса и его распространения опухоли-мишени (см., например, Пример 7).

3. Избегайте аллогенного признания/отвержения.

Как показано в настоящем документе, носители стволовых клеток (клеточные носители) могут успешно амплифицировать и доставлять онколитический вирус осповакцины против аллогенных барьеров благодаря своей способности избегать аллогенного распознавания и активно иммуносупрессировать НК-клетки, Т-клетки, gd ($\gamma\delta$) Т-клетки и/или популяцию клеток «NKT», экспрессирующих как маркеры НК (NKp46), так и маркеры Т-клеток (CD3). Однако в подгруппе «несовместимых/устойчивых» реципиентов носители стволовых клеток иногда не могут избежать аллогенного распознавания, что приводит к нарастанию быстрых и мощных аллогенных иммунных ответов против стволовых клеток-носителей даже в отсутствие вируса. Эти быстрые аллогенные ответы могут быть связаны с развитием цитотоксичности против стволовых клеток и индукцией антивирусного состояния, опосредованного интерфероном (например, $IFN\gamma$), что приводит к значительному подавлению способности амплифицировать вирус осповакцины из-за комбинации

уничтожения клеток-носителей и индукция противовирусного ответа. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления клеточные носители, представленные в настоящем документе и используемые в способах, предоставленных в настоящем документе, наполнены факторами ингибирования или сконструированы для подавления/устранения/блокирования детерминант аллогенного отторжения. Такие детерминанты аллогенного отторжения могут включать, но не ограничиваются ими, высокополиморфные и специфичные для пациента молекулы МНС Класса I и Класса II, распознаваемые Т-клетками CD8 и CD4, или широкий спектр менее полиморфных детерминант, распознаваемых различными врожденными или смешанными врожденными/адаптивными субпопуляциями Т-клеток, такие как NKT, iNKT, $\gamma\delta$ (gd) Т-клетки, которые включают молекулы МНС-подобные MICA и CD1a, b, c, d, а также различные другие связанные со стрессом или чувствительные к стрессу молекулы, такие как бутирофилины и Аннексин A2.

Например, элиминация /блокада аллогенных молекул МНС I может подавлять аллогенные иммунные ответы против стволовых и опухолевых клеток-носителей, особенно тех из CD8⁺ Т-клеток, которые отвечают за распознавание и ответ на несовпадения аллогенных МНС I. Пан-HLA-блокирующее антитело (антитело против HLA-A, B, C человека) (см., Пример 8) можно использовать для подавления аллогенных ответов клеток-носителей различных популяций клеток врожденного и адаптивного иммунитета, количество которых можно идентифицировать, *например*, с помощью многопараметрического анализа проточной цитометрии с использованием CD69 в качестве маркера активации и набора маркеров, специфичных для определенного типа клеток, как показано ниже: $\gamma\delta$ Т-клетки (CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺), iNKT/NKT клетки типа 1 (CD3⁺ Va24Ja18⁺), общие NKT (CD3⁺ CD56⁺ клетки; $\gamma\delta$ и iNKT исключены), классические CD4 (CD3⁺CD4⁺; $\gamma\delta$ и iNKT исключены), классические CD8 Т-клетки (CD3⁺ CD8⁺; $\gamma\delta$ и iNKT исключены), общие NK клетки (CD3⁻ CD56⁺) и субпопуляции NK CD56 с высоким содержанием, CD16⁻ (продуцирование цитокинов) и CD56⁺ с, CD16⁺ (цитотоксичность). В настоящем документе показано, что временная или постоянная блокада или устранение детерминант аллогенного отторжения, таких как HLA (МНС Class I) и других, может быть использована в качестве эффективной стратегии для создания носителей на основе стволовых или опухолевых клеток (клеточных носителей) с усиленным иммунным уклонением потенциал и способность более эффективно доставлять онколитические вирусы путем блокирования индукции аллогенных иммунных ответов и/или секреции эффекторных цитокинов, таких как IFN γ ,

которые могут вызывать антивирусное состояние и блокировать доставку и распространение полезной нагрузки вируса.

Иммунологические ответы и отторжение аллогенных и инфицированных вирусом стволовых клеток или клеток-носителей опухоли могут быть усилены путем задействования различных других маркеров, не относящихся к МНС, которые обычно активируются на поверхности инфицированных вирусом или трансформированных опухолевых клеток и служат иммуностимуляторами. молекулы. Такие маркеры могут поставить под угрозу способность клеток-носителей (*например*, опухолевых клеток или стволовых клеток, инфицированных вирусом и используемых для доставки вируса) избегать иммунологического отторжения. Например, молекулы NKG2D распознают белки, связанные с МНС класса I, такие как MIC A и MIC B человека, которые, как известно, действуют как костимуляторные молекулы, участвующие в распознавании и отторжении инфицированных вирусом и трансформированных опухолевых клеток. Пример 9 демонстрирует, что активация сигнального пути NKG2D с использованием, *например*, NKG2D-специфического антитела обеспечивает мощный костимуляторный сигнал, который усиливает и способствует иммунному распознаванию и активации клеточного иммунного ответа. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления клеточных носителей, представленных в настоящем документе и используемых в способах, предусмотренных в настоящем документе, клеточные носители загружены ингибирующими факторами или сконструированы для подавления/устранения/блокирования костимулирующих сигналов сигнального пути NKG2D. Например, клетки-носители могут быть сконструированы для временного или постоянного подавления экспрессии MIC A и/или MIC B, или могут быть загружены или сконструированы для временной или постоянной экспрессии: белка K5, ассоциированного с саркомой герпеса Капоши (KSHV) (также известный как kK5 или MIR2), который нацелен на деградацию MICA/MICB, UL16 (HCMV), который связывает MICB и предотвращает экспрессию лиганда на поверхности клетки (вызывает внутриклеточное удержание MICB), HCMV US18 и US20, которые нацелены на MICA для лизосомальной деградации (US20 также подавляет MICA и MICB), HCMV UL142, который подавляет MICA за счет удерживания в аппарате цис-гольджи, белок U21 вируса герпеса человека-7 (HHV-7), который подавляет экспрессию MICA и MICB на поверхности клетки, EBV белок LMP2A, который приводит к подавлению MICA, белок аденовируса E3/19K, который предотвращает перенос MICA/B на клеточную поверхность, ингибирует распознавание CD8 Т-клетками и NK-клетками и т.п.

4. Секретные иммунодепрессивные факторы.

Стволовые клетки и опухолевые клетки, как известно, используют различные стратегии подавления и уклонения от иммунитета, включая экспрессию IDO и секрецию IL-10. Однако когда они используются в качестве клеток-носителей/клеток-носителей для вирусов, вирусная амплификация в клетках-носителях вызывает постепенную потерю жизнеспособности и иммуносупрессивного потенциала. Следовательно, в некоторых вариантах реализации клеточных носителей, представленных в настоящем документе и используемых в способах, предусмотренных в настоящем документе, клеточные носители загружены или сконструированы для временной или постоянной экспрессии иммуносупрессивной молекулы или цитокина, *например*, IL-10, для частичного или полного обращения вируса. -опосредованная потеря иммуносупрессивных свойств и улучшение способности инфицированных вирусом клеток-носителей избегать аллогенных ответов и/или раннего иммунного распознавания (*см., например*, Пример 10).

5. Модификация сотовых транспортных средств; Управление по терапии

Клетки-носители/клеточные носители, модифицированные для уклонения от иммунного распознавания и/или подавления противовирусных и/или аллогенных иммунных ответов, как описано выше и в других местах в настоящем документе, могут быть получены путем предварительной обработки/нагрузки клеток-носителей представляющим интерес агентом, модифицирующим иммунный ответ (*например*, Руксолитиниб, пептидный ингибитор активации C3, IL-10, ингибиторы MIC A/MIC B и т.д.) или путем временной или постоянной модификации клеток-носителей для экспрессии/подавления экспрессии представляющего интерес агента, модифицирующего иммунный ответ, с использованием способов, известных специалистам в данной области и описанных в настоящем документе. В вариантах осуществления нагрузка/экспрессия может быть локальной и/или временной, присутствовать в степени, необходимой для облегчения заражения вирусом, амплификации вируса, доставки вируса в опухоль или другие раковые клетки и распространения вируса внутри опухоли или другого рака. В вариантах осуществления модификация осуществляется посредством временной экспрессии с использованием плазмиды или другого вектора, известного специалистам в данной области. В вариантах реализации изобретения плазида сконструирована таким образом, что экспрессия экзогенного гена, который экспрессируется, находится под контролем вирусного промотора (*например*, немедленного-раннего, раннего, промежуточного, позднего промоторов ряда вирусов, таких как аденовирус, вирус осповакцины, CMV, промотор длинных концевых повторов RSV, промотор E1A аденовируса и т.п.), тем самым снижая или устраняя

остановку экспрессии экзогенного гена вирусом, который впоследствии загружается в клетку-носитель.

Модифицированные клетки-носители могут быть загружены вирусом, как описано в настоящем документе, и вводиться парентерально, системно, внутриопухолево или другими путями, как описано в настоящем документе. Для системного введения клетка-носитель должна уклоняться от иммунного распознавания и/или подавлять вирусные или аллогенные клеточные иммунные ответы на достаточно долгое время, чтобы доставить вирус к месту опухоли/рака-мишени и облегчить его амплификацию и распространение. Для внутриопухолевого введения клетка-носитель должна уклоняться от иммунного распознавания и/или подавлять вирусные или аллогенные клеточные иммунные ответы на достаточно долгое время, чтобы проникнуть глубоко в опухоль. Время доставки может составлять от нескольких часов, *например*, от 10 до 20 часов, *например*, 10, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 часов, до нескольких дней, *например*, 24 часа, 30 часов, 36 часов, От 40 часов, 48 часов до 3, 4, 5 или более дней, в зависимости от состава клетки-носителя/вируса. В общем, устойчивая иммуносупрессия нежелательна после того, как была достигнута доставка и распространение вируса в месте доставки-мишени (*например*, опухоли), потому что это может предотвратить проявление эффекта специфичных для опухоли иммунных ответов (направленных против опухоли).

Д. Способы введения клеточного носителя/вируса для терапии

Предоставленные в настоящем документе клетки-носители/вирусы можно вводить субъекту, в том числе субъекту, имеющему опухоль или неопластические клетки, для лечения. Вводимые субъекту клеточный носитель и вирус могут быть клеткой-носителем и вирусом, представленными в настоящем документе, или любыми другими клеткой-носителем и вирусом, которые были созданы с использованием способов, представленных в настоящем документе. В некоторых примерах клетки-носители представляют собой аутологичные клетки (*т.е.*, полученные от пациента) или аллогенные клетки (*т.е.*, не полученные от пациента), которые представляют собой стволовые клетки, иммунные клетки или раковые клетки. Клетки-носители могут быть сенсibilизированы, *например*, для повышения способности амплификации вируса, для блокирования индукции антивирусного состояния, для защиты от детерминант аллогенной инактивации/отторжения и для защиты от комплемента, или клетки-носители могут быть сконструированы для, *например*, быть невосприимчивым к индуцированному интерфероном антивирусному состоянию, уклоняться от аллогенного распознавания Т-клетками, включая $\gamma\delta$ Т-клетки, NK-клетки и NKT-клетки, для экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого или вирусного

происхождения, для экспрессии раковых или стволовых клеток производные факторы, сенсibilизирующие плохо пермиссивные опухолевые клетки к онколитической вирусной инфекции, и для экспрессии факторов, влияющих на функцию комплемента и нейтрализующих антител. В некоторых примерах вводимый вирус представляет собой вирус, обладающий такими характеристиками, как ослабленная патогенность, низкая токсичность, преимущественное накопление в опухоли, способность активировать иммунный ответ против опухолевых клеток, высокая иммуногенность, репликационная способность и способность экспрессировать экзогенные белки, а также комбинации из них.

а. Введение облученных или необлученных клеток-носителей, инфицированных вирусом

Клетки-носители можно облучать до или после заражения онколитическим вирусом. Чтобы использовать трансформированные клетки в качестве носителей клеток для онколитической виротерапии, необходимо предотвратить появление новых метастазов после введения в неинфицированных клетках. Это может быть достигнуто посредством γ -облучения клеток-носителей до или после вирусной инфекции, перед введением, которое устраняет онкогенность, но сохраняет метаболическую активность и не влияет на продукцию/амплификацию и высвобождение вируса. Например, клетки-носители можно облучать за 24 часа до вирусной инфекции или до 24 часов после вирусной инфекции.

Количество излучения может быть выбрано специалистом в данной области в соответствии с любым из множества факторов, включая природу клетки-носителя и вируса. Количество излучения может быть достаточным для инактивации клеток-носителей и предотвращения туморогенеза без воздействия на вирусную инфекцию, амплификацию и высвобождение. Например, количество излучения может составлять около 5 Гр, 10 Гр, 15 Гр, 20 Гр, 25 Гр, 30 Гр, 35 Гр, 40 Гр, 45 Гр, 50 Гр, 100 Гр, 120 Гр, 150 Гр, 200 Гр., 250 Гр, 500 Гр и более.

б. Пути введения

Комбинация клетка-носитель/вирус может доставляться или вводиться субъекту местно или системно. Например, способы введения включают, но не ограничиваются ими, системный, парентеральный, внутривенный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, трансдермальный, внутрикожный, внутриартериальный (например, инфузия печеночной артерии), внутрипузырная перфузия, внутриплевральная, внутрисуставная, местная, внутриопухолевый, внутриочаговый, эндоскопический, множественный пункционный (например, как используется с вакцинами против оспы),

путем ингаляции, чрескожный, подкожный, интраназальный, интратрахеальный, пероральный, внутримышечный (*например*, введение в мочевой пузырь через катетер, введение в кишечник с помощью суппозитория или клизма), вагинальное, ректальное, внутричерепное, интрапростатическое, интравитреальное, ушное, глазное или местное введение.

Специалист в данной области может выбрать любой способ введения, совместимый с субъектом и комбинацией клетки-носителя/вируса, и это также может привести к тому, что клетка-носитель/вирус достигнет и проникнет в целевой тип клетки или ткани, *например*, опухоли и/или метастазы. Способ введения может быть выбран специалистом в данной области в соответствии с любым из множества факторов, включая характер заболевания, свойства целевой клетки или ткани (*например*, вид опухоли) и конкретную клетку-носитель/вирус для введения. Введение в целевой участок может осуществляться, *например*, путем баллистической доставки в виде коллоидной дисперсионной системы, или системное введение может осуществляться путем инъекции в артерию.

с. Устройства

Любое из множества устройств, известных в данной области, для введения лекарств, фармацевтических композиций и вакцин может быть использовано для введения комбинаций клетки-носителя/вируса. Примеры устройств включают, но не ограничиваются ими, иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенного введения, катетер, безыгольное инъекционное устройство, ингалятор и дозатор жидкости, такой как пипетка. Например, можно использовать многозубую инъекционную иглу Qaudra-Fuse™ (Rex Medical, Conshohocken, PA).

Обычно устройство для введения комбинации клетка-носитель/вирус будет совместимо с комбинацией клетка-носитель/вирус; например, игла менее инъекция устройство, такое как устройство впрыска под высоким давлением может быть использовано с носителями клеток/вирусами не поврежден впрыском под высоким давлением, но это, как правило, не используется с носителями клеток/вирусами, поврежденных путем инъекцией под высоким давлением. В настоящем документе также представлены устройства для введения субъекту дополнительного агента или соединения. Можно использовать любое из множества устройств, известных в данной области, для введения пациенту лекарств. Примеры устройств включают, но не ограничиваются ими, иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенного введения, катетер, безыгольное инъекционное устройство, ингалятор и дозатор жидкости, такой как пипетка. Обычно устройство для введения соединения будет совместимо с

желаемым способом введения соединения. Например, соединение, которое должно быть доставлено системно или подкожно, можно вводить с помощью иглы для подкожных инъекций и шприца.

d. Дозировки администрации

Режим дозирования может быть любым из множества способов и количеств и может быть определен специалистом в данной области в соответствии с известными клиническими факторами. Как известно в области медицины, дозировки для любого пациента могут зависеть от многих факторов, включая вид пациента, размер, площадь поверхности тела, возраст, пол, иммунокомпетентность и общее состояние здоровья, конкретного носителя клеток и вводимого вируса продолжительность и способ введения, вид и стадия заболевания, например размер опухоли, и другие методы лечения или соединения, такие как химиотерапевтические препараты, вводимые одновременно. В дополнение к указанным выше факторам на такие уровни могут влиять инфекционность и потенциал амплификации вируса, а также природа клетки-носителя и/или вируса, что может определить специалист в данной области.

В настоящих способах подходящие минимальные уровни доз и режимы дозирования клеток-носителей и вирусов могут быть уровнями, достаточными для того, чтобы клетки-носители доставляли вирус к месту-мишени, и чтобы вирус выживал, рос и реплицировался в опухоли или метастазе. Как правило, от 100000 до 1 миллиарда немодифицированных, сенсibilизированных, защищенных или созданных методами генной инженерии аллогенных или аутологичных клеток-носителей инфицированы *ex vivo* любым подходящим онколитическим вирусом, включая онколитический вирус, выбранный на основе скрининга совместного культивирования и методов анализа, представленных в настоящем документе, во множестве инфекции (MOI) 0,1 и выше. Выбирают носители клеток, которые продуцируют не менее 10 БОЕ/клетку. Например, выбирают носители клеток, которые продуцируют БОЕ/клетку по меньшей мере или по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере или по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере или по меньшей мере примерно 1000 или выше. Обычно вирус вводят в количестве, которое составляет по меньшей мере или около 1×10^5 БОЕ, по меньшей мере, один раз в течение цикла введения. Примерные минимальные уровни для введения вируса человеку массой 65 кг могут включать, по меньшей мере, около 1×10^5 бляшкообразующих единиц (БОЕ), по меньшей мере, около 5×10^5 БОЕ, по меньшей мере, около 1×10^6 БОЕ, по меньшей мере, около 5×10^6 БОЕ, по меньшей мере, примерно 1×10^7 БОЕ, по меньшей мере, примерно 1×10^8 БОЕ, по меньшей мере, примерно 1×10^9 БОЕ или, по меньшей мере,

примерно 1×10^{10} БОЕ. Например, вирус вводят в количестве, которое составляет, по крайней мере или около или составляет 1×10^5 БОЕ, 1×10^6 БОЕ, 1×10^7 БОЕ, 1×10^8 БОЕ, 1×10^9 БОЕ, 1×10^{10} БОЕ, 1×10^{11} БОЕ, 1×10^{12} БОЕ, 1×10^{13} БОЕ или 1×10^{14} БОЕ, по крайней мере, один раз в течение цикла введения.

е. Режимы

В режиме дозирования количество клетки-носителя и вируса можно вводить в виде однократного введения или многократно в течение цикла введения. Следовательно, способы, представленные в настоящем документе, могут включать однократное введение комбинации клеточного носителя/вируса субъекту или многократное введение комбинации клеточного носителя/вируса субъекту. В некоторых примерах однократного введения достаточно для доставки и закрепления вируса в опухоли, где вирус может пролиферировать и может вызывать или усиливать противоопухолевый ответ у субъекта; такие способы не требуют дополнительных введений комбинации клетки-носителя/вируса для того, чтобы вызвать или усилить противоопухолевый ответ у субъекта, который может приводить, *например*, к ингибированию роста опухоли, ингибированию роста или образования метастазов, снижению размер опухоли, устранение опухоли или метастазов, ингибирование или предотвращение рецидива неопластического заболевания или образования новой опухоли или другие терапевтические эффекты рака.

В других примерах комбинацию клеточного носителя/вируса можно вводить в разных случаях, обычно с интервалом не менее одного дня. Например, комбинацию клетка-носитель/вирус можно вводить два раза, три раза, четыре раза, пять раз или шесть раз или более, в течение одного дня или более, двух дней или более, одной недели или более, или одного месяца или более. больше времени между администрациями. Раздельное введение может увеличить вероятность доставки вируса к опухоли или метастазу, если предыдущее введение оказалось неэффективным для доставки вируса к опухоли или метастазу. Раздельное введение может увеличивать участки опухоли или метастазов, где может происходить пролиферация вируса, или может иным образом увеличивать титр вируса, накопленного в опухоли, что может увеличивать масштаб высвобождения антигенов или других соединений из опухоли при выявлении или усилении вируса хозяина. противоопухолевый иммунный ответ, а также может, необязательно, увеличивать уровень лизиса опухоли на основе вируса или гибели опухолевых клеток. Раздельное введение вируса может дополнительно продлить иммунный ответ субъекта против вирусных антигенов, что может продлить иммунный

ответ хозяина на опухоли или метастазы, в которых накопились вирусы, и может увеличить вероятность возникновения у хозяина противоопухолевого иммунного ответа.

Когда выполняются отдельные введения, каждое введение может представлять собой дозу, которая является такой же или отличной от других дозированных доз для введения. В одном примере все вводимые дозы одинаковы. В других примерах первая доза может быть большей дозой, чем одна или несколько последующих доз, *например*, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз больше, чем последующие количества доз. В одном примере способа раздельного введения, в котором первая доза больше, чем одна или несколько последующих доз, все последующие дозировки могут быть такими же или меньшими по сравнению с первым введением.

Отдельные введения могут включать любое количество из двух или более введений, включая два, три, четыре, пять или шесть введений. Специалист в данной области может легко определить количество введений для выполнения или желательность выполнения одного или нескольких дополнительных введений в соответствии со способами, известными в данной области техники для мониторинга терапевтических методов и других способов мониторинга, представленных в настоящем документе. Соответственно, способы, представленные в настоящем документе, включают способы предоставления субъекту одного или нескольких введений комбинации клетка-носитель/вирус, где количество введений может быть определено путем мониторинга субъекта и, на основе результатов мониторинга, определения того, является ли или не предоставлять одно или несколько дополнительных администраций. Решение о том, следует ли проводить одно или несколько дополнительных введений, может быть основано на различных результатах мониторинга, включая, помимо прочего, указание на рост опухоли или ингибирование роста опухоли, появление новых метастазов или ингибирование метастазов, у субъекта титр антивирусных антител, титр противоопухолевых антител субъекта, общее состояние здоровья субъекта, вес субъекта, присутствие вируса только в опухоли и/или метастазах и присутствие вируса в нормальных тканях или органах.

Период времени между администрациями может быть любым из множества периодов времени. Период времени между введениями может зависеть от любого из множества факторов, включая этапы мониторинга, как описано в отношении количества введений, периода времени для субъекта, у которого развивается иммунный ответ, периода времени для субъекта, очистить вирус от нормальной ткани или период времени для распространения вируса в опухоли или метастазах. В одном примере период времени

может быть функцией периода времени, в течение которого у субъекта развивается иммунный ответ; например, период времени может быть больше периода времени, в течение которого у субъекта возникает иммунный ответ, *например*, более примерно одной недели, более примерно десяти дней, более примерно двух недель или более примерно месяца; в другом примере период времени может быть меньше периода времени, в течение которого у субъекта возникает иммунный ответ, *например* менее примерно одной недели, менее примерно десяти дней, менее примерно двух недель или менее примерно месяца. В другом примере период времени может быть функцией периода времени, в течение которого субъект очищает нормальную ткань от вируса; *например*, период времени может быть больше, чем период времени, в течение которого субъект очищает нормальную ткань от вируса, *например*, более одного дня, более двух дней, более трех дней, более пяти дней, или больше, чем около недели. В другом примере период времени может быть функцией периода времени для пролиферации вируса в опухоли или метастазе; *например*, период времени может быть больше, чем время появления детектируемого сигнала в опухоли или метастазе после введения вируса, экспрессирующего детектируемый маркер, *например*, около 3 дней, около 5 дней, около недели, около десяти дней, около двух недель или около месяца.

Например, некоторое количество комбинации клетка-носитель/вирус вводят два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или семь раз в течение цикла введения. Количество вируса можно вводить в первый день цикла, первый и второй день цикла, каждый из первых трех последовательных дней цикла, каждый из первых четырех последовательных дней цикла, каждый из первых пяти последовательных дней цикла, каждый из первых шести последовательных дней цикла или каждый из первых семи последовательных дней цикла. Обычно цикл приема составляет 7 дней, 14 дней, 21 день или 28 дней. В зависимости от реакции или прогноза пациента цикл введения повторяют в течение нескольких месяцев или лет.

Как правило, подходящие максимальные уровни доз или режимы дозирования клеток-носителей/вирусов - это уровни, которые не являются токсичными для хозяина, уровни, которые не вызывают спленоmegалию в 3 раза или более, уровни, которые не вызывают вирусных колоний или бляшек в нормальных тканях или органы примерно через 1 день, примерно через 3 дня или примерно через 7 дней.

Е. Способы лечения и контроль в координации с лечением

В настоящем документе представлены способы лечения путем введения онколитического вируса в комбинации с клеточным носителем, как предусмотрено в настоящем документе, для облегчения доставки вируса для лечения субъекта,

страдающего пролиферативным или воспалительным заболеванием или состоянием. В частности, это состояние связано с иммунопривилегированными клетками или тканями. Заболевание или состояние, связанное с иммунопривилегированными клетками или тканями, включает, *например*, пролиферативные нарушения или состояния, включая лечение (такое как ингибирование) раковых клеток, новообразований, опухолей, метастазов, раковых стволовых клеток и других иммунопривилегированных клеток или тканей, таких как раны и раненые или воспаленные ткани. В конкретных примерах таких способов, комбинации, представленные в настоящем документе, вводят путем внутривенного введения для системной доставки. В других примерах предлагаемые в настоящем документе комбинации вводят внутриопухолевой инъекцией. В вариантах реализации изобретения субъект болен раком. Любой из представленных в настоящем документе клеточных носителей может использоваться для обеспечения виротерапии нуждающимся в этом субъектам, включая носители сенсibilизированных клеток, носители защищенных клеток, носители сконструированных клеток и носители согласованных клеток, которые могут включать носители сенсibilизированных/сконструированных клеток, которые дополнительно подвергаются скринингу путем анализа сопоставления, представленного в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации способов, представленных в настоящем документе, субъект, помимо лечения комбинацией клеточного носителя и вируса, дополнительно лечат отдельной композицией, содержащей защищенный клеточный носитель, *например*, предварительно обработанный IFN γ , для обеспечения пролонгированного действия, выживаемости и/или местной иммуносупрессии. Отдельную композицию, содержащую защищенный клеточный носитель, можно вводить одновременно с комбинацией клеточный носитель/вирус или можно вводить от 10 часов до 3 или более дней до или после введения комбинации. В некоторых вариантах реализации защищенный клеточный носитель вводят за 24 часа до или через 24 часа после введения комбинации.

Комбинации, представленные в настоящем документе, можно вводить одной инъекцией, несколькими инъекциями или непрерывно. Например, композиции можно вводить путем медленной инфузии, включая использование внутривенного насоса, шприцевого насоса, внутривенного капельного введения или медленной инъекции. Например, непрерывное введение композиций может происходить в течение от нескольких минут до часов, например от 1 минуты до 1 часа или примерно от 1 минуты до 1 часа, например от 20 до 60 минут.

Виды рака, поддающиеся лечению и способам обнаружения, описанным в настоящем документе, также включают метастазирующие раки. Специалистам в данной области понятно, что метастазирование - это распространение клеток от первичной опухоли к несмежному участку, обычно через кровоток или лимфатические сосуды, что приводит к вторичному росту опухоли. Примеры рака, предполагаемого для лечения, включают, но не ограничиваются ими, меланому, включая хориоидальную и кожную меланому; рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак легких, рак головы, рак шеи, рак груди, рак поджелудочной железы, рак десен, рак языка, рак простаты, рак почек, рак костей, рак яичек, рак яичников, рак шейки матки, желудочно-кишечной лимфомы, рак мозга, рак толстой кишки; гепатокарцинома; ретинобластома; мезотелиома; астроцитомы; глиобластома; нейробластома; и любые другие опухоли или новообразования с метастазами или с риском метастазирования.

Субъектом представленных в настоящем документе способов может быть любой субъект, такой как животное или растение, включая млекопитающие или виды птиц. Например, животное-субъект может быть человеком или животным, не являющимся человеком, включая, но не ограничиваясь ими, домашних и сельскохозяйственных животных, таких как свинья, корова, коза, овца, лошадь, кошка или собака. В конкретных примерах животным-субъектом является человек.

Предусмотренные в настоящем документе способы могут дополнительно включать один или несколько этапов мониторинга субъекта, мониторинга опухоли и/или мониторинга вируса, вводимого субъекту. Любой из множества этапов мониторинга может быть включен в способы, представленные в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь, мониторинг размера опухоли, мониторинг титра анти- (опухолевого антигена) антитела, мониторинг наличия и/или размера метастазов, мониторинг лимфатических узлов субъекта, мониторинг веса субъекта или других показателей здоровья, включая маркеры крови или мочи, мониторинг титра анти- (вирусного антигена) антитела, мониторинг вирусной экспрессии детектируемого генного продукта и непосредственный мониторинг титра вируса в опухоли, ткани или органе субъекта.

Целью мониторинга может быть оценка состояния здоровья субъекта или прогресса терапевтического лечения субъекта, или определение того, необходимо ли дальнейшее введение того же или другого вируса, или определение того, когда или следует ли вводить соединение субъекту, если соединение может действовать, увеличивая эффективность терапевтического метода, или соединение может действовать, уменьшая патогенность вируса, вводимого субъекту.

Размер опухоли и/или метастазов можно контролировать с помощью любого из множества методов, известных в данной области, включая методы внешней оценки или методы томографической или магнитной визуализации, такие как способы обнаружения, описанные в настоящем документе. Кроме того, представленные в настоящем документе способы, *например*, мониторинг экспрессии гена (*например*, экспрессии вирусного гена), можно использовать для мониторинга размера опухоли и/или метастазов.

Охват мониторинга в нескольких временных точках может предоставить информацию об эффективности терапевтических методов, представленных в настоящем документе. Кроме того, мониторинг увеличения или уменьшения размера опухоли или метастазов также может предоставить информацию, касающуюся присутствия (*то есть* обнаружение и/или диагностики) дополнительных опухолей и/или метастазов у субъекта. Мониторинг размера опухоли в течение некоторого времени может предоставить информацию, касательно развития опухолевого заболевания у субъекта, включая эффективность лечения опухолевого заболевания методами, представленными в настоящем документе.

Предусмотренные в настоящем документе способы также могут включать мониторинг титра антител у субъекта, включая антитела, продуцируемые в ответ на введение клеточного носителя, доставляющего вирус. Например, вирусы, вводимые способами, предусмотренными в настоящем документе, могут вызывать иммунный ответ на эндогенные вирусные антигены. Вирусы, вводимые способами, представленными в настоящем документе, также могут вызывать иммунный ответ на экзогенные гены, экспрессируемые вирусом. Вирусы, вводимые способами, представленными в настоящем документе, также могут вызывать иммунный ответ на опухолевые антигены. Мониторинг титра антител против вирусных антигенов, экзогенных генов, экспрессируемых вирусом, или опухолевых антигенов можно использовать в методах мониторинга токсичности вируса, мониторинга эффективности методов лечения или мониторинга уровня продукта гена или антител.

В одном из примеров мониторинг титра антител можно использовать для мониторинга токсичности вируса. Титр антител против вируса может изменяться в течение периода времени после введения вируса субъекту, где в некоторые конкретные моменты времени низкий титр анти-(вирусного антигена) антитела может указывать на более высокую токсичность, а в другие моменты времени - на высокий титр анти-(вирусного антигена) антитела может указывать на более высокую токсичность. Вирусы, используемые в способах, представленных в настоящем документе, могут быть

иммуногенными и поэтому могут вызывать иммунный ответ вскоре после введения вируса субъекту.

Как правило, против вируса с низкой токсичностью иммунная система субъекта быстро вызывает сильный ответ, уничтожая вирус из всех нормальных органов или тканей. Таким образом, в некоторых примерах высокий титр антител против вирусных антигенов вскоре после введения вируса субъекту может указывать на низкую токсичность вируса. Напротив, вирус, который не обладает высокой иммуногенностью, может инфицировать организм, не вызывая сильного иммунного ответа, что может привести к более высокой токсичности вируса. Соответственно, в некоторых примерах высокий титр антител против вирусных антигенов вскоре после введения вируса субъекту может указывать на низкую токсичность вируса.

В других примерах мониторинг титра антител можно использовать для мониторинга эффективности методов лечения. В способах, представленных в настоящем документе, титр антител, такой как титр анти- (опухолевого антигена) антитела, может указывать на эффективность терапевтического метода, такого как терапевтический метод лечения неопластического заболевания. Предоставленные в настоящем документе терапевтические методы могут включать в себя вызов или усиление иммунного ответа против опухоли и/или метастазов. Таким образом, отслеживая титр анти- (опухолевого антигена) антитела, можно отслеживать эффективность терапевтического метода в возникновении или усилении иммунного ответа против опухоли и/или метастазов.

Предлагаемые в настоящем документе терапевтические методы также могут включать введение субъекту клеточного носителя, содержащего вирус, который может накапливаться в опухоли и может вызывать или усиливать противовирусный или антиклеточный иммунный ответ. Соответственно, можно отслеживать способность субъекта вызывать иммунный ответ против вирусов или клеточных носителей, накопленных в опухоли или метастазах, что может указывать на то, что иммунная система субъекта вызвала, вероятно, вызовет или способна вызвать противоопухолевый иммунный ответ.

Предоставленные в настоящем документе способы также могут включать в себя способы мониторинга здоровья субъекта. Некоторые из представленных в настоящем документе способов являются терапевтическими методами, включая методы лечения неопластических заболеваний. Мониторинг здоровья субъекта может использоваться для определения эффективности терапевтического метода, как известно в данной области. Предоставленные в настоящем документе способы также могут включать стадию введения субъекту комбинации клеточного носителя, как предусмотрено в настоящем

документе, и вируса. Мониторинг здоровья субъекта можно использовать для определения патогенности вируса в комбинации при введении субъекту. Может контролироваться любой показатель из множества методов диагностики здоровья для мониторинга заболевания, такого как неопластическое заболевание, инфекционное заболевание или заболевание, связанное с иммунитетом. Например, вес, кровяное давление, пульс, дыхание, цвет, температура или другое наблюдаемое состояние субъекта могут указывать на его здоровье. Кроме того, наличие, отсутствие или уровень одного или нескольких компонентов в образце от субъекта может указывать на его здоровье. Типичные пробы могут включать образцы крови и мочи, где присутствие или отсутствие или уровень одного или нескольких компонентов может быть определено путем выполнения, *например*, анализа крови или диагностического анализа мочи. Примеры компонентов, указывающих на состояние здоровья субъекта, включают, но не ограничиваются ими, количество лейкоцитов, гематокрит или концентрацию реактивного белка.

Ж. Фармацевтические композиции, комбинации и наборы

В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, комбинации и наборы, содержащие клетки-носители и онколитические вирусы, представленные в настоящем документе. Фармацевтические композиции могут включать сопоставленную клетку-носитель, идентифицированную способами, представленными в настоящем документе, и фармацевтический носитель. Сопоставленные клетки-носители могут включать сенсibilизированные клетки, сконструированные клетки или примированные клетки (*например*, «защищенные» клетки-носители, предварительно обработанные IFN γ), полученные любым из способов, представленных в настоящем документе. Фармацевтические композиции могут включать онколитический вирус, представленный в настоящем документе, и фармацевтический носитель. Комбинации могут включать, *например*, клетку-носитель и онколитический вирус; сопоставленную клетку-носитель и онколитический вирус; сенсibilизированную клетку-носитель и онколитический вирус; сконструированную клетку-носитель и онколитический вирус; любую клетку-носитель, включая сенсibilизированные и сконструированные клетки, онколитический вирус и примированную (защищенную) клетку-носитель; онколитический вирус, примированную (защищенную) клетку-носитель и незащищенную клетку-носитель, сопоставленную или модифицированную, как предусмотрено в настоящем документе. Комбинации могут включать любые клетки-носители, представленные в настоящем документе, онколитический вирус и детектируемое соединение; любая клетка-носитель, онколитический вирус и

терапевтическое соединение; любую клетку-носитель, онколитический вирус и соединение, модулирующее вирусную экспрессию, или любую их комбинацию. Наборы могут включать одну или несколько фармацевтических композиций или комбинаций, представленных в настоящем документе, и один или несколько компонентов, таких как инструкции по применению, устройство для введения фармацевтической композиции или комбинации субъекту, устройство для введения терапевтического или диагностического соединения субъекту или устройство для обнаружения вируса в субъекте.

Клетка-носитель, содержащаяся в фармацевтической композиции, комбинации или наборе, может включать любую клетку-носитель, представленную в настоящем документе. Онколитический вирус, содержащийся в фармацевтической композиции, комбинации или наборе, может включать любой вирус, представленный в настоящем документе.

1. Фармацевтические композиции.

В настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие клетку-носитель, примированную (защищенную) клетку-носитель, сенсibilизированную клетку-носитель, сконструированную клетку-носитель, онколитический вирус или любую клетку-носитель и онколитический вирус, представленные в настоящем документе, и подходящий фармацевтический носитель. Фармацевтически приемлемый носитель включает твердый, полутвердый или жидкий материал, который действует как транспортное средство или среда для вируса. Предлагаемые в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть составлены в различных формах, *например*, в твердой, полутвердой, водной, жидкой, порошковой или лиофилизированной форме. Примеры фармацевтических композиций, содержащие любую клетку-носитель (включая примированные, сенсibilизированные, сконструированные клетки) или онколитический вирус, представленные в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, стерильные растворы для инъекций, стерильные упакованные порошки, глазные капли, таблетки, пилюли, порошки, леденцы, саше, облатка, эликсиры, суспензии, эмульсии, растворы, сиропы, аэрозоли (в твердой или жидкой среде), мази, мягкие и твердые желатиновые капсулы и суппозитории.

Примеры подходящих фармацевтических носителей известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, воду, буферы, физиологические растворы, фосфатно-солевые буферные растворы, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы, спирты, гуммиарабик, растительные масла, бензиловые спирты, желатин, глицерин, углеводы, такие как лактоза, сахароза, декстроза, амилоза или

крахмал, сорбит, маннит, стеарат магния, тальк, кремниевая кислота, вязкий парафин, парфюмерное масло, моноглицериды и диглицериды жирных кислот, сложные эфиры пентаэритрита кислот жирных кислот, гидроксиметилцеллюлоза, и порошки, в том числе. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, могут содержать другие добавки, включая, *например*, антиоксиданты, консерванты, анальгетики, связующие, разрыхлители, красители, разбавители, эксципиенты, наполнители, глиданты, солюбилизаторы, стабилизаторы, тонизирующие вещества, носители, агенты вязкости, ароматизаторы, подсластители, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, эмульгаторы и суспендирующие агенты, такие как гуммиарабик, агар, альгиновая кислота, альгинат натрия, бентонит, карбомер, каррагинан, карбоксиметилцеллюлоза, целлюлоза, холестерин, желатин, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, октоксинал 9, олеиловый спирт, повидон, моностеарат пропиленгликоля, лаурилсульфат натрия, сложные эфиры сорбитана, стеариловый спирт, трагакант, ксантановая камедь и их производные, растворители и различные ингредиенты, такие как, но не ограничиваясь ими, кристаллическая целлюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, лимонная кислота, декстрин, жидкая глюкоза, молочная кислота, лактоза, хлорид магния, метафосфат калия, крахмал и другие. Такие носители и/или добавки могут быть составлены обычными способами и могут вводиться субъекту в подходящей дозе. Стабилизирующие агенты, такие как липиды, ингибиторы нуклеаз, полимеры и хелатирующие агенты, могут предохранять композиции от разложения в организме. Другие подходящие составы для использования в фармацевтической композиции можно найти, *например*, в *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (2005, Twenty-first edition, Gennaro & Gennaro, eds., Lippencott Williams and Wilkins).

Фармацевтические составы, которые включают представленные в настоящем документе клетку-носитель и/или онколитический вирус, для инъекции или доставки через слизистую, обычно включают водные растворы вируса, предоставленного в подходящем буфере для инъекции или введения через слизистые оболочки, или лиофилизированные формы вируса для восстановления в подходящем буфере для инъекции или введения через слизистую. Такие составы необязательно могут содержать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или добавок, как описано в настоящем документе или известных в данной области. Жидкие композиции для перорального введения обычно включают водные растворы, сиропы с подходящим вкусом, водные или масляные суспензии и ароматизированные эмульсии пищевых масел, таких как кукурузное масло, хлопковое масло, кунжутное масло, кокосовое масло

или арахисовое масло, а также эликсиры и аналогичные фармацевтические средства доставки.

Предлагаемые в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть составлены для обеспечения быстрого, замедленного или отсроченного высвобождения клетки-носителя и/или вируса, как описано в настоящем документе, с использованием процедур, известных в данной области. Для приготовления твердых композиций, таких как таблетки, клетка-носитель и/или вирус, представленные в настоящем документе, смешивают с фармацевтическим носителем с образованием твердой композиции. Необязательно, таблетки или пилюли покрывают оболочкой или смешивают иным образом, чтобы получить лекарственную форму, дающую преимущество пролонгированного действия у субъекта. Например, таблетка или пилюля содержит компонент внутренней дозы и компонент внешней дозы, причем последний находится в форме оболочки, покрывающей первый. Два компонента могут быть разделены, *например*, энтеросолюбильным слоем, который служит для предотвращения расщепления в желудке и позволяет внутреннему компоненту попасть в двенадцатиперстную кишку в целости или задерживать высвобождение. Для таких энтеросолюбильных слоев или покрытий используются различные материалы, включая, *например*, ряд полимерных кислот и смеси полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Композиции для ингаляции или вдыхания включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смесях, а также порошки. Эти жидкие или твердые композиции дополнительно могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты и/или добавки, как описано в настоящем документе или известные в данной области. Такие композиции вводятся, *например*, оральным или назальным респираторным путем для местного или системного эффекта. Композиции в фармацевтически приемлемых растворителях распыляются инертными газами. Распыленные растворы вдыхаются, *например*, непосредственно из распылительного устройства, из прикрепленной маски для лица или из дыхательного аппарата с периодическим положительным давлением. Композиции в виде раствора, суспензии или порошка вводятся перорально или назально, *например*, из устройств, которые доставляют состав соответствующим образом, *например*, с помощью ингалятора.

Предлагаемые в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть составлены для трансдермальной доставки через устройства для трансдермальной доставки («пластыри»). Такие трансдермальные пластыри используются для

обеспечения непрерывной или прерывистой инфузии вируса, представленного в настоящем документе. Конструирование и использование трансдермальных пластырей для доставки фармацевтических агентов осуществляют способами, известными в данной области (см., *например*, патент США № 5,023,252). Такие пластыри сконструированы для непрерывной, пульсирующей доставки или доставки по требованию клетки-носителя и/или вируса, представленных в настоящем документе.

Коллоидные дисперсионные системы, которые можно использовать для доставки вирусов, включают комплексы макромолекул, нанокapsулы, микросферы, шарики и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде (смешанные), мицеллы, липосомы и липоплексы. Типичной коллоидной системой является липосома. Органоспецифичные или клеточно-специфические липосомы можно использовать для достижения доставки только в желаемую ткань. Нацеливание липосом может быть выполнено специалистом в данной области, применяя общеизвестные методы. Это нацеливание включает пассивное нацеливание (использование естественной тенденции липосом к распределению в клетках ретикулоэндотелиальной системы (RES) в органах, содержащих синусоидальные капилляры) или активное нацеливание (*например*, путем связывания липосомы с определенным лигандом, *например*, антителом, рецептором, сахаром, гликолипидом и белком методами, известными специалистам в данной области). Моноклональные антитела можно использовать для нацеливания липосом на определенные ткани, например опухолевые ткани, через специфические лиганды поверхности клетки.

2. Комбинации

Предусмотрены комбинации клетки-носителя и онколитического вируса; сенсibilизированной клетки-носителя и онколитического вируса; сконструированной клетки-носителя и онколитического вируса; или любой клетки-носителя, включая сенсibilизированные и сконструированные клетки, онколитический вирус и примированную (защищенную) клетку-носитель (*например*, клетку-носитель, предварительно обработанную IFN γ), причем комбинация дополнительно может включать незащищенную клетку-носитель, сопоставленную или модифицированную в соответствии с методами, представленными в настоящем документе. Комбинация может включать третий или четвертый агент, такой как второй вирус или другой терапевтический или диагностический агент. Комбинация может включать представленный в настоящем документе вирус с одним или несколькими дополнительными вирусами, включая, *например*, один или несколько дополнительных диагностических или терапевтических вирусов. Комбинация может содержать

фармацевтические композиции, содержащие вирус, представленный в настоящем документе; или клетку-носитель (включая сенсibilизированные и сконструированные клетки) и вирус; или клетку-носитель (включая сенсibilизированные и сконструированные клетки), вирус и примированную клетку, как описано в настоящем документе. Комбинация также может включать любой реагент для лечения или диагностики в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, такой как, *например*, противовирусный или химиотерапевтический агент. Комбинации также могут содержать соединение, используемое для модуляции экспрессии генов эндогенных или гетерологичных генов, кодируемых вирусом.

Предлагаемые в настоящем документе комбинации могут содержать клетку-носитель, вирус и терапевтическое соединение. Терапевтические соединения для представленных в настоящем документе композиций могут быть, *например*, противораковыми или химиотерапевтическими соединениями. Примеры терапевтических соединений включают, *например*, цитокины, факторы роста, фотосенсибилизирующие агенты, радионуклиды, токсины, молекулы siRNA, ферментные/пролекарственные пары препаратов, антиметаболиты, модуляторы передачи сигналов, противораковые антибиотики, противораковые антитела, ингибиторы ангиогенеза, химиотерапевтические соединения, антиметастатические соединения или их комбинация.

Клетки-носители и вирусы, представленные в настоящем документе, могут быть объединены с противораковым соединением, таким как координационный комплекс платины. Примеры координационных комплексов платины включают, *например*, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, DWA2114R, NK121, IS3 295 и 254-S. Типичные химиотерапевтические агенты также включают, но не ограничиваются ими, метотрексат, винкристин, адриамицин, не содержащие сахара хлорэтилнитрозомочевин, 5-фторурацил, митомицин С, блеомицин, доксорубин, дакарбазин, Taxol® , фрагилин, мегламин GLA, валрубицин, кармустаин и полиферпосан, MMI270, BAY 12-9566, , ингибитор фарнезилтрансферазы RAS, ингибитор фарнезилтрансферазы, MMP, MTA/LY231514, лометрексол/LY264618, Glamolec, CI-994, TNP-470, Гикамтин/Топотекан, PKC412, Вальсподар/PSC833, Novantrone®/Митроксантрон, Метарет/Сурамин, BB-94/Батимастат, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Мармистат, BB2516/Мармистат, CDP 845, D2163, PD183805, DX895lf, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/Валрубицин, Metastron®/производное стронция, Темодал/Темозоломид, Ютаксан/Паклитаксел, Taxol®/Паклитаксел,

Кселоад/Капецитабин, Фуртулон/Доксифлуридин, Циклопакс/пероральный паклитаксел, пероральный Таксоид, SPU-077/Цисплатин, HMR1275/Флавопиридол, CP-358 (774)/EGFR, CP-609(754)/ингибитор RAS онкогена, BMS-182751/ пероральная платина, UFT™(Тегафур/Урацил), Ergamisol®/Левамизол, Энилурацил/776C85/5FU усилитель, Кампто/Левамизол, Camptosar®/Иринотекан, Тумодекс/Ралитрексед, Leustatin®/Кладрибин, Doxil®/липосомальный доксорубицин, Целикс/липосомальный доксорубицин, Fludara®/Флударабин, Фармарубицин/Эпирубицин, DepoCyt®, ZD1839, LU 79553/Бис-нафталимид, LU103793/Доластатин, Gemzar®/Гемцитабин, ZD0473/Anormed®, YM 116, семена Iodin, ингибиторы CDK4 и CDK2, ингибиторы PARP, D4809/Дексифозамид, Ифес/Mesnex®/Ифосамид, Vumon®/Тенипозид, Paraplatin®/Карбоплатин, Платинол/цисплатин, VePesid/Eposin/Etopophos/этопозит, ZD9331, Taxotere®/Доцетаксел, пролекарство арабинозида гуанина, аналог Таксана, нитрозомочевины, алкилирующие агенты, такие как мелфелан и циклофосфамид, аминоксантидин, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, хлоромбуцил, цитарабин HCl, Дактиномицин, Даунорубицин HCl, эстрамустин фосфат натрия, Этопозид (VP16-213), Флоксуридин, Фторурацил (5-FU), Флутамид, Гидроксимочевина (гидроксикарбамид), Ифосфамид, Интерферон альфа-2a, альфа 2b, ацетат Лейпролида (аналог LHRH-высвобождающего фактора), Ломустин (CCNU), Мехлорэтамин HCl (азотистый иприт), Меркаптопурин, Месна, Митотан (o.p'-DDD), Митоксантрон HCl, Октреотид, Пликамицин, Прокарбазин HCl, Стрептозоцин, цитрат Тамоксифена, Тиогуанин, Тиотепа, сульфат Винбластина, Амсакрин (m-AMSA), Азациитидин, Эритропоэтин, Гексаметилмеламин (НММ), Интерлейкин 2, Митогуазон (метил-GAG; метил глиоксаль бис-гуанилгидразон; MGBG), Пентостатин (2'-деоксикоформицин), Семустин (метил-CCNU), Тенипозид (VM-26) и сульфат Виндесина. Дополнительные примеры терапевтических соединений для использования в фармацевтических композициях и комбинациях, представленных в настоящем документе, можно найти в другом месте в настоящем документе (*например*, цитокины, факторы роста, фотосенсибилизирующие агенты, радионуклиды, токсины, молекул миРНК, пары ферментных/пролекарственных препаратов, анти- метаболиты, модуляторы передачи сигналов, противораковые антибиотики, противораковые антитела, ингибиторы ангиогенеза и химиотерапевтические соединения).

В некоторых случаях комбинация может включать дополнительные терапевтические соединения, такие как, *например*, субстраты ферментов, кодируемые и экспрессируемые вирусом, или другие терапевтические соединения, представленные в настоящем документе или известные в данной области, как действующие совместно с

вирусом. Например, вирус может экспрессировать фермент, который превращает пролекарство в активное химиотерапевтическое лекарство для уничтожения раковой клетки. Следовательно, комбинации, представленные в настоящем документе, могут содержать терапевтическое соединение, такое как пролекарство. Типичная комбинация вирус/терапевтическое соединение может включать вирус, кодирующий тимидинкиназу вируса простого герпеса с пролекарством ганцикловир. Дополнительные примерные пары фермент/пролекарство для использования в предоставленных комбинациях включают, но не ограничиваются ими, тимидинкиназа осповакцины/ганцикловир, цитозиндезаминаза/5-фторурацил, пуриннуклеозидфосфоорилаза/6-метилпуриндезоксирибозид, бета-лактамаза/цефалоспорин -доксорубицин, карбоксипептидаза G2/4 - [(2-хлорэтил) (2-мезилоксиэтил) amino] бензол-L-глутаминовая кислота, цитохром P450/ацетаминофен, пероксидаза хрена/индол-3-уксусная кислота, нитроредуктаза/CB1954, кроличья карбоксилэстераза / 7-этил-10- [4-(1-пиперидино) -1-пиперидино] карбонилоксиамптитотетин (CPT-11), грибная тирозиназа/бис- (2-хлорэтил) amino-4-гидроксифениламинометанон 28, бета-галактозидаза/1-хлорметил- 5-гидрокси-1,2-дигидро-3H-бенз [e] индол, бета-глюкуронидаза/эпирубин-глюкуронид, тимидинфосфоорилаза/5'-дезоксид-5-фторуридин, дезоксицитидинкиназа/цитозинарабинозид, бета-лактамаза и линамеараза/линамарин. Дополнительные типичные пролекарства для использования в комбинациях также можно найти в другом месте настоящего документа. Любая из множества известных комбинаций, представленных в настоящем документе или иным образом известных в данной области, может быть включена в комбинации, представленные в настоящем документе.

В некоторых примерах комбинация может включать соединения, которые могут убивать или ингибировать рост или токсичность вирусов. Такие соединения можно использовать для облегчения одного или нескольких неблагоприятных побочных эффектов, которые могут возникнуть в результате вирусной инфекции (см., например, патентную публикацию США № US 2009-016228-A1). Комбинации, представленные в настоящем документе, могут содержать антибиотики, противогрибковые, противопаразитарные или противовирусные соединения для лечения инфекций. В некоторых примерах противовирусное соединение представляет собой химиотерапевтическое средство, которое ингибирует рост вирусов или токсичность.

Примеры антибиотиков, которые могут быть включены в комбинацию с клеткой-носителем и вирусом, предусмотренными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, цефтазидим, цефепим, имипенем, аминогликозид, ванкомицин и

антипсевдомональный β -лактам. Примеры противогрибковых агентов, которые могут быть включены в комбинацию с клеткой-носителем и вирусом, предусмотренными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, амфотерицин В, дапсон, флуконазол, флуцитозин, гризеофульвин, итраконазол, кетоконазол, миконазол, клотримазол, нистатин и их комбинации. Примеры противовирусных агентов, которые могут быть включены в комбинацию с клеткой-носителем и вирусом, предусмотренными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, цидофовир, алкоксиалкиловые эфиры цидофовира (CDV), циклический CDV, (S) -9- (3-гидрокси -2-фосфонилметоксипропил) аденин, 5- (диметоксиметил) -2'-дезоксинуридин, изатин-бета-тиосемикарбазон, N-метанокарбатимидин, бривудин, 7-дезазанепланоцин А, ST-246, Gleeves, 2'-бета-фтор-2',3'-дидезоксиаденозин, индинавир, нелфинавир, ритонавир, невирапин, AZT, ddI, ddC и их комбинации. Обычно комбинации с противовирусным агентом содержат противовирусный агент, который, как известно, эффективен против вируса комбинации. Например, комбинации могут содержать вирус осповакцины с противовирусным соединением, таким как цидофовир, алкоксиалкиловые эфиры цидофовира, ганцикловира, ацикловира, ST-246, Gleeves и их производных.

В некоторых примерах комбинация может включать детектируемое соединение. Детектируемое соединение может включать, *например*, лиганд, субстрат или другое соединение, которое может взаимодействовать и/или специфически связываться с белком или РНК, кодируемыми и экспрессируемыми вирусом или клеткой-носителем, и обеспечивать излучение сигналов, которые обнаруживаются томографическими, спектроскопическими, магнитно-резонансными или другими известными методами. В некоторых примерах белок или РНК представляет собой экзогенный белок или РНК. В некоторых примерах белок или РНК, экспрессируемые вирусом или клеткой-носителем, модифицирует детектируемое соединение, где модифицированное соединение излучает сигнал. Примеры детектируемых соединений могут быть или могут содержать агент визуализации, такой как агент магнитного резонанса, ультразвука или томографического изображения, включая радионуклид. Детектируемое соединение может включать любое из множества соединений, как указано в настоящем документе в другом месте или иным образом известно в данной области. Иллюстративные белки, которые могут быть экспрессированы вирусом или клеткой-носителем, и комбинации детектируемых соединений, используемые для обнаружения, включают, но не ограничиваются ими, люциферазу и люциферин, β -галактозидазу и (4,7,10-три (уксусную кислоту) -1- (2- β -галактопиранозилэтокси) -1,4,7,10-тетраазациклододекан) гадолиний (Egad) и другие комбинации, известные в данной области.

В некоторых примерах комбинация может включать соединение, модулирующее экспрессию гена и регулирующее экспрессию одного или нескольких генов, кодируемых вирусом или клеткой-носителем. Соединения, которые модулируют экспрессию генов, известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, активаторы транскрипции, индукторы, супрессоры транскрипции, ингибиторы РНК-полимеразы и РНК-связывающие соединения, такие как миРНК или рибозимы. Любое из множества соединений, модулирующих экспрессию генов, известных в данной области, может быть включено в комбинации, представленные в настоящем документе. Обычно соединение, модулирующее экспрессию гена, включенное с вирусом в комбинациях, представленных в настоящем документе, будет соединением, которое может связываться, ингибировать или реагировать с одним или несколькими соединениями, активными в экспрессии генов, такими как фактор транскрипции или РНК вируса или клетки-носителя комбинации. Примером комбинации вируса или клетки-носителя с модулятором экспрессии может быть вирус или клетка-носитель, кодирующая(-ий) комплекс химерного фактора транскрипции, состоящий из мутантного человеческого рецептора прогестерона, слитого с дрожжевым ДНК-связывающим доменом GAL4 и доменом активации белка VP16 вируса простого герпеса, а также синтетический промотор, содержащий серию последовательностей распознавания GAL4 выше TATA-бокса главного позднего промотора *E1B* аденовируса, где модулятором экспрессии может быть соединение мифепристон (RU486) (см., например, Yu et al. (2002) *Mol Genet Genomics* 268: 169-178). Множество других комбинаций вируса или клетки-носителя с модулятором экспрессии, известными в данной области техники, также могут быть включены в комбинации, представленные в настоящем документе.

В некоторых примерах комбинация может содержать наночастицы. Наночастицы могут быть сконструированы так, чтобы они несли один или несколько терапевтических агентов, предусмотренных в настоящем документе. Кроме того, наночастицы могут быть разработаны для переноса молекулы, которая нацеливает наночастицу к опухолевым клеткам. В одном неограничивающем примере наночастицы могут быть покрыты радионуклидом и, дополнительно, антителом, иммунореактивным с антигеном, ассоциированным с опухолью.

В некоторых примерах комбинация может содержать один или несколько дополнительных терапевтических и/или диагностических вирусов или других терапевтических и/или диагностических микроорганизмов (например, терапевтических и/или диагностических бактерий) для диагностики или лечения. Примеры терапевтических и/или диагностических вирусов известны в данной области и

включают, но не ограничиваются ими, терапевтические и/или диагностические поксвирусы, герпесвирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и реовирусы. Примеры онколитических вирусов описаны в настоящем документе выше.

3. Комплекты

Клетки-носители, вирусы, фармацевтические композиции или комбинации, представленные в настоящем документе, могут быть упакованы в виде наборов. Наборы могут необязательно включать один или несколько компонентов, таких как инструкции по применению, устройства и дополнительные реагенты, а также компоненты, такие как пробирки, контейнеры и шприцы, для практического применения методов. Примеры наборов могут включать клетку-носитель и вирус, представленные в настоящем документе, или защищенную клетку-носитель, незащищенную клетку-носитель и вирус; и может дополнительно включать инструкции по применению, устройство для обнаружения клетки-носителя и/или вируса у субъекта, устройство для введения субъекту клетки-носителя и вируса или устройство для введения субъекту дополнительного агента или соединения.

В одном из примеров набор может содержать инструкции. Инструкции обычно включают в себя осязаемое выражение, описывающее клетку-носитель и вирус и, дополнительно, другие компоненты, включенные в набор, и способы введения, включая методы определения надлежащего состояния субъекта, правильного количества дозировки и правильного метода введения клетки-носителя и вируса. Инструкции также могут включать в себя руководство по наблюдению за субъектом в течение всего времени лечения.

В другом примере набор может содержать устройство для обнаружения клетки-носителя и/или вируса у субъекта. Устройства для обнаружения клетки-носителя и/или вируса у субъекта могут включать устройство визуализации при слабом освещении для обнаружения света, *например*, испускаемого люциферазой или флуоресцентным белком, такого как зеленый или красный флуоресцентный белок, измерительное устройство магнитного резонанса, такие как устройство МРТ или ЯМР, томографический сканер, такой как ПЭТ, КТ, КАТ, ОФЭКТ или другой связанный сканер, ультразвуковое устройство или другое устройство, которое можно использовать для обнаружения белка, экспрессируемого клеткой-носителем и/или вирусом внутри субъекта. Обычно устройство набора будет способно обнаруживать один или несколько белков, экспрессируемых клеткой-носителем и/или вирусом набора. Любой из множества наборов, содержащих клетки-носители, вирусы и устройства для обнаружения, может быть включен в наборы, представленные в настоящем документе, *например*, клетка-

носитель или вирус, экспрессирующие люциферазу, и формирователь изображения при слабом освещении, или клетка-носитель, или вирус, экспрессирующий флуоресцентный белок, такой как зеленый или красный флуоресцентный белок и формирователь изображений при слабом освещении.

Предлагаемые в настоящем документе наборы также могут включать устройство для введения субъекту клетки-носителя и вируса. Любое из множества устройств, известных в данной области для введения лекарств, фармацевтических композиций и вакцин, может быть включено в наборы, представленные в настоящем документе. Примеры устройств включают, но не ограничиваются ими, иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенного введения, катетер, безыгольное инъекционное устройство, ингалятор и дозатор жидкости, такой как пипетка. Например, комбинация клетки-носителя и вируса для системной доставки, *например*, путем внутривенной инъекции, может быть включена в набор с иглой для подкожных инъекций и шприцем. Обычно устройство для введения клетки-носителя и вируса набора будет совместимо с клеткой-носителем и вирусом набора; например, безыгольное инъекционное устройство, такое как инъекционное устройство высокого давления, включено в наборы не поврежденным, и как правило, поврежденные инъекцией устройства не входят в наборы.

Предлагаемые в настоящем документе наборы также могут включать устройство для введения субъекту дополнительного агента или соединения. Любое из множества устройств, известных в данной области для введения лекарств субъекту, может быть включено в наборы, предоставленные в настоящем документе. Примеры устройств включают, но не ограничиваются ими, иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенного введения, катетер, безыгольное инъекционное устройство, ингалятор и дозатор жидкости, такой как пипетка. Обычно устройство для введения соединения набора будет совместимо с желаемым способом введения соединения. Например, соединение, которое должно быть доставлено системно или подкожно, может быть включено в набор с иглой для подкожных инъекций и шприцем.

Предоставленные в настоящем документе комплекты также могут включать в себя любое устройство для приложения энергии к субъекту, *например*, электромагнитной энергии. Такие устройства включают, помимо прочего, лазер, светоизлучающие диоды, люминесцентные лампы, дихроичные лампы и световой короб. Наборы также могут включать устройства для воздействия на субъект внутренней энергии, такие как эндоскоп или волоконно-оптический катетер.

3. Дополнительные методы лечения с помощью клеточного носителя и вируса

Виротерапия с использованием представленных в настоящем документе комбинаций, композиций или наборов, содержащих онколитический вирус и клеточный носитель для доставки онколитического вируса субъекту, нуждающемуся в виротерапии, как предусмотрено настоящим изобретением, может использоваться отдельно или в дополнительной комбинации с другими видами терапии или лечения. Комбинации или композиции, представленные в настоящем документе, могут быть дополнительно составлены вместе с или вводиться совместно с другими терапевтическими или фармакологическими агентами или методами лечения, такими как процедуры, либо до, либо с перерывами, либо после них. Например, такие агенты включают, помимо прочего, другие биопрепараты, противораковые агенты, низкомолекулярные соединения, диспергирующие агенты, анестетики, ингибиторы контрольных точек, вазоконстрикторы, хирургическое вмешательство, облучение, химиотерапевтические агенты, биологические агенты, полипептиды, антитела, пептиды, малые молекулы, векторы для генной терапии, вирусы и ДНК, и их комбинации. Такие агенты также могут включать один или несколько агентов для улучшения, уменьшения или предотвращения побочных эффектов. В некоторых случаях комбинированная терапия может использоваться в сочетании с одним или несколькими видами лечения рака, которые удаляют первичную опухоль или которые подавляют иммунитет субъекта до лечения. Например, дополнительная химиотерапия или лучевая терапия могут использоваться в дополнение к комбинированной терапии, представленной в настоящем документе. Такая дополнительная терапия может ослабить иммунную систему пациента. В других примерах может не потребоваться хирургическое удаление и/или терапия, ослабляющая иммунную систему. Примеры других способов, которые могут быть объединены в настоящем документе, включают введение соединения, снижающего скорость пролиферации опухолевых или неопластических клеток без ослабления иммунной системы (*например*, путем введения соединений, подавляющих опухоль, или путем введения соединений, специфичных для опухолевых клеток), или введение ингибирующего ангиогенез соединения.

Препарат второго агента или агентов, или препарат для лечения, или способ лечения можно применять сразу или его можно разделить на ряд меньших порций, которые следует применять через определенные промежутки времени. Выбранный агент/лечебные препараты можно вводить в одной или нескольких дозах в течение периода лечения, *например*, в течение нескольких часов, дней, недель или месяцев. В некоторых случаях полезно постоянное введение. Понятно, что точная дозировка и курс

введения зависят от показаний и переносимости пациентом. Как правило, режимы дозирования вторых агентов/способов лечения в настоящем документе известны специалисту в данной области техники.

Например, комбинированная терапия, представленная в настоящем документе, может дополнительно использоваться в комбинации с одним или несколькими из следующих, включая, но не ограничиваясь ими, агонисты иммунной костимуляции (*например*, семейство B7 (CD28, ICOS); семейство TNFR (4-1BB, OX40, GITR, CD40, CD30, CD27); LIGHT, LT α); BiTE; CAR-T-клетки и TCR трансгенные Т-клетки, нацеленные на опухолеспецифические антигены; ингибиторы контрольных точек (цели включают PD-1, PD-2, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, IDO 1 и 2, CTNNB1 (β -катенин), SIRP α , VISTA, LIGHT, HVEM, LAG3, TIM3, TIGIT, Галектин-9, KIR, GITR, TIM1, TIM4, CEACAM1, CD27, CD40/CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD112, CD137 (4-1BB), CD155, CD160, CD200, CD226, CD244 (2B4), CD272 (BTLA), B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, ICOS, A2aR, A2bR, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B, HLA-G, ILT-2/4 и OX40/OX40L, MDR1, аргиназа1, iNOs, IL-10, TGF- β , pGE2, STAT3, VEGF, KSP, HER2, Ras, EZH2, NIPP1, PP1, TAK1 и PLK1a); и химиотерапевтические соединения и антитела.

Иллюстративные химиотерапевтические соединения и антитела для введения в дополнение к виротерапии, предусмотренной в настоящем документе, могут включать цитокины, хемокины, факторы роста, фотосенсибилизирующие агенты, токсины, противораковые антибиотики, химиотерапевтические соединения, радионуклиды, ингибиторы ангиогенеза, сигнальные модуляторы, антиметаболиты, противораковые вакцины, противораковые олигопептиды, белки-ингибиторы митоза, антимитотические олигопептиды, противораковые антитела, противораковые антибиотики и иммунотерапевтические агенты.

Примеры противораковых агентов, которые можно вводить после, одновременно или до введения комбинации, описанной в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими:

Ацивирин; Ацикловир; Ацикловир; Ацикловир; Ацикловир; Ацикловир;
Альдефосфаты; Алемтузумаб; Алитретинин (9-цис-ретиноевой кислоты);
Аллопуринол; Альтретамин; Альвоцидиб; Амбазон; Амбомицин;
Аметантрон; Амифостин; Аминоглутетимид; Амсакрин; Анастрозол;
Анаксирон; Анцитабин; Антрамицин; Апазиковон; Аргимеснас;
Триоксид мышьяка; Аспарагиназа; Асперлин; Атримустины; Азацитидины;
Азетепас; Азотомидины; Баноксантрон; Батабулины; Батимастат; BCG Live;
Бенаксибины; Бендамустины; Бензодепас; Бексаротены; Бевацизумаб;

Бикалутаамиды; Биетазерпины; Бирикодары; Бисантрены; Бисантрены;
 Биснафида димезилаты; Бизелезины; Блеомицины; Бортезомибы; Брекинары;
 Бропиримины; Будотитаны; Бусульфаны; Кактиномицины; Калустероны;
 Канертинибы; Капецитабины; Карацемиды; Карбетимеры; Карбоплатины;
 Карбоквоны; Кармофур; Кармустиныс полифепрозанами; Кармюстин;
 Карубицины; Карцелезины; Цедефинголы; Целекоксибы; Семадотины;
 Хлорамбуцилс; Циотеронелы; Циролемицины; Цисплатины; Кладрибины;
 Кланфенур; Клофарабины; Криснатола; Циклофосфамиды;
 Липосомы цитарабина; Цитарабины; Дакарбазины; Дактиномицины;
 Дарбэпоэтин Альфас; Липосомы даунорубицина; Даунорубицины/Дауномицины;
 Даунорубицины; Децитабины; Денилейкин Дифтитокс; Декснигулдипины;
 Дексонаплатины; Дексразоксаны; Деагуанины; Диазиквоны; Диброспидиумы;
 Диеногесты; Диналины; Дисермолиды; Доцетаксели; Дофекидарс;
 Доксифлуридины; Липосомы доксорубицина; Доксорубицин HCL;
 Липосомы доксорубицина HCL для инъекций; Доксорубицины; Дролоксифены;
 Дромостанолон пропионаты; Дуазомицины; Экомуцины; Эдатрексат;
 Эдотекарины; Эфлорнитины; Элакридарс; Элинафидес; Решения Эллитта В;
 Эльзамитруцины; Эмитефурс; Энлоплатины; Энпроматы; Энзастаурины;
 Эпипропидины; Эпирубицины; Эпоэтин альфас; Эпталопросты; Эрбулозолы;
 Эзорубицины; Эстрамустины; Этанидазолы; Этоглюциды; Этопозид фосфаты;
 Этопозид VP-16s; Этопозид; Этоприны; Экземестаны; Экзесулинды; Фадрозолы;
 Фазарабины; Фенретиныды; Филграстимы; Флоксуридины; Флударабины;
 Фторурацилы; 5-фторурацилы; Флюоксиместероны; Флуороцитабины;
 Фосквидоны; Фострицины; Фострицины; Фотретамины; Фулвестранты;
 Галарубицины; Галоцитабины; Гемцитабины; Гемтузумабы/озогамицины;
 Герохинолы; Гиматеконны; Гимерацилы; Глоксазоны; Глюфосфамиды;
 Гозерелина ацетаты; Гидроксимочевина; Ибритумомабы/Тиуксетанс;
 Идарубицины; Ифосфамиды; Илмофозины; Иломастатс; Мезилаты иматиниба;
 Имексоны; Импросульфаны; Индисулам; Инпрокуон; Интерферон альфа-2ас;
 Интерферон альфа-2bs; Интерферон Альфас; Интерферон бета; Интерферон гамма;
 Интерфероны; Интерлейкин-2 и другие интерлейкины (включая рекомбинантные);
 Интоплицины; Иобенгуанес [131-I]; Ипроплатины; Иринотекцы; Ирсогладины;
 Иксабепилоны; Кетотрексаты; L-аланоцины; Ланреотиды; Лапатинибы;
 Ледоксантроны; Летрозолы; Лейковорины; Лейпролиды;
 Леупрорелины (Леупрорелиды); Левамизолы; Лексакальцитолы; Лиарозолы;

Лобоплатины; Лометрексолы; Ломустины/CCNU; Ломустины; Лонафарнибы;
 Лосоксантроны; Луртотекцы; Мафосфамиды; Манносульфаны; Маримастат;
 Масопрокол; Майтанзины; Мехлоретамин; Мехлорэтамин/азотные горчицы;
 Мегестрола ацетаты; Мегестроль; Меленгестрол; Мелфаланы;
 МелфалансIL-L-ПАМ; Меногарины; Мепитиостаны; Меркаптопурины;
 6-меркаптопурин; Меснас; Метезинды; Метотрексаты; Метоксален; Метомидаты;
 Метоприны; Метуредепас; Мибоплатины; Мипроксифены; Мизонидазолы;
 Митиндомидес; Митокарцины; Митокромины; Митофлаксоны; Митогиллины;
 Митогуазоны; Митомальдины; Митомицин Cs; Митомицины; Митонафидес;
 Митохидоны; Митосперы; Митотаны; Митоксантроны; Митозоломиды;
 Мивобулины; Мизорибины; Мофаротены; Мопидамолы; Мубритинибы;
 Микофенольные кислоты; Фенпропионаты нандролон; Недаплатины;
 Нельзарабины; Неморубицины; Нитракрины; Нокодазолы; Нофетумомабы;
 Ногаламицины; Нолатрекседс; Нортопиксантроны; Октреотиды; Опрелвекинс;
 Ормеплатины; Ортатаксели; Отерацилы; Оксалиплатины; Оксисураны;
 Оксофенарсины; Паклитаксели; Памидронаты; Патубилоны; Пегадемасы;
 Пегаспаргазы; Пегфилграстимс; Пельдезины; Пелиомицины; Пелитрексолы;
 Пеметрекседс; Пентамустины; Пентостатины; Пепломицины; Перфосфамиды;
 Перифозины; Пикоплатины; Пинафиды; Пипоброманс; Пипосульфаны;
 Пирфенидоны; Пироксантроны; Пиксантроны; Плевитрекседы;
 Пликамицид митрамицины; Пликамицины; Пломестаны; Пломестаны;
 Порфимеры натрия; Порфимеры; Порфирамицины; Преднимустины;
 Прокарбазины; Пропамидины; Проспидиумы; Пумитепа; Пурамицины;
 Пиразофурины; Хинакрины; Ранимустины; Расбурикасы; Рибоприны;
 Ритросульфаны; Ритуксимабы; Роглетимидес; Роквинимекс; Руфокромомиды;
 Сабарубицины; Сафинголы; Сарграмостимы; Сатраплатины; Себриплатины;
 Семустины; Симтразен; Сизофиранс; Собузоксаны; Сорафенибы; Спарфосаты;
 Спарфоновые кислоты; Спарсомицины; Спирогермании; Спиромустины;
 Спиролатины; Спиролатины; Скваламины; Стрептонигрины; Стрептоварицины;
 Стрептозоцины; Суфосфамиды; Сулофенурс; Сунитиниб малат;
 6-тиогуанин (6-ТГ); Тасединалины; Тальки; Талисомицины; Таллимустины;
 Тамоксифен; Тарикикары; Тавромустины; Текогаланс; Тегафуры; Телоксантроны;
 Темопорфины; Темозоломиды; Тенипозиды/VM-26s; Тенипозиды; Тероксироны;
 Тестолактоны; Тиамиприны; Тиогуанины; Тиотепас; Тиамиприны; Тиазофурины;
 Тиломисолы; Тилорон; Тимкодары; Тимоначикс; Тирапазамины; Топиксантроны;

Топотеканы; Торемифены; Тозитумомабы; Трабектины (эктеинасцидин 743); Трастузумабы; Трестолоны; Третиноины/АТРА; Трицирибины; Трилостаны; Триметрексаты; Триплатин тетранитраты; Трипторелины; Трофосфамиды; Тубулозолы; Убенимекс; Урациловая горчица; Уредепас; Валрубицины; Валсподарс; Вапреотиды; Вертепорфины; Винбластины; Винкристины; Виндезины; Винепидины; Винфлунины; Винформиды; Винглицинаты; Винлейцинолы; Винлеуросины; Винорелбины; Винрозидины; Винтриптолы; Винзолидины; Ворозолы; Ксантомицин As (гуамциклины); Зениплатины; Зиласкорбс [2-Н]; Зиностатины; Золедронат; Зорубицины; и Зосукидары, *например*:

Альдеслейкины (*например*, ПРОЛЕУКИН®); Алемтузумабы (*например*, CAMPATH®); Алитретиноины (*например*, PANRETIN®); Аллопуринолы (*например*, ZYLOPRIM®); Альтретамины (*например*, HEXALEN®); Амифостины (*например*, ETHYOL®); Анастрозолы (*например*, ARIMIDEX®); Триоксиды мышьяка (*например*, TRISENOX®); Аспарагиназы (*например*, ELSPAR®); BCG Live (*например*, TICE® BCG); Бексаротены (*например*, ТАРГРЕТИН®); Бевацизумаб (АВАСТИН®); Блеомицины (*например*, BLENOXANE®); Бусульфан для внутривенного введения (*например*, БУСУЛФЕКС®); Пероральные препараты бусульфана (*например*, MYLERAN®); Калустероны (*например*, METHOSARB®); Капецитабины (*например*, XELODA®); Карбоплатины (*например*, ПАРАПЛАТИН®); Кармустины (*например*, BCNU®, BiCNU®); Кармустины с полифепрозанами (*например*, GLIADEL® Wafer); Целекоксибы (*например*, CELEBREX®); Хлорамбуцилы (*например*, ЛЕЙКЕРАН®); Цисплатины (*например*, PLATINOL®); Кладрибины (*например*, LEUSTATIN®, 2-CdA®); Циклофосфамиды (*например*, CYTOXAN®, NEOSAR®); Цитарабины (*например*, CYTOSAR-U®); Липосомы цитарабина (*например*, DepoCyt®); Дакарбазины (*например*, DTIC-Dome); дактиномицины (*например*, COSMEGEN®); Дарбэпозтин Альфас (*например*, АРАНЕСП®); Липосомы даунорубицина (*например*, DANUOXOME®); Даунорубицины/Дауномицины (*например*, CERUBIDINE®); Денилейкин дифтитокс (*например*, ONTAK®); Дексразоксаны (*например*, ZINECARD®); Доцетаксели (*например*, TAXOTERE®); Доксорубицины (*например*, ADRIAMYCIN®, RUBEX®); Липосомы доксорубицина, включая инъекции липосом доксорубицина HCL (*например*, DOXIL®); Пропионаты дромостанолонa (*например*, DROMOSTANOLONE® и MASTERONE® для инъекций); Elliott's B Solutions (*например*, Elliott's B Solution®); Эпирубицины (*например*, ELLENCE®); Эпозтин альфас (*например*, EPOGEN®); Эстрамустины (*например*, ЕМСУТ®); Этопозид фосфаты (*например*, ЕТОРОФНОС®);

Этопозид VP-16 (например, ВЕПЕСИД®); Экземестаны (например, AROMASIN®);
 Филграстимы (например, NEUPOGEN®); Флоксуридины (например,
 FUDR®); Флударабины (например, FLUDARA®); Фторурацилы, вкл. 5-ФУ (например,
 ADRUCIL®); Фулвестранты (например, FASLODEX®); Гемцитабины (например,
 GEMZAR®); Гемтузумабы/озогамицины (например, MYLOTARG®); Ацетаты
 гозерелина (например, ZOLADEX®); Гидроксимочевина (например, HYDREA®);
 Ибритумомабы/тиуксетаны (например, ЗЕБАЛИН®); Идарубицины (например,
 IDAMYCIN®); Ифосфамиды (например, IFEX®); Мезилаты иматиниба (например,
 GLEEVEC®); Интерферон альфа-2ас (например, РОФЕРОН-А®); Интерферон альфа-2bs
 (например, INTRON A®); Irinotecans (например, CAMPTOSAR®); Летрозолы (например,
 FEMARA®); Лейковорины (например, WELLCOVORIN®,
 LEUCOVORIN®); Левамизолы (например, ERGAMISOL®); Ломустины/CCNU
 (например, СееВU®);
 Мехлоретамины/азотные иприты (например, MUSTARGEN®); Ацетаты мегестрола
 (например, MEGACE®); Мелфаланы/L-PAM (например, ALKERAN®); Меркаптопурин,
 включая 6-меркаптопурины (6-МП; например, PURINETHOL®); Mesnas (например,
 MESNEX®); Метотрексаты; Methoxsalens (например, UVADEX®); Митомицин Cs
 (например, MUTAMYCIN®, MITOZYTREX®); Митотаны (например, LYSODREN®);
 Митоксантроны (например, NOVANTRONE®); Фенпропионаты нандролона (например,
 DURABOLIN-50®); Нофетумомабы (например, VERLUMA®); Опрелвекины (например,
 НЕУМЕГА®); Оксалиплатины (например, ELOXATIN®); Паклитакселы (например,
 PAXENE®, TAXOL®); Памидронаты (например, AREDIA®); Пегадемазы (например,
 АДАГЕН®); Пегаспаргазы (например, ONCASPAR®); Пегфилграстимы (например,
 NEULASTA®); Пентостатины (например, NIPENT®); Пипоброманс (например,
 VERCYTE®); Пликамицин/Митрамицины (например, МИТРАЦИН®);
 Натриевые порфиримеры (например, PHOTOFRIN®); Прокарбазины (например,
 МАТУЛАН®); Хинакрины (например, АТАБРИНЕ®); Расбуриказы (например,
 ELITEK®); Ритуксимабы (например, РИТУКСАН®); Сарграмостимы (например,
 ПРОКИН®); Стрептозоцины (например, ZANOSAR®); Малаты сунитиниба (например,
 SUTENT®); Тальки (например, SCLEROSOL®); Тамоксифены (например,
 NOLVADEX®); Темозоломиды (например, TEMODAR®); Тенипозиды/BM-26
 (например, ВУМОН®); Тестолактоны (например, TESLAC®); Тиогуанины, включая 6-
 тиогуанин (6-TG); Тиотепас (например, THIOPLEX®); Топотеканы (например,
 НУСАМТИН®); Торемифены (например, FARESTON®); Тозитумомабы (например,
 ВЕХХАР®); Трастузумабы (например, ГЕРЦЕПТИН®); Третиноины/АТРА (например,

БЕСАНОИД®); Урациловая горчица; Валрубидины (например, VALSTAR®);
Винбластины (например, VELBAN®); Винкристины (например, ONCOVIN®);
Винорелбины (например, НАВЕЛБИН®); и золедронаты (например, ZOMETA®).

Иллюстративные ингибиторы контрольных точек, которые можно вводить после, одновременно или до введения клеток-носителей и вирусов (комбинации для виротерапии), представленных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, анти-CTLA4-агенты, анти-PD-1 агенты и другие, примерные из них следующие:

Типичные белки-мишени и ингибиторы ингибирующих иммунных контрольных точек			
Цель	Целевая функция	Антитело/гибридный белок	Синонимы и кодовые названия
CTLA4	Тормозящий рецептор	Ипилимумаб Тремелиумаб	(MDX-CTLA-4; BMS-734016; MDX-010) (тицилимумаб; CP-675,206)
PD-1	Тормозящий рецептор	МК-3475 АМПИ-224 Ниволумаб Пидилизумаб	(Пембролизумаб; Ламбролизумаб; SCH 900475) (слитый белок анти-PD-1 AMP-224) (BMS-936558; MDX-1106; ONO-4538) (CT-011)
PD-L1	Лиганд для PD-1	MDX-1105 BMS-936559 MED14736 MPDL33280A	(RG7446)
LAG3	Тормозящий рецептор	IMP321	ImmuFact
B7-H3	Ингибиторный лиганд	MGA271	
B7-H4	Ингибиторный лиганд		
TIM3	Тормозящий рецептор		
CD25	субъединица ингибиторного рецептора		

Типичные белки-мишени и ингибиторы ингибирующих иммунных контрольных точек			
Цель	Целевая функция	Антитело/гибридный белок	Синонимы и кодовые названия
CD137	стимулирующий рецептор		
OX40	стимулирующий рецептор		
4-1BB	костимуляторный рецептор	Аптамерный лиганд	
IDO	иммунодепрессивный фермент		

Дополнительные виды лечения, вводимые с помощью комбинаций для виротерапии, представленных в настоящем документе, могут включать один или несколько из иммунодепрессантов, *например* глюкокортикоиды (*например*, Преднизон, Дексаметазон, Гидрокортизон); ингибиторы кальциневрина (*например*, Циклоспорин, Такролимус); ингибиторы mTOR (*например*, Сиролимус, Эверолимус); блокирующие TNF α антитела (*например*, Инфликсимаб/Ремикейд, Этанерцепт/Энбрел, Адалimumаб/Хумира); Метотрексат; Леналидомид; Азатиоприн; Меркаптопурин; Фторурацил; Циклофосфамид и Флударабин.

И. Виды рака, подлежащие лечению

Раскрытые в настоящем документе способы можно использовать для лечения любого типа рака или метастазов, включая солидные опухоли и гематологические злокачественные новообразования. Опухоли, которые можно лечить описанными в настоящем документе способами, включают, но не ограничиваются ими, опухоль груди, опухоль предстательной железы, карциному, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, рак мозга, рак ЦНС, глиому, рак шейки матки, хориокарцинома, рак толстой 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, лейкоз, рак печени, рак легких, лимфома, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, меланома, миелома, нейробластома, рак полости рта, рак яичников, рак поджелудочной железы, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак дыхательных путей, саркома, рак кожи, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы,

например, лимфосаркома, остеосаркома, опухоли молочной железы, мастоцитомы, опухоль мозга, меланома, аденосквамозная карцинома, карциноидная опухоль легкого, опухоль бронхиальной железы, бронхиолярная аденокарцинома, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, фиброма, миксохондрома, легочная саркома, нейросаркома, остеома, папиллома, ретинобластома, саркома Юинга, лимфома Беркитта, микроглиома, нейробластома, неоплазия полости рта, фибросаркома, плоскоклеточная карцинома половых органов, трансмиссивная венерическая опухоль, опухоль яичка, семинома, опухоль клеток Сертоли, гемангиоперицитома, гистиоцитома, хлорома, гранулоцитарная саркома, папиллома роговицы, плоскоклеточный рак роговицы, гемангиосаркома, мезотелиома плевры, базальноклеточная опухоль, тимома, опухоль желудка, рак надпочечников, папилломатоз полости рта, папилломатоз полости рта, цистаденома, фолликулярная лимфома, кишечная лимфосаркома, фибросаркома и плоскоклеточный рак легких, лейкоз, гемангиоперицитома, глазная неоплазия, препуциальная фибросаркома, язвенный плоскоклеточный рак, препуциальная карцинома, неоплазия соединительной ткани, мастоцитомы, гепатоцеллюлярная карцинома, лимфома, легочный аденоматоз, легочная саркома, саркома Рауса, ретикулоэндотелиоз, фибросаркома, нефробластома, В-клеточная лимфома, лимфолейкоз, ретинобластома, неоплазия печени, лимфосаркома, плазмоцитомоидный лейкоз, саркома плавательного пузыря (у рыб), казеозный лимфаденит, карцинома легких, инсулинома, лимфома, саркома, опухоли слюнных желез, неврома, опухоль островковых клеток поджелудочной железы, MALT-лимфома желудка и аденокарцинома желудка.

В некоторых вариантах реализации опухоль выбрана из метастатической меланомы; аденокарцинома пищевода и желудка; холангиокарцинома (любая стадия); аденокарцинома поджелудочной железы (любой стадии); рак желчного пузыря (любой стадии); муцинозный рак аппендикса высокой степени злокачественности (любая стадия); нейроэндокринный рак желудочно-кишечного тракта высокой степени злокачественности (любая стадия); мезотелиома (любая стадия); саркома мягких тканей; рак простаты; почечно-клеточный рак; мелкоклеточная карцинома легких; немелкоклеточная карцинома легких; плоскоклеточный рак головы и шеи; колоректальный рак; рак яичников; гепатоцеллюлярная карцинома; и глиобластома.

В некоторых вариантах реализации изобретения опухоль выбрана из глиобластомы, карциномы молочной железы, карциномы легких, карциномы простаты, карциномы толстой кишки, карциномы яичников, нейробластомы, опухоли центральной нервной системы и меланомы.

К. Примеры

Приведенные ниже примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема предмета изучения.

Пример 1

Выделение клеток и культивирование

А. Стволовые клетки, полученные из жировой ткани (ADSC)

І. Извлечение и подготовка стромально-васкулярной фракции жировой ткани

Субъекту вводят местную анестезию, содержащую 0,5% лидокаина с адреналином в соотношении 1: 400 000 и 8,4% HCO_3 , титрованного до pH 7,4 (обычно 5 кубических сантиметров HCO_3 в общем объеме 60 кубических сантиметров). Затем субъект проходит процедуру липосакции с использованием закрытой системы сбора и обработки клеток, доступной под торговой маркой Time-Machine®, устройство от компании Cell Surgical Network, Beverly Hills, CA, USA (CSN), которая включает установку забора жира (герметичный шприц для липосакции) и канюлю 2,5 - 3 мм. Мазь с бацитрацином и пластырь накладываются на рану вместе с компрессионной повязкой.

В приведенных примерах использовали стволовые клетки жировой ткани, полученные из супраадвентициальных стромальных клеток жировой ткани. Стромально-васкулярная фракция (SVF), содержащая ADSC, получают в закрытой системе в соответствии со следующим протоколом:

- 1) Закрытой системой для сбора и обработки стволовых клеток жировой ткани, такой как CSN TimeMachine® извлекали жир в шприц TP-101 объемом 60 куб. (одноразовый стерильный герметичный шприц для забора жира)
- 2) Полученную фракцию центрифугировали при 2800 об / мин в течение 3 мин.
- 3) Удалили свободные жирные кислоты и остатки органических веществ (локальные/кровь) через закрытую систему TP-109
- 4) Перенесли 25 см³ конденсированного жира в шприц TP-102 (шприц для обработки SVF)
- 5) Добавили предварительно нагретую (38°C) 25 мл ускорителя Roche T-MAX® Time Machine Accelerator (коллагеназа, соответствующая GMP), содержащего 12,5 единиц Wunsch
- 6) Полученную фракцию инкубировали при 38°C в течение 30-45 минут
- 7) Центрифугировали при 200 g в течение 4 минут

- 8) Удалили супернатант за исключением нижних 3-10 см³
- 9) Добавили 50 см³ D5LR (лактат Рингера и 5% декстрозы) в качестве промывочного раствора для удаления остатков коллагеназы и центрифугировали при 200 g в течение 4 минут.
- 10) Повторили отмывку 2 раза, всего 3 отмывки.
- 11) Удалили всю супернатантную жидкость, оставив 3-10 см³ осадка - это стромально-васкулярная фракция (SVF).
- 12) Перенесли SVF в шприц с этикеткой объемом 20 см³ через 100-микронные фильтры.
- 13) Собрали и идентифицировали образцы SVF по количеству клеток, жизнеспособности и для подтверждения отсутствия комков или примесей.
- 14) Аликвоты каждой клеточной суспензии отбирали для сортировки клеток, тестирования на эндотоксины и окрашивания на стерильность. SVF доступна для инъекций после подтверждения уровня единицы эндотоксина (EU) меньше или равного 5 EU / кг / час и отрицательных результатов окрашивания по Граму.
- 15) Клетки ресуспендировали в 20 мл Isolyte. Суспензии клеток отбирали в шприц через иглу 18G для инъекций; для инъекций могут использоваться до 100 миллионов жизнеспособных клеток
- 16) Затем шприц помещали в запечатанный пакет для образцов, на котором указывается имя субъекта и номер медицинской карты.

II. Культура клеток

Стромально-васкулярная фракция нераковых доноров (SVF) были получены в рамках протокола, одобренного IRB, после информированного письменного согласия (International Cell Surgical Society; IRB # ICSS-2016-024), как описано выше. Свежие SVF помещали в чашки для закрепления в течение ночи и промывали на следующий день для удаления неприкрепленных клеток и осадков. Среду меняли каждые 3-4 дня до тех пор, пока мезенхимальные стволовые клетки (МСК) не начали расти и не достигли 80% конфлюентности. Пассировали каждые 3-4 дня с использованием TrypLE™ Express (Life Technologies, (1x), без фенолового красного, № по каталогу 12604021, 3 мин, инкубатор 37□) до 10 пассажей. Стволовые клетки, полученные из жировой ткани (ADSC), размножали и поддерживали в 5% экстракте тромбоцитов человека (Cook Regentec, Stemmlate, PL-SP-100) в DMEM с добавлением L-глутамина и пенициллина/стрептомицина. ADSC были выделены от 6 доноров и обозначены как RM20, RM35, RM47, RM48, RM58 и BH21.

III. Создание стволовых клеток из жировой ткани, конститутивно экспрессирующих eGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок)

Полученные из жировой ткани RM20 стволовые клетки на пассаже 0 были сконструированы для экспрессии eGFP (Clontech, Palo Alto, CA) под контролем промотора CMV (UniProtKB - C5MKY7 (C5MKY7_HCMV)). Лентивирусный вектор (VectorBuilder, доступный от VectorBuilder Inc., Santa Clara, CA)), содержащий eGFP, использовали для введения eGFP в ADSC для конститутивной экспрессии. 10000 eGFP-положительных клеток были отсортированы в пассаже 1, а затем в пассаже 2 с использованием сортировщика клеток BioRAD S3. Экспрессия eGFP была подтверждена с помощью проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии с использованием универсального флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-X700 Series.

Б. Раковые клетки

Клетки меланомы B16 F10, карциномы легкого A549 и клетки K562 размножали в DMEM (B16, A549) (Gibco, № по каталогу: 11960069) или RPMI 1640 (K562) (Gibco, № по каталогу: 21870092) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Omega Scientific, FB-02, сертифицирована Министерством сельского хозяйства США, инактивирована нагреванием), 2 mM L-глутамин (ThermoFisher Scientific, 25030081, 100x) и пенициллин/стрептомицин (Life Technologies, 15140122, 100x).

В. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC)

PBMC были получены в рамках утвержденного IRB протокола после информированного письменного согласия (International Cell Surgical Society; IRB # ICSS-2016-024). PBMC были выделены с использованием стандартного протокола Ficoll (Ficoll-PaquePlus, GE Healthcare, cat. # 95021-205). PBMC были выделены от 8 доноров и обозначены как BH62, RM20, RM47, RM48, RM52, RM53, SIBD01 и SIBD02.

Г. Кокультуры

Кокультуры могут включать иммунные клетки пациента, такие как PBMC или цельную кровь, вместе с клеточным носителем/клетками-носителями, включая стволовые клетки или опухолевые клетки, а также с тестируемым онколитическим вирусом или без него, *например*, вирус осповакцины, вирус простого герпеса и аденовирус, среди прочих.

После выделения крови пациента и ее обработки для выделения PBMC и сыворотки PBMC пациента совместно культивировали с различными клетками-носителями, с онколитическим вирусом или без него, для определения совместимости. Кокультуры, в том числе контрольные, подлежащие тестированию, включают, *например*: только PBMC +/- вирус; только клетки-носители +/- вирус; PBMC + клетки-

носители +/- вирус; только клетки-носители + вирус +/- сыворотка (10-50%) +/- тепловая или фармакологическая (фактор яда кобры или эквивалент) инаktivация комплемента (для скрининга сывороточной резистентности пациента); PBMC + клетки-носители + вирус +/- сыворотка (10-50%) +/- тепловая или фармакологическая (фактор яда кобры или эквивалент) инаktivация комплемента (для скрининга сывороточной резистентности пациента); и гепаринизированная цельная кровь вместо PBMC, как указано выше (для теста в естественной среде).

Затем кокультуры (включая клетки и/или супернатанты) анализировали для определения уровней амплификации вируса и инфицирования, а также иммуносупрессивных эффектов с использованием различных анализов и тестов, включая, но не ограничиваясь ими: поверхностная и внутриклеточная многопараметрическая проточная цитометрия или ее эквиваленты, *например*, масс-цитометрия (CyTOF); иммуноферментный анализ (ELISA); метод иммуноферментных пятен (ELISPOT); анализ вирусных бляшек (VPA); количественная ПЦР (qPCR); биолюминесцентные анализы; флуоресцентная микроскопия; внутриклеточное окрашивание.

Проточная цитометрия выполнялась, *например*, с использованием параметров стробирования для идентификации специфических популяций иммунных клеток, включая Т-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, CD3, CD4, CD8), NK-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, NKp46, CD16, CD56) и NKT-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, CD3, CD16, CD56, NKp46, тетрамеры aGalCer-CD1d). Реакции иммунной системы оценивались путем анализа различных параметров активации/эффекторной функции, включая, но не ограничиваясь ими: CD69, CD25, CD71, CD27 (CD70L), CD154 (CD40L), CD137 (4-1BB), CD44, CD45RA, CD45RO, CD278 (ICOS), CD127 (IL-7RA), CD183 (CXCR3), CD197 (CCR7), CD39, CD73, CD314 (NKG2D), PD-1, CTLA-4, IFN α/β , IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, IL-17, IL-6, CD107a, CD107b, TGF β , перфорин, гранзим В, IL-1a/IL-1b, G-CSF, RANTES, EXOTAXIN, MIP-1b, MCP-1, EGF, HGF, VEGF, IL-1RA, IL-7, IP-10, IL-2R, MIG и IL-8, среди прочих.

Например, PBMC кокультивировали (100 мкл) с ADSC (50 мкл) с вирусом осповакцины или без него (50 мкл) в течение 48 часов на 96-луночных планшетах и в общей сложности 200 мкл среды R10 (RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, L-глутамином и Pen / Strep). В некоторых экспериментах вирус (50 мкл) и ADSC (50 мкл) предварительно смешивали и перемешивали на орбитальном шейкере при 37°C (инкубатор) в течение 1 часа, а затем (100 мкл смеси) добавляли к PBMC без

дополнительных промывок. В конце 48-часового инкубационного периода клетки извлекали для окрашивания и анализа проточной цитометрии непосредственно или после дополнительной 4-5-часовой стимуляции клетками K562 или РМА/иономицином (50 мкл) с монензином/брефельдином А (50 мкл). , по мере необходимости.

Пример 2

Влияние стволовых клеток, полученных из жировой ткани (ADSC), на амплификацию вируса и инфицирование при наличии и отсутствии иммунных клеток (мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC)) от субъекта

Для конкретных вирусов клетки-носители, которые амплифицируют вирус, идентифицируются как кандидаты для доставки вируса субъекту для виротерапии. В этом примере оценивали влияние иммунных клеток, полученных от субъекта, на способность клетки-носителя способствовать амплификации вируса и инфицированию. Для этого использовали PBMC. Факторы, которые влияют на вирусную инфекцию и амплификацию клетками-носителями, включают, *например*, присутствие или отсутствие интерферонов (IFN) и/или присутствие или отсутствие PBMC, которые оцениваются с использованием соответствующих анализов, измеряющих количество присутствующего вируса. Такие анализы включают, *например*, VPA, qPCR (или любые альтернативные анализы, которые измеряют количество присутствующих вирусных ДНК геномов), ELISA (для измерения кодируемых вирусами или сконструированных репортерных белков или ферментов, таких как, но не ограничиваясь ими, β -галактозидазой) и биолюминесцентными анализами (для измерения кодируемых вирусом люминесцентных репортерных белков, таких как, но не ограничиваясь ими, люцифераза). Вирусную инфекцию клеток-носителей, PBMC и опухолевых клеток можно контролировать, *например*, с помощью проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии.

А. Анализы вирусных бляшек (VPA)

Кокультуры, как описано в Примере 1, можно хранить и впоследствии анализировать с использованием VPA для количественной оценки амплификации вирусных частиц в различных условиях и с различными комбинациями иммунных клеток, полученных от пациента, и клеток носителей.

Образцы, содержащие вирус, хранились при -80°C и подвергались трехкратному циклу замораживания (-80°C)/оттаивания ($+37^{\circ}\text{C}$) с последующей обработкой ультразвуком в ледяной воде в течение трех 1-минутных интервалов с разницей между интервалами в 1 мин. Обработанные ультразвуком образцы последовательно разводились в среде для заражения вирусом осповакцины (DMEM с добавлением 2%

FBS, L-глутамина и пенициллина/стрептомицина). Анализы бляшек проводили в 24-луночных планшетах в дублированных лунках. 200000 клеток почки обезьяны CV-1 помещали в 1 мл среды D10 на лунку в течение ночи. Удаляли супернатант и 10-кратным последовательным разведением вирусосодержащего образца наносили на монослой CV-1 в количестве 200 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37°C (инкубатор) с ручным встряхиванием каждые 20 минут. 1 мл СМС аккуратно наслаивали поверх клеток, затем планшеты инкубировали в течение 48 часов. Подсчет бляшек производился после фиксации клеток путем заполнения лунок раствором кристаллического фиолетового (1,3% кристаллический фиолетовый (Sigma-Aldrich, C6158), 5% этанола (PureEthanol, MolecularBiologyGrade, VWR, 71006-012), 30% формальдегида (37 %v/v. формальдегида, Fisher, cat. # F79-9), и бидистиллированная вода) в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим промыванием планшетов в водопроводной воде и сушкой в течение ночи. Накладку СМС готовили путем автоклавирования 15 г натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Sigma-Aldrich, cat. # C4888) и повторного суспендирования с перемешиванием в течение ночи при комнатной температуре в 1 л DMEM с добавлением пенициллина / стрептомицина, L-глутамина и 5% FBS. , с хранением при 4 ° C.

Б. Флуоресцентная микроскопия

Вирусная инфекция отслеживалась с использованием флуоресцентно помеченных клеток, таких как eGFP ADSC (Пример 1), и флуоресцентно помеченных онколитических вирусов, таких как, например вирус L14, который представляет собой сконструированный штамм LIVP вируса осповакцины со встроенным ТК Turbo-FP635, полученный от StemVacGmbH, Bernried, Germany. Микроскопические наблюдения за вирусной инфекцией выполнялись с использованием флуоресцентной микроскопии на универсальном флуоресцентном микроскопе Keyence BZ-X700 Series. Например, сконструированные ADSC, экспрессирующие eGFP, отслеживаются по каналу GFP (воздействие 1 секунда), тогда как заражение вирусом LIVP, созданным с помощью TurboFP635, отслеживается по каналу TRITC (воздействие 3 секунды). Изображения с 4-кратным или 10-кратным увеличением собирались и накладывались на яркое поле (фазовый контраст, выдержка 1/50 секунды).

В. Оценка амплификации вируса осповакцины с помощью ADSC (стволовые клетки, полученные из жировой ткани) в присутствии и в отсутствие интерферонов (IFN)

Способность ADSC амплифицировать вирус осповакцины и реагировать на защитные противовирусные эффекты интерферонов оценивали с помощью вируса

осповакцины L14 (VV) (штамм LIVP со вставленным ТК Turbo-FP635). Вирусы осповакцины (L14 VV) были получены от StemVacGmbH, Bernried, Germany. 50000 ADSC RM35 были инфицированы в 12-луночной планшете с 10000 БОЕ (бляшкообразующие единицы) L14 VV в присутствии возрастающих доз (0,08 нг/мл, 0,3 нг/мл, 1,3 нг/мл, 5 нг/мл и 20 мкг/мл) IFN γ (Peprotech, cat. # AF3000220UG, 20 мг лиофилизированного, разбавленного до 20 мкг/мл из примерно 1000X исходного раствора в 1х PBS, с добавлением 0,1% FBS, хранящегося при -80°C) или IFN β (Peprotech, cat# AF30002B5UG, 5 мкг лиофилизированного, разбавленного до 5 мкг/мл из примерно 1000X исходного раствора в 1х PBS, с добавлением 0,1% FBS, хранящимся при -80°C), добавленных во время заражения или на 24 часа раньше (IFN β / γ 24 часа). Визуализацию флуоресценции и анализ бляшек проводили через 48 часов после заражения.

Результаты анализа бляшек показаны в таблице 1. Флуоресцентная визуализация и анализы бляшек через 48 часов после инфицирования показывают, что интерфероны типа I и типа II защищают ADSC от инфекции вирусом осповакцины (VV) зависящим от дозы образом. Это согласуется с тем, что эти клетки не трансформируются и обладают функциональными антивирусными интерфероновыми ответами. Защита от вирусной инфекции была менее эффективной, когда интерфероны добавлялись одновременно, а не за 24 часа до воздействия вируса.

Чтобы оценить, приводит ли комбинация интерферонов типа I и II к усилению защиты от инфекции VV, 50000 ADSC RM35 были предварительно обработаны в течение 24 часов увеличивающимися дозами (0,02, 0,08, 0,3, 1,3, 5, 20 и 80 нг/мл) IFN γ и IFN β отдельно или в комбинации перед инфицированием 10 000 БОЕ L14 VV. Результаты анализа бляшек (таблица 2) показывают, что комбинация интерферонов типа I и II не усиливает дополнительно защиту.

Затем определяли стабильность антивирусного состояния, индуцированного IFN γ . 100000 ADSC RM20-eGFP (см. Пример 1) инфицировали в 12-луночной планшете 100000 БОЕ L14 VV и инкубировали до 4 дней. ADSC были либо необработанными ((-) IFN γ -контроль), либо предварительно обработанными 20 нг/мл IFN γ в течение 24 часов. IFN γ вводили за 1, 2 или 3 дня до вирусной инфекции. Для визуализации развития вирусной инфекции использовали анализ флуоресцентных изображений с динамикой во времени, изображения были получены через 24, 48, 72 и 96 часов после заражения. Визуализация флуоресценции ADSC, инфицированных вирусом в отсутствие IFN γ ((-) IFN γ , контроль), показывает неинфицированные (eGFP +/зеленый) ADSC, инфицированные мертвые ADSC (TurboFP635 / красный) и инфицированные живые

ADSC (желтый) с возрастающим числом инфицированных и мертвых клеток в период 24-96 часов, демонстрируя успешное инфицирование ADSC вирусом в отсутствие интерферонов. Флуоресцентная визуализация ADSC, инфицированных вирусом, после 24-часового воздействия IFN γ не выявила красных или желтых клеток, что указывает на то, что предварительная обработка интерферонами предотвращает вирусную инфекцию.

Анализ бляшек выполняли, как описано выше, с контролем только вируса (без ADSC) и с контролем (-) IFN γ . Как показано в таблице 3, только контроль (-) IFN γ показал амплификацию вируса. ADSC были очень восприимчивы к инфекции вируса осповакцины. Результаты анализа бляшек показывают, что способность ADSC амплифицировать вирус была отменена предварительной обработкой интерфероном по сравнению с контрольной группой без интерферона. Антивирусное состояние, вызванное обработкой интерфероном, было стабильным и продолжалось в течение нескольких дней после кратковременного 24-часового воздействия IFN γ . Таким образом, интерфероновые ответы типа I и типа II, защищая ADSC от вирусной инфекции и потенциально улучшая их иммуносупрессивные способности, также влияют на их способность доставлять и амплифицировать вирус осповакцины *in vivo*.

Таблица 1. Результаты анализа бляшек

Обработка IFN γ	Среднее значение БОЕ / образец	Обработка IFN β	Среднее значение БОЕ / образец
(-) IFN γ (контроль)	3.40×10^7	(-) IFN β (контроль)	1.90×10^7
20 нг / мл IFN γ	1.75×10^5	20 нг/мл IFN β	4.10×10^5
20 нг / мл IFN γ 24 ч	1.50×10^3	20 нг/мл IFN β 24 ч	4.40×10^3
5 нг / мл IFN γ	2.50×10^5	5 нг/мл IFN β	1.80×10^6
5 нг / мл IFN γ 24 ч	1.60×10^3	5 нг/мл IFN β 24 ч	4.20×10^4
1,3 нг / мл IFN γ	5.55×10^5	1,3 нг/мл IFN β	5.90×10^6
1,3 нг / мл IFN γ 24 ч	2.25×10^3	1,3 нг/мл IFN β 24 ч	5.40×10^5
0,3 нг / мл IFN γ	1.85×10^6	0,3 нг/мл IFN β	3.40×10^7
0,3 нг / мл IFN γ 24 ч	2.25×10^3	0,3 нг/мл IFN β 24 ч	2.10×10^6
0,08 нг / мл IFN γ	4.80×10^6	0,08 нг/мл IFN β	4.00×10^7
0,08 нг / мл IFN γ 24 ч	1.50×10^4	0,08 нг/мл IFN β 24 ч	4.10×10^6

Таблица 2. Результаты анализа бляшек на IFN γ + Ifn β

Концентрация IFN	Среднее значение БОЕ / образец			
	(-) IFN (контроль)	IFN γ	IFN β	IFN γ + IFN β
контроль	2.85×10^6	-	-	-
80 нг / мл	-	1.90×10^3	5.10×10^3	5.25×10^3
20 нг / мл	-	2.50×10^3	3.10×10^3	2.95×10^3
5 нг / мл	-	2.30×10^3	3.15×10^3	2.55×10^3
1,3 нг / мл	-	1.80×10^3	4.50×10^3	2.45×10^3
0,3 нг / мл	-	2.75×10^3	4.95×10^4	2.45×10^3
0,08 нг / мл	-	7.40×10^3	6.90×10^4	3.05×10^3
0,02 нг / мл	-	4.55×10^5	7.00×10^5	3.15×10^5

Таблица 3. Стабильность антивирусного состояния, вызванного IFN γ

Обработка	Среднее значение БОЕ / образец
Внесенный вирус	3.80×10^4
Только вирус	1.30×10^4
(-) IFN γ (контрольный)	4.10×10^5
IFN γ -1 день	1.02×10^4
IFN γ -2 дня	5.20×10^3
IFN γ -3 дня	9.55×10^3

Г. Амплификация вируса и инфицирование в кокультурах клетки-носителя / PBMC

Чтобы оценить потенциал амплификации вируса осповакцины (VV) с помощью ADSC (клеток-носителей) в присутствии аллогенных PBMC, 50000 ADSC RM20-eGFP были инфицированы только 5000 или 50000 L14 VV или в присутствии 1×10^6 аллогенных PBMC. (от донора крови, обозначенного как ВН62) на срок до 48 часов. Для оценки инфицирования вирусом осповакцины и амплификации использовали оверлейную флуоресцентную визуализацию и анализ вирусных бляшек, соответственно, путем сравнения результатов совместного культивирования аллогенных ADSC + PBMC с ADSC, культивируемых отдельно, и PBMC, культивированных отдельно.

Результаты показаны в таблице 4. Только ADSC допускают инфицирование и амплификацию VV, тогда как сами по себе PBMC не показывают инфицирование или амплификации VV. Кокультуры продемонстрировали, что ADSC могут амплифицировать вирус осповакцины в присутствии аллогенных PBMC и что в присутствии аллогенных PBMC общее количество вируса на выходе было увеличено по

сравнению с суммарным количеством при отдельном заражении ADSC и PBMC, что указывает на то, что ADSC повышают чувствительность PBMC к инфекции вируса осповакцины.

Таблица 4. Вирусная амплификация и инфицирование в кокультурах ADSC + PBMC

Культуры / Условия	Среднее значение БОЕ / образец	
	5000 БОЕ L14 VV	50 000 БОЕ L14 VV
Внесенный вирус	3.60×10^3	5.00×10^4
Только вирус	2.70×10^3	3.00×10^4
Только PBMC	2.00×10^3	2.65×10^4
Только ADSC	2.90×10^6	4.00×10^6
Совместное культивирование ADSC + PBMC	4.05×10^6	5.85×10^6

Пример 3

Амплификация вируса и инфицирование в кокультурах клеток-носителей + опухолевых клеток

Амплификация и инфицирование онколитических вирусов оценивается в присутствии различных типов опухолевых / раковых клеток, чтобы определить, эффективна ли конкретная комбинация клетки-носителя и онколитического вируса при онколизе опухоли/раковой клетки. Опухоли могут быть идентифицированы как устойчивые или перmissive к вирусной инфекции. Поэтому любое усиление доставки вируса к опухолевым клеткам клетками-носителями наряду с другими факторами, такими как роль предварительной обработки IFN γ , доза клеток-носителей и секреция растворимых факторов клетками-носителями, могут дать оценку целесообразности применения того или иного фактора при онколизе опухоли/раковой клетки. В этом показательном примере оценивается влияние клеток-носителей, ADSC, на способность доставлять вирус, вирус осповакцины, к линии раковых клеток, клеткам меланомы B16.

А. Онколиз устойчивых и перmissive линий опухолевых клеток, стимулируемый ADSC

Например, флуоресцентная микроскопия, анализ бляшек и проточная цитометрия могут быть применены для определения эффектов использования ADSC для усиления доставки вируса осповакцины к опухолевым/раковым клеткам. Было проанализировано использование ADSC для более эффективной доставки вируса к устойчивым клеткам

меланомы B16 F10. Для сравнения были включены клетки A549, которые очень восприимчивы к вирусной инфекции.

1×10^6 клеток B16 или клеток A549 совместно культивировали с 2×10^5 eGFP помеченных ADSC от донора RM20 (см, пример 1) в 12-луночном планшете и инфицировали 1×10^5 БОЕ L14 VV. (MOI = 0,1 до B16) и инкубировали до 72 часов. Контроль без вируса включал в себя только клетки B16, только клетки A549, только eGFP-помеченные ADSC или клетки B16 кокультивированные с eGFP ADSC. Флуоресцентные изображения были получены после 24, 48 и 72 часов инкубационного периода. Сравнение между устойчивыми клетками B16, культивируемыми отдельно, и перmissive клетками A549, культивированными отдельно, показало резкие и более высокие уровни вирусной инфекции в клетках A549, о чем свидетельствует присутствие красных клеток на флуоресцентных изображениях. Используя eGFP-меченные ADSC (зеленые) для визуализации и отличия их от немеченых клеток B16 (серый), было обнаружено, что в конфлюэнтных средах ADSC имеют тенденцию группироваться вместе и привлекать немеченые клетки меланомы. Через 72 часа в отсутствие вируса наблюдались скопления зеленых стволовых клеток. В присутствии вируса это приводило к образованию высокоинфицированных желтых кластеров ADSC, окруженных интенсивно окрашенными в красный цвет инфицированными клетками B16. Эти эффекты были связаны со значительным улучшением онколиза монослоя устойчивых клеток мышинной меланомы B16.

Эти результаты показывают, что человеческие ADSC способствуют онколизу устойчивых клеток меланомы B16 за счет усиленной амплификации вируса осповакцины L14. Улучшенное нацеливание на устойчивые клетки B16 также наблюдалось с ADSC, полученным от другого донора (RM35). 1×10^6 клеток B16 совместно культивировали с 200000 ADSC RM35 и инфицировали 100000 БОЕ L14 VV в течение до 4 дней. Анализ флуоресцентной визуализации показал, что человеческие ADSC RM35 также способствовали онколизу устойчивых клеток мышинной меланомы B16 *in vitro*.

Анализ бляшек амплификации вируса осповакцины выполняли, как описано выше, только на клетках B16, только на клетках карциномы легких A549, кокультурах B16 + A549, только ADSC и совместных культурах B16 + ADSC. Результаты приведены в таблице 5. Клетки карциномы легких A549 использовались в качестве высоко перmissive положительного контроля вируса осповакцины и демонстрировали уровни амплификации вируса, аналогичные только ADSC. Вирусные титры, полученные из кокультур B16 + A549 или B16 + ADSC, превышали совокупный выход вируса при

отдельном инфицировании клеток только одного вида, показывая, что высокопермиссивные раковые клетки и ADSC могут повышать чувствительность устойчивых клеток меланомы к инфекции вирусом осповакцины. .

Таблица 5. Результаты анализа бляшек

Культуры / Условия	Среднее значение БОЕ / образец
Внесенный вирус	9.50×10^4
Только клетки B16	5.55×10^6
Только клетки A549	6.10×10^8
Кокультуры B16 + A549	1.69×10^9
Только ADSC	8.55×10^8
Кокультуры B16 + ADSC	1.27×10^9

Б. Влияние предварительной обработки IFN γ на онколиз устойчивых линий опухолевых клеток, стимулируемый ADSC

Было протестировано влияние предварительной обработки ADSC IFN γ на амплификацию вируса. 200000 клеток RM20-eGFP (0,2 M) предварительно обрабатывали 20 нг/мл IFN γ в течение 24 часов, затем совместно культивировали с 200000 (0,2 M) ADSC RM20, клетками A549 или клетками B16 и инфицировали вирусом осповакцины L14, как описано выше. Флуоресцентные изображения были получены через 24, 48 и 72 часа. Результаты показали, что предварительная обработка IFN γ защищает ADSC от вирусной инфекции только в присутствии относительно устойчивых клеток B16, но не в присутствии высоко пермиссивных клеток A549. Из-за защиты ADSC от вируса предварительная обработка ADSC с помощью IFN γ нарушила онколиз монослоя B16, что указывает на то, что наблюдаемый противоопухолевый потенциал в первую очередь зависит от амплификации вируса в ADSC.

В. Влияние количества/дозы клеток-носителей на онколиз клеток B16

Влияние числа стволовых клеток/дозы на онколизе B16 монослоя оценивали следующим образом. 1×10^6 клеток B16 совместно культивировали с 200000 (0,2 M) или 20000 (0,02 M) ADSC RM20-eGFP и инфицировали L14 VV, как описано выше, и флуоресцентные изображения получали через 24 часа, 48 часов и 72 часа. Результаты показывают, что недостаточное количество ADSC (2% или меньше) приводит к неполному онколизу монослоя B16, подтверждая, что наблюдаемый противоопухолевый потенциал зависит от амплификации вируса в ADSC.

Г. Влияние растворимых факторов, секретируемых клетками-носителями, на онколиз резистентных опухолевых клеток B16 мыши и раковых клеток человека K562

I. Сенсibilизация устойчивых опухолевых клеток

Успешный онколиз устойчивых опухолевых клеток можно объяснить не только амплификацией вируса ADSC, но и сенсibilизацией опухолевых клеток к вирусной инфекции. Чтобы определить роль, которую сенсibilизация играет в онколизе устойчивых опухолевых клеток, влияние растворимых факторов, секретируемых ADSC, оценивали путем добавления супернатантов из ADSC вместо клеток ADSC. 10000 клеток B16 инфицировали в трех экземплярах в течение 96 часов в 96-луночных планшетах, как описано выше, с L14 VV при MOI 0,1. Затем добавляли супернатанты из человеческих ADSC RM20 и анализировали их влияние на вирусную инфекцию клеток B16 с использованием флуоресценции TurboFP635 и количественно оценивали с помощью анализов бляшек через 72 часа после инфицирования. Результаты анализа бляшек показаны в таблице 6. Флуоресцентные изображения и результаты анализа бляшек показывают, что добавление супернатанта от ADSC приводит к амплификации вируса в устойчивых клетках B16, что указывает на то, что ADSC сенсibilизируют устойчивые опухолевые клетки B16 к вирусной инфекции.

Таблица 6. Результаты анализа бляшек

Культуры / Условия	Среднее значение БОЕ / образец
Внесенный вирус	8.80×10^4
Только супернатант ADSC	7.55×10^4
Только клетки B16	2.82×10^7
Клетки B16 + супернатант ADSC	5.23×10^7

В аналогичном эксперименте супернатанты от четырех разных доноров ADSC (RM20, RM35, BH21 и RM58) были добавлены к клеткам B16 (10 000) и K562 (100 000), инфицированным L14 VV, при MOI 0,1 в течение 96 часов в 96-луночном планшете. Анализ флуоресценции показал, что супернатанты от разных доноров ADSC обеспечивали аналогичную сенсibilизацию мышинных клеток B16 и чрезвычайно устойчивых человеческих раковых клеток K562.

II. Сравнение опосредованной ADSC сенсibilизации клеток B16 к инфицированию двумя разными штаммами вируса осповакцины: L14 VV и WT1 VV

WT1 (ACAM2000) представляет собой тимидинкиназу (ТК) -позитивный штамм Wyeth вируса осповакцины с более высоким потенциалом амплификации и большей способностью уклоняться от противовирусного иммунитета, чем L14 VV. Возможность сенсibilизации посредством ADSC устойчивых клеток B16 к инфекции L14 VV сравнивали с сенсibilизацией клеток к инфекции WT1 VV. Супернатанты от четырех доноров ADSC (RM20, RM35, BH21 и RM58) добавляли к 10000 клеток B16, инфицированных либо L14 VV, либо WT1 VV, при MOI 0,1 в течение 96 часов в 96-луночных планшетах. Анализ бляшек амплификации вируса осповакцины L14 и WT1 в клетках B16 выполняли, как описано ранее. Жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа МТТ. МТТ (тетразолиевый краситель; 3- (4 , 5- диметилтиазол-2-ил) - 2,5-дифенилтетразолий бромид) - это хорошо известный колориметрический анализатор для оценки метаболической активности клеток. NAD(P)H-зависимые клеточные ферменты оксидоредуктазы могут в определенных условиях отражать количество присутствующих жизнеспособных клеток. Анализ оценивает восстановление тетразолиевого красителя МТТ до пурпурного красителя формазана. МТТ (ThermoFisher, cat. # M-6494, исходный раствор 5 мг/мл в 1х PBS, выдерживаемый при -20°C) добавляли к клеткам (от 10 мкл до 100 мкл клеток/лунку) в 96-луночных планшетах, с конечной концентрацией 5 мкг/мл, и инкубировали в течение 1-2 ч при 37°C (инкубатор). После инкубации клетки лизировали добавлением 100 мкл изопропанола: 1МНCl (24:1, с добавлением 10% Triton X100, Sigma-Aldrich, X100-100ML) и энергичным пипетированием для растворения формазана. Планшеты считывали на Tecan Infinite® 200 Pro, и сигналы МТТ измеряли в течение 1 часа путем вычитания значения OD при 650 нм из значения OD при 570 нм. Клетки без МТТ, пустые или со средой, были включены в качестве контроля для устранения фонового сигнала.

Результаты анализа бляшек, которые показаны в Таблице 7, показывают общую тенденцию к увеличению средней БОЕ/образец в присутствии супернатантов ADSC, указывая на то, что супернатанты ADSC способны сенсibilизировать клетки B16 к L14 и к инфекции WT1 VV. Результаты анализа МТТ (таблица 8) показывают отсутствие существенного влияния одних только супернатантов ADSC на выживаемость клеток B16, инфицированных L14 или WT1 VV.

Таблица 7. Результаты анализа бляшек для клеток B16, инфицированных L14 VV и WT1 VV

Донор супернатанта	Среднее значение БОЕ / образец	
	L14 VV	WT1 VV

контроль	1.80×10^4	9.00×10^1
RM20	1.70×10^4	2.70×10^2
RM35	4.10×10^4	3.10×10^2
BH21	3.30×10^4	4.25×10^2
RM58	4.10×10^4	5.30×10^2

Таблица 8. Результаты МТТ анализа В16.

Донор супернатанта	Относительная жизнеспособность (МТТ)		
	Контроль	L14 VV	WT1 VV
Норма. МТТ	1,00	0,50	0,71
контроль	0.73	0.75	0.70
RM20	0.78	0.79	0.62
RM35	0.73	0.67	0.70
BH21	0.89	0.80	0.72
RM58	1.00	0.50	0.71

III. Вирусная инфекция клеток K562 в присутствии супернатантов ADSC или ADSC

100000 клеток K562 были инфицированы TurboFP635 + (флуоресцентно меченые) L14 VV с MOI 0,1 в течение 96 часов в 96-луночных и добавлены супернатанты от четырех разных доноров ADSC (RM20, RM35, BH21 и RM58). Был проведен анализ проточной цитометрии и зарегистрирован процент клеток K562, инфицированных L14 VV, и средняя интенсивность флуоресценции (MFI). Анализ бляшек использовали для определения вирусных титров, а анализ МТТ использовали для определения жизнеспособности клеток. Результаты показали небольшое увеличение частоты (процента) инфицированных клеток K562 (Таблица 9), TurboFP635 + MFI (Таблица 10) и вирусных титров (Таблица 11), но не показали значительного влияния на общую выживаемость высокорезистентных клеток K562, как измерено с помощью анализа МТТ, демонстрирующего усиленное супернатантом ADSC инфицирование клеток K562.

Результаты показывают, что одни только супернатанты ADSC могут сенсibilизировать клетки K562 к вирусной инфекции, но не приводят к значительному онколизу. Эффекты ADSC сравнивали с эффектами супернатантов ADSC. 100000 клеток K562 инфицировали L14 VV при MOI 0,1, но вместо супернатантов ADSC клетки K562 совместно культивировали с 5000 или 20000 ADSC RM20-eGFP в трех экземплярах. Флуоресцентная визуализация и анализ проточной цитометрии

показывают, что зеленые флуоресцентные ADSC привлекают немеченые/серые клетки K562 и резко увеличивают процент инфицированных клеток K562. Несмотря на усиленную инфекционность высокорезистентных клеток K562 (таблица 12), ADSC в конечном итоге не смогли уничтожить или существенно повлиять на их общую выживаемость (таблица 13), что согласуется с минимальной способностью клеток K562 амплифицировать вирус осповакцины, которая отличается от способности ADSC усиливать инфицирование.

Результаты показывают, что ADSC обладают уникальными свойствами как амплификации вируса (примерно в 10000 раз или 5000 БОЕ/клетка), так и распространения его на опухолевые клетки. Это можно объяснить более высокой локальной множественностью инфекции (MOI). Этот эффект, по крайней мере частично, обусловлен секрецией неидентифицированных растворимых факторов, присутствующих в супернатантах ADSC. Наблюдаемые потенцирующие эффекты супернатантов ADSC на частоту инфицирования клеток B16 и K562 и амплификацию вируса были относительно небольшими (примерно в 2 раза), что указывает на то, что для успешной терапии резистентных опухолей требуются не только свойства сенсibilизации и амплификации ADSC и их супернатантов, а также способность самих ADSC привлекать и потенцировать мышиные и человеческие опухолевые клетки для инфицирования.

Таблица 9. Частота инфицирования клеток K562

Доноры супернатантов ADSC	% TurboFP635 + инфицированные клетки K562
Контроль	2.11
RM20	2.69
RM35	3.31
BH21	3.43
RM58	4.32

Таблица 10. MFI TurboFP635 + инфицированные клетки K562

Доноры супернатантов ADSC	Средняя MFI
Контроль	8.30×10^3
RM20	1.02×10^4
RM35	1.11×10^4
BH21	9.70×10^3

Доноры супернатантов ADSC	Средняя MFI
RM58	1.26×10^4

Таблица 11. Результаты анализа бляшек.

Доноры супернатантов ADSC	Среднее значение БОЕ / образец
Контроль	1.00×10^4
RM20	1.50×10^4
RM35	1.85×10^4
ВН21	1.55×10^4
RM58	1.70×10^4

Таблица 12. Влияние ADSC на инфицирование клеток K562 с L14VV

Количество ADSC	TurboFP635 + Среднее количество инфицированных клеток K562
Контроль	119
5 тыс.	853
20 тыс.	1700

Таблица 13. Влияние ADSC на эрадикацию клеток K562

ADSC / вирус	# Живые клетки K562	# Живые инфициров анные клетки K562	# Мертвые клетки K562	# Мертвые инфициров анные клетки K562	Всего клеток	#
Контроль	3854 ± 258	0.33 ± 0.58	7876 ± 1241	3.67 ± 1.53	11730 1412	±
5 тыс. ADSC	5870 ± 2793	1.67 ± 2.89	6819 ± 2740	3.33 ± 1.15	12689 5533	±
20 тыс. ADSC	10006 ± 1075	0.33 ± 0.58	5468 ± 2121	1.33 ± 0.58	15474 2638	±
L14 VV	5451 ± 1230	119 ± 22	12477 ± 2436	45 ± 8	17928 3665	±
5 тыс. ADSC	6363 ± 3103	853 ± 507	9749 ± 4714	259 ± 128	16113	±

+ L14 VV					7811
20 тыс. ADSC + L14 VV	7025 ± 5137	1700 ± 1183	8637 ± 6448	394 ± 260	15663 ± 11577

Пример 4

Анализ параметров иммунитета для идентификации комбинаций онколитического вируса и клеток-носителей для лечения субъекта

Как описано в данном документе, оптимальная комбинация носителя для доставки онколитического вируса и клеток облегчает вирусную амплификацию и онколиз у субъекта, подлежащего лечению, одновременно предотвращая активацию иммунной системы и подавляя вызванную вирусом активацию иммунной системы во время доставки вируса к опухолям. Предыдущие примеры демонстрируют, как оценивать клетки-носители, такие как ADSC, на предмет их потенциала вирусной амплификации, их способности сенсibilизировать опухолевые/раковые клетки к инфицированию вирусом и их умении способствовать онколизу вирусом (*например*, путем привлечения опухолевых/раковых клеток).

В этом примере оцениваются специфические для субъекта иммунные ограничения, которые могут сокращать терапевтический потенциал готовых средств доставки на основе клеток для доставки онколитических вирусов к опухолевым/раковым клеткам. Такие ограничения включают, *например*, индуцированную вирусом и/или индуцированную аллогенными клетками-носителями активацию иммунитета, такую как, *например*, IFN γ и цитотоксические реакции. Эти реакции исходят от врожденных (NK, NKT) и приобретенных (T) иммунных клеток неправильно подобранных субъектов / реципиентов. Этот пример демонстрирует, что клетки-носители, которые обычно соответствуют требованиям хорошего носителя для вирусной терапии при аутологическом или аллогенном введении, такие как ADSC (т.е. они способствуют амплификации вируса и демонстрируют уклонение и/или подавление врожденных и/или приобретенных реакций иммунитета к вирусу и/или клетке-носителю), тем не менее, иногда могут быть менее эффективными в определенных аллогенных условиях.

Для оценки потенциальных реакций иммунитета субъектов на клетки-носители/онколитический вирус, клетки-носители (аутологичные или аллогенные), онколитический вирус и полученные от субъекта иммунные клетки (*например*, PBMC, PBMC + плазма/сыворотка или цельная кровь с лизисом эритроцитов или без него) совместно культивируются. Влияние иммунной индукции комбинаций носителей для

доставки на основе онколитического вируса и аллогенных клеток и параллельная иммуносупрессия, индуцированная носителем на основе аллогенных/аутологических клеток, оценивается с использованием, *например*, ELISPOT или анализа проточной цитометрии (или его эквивалентов), таких как CyTOF, *например*), на основе маркеров, идентифицирующих различные популяции иммунных клеток, включая Т-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, CD3, CD4, CD8), NK-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, NKp46, CD16, CD56) и NKT-клетки (такие как, но не ограничиваясь ими, тетрамеры CD3, CD16, CD56, NKp46, aGalCer-CD1d), а также маркеров активации/эффекторной функции, включая, но не ограничиваясь ими: CD69, CD25, CD71, CD27 (CD70L), CD154 (CD40L), CD137 (4-1BB), CD44, CD45RA, CD45RO, CD278 (ICOS), CD127 (IL-7RA), CD183 (CXCR3), CD197 (CCR7), CD39, CD73, CD314 (NKG2D), PD-1, CTLA-4, IFN α/β , IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, GM-CSF, IL-17, IL-6, CD107a, CD107b, TGF β , перфорин, гранзим В, IL-1a / IL-1b, G-CSF, RANTES, EXOTAXIN, MIP-1b, MCP-1, EGF, HGF, VEGF, IL-1RA, IL-7, IP-10, IL-2R, MIG и IL-8.

А. Иммуносупрессивные свойства ADSC в аутологических и аллогенных условиях

Чтобы оценить способность ADSC преодолевать иммунные барьеры, была протестирована их способность подавлять NK-клетки в присутствии аутологических или аллогенных PBMC человека. 250000 свежевыделенных PBMC RM20 совместно культивировали в течение 48 часов с 10000 или 100000 аутологических (RM20) или аллогенных (RM35) ADSC. PBMC совместно культивировали (100 мкл) с ADSC (50 мкл) в течение 48 часов на 96-луночных планшетах и в общей сложности 200 мкл среды R10 (RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, L-глутамина и Pen/Strep). В конце 48-часового инкубационного периода совместные культуры подвергали дополнительной 4-часовой стимуляции NK-клеток с помощью 250 000 клеток K562 или PMA/иономицина (50 мкл) с помощью монензина/брефельдина А (50 мкл), по необходимости.

Частоту (процентное содержание) NK- и Т-клеток, а также степень активации NK-клеток и цитотоксической активности NK оценивали с помощью анализа проточной цитометрии только на PBMC, PBMC + 10 000 или + 100 000 аутологических ADSC и PBMC + 10 000 или + 100 000 аллогенных ADSC. Для анализа проточной цитометрии совместные культуры PBMC и ADSC выделяли пипетированием и переносили в планшеты с V-образным дном, где их промывали буфером FACS (1x PBS с 1% FBS) и окрашивали поверхность в течение 30 минут при 4°C в буфере FACS с добавлением следующей смеси антител: анти-человеческий CD3-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, cat. #

300328, в 1:50), анти-человеческий CD335 или NKp46-PE (BioLegend, cat. # 331908, в 1:50), анти-человеческий CD69-APC (BioLegend, cat. # 310910, в 1:50). Буфер FACS также содержал зонд жизнеспособности (ThermoFisher Scientific, LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, for 405 nm, cat. # L34964, в 1:1000). После окрашивания клетки дважды промывали буфером FACS, фиксировали в 2% PFA в 1x PBS в течение 15 мин при комнатной температуре, снова промывали буфером FACS для удаления PFA и анализировали на BD FACS Aria II. Для оценки цитотоксических функций анти-человеческий CD107a-Alexaflor 488 (BioLegend, cat. # 328610) добавляли непосредственно к совместным культурам в соотношении 1:20 (10 мкл/лунка) за 5 часов до выделения и окрашивания поверхности с последующим добавлением монензина в соотношении 1: 1000 через час для дополнительной 4-часовой инкубации при 37°C (BioLegend, cat. # 420701-BL, 1000X).

Процентное содержание NK- и Т-клеток определяли в аутологичных и аллогенных совместных культурах и сравнивали с контролем только PBMC. Результаты приведены в Таблице 14 ниже. Было обнаружено, что аутологичная и аллогенная в условиях ADSC-опосредованная иммуносупрессия не влияет на частоту NK- и Т-клеток.

Таблица 14. Влияние опосредованных ADSC эффектов иммуносупрессии на частоту NK- и Т-клеток

Культуры / Условия	% NK клеток		% Т-клеток	
	Аутологичные (RM20) ADSC + RM20 PBMC	Аллогенные (RM35) ADSC + RM20 PBMC	Аутологичные (RM20) ADSC + RM20 PBMC	Аллогенные (RM35) ADSC + RM20 PBMC
(-) ADSC	17,90	18,37	66,90	66,27
10 тыс. ADSC	21,40	21,77	63,80	62,57
100 тыс. ADSC	19,93	20,40	64,30	64,17
(-) ADSC (+) K562	12,33	14,03	68,50	65,97
10 тыс ADSC (+) K562	21,90	17,23	58,70	65,53
100 тыс. ADSC (+) K562	21,23	21,70	59,50	58,87
(-) ADSC (+)PMA + Иономицин	2,57	2,29	74,65	75,35

Культуры / Условия	% NK клеток		% Т-клеток	
	Аутологичные (RM20) ADSC + RM20 PBMC	Аллогенные (RM35) ADSC + RM20 PBMC	Аутологичные (RM20) ADSC + RM20 PBMC	Аллогенные (RM35) ADSC + RM20 PBMC
10 тыс. ADSC (+)PMA + Иономицин	1,61	1,99	76,15	79,35
100 тыс. ADSC (+)PMA + Иономицин	1.18	1.05	75,10	75,95

Анализ проточной цитометрии активации NK с использованием позитивной регуляции CD69 на стробированных живых CD3⁻NKp46⁺NK-клетках (таблица 15) показывает, что активность CD69 повышалась, когда PBMC совместно культивировали с аутологичными (RM20) или с аллогенными (RM35) ADSC после стимуляции с клетками K562 или PMA/иономицин. Проточно-цитометрический анализ цитотоксических функций NK-клеток с использованием поверхностного воздействия CD107a (таблица 15) показывает повышенную регуляцию CD107a в совместных культурах PBMC с аутологичными и аллогенными ADSC.

Таким образом, совместные культуры PBMC с ADSC демонстрируют значительные зависимые от дозы иммуносупрессивные эффекты против иммунного ответа NK-клеток, который стимулировался воздействием на клетки-мишени K562. Иммуносупрессивный эффект наблюдался в аутологичных и аллогенных условиях, демонстрируя, что ADSC могут подавлять NK-клетки в аутологичных и аллогенных условиях.

Таблица 15. % CD69⁺ и CD107a⁺NK-клеток в аутологичных и аллогенных культурах

Культуры / Условия	% CD69 ⁺ NK-клетки		% CD107a ⁺ NK-клетки	
	Аутологичные (RM20) ADSC + RM20 PBMC	Аллогенные (RM35) ADSC + RM20 PBMC	Аутологичные (RM20) ADSC + RM20 PBMC	Аллогенные (RM35) ADSC + RM20 PBMC
(-) ADSC	8.49	12.09	4.15	3.71
10 тыс. ADSC	5.02	7.90	1.58	1.55
100 тыс. ADSC	2.72	2.02	0.62	1.10

Культуры / Условия	% CD69 ⁺ NK-клетки		% CD107a ⁺ NK-клетки	
	Аутологичные (RM20) ADSC + RM20 PBMC	Аллогенные (RM35) ADSC + RM20 PBMC	Аутологичные (RM20) ADSC + RM20 PBMC	Аллогенные (RM35) ADSC + RM20 PBMC
(-) ADSC (+) K562	81.57	85.00	55.68	53.70
10 тыс. ADSC (+) K562	44.90	66.23	28.66	39.53
100 тыс. ADSC (+) K562	29.47	42.60	11.16	25.14
(-) ADSC (+)PMA + Иономицин	96.20	95.30	29.98	22.62
10 тыс. ADSC (+)PMA + Иономицин	86.20	94.30	41.04	42.95
100 тыс. ADSC (+)PMA + Иономицин	64.05	77.60	48.61	46.56

Б. Подавление аллогенными стволовыми клетками вирус-индуцированных ответов Т, NK и NKT-клеток

Способность аллогенных стволовых клеток преодолевать иммунные барьеры коррелирует с их способностью подавлять индуцированные вирусом ответы Т, NK и NKT-подобных клеток. Способность аллогенных ADSC от донора RM35 специфически подавлять вирус-индуцированные ответы, опосредованные NK, Т и NKT-клетками, была протестирована в новой группе из двух доноров PBMC, чтобы выявить возможные ограничения, специфичные для пациента.

250 000 PBMC (100 мкл) от двух разных доноров крови (RM47 и RM48) культивировали совместно с 400; 2000; 10000 или 60000 аллогенными ADSC RM35 (50 мкл) в течение 48 часов на 96-луночных планшетах, всего 200 мкл среды R10 (RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, L-глутамина и Pen / Strep) в присутствии или отсутствие 10 000 БОЕ (50 мкл) WT1 VV (ACAM2000). Анализ проточной цитометрии стробированных живых Т, NK и NKT-подобных клеток выполняли для определения процента CD69⁺ активированных клеток каждого типа иммунных клеток в PBMC,

культивируемых отдельно (контроль), PBMC, культивируемых с WT1 VV (без ADSC), PBMC. + совместные культуры аллогенных ADSC без вируса и PBMC + аллогенные совместные культуры ADSC.

Результаты приведены в Таблице 16 ниже. Анализ проточной цитометрии з стробированных живых Т, NK и NKT-подобных клеток показывает, что процент CD69⁺ активированных Т-клеток, NK-клеток и NKT-клеток резко снизился в совместных культурах WT1 VV + PBMC + аллогенные ADSC по сравнению с WT1 VV + PBMC, культивированные без ADSC. Эти результаты демонстрируют, что аллогенные ADSC RM35 могут подавлять индуцированные вирусом осповакцины врожденные и приобретенные иммунные ответы.

4- часовую стимуляцию 250000 клеток K562 в конце 48-часового периода совместного культивирования использовали для оценки иммуносупрессивного потенциала аллогенных стволовых клеток. По сравнению с Т-клетками, NK-клетки были основной ответной популяцией, при этом комбинация вируса и низких доз стволовых клеток приводила к активации более 80% NK-клеток. Более низких доз стволовых клеток было недостаточно для иммуносупрессии и усиления вирусных иммунных ответов, что, возможно, отражает значительно усиленную амплификацию вируса. Однако более высокие дозы ADSC обеспечивали сильное подавление более слабых индуцированных вирусом осповакцины Т-клеточных ответов зависимым от дозы образом, указывая на то, что опосредованная стволовыми клетками иммуносупрессия преодолевает иммуностимулирующий эффект усиленной амплификации вируса.

Подавление противовирусных ответов NK-клеток было очевидным только при самых высоких дозах стволовых клеток и не было постоянным у двух протестированных доноров аллогенной крови. NK-клетки одного из доноров крови (RM48) ответили непосредственно на аллогенные ADSC. Используя стандартный 4-часовой анализ стимуляции K562 NK в конце 48-часового эксперимента по совместному культивированию PBMC / ADSC / VV, было продемонстрировано, что подавление антивирусных NK-ответов коррелировало с потерей иммунопривилегированного статуса стволовых клеток и иммунодепрессивных способностей. Была идентифицирована NKp46+CD3⁺ NKT -подобная популяция клеток, которая энергично ответила на вирусную инфекцию с повышенной регуляцией маркеров активации. Эта популяция клеток проявила способность к быстрому и избирательному распространению в ответ на вирус осповакцины, что согласуется с уже установленной ролью NKT-клеток в борьбе с вирусными инфекциями.

Таблица 16. Реакции NK-, T- и NKT-клеток

		% CD69 ⁺ T-клетки		% CD69 ⁺ NK-клетки		% CD69 ⁺ NKT-клетки	
	Количество клеток RM35 ADSC	RM47 PBMC	RM48 PBMC	RM47 PBMC	RM48 PBMC	RM47 PBMC	RM48 PBMC
Отсутствие вируса (только PBMC)	контроль	0.77	1.34	3.57	3.90	16.40	2.94
	60 тыс.	1.06	2.72	4.80	20.05	30.80	3.27
	10 тыс.	1.26	1.29	3.65	6.77	24.70	3.17
	2 тыс.	1.13	1.19	4.37	3.86	20.85	1.63
	0,4 тыс.	0.82	1.52	3.30	3.58	15.40	2.79
	контроль + K562	3.47	2.31	83.70	73.35	51.25	8.54
	60 тыс. + K562	1.29	1.80	36.70	46.90	34.75	3.47
	10 тыс + K562	1.53	1.20	62.50	46.40	33.75	2.28
	2 тыс + K562	1.63	1.12	68.65	42.60	30.55	4.40
	0,4 тыс + K562	2.28	0.92	75.70	47.90	24.05	6.49
+ WT1 VV	контроль	15.80	21.95	40.80	76.45	52.40	39.60
	60 тыс.	1.05	2.43	14.39	47.55	36.00	10.43
	10 тыс.	4.05	6.29	75.05	86.10	65.85	37.75
	2 тыс.	13.80	10.65	74.20	75.00	82.70	35.85
	0,4 тыс.	19.30	12.75	64.35	71.60	73.30	33.45
	контроль + K562	30.25	33.95	94.25	97.85	82.80	53.40
	60 тыс + K562	1.28	6.09	46.70	90.10	40.05	28.50
	10 тыс + K562	5.89	11.50	89.20	95.50	72.90	45.95
	2 тыс + K562	20.10	15.25	94.10	94.85	84.60	42.60
	0,4 тыс + K562	24.60	13.25	93.00	92.55	81.30	31.65

В. Определение индивидуального ответа на аллогенные стволовые клетки

Иммуносупрессивные способности и способность к амплификации вируса аллогенных ADSC, полученных от донора RM20 (пример 1), оценивали и тестировали на более широкой группе доноров PBMC для определения ограничений, специфичных для пациента.

250 000 PBMC от четырех разных доноров крови (SIBD01, SIBD02, RM52, RM53) культивировали вместе с 5000; 10,000; 20,000; или 40000 аллогенными ADSC RM20 в течение 48 часов в присутствии или отсутствии 5000 БОЕ WT1 VV. Анализ проточной цитометрии выполняли, как описано выше, для определения процентного содержания CD69⁺ активированных NK, T и NKT-клеток. PBMC, культивированные без стволовых клеток, использовали в качестве контроля. Результаты, показанные в таблицах 17-19, согласуются с предыдущими данными, показывая, что те же ADSC RM20 при тестировании на панели из 4 новых аллогенных доноров PBMC могут запускать прямые ответы NK-, T- и NKT-клеток в зависимости от субъекта. Высокая вариативность между субъектами наблюдалась в ответах NK-, T- и NKT-клеток как на аллогенные стволовые клетки, так и на вирус. Два донора крови показали противоположные результаты, причем SIBD01 был наиболее устойчивым, а SIBD02 - наиболее благоприятным для аллогенных ADSC.

Таблица 17. Реакции NK-клеток на аллогенные ADSC

		% CD69 ⁺⁺ NK-клетки			
	RM20 ADSC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC	RM52 PBMC	RM53 PBMC
Отсутствие вируса	контроль	9.35	4.88	7.02	20.60
	40 тыс.	47.15	8.77	12.20	32.00
	20 тыс.	34.15	8.83	12.05	29.70
	10 тыс.	31.15	13.81	9.51	30.30
	5 тыс	27.40	7.99	15.47	26.50
+ WT1 VV	контроль	63.30	32.70	82.95	32.15
	40 тыс.	68.10	19.80	56.85	51.15
	20 тыс.	80.15	33.00	75.25	56.10
	10 тыс.	77.60	85.80	92.25	78.80
	5 тыс	81.20	87.75	90.90	66.15

Таблица 18. Реакции T-клеток на аллогенные ADSC

		% CD69 ⁺ T-клетки			
	RM20 ADSC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC	RM52 PBMC	RM53 PBMC
Отсутствие вируса	контроль	6.00	1.65	3.63	4.92
	40 тыс.	14.25	3.45	6.18	6.06

		% CD69 ⁺ Т-клетки			
	RM20 ADSC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC	RM52 PBMC	RM53 PBMC
	20 тыс.	11.90	3.11	6.08	5.79
	10 тыс.	9.16	2.48	5.59	4.86
	5 тыс.	9.97	2.16	8.77	5.19
+ WT1 VV	контроль	28.80	6.84	39.35	6.97
	40 тыс.	20.05	1.71	4.72	5.38
	20 тыс.	25.90	1.97	5.52	5.24
	10 тыс.	25.20	11.15	12.25	6.27
	5 тыс.	26.80	10.09	18.60	9.15

Таблица 19. Реакции NKT-клеток на аллогенные ADSC

		% CD69 ⁺ NKT-клетки			
	RM20 ADSC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC	RM52 PBMC	RM53 PBMC
Отсутствие вируса	контроль	9.49	36.80	29.45	42.85
	40 тыс.	37.00	68.95	26.20	57.05
	20 тыс.	35.00	54.85	34.75	56.40
	10 тыс.	27.30	50.10	40.50	73.10
	5 тыс.	20.35	41.25	34.50	35.65
+ WT1 VV	контроль	49.25	54.90	76.70	43.45
	40 тыс.	56.00	39.70	50.95	61.60
	20 тыс.	66.85	28.75	57.65	49.50
	10 тыс.	60.25	74.90	70.70	86.35
	5 тыс.	61.85	76.45	82.80	68.45

4- часовую стимуляцию 250000 клеток K562 в конце 48-часового периода совместного культивирования использовали для оценки степени супрессии NK-клеток аллогенными ADSC RM20 с использованием NK-клеток от доноров крови SIBD01 и SIBD02. Только PBMC использовали в качестве контроля. Анализ проточной цитометрии использовали для определения процента CD69⁺NK, Т и NKT-клеток, а анализ пятен использовали для количественной оценки амплификации вируса аллогенными ADSC в присутствии устойчивых/пермиссивных образцов донорской крови. Анализ проточной цитометрии (таблица 20) показал, что иммуносупрессивные

свойства ADSC не работают в неблагоприятных аллогенных условиях, когда стволовые клетки теряют свой иммунный привилегированный статус и непосредственно активируют NK- и Т-клетки даже в отсутствие вируса.

Эти иммунологические различия оказывают значительное влияние на потенциал амплификации вируса стволовыми клетками. Как показано в таблице 21, анализ бляшек 48-часовых совместных культур продемонстрировал, что ADSC RM20 могут амплифицировать вирус осповакцины WT1 только в присутствии аллогенных PBMC от пермиссивного донора SIBD02, но не от устойчивого донора SIBD01. Это демонстрирует, что неправильно подобранные стволовые клетки и доноры крови, представляющие потенциальных MSC-реципиентов, могут полностью аннулировать потенциал амплификации вируса аллогенных ADSC, тем самым выявляя критические специфические для пациента различия, которые могут привести к «пермиссивности» или «устойчивости» к ADSC.

Таблица 20. Реакции NK, Т и NKT клеток

		% CD69 ⁺ NK- клетки		% CD69 ⁺ Т клетки		% CD69 ⁺ NKT клетки	
	Количество клеток RM20 ADSC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC
Отсутствие вируса	контроль	5.65	3.37	2.38	1.10	7.23	26.45
	40 тыс.	57.05	5.88	10.41	3.14	33.90	36.00
	20 тыс.	30.75	4.19	6.43	1.27	22.85	51.70
	10 тыс.	15.85	4.70	4.70	1.00	13.55	40.85
	5 тыс	10.85	5.33	4.78	1.02	10.75	34.60
	контроль + K562	73.40	79.40	15.70	2.19	37.60	97.20
	40 тыс + K562	82.80	60.10	13.25	2.03	33.40	53.40
	20 тыс + K562	64.80	49.00	9.36	1.35	21.95	69.00
	10 тыс + K562	70.65	46.35	9.73	1.38	20.65	60.35
	5 тыс + K562	70.25	55.60	10.80	1.44	21.25	52.55
+ WT1 VV	контроль	65.10	33.40	19.10	6.46	46.50	47.20
	40 тыс.	86.20	10.56	20.75	1.39	64.50	14.25
	20 тыс.	84.30	8.23	21.05	1.35	64.50	19.20

		% CD69 ⁺ NK- клетки		% CD69 ⁺ Т клетки		% CD69 ⁺ NKT клетки	
	Количество клеток RM20 ADSC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC	SIBD01 PBMC	SIBD02 PBMC
	10 тыс.	77.55	7.16	19.00	1.11	57.50	23.55
	5 тыс	71.75	53.70	16.90	5.44	51.40	73.10
	контроль + K562	92.60	87.55	27.45	4.06	57.30	85.75
	40 тыс + K562	95.15	63.85	25.10	1.58	70.55	52.40
	20 тыс + K562	96.60	53.50	29.65	1.41	69.75	51.35
	10 тыс + K562	95.30	66.60	25.30	2.39	67.80	41.65
	5 тыс + K562	92.80	66.40	21.05	1.94	56.05	66.20

Таблица 21. Результаты анализа бляшек

Культуры Условия	Среднее значение БОЕ / образец		
	Только RM20 ADSC	RM20 ADSC + SIBD01 PBMC	RM20 ADSC + SIBD02 PBMC
Внесенный Вирус	1.05×10^4	-	-
Только PBMC	5.30×10^3	4.30×10^3	4.10×10^3
5 тыс. RM20 ADSC	3.25×10^4	3.90×10^3	4.45×10^3
10 тыс. RM20 ADSC	6.00×10^4	3.70×10^3	1.20×10^5
20 тыс. RM20 ADSC	1.65×10^5	3.90×10^3	2.00×10^5
40 тыс. RM20 ADSC	3.20×10^5	4.65×10^3	2.45×10^5

Был проведен корреляционный анализ ответов NK-, Т- и NKT-клеток (%CD69⁺ клеток, нормализованный к контрольным PBMC) на фоне наивысшей дозы (40 000) аллогенных ADSC. Результаты корреляционного анализа в таблицах 22-24, показывают, что вирус осповакцины индуцирует значительно скоординированные ответы NK, NKT и Т-клеток. Аналогичная корреляция очевидна для ответов NK и Т-клеток против аллогенных стволовых клеток, но реакция на вирус по сравнению с аллогенными ADSC была противоречивой и, вероятно, независимой друг от друга.

Таблица 22. Корреляционный анализ анти-WT1

Донор PBMC	NK	Т	NKT

Донор PBMC	NK	T	NKT
RM47	37.23	15.03	36.00
RM48	72.56	20.61	36.67
SIBD01	53.96	22.81	39.76
SIBD02	27.82	5.19	18.10
RM52	75.94	35.73	47.25
RM53	11.55	2.05	0.60

Таблица 23. Корреляционный анализ анти-ADSC

Донор PBMC	NK	T	NKT
RM47	1.23	0.29	14.40
RM48	16.16	1.38	0.33
SIBD01	37.82	8.26	27.51
SIBD02	3.89	1.80	32.15
RM52	5.19	2.55	-3.25
RM53	11.40	1.14	14.20

Таблица 24. Корреляционный анализ анти-ADSC+WT1

Донор PBMC	NK	T	NKT
RM47	10.82	0.28	19.60
RM48	43.66	1.09	7.50
SIBD01	58.76	14.06	46.51
SIBD02	14.92	0.060	2.90
RM52	49.84	1.10	21.50
RM53	30.55	0.47	18.75

Таким образом, доноры PBMC демонстрируют различные ответы на аллогенные стволовые клетки и вирус по отдельности или в комбинации. Эти индивидуальные различия указывают на то, что правильное соответствие между субъектом и клеткой-носителем может улучшить терапевтическую эффективность.

D. Субъектно-специфические иммунологические барьеры для выживания ADSC

Предварительно выявили пару доноров крови, которые были соответственно значительно устойчивы (SIBD01) и значительно перmissive (SIBD02) к аллогенным ADSC RM20. Затем этих доноров использовали для дальнейшего анализа основных

механизмов индивидуальной устойчивости к ADSC. 20 000 меченных eGFP ADSC RM20 культивировали совместно с 20 000 БОЕ L14 VV (MOI 1) в течение до 48 часов в присутствии 250 000 PBMC из устойчивых (SIBD01; «устойчивые PBMC») или пермиссивных (SIBD02; «пермиссивные PBMC»)) доноров крови. ADSC инфицировали вирусом во время совместного культивирования с PBMC или предварительно инфицировали в течение 1 часа в инкубаторе 37° при постоянном встряхивании, а затем добавляли к PBMC, не смывая остатки несвязанного вируса.

Через 24 часа и 48 часов были получены изображения флуоресценции следующих культур клеток: только ADSC, ADSC + устойчивые PBMC и ADSC + пермиссивный PBMC. Вирусная инфекция наблюдалась только в ADSC и в кокультурах ADSC + пермиссивный PBMC, но не в кокультурах ADSC + устойчивый PBMC. Сравнительный анализ выживаемости и потенциала амплификации аллогенных ADSC в случае пермиссивных и устойчивых PBMC показал, что устойчивость была связана с быстрой потерей стволовых клеток в присутствии устойчивых аллогенных PBMC и в отсутствие вирусной инфекции. Эти же стволовые клетки оставались нетронутыми при совместном культивировании с PBMC от пермиссивного реципиента. Предварительное инфицирование ADSC с помощью L14 VV не влияло на инфекцию в устойчивых PBMC, указывая на то, что предоставление вирусу «старта» для амплификации в клетке-носителе было недостаточным для преодоления иммунологических барьеров устойчивых PBMC.

Чтобы оценить влияние предварительного инфицирования ADSC с помощью L14 VV или WT1 VV на уровни вирусной инфекции, 2500; 5000; 10000 или 20000 ADSC были предварительно инкубированы с L14 VV или WT1 VV в течение 1 часа в инкубаторе 37° при постоянном встряхивании и проведен анализ бляшек на супернатантах. Результаты показаны в таблице 25. Было определено, что предварительного инфицирования было достаточно для того, чтобы примерно половина вируса (L14 VV или WT1 VV) проникла в клетки при использовании 20000 ADSC и что при более высоком MOI (меньшем количестве стволовых клеток) большая часть вируса, по-видимому, оставалась свободной и требовала более длительного времени для интеграции.

Таблица 25. Поглощение VV ADSC при инкубации в течение 1 ч

# ADSC	Среднее значение БОЕ / образец	
	WT1 VV	L14VV
Введенный вирус	15 500 ± 707	15 500 ± 707

2,5 тыс	14900 ± 1344	13175 ± 460
5 тыс	15525 ± 1732	16600 ± 990
10 тыс.	14975 ± 884	17525 ± 530
20 тыс.	7300 ± 212	7050 ± 424

Далее были оценены влияния предварительного инфицирования ADSC с помощью L14 В.В. или WT1 В.В. на амплификации вируса в ADSC / PBMC кокультурах. 2,500; 5000; 10000 и 20000 ADSC культивировали совместно с устойчивыми и пермиссивными PBMC, как описано выше, с параллельным инфицированием генетически аттенуированным вирусом осповакцины L14 и вирусом осповакцины дикого типа WT1 (ACAM2000). ADSC инфицировали вирусом во время совместного культивирования с PBMC или предварительно инфицировали в течение 1 часа в инкубаторе 37° при постоянном встряхивании, а затем добавляли к PBMC, не смывая остатки несвязанного вируса. Анализ бляшек при амплификации вируса осповакцины выполняли, как описано выше. Результаты (таблица 26) показывают, что, несмотря на потенциальное усиление инфицирования стволовыми клетками и ускорение амплификации вируса, 1-часовой предварительный «старт» оказал небольшое общее влияние на потенциал амплификации ADSC в присутствии аллогенных PBMC. Пермиссивные PBMC SIBD02 частично подавляли амплификацию L14 VV, но не WT1 VV. В отличие от основанного на Lister Turbo-FP635-сконструированного вируса L14, у которого locus TK инактивирован/удален, как и в большинстве генетически аттенуированных штаммов вируса осповакцины, WT1 / ACAM2000 представляет собой ТК-положительный вирус осповакцины Wyeth штамма дикого типа с более высоким потенциалом амплификации и способностью преодолевать более сильные аллогенные барьеры. Это связано с возможным более быстрым циклом амплификации и/или повышенной способностью уклоняться от противовирусного иммунитета. Эти преимущества вируса WT1, тем не менее, были недостаточными для преодоления иммунологических барьеров у устойчивого реципиента (SIBD01), и амплификация вируса была лишь незначительно улучшена за счет предварительного инфицирования стволовых клеток за час до совместного культивирования с аллогенными PBMC. Таким образом, специфические для пациента иммунологические барьеры для аллогенных ADSC могут ограничивать терапевтический потенциал генетически аттенуированных штаммов вируса осповакцины дикого типа.

Таблица 26. Результаты анализа бляшек

Количество	Среднее значение БОЕ / образец

клеток ADSC		Контроль	Контроль + 1 час пред. инфицирова ния	SIBD01 PBMC	SIBD01PBM C+ 1 час пред. инфицирова ния	SIBD02 PBMC	SIBD02 PBMCs+ 1 час пред. инфицирова ния
WT1 VV	2,5 тыс.	1.00×10^4	1.38×10^4	5.01×10^3	5.00×10^3	2.46×10^4	2.22×10^4
	5 тыс.	3.34×10^4	3.87×10^4	3.91×10^3	5.13×10^3	6.00×10^4	4.84×10^4
	10 тыс.	7.91×10^4	1.24×10^5	6.81×10^3	7.37×10^3	1.80×10^5	1.25×10^5
	20 тыс.	4.50×10^4	1.10×10^5	7.10×10^3	1.94×10^4	2.73×10^5	2.82×10^5
L14 VV	2,5 тыс.	1.06×10^4	1.29×10^4	3.06×10^3	3.62×10^3	4.01×10^3	5.39×10^3
	5 тыс.	4.30×10^4	4.34×10^4	4.46×10^3	4.68×10^3	8.97×10^3	1.13×10^4
	10 тыс.	1.22×10^5	1.07×10^5	4.09×10^3	5.10×10^3	2.66×10^4	2.83×10^4
	20 тыс.	1.29×10^5	1.30×10^5	1.86×10^3	2.27×10^3	4.54×10^4	3.21×10^5

Пример 5

Анализ субъектно-специфических генетических полиморфизмов

В этом примере представлен анализ гаплотипов для понимания факторов, которые могут способствовать отторжению аллогенных клеток-носителей субъектами, и способов решения этой проблемы. Определенные специфичные для субъекта генетические полиморфизмы могут привести к «иммунологическому несоответствию» между субъектом и аллогенными клетками-носителями. К соответствующим локусам включают, но не ограничиваются ими, *например*, классические гаплотипы МНС I / II, гаплотипы / лиганды KIR и не- классические гаплотипы МНС (такие как, *например*, HLA-E, CD1a, b, c, d и MICA / B).

Анализ соответствующих локусов генетических полиморфизмов, специфичных для конкретного человека, может быть выполнен, *например*, с использованием секвенирования следующего поколения. Профиль генетического полиморфизма каждого субъекта затем сравнивается с профилями каждого из доступных типов клеток-носителей для выявления несоответствий между субъектом и клетками-носителями, включая несовпадения МНС, несовпадения лигандов KIR и KIR и несовпадения в неклассических локусах МНС, и выявленные "иммунокомпрометирующие" несоответствия. «Иммунокомпрометирующие несоответствие» это несоответствие между субъектом и клеток - носителей в виде генетического полиморфизма локуса, который связан со значительным (*например*, 10% или более) снижением

%совместимости, как это определено с помощью методов сопоставления анализа представленных здесь.

А. Устойчивость к аллогенным ADSC связанная с несовпадениями HLA.

Оценивали устойчивость или пермиссивность к разным аллогенным линиям ADSC. 250000 PBMC от резистентных (SIBD01) и пермиссивных (SIBD02) доноров крови культивировали совместно в течение 48 часов с 40000 или 5000 аллогенных ADSC от четырех разных доноров (RM20, RM35, BH21 и RM58), инфицированных 5000 БОЕ WT1 VV. . В качестве контроля использовали только ADSC. Анализы бляшек выполняли, как описано выше. Результаты (таблица 27) показывают, что доноры крови SIBD01 и SIBD02 продемонстрировали широкую устойчивость и пермиссивность к четырем аллогенным линиям ADSC, соответственно. Четыре аллогенных линии ADSC амплифицировали вирус осповакцины только в присутствии PBMC от пермиссивного донора крови SIBD02.

Таблица 27. Результаты анализа бляшек

Условия	Среднее значение БОЕ / образец		
	Только ADSC	SIBD01 PBMC	SIBD01 PBMC
Введенный вирус	2.95×10^3	-	-
Только вирус	1.80×10^3	-	-
Только PBMC	-	1.30×10^3	2.05×10^3
RM20 40 тыс.	2.50×10^5	1.60×10^3	1.00×10^5
RM20 5 тыс.	1.10×10^4	1.55×10^3	1.70×10^4
RM35 40 тыс.	5.90×10^5	1.65×10^3	1.65×10^5
RM35 5 тыс.	3.80×10^4	1.60×10^3	4.80×10^4
BH21 40 тыс.	3.45×10^5	1.30×10^3	4.55×10^5
BH21 5 тыс.	2.90×10^4	1.95×10^3	3.15×10^4
RM58 40 тыс.	8.10×10^5	1.45×10^3	6.75×10^4
RM58 5 тыс.	6.35×10^4	2.10×10^3	2.25×10^5

Отторжение HLA-совпадающих клеток можно объяснить различиями в гаплотипе KIR или балансом передачи сигналов через ингибирующие (KIR, NKG2A / CD94) или стимулирующие (KIR, NKG2D) рецепторы NK-клеток. Типичный анализ HLA и KIR / MIC был выполнен с помощью NGSPROImmune (Oxford, UK) и SciscoGenetics (Seattle, USA) соответственно. Наличие / отсутствие известных эпитопов KIR-лигандов A3 / A11 (HLA-A), Bw4 (HLA-B) и C1 / C2 (HLA-C) в аллелях HLA PBMC (SIBD01, SIBD02) и ADSC (RM20 , RM35, BH21 и RM58) доноров были получены из

dorak.info/mhc/nkcell.html. Диморфизм -21M / T (метионин/треонин) у якорной аминокислоты из лидерной последовательности, который предсказывает сильное/слабое связывание и презентацию лидерных пептидов, производных от HLA-B, с помощью HLA-E, который обеспечивает ингибирующую передачу сигналов через NKG2A / CD94 рецепторов на NK-клетках, был получен из базы данных иммунополиморфизма (IPD) на ebi.ac.uk/ipd.

Был проведен анализ гаплотипов KIR, а также наличия известных лигандов KIR, включая эпитоп Bw4 (HLA-B) и слабые/сильные эпитопы C1 / C2 (HLA-C), включая анализ олигоморфных молекул MICA / B. которые служат лигандами для активирующих рецепторов NKG2D на NK-клетках. Также было проанализировано распределение и число копий длинных (L)-ингибирующих и коротких (S) -активирующих рецепторов KIR, а также общее количество присутствующих ингибирующих и активирующих рецепторов.

Результаты показывают отсутствие четкой корреляции между перmissивностью/резистентностью и гаплотипом KIR /KIR лигандами, -21M / T диморфизмом, и MICA/B олигоморфизмом. Стволовые клетки RM58 показали несовпадение C1/C2 лиганда KIR с устойчивым SIBD01 и с перmissивным SIBD02 донорами крови, что указывает на то, что одного этого несоответствия недостаточно для придания устойчивости. Более широкие детерминанты перmissивности по сравнению с устойчивостью коррелировали с частичным соответствием в основном по локусам HLA-A и HLA-DP, при этом широко перmissивный донор имел наиболее распространенный аллель HLA-A * 02: 01, а устойчивый донор имел HLA-A *. 01:01 аллель. Случай дискордантного HLA-A * 01: 01 может быть связан с несоответствием лиганда C2 KIR, которое в предыдущих исследованиях было связано с недостаточной передачей сигналов, подавляющих KIR, и опосредованным NK-клетками отторжением HLA-гаплоидентичного iPSC (Ichise *et al.* (2017) *StemCellReports*9:853-867). Таким образом, одних только данных HLA-типирования недостаточно для прогнозирования перmissивности по сравнению с устойчивостью, как видно из противоречивого случая HLA-A * 01: 01 RM58 ADSC. Эти данные показывают, что необходимо совместное рассмотрение различных локусов.

Б. Устойчивость к аллогенным ADSC связанная с быстрой индукцией цитотоксического ответа против стволовых клеток и ответа интерферона.

Для анализа CD107a и IFN γ , ответы на WT1 VV. и аллогенные ADSC в стробированных живых NK, NKT и T - клетках из PBMCA/ADSC/WT1 кокультур Части А была использована корреляционная проточная цитометрия. Результаты, приведенные

в таблицах 28-30, показывают, что все четыре линии аллогенных стволовых клеток из испытанных индуцируют гораздо сильные CD107a и IFN γ -ответы в клетках NK и Т от устойчивой, но не пермиссивной, донорской крови, даже в отсутствие вируса. Среднее процентное содержание единичных положительных лимфоцитов CD107a или IFN γ каждого типа клеток анализировали на основании трех лунок и нормализовали к соответствующему фону (нетронутые контрольные PBMC). У пермиссивного донора крови четыре аллогенных стволовых клетки подавляли спонтанные опосредованные NK-клетками ответы IFN γ ниже фонового уровня.

Таблица 28. Корреляции анти-WT1 (R: резистивный; P: пермиссивный)

Донор PBMC	NK	T	НКТ
R: SIBD01	0,0393	0,0099	0.200
P: SIBD02	0,0433	0,0011	0

Таблица 29. Корреляции анти-ADSC (R: резистивный; P: пермиссивный)

Донор PBMC	NK	T	НКТ
R: RM20	0,0307	0,0507	0,1200
R: RM35	0,0700	0,0600	0
R: BH21	0,0640	0,0620	0,1933
R: RM58	0,1813	0,1890	0,2867
P: RM20	-0,2305	0,0093	0
P: RM35	-0,1693	0,0089	0
P: BH21	-0,2148	0,0051	0
P: RM58	-0,2140	0,0114	0

Таблица 30. Корреляции анти-ADSC + WT1 (R: резистивный; P: пермиссивный)

Донор PBMC	NK	T	НКТ
R: RM20	0,1147	0,0950	0
R: RM35	0,0963	0,0366	0
R: BH21	0,0263	0,1357	0,0323
R: RM58	0,1593	0,1857	0,1933
P: RM20	-0,2043	0,0205	1,7533
P: RM35	-0,1557	0,0059	0
P: BH21	-0,2180	0,0010	0
P: RM58	-0,2333	0,0024	0

Анализ проточной цитометрии также показывает, что обработка вирусом осповакцины или аллогенными стволовыми клетками не оказывает значительного влияния на частоту популяции стробированных лимфоцитов. Исключением были $CD3^+NKp46^+$ NKT -подобные клетки от устойчивого донора крови SIBD01. Процент клеток увеличивался в ответ на присутствие аллогенных стволовых клеток и далее в присутствии вируса осповакцины (таблица 31). Широкая устойчивость донора SIBD01 к нескольким линиям аллогенных стволовых клеток может быть связана с необычно высокой частотой появления $CD3^+NKp46^+$ NKT -подобных клеток, которые были единственной популяцией клеток, численность которой увеличилась в ответ на присутствие вируса и аллогенных стволовых клеток.

Таблица 31. Процент NKT-клеток в ответ на аллогенные стволовые клетки / вирус

ДОНОР ADSC	Средний% клеток NKT			
	SIBD01 PBMC	SIBD01 + WT1 VV	SIBD02 PBMC	SIBD02 + WT1 VV
Контроль	0.3267	0.3233	0.0187	0.0210
RM20 40 тыс.	0.9867	1.6467	0.0215	0.0280
RM20 5 тыс.	0.400	0.8133	0.0200	0.0167
RM35 40 тыс.	0.9033	0.9150	0.0130	0.0267
RM35 5 тыс.	0.5500	0.8233	0.0175	0.0275
BH21 40 тыс.	0.87	1.5933	0.0187	0.0180
BH21 5 тыс.	0.4833	0.78	0.019	0.0220
RM58 40 тыс.	0.9867	1.5867	0.0283	0.0287
RM58 5 тыс.	0.5267	1.3633	0.0157	0.0255

В. NKT-подобные клетки - первые продуценты $IFN\gamma$

Для оценки иммунных ответов, индуцированных антивирусными и анти-стволовыми клетками, 2 000 или 10 000 ADSC RM20 культивировали совместно с 250 000 PBMC от устойчивого донора крови SIBD01 или перmissive SIBD02 и 5000 БОЕ WT1 VV. Стробированные живые NK, NKT и Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на активатор (поверхностное окрашивание CD69; таблицы 32-34) и эффекторные функции (внутриклеточное окрашивание на $IFN\gamma$; таблицы 35-37) через 6 часов и 24 часа. Значительная фоновая активация иммунных клеток была очевидна через 6 часов и уменьшилась к 24 часам. Через 6 часов только Т- и NKT-клетки от резистентного донора продемонстрировали индуцированную стволовыми клетками активацию CD69, но не ответы $IFN\gamma$. Через 24 часа все три подгруппы ответили на

аллогенные стволовые клетки положительной регуляцией маркера активации CD69, независимо от наличия или отсутствия вируса. В то время как ответ NK-клеток был наиболее сильным, только подмножество NKT проявляло статистически значимые ответы IFN γ , индуцированные стволовыми клетками, что указывает на то, что NKT-клетки могут быть первым подтипом иммунных клеток, вызывающим ответы эффекторных цитокинов против аллогенных стволовых клеток. NK, NKT и Т-клетки от пермиссивного донора не повышали регуляцию CD69 или не продуцировали IFN γ в ответ на стволовые клетки на протяжении всего времени. По прошествии 24 часов аллогенные стволовые клетки были способны даже подавлять продукцию IFN γ пермиссивными донорскими NK-клетками ниже уровня фона.

Таблица 32. Процент активированных NK-клеток

Условия	% CD69 ⁺ NK-клеток			
	SIBD01 PBMC	SIBD01 + WT1 VV	SIBD02 PBMC	SIBD02 + WT1 VV
контроль 6 ч	32.20	35.67	48.33	46.17
10 тыс. ADSC 6ч	32.00	33.97	43.43	43.23
2 тыс ADSC 6ч	31.43	36.57	45.10	45.70
контроль 24ч	10.90	13.60	10.50	8.57
10 тыс ADSC 24ч	52.43	86.83	15.50	20.30
2 тыс ADSC 24ч	24.60	39.40	7.69	9.31

Таблица 32. Процент активированных Т-клеток

Условия	% CD69 ⁺ Т клеток			
	SIBD01 PBMC	SIBD01 + WT1 VV	SIBD02 PBMC	SIBD02 + WT1 VV
контроль 6 ч	3.81	3.66	2.15	2.05
10 тыс. ADSC 6ч	6.26	6.08	2.23	2.36
2 тыс ADSC 6ч	3.62	3.73	2.67	1.97
контроль 24ч	2.74	2.45	0.76	0.58
10 тыс ADSC 24ч	8.60	23.63	1.39	1.36
2 тыс ADSC 24ч	4.02	5.25	0.72	0.75

Таблица 34. Процент активированных NKT-клеток

Условия	% CD69 ⁺ NKT-клеток

	SIBD01 PBMC	SIBD01 + WT1 VV	SIBD02 PBMC	SIBD02 + WT1 VV
контроль 6 ч	7.35	7.82	18.77	23.43
10 тыс. ADSC 6ч	11.00	10.70	22.37	20.17
2 тыс ADSC 6ч	7.44	7.91	23.87	17.47
контроль 24ч	5.43	6.10	8.30	11.07
10 тыс ADSC 24ч	23.00	48.33	17.37	16.60
2 тыс ADSC 24ч	10.79	11.90	10.88	9.08

Таблица 35. Процент IFN γ + NK клеток

Условия	% IFN γ + NK клеток			
	SIBD01 PBMC	SIBD01 + WT1 VV	SIBD02 PBMC	SIBD02 + WT1 VV
контроль 6 ч	0.37	0.34	0.60	0.68
10 тыс. ADSC 6ч	0.31	0.34	0.37	0.54
2 тыс ADSC 6ч	0.24	0.36	0.56	0.62
контроль 24ч	1.10	1.05	3.39	2.06
10 тыс ADSC 24ч	0.54	0.80	1.02	0.42
2 тыс ADSC 24ч	0.38	0.37	1.01	0.51

Таблица 36. Процент IFN γ + T- клеток

Условия	% IFN γ + T клеток			
	SIBD01 PBMC	SIBD01 + WT1 VV	SIBD02 PBMC	SIBD02 + WT1 VV
контроль 6 ч	0.10	0.12	0.05	0.05
10 тыс. ADSC 6ч	0.09	0.09	0.04	0.05
2 тыс ADSC 6ч	0.08	0.10	0.04	0.06
контроль 24ч	0.26	0.17	0.20	0.03
10 тыс ADSC 24ч	0.54	0.53	0.23	0.02
2 тыс ADSC 24ч	0.27	0.20	0.30	0.02

Таблица 37. Процент IFN γ +NKT-клеток

Условия	% IFN γ + NKT клеток			
	SIBD01 PBMC	SIBD01 + WT1	SIBD02 PBMC	SIBD02 + WT1

		VV		VV
контроль 6 ч	1.46	1.17	4.96	10.67
10 тыс. ADSC 6ч	1.83	1.50	3.04	3.85
2 тыс ADSC 6ч	1.93	2.20	4.87	4.38
контроль 24ч	1.00	0.60	2.99	1.28
10 тыс ADSC 24ч	5.07	4.93	2.21	0.92
2 тыс ADSC 24ч	0.78	0.70	3.07	0.90

Г. Влияние предварительной обработки IFN γ на ADSC на ответы иммунных клеток в пермиссивных и устойчивых PBMC

Чтобы изучить потенциальные пагубные эффекты секреции IFN γ на взаимодействия между иммунными клетками и аллогенными стволовыми клетками, которые могут происходить *in vivo*, стволовые клетки предварительно обрабатывали IFN γ перед совместным культивированием с PBMC в присутствии или в отсутствие вируса осповакцины. PBMC устойчивого (SIBD01) и нескольких пермиссивных (SIBD02, RM52, RM53) доноров крови культивировали совместно с увеличивающимся количеством аллогенных ADSC RM20 (5000; 10000; 20000 или 40000), которые не подвергались или предварительно обрабатывались 20 нг / мл IFN γ в течение 48 часов. Анализ проточной цитометрии стробированных NK, NKT и Т-клеток выполняли, как описано ранее.

Было определено, что предварительная обработка IFN γ усиливала, а не подавляла, ответы NK и Т-клеток у пермиссивных доноров в присутствии, а также и в отсутствие вируса осповакцины WT1 (таблицы 38-43). Данные также демонстрируют, что более поздний пассаж стволовых клеток RM20 (p12) сохраняет некоторую способность к иммуносупрессии Т-клеток, но теряет способность подавлять NK-клетки. Стимуляция NK-клеток с помощью линии NK-специфических стимулирующих клеток, K562, индуцирует непрямую активацию ответов Т- и NKT-клеток, что свидетельствует о перекрестном взаимодействии NK-NKT-Т-клеток (таблицы 44-46).

Таким образом, хотя соответствие HLA или KIR может играть роль в определении пермиссивности или устойчивости к клетке-носителю, на конечную терапевтическую эффективность типа клетки-носителя могут влиять другие индивидуальные различия, включая врожденный и приобретенный состав иммунных клеток, статус активации и чувствительность к несоответствию вирус/аллогенная клетка. Например, было обнаружено, что независимо от степени частичного совпадения лигандов HLA или KIR / KIR, способность аллогенных ADSC эффективно амплифицировать вирус была связана с

отсутствием значительного ответа $IFN\gamma$ и реакции цитотоксических NK и Т-клеток по всем четырем протестированным аллогенным линиям ADSC. Анализ PBMC от значительно устойчивого реципиента SIBD01 показывает, что неправильно подобранные аллогенные стволовые клетки индуцируют детектируемый ответ $IFN\gamma$ даже в отсутствие вирусной инфекции. Этот ответ, по-видимому, исходит от NK и Т-клеток. В то время как Т-клетки представляют собой основную часть ранних продуцирующих $IFN\gamma$ клеток, NK-клетки демонстрируют наивысшую пропорциональную цитотоксическую активность, что свидетельствует о существовании перекрестных связей между популяциями клеток врожденного и приобретенного иммунитета.

Таблица 38. Влияние предварительной обработки $IFN\gamma$ на активацию NK - клеток в присутствии WT1 VV

	% CD69 ⁺ NK клеток		
	Только ADSC	ADSC + WT1 VV	$IFN\gamma$ ADSC + WT1 VV
Только SIBD01 PBMC	9.35	63.30	-
SIBD01 + 40 тыс. RM20	47.15	68.10	81.25
SIBD01 + 20 тыс. RM20	34.15	80.15	70.75
SIBD01 + 10 тыс. RM20	31.15	77.60	46.65
SIBD01 + 5 тыс. RM20	27.40	81.20	77.70
Только SIBD02 PBMC	4.88	32.70	-
SIBD02+ 40 тыс. RM20	8.77	19.80	91.15
SIBD02+ 20 тыс. RM20	8.83	33.00	92.50
SIBD02+ 10 тыс. RM20	13.81	85.80	93.00
SIBD02+ 5 тыс. RM20	7.99	87.75	92.25
Только RM52 PBMC	7.02	82.95	-
RM52 + 40 тыс. RM20	12.20	56.85	92.70
RM52 + 20 тыс. RM20	12.05	75.25	95.00
RM52 + 10 тыс. RM20	9.51	92.25	81.35
RM52 + 5 тыс. RM20	15.47	90.90	97.50
Только RM53 PBMC	20.60	32.15	-
RM53 + 40 тыс. RM20	32.00	51.15	96.60
RM53 + 20 тыс. RM20	29.70	56.10	97.30
RM53 + 10 тыс. RM20	30.30	78.80	94.10

	% CD69 ⁺ NK клеток		
	Только ADSC	ADSC + WT1 VV	IFN γ ADSC + WT1 VV
RM53 + 5 тыс. RM20	26.50	66.15	92.15

Таблица 39. Влияние предварительной обработки IFN γ на активацию Т - клеток в присутствии WT1 VV

	% CD69 ⁺ Тклеток		
	Только ADSC	ADSC + WT1 VV	IFN γ ADSC + WT1 VV
Только SIBD01 PBMC	6.00	28.80	-
SIBD01 + 40 тыс. RM20	14.25	20.05	27.80
SIBD01 + 20 тыс. RM20	11.90	25.90	25.15
SIBD01 + 10 тыс. RM20	9.16	25.20	10.47
SIBD01 + 5 тыс. RM20	9.97	26.80	29.90
Только SIBD02 PBMC	1.65	6.84	-
SIBD02+ 40 тыс. RM20	3.45	1.71	10.20
SIBD02+ 20 тыс. RM20	3.11	1.97	11.55
SIBD02+ 10 тыс. RM20	2.48	11.15	12.50
SIBD02+ 5 тыс. RM20	2.16	10.09	11.80
Только RM52 PBMC	3.63	39.35	-
RM52 + 40 тыс. RM20	6.18	4.72	8.51
RM52 + 20 тыс. RM20	6.08	5.52	12.40
RM52 + 10 тыс. RM20	5.59	12.25	15.90
RM52 + 5 тыс. RM20	8.77	18.60	16.50
Только RM53 PBMC	4.92	6.97	-
RM53 + 40 тыс. RM20	6.06	5.38	16.60
RM53 + 20 тыс. RM20	5.79	5.24	18.10
RM53 + 10 тыс. RM20	4.86	6.27	18.95
RM53 + 5 тыс. RM20	5.19	9.15	13.55

Таблица 40. Влияние предварительной обработки IFN γ на активацию NKT - клеток в присутствии WT1 VV

	% CD69 ⁺ NKT- клеток

	Только ADSC	ADSC + WT1 VV	IFN γ ADSC + WT1 VV
Только SIBD01 PBMC	9.49	49.25	-
SIBD01 + 40 тыс. RM20	37.00	56.00	68.70
SIBD01 + 20 тыс. RM20	35.00	66.85	65.20
SIBD01 + 10 тыс. RM20	27.30	60.25	66.85
SIBD01 + 5 тыс. RM20	20.35	61.85	72.65
Только SIBD02 PBMC	36.80	54.90	-
SIBD02+ 40 тыс. RM20	68.95	39.70	84.00
SIBD02+ 20 тыс. RM20	54.85	28.75	78.95
SIBD02+ 10 тыс. RM20	50.10	74.90	80.15
SIBD02+ 5 тыс. RM20	41.25	76.45	76.80
Только RM52 PBMC	29.45	76.70	-
RM52 + 40 тыс. RM20	26.20	50.95	60.80
RM52 + 20 тыс. RM20	34.75	57.65	78.35
RM52 + 10 тыс. RM20	40.50	70.70	68.55
RM52 + 5 тыс. RM20	34.50	82.80	87.20
Только RM53 PBMC	42.85	43.45	-
RM53 + 40 тыс. RM20	57.05	61.60	81.70
RM53 + 20 тыс. RM20	56.40	49.50	87.05
RM53 + 10 тыс. RM20	73.10	72.70	82.80
RM53 + 5 тыс. RM20	35.65	68.45	87.20

Таблица 41. Влияние предварительной обработки IFN γ на активацию NK - клеток в отсутствии WT1 VV

	% CD69 ⁺ NK клеток			
	Только ADSC	IFN γ ADSC	ADSC + WT1 VV	IFN γ ADSC + WT1 VV
Только SIBD01 PBMC	5.70	-	13.61	-
SIBD01 + 40 тыс. RM20	54.10	54.25	86.40	85.35
SIBD01 + 20 тыс. RM20	46.40	36.15	88.55	89.10
SIBD01 + 10 тыс. RM20	37.45	28.75	86.15	86.95
SIBD01 + 5 тыс. RM20	31.90	19.95	86.20	84.75
Только SIBD02 PBMC	4.38	-	71.80	-

SIBD02+ 40 тыс. RM20	9.51	26.85	78.45	81.45
SIBD02+ 20 тыс. RM20	9.67	15.25	86.15	86.50
SIBD02+ 10 тыс. RM20	9.48	8.42	84.00	86.50
SIBD02+ 5 тыс. RM20	7.59	6.90	81.65	84.85

Таблица 42. Влияние предварительной обработки IFN γ на активацию Т-клеток в отсутствии WT1 VV

	% CD69 ⁺ Тклеток			
	Только ADSC	IFN γ ADSC	ADSC + WT1 VV	IFN γ ADSC + WT1 VV
Только SIBD01 PBMC	4.29	-	5.85	-
SIBD01 + 40 тыс. RM20	14.95	14.80	33.75	34.85
SIBD01 + 20 тыс. RM20	10.45	11.30	36.30	40.15
SIBD01 + 10 тыс. RM20	10.34	10.35	32.15	38.75
SIBD01 + 5 тыс. RM20	10.16	9.10	33.80	35.55
Только SIBD02 PBMC	3.46	-	41.80	-
SIBD02+ 40 тыс. RM20	5.15	7.00	7.04	16.45
SIBD02+ 20 тыс. RM20	3.55	4.50	9.92	15.80
SIBD02+ 10 тыс. RM20	2.87	2.74	15.65	19.60
SIBD02+ 5 тыс. RM20	2.55	3.42	17.15	27.25

Таблица 43. Влияние предварительной обработки IFN γ на активацию NKT клеток в отсутствие WT1 VV

	% CD69 ⁺ NKT клеток			
	Только ADSC	IFN γ ADSC	ADSC + WT1 VV	IFN γ ADSC + WT1 VV
Только SIBD01 PBMC	11.85	-	22.95	-
SIBD01 + 40 тыс. RM20	41.80	48.05	79.35	82.65
SIBD01 + 20 тыс. RM20	34.10	33.45	85.55	87.85
SIBD01 + 10 тыс. RM20	24.80	21.85	87.35	83.75
SIBD01 + 5 тыс. RM20	22.25	22.45	76.00	81.00
Только SIBD02 PBMC	45.75	-	70.00	-
SIBD02+ 40 тыс. RM20	72.15	70.80	85.25	95.00
SIBD02+ 20 тыс. RM20	67.60	63.25	93.10	90.15

SIBD02+ 10 тыс. RM20	64.55	62.40	53.90	91.20
SIBD02+ 5 тыс. RM20	39.30	50.00	95.25	92.95

Таблица 44. Влияние предварительной обработки IFN γ на перекрестное взаимодействие T-NK-NKT

	% CD69 ⁺ NK-клетки	
	Контроль	WT1 VV
Только SIBD01 PBMC	5.70	13.61
SIBD01 + 40 тыс. RM20	54.10	86.40
SIBD01 + 40 тыс. IFN γ RM20	54.25	85.35
SIBD01 + K562 клетки	84.85	93.40
SIBD01 + 40 тыс. RM20 + K562 клетки	88.40	98.10
SIBD01 + 40 тыс. IFN γ RM20 + K562 клетки	87.70	97.10
Только SIBD02 PBMC	4.38	71.80
SIBD02 + 40 тыс. RM20	9.51	78.45
SIBD02 + 40 тыс. IFN γ RM20	26.85	81.45
SIBD02 + K562 клетки	90.05	95.95
SIBD02 + 40 тыс. RM20 + K562 клетки	84.65	87.60
SIBD02 + 40 тыс. IFN γ RM20 + K562 клетки	89.65	97.45

Таблица 45. Влияние предварительной обработки IFN γ на перекрестное взаимодействие T-NK-NKT

	% CD69 ⁺ T-клетки	
	Контроль	WT1 VV
Только SIBD01 PBMC	4.29	5.85
SIBD01 + 40 тыс. RM20	14.95	33.75
SIBD01 + 40 тыс. IFN γ RM20	14.80	34.85
SIBD01 + K562 клетки	30.45	40.05
SIBD01 + 40 тыс. RM20 + K562 клетки	21.65	44.70
SIBD01 + 40 тыс. IFN γ RM20 + K562 клетки	18.20	38.75
Только SIBD02 PBMC	3.46	21.50
SIBD02 + 40 тыс. RM20	5.15	7.04
SIBD02 + 40 тыс. IFN γ RM20	7.00	16.45
SIBD02 + K562 клетки	8.26	14.50

	% CD69 ⁺ Т-клетки	
	Контроль	WT1 VV
SIBD02 + 40 тыс. RM20 + K562 клетки	8.85	8.30
SIBD02 + 40 тыс. IFN γ RM20 + K562 клетки	10.25	16.50

Таблица 46. Влияние предварительной обработки IFN γ на перекрестное взаимодействие Т-NK-NKT

	% CD69 ⁺ NKT -клетки	
	Контроль	WT1 VV
Только SIBD01 PBMC	11.85	22.95
SIBD01 + 40 тыс. RM20	41.80	79.35
SIBD01 + 40 тыс. IFN γ RM20	48.05	82.65
SIBD01 + K562 клетки	78.65	77.85
SIBD01 + 40 тыс. RM20 + K562 клетки	59.30	89.45
SIBD01 + 40 тыс. IFN γ RM20 + K562 клетки	53.75	85.45
Только SIBD02 PBMC	45.75	70.00
SIBD02 + 40 тыс. RM20	72.15	85.25
SIBD02 + 40 тыс. IFN γ RM20	70.80	95.00
SIBD02 + K562 клетки	95.00	95.70
SIBD02 + 40 тыс. RM20 + K562 клетки	92.25	84.15
SIBD02 + 40 тыс. IFN γ RM20 + K562 клетки	95.55	90.50

Пример 6

Подавление индукции IFN-опосредованного антивирусного состояния как инструмент повышения чувствительности стволовых и опухолевых клеток к вирусной инфекции и амплификации

Многие типы опухолевых клеток обладают нарушенной передачей сигналов интерферона, что делает их чувствительными к онколитической виротерапии. Антивирусные механизмы в нетрансформированных стволовых клетках и некоторых типах опухолевых клеток, которые опосредуются различными клеточными вирусными сенсорами и интерферонами, могут создавать барьер для способности таких клеток функционировать в качестве клеток-носителей для доставки онколитических вирусов. Например, интерфероны типа I и II являются мощными индукторами антивирусного состояния стволовых клеток и некоторых типов опухолевых клеток. Это снижает

восприимчивость этих клеток к вирусной инфекции и снижает их способность поддерживать амплификацию вируса.

В данном документе показано, что блокирование обнаружения вирусной инфекции и/или блокирование индукции противовирусного состояния в стволовых и опухолевых клетках-носителях может сенсibilизировать клетки-носители к вирусной инфекции, амплификации и распространению. Блокирование обнаружения вирусной инфекции осуществлялось с использованием Руксолитиниба, низкомолекулярного ингибитора JAK1 / JAK2, который ингибирует передачу сигналов интерферона. Это улучшает терапевтический потенциал различных стволовых и опухолевых клеток как носителей онколитических вирусов.

А. Ингибирование JAK1 / 2 увеличивает потенциал вирусной инфекции и амплификации носителей стволовых клеток

Чтобы определить, улучшает ли вмешательство в передачу сигналов интерферона и индукцию противовирусного состояния терапевтический потенциал стволовых клеток как носителей онколитического вируса, стволовые клетки культивировали в присутствии интерферонов типа I или типа II, с или без ингибитора передачи сигналов интерферона руксолитиниба и оценивали вирусную инфекцию, амплификацию и доставку к опухолевым клеткам. Стволовые клетки RM35 ADSC (пассаж 5) (далее называемые стволовыми клетками ADSC-RM35; полученные из супраадвентициальных жировых стромальных клеток, как описано в Примере 1 выше) инфицировали онколитическим вирусом осповакцины L14, сконструированным экспрессией флуоресцентного белка TurboFP635, при MOI 0,1 в течение 2 часов. После смыывания свободного вируса клетки немедленно высевали с плотностью 10000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты с добавлением 20 нг / мл IFN β (интерферон типа I) или 20 нг / мл IFN γ (интерферона типа II) с 50 нМ руксолитиниба или без (LCLaboratories, Cat. No. R-6688) и инкубировали в течение 48 часов при 37°C, 5% CO₂. Клетки, культивированные без IFN, использовали в качестве контроля. После 48 часов культивирования клеток вирусную инфекцию и амплификацию оценивали с помощью визуализации флуоресценции во времени, которую использовали для измерения интенсивности флуоресценции белка TurboFP635, кодируемого вирусом. Результаты представлены в Таблице 47 ниже, которая показывает среднюю плотность интенсивности флуоресценции для контрольных стволовых клеток (без IFN); контрольные стволовые клетки + Руксолитиниб; стволовые клетки + IFN β ; стволовые клетки + IFN β + Руксолитиниб; стволовые клетки + IFN γ ; и стволовые клетки + IFN γ + Руксолитиниб.

Поскольку IFN не добавляли к контрольным клеткам, не было индукции антивирусного состояния, и количество вирусной инфекции и амплификации, измеренное по интенсивности флуоресценции TurboFP635, было одинаковым с добавлением или без добавления Руксолитиниба. По сравнению с контрольными клетками добавление 20 нг / мл IFN β или IFN γ к культурам клеток приводило к снижению флуоресценции на 26,7% и 17,8% соответственно. Это указывает на то, что воздействие IFN на стволовые клетки после вирусной инфекции снижает способность клеток-носителей поддерживать амплификацию вируса. Эти условия культивирования имитируют воздействие на инфицированные клетки-носители интерферонов типа I и типа II, которые могут происходить из других инфицированных клеток-носителей или из иммунных клеток субъекта *in vivo* соответственно.

Нетрансформированные стволовые клетки (и многие опухолевые клетки) могут иметь неповрежденные внутренние механизмы чувствительности к вирусу и защитные механизмы против вируса коровьей оспы и других онколитических вирусов. Следовательно, чтобы поддерживать их высокий потенциал амплификации, когда они используются в качестве клеток-носителей, может быть полезно предотвратить индукцию опосредованного IFN антивирусного состояния. Как показано в Таблице 47, добавление 50 нМ Руксолитиниба к стволовым клеткам, подвергшимся воздействию IFN β или IFN γ , дает примерно такое же количество флуоресценции, как и контрольные клетки, которые не подвергались воздействию IFN. Эти результаты демонстрируют, что добавление 50 нМ Руксолитиниба эффективно и полностью отменяет индукцию антивирусного состояния интерферонами типа I и типа II и повышает чувствительность клеток-носителей для поддержки вирусной инфекции и амплификации.

Таблица 47. Блокирование интерферона Руксолитинибом в инфицированных вирусом стволовых клетках.

	Средняя плотность интенсивности флуоресценции		
	Контрольные клетки (без IFN)	20 нг/мл IFN β	20 нг/мл IFN γ
(-) Руксолитиниб	0,073	0,0535	0,06
(+) 50 нМ Руксолитиниб	0,074	0,0755	0,0735

Б. Ингибирование JAK1 / 2 увеличивает потенциал вирусной инфекции и амплификации опухолевых клеток.

Чтобы определить, сенсibiliзирует ли ингибирование передачи сигналов IFN также опухолевые клетки к инфекции вируса осповакцины и амплификации, 200000 клеток рака предстательной железы человека PC3 культивировали совместно с 20000 стволовых клеток ADSC-RM35, которые были предварительно инфицированы вирусом L14 при MOI 0,1. на 2 часа. 20 нг/мл IFN типа I + 20 нг/мл IFN типа II, с 5 или 50 нМ Руксолитиниба или без них, добавляли к кокультурам, а прогрессирование вирусной инфекции и распространение отслеживали с помощью флуоресцентной визуализации до 48 часов. Кокультуры без добавления IFN или Руксолитиниба использовали в качестве контроля. Результаты представлены в Таблице 48 ниже, которая показывает среднюю плотность интенсивности флуоресценции (IntDen) для: контрольных клеток (без IFN / без Руксолитиниба); кокультуры + IFN I/II; кокультуры + IFN I/II + 5 нМ Руксолитиниб; кокультуры + IFN I/II + 50 нМ Руксолитиниб. Процент отмены ингибирования IFN рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ Отмены ингибирования IFN} = [(IntDen_{Rux + IFN} - IntDen_{IFN}) / (IntDen_{контроль} - IntDen_{IFN})] \times 100.$$

Результаты показывают, что при добавлении IFN инфицирование опухолевых клеток вирусом, а также амплификация вируса опухолевыми клетками значительно снизились. Добавление 5 нМ Руксолитиниба частично обращало индукцию антивирусного состояния в клетках PC3 (на 40%) и увеличивало уровни вирусной инфекции и амплификации, о чем свидетельствует усиление кодируемого вирусом флуоресцентного сигнала TurboFP635. Добавление 50 нМ Руксолитиниба было высокоэффективным при обращении индукции антивирусного состояния в клетках PC3 (обращение ~ 91%) и восстановило уровни вирусной инфекции и амплификации до немного меньших, чем в контрольных клетках.

Эти результаты демонстрируют, что фармакологическое и/или генетическое вмешательство во внутренние механизмы противовирусной защиты, такие как пути передачи сигналов интерферона, стволовых и опухолевых клеток, можно использовать для улучшения / поддержания их потенциала вирусной инфекции/амплификации. Это делает клетки-носители устойчивыми к воздействию интерферонов во время вирусной нагрузки или воздействия *in vivo*, повышая их потенциал в качестве переносчиков онколитических вирусов. Поскольку интерфероны опосредуют распространение антивирусного состояния между инфицированными и соседними неинфицированными клетками, дополнительное преимущество блокирования индукции антивирусного состояния в клетках-носителях заключается в том, что подавленное производство

интерферонов типа I может минимизировать начальное распространение антивирусного состояния и таким образом облегчить распространение вирусной инфекции *in vivo*.

Таблица 48. Блокирование интерферона Руксолитинибом в совместных культурах инфицированных вирусом стволовых клеток и опухолевых клеток РС3

Условия	Средняя плотность интенсивности флуоресценции	% обращения ингибирования IFN
Контрольные клетки (-) IFN / (-) Руксолитиниб	6.4	-
(+) 20 нг / мл IFN β / γ (-) Руксолитиниб	2.1	-
(+) 20 нг / мл IFN β / γ (+) 5 нМ Руксолитиниб	3.8	40,2
(+) 20 нг / мл IFN β / γ (+) 50 нМ Руксолитиниб	6.0	90,7

Пример 7

Повышение чувствительности стволовых и опухолевых клеток к вирусной инфекции и амплификации посредством блокады комплемента

Человеческая сыворотка может оказывать вредное воздействие на некоторые клетки-носители, в том числе непосредственно атаковать и убивать инфицированные вирусом клетки-носители до амплификации вируса или нейтрализовывать вирусные частицы, высвобождающиеся из клеток-носителей, тем самым ограничивая распространение вируса к опухолевым клеткам-мишеням. Далее были оценены возможность конструирования клеток-носителей для экспрессии блокирующих комплемент факторов для защиты клеток и улучшения их терапевтического потенциала, а так же оценка влияния добавления ингибитора пептида комплемента Компстатина или нейтрализующего античеловеческого антитела C3a/C3a(desArg)/C на способность клеток-носителей амплифицировать и доставлять онколитический вирус осповакцины L14

А. Влияние блокады комплемента на инфицированные вирусом стволовые клетки-носители

Стволовые клетки-носители ADSC-RM35 инфицировали вирусом осповакцины L14, который сконструирован для экспрессии флуоресцентного белка TurboFP635, при MOI 0,1 в течение 2 часов. Влияние активности комплемента на амплификацию и

распространение вируса на неинфицированные 90% клеток-носителей оценивали путем добавления 10% сыворотки крови человека (от донорского CBD2) и сравнения накопления флуоресцентного сигнала TurboFP635, кодируемого вирусом осповакцины L14, с контрольными клетками, которые не подвергались воздействию сыворотки.

Визуализация флуоресценции в течение 72 часов показывает, что 10% человеческой сыворотки не препятствовали амплификации вируса инфицированными стволовыми клетками-носителями.

Чтобы оценить, улучшает ли блокада комплемента возможности вирусной амплификации и доставки стволовых клеток-носителей, инфицированные вирусом стволовые клетки инкубировали с сывороткой человека в присутствии компстатина, который связывает комплемент C3 и ингибирует его протеолитическое расщепление с помощью конвертазы C3, или в присутствии нейтрализующего анти-человеческого антитела C3a / C3a (desArg)/C3. Стволовые клетки ADSC-RM35 инфицировали вирусом осповакцины L14 при MOI 0,1 в течение 2 часов и добавляли 10% сыворотку крови человека (от донорского CBD2) в присутствии 20 мкМ компстатина (Cat. No. 2585; TocrisBioscience, MN), 50 нг/мл контроль изотипа (Cat. No. 400166; BioLegend, SanDiego, CA) или 50 нг/мл анти-C3-антитела (Cat. No. 518104; BioLegend, SanDiego, CA). Инфицированные вирусом стволовые клетки, инкубированные только с 10% сывороткой человека, использовали в качестве контроля. Визуализацию флуоресценции через 72 часа использовали для сравнения вирусной инфекции и амплификации (измеренной по средней плотности интенсивности флуоресценции) между контрольными клетками-носителями (только 10% сыворотки человека); клетки-носители + сыворотка + компстатин; клетки-носители + сыворотка + контроль изотипа; и клетки-носители + сыворотка + антитело анти-C3.

Результаты, которые представлены в Таблице 49 ниже, показывают, что добавление 20 мкМ компстатина увеличивает флуоресцентный сигнал и, следовательно, количество амплификации вируса в стволовых клетках-носителях на 50% по сравнению с контрольными клетками. Добавление 50 нг/мл контроля изотипа не влияет на интенсивность флуоресцентного сигнала по сравнению с контрольными клетками, в то время как добавление 50 нг/мл анти-C3-антитела увеличивает флуоресцентный сигнал на 12,5% по сравнению с контрольными клетками. Эти результаты показывают, что блокада комплемента пептидным ингибитором компстатином или нейтрализующим антителом анти- C3 дополнительно увеличивает амплификацию вируса. Таким образом, блокада комплемента позволяет накапливать более высокие вирусные нагрузки. Это может быть достигнуто путем совместного введения агента, который блокирует комплемент,

например, предварительная загрузка вирусонесных клеток пептидом или низкомолекулярным ингибитором и/или конструирование клеток для экспрессии ингибитора комплемента или любым другим подходящим способом. .

Таблица 49. Влияние блокирования комплемента на инфицирование/амплификацию L14 в стволовых клетках, подвергшихся воздействию 10% сыворотки крови человека.

Условия	Средняя плотность интенсивности флуоресценции	% Увеличение флуоресценции
Контрольные клетки (только 10% сыворотки)	0,06	-
10% сыворотки + 20 мкМ компстатин	0,09	50
10% сыворотки + 50 мкг / мл изотипический контроль	0,057	-5
10% сыворотки + 50 мкг / мл антитела C3	0,0675	12,5

Влияние блокады комплемента компстатином и/или антителом анти C3 затем оценивали в отношении 20% человеческой сыворотки от трех разных доноров. Стволовые клетки ADSC-RM35 были инфицированы вирусом осповакцины L14 при MOI 0,1 в течение 2 часов, и было добавлено 20% человеческой сыворотки от 3 разных доноров (CBD1, CBD2 и CBD3) в присутствии 20 мкМ компстатина, 10 мкг/мл антитела анти- C3 или 50 мкг/мл антитела анти-C3. Зараженные вирусом стволовые клетки, инкубированные с 20% сыворотки человека от каждого из трех доноров (без блокады комплемента), использовали в качестве контроля. Визуализацию флуоресценции через 48 часов после инкубации использовали для сравнения вирусной инфекции и амплификации (измеренной по средней плотности интенсивности флуоресценции экспрессируемого вирусом TurboFP635) между различными культурами клеток. Результаты, которые представлены в Таблице 50 ниже, показывают, что добавление 20 мкМ компстатина увеличивает интенсивность флуоресценции на 27,7%, 8,1% и 18,7% по сравнению с контрольными клетками только сыворотки для доноров CBD1, CBD2 и CBD3 соответственно. По сравнению с контрольными клетками добавление 10 мкг/мл анти-C3-антитела увеличивает интенсивность флуоресценции на 6,1% для донорского CBD1 и на 10,3% для донорского CBD3 и снижает ее на 0,8% для

донорского CBD2. Добавление 50 мкг / мл анти-С3-антитела увеличивает интенсивность флуоресценции на 20,9%, 1,6% и 10,3% по сравнению с контрольными клетками для доноров CBD1, CBD2 и CBD3 соответственно. Эти результаты показывают, что блокада комплемента малым пептидным ингибитором компстатином (в концентрации 20 мкМ) или антителом анти- С3 (в концентрации 10 мкг/мл или 50 мкг/мл) частично обратило негативные эффекты сыворотки крови человека на инфицированные вирусом стволовые клетки и усилило распространения и амплификации вируса осповакцины у нескольких доноров крови / сыворотки человека.

Таблица 50. Влияние блокирования комплемента на инфицирование/амплификацию L14 в клетках-носителях, подвергшихся воздействию 20% сыворотки крови человека от 3 разных доноров.

Условия	Средняя плотность интенсивности флуоресценции			% Увеличение флуоресценции		
	Донор CBD1	Донор CBD2	Донор CBD3	Донор CBD1	Донор CBD2	Донор CBD3
Контрольные клетки (только 20% сыворотки)	0,0740	0,0620	0,0775	-	-	-
20% сыворотки + 20 мкМ компстатина	0,0945	0,0670	0,0920	27,7	8.1	18,7
20% сыворотки + 10 мкг / мл антитела С3	0,0785	0,0615	0,0855	6.1	-0,8	10,3
20% сыворотки + 50 мкг / мл антитела С3	0,0895	0,0630	0,0855	20,9	1.6	10,3

Б. Влияние блокады комплемента на вирусную инфекцию и амплификацию в опухолевых клетках

Чтобы показать, что блокирование комплемента также усиливает распространение вируса к опухолевым клеткам- мишеням , стволовые клетки инфицировали вирусом L14 и культивировали совместно с опухолевыми клетками в присутствии 20% сыворотки крови человека с компстатином или без него. 20000 носителей стволовых клеток, полученных из жировой ткани RM35, инфицировали вирусом осповакцины L14 при MOI, равном 1, в течение 2 часов, а затем засевали на ночь монослой 300000 клеток рака простаты человека PC3 . Распространение вирусной инфекции от стволовых клеток-носителей к опухолевым клеткам продолжали в течение

48 часов в присутствии 20% человеческой сыворотки от донорского CBD2 с добавлением или без добавления 20 мкМ компстатина. Кокультуры инфицированных вирусом стволовых клеток и опухолевых клеток в отсутствие сыворотки или компстатина использовали в качестве контроля. Визуализацию флуоресценции через 48 часов использовали для определения степени инфицирования опухолевых клеток, измеряемой по средней плотности интенсивности флуоресценции, *то есть* флуоресцентному сигналу от TurboFP635, экспрессируемого вирусом осповакцины L14.

Результаты приведены в Таблице 51 ниже. Добавление 20% человеческой сыворотки частично уменьшало распространение вируса от инфицированных стволовых клеток-носителей к опухолевым клеткам, о чем свидетельствует снижение плотности интенсивности флуоресценции с 41,1 до 34,5. Добавление 20 мкМ компстатина увеличивало плотность интенсивности флуоресценции до 36,4. Таким образом, блокада комплемента с помощью компстатина частично отменило опосредованное комплементом подавление распространения вируса и увеличило интенсивность флуоресценции на 28,5%. Эти результаты показывают, что сенсibiliзирующие клетки-носители для защиты от комплемента усиливают распространение вируса и амплификацию в опухолевых клетках-мишенях РС3.

В целом, эти данные подтверждают, что блокада комплемента, *например*, с использованием клеток-носителей, сконструированных для доставки агентов, блокирующих комплемент, таких как пептидные ингибиторы или нейтрализующие/антагонистические антитела комплемента, защищает клетки-носители и выделяемые ими вирусные частицы от комплемента и нейтрализующих антител в сыворотке крови человека. Это позволяет накапливать более высокие нагрузки вируса, тем самым улучшая способность клеток-носителей амплифицировать, доставлять и распространять онколитический вирус к опухолевым клеткам.

Таблица 51. Влияние блокирования комплемента на инфицирование вирусом L14 клеток РС3 выращенных совместно с инфицированными вирусом стволовыми клетками-носителями и 20% сыворотки крови человека

Условия	Средняя плотность интенсивности флуоресценции
Контроль (без сыворотки, без компстатина)	41,1
Только 20% сыворотка	34,5
20% сыворотки + 20 мкМ компстатина	36,4

Пример 8

Оценка детерминант аллогенного отторжения и их подавление с помощью HLA-блокады

Пример 4 демонстрирует, что носители стволовых клеток могут амплифицировать и доставлять онколитический вирус осповакцины, несмотря на аллогенные барьеры. Это связано с их способности избегать аллогенного распознавания и активно иммуносупрессировать NK-клетки, Т-клетки и популяцию «NKT-клеток», экспрессирующих маркеры NK (NKp46) и Т-клеток (CD3). В подгруппе «пермиссивных/устойчивых» реципиентов стволовые клетки не смогли избежать аллогенного распознавания, что привело к усилению быстрых и мощных ответов аллогенных NK, Т и NKT клеток против стволовых клеток-носителей, даже в отсутствие вируса. Эти быстрые аллогенные ответы развивались в течение 48 часов после совместного культивирования и были связаны с развитием цитотоксических ответов против стволовых клеток и опосредованного IFN γ противовирусного состояния, подавляющего способность стволовых клеток амплифицировать вирус осповакцины. Эти результаты показывают, что носители не стволовых клеток, такие как опухолевые клетки, которые лишены мощных специфических для стволовых клеток иммуносупрессивных способностей, могут подвергаться аналогичным или более сильным аллогенным ограничениям, ограничивая их потенциал для амплификации и доставки онколитического вируса. Это, в свою очередь, ограничивает их использование и эффективность.

Идентификация, подавление и устранение факторов, ответственных за аллогенное распознавание и отторжение, можно использовать для увеличения терапевтического потенциала аллогенных стволовых или опухолевых клеток в качестве клеток-носителей для доставки онколитических вирусов в готовом виде. Такие детерминанты аллогенного отторжения включают высокополиморфные и специфичные для пациента молекулы МНС Класа I и Класа II, распознаваемые Т-клетками CD8 и CD4, а также широкий спектр менее полиморфных детерминант, которые включают МНС-подобные MICA и CD1a, b, c, d молекулы и различные другие связанные со стрессом или чувствительные к стрессу молекулы, такие как бутирофилины и аннексин A2, которые распознаются различными субпопуляциями врожденных Т-клеток, такими как gd (гамма-дельта) Т, iNKT и NKT-клетки, среди прочих.

Блокада аллогенных молекул МНС I оценивалась по их способности подавлять аллогенные иммунные ответы против стволовых и опухолевых клеток-носителей,

особенно ответы CD8 Т-клеток, которые ответственны за распознавание и ответ на несовпадения аллогенных МНС I.

А. Истощение иммунных клеток неинфицированными и инфицированными вирусом осповакцины стволовыми клетками и опухолевыми клетками

Оценивали иммуносупрессивные свойства и потенциал истощения иммунных клеток неинфицированных и инфицированных вирусом осповакцины стволовых и опухолевых клеток-носителей, которые были совместно культивированы с РВМС от совместимых и несовместимых доноров. 300000 РВМС от несовместимых / устойчивых (CBD1) и совместимых / пермиссивных (CBD2) доноров культивировали в течение 60 часов совместно с 10000 стволовых клеток, полученных из жировой ткани (RM35) или раковых клеток (PC3 предстательной железы человека), которые были либо неинфицированными контрольными клетками, либо клетки-носители, инфицированные вирусом осповакцины ACAM2000 при MOI 10 в течение 2 часов. После 60-часового совместного культивирования были проанализированы количества различных подтипов иммунных клеток, выделенных из совместных культур стволовых и опухолевых клеток-носителей, инфицированных вирусом осповакцины (VV), с РВМС из несовместимых/устойчивых (CBD1) и совместимых/пермиссивных (CBD2) доноров. Количество различных подтипов иммунных клеток, выделенных только из РВМС CBD1 или CBD2, и из РВМС CBD1 или CBD2, совместно культивируемых с неинфицированными клетками-носителями, использовали в качестве контроля. Различные подтипы иммунных клеток были идентифицированы с помощью многопараметрического анализа проточной цитометрии с использованием CD69 в качестве маркера активации и набора маркеров, специфичных для определенного типа клеток, а именно: $\gamma\delta$ (gd) Т-клетки ($CD3^+$, $\gamma\delta TCR^+$); клетки iNKT / NKT типа 1 ($CD3^+$, $Va24Ja18^+$); общие NKT-подобные клетки ($CD3^+CD56^+$; gd и iNKT исключены); классические CD4 Т-клетки ($CD3^+CD4^+$; gd и iNKT исключены); классические CD8 Т-клетки ($CD3^+CD8^+$; gd и iNKT исключены); общие NK-клетки ($CD3^-CD56^+$) и субпопуляции NK: $CD56^{high}CD16^-$ (продуцирование цитокинов) и $CD56^{low}CD16^+$ (цитотоксичность).

Результаты представлены в Таблице 52 (для стволовых клеток) и Таблице 53 (для клеток PC3, клеток рака простаты человека) ниже. В таблице 54 сравниваются иммуносупрессивные и разрушающие иммунные клетки свойства неинфицированных стволовых клеток и опухолевых клеток с точки зрения % подавления. % подавления подтипов иммунных клеток рассчитывали по формуле:

$\% \text{ Подавления} = (1 - (\text{средн. Количество иммунных клеток из клеток-носителей} + \text{совместное культивирование PBMC})) \times 100.$ средн. количество иммунных клеток только из PBMC

Совместное культивирование PBMC от несовместимых / устойчивых (CBD1) и от совместимых/пермиссивных(CBD2) доноров с неинфицированными ADSC RM35 приводит к снижению/истощению всех иммунных подтипов по сравнению с только PBMC (контроль). Это подтверждает мощный иммуносупрессивный потенциал стволовых клеток, полученных из жировой ткани (см. Таблицу 52). Этот эффект также наблюдался, но в гораздо меньшей степени, при совместном культивировании PBMC CBD1 и CBD2 с опухолевыми клетками PC3 (см. Таблицу 53), что указывает на превосходные иммуносупрессивные свойства стволовых клеток по сравнению с опухолевыми клетками (см. Таблицу 54). Когда стволовые клетки (таблица 52) и опухолевые клетки (таблица 53) были предварительно инфицированы вирусом осповакцины (ADSC RM35 (стволовые клетки) + VV или клетки PC3 (опухолевые клетки) + VV) и использовались в качестве носителей, однако их способность истощать иммунные клетки была потеряна, о чем свидетельствует увеличение числа всех подтипов иммунных клеток. Эти данные согласуются с тем, что клетки-носители постепенно погибают под действием амплифицирующего вируса и теряют свой иммуносупрессивный потенциал.

Таблица 52. Количество подтипов иммунных клеток из совместных культур инфицированных и неинфицированных стволовых клеток с PBMC от несовместимых и совместимых реципиентов

Подтип иммунных клеток	Среднее общее количество иммунных клеток					
	CBD1 PBMC			CBD2 PBMC		
	Только PBMC	RM35 ADSC	RM35 ADSC + VV	Только PBMC	RM35 ADSC	RM35 ADSC + VV
$\gamma\delta$ T	255.0	13.5	705.1	34.5	14.5	139.5
iNKT	97.0	5.0	381.1	87.0	17.5	400.0
NKT	689.0	26.0	1721.5	39.0	11.5	296.5
CD4 T	1293.5	74.0	4062.1	1539.5	261.5	7190.0
CD8 T	419.5	26.0	1546.3	104.5	34.5	1626.5
NK	298.0	21.5	758.6	215.5	60.5	1901.5
CD56 ^{high} CD16 ⁻	27.5	3.0	104.8	17.5	5.0	123.5

CD56 ^{low} CD16 ⁺	225.5	13.5	336.4	169.0	42.0	1081.5

Таблица 53. Количество подтипов иммунных клеток из совместных культур инфицированных и неинфицированных клеток PC3 с PBMC от несовместимых и совместимых реципиентов

Подтип иммунных клеток	Среднее общее количество иммунных клеток					
	CBD1 PBMC			CBD2 PBMC		
	Только PBMC	PC3 клетки	RM35 ADSC + VV	Только PBMC	PC3 клетки	RM35 ADSC + VV
γδ T	344.0	127.0	973.5	38.0	19.5	212.0
iNKT	155.0	62.5	540.5	68.5	31.5	520.0
NKT	723.0	217.0	2484.0	33.0	18.0	281.0
CD4 T	1379.5	610.0	4978.0	915.0	546.0	8636.5
CD8 T	434.0	265.5	2644.5	71.0	39.0	1729.5
NK	426.5	111.5	910.5	205.0	136.0	1536.0
CD56 ^{high} CD16 ⁻	28.0	14.5	123.5	19.0	14.5	112.0
CD56 ^{low} CD16 ⁺	348.5	66.5	452.5	150.0	108.5	835.5

Таблица 54. % Подавление подтипов иммунных клеток из совместных культур неинфицированных стволовых или опухолевых клеток с PBMC от несовместимых и совместимых доноров

Подтип иммунных клеток	% Подавление			
	RM35 ADSC		Опухолевые клетки PC3	
	CBD1 PBMC	CBD2 PBMC	CBD1 PBMC	CBD2 PBMC
γδ T	94,71	57,97	63,08	48,68
iNKT	94,85	79,89	59,68	54,01
NKT	96,23	70,51	69,99	45,45
CD4 T	94,28	83,01	55,78	40,33
CD8 T	93,80	66,99	38,82	45,07
NK	92,79	71,93	73,86	33,66
CD56 ^{high} CD16 ⁻	89,09	71,43	48,21	23,68
CD56 ^{low} CD16 ⁺	94,01	75,15	80,92	27,67

Б. Иммунные субпопуляции, реагирующие на аллогенные клетки-носители и вирус осповакцины

Анализ иммунной активации с использованием фракции CD69⁺ клеток в каждой иммунной субпопуляции, выделенной из совместных культур PBMC + неинфицированные клетки-носители, по сравнению с одними только PBMC, выявил основную популяцию иммунных клеток, реагирующих на аллогенные стволовые или опухолевые клетки-носители. Результаты, которые представлены в Таблице 55, показывают, что при добавлении неинфицированных стволовых клеток или опухолевых клеток к несовместимым PBMC, количество иммунных клеток всех подтипов (за исключением CD56^{high}CD16⁻ NK-клеток в ответ на стволовые клетки) увеличивается. Наибольшие изменения в количестве наблюдались для $\gamma\delta$ T, iNKT, NKT, общих NK и цитотоксических NK (CD56^{low}CD16⁺) клеток. Увеличение общего числа NK и цитотоксических NK-клеток было значительно больше в ответ на клетки РСЗ, чем на стволовые клетки, подтверждая, что стволовые клетки обладают превосходными иммуносупрессивными свойствами. Когда неинфицированные клетки-носители совместно культивировали с совместимыми PBMC, иммунные ответы были, как правило, меньше, с уменьшением количества некоторых иммунных подтипов (*например*, $\gamma\delta$ T, iNKT, NKT и CD4 T-клеток) в некоторых случаях. Это указывает на то, что иммунные ответы в несовместимых аллогенных совместных культурах были выше, чем в совместимых аллогенных совместных культурах, подтверждая важность совместимости донора реципиента в аллогенных условиях.

Анализ иммунной активации с использованием фракции CD69⁺ клеток в каждой иммунной субпопуляции, выделенной из совместных культур PBMC + инфицированных вирусом клеток-носителей, по сравнению с совместными культурами PBMC + неинфицированных клеток-носителей, выявил основную популяцию иммунных клеток, отвечающих на вирус. Эти результаты представлены в Таблице 56, которая показывает, что основные подтипы иммунных клеток, отвечающие на вирус, включали $\gamma\delta$ T, iNKT, общие NKT-подобные (CD3⁺CD56⁺; $\gamma\delta$ T и iNKT исключены), общие NK, цитотоксические NK (CD56^{low}CD16⁺) и цитокин-продуцирующие NK (CD56^{high}CD16⁻) клетки. Одни и те же популяции иммунных клеток отреагировали на вирус как у совместимого, так и у несовместимого реципиента. Величина ответа всех T-субпопуляций была более слабой или даже отрицательной (что указывает на полное подавление противовирусных реакций) в условиях совместимого реципиента как со стволовыми, так и с опухолевыми клетками-носителями, демонстрируя, что совместимость влияет на реакции на вирус с любым типом аллогенного клеточного

носителя. В случае NK-клеток это оказалось верным только для реакций цитокин-продуцирующих NK-клеток ($CD56^{high}CD16^{-}$) на вирус, доставляемый носителями стволовых клеток, которые полностью подавлялись в совместимых, но не в несовместимых условиях реципиента. Реакции цитокин-продуцирующих NK-клеток ($CD56^{high}CD16^{-}$) на вирус, доставляемый аллогенными клетками-носителями опухоли, были одинаково сильными у обоих реципиентов. Ответы цитотоксических клеток NK ($CD56^{low}CD16^{+}$) на вирус были очень высокими и сходными у обоих реципиентов. По-видимому, более низкие ответы на вирус с носителями аллогенных опухолевых клеток у несовместимого реципиента отражают чрезвычайно высокую активацию этих NK-клеток только клетками-носителями (см. Таблицу 55), даже в отсутствие вируса, и не являются признаком более низкого уровня противовирусных ответов NK-клеток в этой обстановке.

Пример 4 демонстрирует важную роль популяций врожденных Т-клеток, экспрессирующих маркеры Т-клеток ($CD3^{+}$) и NK-клеток ($NKp46^{+}$) при реакции на аллогенные клетки-носители онколитических вирусов. Данные, обобщенные в таблицах 55 и 56, показывают, что эти врожденные популяции Т-клеток включают $\gamma\delta$ Т-клетки, клетки iNKT (NKT типа I) и $CD56^{+}CD3^{+}$ NKT (NKT типа II) клетки.

Таблица 55. Подтипы иммунных клеток, реагирующих на аллогенные клетки-носители.

Подтип иммунных клеток	Среднее значение Δ % $CD69^{+}$ подтипов ⁺ в PBMC + клетки-носители + по сравнению с только PBMC			
	CBD1 PBMC + RM35 ADSC	CBD1 PBMC + Опухолевые клетки PC3	CBD2 PBMC + RM35 ADSC	CBD2 PBMC + Опухолевые клетки PC3
$\gamma\delta$ T	20.6	20.1	-6.9	3.9
iNKT	20.0	4.2	6.4	-21.6
NKT	11.4	10.6	-4.9	-6.9
CD4 T	4.5	3.8	3.1	-21.8
CD8 T	1.5	5.3	12.2	9.6
NK	12.8	52.5	10.6	4.6
$CD56^{high}CD16^{-}$	-2.7	18.2	Ниже обнаружения	6.3
$CD56^{low}CD16^{+}$	17.3	59.4	8.4	6.1

Таблица 56. Подтипы иммунных клеток, реагирующие на вирус осповакцины

Подтип	Среднее значение Δ % $CD69^{+}$ подтипов в инфицированных по

иммунных клеток	сравнению с неинфицированными клетках-носителях			
	CBD1 PBMC + RM35 ADSC + VV	CBD1 PBMC + Опухолевые клетки PC3 + VV	CBD2 PBMC + RM35 ADSC + VV	CBD2 PBMC + Опухолевые клетки PC3 + VV
$\gamma\delta$ T	26.4	49.9	6.8	17.0
iNKT	-13.1	25.6	-3.4	6.4
NKT	0.0	30.5	-3.1	8.1
CD4 T	-2.6	11.6	-5.7	-2.1
CD8 T	8.9	24.7	-10.2	1.8
NK	48.1	28.1	51.5	65.9
CD56 ^{high} CD16 ⁻	37.2	39.0	-15.2	43.8
CD56 ^{low} CD16 ⁺	59.8	28.3	52.4	66.8

С. Иммунные ответы на аллогенные клетки-носители в несовместимых и совместимых PBMC

Как показано в таблицах 55 и 56, совместные культуры с несовместимыми PBMC вызывают значительно большее количество субпопуляций Т-клеток врожденного иммунитета ($\gamma\delta$ Т-клетки и CD3+CD56+ NKT -клетки) по сравнению с совместимыми PBMC, а также более сильные ответы против зараженные вирусом носители. Количество CD69⁺ активированных субпопуляций иммунных клеток в процентах от всех PBMC было определено и сравнено для несовместимых (CBD1) и совместимых (CBD2) PBMC, которые были совместно культивированы с инфицированными вирусом осповакцины стволовыми клетками или клетками-носителями опухоли, и результаты представлены в таблице 57. Количество субпопуляций активированных CD69⁺ иммунных клеток в виде процента в каждой конкретной субпопуляции также было рассчитано для несовместимых и совместимых PBMC, и результаты представлены в таблице 58. Таблица 57 показывает CD69⁺ активированные клетки каждой субпопуляции PBMC в виде доли (%) от общего количества PBMC. В таблице 58 показаны CD69⁺ активированные клетки в каждой субпопуляции PBMC в виде доли от общего количества клеток в этой конкретной субпопуляции.

Основным различием между несовместимыми (CBD1) и совместимыми (CBD2) PBMC было значительно большее количество субпопуляций Т-клеток врожденного иммунитета ($\gamma\delta$ Т-клетки и CD3+CD56+ NKT -клетки), наблюдаемых у несовместимых

PBMC, и их гораздо более сильная реакция против зараженные вирусом носители. Об этом свидетельствует увеличение общего количества клеток разных подтипов (см. Таблицы 55 и 56), а также процентное содержание CD69⁺ активированных клеток во всех PBMC (см. Таблицу 57) или в определенных субпопуляциях (см. Таблица 58).

Результаты также показывают, что в целом стволовые клетки обладают превосходными иммуносупрессивными свойствами в качестве носителей по сравнению с опухолевыми клетками, причем последние стимулируют более сильную активацию всех субпопуляций врожденного и приобретенного иммунитета, за исключением NK-клеток (см. Таблицы 57. и 58, RM35 по сравнению с PC3).

Таблица 57. % CD69⁺ иммунных субпопуляций PBMC в присутствии инфицированных стволовых или опухолевых клеток-носителей

Подтип иммунных клеток	Средний% иммунного подтипа CD69 ⁺ в PBMC				Соотношение реакций CBD1 / CBD2	
	CBD1 PBMC		CBD2 PBMC		RM35 ADSC + B VV	Клетки PC3 + VV
	RM35 ADSC + VV	Клетки PC3 + VV	RM35 ADSC + VV	Клетки PC3 + VV		
γδ T	3.4	4.8	0.2	0.5	19.3	10.1
iNKT	0.3	1.2	0.2	0.5	1.6	2.3
NKT	1.9	6.6	0.3	0.4	7.0	14.7
CD4 T	1.9	5.9	0.5	3.6	3.9	1.6
CD8 T	1.5	5.3	0.8	1.4	2.0	3.8
NK	4.4	5.0	8.8	6.8	0.5	0.7
CD56 ^{high} CD16 ⁻	0.3	0.5	0.3	0.4	1.2	1.3
CD56 ^{low} CD16 ⁺	2.3	2.6	4.8	3.7	0.5	0.7

Таблица 58. % CD69⁺ иммунных субпопуляций в присутствии инфицированных стволовых клеток или клеток-носителей опухоли

Подтип иммунных клеток	Средний% CD69 ⁺⁺ в подтипе				Соотношение реакций CBD1 / CBD2	
	CBD1 PBMC		CBD2 PBMC		CBD1 ADSC + VV	CBD2 PC3 + VV
	RM35 ADSC + VV	Клетки PC3 + VV	RM35 ADSC + VV	Клетки PC3 + VV		

$\gamma\delta$ T	59.7	80.2	19.7	39.6	3.0	2.0
iNKT	10.7	36.0	8.2	17.7	1.3	2.0
NKT	13.4	43.2	14.3	28.7	0.9	1.5
CD4 T	5.7	19.5	1.1	7.6	5.4	2.6
CD8 T	12.5	32.6	7.3	14.3	1.7	2.3
NK	70.4	88.7	73.1	80.0	1.0	1.1
CD56 ^{high} CD16 ⁻	37.2	62.4	34.8	60.1	1.1	1.0
CD56 ^{low} CD16 ⁺	84.5	94.2	70.2	78.6	1.2	1.2

Д. Подавление HLA-блокадой реакцию CD8 T – клеток на клетки-носители

Как обсуждалось выше, идентификация, подавление и/или устранение факторов, ответственных за аллогенное распознавание и отторжение, можно использовать для повышения терапевтической эффективности аллогенных стволовых или опухолевых клеток для доставки онколитических вирусов в готовом виде. Аллогенные детерминанты отторжения включают высокополиморфные и специфичные для пациента молекулы МНС Класа I и Класа II, распознаваемые Т-клетками CD8 и CD4, а также широкий спектр менее полиморфных детерминант, которые включают МНС-подобные MICA и CD1a, b, c, d, а также другие связанные со стрессом или чувствительные к стрессу молекулы, такие как бутирофилины и аннексин A2, которые распознаются различными субпопуляциями врожденных Т-клеток, такими как $\gamma\delta$ T, iNKT и NKT-клетки, среди прочих.

Элиминацию/блокаду аллогенных молекул МНС I оценивали, чтобы оценить, подавляет ли она аллогенные иммунные ответы против стволовых и опухолевых клеток-носителей, особенно ответы CD8 T-клеток, которые отвечают за распознавание и ответ на несовпадения аллогенных МНС I. По 300000 PBMC от несовместимых и совместимых доноров совместно культивировали в течение 60 часов с 10000 стволовых клеток, полученных из жировой ткани (RM35) или раковых клеток (клетки PC3 предстательной железы человека), которые были инфицированы вирусом осповакцины ACAM2000 при MOI 10 в течение 2 часов. Анти-HLA-блокирующее антитело (anti-HLA antibody; Ultra-LEAF™ Purified anti-human HLA-A,B,C Antibody Clone W6/32, Cat. No. 311428, BioLegend, San Diego, CA) или изотип контроль (Ultra-LEAF™ Purified Mouse IgG2a, k Isotype Ctrl Antibody, Clone MOPC-173, Cat. No. 400264; BioLegend, San Diego, CA) добавляли к совместным культурам, чтобы оценить влияние блокады HLA на активацию ответов против клеток-носителей различными популяциями врожденных и приобретенных иммунных клеток, особенно CD8 T-лимфоцитами. Иммунную активацию

анализировали после совместного культивирования PBMC с предварительно инфицированными ADSC RM35 или опухолевыми клетками PC3 в течение 60 часов при 37° и 5% CO₂ в присутствии 10 мкг / мл изотип контроля или антитела, блокирующего HLA. Подтипы иммунных клеток были идентифицированы с помощью многопараметрического анализа проточной цитометрии с использованием CD69 в качестве маркера активации и набора маркеров, специфичных для определенного типа клеток, включая CD3⁺CD8⁺ (за исключением $\gamma\delta$ и iNKT) для T-клеток CD8 и CD3⁻CD56⁺ для общие NK-клетки.

Таблица 59 ниже показывает средний процент CD69⁺⁺ активированных CD8 T-клеток и NK-клеток, наблюдаемых с несовместимыми (CBD1) и совместимыми (CBD2) PBMC, каждая из которых совместно культивируется с: инфицированными вирусом стволовыми клетками (RM35 ADSC); инфицированные вирусом стволовые клетки + изотип контроль; инфицированные вирусом стволовые клетки + HLA-блокирующие антитела; инфицированные вирусом опухолевые клетки (PC3); инфицированные вирусом опухолевые клетки + изотип контроль; или инфицированные вирусом опухолевые клетки + HLA-блокирующие антитела. В таблице 60 показаны результаты в виде процента подавления активации CD8 T и NK-клеток, опосредованного блокадой HLA. % Подавления рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ Подавления} = (1 - (\text{среднее количество иммунных клеток с антителом анти HLA} / \text{среднее количество иммунных клеток с изотип контролем})) \times 100.$$

Как показано в Таблице 59, совместные культуры инфицированных аллогенным вирусом стволовых клеток с несовместимыми (CBD1) или совместимыми (CBD2) PBMC привели к активации 7-12,5% CD69⁺CD8 T-клеток и более 70% CD69⁺NK-клеток. Добавление изотип контроля не подавляло или существенно не влияло на ответы иммунных клеток. Однако добавление антитела анти HLA к кокультурам уменьшило количество иммунных клеток во всех совместных культурах, с большим влиянием на активацию CD8 T-клеток, особенно в совместных культурах с совместимыми PBMC. Например, как показано в Таблице 60, блокада HLA с помощью анти-HLA-блокирующего антитела привела к 58% подавлению CD8 T-клеток в совместных культурах инфицированных вирусом стволовых клеток с несовместимыми PBMC и 86% подавления CD8 T-клеток в совместных культурах инфицированных вирусом стволовых клеток с совместимыми PBMC. В общем, инфицированные вирусом опухолевые клетки вызывают большее количество NK и CD8 T-клеток, чем инфицированные вирусом стволовые клетки. Блокада HLA дала аналогичные результаты

для клеток РС3, что и для стволовых клеток, с 58% подавлением активации Т-клеток CD8 в совместных культурах инфицированных вирусом клеток РС3 и несовместимых РВМС и 82% подавления Т-клеток CD8. активация в совместных культурах инфицированных вирусом клеток РС3 и совместимых РВМС.

Эти результаты демонстрируют, что блокада HLA с помощью анти-HLA-блокирующего антитела подавляет аллогенные Т-клетки CD8 клеток-носителей и, в некоторой степени, ответы NK-клеток, причем блокирующая активность в целом более эффективна у совместимого донора CBD2, чем у донора CBD1. несовместимый донор CBD1, особенно в отношении ответов Т-лимфоцитов CD8. Эти данные согласуются с более активным участием врожденных популяций Т-клеток и дополнительными детерминантами аллогенного отторжения, распознаваемыми $\gamma\delta$ Т- и NKT-клетками в несовместимых условиях, а также с необходимостью их устранения в дополнение к классическим MHC класса I и молекулы класса II распознаваемых классическими CD8 и CD4 Т-клетками.

Таким образом, временная и/или постоянная блокада или устранение детерминант аллогенного отторжения, таких как молекулы HLA (MHC Class I) и другие, могут быть использованы для создания носителей на основе стволовых или опухолевых клеток с повышенным иммунным уклонением. Такие клетки-носители могут более эффективно доставлять онколитические вирусы, не вызывая аллогенных ответов, которые связаны с генерацией цитотоксических Т- и NK-клеток и секрецией эффекторных цитокинов, таких как IFN γ , которые вызывают антивирусное состояние и блокируют доставку и распространение вирусной нагрузки.

Таблица 59. Влияние блокирования HLA на реакцию CD8 Т-клеток и NK-клеток на инфицированные вирусом клетки-носители, совместно выращенные с несовместимыми и совместимыми РВМС.

Условия	CBD1 РВМС (несовместимы)		CBD2 РВМС (совместимые)	
	Средний% CD69 ⁺⁺ CD8 Т-клеток	Средний% CD69 ⁺⁺ NK- клеток	Средний% CD69 ⁺ CD8 Т-клеток	Средний% CD69 ⁺ NK- клеток
RM35 ADSC + VV	12,46	70,37	7,31	73,07
RM35 ADSC + VV + контроль изотипа	10,31	77,95	8,99	76,48
RM35 ADSC + VV + антитело	4,37	64,18	1,29	69,84

анти-HLA				
Опухолевые клетки PC3 + VV	32,59	88,66	14,27	80,03
Опухолевые клетки PC3 + VV + контроль изотипа	33,97	90,41	15,87	81,60
Опухолевые клетки PC3 + VV + антитело анти-HLA	14,38	80,46	2,88	82,42

Таблица 60. % подавления посредством блокирования HLA активации CD8 Т и NK-клеток

	CBD1 PBMC (несовместимы)		CBD2 PBMC (совместимые)	
	RM35 ADSC	Опухолевые клетки PC3	RM35 ADSC	Опухолевые клетки PC3
CD8 Т-клетки	57,62	57,66	85,63	81,84
NK-клетки	17,67	11,01	8,69	-0,10

Пример 9

Уклонение от аллогенного распознавания / отклонения путем модуляции сигналов NKG2D

В дополнение к молекулам МНС класса I и класса II, иммунные ответы и аллогенное отторжение инфицированных вирусом стволовых клеток и клеток-носителей опухоли усиливаются за счет включения различных маркеров, не относящихся к МНС, которые служат в качестве иммуностимулирующих молекул. Эти не-МНС маркеры активируются на поверхности инфицированных вирусом клеток или трансформированных опухолевых клеток и модулируют способность клеток-носителей уклоняться от иммунного отторжения. Эти «стресс-индуцированные» не-МНС-маркеры включают белки, связанные с МНС класса I, такие как MICA и MICB человека, которые являются лигандами для рецепторов NKG2D, которые экспрессируются NK-клетками, NKT-клетками, $\gamma\delta$ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками. Таким образом, рецепторы NKG2D могут сенсibilизировать клетки, которые экспрессируют «стресс-индуцированные» маркеры / лиганды, такие как носители онколитического вируса, для нацеливания на врожденный и адаптивный клеточный иммунитет.

Активацию передачи сигналов NKG2D оценивали по ее влиянию на способность инфицированных вирусом стволовых клеток или клеток-носителей опухоли уклоняться от иммунной системы. Человеческое NKG2D-специфическое антитело использовали для оценки эффектов вовлечения рецепторов NKG2D на иммунные ответы против

инфицированных вирусом клеток-носителей. Это антитело действует как мощный стимуляторный сигнал, который способствует и усиливает иммунное распознавание и активацию клеточных иммунных ответов. Это антитело NKG2D является антителом-агонистом, которое ведет себя как лиганд NKG2D, например, экспрессируемый инфицированными вирусом клетками и опухолевыми клетками. Его добавление, в этом примере, имитирует взаимодействие *in vivo* и активацию оси NKG2D.

Стволовые клетки, полученные из жировой ткани (ADSC-RM35s), и опухолевые клетки (клетки PC3 предстательной железы человека) были предварительно инфицированы вирусом осповакцины ACAM2000 при MOI 10 в течение 2 часов. 300000 PBMC от несовместимых (CBD1) и совместимых (CBD2) доноров были совместно культивировали в течение 60 часов, при температуре 37°C и 5% CO₂, с 10000 инфицированного вирусом RM35 ADSCs или опухолевыми PC3 клеток в присутствии 50 мкг / мл человеческого NKG2D-специфического антитела (Cat. No. MAB139-500, R&DSYSTEMS) или 50 мкг / мл мыши IgG₁ изотип контроль (Cat. No. MAB002, R&DSYSTEMS). Затем иммунную активацию оценивали путем определения процентного содержания CD69⁺γδT⁺ -клеток (CD3⁺, γδTCR⁺), общих NK-клеток (CD3⁺CD56⁺), субпопуляций цитокин-продуцирующих NK-клеток (CD56^{high}CD16⁻) и цитотоксических NK-клеток субпопуляции (CD56^{low}CD16⁺) используя многопараметрический анализ проточной цитометрии, как описано выше.

Результаты для совместных культур несовместимых (CBD1) или совместимых (CBD2) PBMC с инфицированными вирусом стволовыми клетками («VV-ADSC») показаны в таблице 61, а результаты для совместных культур с вирусом инфицированные опухолевые клетки PC3 («VV-PC3») показаны в Таблице 62 ниже. В таблицах показано процентное содержание CD69⁺-активированных γδ T-клеток, обычных NK-клеток CD56^{high}CD16⁻ (цитокин-продуцирующих) NK-клеток и CD56^{low}CD16⁺ (цитотоксических) NK-клеток, наблюдаемых в каждой совместной культуре, инкубированной с изотип контролем. или антителом, специфичное к NKG2D. Процент увеличения субпопуляций CD69⁺ активированных иммунных клеток с активацией NKG2D рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ Увеличения} = ((\text{средн.}\% \text{ Подтипа иммунных клеток с NKG2D-специфическим антителом} - \text{средн.}\% \text{ Подтипа иммунных клеток с изотип контролем}) / (\text{средн.}\% \text{ Подтипа иммунных клеток с изотип контролем})) \times 100.$$

Как показано в таблице 61, инкубация с антителом NKG2D увеличивала иммунную активацию / ответы на инфицированных вирусом носителей стволовых

клеток в несовместимых (CBD1) и совместимых (CBD2) условиях для всех подтипов иммунных клеток по сравнению с изотипическим контролем. Активация $\gamma\delta$ Т-клеток и цитокин-продуцирующих $CD56^{high}CD16^{-}NK$ -клеток была наиболее значительной, с увеличением на 16,5% и 27,4% в $\gamma\delta$ Т-клетках в несовместимых и совместимых условиях, соответственно, и на 83,3% и 51,5%. в $CD56^{high}CD16^{-}NK$ -клетки в несовместимых и совместимых настройках соответственно. Влияние на высоко цитотоксическую субпопуляцию $CD56^{low}CD16^{+}NK$ было минимальным, что можно объяснить блокированием антителом NKG2D контакта между цитотоксическими NK-клетками и клеточными носителями. Эти результаты указывают на то, что сигнальный путь/вовлечение NKG2D участвует в регуляции иммунных реакций против инфицированных клеток-носителей.

Результаты в таблице 62 показывают, что инкубация антитела NKG2D с совместными культурами инфицированных вирусом опухолевых клеток и несовместимых или совместимых РВМС не увеличивала активацию одних и тех же субпопуляций иммунных клеток. Эти результаты согласуются с более сильными иммунологическими ответами против носителей опухолевых клеток и их пониженной способностью избегать аллогенного распознавания по сравнению с носителями стволовых клеток. Противоположные иммунные ответы против носителей стволовых и опухолевых клеток можно отнести к тому, что путь NKG2D уже более активен в ответ на трансформированные / опухолевые клетки. Это связано с более высокими уровнями конститутивной экспрессии лигандов NKG2D, таких как MICA/B, на опухолевых клетках, что упрощает их распознавание. Добавление антитела NKG2D, которое ведет себя как лиганд NKG2D, не увеличивало активацию иммунной системы против носителей опухолевых клеток по сравнению с изотип контролем, поскольку опухолевые клетки уже демонстрируют повышенные уровни экспрессии лиганда NKG2D.

Данные указывают на то, что путь NKG2D участвует в контроле иммунных способностей инфицированных вирусами клеток-носителей. Таким образом, устранение лигандов NKG2D, таких как MICA/B и/или других, может улучшить иммунные свойства клеточных носителей. Это особенно актуально в контексте носителей опухолевых клеток, которые демонстрируют более высокие базальные уровни стресс-индуцированной экспрессии лиганда. Удаление лигандов NKG2D в инфицированных вирусом нетрансформированных стволовых клетках также может улучшить их иммунные свойства, поскольку эти клетки также усиливают экспрессию стресс-индуцированных лигандов по мере прогрессирования вирусной инфекции. Для достижения этого клетки-носители могут быть сконструированы для временного или

постоянного подавления экспрессии мембраносвязанного MICA/B. В качестве альтернативы можно ингибировать взаимодействие между рецептором NKG2D и его лигандами. Например, клетки-носители могут быть сконструированы для временной или постоянной экспрессии антагонистов MICA и MICB (например, kK5 (KHSV)) и/или антагонистов рецептора NKG2D (например, сопрох OMCP). В качестве альтернативы клетки можно предварительно обработать антагонистом или блокирующим антителом, таким как моноклональное антитело анти NKG2D (см., например, Kim *et al.* (2010) *Immunology* 130:545-555), чтобы предотвратить связывание его лигандом (s), действующим в роли антагониста.

Таблица 61. Влияние активации NKG2D на % CD69⁺ активированные иммунные субпопуляции в совместных культурах с инфицированными вирусом стволовыми клетками с несовместимыми и совместимыми PBMC.

Подтип иммунных клеток	Средний % CD69 ⁺ подтипов активированных иммунных клеток					
	CBD1 PBMC			CBD2 PBMC		
	VV-ADSC + контроль изотипа	VV-ADSCs + Антитело к NKG2D	% Увеличение с антителом NKG2D	VV-ADSC + контроль изотипа	VV-ADSC + антитело к NKG2D	% Увеличение с антителом NKG2D
γδ T	47.2	55.0	16.5	21.5	27.4	27.4
NK	72.4	77.1	6.5	68.2	77.5	13.6
CD56 ^{high} CD16 ⁻	19.8	36.3	83.3	23.1	35.0	51.5
CD56 ^{low} CD16 ⁺	83.1	85.6	3.0	67.3	76.8	14.1

Таблица 62. Влияние активации NKG2D на % CD69⁺ активированные иммунные субпопуляции в совместных культурах с инфицированными вирусом опухолевыми клетками с несовместимыми и совместимыми PBMC.

Подтип иммунных клеток	Средний % CD69 ⁺ подтипов активированных иммунных клеток					
	CBD1 PBMC			CBD2 PBMC		
	VV-PC3 + контроль изотипа	VV-PC3 + Антитело к NKG2D	% Увеличение с антителом	VV-PC3 + контроль изотипа	VV-PC3 + Антитело к NKG2D	% Увеличение с антителом

			м NKG2D			м NKG2D
$\gamma\delta$ T	81.4	82.6	1.5	33.1	33.6	1.5
NK	90.3	89.8	-0.6	84.5	82.5	-2.4
CD56 ^{high} CD16 ⁻	72.5	73.1	0.8	62.5	66.9	7.0
CD56 ^{low} CD16 ⁺	94.6	95.4	0.8	82.8	80.7	-2.5

Пример 10

Клетки-носители, сенсibilизированные / сконструированные для секретирования иммуносупрессивных факторов

Стволовые клетки и опухолевые клетки используют различные стратегии иммунного подавления и уклонения, включая экспрессию IDO и секрецию IL-10. Однако амплификация вируса в клетках-носителях вызывает постепенную потерю жизнеспособности клеток и иммуносупрессивного потенциала. Чтобы преодолеть это ограничение, была оценена способность высокой дозы иммуносупрессивного цитокина IL-10 обратить вспять опосредованную вирусом потерю иммуносупрессивных свойств и улучшить способность инфицированных вирусом клеток-носителей избегать аллогенного отторжения / ответов или раннего иммунного распознавания.

Неинфицированные или инфицированные вирусом осповакцины клетки-носители (RM35 ADSC - стволовые клетки или PC3 - опухолевые клетки) совместно культивировали с несовместимыми (CBD1) и совместимыми (CBD2) PBMC, как описано в Примере 8 выше, в присутствии или в отсутствие экзогенно предоставленный рекомбинантный человеческий IL-10 (mammalianexpressed, carrier-free) (cat. # 573202; BioLegend, SanDiego, CA. Вкратце, 300000 PBMC от несовместимых и совместимых доноров совместно культивировали в течение 60 часов с 10000 стволовых клеток, полученных из жировой ткани (RM35) или опухолевых клеток (клетки PC3 предстательной железы человека), которые были инфицированы вирусом осповакцины ACAM2000 при MOI 10 для 2. часы. Иммунную активацию анализировали после совместного культивирования PBMC с предварительно инфицированными опухолевыми клетками ADSC-RM35 или PC3 в течение 60 часов при 37°C и 5% CO₂ в присутствии или в отсутствие 10 нМ рекомбинантного человеческого IL-10. Различные подтипы иммунных клеток были идентифицированы и подсчитаны с помощью многопараметрического анализа проточной цитометрии с использованием CD69 в качестве маркера активации и набора маркеров, специфичных для определенного типа клеток, описанных ранее (см. Пример 8). Таблица 63 ниже показывает средние числа для каждой из субпопуляций CD69⁺ активированных иммунных клеток, извлеченных из

совместных культур несовместимых или совместимых РВМС с каждым из: неинфицированных стволовых клеток; стволовые клетки, инфицированные вирусом осповакцины; или стволовые клетки, инфицированные вирусом осповакцины + IL-10. В таблице 64 представлены те же данные для совместных культур с неинфицированными и инфицированными вирусом коровьей оспы опухолевыми клетками РС3. В таблице 65 представлены результаты в виде процента опосредованного IL-10 подавления подтипов иммунных клеток, который был рассчитан по формуле:

$$\% \text{ IL-10 подавление} = (1 - (\text{Ср количество иммунных клеток с инфицированным вирусом клеток - носителей} + \text{IL} - . 10 / \text{ср. иммунного число клеток с клетками - носителей инфицированного вирусом})) \times 100.$$

Как показано в Таблицах 63 и 64, инфицированные вирусом носители стволовых и опухолевых клеток вызывают иммунный ответ по всем подтипам иммунных клеток по сравнению с неинфицированными клетками-носителями, с большей реакцией в совместных культурах с несовместимыми (CBD1) по сравнению с совместимыми (CBD2) РВМС. Инфицированные вирусом опухолевые клетки вызвали большее количество всех подтипов иммунных клеток, что согласуется с тем фактом, что стволовые клетки обладают усиленными иммуносупрессивными и иммунными свойствами. Добавление IL-10 не предотвращало активацию иммунной системы в ответ на инфицированные вирусом клетки-носители, но значительно подавляло количество активированных CD69⁺ иммунных клеток для всех иммунных подтипов, протестированных как в совместимых, так и в несовместимых условиях, а также в совместных культурах с инфицированными вирусом стволовыми клетками (таблица 63) или в опухолевых клетках (таблица 64). В целом, эффективность опосредованного IL-10 подавления была наивысшей в совместных культурах инфицированных вирусом стволовых клеток с совместимыми РВМС (см. Таблицу 65). Эти результаты согласуются с более мощными аллогенными ответами на клетки-носители (опухолевые или стволовые клетки) в несовместимых условиях (CBD1 против CBD2). Данные показывают, что сконструированная экспрессия IL-10 и других иммуносупрессивных факторов в стволовых или опухолевых клетках-носителях может поддерживать и расширять иммуносупрессивные свойства клеток-носителей, позволяя им уклоняться от иммунного распознавания и аллогенного отторжения. Это, в свою очередь, повышает их терапевтическую эффективность за счет улучшения их способности усиливать, доставлять и распространять вирус к опухолевым клеткам-мишеням до того, как они будут атакованы иммунной системой.

Для этого клетки-носители могут быть сконструированы для временной или постоянной экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого или вирусного происхождения. Например, клетки-носители могут быть сконструированы для экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого происхождения, таких как, помимо прочего, IDO, аргиназа, TRAIL, iNOS, IL-10, TGF β , VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, sMICA, sMICB, sHLA-G, HLA-E, PD-L1, FAS-L, B7-H4 и одноцепочечные антитела (scFv), которые нацелены или истощают NK и/или NKT-клетки. Клетки-носители также могут быть сконструированы для экспрессии иммуносупрессивных факторов вирусного происхождения, такие как, но не ограничиваясь ими, вирус экстремелии/осповакцины SPI-2/CrmA (ингибитор иммунного FAS/TNF/Гранзим В индуцированного апоптоза); вирус осповакцины, кодируемый N1 (антагонист IL-1/NF κ B/IRF3); HA (антагонисты NCR, нацеленные на NKp30, NKp44, NKp46); связывающий белок IL-18; A40R; A46R; A52R; B15R/B16R; блокаторы TNF α (например, вирус осповакцины CmrC/CmrE); блокаторы IFN α/β (например, вирус осповакцины B18R/B19R); блокаторы IFN γ (например, вирус осповакцины B8R); и другие антагонисты IL-1/IL-1 β /NF κ B/IRF3/NCR/MHCI/TLR/NKG2D.

Таблица 63. Влияние IL-10 на среднее количество CD69⁺ подтипов⁺ иммунных клеток в совместных культурах с неинфицированными и инфицированными вирусом стволовыми клетками с несовместимыми и совместимыми PBMC.

Подтип иммунных клеток	Среднее количество клеток					
	Несовместимые PBMC (CBD1)			Совместимые PBMC (CBD2)		
	RM35 ADSC	RM35 ADSC + VV	RM35 ADSC + VV + IL-10	RM35 ADSC	RM35 ADSC + VV	RM35 ADSC + VV + IL-10
$\gamma\delta$ T	5.0	413.3	332.0	2.0	27.5	16.0
iNKT	1.0	42.2	18.5	2.0	32.5	4.5
NKT	3.5	235.4	191.0	2.0	42.5	12.0
CD4 T	6.0	229.6	102.0	17.0	76.5	20.0
CD8 T	1.0	186.4	118.0	6.0	118.5	43.0
NK	4.5	547.3	448.0	13.0	1390	568.5
CD56 ^{high} CD16 ⁻	0.0	39.6	25.5	1.5	43.0	20.0
CD56 ^{low} CD16 ⁺	3.5	292.0	305.0	7.5	759.5	380.5

Таблица 64. % Влияние IL-10 на среднее количество CD69⁺ подтипов иммунных клеток в совместных культурах с опухолевыми клетками с несовместимыми и совместимыми PBMC

Подтип иммунных клеток	Среднее количество клеток					
	Несовместимые PBMC (CBD1)			Совместимые PBMC (CBD2)		
	PC3 опухолевые клетки	PC3 + VV	PC3 + VV + IL-10	PC3 опухолевые клетки	PC3 + VV	PC3 + VV + IL-10
γδ T	38.5	780.5	514.5	4.5	84.0	62.5
iNKT	6.5	192.5	64.0	3.5	92.5	39.5
NKT	27.5	1073.5	474.0	3.5	79.0	59.0
CD4 T	48.0	960.0	380.0	49.5	675.0	244.5
CD8 T	21.0	858.0	285.5	5.0	244.5	106.0
NK	67.5	807.0	529.0	18.5	1228.0	847.0
CD56 ^{high} CD16 ⁻	3.0	77.0	51.0	2.5	68.0	40.0
CD56 ^{low} CD16 ⁺	44.5	426.0	313.5	12.0	654.5	503.5

Таблица 65. % опосредованного IL-10 подавления подтипов иммунных клеток в совместных культурах со стволовыми и опухолевыми клетками с несовместимыми и совместимыми PBMC

Подтип иммунных клеток	% Подавление IL-10			
	RM35 ADSC		Опухолевые клетки PC3	
	CBD1 PBMC	CBD2 PBMC	CBD1 PBMC	CBD2 PBMC
γδ T	19.67	41.82	34.08	25.60
iNKT	56.15	86.15	66.75	57.30
NKT	18.85	71.76	55.85	25.32
CD4 T	55.57	73.86	60.42	63.78
CD8 T	36.69	63.71	66.72	56.65
NK	18.14	59.10	34.45	31.03
CD56 ^{high} CD16 ⁻	35.54	53.49	33.77	41.18
CD56 ^{low} CD16 ⁺	-4.45	49.90	26.41	23.07

Поскольку изменения будут очевидны для специалиста в данной области техники, предполагается, что это изобретение будет ограничено только рамками прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клетка-носитель, содержащая онколитический вирус, при этом:
 вирус может размножаться в клетке;
 клетку можно вводить человеку;
 клетка была обработана и/или модифицирована для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки для введения субъекту-человеку;
 и, клетка может быть обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке.
2. Клетка по п. 1, в которой: клетка была обработана и/или модифицирована для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки для введения человеку;
 и клетка была обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке.
3. Клетка по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что клетка является перmissive для амплификации онколитического вируса и накапливается в опухолях и/или не распознается иммунной системой субъекта в течение времени, достаточного для доставки вируса в опухоль у субъекта.
4. Клетка по любому из пп. 1-3, выбранная из обработанной или модифицированной стволовой клетки, иммунной клетки и опухолевой клетки.
5. Клетка по любому из пп. 1-4, которая была выделена или взята у субъекта и инфицирована онколитическим вирусом.
6. Клетка по любому из пп. 1-5, которая представляет собой стволовую клетку.
7. Клетка по п. 6, в которой стволовая клетка не является эмбриональной клеткой или фетальной клеткой или не происходит от линии эмбриональных клеток.
8. Клетка по п. 6, которая выбрана из зрелой, эмбриональной и фетальной стволовых клеток.
9. Клетка по п. 6, выбранная из числа мезенхимальной, нервной, тотипотентной, плюрипотентной, индуцированной плюрипотентной, мультипотентной, олигопотентной, унипотентной, стромальной жировой, эндотелиальной, костного мозга, пуповинной крови, периферической крови взрослых, фибробластов, миобластов, малых ювенильных клеток, эпителиальные и эмбриональных эпителиальных стволовых клеток.
10. Клетка по любому из пп. 6-9, которая представляет собой мезенхимальную стволовую клетку.

11. Клетка по п. 10, отличающаяся тем, что мезенхимальные стволовые клетки выбраны из мезенхимальных клеток взрослого костного мозга, жировой ткани, крови, пульпы зубов, неонатальной пуповины, пуповинной крови, плаценты, стромальные плацентарные адгезивные клетки, плацентарные децидуальные стромальные клетки, эндометриальные регенеративные клетки, плацентарные бипотентные эндотелиальные/мезенхимальные клетки-предшественники, мезенхимальные стволовые клетки из амниотической мембраны или жидкости, клетки-предшественники из амниотических жидкостей, мезенхимальные стволовые клетки желе Уортона, стволовые клетки тазового пояса, мезенхимальные стромальные клетки ворсинок хориона, мезенхимальные стволовые клетки подкожной жировой ткани, перициты, адвентициальные ретикулярные стволовые клетки, стволовые клетки, полученные из волосяных фолликулов, гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки надкостницы, мезенхимальные стволовые клетки боковых пластин, стволовые клетки выпавших молочных зубов, стволовые клетки периодонтальной связки, клетки-предшественники зубных фолликулов, стволовые клетки из апикального сосочка или мышечные сателлитные клетки.
12. Клетка по любому из пп. 1-9, которая представляет собой жировую клетку.
13. Клетка по п. 12, которая представляет собой стромальную мезенхимальную клетку жировой ткани.
14. Клетка по любому из пп. 6-9, которая представляет собой эндотелиальную клетку, выбранную из эндотелиальных клеток-предшественников, эндотелиальных клеток-предшественников плаценты, ангиогенных эндотелиальных клеток и перицитов.
15. Клетка по любому из пп. 6-9, которая представляет собой эмбриональную эпителиальную клетку.
16. Клетка по любому из пп. 1-5, которая является иммунной клеткой.
17. Клетка по п. 16, где иммунная клетка выбрана из гранулоцитов, тучных клеток, моноцитов, дендритных клеток, натуральных киллеров, лимфоцитов, трансгенных клеток Т-клеточного рецептора (TCR), нацеленных на специфические антигены опухоли, и CAR-T-клетки, нацеленных на специфические антигены опухоли.
18. Клетка по любому из пп. 1-5, которая представляет собой модифицированную или обработанную клетку линии гематологических злокачественных клеток.
19. Клетка по любому из пп. 1-5, которая является аллогенной по отношению к субъекту, подлежащему лечению.
20. Клетка по любому из пп. 1-5, которая представляет собой стволовую клетку, полученную из жировой ткани.

21. Клетка по любому из пп. 1-5, которая представляет собой клетку из линии клеток, где линия клеток выбрана из числа следующих линий: лейкоза человека, Т-клеточного лейкоза, миеломоноцитарного лейкоза, лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза, хронического миелолейкоза, острого лимфобластного лейкоза, эритролейкемии, миеломонобластного лейкоза, злокачественной неходжкинской НК-лимфомы, миеломы/плазматомы, множественной миеломы и клеточной линии макрофагов.

22. Клетка по п. 21, в которой клеточная линия выбрана из:

линия клеток лейкоза, представляющая собой KASUMI-1, HL-60, THP-1, K-562, RS4;11, MOLT-4, CCRF-CEM, JVM-13, 31E9, ARH-77, MoB, JM1, NALM-1, или ProPak-X.36;

линия клеток Т-клеточного лейкоза, представляющая собой HM-2, CEM-CM3, Jurkat/Jurkat клон E6-1, J.CaM1.6, BCL2 Jurkat, BCL2 S87A Jurkat, BCL2 S70A Jurkat, Neo Jurkat, BCL2 AAA Jurkat, J.RT3-T3.5, J45.01, J.gamma1, J.gamma1.WT, JK28, P116, P116.cl39, A3, JX17, D1.1, I 9.2, или I 2.1;

линия клеток миеломоноцитарного лейкоза, представляющая собой MV-4-11;

линия клеток лимфомы, представляющая собой HT, BC-3, CA46, Raji, Daudi, GA-10-Clone-4, HH или H9;

линия клеток неходжкинской лимфомы, представляющая собой SU-DHL-1, SU-DHL-2, SU-DHL-4, SU-DHL-5, SU-DHL-6, SU-DHL-8, SU-DHL-10, SU-DHL-16, NUDUL-1, NCEB-1, EJ-1, BCP-1, TUR или U-937;

линия клеток лимфомы Беркитта, представляющая собой Ramos/RA 1, Ramos.2G6.4C10, P3HR-1, Daudi, ST486, Raji, CA46, человеческий гамма-герпесвирус 4 / HHV-4 опухоли щеки от пациента с лимфомой Беркитта, DG-75, GA-10, NAMALWA, HS-Sultan, Jiyoye, NC-37, 20-B8, EB2, 1G2, EB1, EB3, 2B8, GA-10 клон 20, или НКВ-11 / Kidney-B cell Hybrid;

линия клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, представляющая собой Толедо или Пфайффера;

линия клеток лимфомы клеток мантии, представляющая собой JeKo-1, JMP-1, PF-1, JVM-2, REC-1, Z-138, Mino или MAVER-1;

линия клеток острого миелоидного лейкоза, представляющая собой AML-193, BDCM, KG-1, KG-1a, Kasumi-6 или HL-60/S4;

линия клеток хронического миелолейкоза, представляющая собой K562, K562-г, K562-s, LAMA84-r, LAMA84-s, AR230-г или AR230-s;

линия клеток острого лимфобластного лейкоза, представляющая собой N6/ADR, RS4;11, NALM6 клон G5, Loucy, SUP-B15 или CCRF-SB;

линия клеток эритролейкемии, представляющая собой IDH2-mutant-TF-1 Isogenic линия клеток;

линия клеток миеломонобластного лейкоза, представляющая собой GDM-1;

линия клеток злокачественной неходжкинской NK-лимфомы, представляющая собой NK-92 или NK-92MI;

линия клеток миеломы/плазмацитомы, представляющая собой U266B1/U266, HAA1, SA13, RPMI-8226, NCI-H929 или MC/CAR;

линия клеток множественной миеломы, представляющая собой MM. 1R, IM-9 или MM. 1S;

линия клеток макрофагов, представляющая собой MD, SC или WBC264-9C.

23. Клетка ячейка по любому из пунктов 1-5, являющаяся модифицированной или обработанной клеткой, выбранной из:

мезенхимальная линия стволовых клеток, представляющая APCETH-201 (APCETH), APCETH-301 (APCETH), Cx601 (TIGENIX), TEMCELL, MSC-100-IV или Prochymal (MESOBLAST); или

индуцированная плюрипотентная стволовая клетка, представляющая собой ToleraCyte (Fate Therapeutics); или

клеточная линия фибробластов, представляющая собой CCD-16Lu или WI-38; или

клеточная линия ассоциированных с опухолью фибробластов, представляющая собой Malme-3M, COLO 829, HT-144, Hs 895.T, hTERT или PF179T CAF; или

линия эндотелиальных клеток, представляющая собой HUVEC, HUVEC/TERT 2 или TIME; или

линия эмбриональных эпителиальных клеток, представляющая собой HEK-293, HEK-293 STF, 293T/17, 293T/17 SF или HEK-293.2 sus; или

линия эмбриональных стволовых клеток, представляющая собой hESC BG01V; или

линия эпителиальных клеток, представляющая собой NuLi-1, ARPE-19, VK2/E6E7, Ect1/E6E7, RWPE-2, WPE-stem, End1/E6E7, WPMY-1, NL20, NL20-TA, WT 9-7, WPE1-NB26, WPE-int, RWPE2-W99 или BEAS-2B.

24. Клетка по любому из пп. 1-9, которая представляет собой модифицированную или обработанную клетку из линии клеток, которая является линией клеток гематологической злокачественной опухоли человека.

25. Клетка по любому из пп. 1-9, которая является модифицированной или обработанной клеткой из линии опухолевых клеток человека.

26. Клетка по п. 25, где линия клеток выбрана из панели NCI-60, фибросаркомы, гепатокарциномы, рака простаты, рака груди, рака головы и шеи, рака легких, рака поджелудочной железы, рак яичников, рака толстой кишки, рака желудка, гинекологического рака, саркомы, меланомы, плоскоклеточной карциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточной карциномы, эмбриональной карциномы, тератомы яичка, глиобластомы, астроцитомы, карциномы щитовидной железы или линии клеток мезотелиомы.

27. Клетка по любому из пп. 1-9, которая представляет собой модифицированную или обработанную клетку вакцины из цельных опухолевых клеток GM-CSF (GVAX).

28. Клетка по п. 27, где GVAX представляет собой GVAX простаты; GVAX поджелудочной железы; GVAX легкого; или GVAX почечной клетки.

29. Клетка по любому из пп. 1-28, где онколитический вирус выбран из вируса болезни Ньюкастла, парвовируса, вируса кори, реовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV), аденовируса, полиовируса, вируса простого герпеса (HSV), поксвируса, вируса Коксаки (CXV) и вируса Сенека-Валли (SVV).

30. Клетка по любому из пп. 1-29, где онколитический вирус представляет собой вирус осповакцины.

31. Клетка по любому из пп. 1-29, где онколитический вирус представляет собой вирус осповакцины, который представляет собой вакцину против оспы.

32. Клетка по п. 30 или п. 31, где вирус осповакцины выбран из штамма Lister, штамма Western Reserve (WR), штамма Copenhagen (Cop), штамма Bern, штамма Paris, штамма Tashkent, штамма Tian Tan, штамма Wyeth (DRYVAX), штамма IND-J, штамма IND-W, штамма Brighton, штамма Ankara, штамма CVA382, штамма Dairen I, штамма LC16m8, штамма LC16M0, штамма модифицированной осповакцины Ankara (MVA), штамма ACAM, штамма WR 65-16, штамма Connaught, штамма Совета здравоохранения Нью-Йорка (NYCBH), штамма EM-63, штамма NYVAC, штамма Lister LIVP, штамма JX-594, штамма GL-ONC1 и мутантного штамма vvDD TK с делециями в VGF и TK.

33. Клетка по п. 32, характеризующаяся тем, что вирус осповакцины представляет собой ACAM2000 или ACAM1000.

34. Клетка по любому из пп. 1-33, характеризующаяся тем, что вирус был модифицирован для экспрессии продукта гетерологичного гена и/или повышения онкогенности и/или понижения токсичности (повышения аттенуации).

35. Клетка по любому из пп. 1-34, характеризующаяся тем, что онколитический вирус кодирует детектируемый маркер.
36. Клетка по п. 35, характеризующаяся тем, что маркер представляет собой флуоресцентный белок.
37. Клетка по п. 29, характеризующаяся тем, что вирус представляет собой аденовирус, который представляет собой ONYX-015, CG00070, Oncorin (H101), ColoAd1, ONCOS-102 или Delta24-RGD/DNX-2401.
38. Клетка по любому из пп. 1-29 и 34-36, характеризующаяся тем, что вирус представляет собой модифицированный вирус HSV-1.
39. Клетка по любому из пп. 1-38, характеризующаяся тем, что была сенсibilизирована или обработана для достижения, усиления или улучшения одного или нескольких из: амплификации вируса в клетке, блокирования индукции противовирусного состояния в субъекте или в микроокружении опухоли, иммунного подавления/иммунного уклонения, защиты от аллогенных детерминантов инактивации/отторжения и/или защиты от комплемента.
40. Клетка по п. 39, характеризующаяся тем, что была сенсibilизирована для усиления или улучшения амплификации вируса.
41. Клетка по п. 39, характеризующаяся тем, что была сенсibilизирована или обработана для блокирования индукции антивирусного состояния у субъекта или в микроокружении опухоли.
42. Клетка по п. 39, характеризующаяся тем, что была сенсibilизирована для усиления амплификации вируса путем предварительной обработки или загрузки одним или несколькими цитокинами или факторами роста.
43. Клетка по любому из пп. 1-42, которую обрабатывали для ингибирования или модифицировали для экспрессии ингибитора интерферона- γ и/или интерферона- β .
44. Клетка по любому из пп. 39-43, характеризующаяся тем, что была сенсibilизирована для усиления амплификации вируса путем предварительной обработки или загрузки упомянутой клетки одним или несколькими из: IL-10, TGF β , VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, GM-CSF, агонистом RTK/mTOR, белковым лигандом Wnt и ингибитором/антагонистом GSK3.
45. Клетка по любому из пп. 1-44, характеризующаяся тем, что была сенсibilизирована для блокирования индукции противовирусного состояния путем предварительной обработки или загрузки упомянутой клетки одним или несколькими низкомолекулярными или белковыми ингибиторами, которые: препятствуют рецепторам IFN типа I / типа II, препятствуют нисходящей передаче сигналов, препятствуют

передаче сигналов IFNAR1 / IFNAR2, препятствуют передаче сигналов IFNGR1 / IFNGR2, препятствуют передаче сигналов STAT 1/2, препятствуют передаче сигналов Jak1, препятствуют передаче сигналов Jak2, препятствуют передаче сигналов IRF3, препятствуют передаче сигналов IRF7, препятствуют передаче сигналов IRF9, препятствуют передаче сигналов TYK2, препятствуют передаче сигналов TBK1 или препятствуют другим путям передачи сигналов, которые влияют на иммунный ответ против онколитического вируса в клетке или субъекте.

46. Клетка по любому из пп. 1-45, которая была сенсibilизирована для блокирования индукции противовирусного состояния путем предварительной обработки или загрузки клетки одним или несколькими ингибиторами HDAC для вмешательства/дерегулирования передачи сигналов IFN/ответной реакции.

47. Клетка по п. 46, характеризующаяся тем, что ингибитор HDAC выбран из вориностата, ромидепсина, хидамида, панобиностата, белиностата, вальпроевой кислоты, моцетиностата, абексинастата, энтиностата, SB939, резминостата, гивиностата, хизиностата, HBIvetrin-8000, Keys-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, ACY-1215, ME-344, сульфорафана и трихостатина.

48. Клетка по любому из пп. 1-47, которая была сенсibilизирована для блокирования индукции противовирусного состояния или усиления амплификации вируса путем предварительной обработки или загрузки клетки антагонистами чувствительных к вирусу путей и/или путей противовирусной защиты.

49. Клетка по п. 48, отличающаяся тем, что пути противовирусной защиты и/или чувствительные к вирусу пути защиты опосредованы/обусловлены одним или несколькими из: STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3 и DAI (ZBP1).

50. Клетка по п. 49, характеризующаяся тем, что антагонисты выбраны из одного или нескольких: белков осповакцины K1, E3L и K3L; белков гриппа NS1/NS2; гепатита С NS3-4A; белков аренавируса NP и Z; вируса Эбола VP35; HSV US11, ICP34.5 и ICP0; MCMV M45; и белка X вируса болезни Борна.

51. Клетка по любому из пп. 1-50, характеризующаяся тем, что была сенсibilизирована для защиты от детерминант инактивации/отторжения.

52. Клетка по любому из пп. 1-51, характеризующаяся тем, что клетка была сенсibilизирована для защиты от детерминант инактивации/отторжения путем предварительной обработки или загрузки клетки одним или несколькими антагонистами главного вирусного комплекса гистосовместимости (МНС).

53. Клетка по п. 52, характеризующаяся тем, что антагонист МНС выбран из одного или нескольких антагонистов: МНС1 А40R из осповакцины; Nef и TAT от ВИЧ; E3-19K из аденовируса; ICP47 от HSV 1 и HSV2; CPXV012 и CPXV203 от коровьей оспы; ORF66 вируса ветряной оспы (VZV); EBNA1, BNLF2a, BGLF5 и BILF1 из вируса Эпштейна-Барра (EBV); US2 / gp24, US3 / gp23, US6 / gp21, US10 и US11 / gp33 из цитомегаловируса человека (hCMV); Rh178 / VHNCE из CMV-резуса (RhCMV); U21 из вируса герпеса человека-6 или HHV7; LANA1, ORF37 / SOX, kK3 / MIR1 и kK5 / MIR2 из вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши (KSHV); mK3 из вируса гепатита мышей-68 (MHV-68); UL41 / vhs из альфа-вируса герпеса, вируса простого герпеса (HSV), вируса герпеса крупного рогатого скота-2 (BHV-1) и вируса псевдобешенства (PRV); UL49.5 из вируса ветряной оспы, BHV-1, вируса герпеса лошадей 1 и 4 (EHV-1/4) и PRV; и m4 / gp34, m6 / gp48, m27 и m152 / gp40 из мышинного CMV (mCMV).

54. Клетка по п. 51, характеризующаяся тем, что клетка была сенсibilизирована для защиты от детерминант инактивации /отторжения путем предварительной обработки или загрузки клетки антагонистами генов MICA и MICB, связанных с цепью МНС класса I человека, или антагонистами бета-2 микроглобулинов (B2M) вирусного происхождения.

55. Клетка по п. 39, характеризующаяся тем, что клетка была сенсibilизирована для усиления подавления иммунитета/уклонения от иммунитета путем предварительной обработки или загрузки указанной клетки иммуносупрессорными факторами вирусного происхождения.

56. Клетка по п. 55, характеризующаяся тем, что иммуносупрессорный фактор выбирали из одного или нескольких из: ингибиторов иммунного апоптоза, индуцированного FAS/TNF/гранзимом B; антагонистом IL-1/NFκB/IRF3; антагонистом IL-1 и толл-подобным рецептором (TLR); антагонистом IL-1β; блокатором TNFα; блокатором IFNα/β; и блокатором IFNγ.

57. Клетка по п. 39, характеризующаяся тем, что клетка была сенсibilизирована для усиления подавления иммунитета/уклонения от иммунитета путем предварительной обработки или загрузки клетки одним или несколькими низкомолекулярными ингибиторами одного или нескольких переносчиков антигенных пептидов - 1/2 (TAP-1 и TAP-2) и тапазин.

58. Клетка по любому из пп. 1-57, характеризующаяся тем, что клетка была сенсibilизирована для защиты от системы комплемента.

59. Клетка по п. 58, сенсibilизированная путем предварительной обработки или загрузки клетки антителом, низкомолекулярным соединением или другим ингибитором белка комплемента.

60. Клетка по п. 59, где белок комплемента представляет собой C3 или C5.

61. Клетка по любому из пп. 39-60, характеризующаяся тем, что клетку предварительно обрабатывают агентом, который сенсibilизирует или защищает, в течение от 15 минут до 48 часов перед вирусной инфекцией, или перед введением субъекту, или перед хранением.

62. Клетка по любому из пп. 1-61, сенсibilизированная для увеличения выживаемости и улучшения местной иммуносупрессии по сравнению с опосредованным вирусом уничтожением.

63. Клетка по п. 62, которая предварительно обработана агонистом (агонистами) одним или более агонистом из числа: STING, PKR, RIG-I, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3, и DAI (ZBP1).

64. Клетка по любому из пп. 1-63, сконструированная для улучшения вирусной амплификации и/или иммуномодуляции посредством одной или несколькими из:

а) конструкция, направленная на предотвращение или невосприимчивость к противовирусному состоянию, индуцированному интерфероном;

б) конструкция для уклонения от аллогенного распознавания одним или несколькими Т- и NKT-клетками и/или одним или несколькими адаптивными иммунными ответами $\gamma\delta$ Т-клеток;

в) конструкция для уклонения от аллогенного распознавания NK-клетками и/или одного или нескольких врожденных иммунных ответов $\gamma\delta$ Т-клеток;

г) конструкция для экспрессии иммуносупрессивных факторов человеческого или вирусного происхождения для предотвращения/ингибирования аллогенных анти-несущих клеток или антивирусных иммунных ответов;

д) конструкция для экспрессии факторов, происходящих от рака или стволовых клеток, которые способствуют вирусной инфекции, в противном случае непермиссивных клеток-носителей и/или опухолевых клеток; а также

е) конструкция для экспрессии факторов, влияющих на функцию комплемента и/или нейтрализующих антител.

65. Клетка по п. 64, которая а) сконструирована так, чтобы не реагировать на индуцированное интерфероном антивирусное состояние путем временного или постоянного подавления рецепторов IFN типа I / типа II и/или передачи сигналов ниже

по течению, причем постоянное подавление может быть достигнуто путем удаления локуса, который подавлен.

66. Клетка по п. 65, где подавление осуществляется путем подавления одного или нескольких из следующих: экспрессия рецептора интерферона типа I / типа II, экспрессия рецептора IFN α/β , экспрессия рецептора IFN γ , экспрессия рецептора IFNAR1 / IFNAR2, экспрессия рецептора IFNGR1 / IFNGR2, экспрессия рецептора STAT 1/2, экспрессия рецептора Jak 1/2, экспрессия рецептора IRF3, экспрессия рецептора IRF7, экспрессия рецептора IRF9, экспрессия киназы TYK2 и экспрессия киназы TBK1.

67. Клетка по п. 64, которая а) сконструирована так, чтобы не реагировать на индуцированное интерфероном антивирусное состояние путем временного или постоянного подавления элементов цитозольной вирусной ДНК/РНК-чувствительного и противовирусной защиты.

68. Клетка по п. 67, в которой подавление осуществляется путем подавления одного или нескольких из STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3 и DAI (ZBP1).

69. Клетка по п. 64, которая а) сконструирована так, чтобы предотвращать или не реагировать на индуцированное интерфероном антивирусное состояние путем временной или постоянной экспрессии антагонистов чувствительных к вирусу путей и путей противовирусной защиты, опосредованных STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3 и DAI (ZBP1).

70. Клетка по п. 69, где антагонист (ы) выбран (ы) из одного или более из: белков осповакцины K1, E3L и K3L; белков NS1/NS2 гриппа А; гепатита С NS3-4A; белков аренавируса NP и Z; вируса Эбола VP35; HSV US11, ICP34.5 и ICP0; MCMV M45; и белка X вируса болезни Борна.

71. Клетка по любому из пп. 64-70, которая б) сконструирована так, чтобы уклоняться от аллогенного распознавания одной или несколькими Т- и НКТ-клетками и/или одним или несколькими приобретенными иммунными ответами $\gamma\delta$ Т-клеток.

72. Клетка по п. 71, у которой конструкция уклонения от аллогенного распознавания одним или несколькими Т- и НКТ-клетками и/или одним или несколькими адаптивными иммунными ответами $\gamma\delta$ Т-клеток осуществляется одним или обоими из следующих факторов:

(i) временным или постоянным подавлением одной или нескольких из: молекул МНС класса I, молекул МНС класса II, МНС-подобных молекул и регуляторов транскрипции или экспрессии МНС класса I, МНС класса II, МНС-подобных молекул; а также

(ii) временной или постоянной экспрессией антагонистов В2М вирусного происхождения и/или антагонистов МНС вирусного происхождения.

73. Клетка по п. 72, в которой:

временное или постоянное подавление одной или нескольких молекул МНС класса I осуществляется постоянным или временным подавлением HLA-A, В и/или С;

временное или постоянное подавление одной или нескольких молекул МНС класса II осуществляется путем подавления одного или нескольких из HLA-DP, DQ и DR;

временное или постоянное подавление одной или нескольких молекул, подобных МНС, осуществляется путем подавления CD1a/b/c/d; а также

временное или постоянное подавление одного или нескольких регуляторов транскрипции или экспрессии МНС класса I, МНС класса II и МНС-подобных молекул осуществляется путем подавления одного или нескольких из TAP1/2, Тапасина, Beta-2 микроглобулина, СИТА, RFXANK, RFX5 и RFXAP.

74. Клетка по п. 72 или п. 73, в которой временное или постоянное подавление В2М и/или МНС осуществляется путем временной или постоянной экспрессии одного или нескольких из:

антагонистов В2М вирусного происхождения, выбранных из UL18 из hCMV; а также

один или несколько антагонистов МНС, выбранных из одного или нескольких антагонистов МНСI A40R из осповакцины; Nef и TAT от ВИЧ; E3-19K из аденовируса; ICP47 от HSV 1 и HSV2; CPXV012 и CPXV203 от коревой оспы; ORF66 вируса ветряной оспы (VZV); EBNA1, BNLF2a, BGLF5 и BILF1 из вируса Эпштейна-Барра (EBV); US2 / gp24, US3 / gp23, US6 / gp21, US10 и US11 / gp33 из цитомегаловируса человека (hCMV); Rh178 / VINCE из CMV-резуса (RhCMV); U21 из вируса герпеса человека-6 или HHV7; LANA1, ORF37 / SOX, kK3 / MIR1 и kK5 / MIR2 из вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши (KSHV); mK3 из вируса гепатита мышей-68 (MHV-68); UL41 / vhs из альфа-вируса герпеса, вируса простого герпеса (HSV), вируса герпеса крупного рогатого скота-2 (BHV-1) и вируса псевдобешенства (PRV); UL49.5 из вируса ветряной оспы, BHV-1, вируса герпеса лошадей 1 и 4 (EHV-1/4) и PRV; и m4 / gp34, m6 / gp48, m27 и m152 / gp40 из мышинового CMV (mCMV).

75. Клетка по любому из пп. 64-74, которая в) сконструирована для уклонения от аллогенного распознавания НК-клетками и/или от одного или нескольких врожденных иммунных ответов $\gamma\delta$ Т-клеток, или и то и другое:

(i) временное или постоянное подавление: мембраносвязанного MICA/B или мембраносвязанного PVR или мембраносвязанного нектина-2, при этом постоянное подавление может быть достигнуто путем делеции локуса; а также

(ii) временная или постоянная экспрессия: антагонистов MICA и MICB, антагонистов рецептора NKG2D, антагонистов NCR, лигандов рецепторов, ингибирующих NK (KIR), или лигандов рецепторов, ингибирующих NK, NKG2a/CD94.

76. Клетка по любому из пп. 64-75, которая в) сконструирована так, чтобы уклоняться от аллогенного распознавания NK-клетками, одним или обоими из:

(i) временное или постоянное подавление лигандов NKG2D и/или лигандов DNAM-1; а также

(ii) временное или постоянное проявление:

антагонист MICA и MICB kK5 (из вируса саркомы Капоши (KHSV));

антагонист рецептора NKG2D коровьей оспы OMCP;

антагонист NCR, нацеленный на рецепторы NKp30, NKp44, NKp46, гемагглютинин (HA из вирусов осповакцины и других вирусов);

лиганды для рецепторов, ингибирующих NK (KIR), выбранные из HLA-Bw4 и HLA-C2; и/или

лиганды для рецепторов, ингибирующих NK (NKG2a/CD94), выбранные из HLA-E и его производных по отдельности или в сочетании с 21M лигандами HLA-B для образования HLA-E-связывающих пептидов и стабилизации экспрессии HLA-E на поверхности.

77. Клетка по любому из пп. 64-76, которая г) сконструирована для экспрессии иммуносупрессивных факторов для предотвращения/ингибирования аллогенных анти-несущих клеток или противовирусных иммунных ответов.

78. Клетка по любому из пп. 64-77, которая г) сконструирована для экспрессии иммуносупрессивных факторов для предотвращения/ингибирования аллогенного антиклеточного носителя или противовирусных иммунных ответов, выбранных из факторов человеческого или вирусного происхождения.

79. Клетка по п. 78, где факторы человеческого происхождения выбраны из одного или нескольких из: IDO, аргиназы, TRAIL, iNOS, IL-10, TGFβ, VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, sMICA, sMICB, sHLA-G, HLA-E, PD-L1, FAS-L, B7-H4 и одноцепочечных антител (scFv), которые нацелены или истощают NK- и/или NKT-клетки, и/или γδ Т-клетки.

80. Клетка по п. 78, где факторы вирусного происхождения выбраны из одного или нескольких из: SPI-2/CrмА вируса экстремелии/осповакцины (ингибитор иммунного

апоптоза, индуцированного FAS/TNF/гранзимом В), вирус осповакцины, кодируемый N1 (антагонист IL-1/NFkB/IRF3), HA (антагонисты NCR, нацеленные на NKp30, NKp44, NKp46), связывающих белков IL-18, A40R, A46R, A52R, B15R/B16R, блокаторы TNF α , блокаторы IFN α/β , блокаторы IFN γ и других антагонистов IL-1/IL-1 β /NFkB/IRF3/NCR/MHCI/TLR/NKG2D.

81. Клетка по любому из пп. 64-80, которая д) сконструирована для экспрессии факторов, происходящих от рака или стволовых клеток, которые способствуют вирусному инфицированию в противном случае не допускают инфицирование клеток-носителей и/или опухолевых клеток.

82. Клетка по любому из пп. 64-81, которая д) сконструирована для экспрессии факторов, происходящих от рака или стволовых клеток, которые способствуют вирусной инфекции, в противном случае не допускают инфицирование клеточных носителей и/или опухолевых клеток, при этом факторы выбраны из одного или нескольких факторов роста и цитокинов, способствующих вирусной инфекции.

83. Клетка по любому из пп. 64-82, которая д) сконструирована для экспрессии факторов, происходящих от рака или стволовых клеток, которые способствуют вирусной инфекции клеток-носителей и/или опухолевых клеток, которые в противном случае не допускают инфицирование, при этом факторы выбраны из одного или нескольких ассоциированных с раком антигенов, онкофетальных антигенов, онкогенов/супрессоров опухолей, дифференцирующих антигенов, GM-CSF, IL-10, TGF β , VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, агонистов RTK/mTOR и лигандов белка Wnt.

84. Клетка по любому из пп. 64-83, которая е) сконструирована для экспрессии факторов, влияющих на функцию комплемента и/или нейтрализующих антител.

85. Клетка по любому из пп. 64-84, которая е) сконструирована для экспрессии факторов, влияющих на функцию комплемента, и/или нейтрализующих антител, выбранных из белковых антагонистов белка комплемента и/или антитела, которое ингибирует белок комплемента.

86. Клетка по любому из пп. 64-85, которая е) сконструирована для экспрессии факторов, влияющих на функцию комплемента и/или нейтрализующих антител, выбранных из: белковых антагонистов факторов комплемента (C1, C2, C3, C4, C5, MBL), белка контроля комплемента вируса осповакцины (VCP), ингибитора комплемента вируса осповакцины (B5R), scFv анти-CD1q/CD1r/CD1s, анти-C3-антитела, анти-C5-антитела, пептидных C3-ингибиторов семейства компстатина, белков растворимой мембраны человека (s/m), фактора Н человека и его производных, а также факторов и производных яда кобры с ингибирующей активностью комплемента.

87. Способ лечения рака, включающий введение клетки по любому из пп. 1-86 субъекту, у которого есть рак.

88. Применение клетки по любому из пп. 1-86 для лечения пациента, страдающего раком.

89. Способ по п. 87 или применение по п. 88, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

90. Способ или применение по любому из пп. 87-89, где клетка является аллогенной по отношению к субъекту.

91. Способ или применение по любому из пп. 87-89, в котором клетка является аутологичной по отношению к субъекту.

92. Способ или применение по любому из пп. 87-90, в котором клетка сопоставлена с субъектом.

93. Способ или применение по любому из пп. 87-90, включающее сопоставление клетки с субъектом, которому эта клетка будет введена, посредством анализа сопоставления.

94. Способ лечения рака, включающий введение субъекту клеток-носителей, содержащих онколитический вирус, при этом:

клетка-носитель соответствует или была сопоставлена с субъектом; а также клетка-носитель:

клетка, в которой вирус может реплицироваться; а также

клетка, которая была обработана и/или модифицирована для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки, и/или была обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке, посредством чего клетка преодолевает врожденные/приобретенные иммунные барьеры субъекта и доставляет вирус к опухоли.

95. Способ лечения рака, включающий введение субъекту клеток-носителей, содержащих онколитический вирус, при этом:

клетки-носители соответствуют или были сопоставлены с субъектом; а также

клетки-носители содержат клетку по любому из пп. 1-86.

96. Способ лечения рака, включающий введение субъекту клеток-носителей, содержащих онколитический вирус, при этом:

клетки-носители аллогены субъекту и совместимы с субъектом; а также

клетка-носитель:

клетка, в которой вирус может реплицироваться; а также

клетка, которая была обработана и/или модифицирована для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки, и/или была обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке, посредством чего клетка преодолевает врожденные/приобретенные иммунные барьеры субъекта и доставляет вирус к опухоли.

97. Способ лечения рака, включающий введение субъекту клеток-носителей, которые содержат онколитический вирус, при этом клетки-носители являются аллогенными для субъекта и сопоставлены с субъектом.

98. Клетка-носитель, содержащая онколитический вирус для использования для лечения рака, при этом клетка-носитель сопоставлена субъекту.

99. Использование клеточного носителя для лечения рака, при этом:

клеточный носитель включает онколитический вирус;

клеточный носитель соответствует или был сопоставлен с субъектом; а также

клеточный носитель:

клетка, в которой вирус может реплицироваться; а также

клетка, которая была обработана или модифицирована, или и то, и другое для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки, и/или была обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке, посредством чего клетка преодолевает врожденные/адаптивные иммунные барьеры субъекта доставляет вирус к опухоли.

100. Использование клеток-носителей для лечения рака, при этом:

клетки-носители содержат онколитический вирус;

клетки-носители соответствуют или были сопоставлены с субъектом; а также

клетки-носители содержат клетку по любому из пп. 1-86.

101. Использование клеток-носителей для лечения рака у субъекта, при этом:

клетки-носители аллогены субъекту;

клетки-носители содержат онколитический вирус; а также

клетки-носители сопоставлены субъекту.

102. Использование клеток-носителей для лечения рака у субъекта, при этом:

клетки-носители аллогены субъекту;

клетки-носители содержат онколитический вирус;

клетки-носители сопоставлены субъекту; а также

клетки-носители содержат клетку по любому из пп. 1-86.

103. Способ или применение по любому из пп. 94-102, где рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

104. Способ или применение по любому из пп. 94-103, где клетки обрабатывают или модифицируют, чтобы они имели улучшенные свойства вирусной амплификации и/или чтобы они имели улучшенные иммуносупрессивные или иммунные привилегированные свойства.

105. Способ или применение по любому из пп. 94-104, где клетки сенсibilизируют путем предварительной обработки факторами, которые способствуют амплификации вируса и/или усиливают иммуносупрессивные или иммунные привилегированные свойства клеток-носителей.

106. Способ или применение по п. 104 или 105, в котором клетки сконструированы так, чтобы улучшить их потенциал амплификации вируса.

107. Способ или применение по любому из пп. 87-106, где рак включает солидную опухоль.

108. Способ или применение по любому из пп. 87-107, в котором субъектом является человек.

109. Способ или применение по любому из пп. 87-107, где субъектом является животным, не являющимся человеком.

110. Способ или применение по любому из пп. 87-107, где субъектом является собака, кошка, лошадь, свинья, корова или нечеловеческий примат.

111. Способ или применение по любому из пп. 87-110, где рак выбран из лейкозов, лимфом, меланом, карцином, сарком, миелом и нейробластом.

112. Способ или применение по любому из пп. 87-110, где рак выбран из рака поджелудочной железы, рака легких, рака яичников, рака груди, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, рака простаты, рака мозга, рака центральной нервной системы, аденокарциномы, рак печени, рак кожи, гематологические раковые заболевания, рак желчных путей, рак костей, хориокарцинома, рак толстой и прямой кишки, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаз, рак головы и шеи, рак желудка, внутриэпителиальное новообразование, рак почек, рак гортани, рак полости рта, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак дыхательной системы, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы.

113. Способ или применение по любому из пп. 87-112, где рак выбран из лимфомы Ходжкина, неходжкинских лимфом, рака толстой кишки, базальноклеточного рака, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака губы, рак языка, рак рта, глиомы и рак глотки.

114. Способ или применение по любому из пп. 87-113, где клетку-носитель без вируса предварительно обрабатывают IFN-гамма и вводят или используют перед введением клетки-носителя, содержащей вирус, или одновременно с клеткой-носителем, содержащей вирус.

115. Способ или применение по любому из пп. 87-114, где лечение дополнительно включает введение другого противоракового агента или лечение другой противораковой терапией.

116. Способ или применение по п. 115, где дополнительное противораковое средство или лечение включает иммунотерапию.

117. Способ или применение по п. 115, отличающееся тем, что дополнительный противораковый агент или лечение выбирают из одного или нескольких из следующих: хирургическое вмешательство, агонисты иммуностимуляции, BiTE, CAR-T-клетки и трансгенные Т-клетки TCR, нацеленные на опухолеспецифические антигены, контрольная точка ингибиторы, химиотерапевтические соединения/антитела и иммуносупрессанты.

118. Способ или применение по п. 117, где дополнительное противораковое средство или лечение представляет собой иммуносупрессивное лекарство.

119. Способ или применение по п. 117, отличающееся тем, что дополнительный противораковый агент или лечение выбирают из одного или более из семейства B7, выбранных из CD28 и ICOS; семейство TNFR, выбранное из 4-1BB, OX40, GITR, CD40, CD30 и CD27; CBET; LT-альфа; ингибиторы контрольных точек, которые нацелены на один или несколько из PD-1, PD-2, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, IDO 1 and 2, CTNNB1 (β -catenin), SIRP α , VISTA, LIGHT, HVEM, LAG3, TIM3, TIGIT, Galectin-9, KIR, GITR, TIM1, TIM4, CEACAM1, CD27, CD40/CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD112, CD137 (4-1BB), CD155, CD160, CD200, CD226, CD244 (2B4), CD272 (BTLA), B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, ICOS, A2aR, A2bR, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B, HLA-G, ILT-2/4 и OX40/OX-40L, MDR1, Arginase1, iNOs, IL-10, TGF- β , pGE2, STAT3, VEGF, KSP, HER2, Ras, EZH2, NIPP1, PP1, TAK1 and PLK1a; химиотерапевтические соединения и антитела, выбранные из цитокинов, хемокинов, факторов роста, фотосенсибилизирующих агентов, токсинов, противораковых антибиотиков, химиотерапевтических соединений, радионуклидов, ингибиторов ангиогенеза, сигнальных модуляторов, антиметаболитов, противораковых вакцин, противораковых олигопептидов, белков-ингибиторов митоза, антимитотических олигопептидов, противораковых антител, иммунотерапевтических агентов; и иммуносупрессантов, выбранных из глюкокортикоидов, ингибиторов кальциневрина, ингибиторов mTOR,

метотрексата, леналидомида, азатиоприна, меркаптопурина, фторурацила и циклофосфамида, антител, блокирующих TNF α , и флударабина.

120. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-119, в котором клетка-носитель соответствует субъекту, которому ее следует вводить или которому она вводится.

121. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-120, в котором клетка-носитель сопоставлена с иммунными клетками от субъекта, которому вводится клетка, для идентификации клетки-носителя, которая является достаточно иммунологически совместимой с иммунными клетками от субъекта при условии доставки вируса субъекту.

122. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-121, где клетка сопоставлена с вирусом, при этом измеряется способность клетки амплифицировать вирус.

123. Клетка, способ или применение по любому из пп. 120-122, в котором комбинация клетка / вирус соответствует субъекту.

124. Клетка, способ или применение по любому из пп. 121-123, где иммунные клетки от субъекта включают моноклеарные клетки периферической крови (РВМС).

125. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-124, где носитель тестируется для проверки способности вируса реплицироваться в клетке и/или способности клетки способствовать амплификации вируса.

126. Клетка, способ или применение по п. 125, отличающееся тем, что способность вируса к репликации в клетке и/или способность клетки стимулировать вирусную амплификацию тестируют путем совместного культивирования клетки и вируса и измерения скорости вирусной амплификации.

127. Клетка, способ или применение по п. 126, отличающееся тем, что способность вируса к репликации в клетке и/или способность клетки стимулировать вирусную амплификацию измеряют с помощью:

а) измерение скоростей амплификации вируса с использованием множественности инфекции (MOI) от 0,01 до 10 или приблизительно, и совместного культивирования в течение периодов от 1 дня до приблизительно или через 1 неделю (24 часа-1 неделя) в эквивалентных условиях анализа; а также

б) нормализация относительно количества инфицированных носителей клеток, при этом:

нормализованные бляшкообразующие единицы (БОЕ) на клетку значения, измеренные в эквивалентных условиях анализа, можно использовать для вычисления

показателя амплификации вируса (VAS), который предназначен для ранжирования комбинации клетка-носитель + вирус как подходящей (или не подходящей) для терапии;

количество бляшкообразующих единиц на клетку-носитель 1-10 считается ограниченной эффективностью (в качестве клеточного носителя для конкретного вируса);

10–100 БОЕ на клетку - хорошая эффективность;

100-1000 БОЕ на клетку - очень хорошая эффективность;

БОЕ на клетку более 1000 - чрезвычайно высокая эффективность; а также

комбинации клеток-носителей и вирусов, демонстрирующие не менее 10 БОЕ/клетку, рассматриваются для тестирования в скринингах совместимости клеток с субъектом.

128. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-127, в котором комбинация клетка-носитель/вирус соответствует субъекту, подлежащему лечению, посредством:

а) оценки специфического для пациента генетического полиморфизма для идентификации гаплотипа МНС I/II, гаплотипа KIR и лигандов, а также неклассического гаплотипа МНС, включая один или несколько из HLA-E, CD1a, b, c, d, MICA/B;

б) сравнение профиля генетического полиморфизма субъекта с профилем доступных клеток-носителей для идентификации среди клеток-носителей клеток, наиболее совместимых с субъектом;

в) оценки совместимости клеток-носителей и иммунных клеток-субъектов путем совместного культивирования клеток-носителей, вирусов и иммунных клеток;

г) оценка уровня вирусной амплификации.

129. Клетка, способ или применение по п. 128, дополнительно включающее:

д) измерение клетки-носителя + биопсию живой опухоли +/- вирус от обнаружения направленной переносчиком миграцией опухолевых клеток и амплификации вируса для идентификации клеток-носителей/вируса для введения, где:

вирусная амплификация в исследуемой биопсии опухоли + клеточные носители:

На 5% или более больше, чем сумма вирусной амплификации в одной биопсии опухоли в эквивалентных условиях + вирусная амплификация только в клеточных носителях в эквивалентных условиях; или же

по крайней мере на 5% или более больше, чем вирусная амплификация в одной биопсии опухоли в эквивалентных условиях.

130. Клетка, способ или применение по п. 128 или п. 129, дополнительно включающие анализ совместных культур для оценки восприимчивости субъекта к

опосредованной клеткой-носителем виротерапии путем культивирования полученных от субъекта РВМС + клетки-носителя + вирус.

131. Клетка, способ или применение по любому из пп. 128-130, включающее:

измерение амплификации вируса в совместных культурах РМВС, полученных от субъекта, + клетка-носитель + вирус, при этом соответствие:

совместимы, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента превышает 80% амплификации вируса, когда одна и та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС;

умеренно совместимы, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента находится в диапазоне 30-80% амплификации вируса, когда одна и та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС;

минимально совместимы, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента находится в диапазоне 10-30% амплификации вируса, когда одна и та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС;

несовместимо, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента составляет менее 10% от амплификации вируса, когда одна и та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС; а также

% совместимости можно использовать для ранжирования клеток-носителей от наименее до наиболее совместимых клеток-носителей для каждого отдельного пациента и для каждого конкретного вируса.

132. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-131, в котором соответствие между клеткой-носителем и субъектом путем выбора клеточного носителя (клетки-носителя), подходящего для доставки онколитического вируса субъекту, страдающему раком, осуществляется посредством способ, включающий идентификацию одного или нескольких из следующих детерминант (а) - (е) как показывающих совпадение между клеткой-носителем (клеткой-носителем) и субъектом:

а) клеточный носитель и субъект имеют идентичные аллели в 50% или более из следующих генетических локусов в сочетании:

(i) гаплотипы МНС I и/или МНС II;

(ii) гаплотип KIR и/или гаплотип лиганда KIR; а также

(iii) гаплотипы HLA-E, CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d;

б) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции клетки в опухоль (CTMS), составляющий 20% или более клеток-носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(ii) показатель миграции от опухоли к клеткам (TCMS), составляющий 20% или более раковых клеток, мигрирующих к клеткам-носителям, и/или

(iii) совокупный балл миграции (MRS) $[(i) + (ii)] / 2$ по меньшей мере, на 20%;;

в) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с онколитическим вирусом и раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции нагруженных вирусом клеток к опухоли (V-CTMS), составляющий 20% или более клеток-носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(ii) показатель миграции нагруженных вирусом клеток от опухоли (V-TCMS) 20% или более раковых клеток, мигрирующих в сторону клеток-носителей; и/или

(iii) совокупный показатель миграции нагруженного вирусом (V-MRS) $[(i) + (ii)] / 2$ не менее 20%;

г) когда клеточный носитель инкубируется в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, показатель иммунологической вирусной амплификации (IVAS), представляющий количество вирусной амплификации в присутствии иммунных клеток, полученных от субъекта, родственника к количеству вирусной амплификации, полученной в эквивалентных условиях, за исключением отсутствия иммунных клеток, полученных от субъекта, составляет не менее 20%;

д) когда клеточный носитель инкубируют в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, показатель иммунологической совместимости (ICS), представляющий иммунный ответ в присутствии клеточного носителя относительно иммунного ответа при эквивалентных в условиях, за исключением отсутствия клеточного носителя, составляет $\leq 200\%$, при этом иммунный ответ определяется степенью экспрессии одного или нескольких из следующего:

(i) IFN γ ;

(ii) один или несколько маркеров, связанных с цитотоксичностью, опосредованной Т-клетками, NK-клетками и/или NKT-клетками; и/или

(iii) один или несколько маркеров, связанных с Т-клеткой, $\gamma\delta$ Т-клеткой, NK-клеткой и/или активаторной / эффекторной функцией (ами) NKT-клеток;

е) когда клеточный носитель инкубируется в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, клеточный носитель не усиливает противовирусный иммунный ответ и/или подавляет противовирусный иммунный ответ по сравнению с идентичным условием, за

исключением отсутствия клеточного носителя, что определяется по шкале иммунологического подавления (ISS) $\geq 0\%$ в соответствии с уравнением:

$$\text{ISS}\% = [(\text{IV} + \text{IC}) - \text{ICV}] / (\text{IV} + \text{IC}) \times 100, \text{ где:}$$

IV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре вируса + иммунных клеток, полученных от субъекта;

IC = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта + клеточный носитель;

ICV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта + клеточный носитель + вирус; а также

уровень экспрессии маркера представляет собой уровень экспрессии одного или нескольких маркеров, указанных в (i), (ii) и (iii) из е); а также

если удовлетворяется одно или несколько из а) - е), определение соответствия между клеточным носителем и субъектом и выбор клеточного носителя как подходящего для доставки онколитического вируса субъекту, страдающему раком.

133. Клетка, способ или применение по п. 132, дополнительно включающее перед одним или несколькими из а) - е):

определение показателя вирусной амплификации (VAS) как БОЕ/клетка, когда клеточный носитель инкубируют с вирусом; а также

если оценка по VAS составляет не менее 10, выбор клеточного носителя для скрининга с использованием одного или нескольких детерминант (а) - (е) и определение наличия совпадения между клеточным носителем и субъектом.

134. Клетка, способ или применение по п. 132 или п. 133, в котором способ мультиплексирован на панели из нескольких вариаций возможных клеток-носителей для их ранжирования на основе эффективности или доставки онколитического вируса субъекту, при этом ранг из 1 является наиболее желательным, наивысший ранг и большие числа представляют менее желательные ранги, с помощью мультиплексированного метода, включающего:

(i) измерение значения (значений) одного или нескольких из а) - е) для клеточного носителя в панели и ранжирование каждого клеточного носителя в соответствии с измеренным значением (ями), при этом:

для а) чем выше идентичность аллелей между клеточным носителем и субъектом, тем выше ранг клеточного носителя;

для б) чем выше баллы CTMS, TCMS и/или MRS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для в) чем выше баллы V-CTMS, V-TCMS и/или V-MRS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для г) чем выше оценка IVAS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для д) чем ниже балл ICS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя; а также

для е) чем выше оценка ISS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя; и/или

(ii) для каждого клеточного носителя в панели, получение совокупного ранга, который представляет собой среднее значение двух или более рангов на основе измерения значения (значений) двух или более из а) - е), и ранжирование клеточного носителя в панель в соответствии с их совокупным рангом.

135. Клетка, способ или применение по п. 134, дополнительно включающее:

(i) для каждого клеточного носителя в панели получение показателя вирусной амплификации (VAS) как БОЕ/клетка, когда клеточный носитель инкубируют с вирусом;

(ii) для каждого клеточного носителя в панели получение совокупного ранга, который представляет собой среднее значение двух или более рангов на основе измерения оценки VAS и значения одного или более из а) - е); и

(iii) ранжирование группы клеточных носителей в соответствии с их совокупным рангом.

136. Способ по любому из пп. 132-135, в котором показатель ICS и/или показатель ISS получают на основании измерения экспрессии маркера в совместной культуре клеток.

137. Способ по любому из пп. 132-135, в котором показатель ICS и/или показатель ISS получают на основании измерения экспрессии маркера в супернатантах совместной культуры (культур).

138. Способ по любому из пп. 132-137, в котором показатель IVAS корректируется с учетом влияния сыворотки субъекта на вирусную амплификацию способом, включающим:

(i) совместное культивирование г), добавление сыворотки от субъекта в количестве от 10 до 50% по весу. (или об./об.) объема совместного культивирования;

(ii) вычисление шкалы устойчивости испытуемых к сыворотке (SSRS) по формуле:

$$SSRS = \text{БОЕ/клетка без сыворотки} - \text{БОЕ/клетка с сывороткой}$$

БОЕ/клетка без сыворотки; и

(iii) вычисление процентной оценки IVAS, скорректированной по SSRS, по формуле:

$$\text{IVAS (исправлено SSRS)} = \text{IVAS} \times (1 - \text{SSRS}) \times 100.$$

139. Модифицированная клетка-носитель или клетка-носитель, содержащая одну или несколько модификаций, выбранных из:

- а) сенсibilизация клеточного носителя для усиления способности вируса к амплификации;
- б) сенсibilизация клеточного носителя для блокирования индукции противовирусных ответов;
- с) защита клеточного носителя от аллогенной инактивации и/или отторжения субъектом;
- г) защита клеточного носителя от комплемента; и/или
- д) придание клеточному носителю устойчивости к уничтожению, опосредованному вирусом.

140. Модифицированный клеточный носитель (клетка-носитель), спроектированный для:

- а) временной или постоянной экспрессии или подавление гена, который делает клеточный носитель невосприимчивым к индуцированному интерфероном антивирусному ответу;
- б) временной или постоянной экспрессии или подавление гена для облегчения уклонения от аллогенного распознавания одним или несколькими Т- и НКТ-клетками и/или одним или несколькими приобретенными иммунными ответами $\gamma\delta$ Т-клеток;
- в) временной или постоянной экспрессии или подавление гена для облегчения уклонения от аллогенного распознавания НК-клетками и/или одного или нескольких врожденных иммунных ответов $\gamma\delta$ Т-клеток;
- г) временной или постоянной экспрессии иммуносупрессивных факторов;
- д) временной или постоянной экспрессии факторов, которые способствуют ассоциации вируса с клеточным носителем; а также
- е) временной или постоянной экспрессии факторов, влияющих на функцию комплемента и/или нейтрализующих антител.

141. Модифицированный клеточный носитель (клетка-носитель) по п. 140, в котором модификации дополнительно выбраны из:

- а) сенсibilизация клеточного носителя для усиления способности вируса к амплификации;

б) сенсibilизация клеточного носителя для блокирования индукции противовирусных ответов;

в) защита клеточного носителя от аллогенной инактивации и/или отторжения субъектом;

г) защита клеточного носителя от комплемента; и/или

д) придание клеточному носителю устойчивости к уничтожению, опосредованному вирусом.

142. Способ выбора клеточного носителя, подходящего для доставки онколитического вируса субъекту, страдающему раком, включающий идентификацию одной или нескольких из следующих детерминант (а) - (е), указывающих на соответствие между клеточным носителем и предмет:

а) клеточный носитель и субъект имеют идентичные аллели в 50% или более из следующих совокупных генетических локусов:

(i) гаплотипы MHC I и/или MHC II;

(ii) гаплотип KIR и/или гаплотип лиганда KIR; а также

(iii) гаплотипы HLA-E, CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d;

б) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции клетки в опухоль (CTMS), составляющий 20% или более клеток носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(ii) показатель миграции от опухоли к клеткам (TCMS), составляющий 20% или более раковых клеток, мигрирующих к клеткам-носителям; и/или

(III) совокупная оценка миграции (MPC) из $[(I) + (II)] / 2$, по меньшей мере, на 20%;

в) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с онколитическим вирусом и раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции нагруженных вирусом клеток к опухоли (V-CTMS), составляющий 20% или более клеток-носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(II) показатель миграции нагруженных вирусом клеток от опухоли (V-TCMS) 20% или более раковых клеток, мигрирующих в сторону клеток-носителей; и/или

(III) совокупный показатель миграции (V-MRS) из $[(I) + (II)] / 2$, по меньшей мере на 20%;

г) когда клеточный носитель инкубируется в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, показатель

иммунологической вирусной амплификации (IVAS), представляющий количество вирусной амплификации в присутствии иммунных клеток, полученных от субъекта, родственника к количеству вирусной амплификации, полученной в эквивалентных условиях, за исключением отсутствия иммунных клеток, полученных от субъекта, составляет не менее 20%;

д) когда клеточный носитель инкубируется в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, оценка иммунологической совместимости (ICS), представляющая иммунный ответ в присутствии клеточного носителя относительно иммунного ответа при эквивалентных условиях, за исключением отсутствия клеточного носителя, составляет $\leq 200\%$, при этом иммунный ответ определяется степенью экспрессии одного или нескольких из следующего:

(i) $IFN\gamma$;

(ii) один или несколько маркеров, связанных с цитотоксичностью, опосредованной Т-клетками, НК-клетками и/или NKT-клетками; и/или

(iii) один или несколько маркеров, связанных с Т-клеткой, $\gamma\delta$ Т-клеткой, НК-клеткой и/или активаторной / эффекторной функцией (ами) NKT-клеток

е) когда клеточный носитель инкубируется в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, клеточный носитель не усиливает противовирусный иммунный ответ и/или подавляет противовирусный иммунный ответ по сравнению с идентичным условием, за исключением отсутствия клеточного носителя, что определяется по шкале иммунологического подавления (ISS) $\geq 0\%$ в соответствии с уравнением:

$$ISS\% = [(IV + IC) - ICV] / (IV + IC) \times 100, \text{ где:}$$

IV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре вируса + иммунных клеток, полученной от субъекта;

IC = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта + клеточный носитель;

ICV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта + клеточный носитель + вирус; а также

уровень экспрессии маркера представляет собой уровень экспрессии одного или нескольких маркеров, указанных в (i), (ii) и (iii) из е); а также

если удовлетворяется одно или несколько из а) - е), определение соответствия между клеточным носителем и субъектом и выбор клеточного носителя как подходящего для доставки онколитического вируса субъекту, страдающему раком.

143. Способ по п. 142, дополнительно включающий перед одним или несколькими из а) - е):

определение показателя вирусной амплификации (VAS) как БОЕ/клетка, когда клеточный носитель инкубируют с вирусом; а также

если оценка по VAS составляет не менее 10, выбор клеточного носителя для скрининга с использованием одного или нескольких детерминант (а) - (е) и определение наличия совпадения между клеточным носителем и субъектом.

144. Мультиплексный способ, включающий способ по п. 142 или 143, применяемый к панели из нескольких вариаций возможных клеток-носителей и ранжирование их в соответствии с их желательностью для доставки онколитического вируса субъекту, где ранг 1 является наиболее желательным, самым высоким рангом и большие числа представляют менее желательные ранги, метод включает:

(i) измерение значения (значений) одного или нескольких из а) - е) для каждого клеточного носителя на панели и ранжирование клеточного носителя в соответствии с измеренным значением(-ями), при этом:

для а), чем выше идентичность аллелей между клеточным носителем и субъектом, тем выше ранг клеточного носителя;

для б) чем выше баллы CTMS, TCMS и/или MRS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для в), чем выше баллы V-CTMS, V-TCMS и/или V-MRS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для г), чем выше оценка IVAS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для д) чем ниже балл ICS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя; и

для е), чем выше оценка ISS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя; и/или

(ii) для каждого клеточного носителя в панели, получение совокупного ранга, который представляет собой среднее значение двух или более рангов на основе измерения значения (значений) двух или более из а) - е), и ранжирование клеточного носителя в панель в соответствии с их совокупным рангом.

145. Способ по п.144, дополнительно включающий:

(i) для каждого клеточного носителя в панели получение показателя вирусной амплификации (VAS) как БОЕ/клетка, когда клеточный носитель инкубируют с вирусом;

(ii) для каждого клеточного носителя в панели получение сувокупного ранга, который представляет собой среднее значение двух или более рангов на основе измерения оценки VAS и значения одного или более из а) - е); и

(iii) ранжирование группы клеточных носителей в соответствии с их совокупным рангом.

146. Способ по любому из пп. 142-145, в котором показатель ICS и/или показатель ISS получают на основании измерения экспрессии маркера в совместной культуре клеток.

147. Способ по любому из пп. 142-145, в котором показатель ICS и/или показатель ISS получают на основании измерения экспрессии маркера в супернатантах совместной (ых) культуры (ов).

148. Способ по любому из пп. 142-147, в котором показатель IVAS корректируется с учетом влияния сыворотки субъекта на вирусную амплификацию способом, включающим:

(i) совместное культивирование г), добавление сыворотки от субъекта в количестве от 10 до 50% по весу. (или об./об.) объема совместного культивирования;

(ii) вычисление шкалы устойчивости испытуемых к сыворотке (SSRS) по формуле:

$$SSRS = \frac{\text{БОЕ/клетка без сыворотки} - \text{БОЕ/клетка с сывороткой}}{\text{БОЕ/клетка без сыворотки}}; \text{ и}$$

(iii) вычисление процентной оценки IVAS, скорректированной по SSRS, по формуле: $IVAS \text{ (с поправкой на SSRS)} = IVAS \times (1 - SSRS) \times 100$.

149. Способ лечения онколитического вируса субъекта, страдающего раком, включающий:

а) выбор клетки-носителя для доставки онколитического вируса в соответствии со способом по любому из пп. 142-148; а также

б) введение субъекту клеточного носителя и онколитического вируса.

150. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по любому из пп. 1-86 в фармацевтически приемлемом носителе.

151. Фармацевтическая композиция по п.150 для лечения рака.

152. Фармацевтическая композиция по п. 151, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

153. Клетка, способ, применение или фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-152, где клетка вводится системно, локально, внутриопухолево, внутривенно, ректально или подкожно.

154. Способ по п. 97, в котором клетки-носители подбирают субъекту способом по любому из пп. 142-148.

155. Способ или применение по любому из пп. 87-92, включающий сопоставление клетки с субъектом, которому эта клетка будет введена, посредством анализа сопоставления по любому из пп. 142-148.

156. Клетки-носители по п. 98, в которых ячейки-носители подбирают субъекту способом по любому из пп. 142-148.

157. Способ сопоставления субъекта, страдающего раком, с клеточным носителем для доставки онколитического вируса субъекту, включающий:

определение того, преодолевает ли клеточный переносчик иммунные барьеры у субъекта, путем обнаружения в совместной культуре, содержащей клеточный носитель, онколитического вируса и клеток субъекта, одного или нескольких из:

(а) пониженный уровень одного или нескольких маркеров активации Т-клеток по сравнению с другими эквивалентными условиями, за исключением отсутствия клеточного носителя;

(б) пониженный уровень одного или нескольких маркеров активации НК-клеток по сравнению с другими эквивалентными условиями, за исключением отсутствия клеточного носителя; а также

(в) пониженный уровень одного или нескольких маркеров активации НКТ-клеток по сравнению с другими эквивалентными условиями, за исключением отсутствия клеточного носителя;

при этом, если один или несколько из (а), (б) и (в) удовлетворяется/удовлетворяются, то клетка-носитель является подходящей для субъекта.

158. Способ сопоставления субъекта, страдающего раком, с клеточным носителем для доставки онколитического вируса субъекту, включающий:

(а) измерение количества вирусной амплификации, полученной при инкубации вируса и клеточного носителя вместе с клетками от субъекта;

(б) измерение количества вирусной амплификации, полученной при инкубации вируса и клеточного носителя в эквивалентных условиях, за исключением отсутствия клеток у субъекта; а также

(в) сравнение количеств, измеренных в (а) и (б), при этом, если количество амплификации, измеренное в (а), составляет не менее 20% от количества амплификации, измеренного в (б), клеточный носитель подходит для субъекта.

159. Способ по п. 157 или п. 158, дополнительно включающий идентификацию, по меньшей мере, 10% аллелей в клеточном носителе и субъекте как идентичных, причем аллели принадлежат одному или нескольким генетическим локусам главного комплекса гистосовместимости (МНС) и/или рецептора ингибитора клеток-киллеров (KIR).

160. Способ по п. 159, в котором идентификацию идентичных аллелей проводят до измерения уровня маркеров или величины амплификации вируса.

161. Способ сопоставления субъекта, страдающего раком, с клеточным носителем для доставки онколитического вируса субъекту, включающий:

идентификацию идентичных аллелей в генетических локусах главного комплекса гистосовместимости (МНС) и/или рецептора ингибитора клеток-киллеров (KIR) в клеточном носителе и субъекте; а также

если по крайней мере 50% аллелей идентичны, выбор клеточного носителя в качестве подходящего для субъекта.

162. Способ сопоставления субъекта, страдающего раком, с клеточным носителем для доставки онколитического вируса субъекту, включающий:

определение того, преодолевает ли клеточный носитель иммунные барьеры у субъекта, путем обнаружения в совместной культуре, содержащей клеточный носитель, онколитического вируса и клеток субъекта, уровня экспрессии одного или нескольких иммунологических маркеров, который составляет $\leq 200\%$ от уровня экспрессии, обнаруженной в эквивалентных условиях, за исключением отсутствия клеточного носителя, где маркеры выбраны из одного или нескольких из:

- (1) маркеры активации Т-клеток;
- (2) маркеры активации NK-клеток; а также
- (3) маркеры активации NKT-клеток;

где, если уровень экспрессии по меньшей мере одного маркера, выбранного из (1), (2) и (3) в совместной культуре, составляет $\leq 200\%$, уровень экспрессии, обнаруженный в эквивалентных условиях, за исключением отсутствия клеточного носителя, клетка-носитель подходит под псубъект.

163. Способ по п. 162, дополнительно включающий идентификацию по меньшей мере одного из аллелей в генетических локусах главного комплекса гистосовместимости (МНС) и/или рецептора ингибитора клеток-киллеров (KIR) как идентичных в клеточном носителе и субъекте, причем если по крайней мере один из локусов идентичен, и уровень экспрессии одного или нескольких иммунологических маркеров в совместной культуре составляет $\leq 200\%$ от уровня экспрессии, обнаруженного в эквивалентных условиях, за

исключением отсутствия клеточного носителя, клеточный носитель является подходящим субъекту.

164. Способ по п. 163, в котором идентификацию идентичного аллеля(ей) выполняют до обнаружения уровня экспрессии одного или нескольких иммунологических маркеров.

165. Способ по любому из пп. 157-164, в котором клеточный носитель выбирают из клетки, упомянутой в любом из пп. 1-86, 120-135 и 139-141.

Формула изобретения, откорректированная в соответствии со ст. 34(2)(b) РСТ

1. Клетка-носитель, содержащая онколитический вирус, где:

вирус может размножаться в клетке;

клетку можно вводить субъекту, являющемуся человеком;

клетка была обработана и/или модифицирована для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки для введения человеку, при этом обработанная или модифицированная клетка является:

сконструированной клеткой, которая экспрессирует одноцепочечные антитела, которые нацелены или истощают NK- и/или NKT-клетки, и/или $\gamma\delta$ T-клетки, и/или

сконструированной клеткой, которая экспрессирует белковые антагонисты белков комплемента и/или белковые антагонисты нейтрализующих антител; а также

клетка могла быть обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке, причем обработка или модификация включает загрузку клетки фактором роста или цитокином.

2. Клетка по п. 1, где:

клетка была обработана и/или модифицирована для усиления иммуносупрессивных свойств или иммунопривилегированных свойств клетки для введения субъекту, являющемуся человеком; и

клетка была обработана или модифицирована для усиления амплификации вируса в клетке.

3. Клетка по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что клетка является перmissive для амплификации онколитического вируса и накапливается в опухолях и/или не распознается иммунной системой субъекта в течение времени, достаточном для доставки вируса в опухоль у субъекта.

4. Клетка по любому из пп. 1-3, выбранная из обработанной или модифицированной стволовой клетки, иммунной клетки и опухолевой клетки.

5. Клетка по любому из пп. 1-4, полученная способом, включающим:

выделение или взятие клетки у субъекта; и

инфицирование клетки онколитическим вирусом для получения в результате клетки-носителя.

6. Клетка по любому из пп. 1-5, которая представляет собой стволовую клетку.

7. Клетка по п. 6, в которой стволовая клетка не является эмбриональной клеткой или фетальной клеткой или не происходит от линии эмбриональных клеток.

8. Клетка по п. 6, выбранная из зрелой, эмбриональной и фетальной стволовых клеток.

9. Клетка по п. 6, выбранная из мезенхимальных, нервных, тотипотентных, плюрипотентных, индуцированных плюрипотентных, мультипотентных, олигопотентных, унипотентных, стромальных жировых, эндотелиальных клеток, клеток костного мозга, пуповинной крови, периферической крови взрослых, фибробластов, миобластов, малых ювенильных клеток, эпителиальных и эмбриональных эпителиальных стволовых клеток.

10. Клетка по любому из пп. 6-9, которая представляет собой мезенхимальную стволовую клетку.

11. Клетка по п. 10, отличающаяся тем, что мезенхимальные стволовые клетки выбраны из мезенхимальных клеток взрослого костного мозга, жировой ткани, крови, пульпы зубов, неонатальной пуповины, пуповинной крови, плаценты, стромальных плацентарных адгезивных клеток, плацентарных децидуальных стромальных клеток, эндометриальных регенеративных клеток, плацентарных бипотентных эндотелиальных/мезенхимальных клеток-предшественников, мезенхимальных стволовых клеток из амниотической мембраны или жидкости, клеток-предшественников из амниотических жидкостей, мезенхимальных стволовых клеток желе Уортона, стволовых клеток тазового пояса, мезенхимальных стромальных клеток ворсинок хориона, мезенхимальных стволовых клеток подкожной жировой ткани, перицитов, адвентициальных ретикулярных стволовых клеток, стволовых клеток, полученных из волосяных фолликулов, гемопоэтических стволовых клеток, мезенхимальных стволовых клеток надкостницы, мезенхимальных стволовых клеток боковых пластин, стволовых клеток выпавших молочных зубов, стволовых клеток периодонтальной связки, клеток-предшественников зубных фолликулов, стволовых клеток из апикального сосочка или мышечных сателлитных клеток.

12. Клетка по любому из пп. 1-9, которая представляет собой жировую клетку.

13. Клетка по п. 12, которая представляет собой стромальную мезенхимальную клетку жировой ткани.

14. Клетка по любому из пп. 6-9, которая представляет собой эндотелиальную клетку, выбранную из эндотелиальных клеток-предшественников, эндотелиальных клеток-предшественников плаценты, ангиогенных эндотелиальных клеток и перицитов.

15. Клетка по любому из пп. 6-9, которая представляет собой эмбриональную эпителиальную клетку.

16. Клетка по любому из пп. 1-5, которая является иммунной клеткой.

17. Клетка по п. 16, где иммунная клетка выбрана из гранулоцитов, тучных клеток, моноцитов, дендритных клеток, натуральных киллеров, лимфоцитов, трансгенных клеток Т-клеточного рецептора (TCR), нацеленных на специфические антигены опухоли, и CAR-T-клеток, нацеленных на специфические антигены опухоли.

18. Клетка по любому из пп. 1-5, которая представляет собой модифицированную или обработанную клетку линии гематологических злокачественных клеток.

19. Клетка по п. 18, где линия клеток гематологических злокачественных новообразований выбрана из линий лейкозных клеток, клеточных линий Т-клеточного лейкоза, клеточных линий миеломоноцитарного лейкоза, клеточных линий лимфомы, клеточных линий неходжкинской лимфомы, клеточных линий лимфомы Беркитта, линии клеток диффузных больших В-клеточных лимфом, линии клеток мантийной лимфомы, линии клеток AML, линии клеток CML, линии клеток ALL, линии клеток эритролейкемии, линии клеток миеломонобластной лейкемии, линии клеток злокачественной неходжкинской НК лимфомы, линии клеток миеломы/плазмоцитомы, линии клеток множественной миеломы и линии клеток макрофагов.

20. Клетка по любому из пп. 1-5, которая представляет собой стволовую клетку, полученную из жировой ткани.

21. Клетка по любому из пп. 1-5, которая представляет собой клетку из линии клеток, выбранной из клеточных линий лейкоза человека, Т-клеточного лейкоза, миеломоноцитарного лейкоза, лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза, хронического миелолейкоза, острого лимфобластного лейкоза, эритролейкемии, миеломонобластного лейкоза, злокачественной неходжкинской НК-лимфомы, миеломы/плазмацитомы, множественной миеломы и клеточной линии макрофагов.

22. Клетка по п. 21, где клеточная линия выбрана из:

линии клеток лейкоза, представляющей собой KASUMI-1, HL-60, THP-1, K-562, RS4;11, MOLT-4, CCRF-CEM, JVM-13, 31E9, ARH-77, MoB, JM1, NALM-1, или ProPak-X.36;

линии клеток Т-клеточного лейкоза, представляющей собой HM-2, CEM-CM3, Jurkat/Jurkat клон E6-1, J.CaM1.6, BCL2 Jurkat, BCL2 S87A Jurkat, BCL2 S70A Jurkat, Neo Jurkat, BCL2 AAA Jurkat, J.RT3-T3.5, J45.01, J.gamma1, J.gamma1.WT, JK28, P116, P116.cl39, A3, JX17, D1.1, I 9.2, или I 2.1;

линии клеток миеломоноцитарного лейкоза, представляющей собой MV-4-11;

линии клеток лимфомы, представляющей собой HT, BC-3, CA46, Raji, Daudi, GA-10-Clone-4, HH или H9;

линии клеток неходжкинской лимфомы, представляющей собой SU-DHL-1, SU-DHL-2, SU-DHL-4, SU-DHL-5, SU-DHL-6, SU-DHL-8, SU-DHL-10, SU-DHL-16, NU-DUL-1, NCEB-1, EJ-1, BCP-1, TUR или U-937;

линии клеток лимфомы Беркитта, представляющей собой Ramos/RA 1, Ramos.2G6.4C10, P3HR-1, Daudi, ST486, Raji, CA46, человеческий гамма-герпесвирус 4 / HHV-4 опухоли щеки от пациента с лимфомой Беркитта, DG-75, GA-10, NAMALWA, HS-Sultan, Jiyoye, NC-37, 20-B8, EB2, 1G2, EB1, EB3, 2B8, GA-10 клон 20, или НКВ-11 / Kidney-B cell Hybrid;

линии клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, представляющей собой Толедо или Пфайффера;

линии клеток лимфомы клеток мантии, представляющей собой JeKo-1, JMP-1, PF-1, JVM-2, REC-1, Z-138, Mino или MAVER-1;

линии клеток острого миелоидного лейкоза, представляющей собой AML-193, BDCM, KG-1, KG-1a, Kasumi-6 или HL-60/S4;

линии клеток хронического миелолейкоза, представляющей собой K562, K562-r, K562-s, LAMA84-r, LAMA84-s, AR230-r или AR230-s;

линии клеток острого лимфобластного лейкоза, представляющей собой N6/ADR, RS4;11, NALM6 клон G5, Loucy, SUP-B15 или CCRF-SB;

линии клеток эритролейкемии, представляющей собой IDH2-mutant-TF-1 Isogenic линия клеток;

линии клеток миеломонобластного лейкоза, представляющей собой GDM-1;

линии клеток злокачественной неходжкинской НК-лимфомы, представляющей собой NK-92 или NK-92MI;

линии клеток миеломы/плазмацитомы, представляющей собой U266B1/U266, HAA1, SA13, RPMI-8226, NCI-H929 или MC/CAR;

линии клеток множественной миеломы, представляющей собой MM. 1R, IM-9 или MM. 1S; и

линии клеток макрофагов, представляющей собой MD, SC или WBC264-9C.

23. Клетка по любому из пунктов 1-5, являющаяся модифицированной или обработанной клеткой, выбранной из:

мезенхимальной линия стволовых клеток, представляющей APCETH-201 (APCETH), APCETH-301 (APCETH), Cx601 (TIGENIX), TEMCELL, MSC-100-IV или Prochymal (MESOBLAST); или

индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), представляющих собой ToleraCyte;

клеточной линии фибробластов, представляющей собой CCD-16Lu или WI-38;

клеточной линии ассоциированных с опухолью фибробластов, представляющей собой Malme-3M, COLO 829, HT-144, Hs 895.T, hTERT или PF179T CAF;

линии эндотелиальных клеток, представляющей собой HUVEC, HUVEC/TERT 2 или TIME;

линии эмбриональных эпителиальных клеток, представляющей собой HEK-293, HEK-293 STF, 293T/17, 293T/17 SF или HEK-293.2 sus;

линии эмбриональных стволовых клеток, представляющей собой hESC BG01V; и

линии эпителиальных клеток, представляющей собой NuLi-1, ARPE-19, VK2/E6E7, Ect1/E6E7, RWPE-2, WPE-stem, End1/E6E7, WPMY-1, NL20, NL20-TA, WT 9-7, WPE1-NB26, WPE-int, RWPE2-W99 или BEAS-2B.

24. Клетка по любому из пп. 1-9, которая является модифицированной или обработанной клеткой из линии клеток гематологической злокачественной опухоли человека.

25. Клетка по любому из пп. 1-9, которая является модифицированной или обработанной клеткой из линии опухолевых клеток человека.

26. Клетка по п. 25, где линия клеток выбрана из панели NCI-60, клеточных линий фибросаркомы, гепатокарциномы, рака простаты, рака груди, рака головы и шеи, рака легких, рака поджелудочной железы, рак яичников, рака толстой кишки, рака желудка, гинекологического рака, саркомы, меланомы, плоскоклеточной карциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака мочевого пузыря, почечно-клеточной карциномы, эмбриональной карциномы, тератомы яичка, глиобластомы, астроцитомы, карциномы щитовидной железы или линии клеток мезотелиомы.

27. Клетка по любому из пп. 1-9, которая является модифицированной или обработанной клеткой вакцины из цельных опухолевых клеток GM-CSF (GVAX).

28. Клетка по п. 27, где GVAX представляет собой GVAX простаты; GVAX поджелудочной железы; GVAX легкого; или GVAX почечной клетки.

29. Клетка по любому из пп. 1-28, где онколитический вирус выбран из вируса болезни Ньюкастла, парвовируса, вируса кори, реовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV), аденовируса, полиовируса, вируса простого герпеса (HSV), поксвируса, вируса Коксаки (CXV) и вируса Сенека-Валли (SVV).

30. Клетка по любому из пп. 1-29, где онколитический вирус представляет собой вирус осповакцины.

31. Клетка по любому из пп. 1-29, где онколитический вирус является вирусом осповакцины, который представляет собой вакцину против оспы.

32. Клетка по п. 30 или п. 31, где вирус осповакцины выбран из штамма Lister, штамма Western Reserve (WR), штамма Copenhagen (Cop), штамма Bern, штамма Paris, штамма Tashkent, штамма Tian Tan, штамма Wyeth (DRYVAX), штамма IHD-J, штамма IHD-W, штамма Brighton, штамма Ankara, штамма CVA382, штамма Dairen I, штамма LC16m8, штамма LC16M0, штамма модифицированной осповакцины Ankara (MVA), штамма ACAM, штамма WR 65-16, штамма Connaught, штамма Совета здравоохранения Нью-Йорка (NYCBH), штамма EM-63, штамма NYVAC, штамма Lister LIVP, штамма JX-594, штамма GL-ONC1 и мутантного штамма vvDD ТК с делециями в VGF и ТК.

33. Клетка по п. 32, характеризующаяся тем, что вирус осповакцины представляет собой ACAM2000 или ACAM1000.

34. Клетка по любому из пп. 1-33, характеризующаяся тем, что вирус был модифицирован для экспрессии продукта гетерологичного гена и/или повышения онкогенности и/или понижения токсичности (повышения аттенуации).

35. Клетка по любому из пп. 1-34, характеризующаяся тем, что онколитический вирус кодирует детектируемый маркер.

36. Клетка по п. 35, характеризующаяся тем, что маркер представляет собой флуоресцентный белок.

37. Клетка по п. 29, характеризующаяся тем, что вирус является аденовирусом, представляющим собой ONYX-015, CG00070, Oncorin (H101), ColoAd1, ONCOS-102 или Delta24-RGD/DNX-2401.

38. Клетка по любому из пп. 1-29 и 34-36, характеризующаяся тем, что вирус представляет собой модифицированный вирус HSV-1.

39. Клетка по любому из пп. 1-38, которую модифицировали для экспрессии ингибитора интерферона- γ и/или интерферона- β .

40. Клетка по любому из пп. 1-39, которая была сенсibilизирована для усиления амплификации вируса путем предварительной обработки или загрузки упомянутой клетки одним или несколькими из: IL-10, TGF β , VEGF, FGF-2, PDGF, HGF, IL-6, GM-CSF, агонистом RTK/mTOR, белковым лигандом Wnt и ингибитором/антагонистом GSK3.

41. Клетка по любому из пп. 1-40, которая была сенсibilизирована для блокирования индукции противовирусного состояния путем предварительной обработки или загрузки упомянутой клетки одним или несколькими низкомолекулярными или белковыми ингибиторами, которые: препятствуют рецепторам IFN типа I / типа II, препятствуют нисходящей передаче сигналов, препятствуют передаче сигналов IFNAR1 / IFNAR2, препятствуют передаче сигналов IFNGR1 / IFNGR2, препятствуют передаче

сигналов STAT 1/2, препятствуют передаче сигналов Jak1, препятствуют передаче сигналов Jak2, препятствуют передаче сигналов IRF3, препятствуют передаче сигналов IRF7, препятствуют передаче сигналов IRF9, препятствуют передаче сигналов TYK2, препятствуют передаче сигналов TBK1 или препятствуют другим путям передачи сигналов, которые влияют на иммунный ответ против онколитического вируса в клетке или субъекте.

42. Клетка по любому из пп. 1-41, которая была сенсibilизирована для блокирования индукции противовирусного состояния путем предварительной обработки или загрузки клетки одним или несколькими ингибиторами HDAC для вмешательства/дерегулирования передачи сигналов IFN/ответной реакции.

43. Клетка по п. 42, характеризующаяся тем, что ингибитор HDAC выбран из вориностата, ромидепсина, хидамида, панобиностата, белиностата, вальпроевой кислоты, моцетиностата, абексиностата, энтиностата, SB939, резминостата, гивиностата, хизиностата, HBIvetrin-8000, Keys-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, ACY-1215, ME-344, сульфорафана и трихостатина.

44. Клетка по любому из пп. 1-43, которая была сенсibilизирована для блокирования индукции противовирусного состояния или усиления амплификации вируса путем предварительной обработки или загрузки клетки антагонистами чувствительности к вирусу и/или путей противовирусной защиты.

45. Клетка по п. 44, характеризующаяся тем, что пути противовирусной защиты и/или чувствительные к вирусу пути (путь) защиты опосредованы/обусловлены одним или несколькими из: STING, PKR, RIG-1, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3 и DAI (ZBP1).

46. Клетка по п. 45, характеризующаяся тем, что антагонисты выбраны из одного или нескольких из: белков осповакцины K1, E3L и K3L; белков гриппа NS1/NS2; гепатита С NS3-4A; белков аренавируса NP и Z; вируса Эбола VP35; HSV US11, ICP34.5 и ICP0; MCMV M45; и белка X вируса болезни Борна.

47. Клетка по любому из пп. 1-46, характеризующаяся тем, что клетка была сенсibilизирована для защиты от детерминант инактивации/отторжения путем предварительной обработки или загрузки клетки одним или несколькими антагонистами главного вирусного комплекса гистосовместимости (MHC).

48. Клетка по п. 47, характеризующаяся тем, что антагонист МНС выбран из одного или нескольких антагонистов: МНС1 А40R из осповакцины; Nef и TAT от ВИЧ; E3-19K из аденовируса; ICP47 от HSV 1 и HSV2; CPXV012 и CPXV203 от коровьей оспы; ORF66 вируса ветряной оспы (VZV); EBNA1, BNLF2a, BGLF5 и BILF1 из вируса Эпштейна-Барра (EBV); US2 / gp24, US3 / gp23, US6 / gp21, US10 и US11 / gp33 из цитомегаловируса человека (hCMV); Rh178 / VHCE из CMV-резуса (RhCMV); U21 из вируса герпеса человека-6 или HHV7; LANA1, ORF37 / SOX, kK3 / MIR1 и kK5 / MIR2 из вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши (KSHV); mK3 из вируса гепатита мышей-68 (MHV-68); UL41 / vhs из альфа-вируса герпеса, вируса простого герпеса (HSV), вируса герпеса крупного рогатого скота-2 (BHV-1) и вируса псевдобешенства (PRV); UL49.5 из вируса ветряной оспы, BHV-1, вируса герпеса лошадей 1 и 4 (EHV-1/4) и PRV; и m4 / gp34, m6 / gp48, m27 и m152 / gp40 из мышинного CMV (mCMV).

49. Клетка по любому из пп. 1-46, характеризующаяся тем, что клетка была сенсibilизирована для защиты от детерминант инактивации/отторжения путем предварительной обработки или загрузки клетки антагонистами генов MICA и MICB, связанных с цепью МНС класса I человека, или антагонистами бета-2 микроглобулинов (B2M) вирусного происхождения.

50. Клетка по любому из пп. 1-38, характеризующаяся тем, что клетка была сенсibilизирована для усиления подавления иммунитета/уклонения от иммунитета путем предварительной обработки или загрузки указанной клетки иммуносупрессорными факторами вирусного происхождения.

51. Клетка по п. 50, характеризующаяся тем, что иммуносупрессорный фактор выбран из одного или нескольких из: ингибитора иммунного апоптоза, индуцированного FAS/TNF/гранзимом В; антагониста IL-1/NFκB/IRF3; антагониста IL-1 и толл-подобного рецептора (TLR); антагониста IL-1β; блокатора TNFα; блокатора IFNα/β; и блокатора IFNγ.

52. Клетка по любому из пп. 1-38, характеризующаяся тем, что клетка была сенсibilизирована для усиления подавления иммунитета/уклонения от иммунитета путем предварительной обработки или загрузки клетки одним или несколькими низкомолекулярными ингибиторами одного или нескольких переносчиков антигенных пептидов - 1/2 (TAP-1 и TAP-2) и тапазина.

53. Клетка по любому из пп. 1-52, сенсibilизированная путем предварительной обработки или загрузки клетки антителом, низкомолекулярным соединением или другим ингибитором белка комплемента.

54. Клетка по п. 53, где белок комплемента представляет собой C3 или C5.

55. Клетка по любому из пп. 1-54, которая предварительно обработана одним или более агонистами из: STING, PKR, RIG-I, MDA-5, OAS-1/2/3, AIM2, MAVS, RIP-1/3, и DAI (ZBP1).

56. Клетка по любому из пп. 1-55, где клетка сконструирована для экспрессии одного или нескольких антагонистов белка, препятствующих функции комплемента, выбранных из антагонистов белков факторов комплемента (C1, C2, C3, C4, C5, и MBL), белка контроля комплемента вируса осповакцины (VCP), ингибитора комплемента вируса осповакцины (B5R), scFv анти-CD1q, scFv анти-CD1r, scFv анти-CD1s, анти-C3-антитела, анти-C5-антитела, пептидных C3-ингибиторов семейства компстатина, человеческих растворимых мембранных (s/m) белков, человеческого фактора H и его производных, а также факторов яда кобры и производных с ингибирующей активностью комплемента.

57. Клетка по любому из пп. 1-55, где клетка сконструирована для экспрессии одноцепочечных антител, которые нацелены или истощают NK- и/или NKT-клетки, и/или $\gamma\delta$ T-клетки.

58. Клетка по п. 57, где клетка сконструирована для экспрессии одного или нескольких антител, выбранных из анти-asialo GM1, анти-NK1.1, анти-CD11b, анти-CD16, DJ130c, 3G8, IMMU510, B1.1, анти-NKp30, анти-NKp44, анти-NKp46, анти-TCR $\gamma\delta$, анти-V δ 1 ТКС, антитела B1, GL3, UC7-13D5, анти-CD1d и NKTT120.

59. Способ лечения рака, включающий введение клетки по любому из пп. 1-58 субъекту, страдающему раком

60. Клетка по любому из пп. 1-58 для использования для лечения пациента, страдающего раком.

61. Способ по п. 59 или применение по п. 60, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

62. Способ или применение по любому из пп. 59-61, где клетка является аллогенной по отношению к субъекту.

63. Способ или применение по любому из пп. 59-61, где клетка является аутологичной по отношению к субъекту.

64. Способ или применение по любому из пп. 59-62, где клетка сопоставлена с субъектом.

65. Способ или применение по любому из пп. 59-62, включающие сопоставление клетки с субъектом, которому эта клетка будет введена, посредством анализа сопоставления.

66. Способ лечения рака, включающий введение субъекту клеток-носителей, содержащих онколитический вирус, где:

клетки-носители соответствуют или были сопоставлены с субъектом; и

клетки-носители включают клетку по любому из пп. 1-58.

67. Использование клеток-носителей для лечения рака, где:

клетки-носители содержат онколитический вирус;

клетки-носители соответствуют или был сопоставлены с субъектом; и

клетки-носители содержат клетку по любому из пп. 1-58.

68. Использование клеток-носителей для лечения рака у субъекта, где:

клетки-носители аллогены субъекту;

клетки-носители содержат онколитический вирус;

клетки-носители сопоставлены субъекту; и

клетки-носители содержат клетку по любому из пп. 1-58.

69. Способ или применение по любому из пп. 66-68, где рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

70. Способ или применение по любому из пп. 59-69, где рак включает солидную опухоль.

71. Способ или применение по любому из пп. 59-70, в котором субъектом является человек.

72. Способ или применение по любому из пп. 59-70, где субъектом является животное, не являющееся человеком.

73. Способ или применение по любому из пп. 59-70, где субъектом является собака, кошка, лошадь, свинья, корова или нечеловеческий примат.

74. Способ или применение по любому из пп. 59-73, где рак выбран из лейкозов, лимфом, меланом, карцином, сарком, миелом и нейробластом.

75. Способ или применение по любому из пп. 59-73, где рак выбран из рака поджелудочной железы, рака легких, рака яичников, рака груди, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, рака простаты, рака мозга, рака центральной нервной системы, аденокарциномы, рака печени, рака кожи, гематологических раковых заболеваний, рака желчных путей, рака костей, хориокарциномы, рака толстой и прямой кишки, рака соединительной ткани, рака пищеварительной системы, рака эндометрия, рака пищевода, рака глаз, рака головы и шеи, рака желудка, внутриэпителиальных новообразований, рака почек, рака гортани, рака полости рта, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака дыхательной системы, рака желудка, рака яичек, рака щитовидной железы, рака матки и рака мочевыделительной системы.

76. Способ или применение по любому из пп. 59-75, где рак выбран из лимфомы Ходжкина, неходжкинских лимфом, рака толстой кишки, базальноклеточного рака, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака губы, рака языка, рака рта, глиомы и рака глотки.

77. Способ или применение по любому из пп. 59-76, где клетку-носитель без вируса предварительно обрабатывают IFN-гамма и вводят или используют перед введением клетки-носителя, содержащей вирус, или одновременно с клеткой-носителем, содержащей вирус.

78. Способ или применение по любому из пп. 59-77, где лечение дополнительно включает введение другого противоракового средства или лечение другой противораковой терапией.

79. Способ или применение по п. 78, где дополнительное противораковое средство или лечение включает иммунотерапию.

80. Способ или применение по п. 78, отличающееся тем, что дополнительное противораковое средство или лечение выбирают из одного или нескольких из следующих: хирургического вмешательства, агонистов иммуностимуляции, BiTE, CAR-T-клеток и трансгенных Т-клеток TCR, нацеленных на опухолеспецифические антигены, ингибиторов контрольных точек, химиотерапевтических соединений/антител и иммуносупрессантов.

81. Способ или применение по п. 80, где дополнительное противораковое средство или лечение представляет собой иммуносупрессивное лекарство.

82. Способ или применение по п. 80, отличающееся тем, что дополнительное противораковое средство или лечение выбирают из одного или более из семейства B7, выбранных из CD28 и ICOS; семейства TNFR, выбранного из 4-1BB, OX40, GITR, CD40, CD30 и CD27; CBET; LT-альфа; ингибиторов контрольных точек, нацеленных на один или несколько из PD-1, PD-2, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, IDO 1 and 2, CTNNB1 (β -catenin), SIRP α , VISTA, LIGHT, HVEM, LAG3, TIM3, TIGIT, Galectin-9, KIR, GITR, TIM1, TIM4, CEACAM1, CD27, CD40/CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD112, CD137 (4-1BB), CD155, CD160, CD200, CD226, CD244 (2B4), CD272 (BTLA), B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, ICOS, A2aR, A2bR, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B, HLA-G, ILT-2/4 и OX40/OX-40L, MDR1, Arginase1, iNOs, IL-10, TGF- β , pGE2, STAT3, VEGF, KSP, HER2, Ras, EZH2, NIPP1, PP1, TAK1 и PLK1a; химиотерапевтических соединений и антител, выбранных из цитокинов, хемокинов, факторов роста, фотосенсибилизирующих агентов, токсинов, противораковых антибиотиков, химиотерапевтических соединений, радионуклидов, ингибиторов ангиогенеза, сигнальных модуляторов, антиметаболитов,

противораковых вакцин, противораковых олигопептидов, белков-ингибиторов митоза, антимиотических олигопептидов, противораковых антител, иммунотерапевтических агентов; и иммуносупрессантов, выбранных из глюкокортикоидов, ингибиторов кальциневрина, ингибиторов mTOR, метотрексата, леналидомида, азатиоприна, меркаптопурина, фторурацила и циклофосфамида, антител, блокирующих TNF α , и флударабина.

83. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-82, где клетка-носитель соответствует субъекту, которому ее следует вводить или которому она вводится.

84. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-83, в котором клетка-носитель сопоставлена с иммунными клетками от субъекта, которому вводится клетка, для идентификации клетки-носителя, которая является достаточно иммунологически совместимой с иммунными клетками от субъекта при условии доставки вируса субъекту.

85. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-84, где клетка сопоставлена с вирусом, при этом измеряется способность клетки амплифицировать вирус.

86. Клетка, способ или применение по любому из пп. 83-85, где комбинация клетка/вирус соответствует субъекту.

87. Клетка, способ или применение по любому из пп. 84-86, где иммунные клетки от субъекта включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC).

88. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-87, где носитель тестируется для проверки способности вируса реплицироваться в клетке и/или способности клетки способствовать амплификации вируса.

89. Клетка, способ или применение по п. 88, отличающиеся тем, что способность вируса к репликации в клетке и/или способность клетки стимулировать вирусную амплификацию тестируют путем совместного культивирования клетки и вируса и измерения скорости вирусной амплификации.

90. Клетка, способ или применение по п. 89, отличающиеся тем, что способность вируса к репликации в клетке и/или способность клетки стимулировать вирусную амплификацию измеряют с помощью:

а) измерения скоростей амплификации вируса с использованием множественности инфекции (MOI) приблизительно от 0,01 до 10, и совместного культивирования в течение периодов от 1 дня до приблизительно 1 недели (24 часа -1 неделя) в эквивалентных условиях анализа; и

б) нормирования относительно количества инфицированных носителей клеток, где:

значения бляшкообразующих единиц (БОЕ), нормированные на клетку, измеренные в эквивалентных условиях анализа, можно использовать для вычисления показателя амплификации вируса (VAS), который предназначен для ранжирования комбинации клетка-носитель + вирус как подходящей (или не подходящей) для терапии;

количество бляшкообразующих единиц на клетку-носитель 1-10 считается ограниченной эффективностью (в качестве клеточного носителя для конкретного вируса);

10-100 БОЕ на клетку - хорошая эффективность;

100-1000 БОЕ на клетку - очень хорошая эффективность;

БОЕ на клетку более 1000 - чрезвычайно высокая эффективность; и

комбинации клеток-носителей и вирусов, демонстрирующие не менее 10 БОЕ/клетку, рассматриваются для тестирования в скринингах совместимости клеток с субъектом.

91. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-90, где комбинацию клетка-носитель/вирус сопоставляют субъекту, подлежащему лечению, посредством:

а) оценки специфического для пациента генетического полиморфизма для идентификации гаплотипа МНС I/II, гаплотипа KIR и лигандов, а также неклассического гаплотипа МНС, включая один или несколько из HLA-E, CD1a, b, c, d, MICA/B;

б) сравнения профиля генетического полиморфизма субъекта с профилем доступных клеток-носителей для идентификации среди клеток-носителей клеток, наиболее совместимых с субъектом;

в) оценки совместимости клеток-носителей и иммунных клеток субъектов путем совместного культивирования клеток-носителей, вирусов и иммунных клеток;

г) оценки уровня вирусной амплификации.

92. Клетка, способ или применение по п. 91, дополнительно включающие:

д) измерение клетки-носителя + биопсии живой опухоли +/- вирус путем обнаружения направленной переносчиком миграции опухолевых клеток и амплификации вируса для идентификации клеток-носителей/вируса для введения, где:

вирусная амплификация в исследуемой биопсии опухоли + клеточные носители либо:

на 5% или более выше, чем сумма вирусной амплификации в одной биопсии опухоли в эквивалентных условиях + вирусная амплификация только в клеточных носителях в эквивалентных условиях; либо

по крайней мере, на 5% или более выше, чем вирусная амплификация в одной биопсии опухоли в эквивалентных условиях.

93. Клетка, способ или применение по п. 91 или п. 92, дополнительно включающие анализ совместных культур для оценки восприимчивости субъекта к опосредованной клеткой-носителем виротерапии путем культивирования полученных от субъекта РВМС + клетки-носители + вирус.

94. Клетка, способ или применение по любому из пп. 91-93, включающее:

измерение амплификации вируса в совместных культурах РМВС, полученных от субъекта, + клетка-носитель + вирус, при этом соответствие:

совместимы, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента превышает 80% амплификации вируса, когда та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС;

умеренно совместимы, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента находится в диапазоне 30-80% амплификации вируса, когда та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС;

минимально совместимы, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента находится в диапазоне 10-30% амплификации вируса, когда та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС;

несовместимы, если амплификация вируса в совместных культурах клетки-носителя и РВМС пациента составляет менее 10% от амплификации вируса, когда та же клетка-носитель инфицирована в отсутствие РВМС; и

% совместимости можно использовать для ранжирования клеток-носителей от наименее до наиболее совместимых клеток-носителей для каждого отдельного пациента и для каждого конкретного вируса.

95. Клетка, способ или применение по любому из пп. 1-94, где соответствие между клеткой-носителем и субъектом путем выбора клеточного носителя (клетки-носителя), подходящего для доставки онколитического вируса субъекту, страдающему раком, осуществляется посредством способа, включающего идентификацию одного или нескольких из следующих детерминант (а) - (е) как показывающих соответствие клеток-носителей (клетки-носителя) субъекту:

а) клеточный носитель и субъект имеют идентичные аллели в 50% или более из следующих генетических локусов в сочетании:

(i) гаплотипы МНС I и/или МНС II;

(ii) гаплотип KIR и/или гаплотип лиганда KIR; а также

(iii) гаплотипы HLA-E, CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d;

б) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции клетки в опухоль (CTMS) составляет 20% или более клеток-носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(ii) показатель миграции от опухоли к клеткам (TCMS) составляет 20% или более раковых клеток, мигрирующих к клеткам-носителям, и/или

(iii) совокупный балл миграции (MRS) $[(i) + (ii)] / 2$ составляет, по меньшей мере, 20%;

в) инкубация клеточного носителя в совместной культуре с онколитическим вирусом и раковыми клетками субъекта приводит к одному или нескольким из следующего:

(i) показатель миграции нагруженных вирусом клеток к опухоли (V-CTMS), составляет 20% или более клеток-носителей, мигрирующих к раковым клеткам;

(ii) показатель миграции нагруженных вирусом клеток от опухоли (V-TCMS) составляет 20% или более раковых клеток, мигрирующих в сторону клеток-носителей; и/или

(iii) совокупный показатель миграции нагруженного вирусом (V-MRS) $[(i) + (ii)] / 2$ составляет не менее 20%;

г) когда клеточный носитель инкубируют в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, показатель иммунологической вирусной амплификации (IVAS), представляющий показатель вирусной амплификации в присутствии иммунных клеток, полученных от субъекта, относительно показателя вирусной амплификации, полученной в эквивалентных условиях, за исключением отсутствия иммунных клеток, полученных от субъекта, составляет не менее 20%;

д) когда клеточный носитель инкубируют в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, показатель иммунологической совместимости (ICS), представляющий иммунный ответ в присутствии клеточного носителя относительно иммунного ответа при эквивалентных в условиях, за исключением отсутствия клеточного носителя, составляет $<200\%$, при этом иммунный ответ определяется степенью экспрессии одного или нескольких из следующих:

(i) $IFN\gamma$;

(ii) одного или нескольких маркеров, связанных с цитотоксичностью, опосредованной Т-клетками, NK-клетками и/или NKT-клетками; и/или

(iii) одного или нескольких маркеров, связанных с Т-клеткой, $\gamma\delta$ Т-клеткой, NK-клеткой и/или активаторной / эффекторной функцией (ами) NKT-клеток;

е) когда клеточный носитель инкубируют в совместной культуре с онколитическим вирусом и иммунными клетками, полученными от субъекта, клеточный носитель не усиливает противовирусный иммунный ответ и/или подавляет противовирусный иммунный ответ по сравнению с идентичными условиями, за исключением отсутствия клеточного носителя, что определяется по шкале иммунологического подавления (ISS) $\geq 0\%$ в соответствии с уравнением:

$$ISS\% = [(IV + IC) - ICV] / (IV + IC) \times 100, \text{ где:}$$

IV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре вируса + иммунных клеток, полученных от субъекта;

IC = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта, + клеточный носитель;

ICV = уровень экспрессии маркера в совместной культуре иммунных клеток, полученных от субъекта + клеточный носитель + вирус; и

уровень экспрессии маркера представляет собой уровень экспрессии одного или нескольких маркеров, указанных в (i), (ii) и (iii) из е); а также

если удовлетворяется одно или несколько из а) - е), определение соответствия между клеточным носителем и субъектом и выбор клеточного носителя как подходящего для доставки онколитического вируса субъекту, страдающему раком.

96. Клетка, способ или применение по п. 95, дополнительно включающие перед одним или несколькими из а) - е):

определение показателя вирусной амплификации (VAS) как БОЕ/клетка, когда клеточный носитель инкубируют с вирусом; и

если оценка по VAS составляет не менее 10, выбор клеточного носителя для скрининга с использованием одного или нескольких детерминант (а) - (е) и определение наличия соответствия между клеточным носителем и субъектом.

97. Клетка, способ или применение по п. 95 или п. 96, где способ мультиплексирован на панели из нескольких вариаций возможных клеток-носителей для их ранжирования на основе эффективности или доставки онколитического вируса субъекту, где ранг из 1 является наиболее желательным, наивысший ранг и большие числа представляют менее желательные ранги, с помощью мультиплексированного метода, включающего:

(i) измерение значения (значений) одного или нескольких из а) - е) для клеточного носителя в панели и ранжирование каждого клеточного носителя в соответствии с измеренным значением (ями), где:

для а) чем выше идентичность аллелей между клеточным носителем и субъектом, тем выше ранг клеточного носителя;

для б) чем выше баллы CTMS, TCMS и/или MRS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для в) чем выше баллы V-CTMS, V-TCMS и/или V-MRS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для г) чем выше оценка IVAS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя;

для д) чем ниже балл ICS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя; и

для е) чем выше оценка ISS для клеточного носителя, тем выше ранг клеточного носителя; и/или

(ii) для каждого клеточного носителя в панели, получение совокупного ранга, который представляет собой среднее значение двух или более рангов на основе измерения значения (значений) двух или более из а) - е), и ранжирование клеточного носителя в панель в соответствии с их совокупным рангом.

98. Клетка, способ или применение по п. 97, дополнительно включающее:

(i) для каждого клеточного носителя в панели получение показателя вирусной амплификации (VAS) как БОЕ/клетка, когда клеточный носитель инкубируют с вирусом;

(ii) для каждого клеточного носителя в панели получение совокупного ранга, который представляет собой среднее значение двух или более рангов на основе измерения показателя VAS и значения одного или более из а) - е); и

(iii) ранжирование группы клеточных носителей в соответствии с их совокупным рангом.

99. Способ по любому из пп. 95-98, в котором показатель ICS и/или показатель ISS получают на основании измерения экспрессии маркера в совместной культуре клеток.

100. Способ по любому из пп. 95-98, в котором показатель ICS и/или показатель ISS получают на основании измерения экспрессии маркера в супернатантах совместной культуры (культур).

101. Способ по любому из пп. 95-100, в котором показатель IVAS скорректирован с учетом влияния сыворотки субъекта на вирусную амплификацию способом, включающим:

(i) совместное культивирование г), добавление сыворотки от субъекта в количестве от 10 до 50% по весу (или об./об.) от объема совместной культуры;

(ii) вычисление шкалы устойчивости испытуемых к сыворотке (SSRS) по формуле:

$$SSRS = \frac{\text{БОЕ/клетка без сыворотки} - \text{БОЕ/клетка с сывороткой}}{\text{БОЕ/клетка без сыворотки}}; \text{ и}$$

(iii) вычисление процентного значения IVAS, скорректированного по SSRS, по формуле:

$$IVAS \text{ (скорректировано по SSRS)} = IVAS \times (1 - SSRS) \times 100.$$

102. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по любому из пп. 1-58 в фармацевтически приемлемом носителе.

103. Фармацевтическая композиция по п.102 для лечения рака.

104. Фармацевтическая композиция по п. 103, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

105. Способ или применение по любому из пп. 66-82, где клетка вводится системно, локально, внутриопухолево, внутripеченочно, внутривенно, ректально или подкожно.