

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202192645 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.01.13

(22) Дата подачи заявки  
2020.03.27

(51) Int. Cl. A61K 38/19 (2006.01)  
A61K 38/21 (2006.01)  
C07K 14/00 (2006.01)  
C07K 14/52 (2006.01)  
C07K 14/555 (2006.01)  
C07K 14/565 (2006.01)

(54) IFNβ В КАЧЕСТВЕ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОГО МАРКЕРА ДЛЯ  
ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ VSV-IFNβ-NIS

(31) 62/825,482

(32) 2019.03.28

(33) US

(86) PCT/US2020/025409

(87) WO 2020/198652 2020.10.01

(71) Заявитель:

МЭЙО ФАУНДЕЙШН ФОР  
МЕДИКАЛ ЭДЬЮКЕЙШН ЭНД  
РИСЕРЧ; ВИРИАД, ИНК. (US)

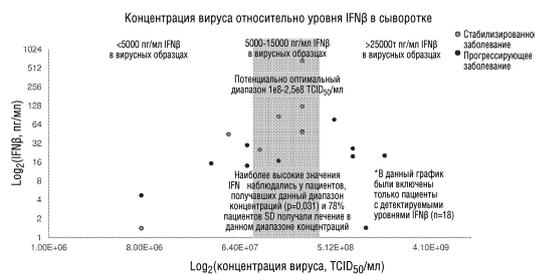
(72) Изобретатель:

Расселл Люк, Пенг Ках-Вхие, Расселл  
Стефен Джеймс (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение в общем относится к фармакокинетическим и фармакодинамическим маркерам для лечения рака и способам лечения рака. Представлены онколитические вирусные зонды, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую растворимый интерферон бета (IFNβ), и способы их применения.



202192645

A1

A1

202192645

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571021EA/050

### **IFN $\beta$ В КАЧЕСТВЕ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОГО МАРКЕРА ДЛЯ ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ VSV-IFN $\beta$ -NIS**

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/825482, поданной 28 марта 2019 г. Описание предшествующей заявки рассматривается как часть описания настоящего изобретения (и включено в настоящий документ посредством ссылки).

#### **ЗАЯВЛЕНИЕ О ГОСУДАРСТВЕННОМ УЧАСТИИ**

[0002] Это изобретение было выполнено с государственной поддержкой в виде гранта № CA015083, выданного Национальным институтом здравоохранения. Поэтому государство имеет определенные права на изобретение.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Настоящее изобретение в общем относится к фармакокинетическим и фармакодинамическим маркерам для терапевтических схем и способов лечения рака.

[0004] Рак остается одной из ведущих причин смертности во всем мире. В США за 2015 год было диагностировано 1658370 новых случаев раковых заболеваний и 589430 смертей от рака. Пятилетний относительный показатель выживаемости для всех раковых заболеваний, диагностированных в 2004-2010 гг., составил всего 68%. Кроме того, некоторые раковые заболевания имеют крайне плохие прогнозы с 5-летними показателями относительной выживаемости, составляющими 7% для рака поджелудочной железы и менее 20% для рака печени, легких и пищевода; эти показатели для злокачественных новообразований на поздней стадии с отдаленными метастазами варьируют от 2% для рака поджелудочной железы до 55% для рака щитовидной железы.

[0005] Химиотерапия представляет собой стандартный вариант лечения для большинства пациентов с метастатическим раком и/или поздней стадией рака. К сожалению, для многих пациентов химиотерапия не помогает, и их заболевание становится невосприимчивым к лечению. У пациентов с рефрактерными метастатическими солидными опухолями остается мало вариантов лечения.

[0006] Противораковая иммунотерапия представляет собой быстро развивающееся терапевтическое направление, которое предлагает клинический потенциал тогда, когда химиотерапия становится неэффективной. За последнее десятилетие были одобрены такие ингибиторы иммунных контрольных точек, как ипилимумаб, пембролизумаб, атезолизумаб и ниволумаб. Первоначально применение этих соединений было одобрено для лечения меланомы, но впоследствии их применение было одобрено для других типов заболеваний, а недавно были одобрены дополнительные препараты, включая авелумаб и дурвалумаб. Эти агенты стимулировали возрождение иммунотерапии в клинической практике. В настоящее время множество средств находится в разработке, в том числе онколитическая вирусная терапия.

[0007] Онколитическая виротерапия представляет собой многообещающую альтернативу химиотерапии, особенно у пациентов с рефрактерными или рецидивирующими заболеваниями, у которых не сработали несколько других методов противораковой терапии. Терапевтическая эффективность онколитических вирусов определяется их способностью вызывать многоцентровую атаку. Онколитические вирусы избирательно реплицируются в раковых клетках и, вызывая провоспалительный клеточный лизис и экспозицию ассоциированных с опухолью антигенов, они помогают обратить вспять иммуносупрессию в микросреде опухоли и стимулировать эффекторные клетки организма-хозяина, в результате чего возникает системный длительный противораковый иммунный ответ.

[0008] В 2015 году первая онколитическая вирусная терапия Imlygic (талимоген Laherparepvec) была одобрена для использования у пациентов с местнораспространенной меланомой. Для дальнейшего изучения их безопасности и эффективности применение онколитических вирусов необходимо исследовать на пациентах с рефрактерными солидными опухолями. Недавно, онколитический вирус простого герпеса типа 1, T-Vec, кодирующий гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор, был одобрен FDA для лечения хирургически неоперабельной меланомы, что сделало его первым в своем классе, одобренным в США (Andtbacka 2015). В настоящий момент проводятся три других испытания III фазы онколитической виротерапии: внутриопухолевое введение онколитического вируса осповакцины, кодирующего GMCSF (Pexa-Vec), для лечения гепатоцеллюлярной карциномы; интравезикулярного аденовируса, также кодирующего GMCSF (CG0070), для лечения рака мочевого пузыря; и реовируса IV (Reolysin) для лечения рака головы и шеи. Из других клинических испытаний онколитических вирусов открытой является фаза I с использованием внутриопухолевого введения онколитического VSV, экспрессирующего IFN $\beta$  (и не экспрессирующего симпортер) для лечения гепатоцеллюлярной карциномы, и проводится набор нужного количества участников исследования.

[0009] Онколитическая виротерапия также может быть скомбинирована с другими видами противораковой терапии, такими как химиотерапия или иммунотерапия. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование ингибиторов контрольных точек в сочетании с онколитическими вирусами может усилить противоопухолевый иммунный ответ за счет высвобождения неоантигенов, что приводит к длительному специфичному ответу у большей части пациентов, чем ожидаемый при использовании только ингибитора контрольной точки. В то время как некоторые исследования предполагают, что комбинация ингибиторов контрольных точек и онколитических вирусов может быть полезна, до настоящего времени у человека не проводились исследования комбинированной терапии, состоящей из ингибитора контрольной точки и онколитического вируса для метастатического рака толстой кишки.

[0010] Онколитическая виротерапия может быть оптимизирована или настроена. Например, раковые клетки с противовирусной недостаточностью можно

идентифицировать на основании наличия сигнатуры экспрессии пермиссивных генов виротерапии. Один такой набор маркеров показан в WO 2017218757 A1. Сигнатуры экспрессии генов опухоли дают нужную информацию. Однако они являются статическими и, следовательно, не могут учитывать изменяющиеся обстоятельства, которые могут возникать во время лечения. Кроме того, сигнатура экспрессии генов не может повлиять на опухолевую нагрузку.

[0011] Таким образом, существует потребность в измерении и мониторинге в режиме реального времени в динамической клинической среде и адаптации решений по лечению на основании индивидуального ответа и изменения обстоятельств у каждого пациента.

### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0012] Настоящее изобретение в общем относится к способу диагностики. В некоторых вариантах осуществления изобретения изобретение относится к способам определения вероятности того, что раковая ткань у субъекта, имеющего раковую ткань, будет отвечать на схему противоракового лечения. Способы, как правило, включают (а) внутриопухолевое введение в раковую ткань субтерапевтической диагностической дозы онколитического вируса-зонда, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую растворимый интерферон-бета (IFN $\beta$ ); и (b) измерение циркулирующего уровня IFN $\beta$  у субъекта после введения онколитического вируса для определения степени ответа раковой ткани: сильной, промежуточной, слабой, или ответ отсутствует.

[0013] Настоящее изобретение также относится к способам лечения субъекта, у которого был диагностирован рак. Способы лечения включают в себя: (а) введение субъекту первой дозы из схемы онколитической вирусной противораковой терапии, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую интерферон-бета (IFN $\beta$ ), и (b) введение по меньшей мере второй дозы из схемы онколитической вирусной противораковой терапии, если у субъекта идентифицирован сильный или промежуточный ответ на схему онколитической вирусной противораковой терапии.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[0014] На фиг.1 показано, что концентрация вводимого внутрь опухоли вируса Voyager-V1 коррелирует с ответом. Уровни IFN $\beta$  предсказывают ответ пациента на Voyager-V1.

[0015] На фиг.2 показаны уровни IFN $\beta$  в плазме у пациентов, которым вводили разные дозы (DL, дозировка) 1, 2, или 3 Voyager-V1. DL1, DL2 и DL3 соответствуют  $5 \times 10^9$ ,  $1,7 \times 10^{10}$  и  $5 \times 10^{10}$  TCID $_{50}$ , соответственно. SD указывает на стабилизированное заболевание. PR указывает на частичный ответ.

[0016] На фиг.3 показан график уровня IFN $\beta$  в плазме на 2-й день (через 24 ч после введения) относительно титра анти-VSV антител на 29-й день (28-й день после введения).

[0017] На фиг.4A-4F показано сравнение относительных трендов IFN $\beta$  и IFN $\alpha$  у пациентов. Фиг.4A-4C показывают, что уровень IFN $\beta$  (темная линия) увеличивается через 24 часа после введения. Фиг.4D-4F показывают, что уровень IFN $\alpha$  (темная линия)

уменьшается через 24 часа после введения. Данные показывают, что уровни трансгенного IFN $\beta$  могут служить биомаркером вирусной инфекции.

[0018] На фиг.5A-5F показано, что циркулирующий уровень IFN $\beta$ , обнаруженный в сыворотке, является показателем вариабельности инфекции и распространения Voyager-V1 у индивидуальных пациентов. В частности, фиг.5A-5C показывают, что циркулирующий IFN $\beta$  может детектироваться у пациентов с внутриопухолевым введением дозровок в диапазоне от приблизительно  $10^6$  до  $10^8$  TCID $_{50}$ .

[0019] На фиг.6 показано изображение конструкции Voyager-V1 (VSV-IFN $\beta$ -NIS, VV1).

[0020] На фиг.7 показана общая блок-схема способа, используемого в исследовании системной виротерапии Voyager-V1, представленной в примере 1.

[0021] На фиг.8A и 8B показана клиническая активность после одной внутривенной дозы Voyager-V1. В частности, на фиг.8A показаны КТ-сканы до лечения и через 3 месяца после лечения Voyager-V1 у субъекта с раком эндометрия. Общее уменьшение опухоли составляет 16,5% в диаметре на 29-й день. На фиг.8B показано уменьшение диаметра опухоли у субъекта с Т-клеточной лимфомой.

[0022] На фиг.9A и 9B показано, что NIS-визуализация подтверждает инфицирование опухоли вирусом Voyager-V1 у двух субъектов, субъекта 105-021 (фигура 9A) и субъекта 105-020 (фигура 9B).

[0023] На фиг.10A и 10B показано, что лечение Voyager-V1 повышает содержание опухоль-инфильтрующих клеток CD8 через один месяц после внутривенной инъекции (субъект 6, фигура 10A) или внутриопухоловой инъекции (субъект 103-014, фигура 10B).

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0024] Настоящее изобретение в целом относится к способу диагностики. В некоторых вариантах осуществления изобретения изобретение относится к способам определения вероятности того, что раковая ткань у субъекта, имеющего раковую ткань, будет отвечать на схему противоракового лечения. Способы, как правило, включают (а) внутриопухолевое введение в раковую ткань субтерапевтической диагностической дозы онколитического вируса-зонда, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую растворимый интерферон-бета (IFN $\beta$ ); и (b) измерение циркулирующего уровня IFN $\beta$  у субъекта после введения онколитического вируса для определения степени ответа раковой ткани: сильной, промежуточной, слабой, или ответ отсутствует.

[0025] В некоторых вариантах осуществления схема противораковой терапии способа включает в себя онколитический вирус-зонд, который вводится внутрь опухоли на стадии (а). В некоторых вариантах осуществления схема противораковой терапии способа включает в себя другой онколитический вирус-зонд, чем тот, что вводится внутрь опухоли на стадии (а). В некоторых вариантах осуществления схема противораковой терапии представляет собой иммуноонколитическую терапию. В некоторых вариантах осуществления схема противораковой терапии представляет собой антитело или низкомолекулярное противораковое соединение.

[0026] В некоторых вариантах осуществления вводимый онколитический вирусный зонд является нетоксичным и нетерапевтическим. В некоторых вариантах осуществления нетерапевтическая и нетоксичная доза составляет от примерно  $10^5$  TCID<sub>50</sub> до примерно  $3 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>. В некоторых вариантах осуществления нетерапевтическая и нетоксичная доза составляет от примерно  $10^8$  TCID<sub>50</sub> до примерно  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>.

[0027] В других вариантах осуществления онколитический вирус-зонд может представлять собой любой вирус класса GMP. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус-зонд представляет собой вирус везикулярного стоматита (VSV). В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус-зонд дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую симпортер йодида натрия (NIS). В некоторых вариантах осуществления онколитический вирусный зонд имеет конструкцию из N-P-M-IFN  $\beta$ -G-NIS-L.

[0028] В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN  $\beta$  измеряют у субъекта в интервале от примерно 12 до примерно 45 дней после введения онколитического вируса. В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN  $\beta$  измеряют у субъекта в интервале от примерно 12 часов до примерно 3 дней после введения онколитического вируса. В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN  $\beta$  измеряют у субъекта примерно через 48 часов после введения онколитического вируса. В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN  $\beta$  измеряют у субъекта примерно через 24 часа после введения онколитического вируса.

[0029] В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN  $\beta$  измеряют с помощью иммунологического анализа.

[0030] В некоторых вариантах осуществления раковая ткань представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления раковая ткань представляет собой рак головы и шеи, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак легкого, медуллобластому, атипичную тератоидную/рабидоидную опухоль, лейкоз, лимфому или миелому.

[0031] Настоящее изобретение также относится к способам лечения субъекта, у которого был диагностирован рак. Способы лечения включают: (a) введение субъекту первой дозы из схемы онколитической вирусной противораковой терапии, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую интерферон-бета (IFN $\beta$ ), и (b) введение по меньшей мере второй дозы из схемы онколитической вирусной противораковой терапии, если у субъекта идентифицирован сильный или промежуточный ответ на схему онколитической вирусной противораковой терапии.

[0032] В некоторых вариантах осуществления схема противораковой терапии включает введение более чем одной противораковой композиции. В некоторых вариантах осуществления раковая ткань представляет собой солидную опухоль, а схема противораковой терапии представляет собой онколитический вирус, который вводят

внутри опухоли в дозе, которая основана на количестве вирусных частиц на единицу объема опухоли.

[0033] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая доза онколитического вируса, вводимого внутри опухоли, вводится в стандартном диапазоне доз. В некоторых вариантах осуществления схема противораковой терапии представляет собой онколитический вирус, который вводят внутривенно.

[0034] В некоторых вариантах осуществления первая доза схемы онколитической вирусной противораковой терапии вводится внутривенно. В некоторых вариантах осуществления первая доза схемы онколитической вирусной противораковой терапии вводится внутри опухоли. В некоторых вариантах осуществления первая доза схемы онколитической вирусной противораковой терапии является нетерапевтической и нетоксичной дозой схемы онколитической вирусной противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая доза схемы онколитической вирусной противораковой терапии вводится внутривенно или внутри опухоли.

[0035] В некоторых вариантах осуществления схема онколитической вирусной противораковой терапии включает нуклеиновую кислоту, кодирующую симпортер йодида натрия (NIS). В некоторых вариантах онколитический вирус представляет собой РНК-вирус. В некоторых вариантах онколитический вирус представляет собой вирус везикулярного стоматита (VSV). В некоторых вариантах осуществления VSV имеет конструкцию из N-P-M-IFN $\beta$ -G-NIS-L.

[0036] В некоторых вариантах осуществления способ лечения дополнительно включает введение субъекту одного или нескольких дополнительных иммуноонкологических агентов, если субъект показывает промежуточный ответ в схеме онколитической вирусной противораковой терапии.

[0037] В некоторых вариантах осуществления способ лечения дополнительно включает в себя введение ингибитора янус-киназ (JAK-ингибитора) субъекту, если субъект дает сильный ответ в схеме онколитической вирусной противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления JAK-ингибитор представляет собой руксонитиниб.

[0038] В некоторых вариантах осуществления уровень IFN $\beta$  оценивают в интервале от примерно 0,5 до 45 дней после введения первой дозы схемы онколитической вирусной противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN $\beta$  оценивают в интервале от приблизительно 0,5 до 3 дней после введения первой дозы схемы онколитической вирусной противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления вторую дозу схемы онколитической вирусной противораковой терапии вводят в течение примерно 1-10 дней после введения первой дозы схемы онколитической вирусной противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления циркулирующие уровни IFN $\beta$  оценивают в течение приблизительно 12-24 часов после введения первой дозы схемы онколитической вирусной противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN $\beta$  оценивают с помощью иммунологического анализа.

[0039] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак головы и шеи, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак легкого, медуллобластома или атипичную тератоидную/рабидоидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз, лимфому или миелому.

[0040] В некоторых вариантах осуществления второе введение схемы онколитической вирусной противораковой терапии представляет собой внутриопухолевую инъекцию. В некоторых вариантах осуществления вторая внутриопухолевая инъекция вводится субъекту на основе количества вирусных частиц на единицу объема опухоли. В некоторых вариантах осуществления вторая внутриопухолевая инъекция вводится субъекту в стандартном диапазоне доз. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая доза онколитического вируса вводится внутривенно.

[0041] Настоящее изобретение в общем относится к способам диагностики и лечения рака. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу ранней оценки ответа индивидуума на противораковую терапию и адаптации решений по лечению на основании индивидуального ответа и изменения обстоятельств у каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу изучения микроокружения раковой ткани и потенциального иммунного ответа на противораковый терапевтический агент у индивидуального пациента. Такой способ может позволить выбор наиболее эффективной схемы лечения, адаптированной для конкретного индивидуума.

[0042] Термины «образец», «исследуемый образец» или «биологический образец», используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к образцу, имеющему биологическое происхождение, в конкретных вариантах осуществления, например, от млекопитающего. В некоторых примерах образец представляет собой ткань или жидкость организма, полученные от субъекта. В других конкретных примерах образец представляет собой образец от человека или животного. Неограничивающие источники образцов включают кровь, плазму, сыворотку, мочу, ликвор, лимфатическую жидкость, синовиальную жидкость, спинномозговую жидкость, слезы, слюну, молоко, мукозальную секрецию, эффузию, пот, биопсийные аспираты, асциты или жидкостные экстракты. В конкретном примере образец представляет собой образец жидкости. В конкретном примере образец представляет собой раковую ткань. В некоторых вариантах осуществления образцы получают от субъекта (например, человека), содержащего источники различных образцов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления образцы подвергают дальнейшей обработке. Приведенные в качестве примера процедуры обработки образцов представлены в настоящей заявке,

например, в разделе «Пример».

[0043] Термин «субъект» относится к любому животному, например млекопитающему, включая, но не ограничиваясь ими, человека и других приматов, которое является реципиентом конкретного лечения.

[0044] Используемая в настоящем документе субтерапевтическая доза означает уровень дозы или диапазон доз, ниже уровня или диапазона доз, который обычно вводится при определенном показании или определенному индивидууму. В некоторых вариантах осуществления субтерапевтическая доза представляет собой уровень или диапазон доз, ниже указанных на этикетке средства, такого как любой противораковый терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления субтерапевтическая доза означает уровень дозы или диапазон доз, которые не вызывают токсичность или терапевтический ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субтерапевтическая доза представляет собой нетоксичную и нетерапевтическую дозу.

[0045] Онколитический вирус, используемый в настоящем документе, означает вирус, который инфицирует и убивает раковые клетки благодаря нормальной репликации и жизненному циклу вируса, но не нормальные клетки. В некоторых примерах онколитическая вирусная терапия может облегчить уничтожение опухолевых клеток другими методами противораковой терапии, такими как химиотерапия и лучевая терапия. Онколитическая вирусная терапия представляет собой тип направленной терапии. Также этот метод обозначается терминами онколитическая виротерапия, вирусная терапия и виротерапия, используемыми взаимозаменяемо в данном документе.

[0046] Онколитический вирус-зонд, используемый в данном документе, означает онколитический вирус, который используется в более низкой дозе, чем он может использоваться в качестве терапевтического агента, чтобы исследовать в раковой ткани, такой как опухоль, специфические характеристики раковых тканей, такие как иммунные ответы на вирус, тканевая или опухолевая микросреда, или защитная способность раковой ткани. В некоторых вариантах осуществления используют онколитический вирусный зонд для исследования индивидуума, которому был поставлен диагноз рак. Онколитический вирус-зонд может представлять собой любой вирус класса GMP. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус-зонд представляет собой вирус везикулярного стоматита (VSV). В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус-зонд дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую симпорт йодида натрия (NIS). В некоторых вариантах осуществления зонд представляет собой вирус, который в достаточной дозе являлся бы терапевтическим.

[0047] В некоторых вариантах осуществления субтерапевтическая доза онколитического вируса-зонда составляет от примерно  $10^5$  TCID<sub>50</sub> до примерно  $3 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>. В некоторых вариантах осуществления субтерапевтическая доза составляет от примерно  $10^8$  TCID<sub>50</sub> до примерно  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>. В некоторых вариантах осуществления субтерапевтическая доза онколитического вируса-зонда может быть рассчитана любым специалистом в данной области с использованием стандартного способа.

[0048] В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус-зонд имеет конструкцию N-P-M-IFN $\beta$ -G-NIS-L в некоторых вариантах осуществления, нетерапевтическая и нетоксичная доза онколитического вируса-зонда составляет от примерно  $10^5$  TCID<sub>50</sub> до примерно  $3 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>. В некоторых вариантах осуществления нетерапевтическая и нетоксичная доза составляет от примерно  $10^8$  TCID<sub>50</sub> до примерно  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>.

[0049] Термин «циркулирующий уровень» предназначен для обозначения количества или концентрации маркера, присутствующего в циркулирующей текучей среде. Циркулирующие уровни могут быть выражены в терминах, например, абсолютных количеств, концентраций, количества на единицу массы субъекта, и могут быть выражены в терминах относительных количеств. Уровень маркера может также представлять собой относительное количество, такое как, но не ограниченное этим, в сравнении с внутренним стандартом или базовыми уровнями, или может быть выражен в виде количественного диапазона, минимального и/или максимального количества, среднего количества, медианного количества или наличия или отсутствия маркера.

[0050] В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют у субъекта до введения онколитического вируса. Онколитический вирус может являться вирусным зондом, вводимым в субтерапевтической дозе, или агентом виротерапии. В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют у субъекта от примерно 12 часов до примерно 45 дней после введения онколитического вируса. В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют у субъекта от примерно 12 часов до примерно 3 дней после введения онколитического вируса. В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют у субъекта примерно через 48 часов после введения онколитического вируса. В некоторых вариантах осуществления циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют у субъекта примерно через 24 часа после введения онколитического вируса. Уровни циркулирующего IFN $\beta$  у субъекта идентифицирует субъекта как имеющего сильный ответ, промежуточный ответ, низкий ответ или не отвечающего на введение онколитического вируса.

[0051] Уровни циркулирующего IFN $\beta$  у имеющего сильный ответ, промежуточный ответ, низкий ответ или не имеющего ответ определяются более чем одним фактором и могут перекрываться. Например, фактическое количество IFN $\beta$ , полученного у субъекта, будет зависеть от типа используемого вирусного вектора, маркерного гена или белка, переносимого вектором, введенной начальной дозы, микроокружения опухоли человека и механизма иммунной защиты индивидуума. Маркерный ген или белок, используемый в настоящем документе, означает ген или белок, уровни которых, т.е. циркулирующий уровень или уровень экспрессии, могут быть обнаружены обычными методами. В некоторых вариантах осуществления он представляет собой растворимый IFN $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления он представляет собой NIS.

[0052] В случае растворимого IFN $\beta$ , экспрессируемого с помощью вируса VSV,

такого как Voyager-V1, уровень циркулирующего IFN $\beta$  между 0-100 пг/мл может считаться низким, в зависимости от начальной дозы зонда, и идентифицирует субъекта, как имеющего низкий ответ или не имеющего ответ. В некоторых вариантах осуществления уровень циркулирующего IFN $\beta$  10 пг/мл и выше может быть высоким в зависимости от начальной дозы зонда и идентифицирует субъекта, как имеющего сильный ответ. Кроме того, различные исходные дозировки будут давать отличающиеся высокие и низкие диапазоны.

[0053] Термин «рак» имеет свое общее значение в данной области. Как правило, рак является термином для заболеваний, в которых аномальные клетки делятся бесконтрольно и могут проникать в близлежащие ткани. Существует несколько основных типов рака. Например, карцинома представляет собой рак, который начинается в коже или в тканях, образующих внутренние органы или покрывающие внутренние органы. Саркома представляет собой рак, который начинается с кости, хряща, жира, мышцы, кровеносных сосудов или другой соединительной или поддерживающей ткани. Лейкоз представляет собой рак, который начинается в кровеобразующей ткани, такой как костный мозг, и является причиной образования большого количества аномальных клеток крови, выходящих в кровь. Лимфома и множественная миелома являются раковыми заболеваниями, которые возникают из клеток иммунной системы. Злокачественные опухоли центральной нервной системы представляют собой виды рака, которые начинаются в тканях головного мозга и спинного мозга. Также рак называется злокачественным новообразованием. Термин «рак», используемый в настоящем документе, включает все виды рака, будь то солидная опухоль или рак крови, независимо от происхождения ракового заболевания. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головы и шеи, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак легкого, медуллобластому, атипичную тератоидную/рабидоидную опухоль, лейкоз, лимфому или миелому.

[0054] Раковая ткань означает ткань, которая имеет идентифицируемые раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления раковая ткань представляет собой солидную опухоль.

[0055] Термин «введение», используемый в настоящем документе, включает любой способ введения лекарственного средства субъекту, включая, но не ограничиваясь этим, внутриопухолевое и внутривенное. Внутривенная (IV) инъекция или инфузия означает, что лекарственное средство передается непосредственно в вену субъекта с использованием иглы или трубки. В некоторых вариантах осуществления в вену вставляют тонкую пластиковую трубку, называемую IV-катетером. Внутриопухолевое введение означает, что лекарственное средство вводится непосредственно в опухоль или раковую ткань.

[0056] Настоящее изобретение также относится к маркерам фармакодинамики (PD) терапевтических схем и способов лечения рака, при этом способы включают введение

субъекту рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, который был сконструирован для экспрессии интерферона-бета и симпортера йодида натрия (например, VSV-IFN $\beta$ -NIS). В настоящем изобретении термины «субъект» и пациент употребляются взаимозаменяемо.

[0057] Инфекция человека VSV дикого типа обычно является бессимптомной, но может вызывать острое, фебрильное, гриппообразное заболевание, продолжительное 3-6 дней, характеризующееся лихорадкой, счетами, тошнотой, рвотой, головной болью, ретробульбарной болью, миалгией, болью за грудиной, недомоганием, фарингитом, конъюнктивитом и лимфаденитом. Осложнения, как правило, не наблюдаются у людей, инфицированных вирусом VSV дикого типа, и не были зарегистрированы, хотя был опубликован случай нелетального менингоэнцефалита у 3-летнего панамского ребенка, приписываемый инфекции VSV. Модифицированный штамм Indiana VSV вводили более чем 17000 здоровым добровольцам в программе вакцинации Эбола, что позволило заключить, что профиль безопасности можно считать приемлемым для здоровых взрослых. Вакцина на основе VSV, как правило, хорошо переносится, и сообщалось о небольшом числе связанных с вакциной побочных явлений. Общие побочные явления включают головную боль, лихорадку, усталость и миалгию, причем большая часть является легкой или умеренной и обычно непродолжительной. Никогда не наблюдалось ни выделения живого вируса, ни переноса вируса от человека к человеку.

[0058] Вирус везикулярного стоматита является представителем семейства Rhabdoviridae. Геном VSV представляет собой одну молекулу негативной РНК, которая кодирует пять основных полипептидов: полипептид нуклеокапсида (N), полипептид фосфопротеина (P), полипептид (M) матрикса, полипептид гликопротеина (G) и полипептид вирусной полимеразы (L). Последовательности нуклеиновых кислот вируса везикулярного стоматита, представленные в данном документе, которые кодируют полипептид VSV N, полипептид VSV P, полипептид VSV M, полипептид VSV G и полипептид VSV L могут относиться к штамму VSV Indiana, имеющему номер доступа в GenBank NC\_001560 (GI No. 9627229), или могут относиться к штамму VSV New Jersey.

[0059] В одном варианте осуществления способа и схемы настоящего изобретения включают введение Voyager-V1 (VSV-IFN $\beta$ -NIS, VV1). VSV-IFN $\beta$ -NIS является живым вирусом, разработанным для экспрессии как гена интерферона-бета человека (hIFN $\beta$ ), так и тиреоидного симпортера йодида натрия (NIS). Вирус конструировали путем вставки гена hIFN $\beta$  после гена M, и гена NIS (кДНК) после гена белка G в полноразмерный инфекционный молекулярный клон вируса везикулярного стоматита Indiana (VSV). VSV-IFN $\beta$ -NIS описан в PCT/US2011/050227, который включен в настоящее описание в качестве ссылки. Иллюстрация конструкции Voyager-V1 представлена на фиг.6.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Системная виротерапия Voyager-V1**

[0060] Voyager-V1 (VSV-IFN $\beta$ -NIS, VV1) представляет собой модифицированный для улучшения противоопухолевого иммунного ответа и направленный онколитический

вирус везикулярного стоматита (VSV), предназначенный для селективного разрушения опухолевых клеток путем прямого онколиза и иммунной активации. VV1 экспрессирует интерферон бета человека (IFN $\beta$ ) и симпортер йодида натрия NIS. Во время исследования было обнаружено, что IFN $\beta$  может также служить в качестве растворимого биомаркера для контроля репликации вируса *in vivo*. В данном случае авторы сообщают о новом применении кодируемого вирусом IFN $\beta$  с использованием корреляционных данных из трех клинических испытаний (фаза 1) Voyager-V1 на пациентах с рефрактерными раковыми заболеваниями (n=51), где целевые исследования были направлены на механизм действия (МОА) Voyager-V1. Иллюстрация конструкции Voyager-V1 показана на фиг.6.

[0061] Основные задачи этого исследования включают безопасность и переносимость Voyager-V1 после внутриопухолевого (IT) или внутривенного (IV) введения у пациентов с рецидивирующими или возвратными гематологическими злокачественными новообразованиями или солидными опухолями.

[0062] Вторичные задачи этого исследования включают в себя установление доказательства концепции (например, посредством NIS-визуализации, иммунной активации и опухолевой селективности), PK и PD для Voyager-V1, выделения вируса, иммунных ответов и степени ответа. Схематическая блок-схема плана исследования показана на фиг.7.

[0063] Пятьдесят один пациент получал одну дозу Voyager-V1 либо IT, либо IV в дозах в диапазоне от  $3 \times 10^6$  до  $5 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>.

[0064] Кровь собирали перед введением вируса (для IV и IT), через 4 ч после инфузии (IV), в день 2 (24 ч для IT и IV), в дни 3, 8 и 15 (для IT и IV), в день 22 (только для IV) и в день 29 (только для IT). Уровни IFN $\beta$  измеряли с использованием стандартного набора ELISA, специфичного к IFN $\beta$  человека (PBL Assay Science, NJ). Уровни цитокинов измеряли с использованием набора для анализа нескольких цитокинов (R&D Systems, MN). Примеры протоколов приведены в примерах 3 и 4 ниже.

[0065] Эффективность системной виротерапии Voyager-V1 проиллюстрирована на фигурах 8A, 8B, 9A, 9B, 10A и 10B. В частности, на фиг.8A показано КТ-сканирование до лечения и через 3 месяца после лечения Voyager-V1 у субъекта с раком эндометрия. Общее уменьшение опухоли составляет 16,5% в диаметре в день 29. Фигура 8B показывает снижение диаметра опухоли на 75% у субъекта с Т-клеточной лимфомой. На фигурах 9A и 9B показано, что NIS-визуализация подтверждает инфицирование опухоли Voyager-V1 у двух субъекта, субъекта 105-021 (фигура 9A) и субъекта 105-020 (фигура 9B). На фигурах 10A и 10B показано, что лечение Voyager-V1 увеличивает инфильтрацию опухоли CD8-клетками в течение одного месяца после внутривенной инъекции (субъект 6, фигура 10A) или внутриопухолевой инъекции (субъект 103-014, фигура 10B).

### **Пример 2. Концентрация вируса позволяет прогнозировать ответ**

[0066] Пациентам с различными солидными опухолями вводили Voyager-V1 с помощью инъекции внутрь опухоли. Дозы Voyager-V1 находились в диапазоне от  $3 \times 10^6$  до  $5 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, и объем инъекции варьировал от 0,5-4,0 мл в зависимости от размера

опухоли. Концентрации вводимого с помощью инъекции вируса для  $n=27$  пациентов находились в диапазоне от  $7,5 \times 10^5$  до  $1,5 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/мл и содержали некоторое количество интерферонв-бета в вводимом объеме (клинический продукт содержит от  $8 \times 10^5$  до  $1,2 \times 10^6$  пг/мл интерферона-бета, который разбавляют во время приготовления лекарственного средства в местной аптеке). У всех пациентов брали кровь на анализ в 1-й день (до лечения) и дни 2, 3, 8 и 15 после лечения. Уровни IFN $\beta$  в сыворотке оценивали в каждый момент времени, и пиковые уровни интерферона-бета для всех пациентов с детектируемым ( $>1,2$  пг/мл) интерферона-бета наносили на график относительно концентрации вводимого вируса для каждого пациента ( $n=18$ ). Пиковый уровень IFN $\beta$  в сыворотке соответствовал нормальному распределению относительно концентрации вводимого вируса.

[0067] Максимальные уровни IFN $\beta$  наблюдались у пациентов, которым вводили Voyager-V1 в диапазоне концентраций от  $1 \times 10^8$  до  $2,5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл (Т-критерий Стьюдента, оценивающий пиковые уровни интерферона-бета у пациентов, получавших Voyager-V1 в этом диапазоне концентраций ( $n=8$ ) по сравнению со всеми другими пациентами ( $n=19$ ),  $P=0,031$ ).

[0068] 78% пациентов со стабилизированным заболеванием (SD) получали Voyager-V1 в диапазоне концентраций от  $1 \times 10^8$  до  $2,5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл (9 пациентов имели SD через 6 недель после терапии Voyager-V1. Из этих пациентов 7/9 (78%) получали Voyager-V1 в диапазоне концентраций от  $1 \times 10^8$  до  $2,5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл).

[0069] Увеличение концентраций IFN $\beta$  в вирусном препарате может ингибировать репликацию вируса. Средние уровни интерферона-бета в сыворотке, измеренные через 24 ч после введения Voyager-V1, увеличивались с 2,0 пг/мл IFN $\beta$  при  $7,5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/мл до 219,5 пг/мл IFN $\beta$  при  $2,5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл (в среднем), выше которого пиковые уровни IFN $\beta$  начинали снижаться (77 пг/мл IFN $\beta$  при  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл, 23 пг/мл IFN $\beta$  при  $7,5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл и 11 пг/мл IFN $\beta$  при  $1 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/мл и выше). Более высокие концентрации вируса означают более высокие концентрации IFN $\beta$  во вводимом вирусном препарате, которые могут ингибировать рост и распространение вируса.

[0070] Как показано на фиг.1, концентрация вводимого внутрь опухоли вируса Voyager-V1 коррелирует на 2-й день (24 ч после введения) с ответом пациентов на лечение. Уровни IFN $\beta$  прогнозируют реакцию пациента на Voyager-V1. Пациенты с детектируемыми уровнями IFN $\beta$ , как правило, имеют стабилизированное заболевание. Кроме того, на фиг.2 показаны уровни IFN $\beta$  в плазме в день 2 (24 ч.) у пациентов, которым вводили внутривенно одну дозу Voyager-V1. Уровень дозы (DL) Voyager-V1 был 1, 2 или 3. DL1, DL2 и DL3 соответствуют  $5 \times 10^9$ ,  $1,7 \times 10^{10}$  и  $5 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, соответственно, вируса, вводимого IV каждому субъекту. SD указывает на стабилизированное заболевание. PR указывает на частичный ответ. Каждый ромб представляет собой одного субъекта, получившего лечение.

[0071] Инфекция VSV может давать адаптивный иммунный ответ хозяина и генерирует нейтрализующие противовирусные антитела (фиг.3). Пиковый уровень IFN $\beta$

(день 2, показанный на фиг.3) коррелирует с титрами анти-VSV антител, указывая на то, что уровень IFN $\beta$  рано (24 ч.) после инфузии терапевтического вируса будет представлять собой хороший индикатор репликации вируса Voyager-V1 и инфекции и восприимчивость опухоли к виротерапии.

[0072] Кинетика IFN $\beta$  (увеличение) и IFN $\alpha$  (уменьшение) указывает на то, что день 2 был бы подходящим моментом времени для измерения IFN $\beta$  в качестве фармакодинамического (PD) маркера инфекции опухолей с помощью Voyager-V1. В частности, на фиг.4A-4F показано сравнение относительных трендов IFN $\beta$  и IFN $\alpha$  у пациентов. На фиг.4A-4C показано, что уровень IFN $\beta$  (темная линия) увеличивается через 24 часа после введения. На фиг.4D-4F показано, что уровень IFN $\alpha$  (темная линия) у тех же пациентов уменьшается через 24 часа после введения. Данные указывают, что уровни трансгена IFN $\beta$  могут служить в качестве PD-маркера вирусной инфекции в опухолях.

[0073] В заключение, Voyager-V1 вводили 51 субъектам IT или IV. Отсутствие выделения вируса наблюдали в буккальных тампонах или моче. Уровни IFN $\beta$  в плазме являются хорошим ранним индикатором репликации вируса и может быть хорошим PD-маркером восприимчивости опухоли к Voyager-V1.

### **Пример 3. Субтерапевтическая доза вируса для IT-введения для диагностического тестирования при противораковой терапии**

[0074] Существует потребность в ранней оценке индивидуального ответа пациента на противораковую терапию и адаптации решений по лечению на основании индивидуального ответа и изменения обстоятельств у каждого пациента. Понимание индивидуального микроокружения опухоли пациента и иммунного ответа на противораковое терапевтическое средство может позволить выбор наиболее эффективной схемы лечения, адаптированной для конкретного индивидуума.

[0075] Кроме того, как показано выше в примере 2, циркулирующие уровни IFN $\beta$  являются хорошими ранними индикаторами репликации вируса и хорошим PD-маркером восприимчивости опухоли к Voyager-V1. Таким образом, важно знать наименьшую дозу Voyager-V1, которая может продуцировать детектируемый сигнал IFN $\beta$  из легко получаемого образца, такого как кровь, сыворотка или плазма.

[0076] Пациентам с различными солидными опухолями вводили различные дозы Voyager-V1 внутрь опухолей. Исследуемые дозы варьировали от  $3 \times 10^6$  до  $3 \times 10^9$  TCID $_{50}$ . Циркулирующие уровни IFN $\beta$  в сыворотке могут быть обнаружены даже у пациентов, получающих субтерапевтические и нетоксичные внутриопухолевые дозы, такие низкие как примерно  $3 \times 10^7$  TCID $_{50}$ . См., например, фиг.5A-5C. Кроме того, начиная с DL4 и далее ( $3 \times 10^8$  TCID $_{50}$ ) наблюдали как повышенную частоту в детектируемых уровнях циркулирующего IFN $\beta$ , так и увеличение уровней циркулирующего IFN $\beta$  с увеличением уровней дозы. См. например, фиг.5B-5E. Таким образом, низкая доза Voyager-V1, которая не токсична и не является терапевтической, может быть использована для определения вероятности того, что раковая ткань у пациента будет реагировать на схему противораковой терапии.

[0077] Кроме того, этот способ может быть использован не только с Voyager-V1, но также с любым онколитическим вирусным зондом, в частности, с вирусным вирусом класса GMP, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую растворимый IFN $\beta$ . В примерах, приведенных выше, уровень циркулирующего IFN $\beta$  может быть хорошим показателем вариабельности и распространения вирусной инфекции у индивидуальных пациентов. В случае Voyager-V1 субтерапевтическая доза зонда может быть такой низкой, как от примерно  $10^6$  TCID $_{50}$  до примерно  $10^8$  TCID $_{50}$ , и ее можно вводить внутрь опухоли (как показано на фиг.5A-5F), или, что более удобно, внутривенно.

#### **Пример 4. Сбор и подготовка образцов**

[0078] Образцы от пациентов могут быть собраны с использованием соответствующего протокола, доступного в данной области техники. Приведенная в качестве примера процедура сбора образцов, используемая при исследовании, представлена в настоящем документе.

[0079] Кровь (1×15мл) собирали в одну 5-мл пробирку с красной маркировкой. Образец собирали со следующими интервалами: 1 день до лечения, дни 2, 3, 4 (для IT+IV пациентов), 8 и 15. Образцы должны быть собраны в день 22 и день 43, если результат в день 15 является положительным.

[0080] Образцы обрабатывали в соответствии со следующим протоколом. Пробирку аккуратно переворачивали 5 раз. Оставляли образец на 30-60 минут. Затем образец центрифугировали в течение 15 минут при 2200-2500 об/мин. Переносили 1-2 мл сыворотки (супернатант) в 2-миллилитровый пластиковый криофлакон. Образцы должны быть перенесены в морозильную камеру с температурой -80°C. Затем образцы хранили и транспортировали в лабораторию, где проводили исследования. При подготовке образцов к транспортировке важно поддерживать образцы в полностью замороженном состоянии. Контейнеры из полистирола с сухим льдом могут быть использованы для временного хранения или манипуляций с образцами вне морозильной камеры на -80°C.

#### **Пример 5. Анализ на IFN $\beta$**

[0081] Уровни IFN $\beta$  в образцах пациента оценивали с помощью стандартного анализа ELISA с использованием набора VeriKine-HS™ Human IFN Beta Serum ELISA Kit (Catalog No 41415-1, PBL Assay, Piscataway Townon, NJ), следуя инструкциям производителя, предоставленным в протоколе A (усовершенствованный протокол для улучшенного анализа при оценке сыворотки).

[0082] Пример протокола представлен далее. В каждую лунку добавляют последовательно следующие реагенты: 50 мкл буфера для образца, 50 мкл разбавленного антитела и 50 мкл исследуемого образца, стандарт IFN $\beta$  или пустой образец. Инкубируют в течение 2 часов при встряхивании 450 об/мин. Супернатант удаляют, и промывают лунки 3 раза. Добавляют 100 мкл разбавленного раствора HRP. Инкубируют 30 минут при встряхивании 450 об/мин. Супернатант удаляют, и промывают лунки 4 раза. Затем добавляют 100 мл ТМВ-субстрата. Инкубируют в течение 60 минут в темноте. Не закрывают плотно, не встряхивают или не промывают. Добавляют 100 мкл стоп-раствора.

Измеряют оптическую плотность в лунках планшета в пределах 5 минут при 450 нм. Все инкубации проводят при комнатной температуре (22-25°C). Общее время анализа составляет около 3 часов 30 минут.

[0083] Стандартную кривую получали в соответствии со следующим протоколом: а) помечали 8 полипропиленовых пробирок (S1-S8). б) Добавляли указанные объемы разбавителя для стандартов или буфера для образцов в помеченные пробирки, следуя инструкциям изготовителя, предоставленным в протоколе А. (с) Добавляли 10 мкл стандарта IFN к 90 мкл разбавителя для стандартов или буфера для образцов с использованием полипропиленовых наконечников для автоматической пипетки. На пипетке устанавливали объем до 80 мкл и тщательно пипетировали вверх и вниз в 10 раз с использованием пипетки на объем 100 мкл или 200 мкл. (d) Добавляли 7,5 мкл предварительно разведенного 1:10 стандарта в S8 и тщательно перемешивали для переноса всего материала, приставшего к внутренней части наконечника пипетки. е) Используя пипетку, установленную на 250 мкл, тщательно перемешивали смесь в S8 пипеткой вверх и вниз 10 раз. Переносили 250 мкл из S8 в S7 и тщательно смешивали пипетированием вверх и вниз 5 раз. Повторяли до завершения серии в S1. ф) Оставляли в стороне до использования на стадии 1 процедуры анализа.

#### **Пример 6. Лечение пациентов с раком, которые, вероятно, отвечают на вирусную терапию**

[0084] После введения первой терапевтической дозы или субтерапевтической дозы Voyager-V1 субъекту, у которого диагностирован рак, уровень циркулирующего IFN $\beta$  может быть обнаружен в образце, полученном от субъекта, с использованием описанных выше способов.

[0085] Субъекты, имеющие уровень IFN $\beta$  в плазме выше приблизительно 1000 пг/мл, имеют опухоли, которые являются высокочувствительными к вирусной терапии. Эти субъекты могут быть идентифицированы как сильные респонденты, и им можно вводить дополнительные терапевтические дозы Voyager-V1 или другого онколитического вируса, например, в течение недели. Субъекты, имеющие уровень IFN $\beta$  в плазме от приблизительно 10 пг/мл до приблизительно 1000 пг/мл, имеют опухоль, инфицированную вирусом иммунологически в измеренный момент времени. Этих субъектов идентифицируют как промежуточных респондентов в этой дозе, и им должны вводить дополнительные терапевтические дозы Voyager-V1 или другого онколитического вируса в комбинации с другими противораковыми терапевтическими агентами. Субъекты, имеющие уровень IFN $\beta$  в плазме ниже, чем приблизительно 10 пг/мл, имеют опухоли, не отвечающие на вирусную терапию. Эти субъекты могут быть идентифицированы как респонденты с низким ответом, и им должны вводиться другие противораковые терапевтические агенты или бустерные лекарственные средства. Другие противораковые терапевтические агенты могут представлять собой, например, иммунотерапию, химиотерапевтические агенты, лучевую терапию, гормональную терапию и т.д. Иммунотерапия может представлять собой ингибиторы иммунной контрольной точки,

такие как ингибиторы PD-L1.

[0086] Уровни циркулирующего IFN $\beta$  могут быть оценены в любое время между 12 часами и 10 днями после введения первой терапевтической дозы или субтерапевтической дозы Voyager-V1. Например, уровни циркулирующего IFN $\beta$  могут быть оценены примерно через 12-24 ч. после введения или примерно через 24-48 ч. после введения.

[0087] Если циркулирующие уровни IFN $\beta$  являются слишком высокими, например, больше или равны 10000 пг/мл, в пределах приблизительно 12-48 ч. после первого введения Voyager-V1, пациенту можно ввести одну или несколько терапевтических доз ингибитора янус-киназ (ингибитора JAK). Ингибитор JAK может, например, представлять собой руксонитиниб или любой используемый обычно ингибитор JAK.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения вероятности того, что раковая ткань у субъекта, имеющего раковую ткань, будет отвечать на введение схемы противораковой терапии, причем способ включает в себя:

(а) внутриопухолевое введение в раковую ткань субтерапевтической диагностической дозы онколитического вируса-зонда, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую растворимый интерферон-бета (IFN $\beta$ ); и

(б) измерение циркулирующего уровня IFN $\beta$  у субъекта после введения онколитического вируса для определения степени ответа раковой ткани: сильной, промежуточной, слабой, или ответ отсутствует.

2. Способ по п.1, где схема противораковой терапии включает в себя онколитический вирус-зонд, который вводят внутрь опухоли на стадии (а).

3. Способ по п.1, где схема противораковой терапии включает в себя другой онколитический вирус-зонд, чем тот, что вводится внутрь опухоли на стадии (а).

4. Способ по п.1, где схема противораковой терапии представляет собой иммуноонколитическую терапию.

5. Способ по п.1, где схема противораковой терапии представляет собой антитело или низкомолекулярное противораковое соединение.

6. Способ по п.1, где вводимый онколитический вирусный зонд является нетоксичным и нетерапевтическим.

7. Способ по п.1, где нетерапевтическая и нетоксичная доза составляет от примерно  $10^5$  TCID<sub>50</sub> до примерно  $3 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>.

8. Способ по п.7, где нетерапевтическая и нетоксичная доза составляет от приблизительно  $10^8$  TCID<sub>50</sub> до примерно  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>.

9. Способ по п.1, где онколитический вирус-зонд представляет собой вирус класса GMP.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, где онколитический вирус-зонд представляет собой вирус везикулярного стоматита (VSV).

11. Способ по п.10, где онколитический вирус-зонд дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую симпорттер йодида натрия (NIS).

12. Способ по п.12, где онколитический вирусный зонд имеет конструкцию N-P-M-IFN $\beta$ -G-NIS-L.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют у субъекта от примерно 12 часов до примерно 45 дней после введения онколитического вируса.

14. Способ по п.13, где циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют в течение от примерно 12 часов до примерно 3 дней после введения онколитического вируса.

15. Способ по п.14, где циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют у субъекта примерно через 48 часов после введения онколитического вируса.

16. Способ по п.14, где циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют у субъекта

примерно через 24 часа после введения онколитического вируса.

17. Способ по любому из предшествующих пунктов, где циркулирующий уровень IFN $\beta$  измеряют с помощью иммунологического анализа.

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, где раковая ткань представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, где раковая ткань представляет собой рак головы и шеи, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак легкого, медуллобластому, атипичную тератоидную/рабидоидную опухоль, лейкоз, лимфому или миелому.

20. Способ лечения рака у субъекта, включающий:

(а) идентификацию вероятности того, что раковая ткань у субъекта, имеющего раковую ткань, будет отвечать на введение схемы противораковой терапии согласно способу по любому из предшествующих пп., и

(б) введение схемы противораковой терапии, если раковая ткань идентифицируется, как дающая сильный или промежуточный ответ.

21. Способ по п.20, где схема противораковой терапии включает введение более чем одной противораковой композиции.

22. Способ по п.20, где раковая ткань представляет собой солидную опухоль, а схема противораковой терапии представляет собой онколитический вирус, который вводят внутрь опухоли в дозировке, которая основана на количестве вирусных частиц на единицу объема опухоли.

23. Способ по п.22, где терапевтическая доза онколитического вируса, подлежащего внутриопухолевому введению, дается в стандартном диапазоне доз.

24. Способ по любому из пп.19-23, где схема противораковой терапии представляет собой онколитический вирус, который вводят внутривенно.

25. Способ лечения субъекта, у которого был диагностирован рак, включающий в себя: введение субъекту первой дозы из схемы онколитической вирусной противораковой терапии, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую интерферон-бета (IFN $\beta$ ), и введение по меньшей мере второй дозы из схемы онколитической вирусной противораковой терапии, если у субъекта идентифицирован сильный или промежуточный ответ на схему онколитической вирусной противораковой терапии.

26. Способ по п.25, где первая доза из схемы онколитической вирусной противораковой терапии вводится внутривенно.

27. Способ по п.25, где первая доза из схемы онколитической вирусной противораковой терапии вводится внутрь опухоли.

28. Способ по любому из пп.25-27, где первая доза из схемы онколитической вирусной противораковой терапии представляет собой нетерапевтическую дозу и нетоксичную дозу из схемы онколитической вирусной противораковой терапии.

29. Способ по любому из пп.25-28, где вторая доза из схемы онколитической вирусной противораковой терапии вводится внутривенно или внутрь опухоли.

30. Способ по любому из пп.25-29, где схема онколитической вирусной противораковой терапии включает нуклеиновую кислоту, кодирующую симпортер йодида натрия (NIS).

31. Способ по любому из пп.25-30, где онколитический вирус представляет собой РНК-вирус.

32. Способ по любому из пп.25-31, где онколитический вирус представляет собой вирус везикулярного стоматита (VSV).

33. Способ по п.32, где VSV имеет конструкцию из N-P-M-IFN $\beta$ -G-NIS-L.

34. Способ по любому из пп.25-33, дополнительно включающий в себя введение субъекту одного или нескольких дополнительных иммуноонкологических терапевтических агентов, если субъект идентифицирован, как имеющий промежуточный ответ на схему онколитической вирусной противораковой терапии.

35. Способ по любому из пп.25-34, дополнительно включающий в себя введение субъекту ингибитора янус-киназ (ингибитора JAK), если субъект идентифицирован, как имеющий сильный ответ на схему онколитической вирусной противораковой терапии.

36. Способ по п.35, где ингибитор JAK представляет собой руксонитиниб.

37. Способ по любому из пп.25-36, где уровень IFN $\beta$  оценивают в интервале примерно от 0,5 до 45 дней после введения первой дозы схемы онколитической вирусной противораковой терапии.

38. Способ по любому из пп.25-37, где уровень IFN $\beta$  оценивают в интервале примерно от 0,5 до 3 дней после введения первой дозы схемы онколитической вирусной противораковой терапии.

39. Способ по любому из пп.25-38, где вторую дозу схемы онколитической вирусной противораковой терапии вводят в течение примерно 1-10 дней после введения первой дозы схемы онколитической вирусной противораковой терапии.

40. Способ по п.39, где циркулирующие уровни IFN $\beta$  оценивают в течение примерно 12-24 часов после введения первой дозы схемы онколитической вирусной противораковой терапии.

41. Способ по любому из пп.25-40, где циркулирующий уровень IFN $\beta$  оценивают с помощью иммунологического анализа.

42. Способ по любому из пп.25-41, где рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

43. Способ по п.42, где солидная опухоль представляет собой рак головы и шеи, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак легкого, медуллобластому или атипичную тератоидную/рабидоидную опухоль.

44. Способ по п.42, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз, лимфому или миелому.

45. Способ по любому из пп.25-43, где второе введение по схеме онколитической вирусной противораковой терапии представляет собой внутриопухолевую инъекцию.

46. Способ по п. 45, где вторую внутриопухолевую инъекцию вводят субъекту на основании количества вирусных частиц на единицу объема опухоли.

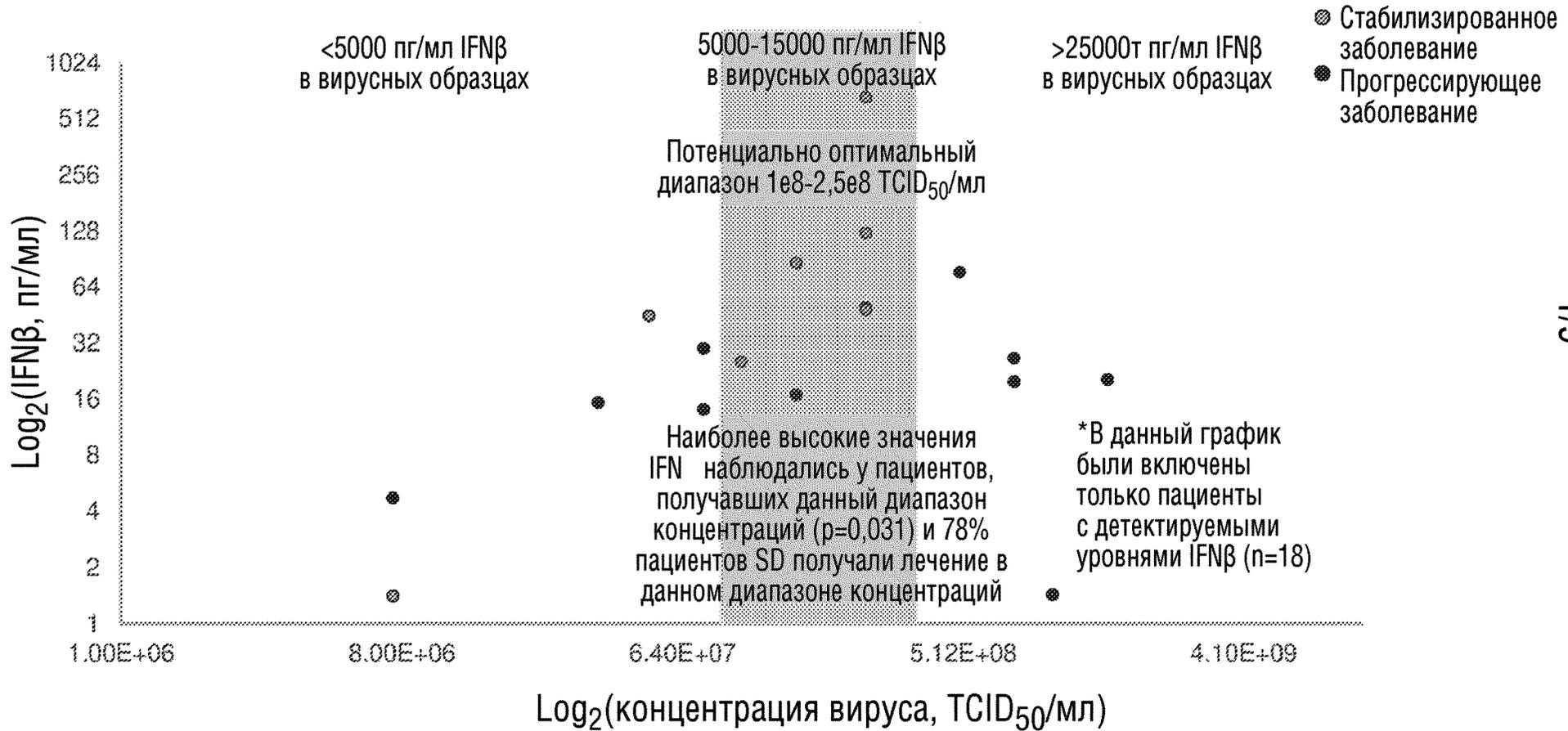
47. Способ по п. 46, где вторую внутриопухолевую инъекцию вводят субъекту в стандартном диапазоне доз.

48. Способ по любому из пп.25-44, где терапевтическая доза онколитического вируса вводится внутривенно.

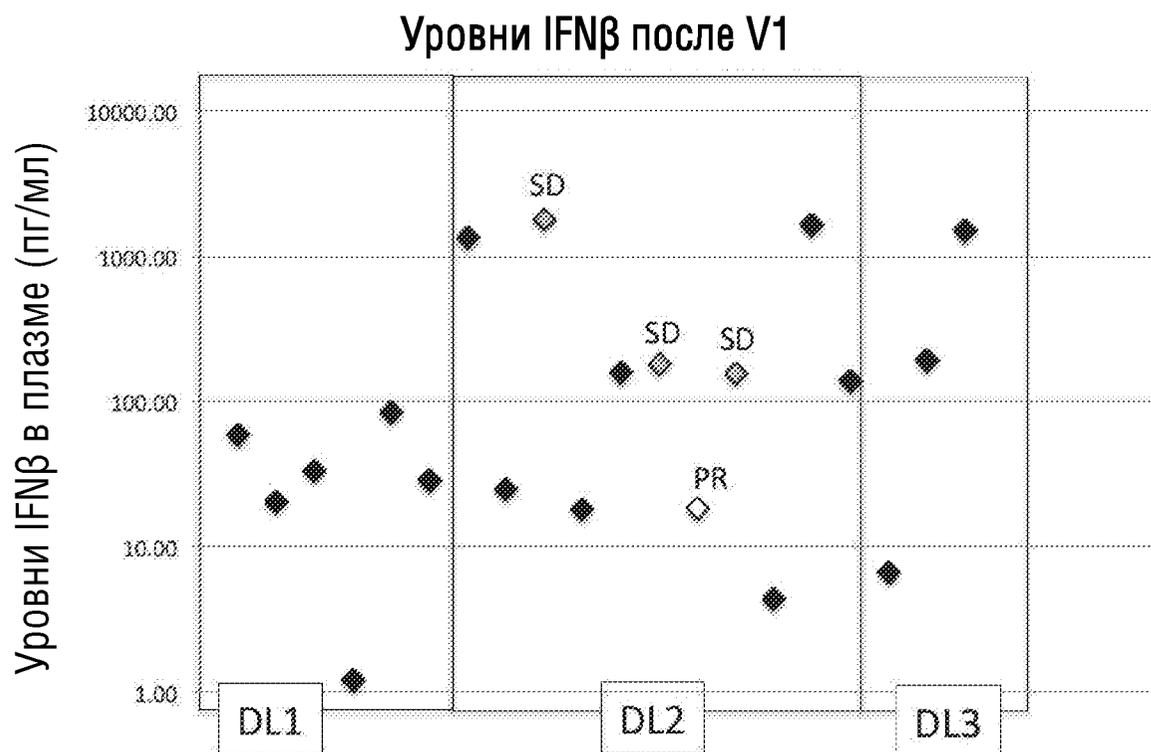
По доверенности

ФИГ.1

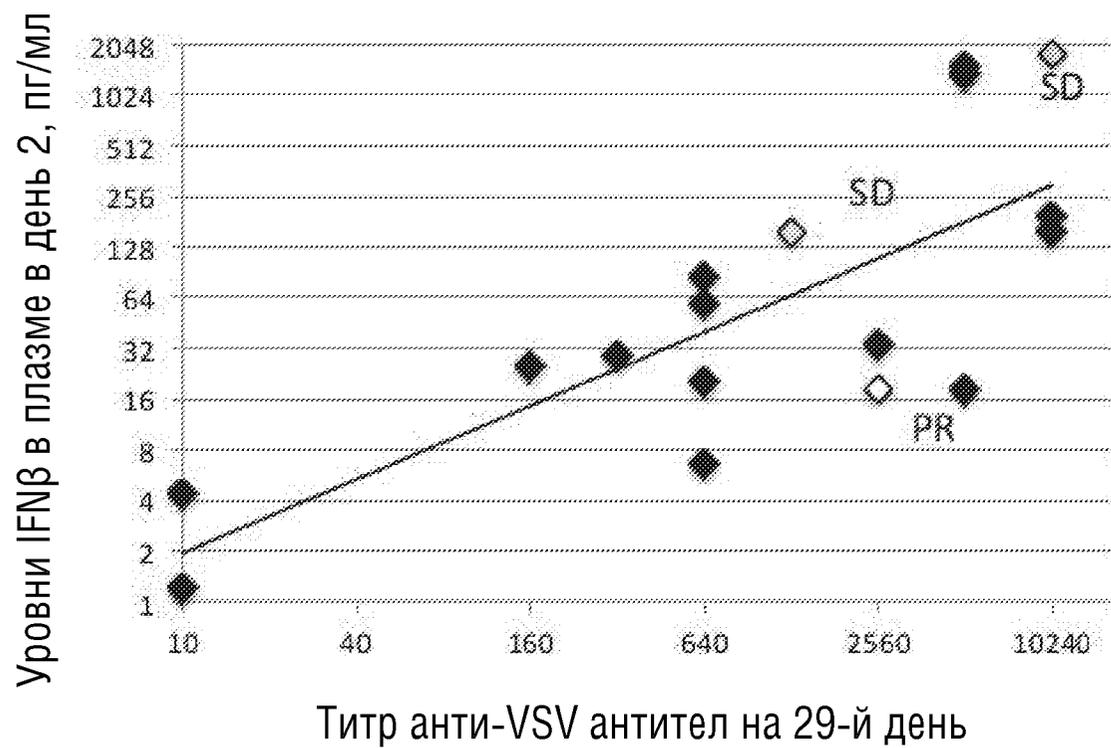
Концентрация вируса относительно уровня IFN $\beta$  в сыворотке



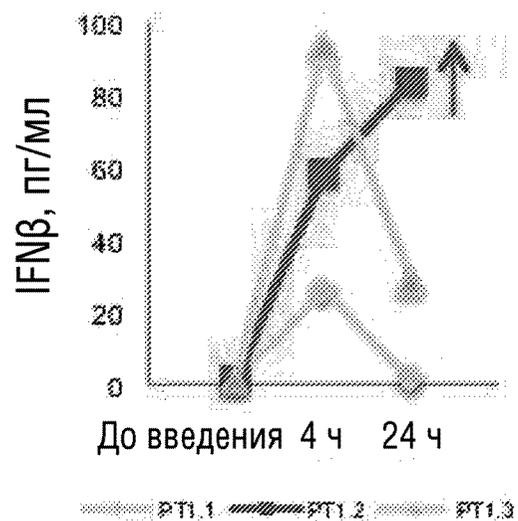
ФИГ.2



ФИГ.3



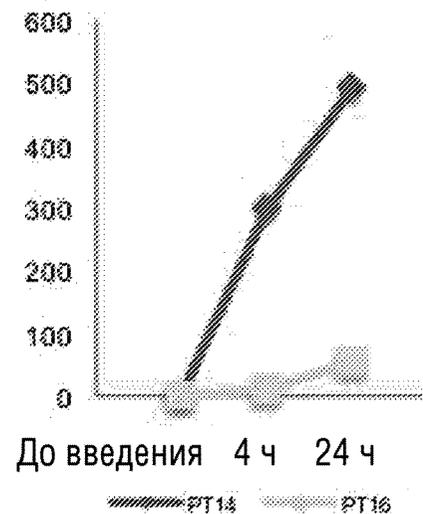
ФИГ.4А



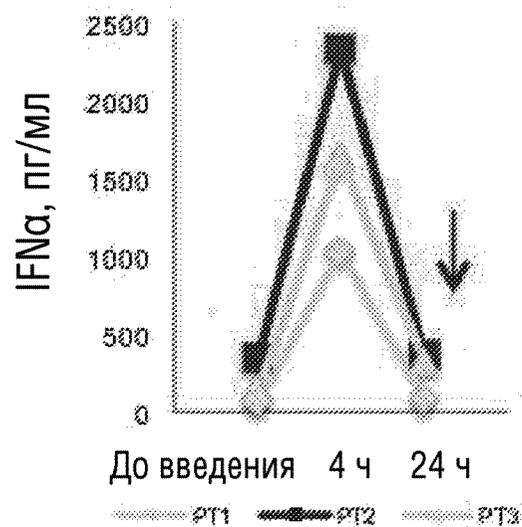
ФИГ.4В



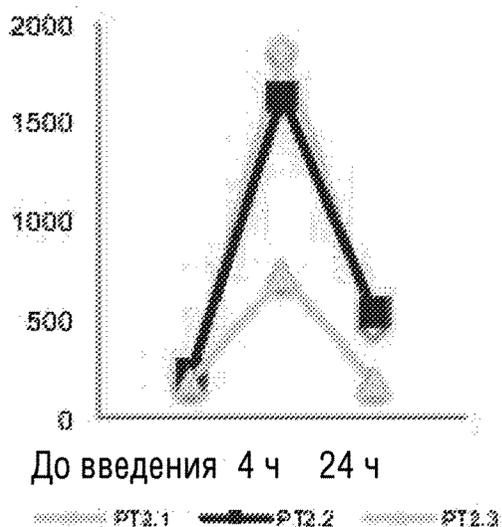
ФИГ.4С



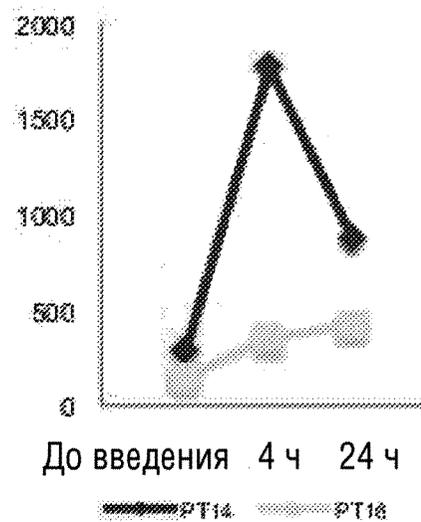
ФИГ.4Д



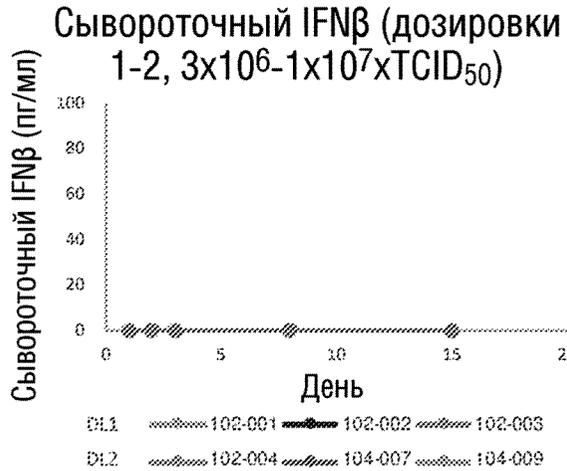
ФИГ.4Е



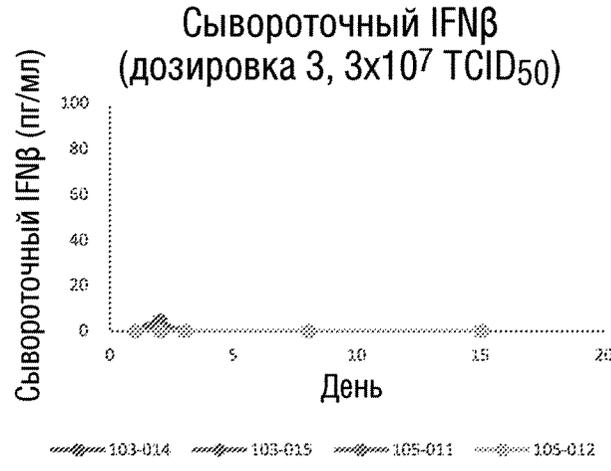
ФИГ.4Ф



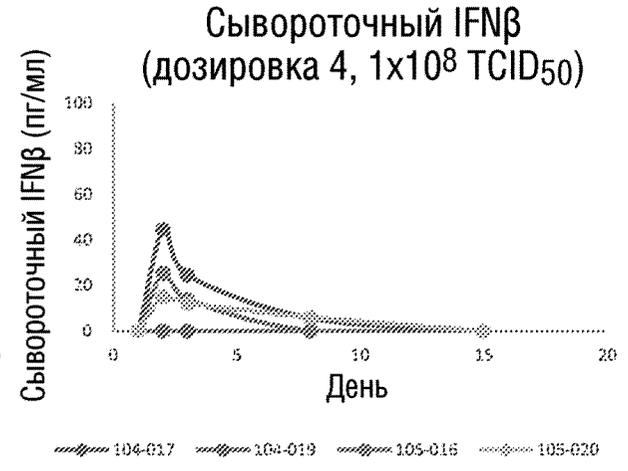
ФИГ.5А



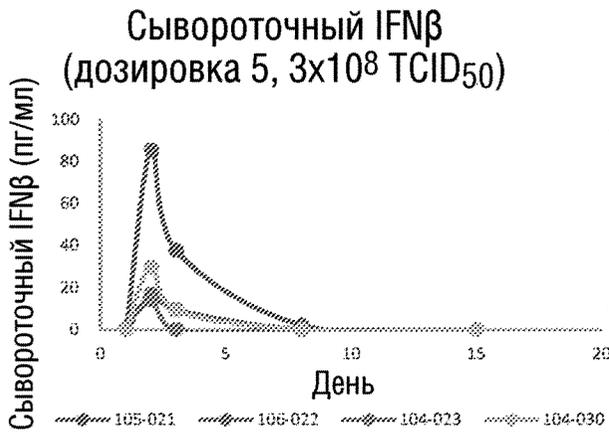
ФИГ.5В



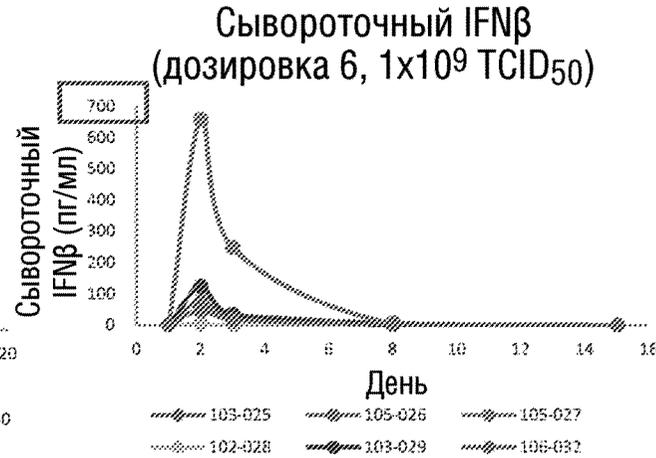
ФИГ.5С



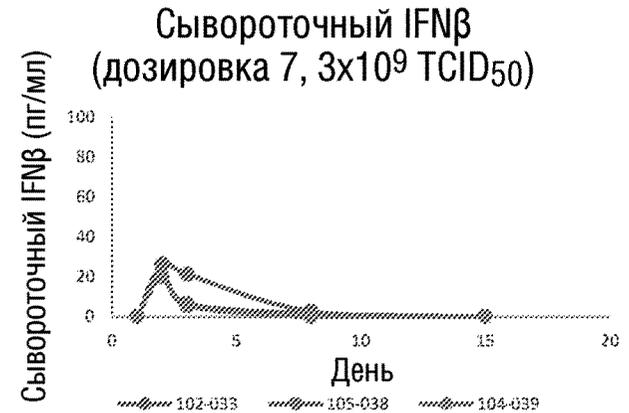
ФИГ.5D



ФИГ.5Е



ФИГ.5F



## ФИГ.6

VSV	IFN $\beta$	NIS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Мощный и гибкий вирусный каркас: быстрая репликация и распространение</li><li>• Опосредует прямое воспалительное уничтожение опухолевых клеток</li><li>• Низкий уровень серопозитивности позволяет внутривенную доставку</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Токсичен для опухолевых клеток и кровеносных сосудов в опухоли</li><li>• Предупреждает повреждение нормальных тканей</li><li>• Усиливает воспалительный и противоопухолевый иммунные ответы</li><li>• Сывороточный биомаркер вирусной инфекции (PK/PD)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Визуализирующий биомаркер инфекции</li><li>• Позволяет радиоизотопное уничтожение инфицированной опухоли (абскопальный эффект)</li></ul>

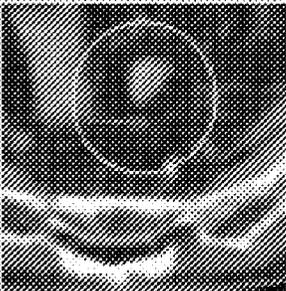
ФИГ.7



ФИГ.8

### Эндометриальный рак

КТ до лечения



КТ через 3 месяца после лечения с VSV



Общее 16,5% уменьшение в диаметре на 29-й день

### T-клеточная лимфома

Местоположение	До лечения	D23
Правый глаз	0.7 x 0.3	0
Левая рука	3 x 2	0
Правая рука	2 x 1	1 x 1
Середина правого бедра	4 x 2.5	3.5 x 1
Всего см <sup>2</sup>	18.21	4.6

75%-е снижение в диаметре опухолей

