(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 043895 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.03

(21) Номер заявки
201990183

(22) Дата подачи заявки
2017.08.29

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(54) АДЕНОВИРУС, ВООРУЖЕННЫЙ БИСПЕЦИФИЧНЫМ АКТИВАТОРОМ Т-КЛЕТОК

(31) **1614607.8; 1700663.6; 1706219.1; 1713765.4**
(32) **2016.08.29; 2017.01.13; 2017.04.19; 2017.08.28**
(33) **GB**
(43) **2019.07.31**
(86) **PCT/EP2017/071674**
(87) **WO 2018/041838 2018.03.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКАМИС БИО ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Чемпион Брайан Роберт, Бромли Элис Клэр Ноэль, Фридман Джошуа Дэвид, Фишер Керри Дэвид, Сеймур Леонард Уильям (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) ALBERTO FAJARDO CARLOS ET AL.: "Bi-specific T-cell engager-armed oncolytic adenoviruses as a strategy to improve antitumor efficacy", HUMAN GENE THE, MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, US, vol. 26, no. 9, 1 September 2015 (2015-09-01), pages A13-A14, XP008180451, ISSN: 1043-0342, the whole document

BRIAN CHAMPION: "Abstract 295: Delivery of checkpoint inhibitor antibodies and other therapeutics directly to tumors by encoding them within the oncolytic adenovirus enadenotucirev | Cancer Research", AACR 106TH ANNUAL MEETING 2015; APRIL 18-22, 2015; PHILADELPHIA, PA, vol. 75 (15:Suppl), 18 April 2015 (2015-04-18), page A295, XP055430850, the whole document

BRIAN R CHAMPION ET AL.: ""Arming" the chimeric oncolytic adenovirus enadenotucirev to deliver checkpoint inhibitors and other therapeutics directly to tumours", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, vol. 2, no. Suppl 3, 1 January 2014 (2014-01-01), page P46, XP055168248, ISSN: 2051-1426, DOI: 10.1186/2051-1426-2-S3-P46, the whole document

WO-A1-2015059303
WO-A1-2015155370
WO-A1-2014138314

RAUM TOBIAS J ET AL.: "Novel primate-crossreactive BiTE antibodies that eliminate cancer cells expressing cMet, IGFR-1, FAP-alpha, PSCA, Endosialin, CAIX or Her2/neu", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESE, vol. 51, 15 April 2010 (2010-04-15), page 590, XP008181797, ISSN: 0197-016X, DOI: 10.1158/1538-7445.AM10-2434 [retrieved on 2010-04-15), the whole document

WO-A1-2016146894

JOSHUA D FREEDMAN ET AL.: "Oncolytic adenovirus expressing bispecific antibody targets T-cell cytotoxicity in cancer biopsies", EMBO MOLECULAR MEDICINE MAR 2011, vol. 9, no. 8, 20 June 2017 (2017-06-20), pages 1067-1087, XP55430764, ISSN: 1757-4684, DOI: 10.15252/emmm.201707567, the whole document

ROCIO GARCIA-CARBONERO ET AL.: "Phase 1 study of intravenous administration of the chimeric adenovirus enadenotucirev in patients undergoing primary tumor resection", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 5, no. 1, 19 September 2017 (2017-09-19), pages 1-13, XP021248903, DOI: 10.1186/S40425-017-0277-7, abstract

(57) Модифицированный аденовирус, в частности enadenotucirev (EnAd), вооруженный биспецифичным активатором Т-клеток, содержащим по меньшей мере два связывающих домена, причем по меньшей мере один из доменов является специфичным к поверхностному антигену на представляющей интерес Т-клетке. Также предложены композиция, например фармацевтический состав, содержащий указанный вирус, применение указанного вируса и составов, содержащих указанный вирус, для лечения, например лечения рака. В настоящем изобретении предложены также способы получения указанного вируса.

043895 B1

043895 B1

В рамках настоящего изобретения предложен модифицированный аденовирус, в частности Enadenotucirev (EnAd), вооруженный биспецифичным активатором Т-клеток, содержащим по меньшей мере два связывающих домена, причем по меньшей мере один из указанных доменов является специфичным к поверхностному антигену на представляющей интерес Т-клетке. В настоящем изобретении также предложена композиция, например, фармацевтический состав, содержащей вирус, применение указанного вируса и содержащих вирус составов, в частности, при лечении, в особенности при лечении рака. Настоящее изобретение также распространяется на способы получения указанного вируса и ДНК, кодирующей указанный вирус.

Уровень техники

Рак по-прежнему является огромным социальным бременем для общества с точки зрения трудностей и страданий пациентов и их близких, а также с точки зрения больших финансовых затрат на лечение, уход и поддержку пациентов.

Для лечения рака было разработано большое разнообразие способов лечения, включая химиотерапевтические средства, лучевую терапию и, в последнее время, биологические препараты, такие как антитела. За последние 15 лет была разработан подход к терапии рака, основанный на антителах, который в настоящее время является одной из наиболее успешных и важных стратегий лечения пациентов с гематологическими злокачественными заболеваниями и солидными опухолями. Примеры противораковых терапевтических препаратов на основе моноклональных антител, в настоящее время применяемых в клинической практике, включают ритуксимаб, который нацелен на CD20, бевацизумаб, который нацелен на VEGF, цетуксимаб, который нацелен на EGFR, и лабетузумаб, который нацелен на CEA.

Среди различных разработанных форматов антител очень многообещающими представляются биспецифичные активаторы Т-клеток. Они представляют собой относительно простые биспецифичные молекулы, которые специфичны к субъединице CD3ε TCR-комплекса Т-клеток, а также являются мишенью для представляющего интерес антигена, такого как раковый антиген. Поскольку биспецифичные активаторы Т-клеток специфичны к комплексу TCR, это позволяет биспецифичному активатору Т-клеток активировать резидентные Т-клетки для уничтожения клеток, экспрессирующих определенный антиген-мишень на их клеточной поверхности, например раковых клеток. Важным свойством биспецифичных активаторов Т-клеток является их способность нацеливать CD4+ и неактивированные CD8+ Т-клетки на раковые клетки. Другими словами, Т-клетки, активированные биспецифичными активаторами Т-клеток, могут быть использованы для уничтожения клеток независимо от экспрессии MHC на поверхности указанных клеток. Это важно, поскольку некоторые опухолевые клетки обеспечивают ингибирование MHC, что делает их устойчивыми к таким агентам, как клетки CAR-T и immTAC.

К сожалению, биспецифичные активаторы Т-клеток имеют плохие кинетические параметры в кровообращении по сравнению с полноразмерными антителами. Это означает, что при введении пациенту большая часть биспецифичных активаторов Т-клеток не достигает своих клеток-мишеней. Кроме того, использование высокоаффинного ScFv против CD3 в качестве части биспецифичных активаторов Т-клеток может привести к сильному связыванию с Т-клетками в крови, что также препятствует доставке к опухоли. В результате, биспецифичные активаторы Т-клеток не могут полностью реализовать свой потенциал в качестве противоракового терапевтического средства, потому что они не могут быть эффективно доставлены к клеткам опухоли.

Необходимость обеспечения эффективной доставки терапевтических агентов, таких как биспецифичные активаторы Т-клеток, к клеткам опухоли становится все более важной, поскольку становится все более очевидным, что солидные опухоли защищают себя in vivo несколькими способами, например, путем образования стромы вокруг опухоли. Прогрессирование до карциномы ассоциировано с пролиферацией эпителиальных клеток (митотических клеток] наряду с развитием активированной стромы опухоли. В этом случае компоненты внеклеточного матрикса (ECM), такие как пучки коллагена, распадаются из-за увеличения метаболизма. Количество воспалительных клеток увеличивается, и фибробласты дифференцируются в миофибробласты, что приводит к экспрессии ими факторов роста, компонентов матрицы и деградирующих протеаз. Ангиогенез сохраняется, что приводит к большому количеству сосудов с повышенной проницаемостью в опухоли. После активации стромы опухоли с персистирующим ангиогенезом начинается инвазия опухолевых клеток через разрушенную базальную мембрану, и кровеносные сосуды инфильтруют ткань опухоли.

Данная строма обеспечивает физическую защиту опухоли в том смысле, что она может выполнять функцию захвата иммунных клеток, направленных на борьбу с опухолью. Кроме того, строма экранирует гипоксическое микроокружение опухоли, которое обеспечивает пермиссивные и оптимизированные условия для роста опухоли. Существуют некоторые теории, о том, что клетки в строме представляют собой источник энергии для опухоли.

Значительным компонентом стромы опухоли являются фибробласты, функция которых была изменена опухолью в своих целях. Другими клетками, инфильтрующими строму, являются ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM), которые представляют собой макрофаги второго типа (M2), которые могут стимулировать рост опухоли, секретируя цитокины и хемокины, такие как IL-10, которые подавляют иммунные ответы.

Нацеливание на строму опухоли является особенно трудным, потому что клетки, которые создают ее окружающую среду, являются "нативными" иммунными клетками или клетками соединительной ткани, встречающимися по всему организму. Таким образом, нацеливание на эти клетки терапевтических агентов может привести к серьезным побочным эффектам.

Исходя из этого, существует потребность в улучшенном способе доставки биспецифичных активаторов Т-клеток непосредственно к клеткам опухоли, где они могут обеспечить максимальный терапевтический эффект, в частности доставку к опухолевым клеткам, окруженным стромальными фибробластами.

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения полагают, что одним из наиболее эффективных способов доставки терапевтических агентов непосредственно в опухоль является использование онколитического аденовируса, сконструированного генно-инженерными способами для экспрессии агентов, которые, например, активируют Т-клетки и нацелены на антиген, например, на антиген стромы.

Соответственно, в настоящем изобретении предложен аденовирус, содержащий последовательность формулы (I):

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_A\text{-}B_2\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad (I)$$

где B_1 представляет собой связь или содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

B_A содержит -E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или содержит E3;

B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или и то, и другое;

B_B содержит L5;

B_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или и то, и другое;

B_3 представляет собой связь или содержит E4;

причем указанный аденовирус кодирует биспецифичный активатор Т-клеток, содержащий по меньшей мере два связывающих домена, и при этом по меньшей мере один из указанных доменов является специфичным к поверхностному антигену на представляющей интерес иммунной клетке, например, представляющей интерес Т-клетке; и

при этом указанный аденовирус представляет собой EnAd или Ad11.

Биспецифичные активаторы Т-клеток согласно настоящему изобретению не содержат трансмембранного домена и, следовательно, не экспрессируются на поверхности раковых клеток, а содержат сигнальную последовательность, способствующую высвобождению молекулы биспецифичного активатора Т-клеток из раковой клетки.

Следующие параграфы представляют собой краткое изложение настоящего изобретения.

1. Аденовирус, содержащий последовательность формулы (I):

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_a\text{-}B_2\text{-}B_x\text{-}B_b\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad (I)$$

где B_1 представляет собой связь или содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

B_A содержит -E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или содержит E3;

B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или и то, и другое;

B_B содержит L5;

B_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или и то, и другое;

B_3 представляет собой связь или содержит E4;

причем указанный аденовирус кодирует биспецифичный активатор Т-клеток, содержащий по меньшей мере два связывающих домена, и при этом по меньшей мере один из указанных доменов является специфичным к поверхностному антигену на представляющей интерес иммунной клетке, такой как представляющая интерес Т-клетка; и при этом указанный аденовирус представляет собой EnAd или Ad11.

2. Аденовирус по параграфу 1, отличающийся тем, что указанный аденовирус представляет собой EnAd.

3. Аденовирус по параграфу 1 или 2, отличающийся тем, что поверхностный антиген представляет собой компонент комплекса Т-клеточного рецептора (TCR), такой как CD3, TCR-α и TCR-β.

4. Аденовирус по параграфу 3, отличающийся тем, что поверхностный антиген представляет собой CD3, такой как CD3ε, CD3γ и CD3δ, в частности CD3ε.

5. Аденовирус по любому из параграфов 1-4, отличающийся тем, что один из связывающих доменов является специфичным к опухолевому антигену, такому как CEA, MUC-1, EpCAM, HER рецепторы HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, углеводные антигены Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-кадгерин, SPARC, ErbB2 и ErbB3.

6. Аденовирус по параграфу 5, отличающийся тем, что один из связывающих доменов является

специфичным к EpCAM, например EpCAM, содержащему аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28.

7. Аденовирус по любому из параграфов 1-4, отличающийся тем, что один из связывающих доменов является специфичным к антигену, который присутствует в строме опухоли, например, белку активации фибробластов (FAP], TREM1, IGFBP7, FSP-1, рецептора тромбоцитарного фактора роста-α (PDGFR-α), рецептору тромбоцитарного фактора роста-β (PDGFR-β) и виментину.

8. Аденовирус по параграфу 7, отличающийся тем, что один из связывающих доменов является специфичным к FAP, например FAP, содержащему аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 30.

9. Аденовирус по параграфу 7 или 8, отличающийся тем, что антиген, который присутствует в строме, представляет собой антиген, выбранный из антигена миелоидных клеток-супрессоров, ассоциированного с опухолью макрофага и их комбинаций.

10. Аденовирус по параграфу 9, отличающийся тем, что антиген выбран из CD163, CD206, CD68, CD11c, CD11b, CD14, рецептора CSF1, CD15, CD33, CD66b и комбинации двух или более из них.

11. Аденовирус по любому из параграфов 1-3 и 5-10, отличающийся тем, что один из связывающих доменов в биспецифичном активаторе Т-клеток специфичен к не-являющемуся TCR активирующему белку, такому как CD31, CD2 и CD277.

12. Аденовирус по любому из параграфов 1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из B_X или B_Y не является связью.

13. Аденовирус по любому из параграфов 1-12, отличающийся тем, что указанный аденовирус является химерным.

14. Аденовирус по любому из параграфов 1-13, отличающийся тем, что указанный аденовирус является онколитическим.

15. Аденовирус по любому из параграфов 1-14, отличающийся тем, что указанный аденовирус способен к репликации.

16. Аденовирус по параграфу 13, отличающийся тем, что указанный аденовирус является компетентным по репликации.

17. Аденовирус по любому из параграфов 1-14, отличающийся тем, что указанный аденовирус является дефектным по репликации.

18. Аденовирус по любому из параграфов 1-17, отличающийся тем, что B_X содержит один или более трансгенов или трансгенную кассету.

19. Аденовирус по любому из параграфов 1-16, отличающийся тем, что B_Y содержит один или более трансгенов или трансгенную кассету.

20. Аденовирус по любому из параграфов 1-19, отличающийся тем, что один или более трансгенов или трансгенных кассет находятся под контролем эндогенного или экзогенного промотора, такого как эндогенный промотор.

21. Аденовирус по параграфу 20, отличающийся тем, что трансген или трансгенная кассета находится под контролем эндогенного промотора, выбранного из группы, состоящей из промотора E4 и главного позднего промотора, в частности - главного позднего промотора.

22. Аденовирус по параграфу 19, отличающийся тем, что трансген или трансгенная кассета находится под контролем экзогенного промотора, такого как CMV.

23. Аденовирус по любому из параграфов 1-22, отличающийся тем, что трансгенная кассета дополнительно содержит регуляторный элемент, независимо выбранный из:

a. последовательности акцептора сплайсинга,

b. последовательности внутреннего участка посадки рибосомы или пептида с высокой эффективностью саморасщепления A,

c. последовательности Козака и d их комбинации.

24. Аденовирус по параграфу 23, отличающийся тем, что трансгенная кассета содержит последовательность Козака, которая находится в начале кодирующей белок последовательности.

25. Аденовирус по любому из параграфов 1-24, отличающийся тем, что трансгенная кассета кодирует пептид A с высокой эффективностью саморасщепления.

26. Аденовирус по любому из параграфов 1-25, отличающийся тем, что трансгенная кассета дополнительно содержит последовательность полиаденилирования.

27. Аденовирус по любому из параграфов 1-26, отличающийся тем, что трансгенная кассета дополнительно содержит сайт рестрикции на 3'-конце последовательности ДНК и/или на 5'-конце последовательности ДНК.

28. Аденовирус по любому из параграфов 1-27, отличающийся тем, что по меньшей мере одна трансгенная кассета кодирует моноцистронную мРНК.

29. Аденовирус по любому из параграфов 1-28, отличающийся тем, что биспецифичный активатор Т-клеток имеет короткое время полужизни, например 48 ч или менее.

30. Аденовирус по любому из параграфов 1-29, отличающийся тем, что биспецифичный активатор

Т-клеток кодируется в области, выбранной из E1, E3, B_X, B_Y и их комбинаций.

31. Аденовирус по параграфу 30, отличающийся тем, что биспецифичный активатор Т-клеток кодируется, по меньшей мере, в положении B_X, например, под контролем главного позднего промотора.

32. Аденовирус по любому из параграфов 1-29, отличающийся тем, что аденовирус дополнительно кодирует второй биспецифичный активатор Т-клеток.

33. Аденовирус по параграфу 32, отличающийся тем, что первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток является специфичной к антигену, например опухолевому антигену (например, указанному в настоящем изобретении), а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток является специфичной к антигену, который присутствует в строме опухоли, например антигену, который присутствует в строме (например, указанному в настоящем изобретении).

34. Аденовирус по любому из параграфов 1-33, отличающийся тем, что указанный аденовирус дополнительно содержит цитокин или хемокин или иммуномодулятор (такой как цитокин или хемокин].

35. Аденовирус по параграфу 34, отличающийся тем, что цитокин или хемокин выбран из MIP1α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFNα, IFNβ, IFNγ, TNFα, лимфотоксина α (LTA), Flt3L, GM-CSF, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, (например, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFNα, IFNβ, IFNγ, TNFα, лимфотоксина α (LTA), GM-CSF, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21), например, IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFNγ, TNFα, лимфотоксина α (LTA), CCL3, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CCL2, CCL19 и CCL21.

36. Аденовирус по любому из параграфов 1-35, отличающийся тем, что указанный аденовирус дополнительно содержит иммуномодулятор, такой как антитело или фрагмент антитела, или белок или пептидный лиганд, специфичный к белку контрольной точки, такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT или CD160, например CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2, или к костимулирующей молекуле, такой как CD28, CD80, CD86, CD83, ICOS, B7H2, TL1A и 4-1BB.

37. Аденовирус по любому из параграфов 1-36, отличающийся тем, что биспецифичный активатор Т-клеток содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 8, 13 или 18, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей.

38. Аденовирус по любому из параграфов 1-37, отличающийся тем, что биспецифичный активатор Т-клеток содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 9, 12 или 17, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей.

39. Аденовирус по любому из параграфов 1-36, отличающийся тем, что биспецифичный активатор Т-клеток содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 7, 11 или 16, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей.

40. Аденовирус по любому из параграфов 1-39, отличающийся тем, что биспецифичный активатор Т-клеток содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2 или 4, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентичную ей, например, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73 или 75.

41. Аденовирус по любому из параграфов 1-40, отличающийся тем, что аденовирус содержит последовательность ДНК, указанную в любой из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность ДНК, по меньшей мере на 95% идентичную ей, например последовательность ДНК, представленную в любой из SEQ ID NO: 79-82.

42. Композиция, содержащая аденовирус по любому из параграфов 1-41 и разбавитель или носитель.

43. Способ лечения пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества аденовируса по любому из параграфов 1-41 или композиции по параграфу 42.

44. Способ по параграфу 43, для лечения рака, в частности солидной опухоли.

В одном варианте реализации аденовирус согласно настоящему изобретению кодирует по меньшей мере один дополнительный трансген, например 1, 2, 3 или 4 дополнительных трансгена.

В одном варианте реализации между каждым из генов кодируется другой пептид расщепления.

В одном варианте реализации все трансгены в вирусе находятся в одном положении, например, находятся в положении B_Y.

Авторы настоящего изобретения обнаружили преимущество, заключающееся в том, что вооружение аденовируса молекулой биспецифичного активатора Т-клеток позволяет этой молекуле фрагмента би-специфичного антитела воспользоваться в своих целях способностью аденовируса избирательно инфицировать раковые клетки, тем самым обеспечивая целевую доставку биспецифичного активатора Т-

клеток к опухолевым клеткам.

Другим преимуществом является то, что биспецифичные активаторы Т-клеток являются небольшими и могут быть получены в клетках млекопитающих. Следовательно, после заражения аденовирусами по настоящему изобретению молекулы биспецифичного активатора Т-клеток синтезируются опухолевыми клетками, секретируются и могут действовать локально, распространяясь за пределы непосредственной сферы присутствия вируса. Таким образом, это позволяет биспецифичному активатору Т-клеток распространяться за пределы непосредственного участка инфекции, но в то же время ограничивает распространение вируса слишком далеко за пределами группы инфицированных опухолевых клеток. Это сводит к минимуму риск нежелательных побочных эффектов.

В одном варианте реализации аденовирус представляет собой EnAd. Было показано, что EnAd обладает повышенной онколитической активностью по сравнению с аденовирусами предшествующего уровня техники. Также было показано, что EnAd обладает высокой селективностью в отношении клеток карциномы, полученных из эпителия человека, таких как клетки рака толстой кишки, легких, мочевого пузыря и почек. Это делает его идеальным средством доставки молекул биспецифичного активатора Т-клеток, потому что молекула биспецифичного активатора Т-клеток может активировать Т-клетки для атаки на клетки-мишени, в то время как EnAd одновременно заражает и лизирует раковые клетки. Это приводит к двусторонней атаке на опухоль, обеспечивающей синергетический онколитический эффект.

В одном варианте реализации поверхностный антиген представляет собой компонент комплекса Т-клеточного рецептора (TCR), такой как CD3, TCR-α и TCR-β.

В одном варианте реализации поверхностный антиген представляет собой CD3, такой как CD3ε, CD3γ и CD3δ, в особенности CD3ε.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным к опухолевому антигену, такому как CEA, MUC-1, EpCAM, рецептор HER (такой как HER1, HER2, HER3, HER4), PEM, A33, G250, углеводные антигены Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-кадгерин, SPARC, ErbB2 и ErbB3, в особенности EpCAM.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным к EpCAM, например, EpCAM, содержащему аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 28, или последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную ей.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным к антигену, который присутствует в строме опухоли, например, белку активации фибробластов (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, рецептору тромбоцитарного фактора роста-α (PDGFR-α), рецептору тромбоцитарного фактора роста-β (PDGFR-β) и виментину. Преимущество заключается в том, что стромальные клетки (нетрансформированные клетки], экспрессирующие эти антигены, не подвергаются такому же уровню процесса отбора по мутационной устойчивости, как трансформированные клетки. Таким образом, эти клетки легче нацелить на лечение рака, поскольку они не являются "движущейся мишенью". Кроме того, типы рецепторов, обнаруживаемых в стромальных клетках, часто встречаются у разных типов рака. Следовательно, нацеливание на один из вышеуказанных антигенов, вероятно, будет эффективным при множественных типах рака.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным к FAP, например FAP, содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, или последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную ей. Преимущество заключается в том, что FAP активирован на ассоциированных с опухолью фибробластах. Фибробласты являются жизненно важным компонентом твердых карцином, поддерживая их рост, инвазию и восстановление после вмешательств. Они обычно составляют 40-60% клеток в карциномах на поздней стадии. Преимущество заключается в том, что фибробласты являются генетически стабильными клетками, которым с меньшей вероятностью удается избегать терапии, чем раковым клеткам. Активированные фибробласты также относительно схожи между различными типами опухолей. Таким образом, активируя Т-клетки для нацеливания и уничтожения FAP-экспрессирующих опухоль-ассоциированных фибробластов, аденовирусы по настоящему изобретению способны помочь уменьшить спектр иммуносупрессорных путей, таких как пути, опосредованные IL-10, TGFβ и IDO.

Другие мишени стромы включают опухоль-ассоциированные макрофаги и антиген миелоидных клеток-супрессоров, например CD163, CD206, CD68, CD11c, CD11b, CD14, рецептор CSF1, CD15, CD33, CD66b и комбинации двух или более из них.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов в биспецифичном активаторе Т-клеток является специфичным к не являющемуся TCR активирующему белку, например CD31, CD2 и CD277.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным к поверхностному антигену на представляющей интерес Т-клетке, например выбранному из CD3 (такому как CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма), цепи TCR-α и цепи TCR-β, и один связывающий домен специфичен к опухолевому антигену.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным к CD3, а дру-

гой связывающий домен является специфичным к опухолевому антигену, например, его выбирают из группы, состоящей из: CEA, MUC-1, EpCAM, HER-рецепторов HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, углеводных антигенов Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-кадгерина, SPARC, ErbB2 и ErbB3.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов специфичен для CD3 (например, CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма), а другой связывающий домен специфичен для EpCAM.

В одном варианте реализации один из доменов связывания специфичен для CD3ε, а другой связывающий домен специфичен для EpCAM.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным к поверхностному антигену на представляющей интерес Т-клетке, например выбранному из CD3 (например CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма), TCR-α и TCR-β, и другой связывающий домен специфичен к антигену, который присутствует в строме опухоли.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным к CD3 (например, CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма), а другой связывающий домен является специфичным к антигену, который присутствует в строме опухоли, например, выбранного из группы, состоящей из: белка активации фибробластов (FAP], TREM1, IGFBP7, FSP-1, рецептора тромбоцитарного фактора роста α (PDGFR-α), рецептора тромбоцитарного фактора роста β (PDGFR-β) и виментина.

В одном варианте реализации один из доменов связывания специфичен для CD3 (например CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма), а другой домен связывания специфичен для FAP.

В одном варианте реализации один из доменов связывания специфичен для CD3ε, а другой домен связывания специфичен для FAP.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным для поверхностного антигена на представляющей интерес Т-клетке, такого как CD3, TCR-α и TCR-β, а другой связывающий домен является специфичным для не являющегося TCR активирующего белка.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов специфичен для CD3 (например, CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма), а другой связывающий домен специфичен для не являющегося TCR активирующего белка, выбранного из группы, состоящей из CD31, CD2 и CD277.

В одном варианте реализации один из связывающих доменов является специфичным к CD3ε, а другой связывающий домен является специфичным к не являющемуся TCR активирующему белку, выбранному из группы, состоящей из CD31, CD2 и CD277.

В одном варианте реализации по меньшей мере одно из B_X или B_Y не является связью.

В одном варианте реализации B_X не является связью.

В одном варианте реализации B_Y не является связью.

В одном варианте реализации и B_X, и B_Y не являются связями.

В одном варианте реализации аденовирус является химерным.

В одном варианте реализации аденовирус является онколитическим.

В одном варианте реализации аденовирус является химерным и онколитическим.

В одном варианте реализации аденовирус является способным к репликации.

В одном варианте реализации аденовирус является химерным, онколитическим и способным к репликации.

В одном варианте реализации аденовирус является компетентным по репликации.

В одном варианте реализации аденовирус является химерным, онколитическим и компетентным по репликации.

В одном варианте реализации аденовирус является дефектным по репликации, то есть является вектором.

В одном варианте реализации B_X содержит трансген или трансгенную кассету, в частности трансгенную кассету, кодирующую биспецифичный активатор Т-клеток, согласно настоящему изобретению.

В одном варианте реализации B_Y содержит трансген или трансгенную кассету, в частности трансгенную кассету, кодирующую биспецифичный активатор Т-клеток, согласно настоящему изобретению.

В одном варианте реализации B_Y содержит трансген или трансгенную кассету, в частности трансгенную кассету, кодирующую биспецифичный активатор Т-клеток, согласно настоящему изобретению, а B_X представляет собой связь.

В одном варианте реализации и B_X, и B_Y содержат трансген или трансгенную кассету.

В одном варианте реализации один или более трансгенов или трансгенных кассет находятся под контролем эндогенного или экзогенного промотора, такого как эндогенный промотор. Преимущество заключается в том, что, находясь под контролем этих промоторов вирус остается компетентным по репликации и также способен экспрессировать биспецифичный активатор Т-клеток и/или другой белок. Таким образом, выбранный биспецифичный активатор Т-клеток будет экспрессироваться раковой клеткой. Использование экзогенного промотора может быть выгодным в некоторых вариантах реализации, поскольку это способствует сильной и конститутивной экспрессии антитела или фрагмента, что может быть особенно полезно в некоторых ситуациях, например, когда у пациента в рак, обладающий высокой

способностью к распространению. Использование эндогенного промотора может быть выгодным, потому что он уменьшает размер трансгенной кассеты, которая должна быть включена для экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток, то есть кассета может быть меньше, потому что не требуется включения экзогенного промотора.

Соответственно, в одном варианте реализации трансген или трансгенная кассета находится под контролем эндогенного промотора, выбранного из группы, состоящей из E4 и главного позднего промотора, в частности - главного позднего промотора. Использование эндогенного промотора в вирусе также может быть выгодным в терапевтическом контексте, поскольку трансген экспрессируется, только когда вирус реплицируется в раковой клетке, в отличие от конститутивного экзогенного промотора, который будет непрерывно транскрибировать трансген и может привести к неуместной концентрации антитела или фрагмента.

В одном варианте реализации трансген или трансгенная кассета (например, кодирующая биспецифичный активатор Т-клеток) находится под контролем экзогенного промотора, такого как CMV. Преимущество заключается в том, что использование конститутивного экзогенного промотора приводит к непрерывной транскрипции трансгена, что может быть желательно в некоторых случаях.

В одном варианте реализации один трансген или трансгенная кассета (например, кодирующие биспецифичный активатор Т-клеток) находится под контролем эндогенного промотора, а другой трансген или трансгенная кассета (например, кодирующие биспецифичный активатор Т-клеток) находится под контролем экзогенного промотора.

В одном варианте реализации все трансгены или трансгенные кассеты (например, кодирующие биспецифичный активатор Т-клеток) в вирусе находится/находятся под контролем эндогенного промотора.

В другом варианте реализации все трансгены или трансгенные кассеты (например, кодирующие биспецифичный активатор Т-клеток) в вирусе находится/находятся под контролем экзогенного промотора.

В одном варианте реализации трансген или трансгенная кассета дополнительно содержит регуляторный элемент, независимо выбранный из:

i) последовательности акцептора сплайсинга,

ii) последовательности внутреннего участка посадки рибосомы или пептида с высокой эффективностью саморасщепления A,

iii) последовательности Козака и

iv) их комбинации.

Таким образом, в одном варианте реализации трансгенная кассета содержит i) или ii) или iii) или iv).

В одном варианте реализации трансгенная кассета содержит i) и ii), или i) и iii), или i) и iv), или ii) и iii), или ii) и iv), или iii) и iv).

В одном варианте реализации трансгенная кассета содержит i) и ii) и iii), или i) и ii) и iv), или i) и iii) и iv), или ii) и iii) и iv).

В одном варианте реализации трансгенная кассета содержит i) и ii) и iii) и iv).

В одном варианте реализации трансгенная кассета содержит последовательность Козака в начале кодирующей последовательности белка (например, биспецифичный активатор Т-клеток), которая способствует трансляции мРНК.

В одном варианте реализации трансгенная кассета кодирует пептид с высокой эффективностью саморасщепления 2A.

В одном варианте реализации трансгенная кассета дополнительно содержит последовательность полиаденилирования.

В одном варианте реализации трансгенная кассета дополнительно содержит сайт рестрикции на 3'-конце последовательности ДНК и/или на 5'-конце последовательности ДНК.

В одном варианте реализации по меньшей мере одна трансгенная кассета кодирует моноцистронную мРНК.

В одном варианте реализации молекула биспецифичного активатора Т-клеток имеет короткий период полувыведения, например, 48 ч или менее.

В одном варианте реализации молекула биспецифичного активатора Т-клеток кодируется в области, выбранной из E1, E3, B_X, B_Y и их комбинации. Авторы настоящего изобретения установили преимущество, заключающееся в том, что, что различные трансгены могут быть встроены в B_X и/или B_Y под контролем экзогенного или эндогенного промотора, без негативного влияния на жизненный цикл вируса или стабильность вектора.

В одном варианте реализации молекула биспецифичного активатора Т-клеток кодируется, по меньшей мере, в положении B_X, например, под контролем главного позднего промотора. Преимущество заключается в том, что трансген или трансгенная кассета позволяет экспрессировать биспецифичный активатор Т-клеток или любую дополнительную молекулу вместе с самим аденовирусом. Важно отметить, что авторы настоящего изобретения успешно продемонстрировали, что экспрессия биспецифичного активатора Т-клеток не оказывает значительного влияния на способность EnAd реплицироваться и не

оказывает негативного влияния на его онколитическую активность.

В одном варианте реализации молекула биспецифичного активатора Т-клеток кодируется, по меньшей мере, в положении B_Y, например, под контролем главного позднего промотора. Преимущество состоит в том, что трансген или трансгенная кассета позволяет экспрессировать биспецифичный активатор Т-клеток или любую дополнительную молекулу вместе с самим аденовирусом. Важно отметить, что авторы настоящего изобретения успешно продемонстрировали, что экспрессия биспецифичного активатора Т-клеток не оказывает значительного влияния на способность EnAd реплицироваться и не оказывает негативного влияния на его онколитическую активность.

В одном варианте реализации аденовирус дополнительно кодирует второй биспецифичный активатор Т-клеток.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток является специфичной к опухолевому антигену, например опухолевому антигену, как описано выше, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток является специфичной к антигену, который присутствует в строме опухоли, например антигену, который присутствует в строме, как описано выше.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток является специфичной к опухолевому антигену, выбранному из группы, состоящей из: CEA, MUC-1, EpCAM, HER рецепторов HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, углеводных антигенов Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-кадгерина, SPARC, ErbB2 и ErbB3, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к антигену, который присутствует в строме опухоли, выбранному из группы, состоящей из: белка активации фибробластов (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, рецептора тромбоцитарного фактора роста-α (PDGFR-α), рецептора тромбоцитарного фактора роста β (PDGFR-β) и виментина.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к EpCAM, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к антигену, который присутствует в строме опухоли, выбранному из группы, состоящей из: белка активации фибробластов (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, рецептора тромбоцитарного фактора роста-α (PDGFR-α), рецептора тромбоцитарного фактора роста β (PDGFR-β) и виментина.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток является специфичной к опухолевому антигену, выбранному из группы, состоящей из: CEA, MUC-1, EpCAM, HER рецепторов HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, углеводных антигенов Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-кадгерина, SPARC, ErbB2 и ErbB3, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к FAP.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к EpCAM, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к FAP.

В другом варианте первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к опухолевому антигену, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к не являющемуся TCR активирующему белку.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток является специфичной к опухолевому антигену, выбранному из группы, состоящей из: CEA, MUC-1, EpCAM, HER рецепторов HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, углеводных антигенов Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-кадгерина, SPARC, ErbB2 и ErbB3.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к EpCAM, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к не являющемуся TCR активирующему белку, выбранному из группы, состоящей из: CD31, CD2 и CD277.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к антигену, который присутствует в строме опухоли, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к не являющемуся TCR активирующему белку.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток является специфичной к антигену, который присутствует в строме опухоли, выбранному из группы, состоящей из: белка активации фибробластов (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, рецептора тромбоцитарного фактора роста-α (PDGFR-α), рецептора тромбоцитарного фактора роста-β (PDGFR-β) и виментина, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфичны к не являющемуся TCR активирующему белку, выбранному из группы, состоящей из: CD31, CD2 и CD277.

В одном варианте реализации первая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к FAP, а вторая молекула биспецифичного активатора Т-клеток специфична к не являющемуся TCR активирующему белку, выбранному из группы, состоящей из: CD31, CD2 и CD277.

В одном варианте реализации аденовируса содержит только один биспецифичный активатор Т-клеток.

В другом варианте реализации аденовируса содержит два биспецифичных активатора Т-клеток.

В другом варианте реализации аденовирус содержит три биспецифичных активатора Т-клеток.

В дополнение к кодированию одного, двух или трех биспецифичных активаторов Т-клеток вирус

может также кодировать 1, 2, 3 или 4 дополнительных трансгена.

В одном варианте реализации аденовирус дополнительно кодирует цитокин или хемокин.

В одном варианте реализации аденовирус дополнительно кодирует цитокин.

В одном варианте реализации аденовирус дополнительно кодирует хемокин.

В другом варианте реализации аденовирус дополнительно кодирует цитокин и хемокин.

В одном варианте реализации аденовирус содержит один биспецифичный активатор Т-клеток и, по меньшей мере, один цитокин или хемокин, например, 1, 2 или 3 цитокина, 1, 2 или 3 хемокина или комбинацию из 2 или 3 генов, каждый из которых независимо кодирует цитокин или хемокин.

В другом варианте реализации аденовирус содержит два биспецифичных активатора Т-клеток и, по меньшей мере, один цитокин или хемокин, например, 1 или 2 цитокина, 1 или 2 хемокина или комбинацию цитокина и хемокина.

В другом варианте реализации аденовирус содержит три биспецифичных активатора Т-клеток и, по меньшей мере, один цитокин или хемокин.

В одном варианте реализации изобретения цитокин или хемокин выбирают из IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFNα, IFNβ, IFNγ, TNFα, лимфотоксина α (LTA) и GM-CSF, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, например IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFNγ, TNFα, лимфотоксина α (LTA), CCL3, CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19 и CCL21.

В одном варианте реализации кодируемый цитокин выбран из суперсемейства TNF-альфа (TNFRSF включает TNF-альфа, TNF-C, OX40L, CD154, FasL, LIGHT, TL1A, CD70, Siva, CD153, лиганд 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, GITR лиганд, EDA-A, EDA-A2), суперсемейства TGF- бета, семейства IL-1 (то есть IL-1 и IL-8), семейства IL-2, семейства IL-10, семейства IL-17, семейства интерферонов.

В одном варианте реализации хемокин выбран из группы, включающей MIP-1 альфа, RANTES, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19 и CCL21.

В одном варианте реализации аденовирус дополнительно содержит иммуномодулятор, такой как антитело или фрагмент антитела, или белок или пептидный лиганд, специфичный для белка контрольной точки или костимулирующей молекулы, или специфичные связывающие лиганды для таких молекул.

В одном варианте реализации указанный иммуномодулятор представляет собой антитело или фрагмент антитела, или белок или пептидный лиганд, специфичный к белку контрольной точки, такой как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT или CD160, например CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2.

В одном варианте реализации иммуномодулятор представляет собой ингибитор, например ингибитор контрольной точки.

В одном варианте реализации иммуномодулятор представляет собой агонист.

В другом варианте реализации иммуномодулятор представляет собой антитело или фрагмент антитела, или белок или пептидный лиганд, специфичные к костимулирующей молекуле, такой как CD28, CD80, CD86, CD83, ICOS, B7H2, TL1A и 4-1BB.

В одном варианте реализации аденовирус содержит первое антитело, фрагмент антитела, белок или пептидный лиганд, специфичные к белку контрольной точки, и второе антитело, фрагмент антитела, белок или пептидный лиганд, специфичные к костимулирующей молекуле.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 8, 13 или 18, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 9, 12 или 17, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 7, 11 или 16, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, используемый в настоящем изобретении (т.е. кодируемый аденовирусом), содержит домен связывания с доменом VH с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 8, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей, и домен VL с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 9, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, используемый в настоящем изобретении (т.е. кодируемый аденовирусом), содержит домен связывания с доменом VH с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 13, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей, и домен VL с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 12, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, используемый в настоящем изобретении (т.е. кодируемый аденовирусом), содержит домен связывания с доменом VH с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 18, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей, и домен VL с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 17, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, используемый в настоящем изобретении (т.е. кодируемый аденовирусом), содержит домен связывания с доменом VH с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 8, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей, и домен VL с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 9, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей, и домен связывания с доменом VH с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 13, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей, и домен VL с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 12, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, используемый в настоящем изобретении (т.е. кодируемый аденовирусом), содержит домен связывания с доменом VH с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 8, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей, и домен VL с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 9, или последовательностью, идентичной, по меньшей мере, на 95%, и домен связывания с доменом VH с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 18, или последовательностью, идентичной, по меньшей мере, на 95%, и домен VL с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 17, или последовательностью, по меньшей мере, на 95% идентичной ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, используемый в настоящем изобретении (то есть кодируемый аденовирусом), содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7, 11, 16, или последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из них.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, используемый в настоящем изобретении (т.е. кодируемый аденовирусом), содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7, или последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, используемый в настоящем изобретении (т.е. кодируемый аденовирусом), содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 11, или последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, используемый в настоящем изобретении (т.е. кодируемый аденовирусом), содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную ей.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или 4, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей, например аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 73, или 75.

В одном варианте реализации аденовирус по настоящему изобретению содержит последовательность ДНК, указанную в любой из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность ДНК, которая гибридизуется с ней при строгих условиях.

В одном варианте реализации аденовирус по настоящему изобретению содержит последовательность ДНК, изложенную в любой из SEQ ID NO: 79-82.

В одном варианте реализации аденовирус согласно настоящему изобретению содержит последовательность ДНК, показанную в любой из SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 79, 80, 82, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 120, 298, или последовательность, кодирующая тот же вирус, или последовательность, которая гибридизуется с любой из них при строгих условиях.

В одном варианте реализации аденовирус согласно настоящему изобретению содержит последовательность ДНК, показанную в любой из SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 79, 80, 82, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 120 или 298.

Специалисту известно, что ДНК код является вырожденным, поэтому настоящее изобретение распространяется на End или Ad11, кодирующие биспецифичный активатор Т-клеток с аминокислотой, раскрытой в настоящем изобретении.

С-концевая аффинная дека-His метка (HHHHHHHHH SEQ ID NO: 24) полезна для очистки биспецифичного активатора Т-клеток или аденовируса. Однако она необязательна и может быть исключена, например, в конечном продукте. Специалист также должен знать, что могут быть использованы другие аффинные метки, отличные от дека-His, и также могут быть исключены, не затрагивая биологическую функцию биспецифичного активатора Т-клеток или аденовируса. Соответственно, в одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток содержит аминокислотную последовательность, как указано в любой из SEQ ID NO: 2 или 4, но исключает аффинную дека-His метку на С-конце последовательности, например, как изложено в SEQ ID NO: 73 или 75. В другом варианте реализации аденовирус содержит последовательность ДНК, представленную в любой из SEQ ID NO: 34-37, но исключает аффинную дека-His метку, например последовательность ДНК, как указано в любой из SEQ ID NO: 79-82.

Исключение аффинной дека-His метки также распространяется на все другие раскрытые в настоя-

щем изобретении последовательности, включающие аффинную дека-His метку, то есть настоящее изобретение включает те же аминокислотные или ДНК-последовательности, в которых отсутствует С-концевая дека-His-MeTKa (HHHHHHHHHH или CATCACCATCACCATCACCACCATCACCAT), например, как указано в любой из SEQ ID NO: 72-82.

В одном варианте реализации биспецифичный активатор Т-клеток, кодируемый вирусом по настоящему изобретению, находится под контролем экзогенного промотора, например промотора CMV. Экзогенный промотор может быть помещен между MPL и кодированным трансгеном, когда трансген находится между областями L5 и E4.

Экзогенный промотор может быть помещен между закодированным трансгеном и L5, когда трансген находится между областями L5 и E3.

В одном аспекте предложена композиция, содержащая аденовирус, описанный в настоящем изобретении, и разбавитель или носитель.

В одном аспекте предложен способ лечения пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества аденовируса или композиции, описанных в настоящем изобретении.

В одном варианте реализации описанный способ предназначен для лечения рака, например рака эпителия, в частности солидной опухоли.

В одном варианте реализации предложен способ лечения, включающий введение вируса в соответствии с настоящим изобретением в комбинации с ингибитором контрольной точки (таким как ингибитор PD-1 или PDL1), в частности, когда ингибитор контрольной точки кодируется в вирусе.

В одном варианте реализации предлагается способ лечения, включающий введение вируса в соответствии с настоящим изобретением, который НЕ сочетается с ингибитором контрольной точки (например, как указано в другом месте в настоящем изобретении, таким как ингибитор PD-1 или PDL1), в частности, когда ингибитор контрольной точки не кодируется в вирусе.

Биспецифичные активаторы Т-клеток, кодируемые вирусом согласно настоящему изобретению, обладают способностью усиливать цитотоксичность вируса.

Неожиданно оказалось, что биспецифичные активаторы Т-клеток, кодируемые вирусом согласно настоящему изобретению, могут активировать клетки CD4+ и/или клетки CD8+, например, даже клетки в супрессивной среде опухоли, включая Т-клетки в жидкой среде опухоли, такой как асцит.

Преимуществом является то, что биспецифичные активаторы Т-клеток, кодируемые вирусом согласно настоящему изобретению, могут активировать цитотоксические Т-клетки, например, даже Т-клетки в супрессивной среде опухоли, включая Т-клетки в жидкой среде, такой как асцит, опухоли.

Еще более неожиданно оказалось, что биспецифичные активаторы Т-клеток, кодируемые вирусом согласно настоящему изобретению, способны стимулировать (активировать) пролиферацию Т-клеток.

Вирусы, кодирующие биспецифичные активаторы Т-клеток согласно настоящему изобретению, по-видимому, способны обходить, преодолевать или диаметрально изменять иммуносупрессивную микросреду опухоли.

В одном варианте реализации активация Т-клеток приводит к повышенной регуляции Т-клеточного маркера, например CD25.

В одном варианте реализации связывание биспецифичного активатора Т-клеток в вирусе согласно настоящему изобретению является специфичным к неоантигену.

Изобретение также распространяется на новые последовательности, раскрытые в настоящем изобретении.

Подробное описание

Используемые в настоящем изобретении термин "иммунная клетка" обозначает клетку с функциональной ролью в иммунной системе, включая (среди прочего) макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, NK-клетки, лимфоциты, такие как Т-лимфоциты (в частности, Т-клетки и NKT-клетки).

Используемый в настоящем изобретении термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, способной специфично связываться с антигеном-мишенью, таким как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид, пептид и т. д., по меньшей мере, через один сайт распознавания антигена (также называемый в настоящем изобретении сайтом связывания), расположенный в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Если в контексте не указано иное, тот термин распространяется на антитела полной длины и молекулы мультиспецифичных антител, содержащие антитела полной длины.

Используемый в настоящем изобретении термин "молекула антитела" включает антитела и их связывающие фрагменты, а также мультиспецифичные форматы любого из них.

Используемый в настоящем изобретении термин "антигенсвязывающий сайт" относится к части молекулы, которая содержит пару вариабельных областей, в частности когнатную пару, которые специфично взаимодействуют с антигеном-мишенью.

В частности, в настоящем изобретении, указанный термин предназначен для обозначения сайта связывания, который распознает только антиген, к которому он специфичен, или сайт связывания, который имеет значительно более высокую аффинность связывания с антигеном, к которому он специфичен, по сравнению со сродством к антигенам, к которым он является неспецифичным, например, в 5, 6, 7, 8, 9, в 10 раз более высокую аффинность, связывания.

Используемые в настоящем изобретении понятия связывающих фрагментов или антителосвязывающих фрагментов относятся к антителосвязывающим фрагментам и молекулам мультиспецифичных антител, содержащим антителосвязывающие фрагменты, включая, среди прочего, Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', $F(ab')^2$, Fv, однодоменные антитела, scFv, двух-, трех- или тетравалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, тетра-тела и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленного (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Способы создания и изготовления этих фрагментов антител хорошо известны в данной области техники (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216:165-181). Другие фрагменты антител для использования в настоящем изобретении включают фрагменты Fab и Fab', описанные в международных заявках на патент WO 05/003169, WO 05/003170 и WO 05/003171. Мультивалентные антитела могут иметь множество специфичностей, например, быть биспецифичными или моноспецифичными (см., например, WO92/22853 и WO05/113605).

В одном варианте реализации аденовирус содержит молекулу мультиспецифичного антитела.

Используемое в настоящем изобретении понятие молекулы мультиспецифичного антитела относится к молекуле антитела, которая имеет два или более антигенсвязывающих домена, например два (биспецифичное) или три (триспецифичное) или четыре (тетраспецифичное) связывающих домена.

Молекулы мультиспецифичных антител по настоящему изобретению могут быть сконструированы из различных фрагментов антител, таких как описанные выше. Например, диатело представляет собой молекулу биспецифичного антитела, состоящую из нековалентного димера ScFv-фрагментов, тогда как $F(ab')^2$ представляет собой молекулу биспецифичного антитела, состоящую из 2 Fab-фрагментов, связанных шарнирной областью. Таким образом, специалисту в данной области техники известно, что различные фрагменты антител могут быть расположены в различных комбинациях для получения молекулы би- или мультиспецифичного антитела.

Примеры форматов три-специфичных или тетра-специфичных антител включают, среди прочего, Fab3, триатело, тетратело, тритело, DVD-Ig, IgG-scFv, ScFv2-Fc, tandAbs и DNL-Fab3.

Используемое в настоящем изобретении понятие молекулы биспецифичного антитела относится к молекуле с двумя антигенсвязывающими доменами, которые могут связывать одинаковые или разные антигены. Биспецифичный активатор Т-клеток является подклассом молекул биспецифичных антител.

Домены могут связывать разные антигены.

В альтернативном варианте, все домены могут связывать один и тот же антиген, включая связывание одного и того же эпитопа на антигене или связывание разных эпитопов на одном и том же антигене.

Примеры форматов биспецифичных антител включают, среди прочего, биспецифичный активатор Т-клеток, $F(ab')_2$, F(ab')-ScFv2, ди-scFv, диатело, минитело, scFv-Fc, DART, TandAb, ScDiabody, ScDiabody-CH3, Diabody-CH3, тройное тело, миниантитело, минитело, минибоди TriBi, ScFv-CH3 KIH ("выступы-во-впадины"), Fab-ScFv, SCFv-CH-CL-scFv, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, тетравалентное HCAb, scDiabody-Fc, Diabody-Fc, интратело, "dock and lock"-антитела, ImmTAC, HSAbody, ScDiabody-HAS, антител Humabody и Tandem ScFv-toxic (см., например Christoph Spiess et al., Molecular Immunology 67 (2015) p. 95-106).

Аденовирус по настоящему изобретению содержит биспецифичный активатор Т-клеток, который специфичен по меньшей мере для поверхностного антигена на представляющей интерес Т-клетке. Примеры антигенов поверхности Т-клеток включают, среди прочего: CD3, CD2, VLA-1, CD8, CD4, CCR6, CXCR5, CD25, CD31, CD45RO, CD197, CD127, CD38, CD27, CD196, CD277 и CXCR3, в особенности - CD2, CD3, CD31 и CD277.

Используемый в настоящем изобретении термин "биспецифичный активатор Т-клеток (бисп.актив.Т-кл.)" относится к классу искусственных биспецифичных моноклональных антител, включающих 2 scFv-фрагмента различных антител или аминокислотных последовательностей из 4 различных генов в одной пептидной цепи длиной приблизительно 55 кДа. Один из этих scFv является специфичным для иммунной клетки, такой как Т-клеточный антиген, например рецептор CD3, экспрессируемый на поверхности Т-клеток. Другой scFv обычно связывается с опухолевой клеткой через опухоль-специфичную молекулу. Соответственно, биспецифичные активаторы Т-клеток способны образовывать связь между Т-клетками и опухолевыми клетками благодаря их специфичности в отношении антигена на Т-клетке и антигена на опухолевой клетке. Это приводит к активации Т-клеток и запускает проявление Т-клетками их цитотоксического действия на опухолевые клетки независимо от MHC I или костимулирующих молекул. Примеры основанных на биспецифичных активаторах Т-клеток препаратов, которые в настоящее время одобрены или проходят клинические испытания, включают, например, блинатумомаб (Блинцито®), который нацелен на CD19 и предназначен для лечения неходжкинской лимфомы и острого лимфобластного лейкоза, и солитомаб, который нацелен на EpCAM и предназначен для лечения рака желудочно-кишечного тракта и легких.

В одном варианте реализации активатор иммунных клеток (такой как активатор Т-клеток) скомпонован в формате VL1-линкер 1-VH1-линкер 2-VH2-линкер 3-VL2, например, с использованием линкеров, например независимо выбранных из линкерных последовательностей, раскрытых в настоящем изобрете-

нии.

В одном варианте реализации линкеры в биспецифичном активаторе Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением независимо выбраны из SEQ ID NO: 10, 14, 23, 124-162 и 166-297.

В одном варианте реализации линкер 1 и линкер 3 имеют одинаковую последовательность, например последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 10, 14, 23, 124-162 и 166-296, в частности 10, 14 и 23.

В одном варианте реализации линкер 1 и линкер 3 имеют разные аминокислотные последовательности, например, независимо выбранные из SEQ ID NO: 10, 14, 23, от 124 до 162 и от 166 до 296, в частности от 10, 14 и 23.

В одном варианте реализации линкер 1 представляет собой SEQ ID NO: 10.

В одном варианте реализации линкер 1 представляет собой SEQ ID NO: 14.

В одном варианте реализации линкер 3 представляет собой SEQ ID NO: 10.

В одном варианте реализации линкер 3 представляет собой SEQ ID NO: 14.

В одном варианте реализации линкер 1 и линкер 3 представляют собой SEQ ID NO: 10.

В одном варианте реализации линкер 1 и линкер 3 представляют собой SEQ ID NO: 14.

В одном варианте реализации линкер 1 представляет собой SEQ ID NO: 10, а линкер 3 представляет собой SEQ ID NO: 14.

В одном варианте реализации линкер 1 представляет собой SEQ ID NO: 14, а линкер 3 представляет собой SEQ ID NO: 10.

В одном варианте реализации линкер 2 отличается как от линкер 1, так и от линкер 3.

В одном варианте реализации линкер 2 выбран из любой из SEQ ID NO: 10, 14, 23, 124-162 и 166-297, например SEQ ID NO: 297.

В одном варианте реализации длина линкера 1 составляет от 10 до 30 аминокислот, например 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30.

В одном варианте реализации длина линкера 3 составляет от 10 до 30 аминокислот, например 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30.

В одном варианте реализации линкер 2 имеет длину от 2 до 10 аминокислот, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В одном варианте реализации VH1 и VL1 являются специфичными к антигену Т-клеток согласно настоящему изобретению, например CD3.

В одном варианте реализации VH2 и VL2 являются специфичными к антигену иммунных клеток, например антигену Т-клеток, согласно настоящему изобретению, например CD3.

В одном варианте реализации VH1 и VL1 являются специфичными к целевому антигену, например раковый антиген или антиген который присутствует в строме, и т.д.

В одном варианте реализации VH2 и VL2 являются специфичными для целевого антигена, такого как раковый антиген или антиген, который присутствует в строме, и т.д.

Используемый в настоящем изобретении термин "строма" или "стромальный антиген (антиген, который пристусвует в строме)" относится к антигену-терапевтической мишени в строме, в том числе экспрессируемой в молекулярной структуре матрикса стромы, такой как молекулы соединительной ткани или молекулы, ассоциированные с этим матрицей, или антигены, ассоциированные с клеточными компонентами стромы, например, экспрессируемый на фибробластах, опухоль-ассоциированных макрофагах, дендритных клетках, NK-клетках и/или Т-клетках, которые проникли в строму. Примеры антигенов, которые присутствуют в строме, включают, среди прочего, FAP, TGFβ, TREM1, IGFBP7, FSP-1, фибробласт-ассоциированный антиген, NG2, эндосиалин (CD248), рецептор тромбоцитарного фактора роста-α (PDGFR-α), рецептор тромбоцитарного фактора роста-β (PDGFR-β) и виментин.

На фибробласты можно воздействовать, используя антигенный белок активации фибробластов (FAP), в частности антитело, специфичное к FAP, которое не связывает CD26 (см. US2012/0258119, включенный в настоящий документ в качестве ссылки).

FAP был первоначально идентифицирован как сериновая протеаза на реактивных стромальных фибробластах. Последующее молекулярное клонирование выявило, что FAP идентичен сепразе, мембрана-ассоциированной желатиназе размером 170 кДа, которая экспрессируется клеточными линиями меланомы. Полноразмерная кДНК кодировала трансмембранную протеазу типа H из 760 аминокислот (ак), высоко гомологичную дипептидилпептидазе IV (DPPIV) с 52%-ной идентичностью по всей последовательности и почти 70%-ной идентичностью в каталитическом домене. В патенте США №5587299, включенном в настоящее описание в качестве ссылки, описаны молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие FAP, и их применения.

FAP и DPPIV имеют сходные размеры генов и хромосомно соседствуют друг с другом в 2q24, что указывает на событие дупликации генов (номер доступа в Genebank U09278). Оба белка являются членами семейства пролилпептидаз. Указанный класс ферментов индуцибелен, активен на клеточной поверхности или во внеклеточных жидкостях и уникально способен отщеплять N-концевые дипептиды от полипептидов с пролином или аланином в предпоследнем положении. DPPIV, также называемый CD26,

конститутивно экспрессируется несколькими типами клеток, включая фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки, подгруппы лейкоцитов, такие как NK-клетки, Т-лимфоциты и макрофаги. Небольшая доля DPPIV циркулирует в крови как растворимый белок. В отличие от DPPIV, FAP, как правило, не экспрессируется в нормальной ткани взрослого человека, а его протеолитически активная растворимая форма называется ферментом расщепления 2-антиплазмина (APCE). Выраженная экспрессия FAP происходит в условиях, ассоциированных с активированной стромой, включая заживление ран, рак эпителия, остеоартрит, ревматоидный артрит, цирроз и фиброз легких.

Структура FAP расшифрована (PDB ID 1Z68) и очень похожа на структуру DPPIV. FAP закрепляется в плазматической мембране с помощью нерасщепленной сигнальной последовательности, состоящей приблизительно из 20 аминокислот, и имеет короткий аминоконцевой цитоплазматический домен из шести аминокислот. Главная часть этого белка, включая каталитический домен, подвергается воздействию внеклеточной среды. Гликопротеин FAP представляет собой гомодимер, состоящий из двух идентичных субъединиц по 97 кДа. Каждая субъединица FAP-мономера состоит из двух доменов: αβ-гидролазного домена (ак 27-53 и 493-760) и восьмилопастного β-пропеллерного домена (ак 54-492), которые охватывают большую полость. Небольшой карман внутри этой полости на границе обоих доменов содержит каталитическую триаду (Ser624, Asp702 и His734). FAP приобретает свою ферментативную активность при гомодимеризации субъединиц, и помимо своей дипептидилпептидазной активности, FAP также обладает коллагеновой I типа специфичной желатиназной и эндопептидазной активностью, β-пропеллер действует в качестве основы для межбелковых взаимодействий и определяет связывание субстрата и внеклеточного матрикса (ECM). Кроме того, β-пропеллер участвует в образовании надмолекулярных комплексов FAP с другими пролилпептидазами или с другими мембраносвязанными молекулами. Установлено, что образование гетеромерных или тетрамерных комплексов FAP и DPPIV ассоциировано с инвадоподиями мигрирующих клеток на коллагеновом субстрате. Коллаген типа I индуцирует тесную связь FAP с β1-интегринами, тем самым играя главную организационную роль в формировании и адгезии инвадоподий. Хотя вовлеченные механизмы не понятны в деталях, образование таких богатых протеиназой мембранных доменов на фронте клеточной инвазии способствует направленной перицеллюлярной деградации ECM. Это указывает на то, что взаимодействия FAP и ECM могут быть тесно связаны с инвазивным поведением клеток, влияя на клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию и апоптоз через пути интегрина, и подтверждает роль FAP в патогенезе и прогрессировании заболевания. Таким образом, FAP признан многофункциональным белком, который выполняет свои биологические функции клеточно-зависимым образом благодаря комбинации своей протеазной активности и способности образовывать комплексы с другими молекулами клеточной поверхности. Избыточная экспрессия FAP в эпителиальных и фибробластических клеточных линиях способствует злокачественному поведению, что указывает на клиническую ситуацию, когда уровни клеточной экспрессии FAP коррелируют с худшим клиническим исходом.

Посредством паракринных сигнальных молекул раковые клетки активируют стромальные фибробласты и индуцируют экспрессию FAP, что, в свою очередь, влияет на пролиферацию, инвазию и миграцию раковых клеток. Недавние исследования показали, что доминирующим фактором в стимулировании экспрессии белка FAP является TGF-β (Chen, H et al. (2009) Exp and Molec Pathology, doi: 10.1016/j.yexmp. 2009.09.001). FAP обильно экспрессируется на реактивных стромальных фибробластах в 90% карцином эпителия человека, включая рак молочной железы, легких, толстой кишки и яичника (Garin-Chesa, P et al. (1990) PNAS USA 87: 7236-7239). Chen et al недавно показали, что FAPα влияет на инвазию, пролиферацию и миграцию клеток рака яичника HO-8910PM (Chen, H et al. (2009) Exp and Molec Pathology, doi: 10.1016/j.yexmp. 2009.09.001).

FAP может быть превращен в мишень связыванием указанного антигена и стерического блокирования его взаимодействия с биологически релевантными молекулами. В альтернативном варианте или дополнительно сшивание FAP молекулы с другой FAP молекулой или другой молекулой, например, антигеном на поверхности раковой клетки, может быть достигнуто с использованием молекулы мультиспецифичного, например биспецифичного антитела. Это перекрестное связывание повышало видимость клеток, несущих антигены, для иммунной системы, которая затем может быть активирована для нейтрализации или уничтожения этих клеток.

Предполагается, что опухоль-ассоциированные макрофаги (TAM) экспрессируют TREM1, CD204, CD68 (отдельно или в комбинации с CD163 или CD206). Эти маркеры могут использоваться для нацеливания на макрофаги TAM.

Аденовирус по настоящему изобретению обладает способностью инфицировать опухолевые клетки и, в частности, выбирается так, чтобы преимущественно инфицировать опухолевые клетки. Инфекция онколитического вируса вызывает гибель и лизис раковой клетки с выделением только что сгенерированных вирусных частиц. Инкорпорированные трансгены, кодирующие антитела, биспецифичный активатор Т-клеток и другие "полезные заряды", вновь синтезируются и активно секретируются опухолевыми клетками до их гибели, а некоторые молекулы также высвобождаются при лизисе клеток.

Молекулы антител с коротким периодом полувыведения могут быть особенно подходящими для

использования в настоящем изобретении, так как это сводит к минимуму побочные эффекты, поскольку организм быстро выводит молекулы, если они становятся системно доступными.

Клетки NKT обладают способностью нацеливаться и уничтожать опухоль-ассоциированные макрофаги. Однако их активность, по-видимому, ингибируется гипоксической средой опухоли. Эта активность может быть восстановлена путем обеспечения клеток NKT цитокинами IL-2 и/или IL-15, например, кодируемыми вирусом по настоящему изобретению.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус по настоящему изобретению дополнительно кодирует цитокин для активации NKT-клеток, например, выбранный из IL-2, IL-15 и их комбинаций. Ген, кодирующий цитокин, может находиться в том же месте или в другом месте, чем ген, кодирующий молекулу антитела, например независимо выбран из E1, E3, E4, B_X и B_Y.

Таким образом, аденовирус по настоящему изобретению имеет по меньшей мере два или три механизма для атаки опухоли, включая косвенные механизмы, которые подрывают строму опухоли.

Используемый в настоящем изобретении термин "трансген" относится к гену, который был вставлен в последовательность генома, который представляет собой ген, являющийся неестественным для этого вируса (экзогенным) или обычно не обнаруживается в этом конкретном месте в вирусе. Примеры трансгенов приведены ниже. Используемый в настоящем изобретении термин "трансген" также включает функциональный фрагмент гена, который является частью гена, который при инсерции пригоден для выполнения функции или большей части функции гена полной длины.

Понятия "трансген" и "кодирующая последовательность" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо в контексте инсерции в вирусный геном, если в контексте не указано иное. Используемый в настоящем изобретении термин "кодирующая последовательность" означает, например, последовательность ДНК, кодирующую функциональную РНК, пептид, полипептид или белок. Как правило, кодирующая последовательность представляет собой кДНК для трансгена, которая кодирует функциональную РНК, пептид, полипептид или целевой белок. Функциональные РНК, пептиды, полипептид и целевые белки описаны ниже.

Очевидно, что геном вируса содержит кодирующие последовательности ДНК. Эндогенные (гены естественного происхождения) в геномной последовательности вируса не считаются трансгенами в контексте настоящей заявки, если только они не были модифицированы рекомбинантными методами так, что они находятся в не естественном положении или в не естественной окружающей среде.

В одном варианте реализации используемый в настоящем изобретении термин трансген, относится к сегменту ДНК, содержащему ген или последовательность кДНК, которая была выделена из одного организма и введена в другой организм, т.е. вирус по настоящему изобретению. В одном варианте реализации указанный ненативный сегмент ДНК может сохранять способность продуцировать функциональную РНК, пептид, полипептид или белок.

Таким образом, в одном варианте реализации вставленный трансген кодирует человеческий или гуманизированный белок, полипептид или пептид.

В одном варианте реализации изобретения вставленный трансген кодирует молекулу нечеловеческого белка, полипептида или пептида (такого как белок, полипептид или пептид млекопитающего, не являющегося человеком) или молекулу РНК, например, от мыши, крысы, кролика, верблюда, ламы или подобных животных. Преимущество заключается в том, что вирусы по настоящему изобретению позволяют транспортировать трансгены внутрь раковой клетки. Таким образом, ответы, генерируемые пациентом-человеком на последовательность не человека (например, белок), могут быть минимизированы этой внутриклеточной доставкой.

Последовательность ДНК может содержать более одного трансгена, например, 1, 2, 3 или 4 трансгена, например 1 или 2.

Трансгенная кассета может содержать более одного трансгена, например, 1, 2, 3 или 4 трансгена, например 1 или 2.

В одном или нескольких вариантах реализации кассета расположена так, как показано на одной или нескольких фигурах или в примерах.

Используемый в настоящем изобретении термин "трансгенная кассета" относится к последовательности ДНК, кодирующей один или более трансгенов в форме одной или нескольких кодирующих последовательностей и одного или нескольких регуляторных элементов.

Трансгенная кассета может кодировать одну или более моноцистронных и/или полицистронных последовательностей мРНК.

В одном варианте реализации трансген или трансгенная кассета кодирует моноцистронную или полицистронную мРНК, и, например, такая кассета является подходящей для инсерции в аденовирусный геном в определенном положении под контролем эндогенного промотора или экзогенного промотора или их комбинации.

Используемый в настоящем изобретении в настоящем изобретении термин "моноцистронная мРНК" относится к молекуле мРНК, кодирующей одну функциональную РНК, пептид, полипептид или белок.

В одном варианте реализации трансгенная кассета кодирует моноцистронную мРНК.

В одном варианте реализации трансгенная кассета в контексте кассеты, кодирующей моноцистронную мРНК, означает сегмент ДНК, необязательно содержащий экзогенный промотор (представляющий собой регуляторную последовательность, которая будет определять, где и когда указанный трансген активен) или сайт сплайсинга (который представляет собой регуляторную последовательность, определяющую, когда молекула мРНК будет расщеплена сплайсосомой), кодирующую последовательность (то есть трансген), обычно получаемую из кДНК для целевого белка, необязательно содержащую сигнальную последовательность polyA, и терминаторную последовательность.

В одном варианте реализации трансгенная кассета может кодировать одну или более последовательностей полицистронных мРНК.

Термин "полицистронная мРНК" в контексте настоящей заявки относится к молекуле мРНК, кодирующей две или более функциональных РНК, пептидов или белков или их комбинацию. В одном варианте реализации трансгенная кассета кодирует полицистронную мРНК.

В одном варианте реализации трансгенная кассета в контексте кассеты, кодирующей полицистронную мРНК, включает сегмент ДНК, необязательно содержащий экзогенный промотор (представляющий собой регуляторную последовательность, которая будет определять, где и когда трансген активен) или сайт сплайсинга (который представляет собой регуляторную последовательность, определяющую, когда молекула мРНК будет расщеплена с помощью сплайсосомы), две или более кодирующих последовательностей (т.е. трансгенов), обычно получаемых из кДНК для целевого белка или пептида, например, когда каждая кодирующая последовательность отделена посредством либо IRES, либо пептида 2A. После последней кодирующей последовательности, которая должна быть транскрибирована, кассета может необязательно содержать последовательность polyA и терминаторную последовательность.

В одном варианте реализации трансгенная кассета кодирует моноцистронную мРНК, за которой следует полицистронная мРНК. В другом варианте реализации трансгенная кассета представляет собой полицистронную мРНК, за которой следует моноцистронная мРНК.

В одном варианте реализации аденовирус представляет собой аденовирус человека. Используемые в настоящем изобретении термины "аденовирус", "серотип" или "аденовирусный серотип" обозначают любой аденовирус, который может быть отнесен к любому из более чем 50 известных в настоящее время аденовирусных серотипов, классифицированных в подгруппы A-F, и далее распространяется на любые, пока не идентифицированные или неклассифицированные аденовирусные серотипы. См. например, Strauss, "Adenovirus инфицирование in humans," в The Adenoviruses, Ginsberg, ea., Plenum Press, New York, NY, p. 451-596 (1984) и Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," в Fields Virology, Vol. 2, Fourth Edition, Knipe, 35ea., Lippincott Williams & Wilkins, p. 2265-2267 (2001), как показано в табл. 1.

Таблица 1

Подгруппа	Аденовирусный серотип
A	12,18,31
B	3,7,11,14,16,21,34,35,51
C	1,2,5,6
D	8-10,13,15,17,19,20,22-30,32,33,36-39,42-49,50
E	4
F	40,41

Аденовирусы по настоящему изобретению представляют собой вирусы подгруппы B, а именно Ad11, в частности Ad11p (штамм Slobitski) и их производные, такие как EnAd.

Аденовирусы классифицируют по их группам/серотипам на основании капсида, например гексона и/или фибера.

Аденовирус по настоящему изобретению не является вирусом группы A, C, D, E или F. Вирусы по настоящему изобретению не содержат аденовирусный белок смерти.

В одном варианте реализации аденовирус по настоящему изобретению является химерным. Когда аденовирус является химерным, тогда для определения серотипа будут использованы характеристики внешнего капсида. Используемый в настоящем изобретении термин "химерный" относится к вирусу, который содержит ДНК по меньшей мере из двух различных вирусных серотипов, включая различные серотипы в пределах одной и той же группы.

В одном варианте реализации онколитический вирус имеет белки гексона, фибера и пентона одного и того же серотипа, например Ad11, в частности Ad11p, например, находящиеся в положениях 30812-31789, 18254-21100 и 13682-15367 геномной последовательности последнего, где положения нуклеотидов указаны относительно идентификатора генбанка ID 217307399 (номер доступа: GC689208).

В одном варианте реализации аденовирус представляет собой enadenotucirev (также известный как EnAd и ранее - как EnAd). Используемый в настоящем изобретении термин Enadenotucirev относится к химерному аденовирусу с SEQ ID NO: 38. Он является компетентным по репликации онколитическим химерным аденовирусом, который обладает улучшенными терапевтическими свойствами по сравнению с аденовирусами дикого типа (см. WO2005/118825). EnAd имеет химерную область E2B, которая содер-

жит ДНК из Ad11p и Ad3 и делеции в E3/E4. Эти структурные изменения в enadenotucirev приводят к тому, что геном приблизительно на 3,5 т.п.н. меньше, чем Ad11p, обеспечивая тем самым дополнительное "пространство" для инсерции трансгенов.

Enadenotucirev (EnAd) представляет собой химерный онколитический аденовирус, ранее известный как EnAd (WO2005/118825), с фибером, пентоном и гексоном из Ad11p, следовательно, это вирус подгруппы B. Он имеет химерную область E2B, которая включает ДНК из Ad11p и Ad3. В EnAd почти вся область E3 и часть области E4 удалены. Поэтому он имеет значительное пространство в геноме для размещения дополнительного генетического материала, оставаясь при этом жизнеспособным. Кроме того, поскольку EnAd является аденовирусом подгруппы B, ранее существовавший иммунитет у людей встречается реже, чем, например, для Ad5. Другие примеры химерных онколитических вирусов с фибером, пентоном и гексоном Ad11 включают OvAd1 и OvAd2 (см. WO2006/060314).

EnAd, по-видимому, преимущественно инфицирует опухолевые клетки, быстро размножается в этих клетках и вызывает их лизис. Это, в свою очередь, может генерировать воспалительные иммунные реакции, тем самым стимулируя организм также бороться с раком. Предполагается, что часть успеха EnAd связана с быстрой репликацией вируса in vivo.

Хотя EnAd избирательно лизирует опухолевые клетки, может оказаться возможным ввести дополнительные полезные свойства, например, повысить терапевтическую активность вируса или уменьшить побочные эффекты вируса, вооружив его трансгенами, такими как трансген, который кодирует белок, сигнальный белок или антитело или трансген, который кодирует объект, который стимулирует клеточный сигнальный белок (белки).

Полезной является возможность вооружить вирус снабдив его ДНК, кодирующей определенные белки, такие как биспецифичный активатор Т-клеток, способные экспрессироваться внутри раковой клетки, чтобы использовать собственные защитные механизмы организма для более эффективной борьбы с опухолевыми клетками, например, делая эти клетки более видимыми для иммунной системы или путем доставки терапевтического гена/белка, предпочтительно, нацеленных на опухолевые клетки.

Кроме того, способность вставлять в геном трансгены, которые являются репортерами, может помочь в клинических или доклинических исследованиях.

Важно, чтобы экспрессия трансгенов не оказывала неблагоприятного влияния на репликацию или другие полезные свойства вируса. Таким образом, ген или гены должны быть вставлены в положение, которое не ставит под угрозу способность к репликации и другие полезные свойства вируса. Кроме того, геном аденовирусов плотно упакован, и поэтому может быть трудно найти подходящее место для инсерции трансгенов. Это также ограничивает размер трансгенов, которые можно вместить.

OvAd1 и OvAd2 также являются химерными аденовирусами, сходными с enadenotucirev, которые также имеют дополнительное "пространство" в геноме (см. WO2008/080003). Таким образом, в одном варианте реализации аденовирус представляет собой OvAd1 или OvAd2.

В одном варианте реализации аденовирус является онколитическим. Используемый в настоящем изобретении термин "онколитический аденовирус" означает аденовирус, который предпочтительно убивает раковые клетки по сравнению с нераковыми клетками.

В одном варианте реализации онколитический вирус является апоптотическим. То есть, он ускоряет запрограммированную гибель клеток.

В одном варианте реализации онколитический вирус является цитолитическим. Цитолитическая активность онколитических аденовирусов по настоящему изобретению может быть определена в репрезентативных линиях опухолевых клеток, и данные могут быть преобразованы в измерение активности, например, с использованием аденовируса, принадлежащего к подгруппе C, такого как Ad5, в качестве стандарта (т.е. присваивая ему активность = 1). Подходящим методом для определения цитолитической активности является MTS-анализ (см. пример 4, фиг. 2 из WO 2005/118825, включенный в настоящий документ в качестве ссылки).

В одном варианте реализации онколитический вирус является некролитическим. То есть, он вызывает или ускоряет некроз клеток или гибель иммуногенных клеток. В одном варианте реализации некролитическая гибель клеток является преимуществом, потому что она запускает, индуцирует иммунные ответы пациентов (хозяина).

Если в контексте не указано иное, аденовирус, используемый в настоящем изобретении, относится к способному к репликации вирусу (например, компетентному по репликации вирусу), а также к вирусным векторам, дефектным по репликации.

Используемый в настоящем изобретении термин "способный к репликации" относится к компетентному по репликации вирусу или вирусу, репликация которого зависит от некоего фактора в раковых клетках, например, активированного фактора, такого как p53 или подобного.

В одном варианте реализации вирус является компетентным по репликации. Термин "компетентный по репликации" в контексте настоящей заявки относится к вирусу, который обладает всеми необходимыми механизмами для репликации в клетках in vitro и in vivo, то есть без помощи пакующей клеточной линии. Вирусный вектор, например, удаленный в области E1, способный реплицироваться в комплементарной пакующей клеточной линии, не является в данном контексте компетентным по реплика-

ции вирусом.

Вирусные векторы являются дефектными по репликации и требуют пакующей клетки для обеспечения комплементарного гена, чтобы позволить репликацию.

Используемый в настоящем изобретении термин "геном аденовируса" означает последовательность ДНК, кодирующую структурные белки и элементы, имеющие отношение к функции/жизненному циклу аденовируса.

Все исследованные на сегодняшний день человеческие геномы аденовируса имеют одинаковую общую организацию, то есть гены, кодирующие специфичные функции, расположены в одном и том же положении в вирусном геноме (называемом в настоящем изобретении структурными элементами). Каждый конец вирусного генома имеет короткую последовательность, известную как инвертированный концевой повтор (или ITR), который необходим для репликации вируса. Вирусный геном содержит пять ранних единиц транскрипции (E1A, E1B, E2, E3 и E4), три отсроченно-ранних единицы (IX, IVa2 и E2 поздняя) и одну позднюю единицу (главная поздняя), которая обрабатывается для генерации пяти семейств поздних мРНК (L1-L5). Белки, кодируемые ранними генами, в первую очередь участвуют в репликации и модуляции ответа клетки-хозяина на инфекцию, тогда как поздние гены кодируют вирусные структурные белки. Ранние гены начинаются с префикса E, а поздние гены начинаются с префикса L.

Геном аденовирусов плотно упакован, то есть имеется лишь небольшая некодирующая последовательность, и поэтому может быть трудно найти подходящее место для инсерции трансгенов. Авторы настоящего изобретения выявили две области ДНК, где допускаются трансгены, в частности выявленные сайты подходят для размещения сложных трансгенов, таких как кодирующие антитела. Таким образом, трансген экспрессируется без ущерба для жизнеспособности, нативных свойств вируса, таких как онколитические свойства или репликация.

В одном варианте реализации онколитический или частично онколитический вирус согласно настоящему изобретению может быть результатом делеции в области E4 и/или E3, например, с делецией в части области E4 или полностью с делецией в области E3, или в альтернативном варианте с делецией в части области E4 (такой как E4orf4) и полностью с делецией в области E3, например, как показано в примерах, раскрытых в настоящем изобретении.

В одном варианте реализации онколитический вирус по изобретению является химерным. Используемый в настоящем изобретении термин "химерный" относится к вирусу, который содержит ДНК из двух или более различных серотипов и обладает свойствами онколитического вируса.

В одном варианте реализации онколитический вирус представляет собой EnAd или его активное производное, которое сохраняет основные полезные свойства вируса. EnAd раскрыт в WO 2005/118825 (включенной в настоящую заявку посредством ссылки), и полная последовательность для вируса предоставлена в настоящем изобретении как SEQ ID NO: 38. Химерная область E2B раскрыта в настоящем изобретении как SEQ ID NO: 71.

Альтернативные онколитические вирусы включают OvAd1 и OvAd2, которые соответственно раскрыты как SEQ ID NO: 2 и 3 в WO2008/080003 и включены в настоящий документ посредством ссылки.

Преимуществом аденовирусов по настоящему изобретению является то, что они демонстрируют сходные профили вирусной активности, например репликации и/или инфекционности, по сравнению с EnAd после инфицирования различных клеточных линий рака толстой кишки in vitro.

Структурные элементы аденовирусов

Настоящее изобретение также относится к новым последовательностям вирусов или вирусных компонентов/конструкций, таких как плазмиды, раскрытым в настоящем изобретении.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (I)

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_A\text{-}B_2\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad (I)$$

где B_1 содержит E1A, E1B или E1A-E1B; B_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4; B_2 представляет собой связь или содержит E3; B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем экзогенного промотора) или и то, и другое; B_B содержит L5; B_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем эндогенного промотора, такого как MPL, или под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV) или и то, и другое; B_3 представляет собой связь или содержит E4; причем по меньшей мере один из B_X и B_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или и то, и другое; и кодирует молекулу полиспецифичного антигена, содержащую, по меньшей мере, два связывающих домена и, по меньшей мере, один из указанных доменов, является специфичным к поверхностному антигену на представляющей интерес Т-клетке. В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (I), где B_1 и B_X представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность фор-

мулы (I), где B_Y представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ia):

$$5'ITR\text{-}B_a\text{-}B_2\text{-}B_x\text{-}B_b\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad (Ia)$$

где B_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4; B_2 представляет собой связь или содержит E3; B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем экзогенного промотора) или и то, и другое; B_B содержит L5; B_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем эндогенного промотора, такого как MPL, или под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV) или и то, и другое; B_3 представляет собой связь или содержит E4; причем по меньшей мере один из B_X и B_Y не является связью и, по меньшей мере, один содержит трансген или сайт рестрикции, такой как трансген.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ia), где B_X представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ia), где B_Y представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ib):

$$5'ITR\text{-}B_A\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad (Ib)$$

где B_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4; B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем экзогенного промотора) или и то, и другое; B_B содержит L5; B_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем эндогенного промотора, такого как MPL, или под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV) или и то, и другое; B_3 представляет собой связь или содержит E4; причем по меньшей мере один из B_X и B_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или и то, и другое, например трансген.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ib), где B_X представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ib), где B_Y представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ic):

$$5'ITR\text{-}B_A\text{-}B_2\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}3'ITR \quad (Ic)$$

где B_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4; B_2 is E3; B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем экзогенного промотора) или и то, и другое; B_B содержит L5; B_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем эндогенного промотора, такого как MPL, или под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV) или и то, и другое; причем по меньшей мере один из B_X и B_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или и то, и другое, например трансген.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ic), где B_X представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ic), где B_Y представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Id):

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_A\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad (Id)$$

где B_1 содержит E1A, E1B или E1A-E1B; Bд содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4; B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем экзогенного промотора) или и то, и другое; B_B содержит L5; B_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспеци-

фичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем эндогенного промотора, такого как MPL, или под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV) или и то, и другое; B_3 представляет собой связь или содержит E4; причем по меньшей мере один из B_X и B_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или и то, и другое.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Id), где B_X представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Id), где B_Y представляет собой связь.

В одном варианте реализации аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ie):

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_a\text{-}B_2\text{-}B_b\text{-}B_Y\text{-}3'ITR \quad (Ie)$$

где B_1 содержит E1A, E1B или E1A-E1B; Вд содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4; B_2 содержит E3; B_B содержит L5; B_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов (в частности, трансген, кодирующий по меньшей мере один биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, например, под контролем эндогенного промотора, такого как MPL, или под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV); причем по меньшей мере один из B_X и B_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или и то, и другое.

В одном варианте реализации предложено соединение формулы (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id) или (Ie) причем по меньшей мере один из B_X и B_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или и то, и другое, например так, что B_X и B_Y оба представляют собой трансгены.

В одном варианте реализации формулы (I), (Ia), (Ib), (Ic) или (Id) только B_X кодирует один или два биспецифичных активатора Т-клеток, например один биспецифичный активатор Т-клеток (и B_Y не кодирует биспецифичный активатор Т-клеток), в частности, указанный биспецифичный активатор Т-клеток или более биспецифичных активаторов Т-клеток находятся под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV. В одном варианте формулы (I), (Ia), (Ib), (Ic) или (Id) только B_Y кодирует один или два биспецифичных активатора Т-клеток, например один биспецифичный активатор Т-клеток (и B_X не кодирует биспецифичный активатор Т-клеток), в частности, указанный биспецифичный активатор Т-клеток или более биспецифичных активаторов Т-клеток находятся под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV. В одном варианте формулы (I), (Ia), (Ib), (Ic) или (Id) B_X кодирует биспецифичный активатор Т-клеток (например, под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV) и B_Y кодирует биспецифичный активатор Т-клеток (например, под контролем эндогенного промотора, такого как MPL, или под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV).

Термин "связь" относится к ковалентной связи, соединяющей одну ДНК последовательность с другой последовательностью ДНК, например, соединяющую один участок вирусного генома с другим. Таким образом, когда переменная в формуле (I) (Ia), (Ib), (Ic), (Id) или (Ie) в настоящем изобретении представляет собой связь, признак или элемент, представленный этой связью, отсутствует, т.е. удален.

Поскольку структура аденовирусов, в общем, аналогична, приведенные ниже элементы обсуждаются в терминах структурных элементов и обычно используемой номенклатуры, относящейся к ним, которые известны специалисту в данной области техники. Когда в настоящем изобретении упоминается какой-то элемент, то мы имеем в виду последовательность ДНК, кодирующую элемент, или последовательность ДНК, кодирующую тот же структурный белок элемента в аденовирусе. Последнее применимо из-за избыточности кода ДНК. Возможно, для получения оптимальных результатов необходимо учитывать предпочтения вирусов к частоте использования кодона.

Любой структурный элемент из аденовируса, используемого в вирусах по настоящему изобретению, может содержать или состоять из природной последовательности или может иметь сходство с ней по заданной длине, по меньшей мере, на 95%, например на 96, 97, 98, 99 или 100%. Исходная последовательность может быть модифицирована, чтобы исключить 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2% или 1% генетического материала. Специалисту известно, что при внесении изменений рамки считывания вируса не должны нарушаться так, что нарушается экспрессия структурных белков.

В одном варианте реализации рассматриваемый элемент представляет собой полноразмерную последовательность, то есть полноразмерный ген.

В одном варианте реализации рассматриваемый элемент меньше полной длины и сохраняет ту же или соответствующую функцию, что и полноразмерная последовательности.

В одном варианте реализации для рассматриваемого элемента, который является необязательным в конструкциях настоящего изобретения, последовательность ДНК может быть меньше полноразмерной и не иметь функциональности.

Структурные гены, кодирующие структурные или функциональные белки аденовируса, как правило, связаны некодирующими областями ДНК. Таким образом, существует некоторая гибкость в отношении того, где "разрезать" геномную последовательность целевого структурного элемента (особенно его некодирующих областей) с целью инсерции трансгена в вирусы по настоящему изобретению. Таким образом, для целей настоящей заявки элемент будет считаться эталонным структурным элементом в той

степени, в которой он соответствует цели и не кодирует посторонний материал. Таким образом, при необходимости ген будет ассоциированным с подходящими некодирующими областями, например, как это встречается в природной структуре вируса.

Таким образом, в одном варианте реализации вставку, например когда ДНК, кодирующая сайт рестрикции и/или трансген, вставляют в некодирующую область геномной ДНК вируса, такую как интрон или межгенная последовательность. При этом, некоторые некодирующие области аденовируса могут иметь какую-то функцию, например, в альтернативном сплайсинге, регуляции транскрипции или регуляции трансляции, и это может быть необходимо учитывать.

Указанные в настоящем изобретении сайты, которые ассоциированы с областью L5 (например, между L5 и областью E4), являются подходящими для размещения множества последовательностей ДНК, кодирующих сложные объекты, такие как РНК-и, цитокины, одноцепочечные или мультимерные белки, такие как антитела, например биспецифичные активаторы Т-клеток.

Используемый в настоящем изобретении термин "ген" относится к кодирующим и любым некодирующим последовательностям, ассоциированным с ним, например, интронам и ассоциированным экзонам. В одном варианте реализации ген содержит или состоит только из существенных структурных компонентов, например кодирующей области.

Далее следует обсуждение, касающееся конкретных структурных элементов аденовирусов.

Последовательности инвертированного концевого повтора (ITR) являются общими для всех известных аденовирусов, были названы так из-за их симметрии и являются источником репликации вирусных хромосом. Другим свойством этих последовательностей является их способность формировать шпильку.

Используемое в настоящем изобретении обозначение 54TR относится к части или всему ITR из 5'-конца аденовируса, который сохраняет функцию ITR при включении в аденовирус в соответствующем месте. В одном варианте реализации 5'ITR содержит или состоит из последовательности приблизительно из 1-138 п.н. SEQ ID NO: 38 или последовательности, идентичной им на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% по всей длине, в частности последовательности состоящий из приблизительно 1-138 п.н. SEQ ID NO: 38.

Используемое в настоящем изобретении обозначение 3'ITR относится к части или всему ITR из 3'-конца аденовируса, который сохраняет функцию ITR при включении в аденовирус в соответствующем месте. В одном варианте реализации 3'ITR содержит или состоит из последовательности приблизительно из 32189-32326 п.н. SEQ ID NO: 38 или последовательности, идентичной им на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% по всей длине, в частности последовательности состоящий из приблизительно 32189 -32326 п.н. SEQ ID NO: 38.

Используемое в настоящем изобретении обозначение B_1 относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область E1A из аденовируса, часть или всю область E1B аденовируса и независимо часть или всю область E1A и E1B аденовируса.

Когда B_1 представляет собой связь, последовательности E1A и E1B будут исключены из вируса. В одном варианте реализации B_1 представляет собой связь, и, таким образом, вирус представляет собой вектор.

В одном варианте реализации B1 также содержит трансген. В данной области техники известно, что область E1 может вмещать трансген, который может быть дизруптивным образом введен в область E1 (то есть в "середину" последовательности), или часть или вся область E1 могут быть удалены для обеспечения большего пространства для размещения генетического материала.

Используемое в настоящем изобретении обозначение E1A относится к кодирующей части последовательности ДНК или всей области E1A аденовируса. Последнее в данном случае относится к полипептиду/белку E1A. Он может быть мутирован так, что белок, кодируемый геном E1A, имеет консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, так что он имеет ту же функцию, что и дикий тип (то есть соответствующий немутантный белок); повышенную функцию по сравнению с белком дикого типа; сниженную функцию, например, отсутствие функции по сравнению с белком дикого типа; или имеет новую функцию по сравнению с белком дикого типа, или их комбинацию в зависимости от ситуации.

Используемое в настоящем изобретении обозначение E1B относится к части, кодирующей последовательность ДНК, или всей области E1B аденовируса (т.е. полипептиду или белку), она может быть мутирована так, что белок, кодируемый геном/областью E1B, имеет консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, такие как что он имеет ту же функцию, что и дикий тип (то есть соответствующий немутантный белок); повышенная функция по сравнению с белком дикого типа; снижение функции, например, отсутствие функции по сравнению с белком дикого типа; или имеет новую функцию по сравнению с белком дикого типа или их комбинацией в зависимости от ситуации.

Таким образом, B_1 может быть модифицирован или не модифицирован относительно области E_1 дикого типа, такой как E1A и/или E1B дикого типа. Специалист может легко определить, присутствуют ли E1A и/или E1B или (частично) удалены или мутированы.

Используемый в настоящем изобретении термин "дикий тип" относится к известному аденовирусу. Известный аденовирус - это аденовирус, который был идентифицирован и поименован, независимо от того, доступна ли его последовательность.

В одном варианте реализации B_1 имеет последовательность от 139 до 3932 п.н. из SEQ ID NO: 38.

Используемое в настоящем изобретении обозначение B_A относится к последовательности ДНК, кодирующей области E2B-L1-L2-L3-E2A-L4, включая любые некодирующие последовательности, в зависимости от ситуации. Обычно эта последовательность не содержит трансгена. В одном варианте реализации последовательность по существу сходна или идентична смежной последовательности из известного аденовируса, например серотипа, показанного в Таблице 1, в частности вируса группы B, например Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34. Ad35, Ad51 или их комбинации, например Ad3, Ad11 или их комбинации. В одном варианте реализации E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 относится к включению этих элементов и других структурных элементов, ассоциированных с областью, например Bд обычно включает последовательность, кодирующую белок IV2a, например, следующим образом: IV2A IV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4.

В одном варианте реализации область E2B является химерной. То есть содержит последовательности ДНК из двух или более различных аденовирусных серотипов, например, из Ad3 и Ad11, например Ad11p. В одном варианте реализации область E2B имеет последовательность от 5068 до 10355 п.н. SEQ ID NO: 38 или последовательность, идентичную ей на 95, 96, 97, 98 или 99% по всей длине.

В одном варианте реализации E2B в компоненте Bд содержит последовательности, показанные в SEQ ID NO: 71 (которая соответствует SEQ ID NO: 3, раскрытой в WO2005/118825).

В одном варианте реализации Bд имеет последовательность от 3933 до 27184 п.н. SEQ ID NO: 38.

Используемое в настоящем изобретении обозначение E3 относится к части, кодирующей последовательность ДНК, или всей области E3 аденовируса (т.е. белка/полипептида), она может быть мутирована так, что белок, кодируемый геном E3, имеет консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, так что он имеет такие же функции как дикий тип (соответствующий немутантный белок); повышенную функцию по сравнению с белком дикого типа; сниженную функцию, например, отсутствие функции по сравнению с белком дикого типа; или имеет новую функцию по сравнению с белком дикого типа, или их комбинацию в зависимости от ситуации.

В одном варианте реализации область E3 происходит от серотипа аденовируса, указанного в Таблице 1, или их комбинации, в частности серотипа группы B, например Ad3, Ad7, Ad11 (в частности Ad11p), Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 или их комбинации, например Ad3, Ad11 (в частности, Ad11p) или их комбинации.

В одном варианте реализации область E3 частично удалена, например, удалена на 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5%.

В одном варианте реализации B_2 представляет собой связь, где ДНК, кодирующая область E3, отсутствует.

В одном варианте реализации ДНК, кодирующая область E3, может быть заменена или прервана трансгеном. Используемое в настоящем изобретении понятие "область E3, замещенная трансгеном", включает часть или всю область E3, замененную трансгеном.

В одном варианте реализации область B_2 содержит последовательность от 27185 п.н. до 28165 п.н. из SEQID NO: 38.

В одном варианте реализации B_2 состоит из последовательности от 27185 п.н. до 28165 п.н. из SEQ ID NO: 38.

Используемое в настоящем изобретении обозначение B_X относится к последовательности ДНК в окрестности 5'-конца гена L5 в B_B. Используемое в настоящем изобретении понятие "вблизи от 5'-конца гена L5 или проксимально от него", означает смежный (примыкающий) с 5'-концом гена L5 или некодирующей областью, по своей природе ассоциированной с ним, то есть примыкающий или смежный с 5'-концом гена L5 или некодирующей областью, по своей природе ассоциированной с ним. В альтернативном варианте, вблизи или проксимально может относиться к близости к гену L5, так что между областью B_X и 5'-концом гена L5 нет кодирующих последовательностей.

Таким образом, в одном варианте реализации B_X присоединяется непосредственно к основанию L5, которое представляет собой, например, начало кодирующей последовательности гена L5.

Таким образом, в одном варианте реализации B_X присоединяется непосредственно к основанию L5, которое представляет собой, например, начало некодирующей последовательности, или присоединяется непосредственно к некодирующей области, естественно ассоциированной с L5. Используемое в настоящем изобретении понятие "некодирующая область, естественно ассоциированная с L5", относится к части всех некодирующих областей, которая является частью гена L5 или является смежной с ним, но не является частью другого гена.

В одном варианте реализации B_X содержит последовательность SEQ ID NO: 39. Эта последовательность представляет собой искусственную некодирующую последовательность, в которую может быть вставлена последовательность ДНК, например, содержащая трансген (или трансгенную кассету), сайт рестрикции или их комбинацию. Эта последовательность является полезной, поскольку она действует как буфер в том смысле, что обеспечивает некоторую гибкость в отношении точного местоположения трансгена, в то же время сводя к минимуму разрушительное воздействие на стабильность и жизнеспособность вируса.

Вставка(и) может (могут) происходить в любом месте в SEQ ID NO: 39 от 5'-конца, 3'-конца или в любой точке между 1 и 201 п.н., например, между парами оснований 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34, 34/35, 35/36, 36/37, 37/38, 38/39, 39/40, 40/41, 41/42, 42/43, 43/44, 44/45, 45/46, 46/47, 47/48, 48/49, 49/50, 50/51, 51/52, 52/53, 53/54, 54/55, 55/56, 56/57, 57/58, 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 63/64, 64/65, 65/66, 66/67, 67/68, 68/69, 69/70, 70/71, 71/72, 72/73, 73/74, 74/75, 75/76, 76/77, 77/78, 78/79, 79/80, 80/81, 81/82, 82/83, 83/84, 84/85, 85/86, 86/87, 87/88, 88/89, 89/90, 90/91, 91/92, 92/93, 93/94, 94/95, 95/96, 96/97, 97/98, 98/99, 99/100, 100/101, 101/102, 102/103, 103/104, 104/105, 105/106, 106/107, 107/108, 108/109, 109/110, 110/111, 111/112, 112/113, 113/114, 114/115, 115/116, 116/117, 117/118, 118/119, 119/120, 120/121, 121/122, 122/123, 123/124, 124/125, 125/126, 126/127, 127/128,128/129, 129/130, 130/131, 131/132, 132/133, 133/134, 134/135, 135/136, 136/137, 137/138, 138/139, 139/140, 140/141, 141/142, 142/143, 143/144, 144/145, 145/146, 146/147, 147/148, 148/149, 150/151, 151/152, 152/153, 153/154, 154/155, 155/156, 156/157, 157/158, 158/159, 159/160, 160/161, 161/162, 162/163, 163/164, 164/165, 165/166, 166/167, 167/168, 168/169, 169/170, 170/171, 171/172, 172/173, 173/174, 174/175, 175/176, 176/177, 177/178, 178/179, 179/180, 180/181, 181/182, 182/183, 183/184, 184/185, 185/186, 186/187, 187/188, 189/190, 190/191, 191/192, 192/193, 193/194, 194/195, 195/196, 196/197, 197/198, 198/199, 199/200 или 200/201.

В одном варианте реализации B_X содержит SEQ ID NO: 39 с последовательностью ДНК, вставленной между 27 п.н. и 28 п.н., или в месте, соответствующем месту между положениями 28192 п.н. и 28193 п.н. из SEQ ID NO: 38.

В одном варианте реализации вставка представляет собой вставку сайта рестрикции. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции. В одном варианте реализации сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции 19 п.н., содержащую 2 сайта рестрикции. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции 9 п.н., содержащую 1 сайт рестрикции. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции и, по меньшей мере, один трансген, например, один или два трансгена. В одном варианте реализации сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции 19 п.н., содержащую 2 сайта рестрикции и, по меньшей мере, один трансген, например, один или два трансгена. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции 9 п.н., содержащую 1 сайт рестрикции и, по меньшей мере, один трансген, например, один, два или три трансгена, например один или два трансгена. В одном варианте реализации два сайта рестрикции вмещают в виде сэндвича один или более, например два трансгена (например, в трансгенной кассете). В одном варианте реализации, когда B_X содержит два сайта рестрикции, указанные сайты рестрикции отличаются друг от друга. В одном варианте реализации указанные один или более сайтов рестрикции в B_X не встречаются в природе в конкретном геноме аденовируса, в который они были вставлены. В одном варианте реализации указанные один или более сайтов рестрикции в B_X отличаются от других сайтов рестрикции, расположенных в других местах генома аденовируса, например, отличаются от встречающихся в природе сайтов рестрикции и/или сайтов рестрикции, введенных в другие части генома, таких как сайт рестрикции, введенный в B_Y. Таким образом, в одном варианте реализации сайт или сайты рестрикции позволяют разрезать ДНК в сечении в конкретном месте.

Использование "уникальных" сайтов рестрикции дает преимущество, обеспечивая селективность и контроль того, где именно разрезается геном вируса, просто с помощью соответствующей рестриктазы.

"Разрезание в конкретном месте", в том смысле, в котором оно в настоящем изобретении используется, относится к случаю, когда использование фермента, специфичного к сайтам рестрикции, разрезает вирус только в желаемом месте, обычно в одном месте, хотя иногда это может быть пара мест. Используемое в настоящем изобретении понятие "пара мест" относится к двум сайтам рестрикции в близи друг от друга, которые предназначены для разрезания одним и тем же ферментом (то есть не могут быть различены между собой).

В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции представляет собой SEQ ID NO: 50.

В одном варианте реализации B_X имеет последовательность от 28166 п.о. до 28366 п.о. SEQ ID NO: 38.

В одном варианте реализации B_X представляет собой связь.

В одном варианте реализации B_X содержит сайт рестрикции, например, 1, 2, 3 или 4 сайта рестрикции, например 1 или 2. В одном варианте реализации B_X содержит по меньшей мере один трансген, например 1 или 2 трансгена. В одном варианте реализации B_X содержит, по меньшей мере, один трансген, например, 1 или 2 трансгена и один или более сайтов рестрикции, например, 2 или 3 сайта рестрикции, в частности, когда сайты рестрикции вмещают в виде сэндвича ген или последовательность ДНК, содержащую гены, что позволяет ему/им быть вырезанными в конкретном месте из генома и/или замененными. В альтернативном варианте, сайты рестрикции могут вмещать в виде сэндвича каждый ген, например, когда есть два трансгена, необходимы три разных сайта рестрикции, чтобы гарантировать, что гены могут быть избирательно вырезаны и/или заменены. В одном варианте реализации один или более, например, все трансгены находятся в форме трансгенной кассеты. В одном варианте реализации B_X содер-

жит SEQ ID NO: 39. В одном варианте реализации SEQ ID NO: 39 прерывается, например, трансгеном. В одном варианте реализации SEQ ID NO: 39 является непрерывной. В одном варианте реализации B_X не содержит сайт рестрикции. В одном варианте реализации B_X представляет собой связь. В одном варианте реализации B_X содержит или состоит из одного или нескольких трансгенов.

В одном варианте реализации B_Y содержит сайт рестрикции, например 1, 2, 3 или 4 сайта рестрикции, например 1 или 2. В одном варианте реализации B_Y содержит, по меньшей мере, один трансген, например 1 или 2 трансгена. В одном варианте реализации B_Y содержит, по меньшей мере, один трансген, например, 1 или 2 трансгена и один или более сайтов рестрикции, например, 2 или 3 сайта рестрикции, в частности, когда сайты рестрикции вмещают в виде сэндвича ген или последовательность ДНК, содержащую гены, что позволяет ему/им быть вырезанными в конкретном месте из генома и/или замененными. В качестве альтернативы сайты рестрикции могут включать в себя в виде сэндвича каждый ген, например, когда имеется два трансгена, требуются три разных сайта рестрикции, чтобы гарантировать, что гены могут быть селективно вырезаны и/или заменены. В одном варианте реализации один или более, например, все, трансгены находятся в форме трансгенной кассеты. В одном варианте реализации B_Y содержит SEQ ID NO: 40. В одном варианте реализации SEQ ID NO: 40 прерывается, например, трансгеном. В варианте реализации SEQ ID NO: 40 является непрерывной. В одном варианте реализации B_Y не содержит сайт рестрикции. В одном варианте реализации B_Y представляет собой связь. В одном варианте реализации B_Y содержит или состоит из одного или нескольких трансгенов.

В одном варианте реализации B_X и B_Y каждый содержит сайт рестрикции, например, 1, 2, 3 или 4 сайта рестрикции, например 1 или 2. В одном варианте реализации B_X и B_Y каждый содержит по меньшей мере один трансген, например 1 или 2 трансгена. В одном варианте реализации B_X и B_Y каждый содержит, по меньшей мере, один трансген, например, 1 или 2 трансгена и один или более сайтов рестрикции, например, 2 или 3 сайта рестрикции, в частности, когда сайты рестрикции вмещают в виде сэндвича геном или последовательность ДНК, содержащую гены что позволяет ему или ей быть вырезанными из генома и/или замененными. В качестве альтернативы сайты рестрикции могут включать в виде сэндвича в себя каждый ген, например, когда имеется два трансгена, требуются три разных сайта рестрикции, чтобы гарантировать, что гены могут быть селективно вырезаны и/или заменены. В одном варианте реализации один или более, например, все, трансгены находятся в форме трансгенной кассеты. В одном варианте реализации B_X и B_Y содержат SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40 соответственно. В одном варианте реализации B_X и B_Y не содержат сайт рестрикции. В одном варианте реализации B_X представляет собой связь, а B_Y не является связью. В одном варианте реализации B_Y представляет собой связь, а B_X не является связью.

Используемый в настоящем изобретении термин B_B означает последовательность ДНК, кодирующую область L5. В данном контексте "область L5" относится к последовательности ДНК, содержащей ген, кодирующий полипептид/белок фибера, в зависимости от ситуации. Ген/область фибера кодирует белок фибера, который является основным компонентом капсида аденовирусов. Фибер работает при распознавании рецепторов и способствует способности аденовируса избирательно связывать и инфицировать клетки.

В вирусах по настоящему изобретению фибер может быть из любого аденовирусного штамма серотипа 11, такого как Ad11p.

В одном варианте реализации B_B имеет последовательность от 28367 п.н. до 29344 п.н. из SEQ ID NO: 38.

Последовательность ДНК по отношению к B_Y в используемом в настоящем изобретении значении относится к последовательности ДНК вблизи 3'-конца гена L5 из B_B. "Вблизи или проксимально от 3'-вблизи гена L5", в используемом в настоящем изобретении значении, понимается смежный (примыкающий) с 3'-концом гена L5 или некодирующей областью, по своей природе связанная с ним, то есть примыкающий к 3'-концу гена L5 или некодирующей области, по своей природе ассоциированной с ним (т.е. вся или часть некодирующей последовательности, эндогенной по отношению к L5). В альтернативном варианте, "вблизи или проксимально" может относиться к близости к гену L5, так что между областью B_Y и 3'-концом гена L5 нет кодирующих последовательностей.

Таким образом, в одном варианте реализации B_Y соединяется непосредственно с основанием L5, которое представляет собой "конец" кодирующей последовательности.

Таким образом, в одном варианте реализации B_Y соединяется непосредственно с основанием L5, которое представляет собой "конец" некодирующей последовательности, или соединяется непосредственно с некодирующей областью, естественно ассоциированной с L5.

Понятия "по своей природе" и "естественно" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. В одном варианте реализации B_Y содержит последовательность SEQ ID NO: 40. Эта последовательность представляет собой некодирующую последовательность, в которую может быть вставлена последовательность ДНК, например, содержащая трансген (или трансгенную кассету), сайт рестрикции или их комбинацию. Эта последовательность является полезной, поскольку она действует как буфер, который обеспечивает некоторую гибкость в отношении точного местоположения трансгена, в то же время сводя к минимуму разрушительное воздействие на стабильность и жизнеспособность вируса.

Вставка(и) может происходить в любом месте SEQ ID NO: 40 от 5'-конца, 3'-конца или в любой точке от 1 до 35 п.н., например, между парами оснований 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34 или 34/35.

В одном варианте реализации B_Y содержит SEQ ID NO: 40 с последовательностью ДНК, вставленной между положениями 12 и 13 п.н. или местом, соответствующим 29356 п.н. и 29357 п.н. в SEQ ID NO: 38. В одном варианте реализации эта вставка представляет собой вставку сайта рестрикции. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции. В одном варианте реализации сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции 19 п.н., содержащую 2 сайта рестрикции. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции 9 п.н., содержащую 1 сайт рестрикции. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции и, по меньшей мере, один трансген, например, один или три трансгена, например, один или два трансгена. В одном варианте реализации сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции 19 п.н., содержащую 2 сайта рестрикции и, по меньшей мере, один трансген, например, один или два трансгена. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции 9 п.н., содержащую 1 сайт рестрикции и, по меньшей мере, один трансген, например, один или два трансгена, например один или два трансгена. В одном варианте реализации два сайта рестрикции вмещают в виде сэндвича один или более, например, два, трансгена (например, в трансгенной кассете). В одном варианте реализации, когда B_Y содержит два сайта рестрикции, указанные сайты рестрикции отличаются друг от друга. В одном варианте реализации указанные один или более сайтов рестрикции в B_Y не встречаются в природе (например, уникальны) в конкретном геноме аденовируса, в который они были вставлены. В одном варианте реализации указанные один или более сайтов рестрикции в B_X отличаются от других сайтов рестрикции, расположенных в других местах генома аденовируса, например, отличаются от встречающихся в природе сайтов рестрикции и/или сайтов рестрикции, введенных в другие части генома, например B_X. Таким образом, в одном варианте реализации сайт или сайты рестрикции позволяют разрезать ДНК в сечении в конкретном месте.

В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции представляет собой SEQ ID NO: 51.

В одном варианте реализации B_Y имеет последовательность от 29345 п.н. до 29379 п.н. из SEQ ID NO: 38.

В одном варианте реализации B_Y представляет собой связь.

В одном варианте реализации вставка находится после 12 п.н. в SEQ ID NO: 40.

В одном варианте реализации вставка находится приблизительно в положении 29356 п.н. из SEQ ID NO: 38.

В одном варианте реализации вставка представляет собой трансгенную кассету, содержащую один или более трансгенов, например 1, 2 или 3, например 1 или 2 трансгена.

Используемое в настоящем изобретении обозначение E4 относится к части, кодирующей последовательность ДНК, или всей области E4 аденовируса (т.е. области полипептида/белка), которая может быть мутирована так, что белок, кодируемый геном E4, имеет консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, так что он имеет ту же функцию, что и дикий тип (то есть соответствующий немутантный белок);

повышенную функцию по сравнению с белком дикого типа; сниженную функцию, например, отсутствие функции по сравнению с белком дикого типа; или имеет новую функцию по сравнению с белком дикого типа, или их комбинацию в зависимости от ситуации. В одном варианте реализации в области E4 выполнена делеция E4orf4.

В одном варианте реализации область E4 частично удалена, например, удалена на 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%. В одном варианте реализации область E4 имеет последовательность от 32188 п.н. до 29380 п.н. из SEQ ID NO: 38.

В одном варианте реализации B_3 представляет собой связь, то есть в ней E4 отсутствует.

In одном варианте реализации B_3 имеет последовательность от 32188 до 29380 п.н. SEQ ID из NO: 38.

Используемые в настоящем изобретении диапазоны чисел и номеров включают конечные точки.

Специалист поймет, что элементы в формулах в настоящем изобретении, таких как формулы (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id) и (Ie), являются смежными и могут содержать некодирующие последовательности ДНК, а также гены и кодирующие последовательности ДНК (структурные признаки), упомянутые в настоящем изобретении. В одном или нескольких вариантах реализации формулы настоящего изобретения пытаются описать встречающуюся в природе последовательность в геноме аденовируса. В этом контексте специалисту будет понятно, что формула относится к основным элементам, характеризующим соответствующий участок генома, и не предназначена для исчерпывающего описания геномного участка ДНК.

Используемые в настоящем изобретении обозначения E1A, E1B, E3 и E4, каждое независимо, относятся к дикому типу и его эквивалентам, мутированным или частично удаленным формам каждой области, согласно настоящему описанию, в частности последовательности дикого типа из известного аденови-

руса.

Используемый в настоящем изобретении термин "вставка" относится к последовательности ДНК, которая включена либо на 5'-конце, на 3'-конце, либо в заданном эталонном сегменте последовательности ДНК, так что она прерывает эталонную последовательность. Последняя представляет собой эталонную последовательность, используемую в качестве контрольной точки, относительно которой расположена вставка. В контексте настоящего изобретения вставки обычно встречаются либо в SEQ ID NO: 10, либо в SEQ ID NO: 11. Вставка может быть либо вставкой сайта рестрикции, либо трансгенной кассеты, либо обоих. Когда последовательность прервана, вирус все равно будет содержать исходную последовательность, но, как правило, она будет состоять из двух фрагментов, вмещающих вставку как сэндвич.

В одном варианте реализации трансген или трансгенная кассета не содержит несмещенного инсерционного транспозона, такого как транспозон TN7, или его части. Используемый в настоящем изобретении термин "транспозон Tn7" относится к несмещенному инсерционному транспозону, как описано в WO2008/080003.

В одном варианте реализации один или более сайтов рестрикции в B_X и B_Y независимо выбраны из сайта рестрикции, специфичного к ферменту, описанному в настоящем изобретении, например, NotI, FseI, AsiSI, SgfI и SbfI, в частности, вставленные сайты рестрикции все разные, например сайты, специфичные к NotI и сайты, специфичные к FseI, расположенные в B_X, и SgfI и SbfI, расположенные в B_Y.

Как обсуждалось выше, в одном варианте реализации область B_X и/или B_Y не содержат сайт рестрикции. Преимущество состоит в том, что вирусы и конструкции по настоящему изобретению могут быть получены без сайтов рестрикции, например, с использованием методов синтеза. Эти методики позволяют большую гибкость в создании вирусов и конструкций. Кроме того, авторы настоящего изобретения установили, что свойства вирусов и конструкций не снижаются, когда их получают синтетическими методами.

Промоторы

Используемый в настоящем изобретении термин "промотор" означает область ДНК, которая инициирует транскрипцию определенного гена или генов. Промоторы, как правило, располагаются проксимально к генам, которые они транскрибируют, на одной и той же цепи и "слева" (то есть в направлении 5' от него) на ДНК. "Проксимально" в этом контексте, означает достаточно близко, чтобы выполнять функции промотора. В одном варианте реализации промотор находится в пределах 100 п.н. от сайта начала транскрипции. Таким образом, используемый в настоящем изобретении термин "эндогенный промотор" относится к промотору, который встречается в природе (т.е. является нативным) для аденовируса (или конструкции), в который встраивается трансген. В одном или нескольких вариантах реализации используемый эндогенный промотор представляет собой встречающийся в природе промотор в вирусе в его исходном положении в геноме вируса, в частности, это главной или единственный промотор, используемый для экспрессии трансгена или трансгенов. В одном варианте реализации эндогенный промотор, используемый для стимуляции трансляции и, необязательно, транскрипции трансгена, является резидентным, то есть интегрированным в геном аденовируса, и не введенным ранее рекомбинантными методами.

Используемый в настоящем изобретении термин "под контролем эндогенного промотора" означает, что трансген/трансгенная кассета вставлены в соответствующей ориентации, чтобы находиться под контролем указанного эндогенного промотора. То есть, когда промотор обычно находится на антисмысловой цепи, кассета вставлена, например, в антисмысловой ориентации.

С учетом вышесказанного, гены могут быть экспрессированы в одной из двух ориентаций. Однако, как правило, одна ориентация обеспечивает повышенные уровни экспрессии по сравнению с другой ориентацией для данного (конкретного) трансгена.

В одном варианте реализации кассета находится в смысловой ориентации. То есть она транскрибируется в направлении от 5' к 3'. В одном варианте реализации кассета находится в антисмысловой ориентации. То есть она транскрибируется в ориентации от 3' к 5'.

Эндогенные промоторы в вирусе могут быть применены, например, путем использования гена, кодирующего трансген и последовательность акцептора сплайсинга. Таким образом, в одном варианте реализации кассета будет содержать последовательность акцептора сплайсинга, когда находится под контролем эндогенного промотора. Таким образом, в одном варианте реализации кодирующая последовательность, например последовательность, кодирующая антитело или антитело-связывающий фрагмент, дополнительно содержит последовательность акцептора сплайсинга.

В одном варианте реализации трансген, трансгены или трансгенная кассета находятся под контролем промотора E4 или главного позднего промотора, такого как главный поздний промотор (ML-промотор).

"Под контролем" в настоящем изобретении означает, что трансген активируется, то есть транскрибируется, когда это диктует конкретный промотор.

"Главный поздний промотор" (ML-промотор или MLP) в контексте настоящей заявки относится к аденовирусному промотору, который контролирует экспрессию "поздних экспрессируемых" генов, таких как ген L5. MLP является промотором "смысловой цепи". То есть промотор влияет на гены, которые находятся "справа" от промотора в направлении 5'-3'. Термин "главный поздний промотор" в настоящем

изобретении относится к исходному главному позднему промотору, расположенному в геноме вируса.

Используемый в настоящем изобретении термин "промотор E4" относится к аденовирусному промотору области E4. Область E4 является антисмысловой областью; следовательно, промотор является антисмысловым промотором. То есть, промотор находится "слева" от области E4 в направлении 3'-5'. Следовательно, любая трансгенная кассета под контролем промотора E4 должна быть ориентирована соответствующим образом. В одном варианте реализации кассета под контролем промотора E4 находится в антисмысловой ориентации. В одном варианте реализации кассета находится под контролем промотора E4 в смысловой ориентации. Используемый в настоящем изобретении термин "промотор E4" относится к исходному промотору E4, расположенному в геноме вируса.

Таким образом, в одном варианте реализации обеспечивается компетентный по репликации онколитический аденовирусный серотипа 11 (такой как Ad11p) или его производное вируса, в котором фибер, гексон и капсид представляют собой серотип 11 (такой как Ad11p), в котором геном вируса содержит последовательность ДНК, кодирующую терапевтическое антитело или антитело-связывающий фрагмент (такой как биспецифичный активатор Т-клеток), в котором указанная последовательность ДНК находится под контролем промотора, эндогенного по отношению к аденовирусу, выбранного из состоящего из E4 и главного позднего промотора (т.е. промотора E4 или главного позднего промотора), так что трансген не препятствует репликации вируса, например, ассоциирован с областью L5 (то есть до или после указанной области), например расположен после L5 в геноме вируса, в частности, расположен между L5 и областью E4.

В одном варианте реализации эндогенный промотор вводят в вирусный геном в желаемом месте рекомбинантными методами, например, вводят в трансгенную кассету. Тем не менее, в контексте настоящей заявки это расположение обычно будет обозначаться как экзогенный промотор.

В одном варианте реализации трансгенная кассета содержит экзогенный промотор. Используемый в настоящем изобретении термин "экзогенный промотор" относится к промотору, который не встречается в природе в аденовирусе, в который вставлен трансген. Как правило, экзогенные промоторы происходят от других вирусов или являются промоторами млекопитающих. Используемый в настоящем изобретении термин "экзогенный промотор" означает элемент ДНК, обычно расположенный "слева" от целевого гена, который регулирует транскрипцию гена.

В одном варианте регулятор экспрессии гена представляет собой экзогенный промотор, например, CMV (цитомегаловирусный промотор), CBA (куриный бета-актиновый промотор) или PGK (промотор фосфоглицераткиназы 1), такой как CMV-промотор.

В одном варианте реализации используемый экзогенный промотор CMV имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 52. В одном варианте реализации используемый экзогенный промотор PGK имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 53. В одном варианте реализации используемый экзогенный промотор CBA имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 54.

В одном варианте реализации предложен компетентный по репликации онколитический аденовирусный серотип 11 (такой как Ad11p) или его производное вируса, в котором фибер, гексон и капсид представляют собой серотип 11 (такой как Ad11p), в котором геном вируса содержит последовательность ДНК, кодирующую терапевтическое антитело или антитело-связывающий фрагмент (такой как биспецифичный активатор Т-клеток согласно настоящему изобретению), расположенный в части генома вируса, которая экспрессируется в конце цикла репликации вируса и такая, что трансген не препятствует репликации вируса, причем указанная последовательность ДНК находится под контролем промотора, экзогенного по отношению к аденовирусу (например, промотор CMV). В одном варианте реализации последовательность ДНК, кодирующая антитело или фрагмент (такой как биспецифичный активатор Т-клеток согласно настоящему изобретению), ассоциирована с областью L5, как описано в другом месте в настоящем изобретении, в частности, расположена между областью L5 и E4.

В одном варианте реализации экзогенный промотор представляет собой антигенпрезентирующий клеточный промотор. Используемый в настоящем изобретении термин "антигенпрезентирующий клеточный промотор" относится к промотору гена, который избирательно экспрессируется антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки или макрофаги. Такие гены включают, среди прочего: FLT-3, FLT-3 лиганд, TLR, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, лиганд GITR, IFN-α2, IL-12, IL-23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, TSLP рецептор, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 или CD304; медиаторы процессинга и презентации антигена, такие как CTIIA или GILT. Таким образом, в одном варианте реализации экзогенный промотор подходит для селективной экспрессии трансгенов в указанных антигенпрезентирующих клетках.

Другие регуляторные последовательности.

Используемый в настоящем изобретении термин "регулятор экспрессии гена" (или регулятор/регуляторный элемент) относится к генетическому признаку, такому как промотор, энхансер или последовательность акцептора сплайсинга, которая играет роль в экспрессии гена, как правило, посредством инициирования или усиления транскрипции или трансляции.

Используемые в настоящем изобретении термины "последовательность акцептора сплайсинга",

"акцептор сплайсинга" или "сайт сплайсинга" относятся к регуляторной последовательности, определяющей, когда молекула мРНК будет распознаваться небольшими ядерными рибонуклеопротеинами комплекса сплайсосомы. После сборки сплайсосома катализирует сплайсинг между сайтом акцептора сплайсинга молекулы мРНК и "левым" сайтом донора сплайсинга, продуцируя зрелую молекулу мРНК, которая может транслироваться с получением единого полипептида или белка.

В настоящем изобретении могут быть использованы последовательности акцептора сплайсинга разного размера, и они могут быть описаны как короткий акцептор сплайсинга (маленький), акцептор сплайсинга (средний) и разветвленный акцептор сплайсинга (большой).

Используемый в настоящем изобретении термин "SSA" означает короткий акцептор сплайсинга, обычно содержащий только сайт сплайсинга, например 4 пары оснований. Используемый в настоящем изобретении термин "SA" означает акцептор сплайсинга, обычно включающий короткий акцептор сплайсинга и полипиримидиновый тракт, например, 16 п.н. Используемый в настоящем изобретении термин bSA означает разветвленный акцептор сплайсинга, обычно содержащий короткий акцептор сплайсинга, полипиримидиновый тракт и точку разветвления, например, 26 пар оснований.

В одном варианте реализации акцептор сплайсинга, используемый в конструкциях по изобретению, приведен в SEQ ID NO: 55-57. В одном варианте реализации SSA имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 55. В одном варианте реализации SA имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 56. В одном варианте реализации bSA имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 57. В одном варианте реализации последовательность акцептора сплайсинга независимо выбрана из группы, содержащей TGCTAATCTT CCTTTCTCTC TTCAGG (SEQ ID NO: 57), CCTTTCTCTCTT CAGG (SEQ ID NO: 56) и CAGG (SEQ ID NO: 55).

В одном варианте реализации сайт сплайсинга непосредственно обрабатывается (то есть за ней следует в направлении от 5' до 3') консенсусной последовательностью Козака, включающей CCACC. В одном варианте реализации сайт сплайсинга и последовательность Козака перемежаются вплоть до 100 или менее пар оснований. В одном варианте реализации последовательность Козака имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 58.

Как правило, будучи под контролем эндогенного или экзогенного промотора (такого как эндогенный промотор), кодирующей последовательности будет непосредственно предшествовать последовательность Козака. Начало кодирующей области обозначено инициирующим кодоном (AUG), например, в контексте последовательности (gcc)gccRccAUGg [SEQ ID NO: 59] начало "начала" кодирующих последовательностей обозначено основаниями, выделенными жирным шрифтом. Буквы в нижнем регистре обозначают общие основания в этом положении (которые, тем не менее, могут варьироваться), а буквы в верхнем регистре указывают на высококонсервативные основания, то есть последовательность "AUGG" является постоянной или редко, если вообще, изменяется; "R" указывает, что в этом положении обычно наблюдается пурин (аденин или гуанин), а последовательность в скобках (gcc) имеет неопределенное значение. Таким образом, в одном варианте реализации кодон инициации AUG включен в последовательность Козака.

Используемый в настоящем изобретении термин "последовательность ДНК внутренней посадки рибосомы" относится к последовательности ДНК, кодирующей участок внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES обозначает в настоящем изобретении нуклеотидную последовательность, которая позволяет инициировать трансляцию последовательности матричной РНК (мРНК), включая инициацию, начинающуюся в последовательности мРНК. Это особенно полезно, когда кассета кодирует полицистронную мРНК. Использование IRES приводит к получению полицистронной мРНК, которая транслируется в несколько отдельных белков или пептидов. В одном варианте реализации последовательность ДНК внутренней посадки рибосомы имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 60. В одном варианте реализации конкретный IRES используется в геноме только один раз. Это может иметь преимущества в отношении стабильности генома.

Используемый в настоящем изобретении термин "2A-пептид с высокой эффективностью саморасщепления" или "2A-пептид" относится к пептиду, который эффективно расщепляется после трансляции. Подходящие 2A-пептиды включают P2A, F2A, E2A и T2A. Авторы настоящего изобретения заметили, что если определенная последовательность ДНК, кодирующая данный 2A-пептид, используется один раз, эта же конкретная последовательность ДНК не может использоваться во второй раз. Однако избыточность в коде ДНК может быть использована для генерации последовательности ДНК, которая транслируется в тот же 2A-пептид. Использование 2A-пептидов особенно полезно, когда кассета кодирует полицистронную мРНК. Использование 2A-пептидов приводит к трансляции одной полипептидной цепи, которая после трансляции модифицируется для генерации множества отдельных белков или пептидов.

В одном варианте реализации используемый кодированный пептид P2A имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В одном варианте реализации используемый кодированный пептид F2A имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. В одном варианте реализации используемый кодированный пептид E2A имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В одном варианте реализации используемый кодированный пептид T2A имеет аминокислотную последователь-

ность SEQ ID NO: 64.

В одном варианте реализации мРНК или каждая мРНК, кодируемая трансгеном (-ами), содержат сигнальную последовательность полиаденилирования, например, обычно в конце последовательности мРНК, например, как показано в SEQ ID NO: 65. Таким образом, в одном варианте реализации трансген или трансгенная кассета содержат по меньшей мере одну последовательность, кодирующую последовательность сигнала полиаденилирования.

"PolyA", "сигнал полиаденилирования" или "последовательность полиаденилирования" в настоящем изобретении означают последовательность ДНК, обычно содержащую сайт AATAAA, которая после транскрибирования может быть распознана мультипротеиновым комплексом, который расщепляет и полиаденилирует возникающую молекулу мРНК.

В одном варианте реализации последовательность полиаденилирования имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 65.

В одном варианте реализации эта конструкция не включает последовательность полиаденилирования. В одном варианте реализации регулятор экспрессии гена представляет собой последовательность акцептора сплайсинга.

В одном варианте реализации последовательность, кодирующая белок/полипептид/пептид, такой как антитело или фрагмент антитела (такой как биспецифичный активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением), дополнительно содержит сигнал полиаденилирования.

Молекулы, кодируемые трансгеном.

Как описано в настоящем изобретении, по меньшей мере, один трансген в вирусе кодирует биспецифичный активатор Т-клеток, причем один связывающий домен является специфичным для антигена поверхности Т-клеток. Второй связывающий домен может быть нацелен на подходящий антиген, например патогенный антиген, раковый антиген, антиген, который присутствует в строме.

Раковые антигены (также называемые опухолевыми антигенами) представляют собой одну категорию, представляющую особый интерес, и включают, например, выбранные из CEA, MUC-1, EpCAM, HER рецепторы HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, углеводные антигены Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-кадгерин, SPARC, ErbB2, ErbB3, WT1, MUC1, LMP2, идиотип, HPV E6&E7, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE A3, p53 не-мутантный, p53 мутантный, NY-ESO-1, GD2, PSMA, PCSA, PSA, MelanA/MART1, Ras мутантный, протеиназа3 (PR1), bcr-abl, ирозиназа, сурвивин, PSA, hTERT, в частности WT1, MUC1, HER-2/neu, NY-ESO-1, сурвивин и hTERT.

Антигены, которые присутствуют в строме, включают в себя антигены фибробластов, например, описанные в настоящем изобретении, такие как FAP, антигены опухоль-ассоциированных макрофагов и антигены миелоидных супрессорных клеток, например, включают CD163, CD206, CD68, CD11c, CD11b, CD14, CSF1 рецептор, CD15, CD33 и CD66b.

Приведенный ниже список мишеней может, при необходимости, быть закодирован в биспецифичном активаторе Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением или, в качестве альтернативы, может быть представлен в качестве дополнительного терапевтического трансгена, или и то, и другое.

В одном варианте реализации трансген или трансгены независимо кодируют белок, пептид, молекулу РНК, например молекулу РНК. Преимущество состоит в том, что трансген может быть доставлен внутриклеточно и впоследствии может быть транскрибирован и,

если необходимо, транслирован. Примеры генетического материала, кодируемого трансгеном, включают, например, антитела или их связывающие фрагменты, хемокины, цитокины, иммуномодуляторы, ферменты (например, способные превращать пролекарство в активный агент) и молекулу РНК-и.

Используемый в настоящем изобретении термин "пептид" относится к аминокислотной последовательности от 2 до 50 остатков, например от 5 до 20 остатков. Используемый в настоящем изобретении термин "полипептид" относится к аминокислотной последовательности из более 50 остатков без третичной структуры, в частности без вторичной и третичной структуры. Термин "белок" относится к аминокислотной последовательности из более 50 остатков со вторичной и/или третичной структурой, в частности со второй и третичной структурой.

В одном варианте реализации кодирующая последовательность кодирует терапевтическую РНК, терапевтический пептид, терапевтический полипептид или терапевтический белок (т.е. представляет собой терапевтический ген).

Используемый в настоящем изобретении термин "иммуномодуляторный ген или трансген" означает ген, который кодирует пептидную или белковую молекулу, которая может качественно или количественно модифицировать активность клеток иммунной системы.

Используемый в настоящем изобретении термин "терапевтический ген" означает ген, кодирующий объект, который может быть полезен для лечения, облегчения или предотвращения заболевания, например, ген экспрессирует терапевтический белок, полипептид, пептид или РНК, которые, по меньшей мере, замедляют, останавливают или обращают вспять прогрессирование заболевания, такого как рак.

В одном варианте реализации объект, кодируемый трансгеном при транскрибировании или трансляции в клетке, такой как раковая клетка, увеличивает выработку клеткой сигналов опасности. Используемый в настоящем изобретении термин "сигналы опасности" относится к множеству молекул, проду-

цируемых клетками, подвергающимися травмам, стрессу или неапоптотической смерти, которые действуют как сигналы тревоги, например, стимулируя клетки врожденной иммунной системы реагировать непосредственно, а также служат для усиления активация клеток адаптивной иммунной системы.

Известно, что микроокружение опухолей часто изменяется таким образом, что естественные иммунные реакции человека подавляются. Таким образом, способность повторно запускать иммунные ответы изнутри опухоли потенциально очень интересна при лечении рака.

В одном варианте реализации кодированный терапевтический пептид или белок предназначен для секретирования во внеклеточную среду. В одном варианте реализации функциональная РНК, пептид, полипептид или белок, такой как антитело, высвобождается во внешнее микроокружение клетки, например, в культуральный супернатант или in vivo: в ткань, строму, кровообращение, кровь и/или лимфатическую систему.

В одном варианте реализации пептид, полипептид или белок (включая биспецифичный активатор Т-клеток согласно настоящему изобретению), кодируемый трансгеном, содержит сигнальную последовательность. Используемый в настоящем изобретении термин "сигнальный пептид" относится к короткой пептидной последовательности из 13-36 остатков, расположенной на N-конце белков, которая способствует проникновению белка в секреторный путь для секреции или мембранной экспрессии. В одном варианте реализации лидерная последовательность (сигнальный пептид) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или 67.

В другом варианте реализации кодированный терапевтический пептид или белок, такой как антитело, предназначен для экспрессии в виде закрепленной на мембране формы в поверхностной мембране клетки, например, путем включения кодирования трансмембранного домена в белке или сайта для присоединения якоря липидной мембраны. Как правило, биспецифичный активатор Т-клеток по настоящему изобретению не экспрессируются в формате якоря поверхности клетки.

В одном варианте реализации функциональная РНК, пептид, полипептид или белок, например антитело, высвобождается из клетки, инфицированной аденовирусом, например, посредством активной секреции или в результате лизиса клеток. Таким образом, в одном варианте реализации аденовирус лизирует клетку, при этом высвобождая, функциональную РНК, пептид, полипептид или белок, такой как антитело.

В другом варианте реализации кодируемый дополнительный терапевтический пептид или белок, такой как антитело, предназначен для удержания в интактной клетке.

Преимущество состоит в том, что функциональные РНК, пептид, полипептид или белок, например антитела, экспрессируемые аденовирусами по настоящему изобретению, могут быть обнаружены в ткани in vivo в виде как мРНК, так и белка антитела. Кроме того, экспрессированная функциональная РНК, пептид или белок, например антитело, может связывать свой лиганд в ИФА. Кроме того, функциональная РНК, пептид, полипептид или белок, например антитело, являются обнаружимыми на ранней стадии (например, в течение 3 дней после заражения), и эта экспрессия сохраняется в течение нескольких недель.

В одном варианте реализации аденовирусы по настоящему изобретению экспрессируют функциональные РНК, пептид, полипептид или белок, например антитела, в течение приблизительно 3 дней или более после заражения, например, в течение приблизительно 36, 48, 60 или 72 ч или, например, 2, 3, 4, 5 или 6 дней.

В одном варианте реализации аденовирусы по настоящему изобретению экспрессируют функциональные РНК, пептид, полипептид или белок, например антитела, в течение нескольких недель, например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель. Например, в течение 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 или 42 дней.

Преимущество заключается в том, что экспрессия функциональной РНК, пептида или белка, например экспрессия антител, является достаточно высокой, чтобы можно было обнаружить эти функциональную РНК, пептид, полипептид или белок, например антитело, в крови.

В одном варианте реализации функциональные РНК, пептид или белок, например антитела, экспрессируемые аденовирусом по настоящему изобретению, попадают в кровоток и/или лимфатическую систему.

В одном варианте реализации аденовирус по настоящему изобретению представляет собой онколитический вирус, который имеет повышенный терапевтический индекс в отношении раковых клеток.

В одном варианте реализации кодирующая последовательность дополнительно кодирует функциональную РНК, например терапевтическую РНК.

Используемый в настоящем изобретении термин "функциональная РНК" относится к РНК, которая выполняет функцию, отличную от кодирования белка или пептида, и включает в себя, например, РНК-конструкции, подходящие для ингибирования или снижения активности генов, включая РНК-и, такие как кшРНК и микроРНК. Используемый в настоящем изобретении термин "кшРНК" относится к короткой шпилечной РНК, которая представляет собой последовательность РНК, которая делает крутой поворот шпильки, что можно использовать для сайленсинга экспрессии гена-мишени посредством РНК-интерференции (РНК-и). Термин "микроРНК" (микроРНК), используемый в настоящем изобретении,

относится к небольшой некодирующей молекуле РНК (содержащей приблизительно 22 нуклеотида), которая функционирует посредством спаривания оснований с комплементарными последовательностями в молекулах мРНК для регулирования экспрессии генов на уровне транскрипции или посттранскрипции. Цепи мРНК, связанные микроРНК, подвергаются сайленсингу, потому что они больше не могут транслироваться в белки рибосомами, и такие комплексы часто активно разбираются клеткой.

В одном варианте реализации трансген кодирует белок. Используемый в настоящем изобретении термин "белок" включает белковый лиганд, белковый рецептор или молекулу антитела.

Используемый в настоящем изобретении термин "белковый лиганд" относится к мембране клеточной поверхности или ее секретируемым белкам, связывающим ее фрагменты, которые связываются с клеточными рецепторами или иным образом взаимодействуют с ними, влияя на функцию клетки, например, посредством стимуляции внутриклеточной передачи сигналов и модуляции транскрипции генов в клетке. В одном варианте реализации экспрессированный белок сконструирован так, чтобы экспрессироваться на поверхности клетки и/или секретироваться из клетки.

В одном варианте реализации кодируемый белок представляет собой би-специфичное антитело, такое как биспецифичный активатор Т-клеток.

В одном варианте реализации трансген дополнительно кодирует фермент, например фермент, который помогает разрушать внеклеточный матрикс опухоли, например ДНКазу, коллагеназу, матриксную металлопротеиназу (такую как MMP2 или 14) или аналогичные.

Подходящие антитела и фрагменты антител могут быть агонистическими или антагонистическими и включать антитела с противораковой активностью и антитела, которые модифицируют ответы клеток-хозяев на рак, например агонистическое или антагонистическое антитело или фрагмент антитела могут уменьшать васкуляризацию или нормализовать васкуляризацию опухоли. В одном варианте реализации агонистические антитела или другие кодируемые белки могут сделать клетку-хозяина более видимой для врожденных и адаптивных иммунных ответов хозяина, например, путем экспрессии антигенов, сигналов опасности, цитокинов или хемокинов, чтобы привлечь и активировать их, или путем связывания с молекулами ко-стимулирующего или контрольного пути для усиления адаптивных иммунных реакций.

Используемые в настоящем изобретении термины "терапевтическое антитело" или "антитело-связывающий фрагмент" относятся к антителу или антитело-связывающему фрагменту, которые при введении в онколитический вирус оказывает полезное воздействие на патологию у пациента, например на рак, подвергаемый лечению.

Используемый в настоящем изобретении термин "полезное воздействие" относится к желательному и/или полезному эффекту антитела, экспрессируемого in vivo.

Классы терапевтических антител и фрагментов, связывающих антитела, включают анти-EGF-антитела, анти-VEGF-антитела, анти-PDGF-антитела, анти-CTLA-антитела, анти-PD1-антитела, анти-PDL1-антитела и анти-FGF-антитела.

Зарегистрированные терапевтические антитела, пригодные для включения в вирусы настоящего изобретения включают в себя абциксимаб, адалимумаб, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, брентуксимаб ведотин, канакинумаб, цетуксимаб, цертолизумаб, даклизумаб, деносумаб, экулизумаб, эфализумаб, гемтузумаб, голимумаб, ибритумомаб тиуксетан, инфликсимаб, ипилимумаб, муромонаб-CD3, офатумумаб, паливизумаб, панитумумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, тозитумомаб и трастузумаб.

В одном варианте реализации последовательности вариабельной области антитела для используемого антитела или фрагмента антитела на 95-100% аналогичны или идентичны вариабельной области бевацизумаба (также известного как Авастин®), например на 96, 97, 98 или 99% аналогичны или идентичны.

Также подходящими для включения в вирусы по настоящему изобретению являются кодирующие последовательности для тех антител и их связывающих фрагментов, которые одобрены для раковых показаний, например трастузумаб, тоситумомаб, ритуксимаб, панитумумаб, офатумумаб, ипилимумаб, ибритумомаб тиуксетан, гемтузумаб, деносумаб, цетуксимаб, брентуксимаб ведотин, авастин и адалимумаб.

В одном варианте реализации последовательности вариабельной области антитела для используемого антитела или фрагмента антитела на 95-100% аналогичны или идентичны вариабельным областям известного антитела или антитела, раскрытого в настоящем изобретении.

Используемый в настоящем изобретении термин "молекула антитела" включает антитела и их связывающие фрагменты.

Используемый в настоящем изобретении термин "антитело" обычно относится к полноразмерному антителу и биспецифичным или мультиспецифичным форматам, содержащим его.

Антитело-связывающие фрагменты включают фрагмент антитела, способный нацеливаться на антиген с такой же, сходной или лучшей специфичностью к исходному "антителу", из которого они были получены. Фрагменты антител включают в себя Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', $F(ab')_2$, Fv, однодоменные антитела (например, VH или VL или VHH), scFv, би-, три- или тетравалентные антитела, бис-scFv, диатела, триатела, тетратела и эпитоп-связывающие фрагменты любого из

вышеперечисленного (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9): 1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2 (3), 209-217). Способы создания и изготовления этих фрагментов антител хорошо известны в данной области техники (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Другие фрагменты антител для использования в настоящем изобретении включают фрагменты Fab и Fab', описанные в международных заявках на патент WO2005/003169, WO2005/003170 и WO2005/003171. Мультивалентные антитела могут иметь множество специфичностей, например, быть биспецифичными или моноспецифичными (см., например, WO 92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 и WO2010/035012).

Термин "специфичный", используемый в настоящем изобретении, предназначен для обозначения антитела или фрагмента, который распознает только антиген, к которому он специфичен, или к антителу или фрагменту, которые обладают значительно более высокой аффинностью связывания с антигеном, к которому он специфичен по сравнению со своей аффинностью связывания с антигенами, к которым он не специфичен, например аффинность связывания выше в 5, 6, 7, 8, 9, в 10 раз.

Известные антитела или антитело-связывающие фрагменты могут быть использованы для создания альтернативных форматов антител с теми же CDR или теми же вариабельными областями, например, полноразмерное антитело может быть легко преобразовано в Fab, Fab' или scFv фрагмент.

В конструкциях по настоящему изобретению может быть использован широкий спектр различных форм антител, включая молекулы антител от животных, отличающихся от человека, молекулы антител человека, молекулы гуманизированных антител и молекулы химерных антител.

В одном варианте реализации антитело или связывающий фрагмент является моноклональным. Моноклональные антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, таким как методика гибридомы (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497), методика триомы, методика гибридомы B-клеток человека (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) и методика EBV-гибридомы (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

В одном варианте реализации антитело или связывающий фрагмент не принадлежат человеку, то есть полностью нечеловеческого происхождения. Это возможно, поскольку антитела и фрагменты могут быть доставлены внутрь раковой клетки вирусом.

В одном варианте реализации антитело является химерным, например, имеет человеческую константную область (области) и вариабельные области, не относящиеся к человеку.

В одном варианте реализации антитело или связывающий фрагмент является человеческим, то есть полностью человеческого происхождения.

В одном варианте реализации антитело или связывающий фрагмент является гуманизированным. Гуманизированные антитела (которые включают в себя CDR-привитые антитела) представляют собой молекулы антител, имеющие одну или более областей, определяющих комплементарность (CDR), из видов животных, не являющихся человеком, и каркасную область из молекулы иммуноглобулина человека (см., например, US 5585909; WO91/09967). Понятно, что может потребоваться перенести только определяющие специфичность остатки CDR, а не весь CDR (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Гуманизированные антитела могут необязательно содержать один или более каркасных остатков, полученных от видов животных, не относящихся к человеку, например, из которых были получены эти CDR.

В одном варианте реализации кодирующая последовательность кодирует тяжелую цепь антитела, легкую цепь антитела или фрагмент антитела. Термин "тяжелая цепь" (HC) в настоящем изобретении относится к большой полипептидной субъединице антитела. Термин легкая цепь (LC) в настоящем изобретении относится к небольшой полипептидной субъединице антитела. В одном варианте реализации легкая цепь антитела содержит CL-домен, либо каппа, либо лямбда.

Антитела для использования в настоящем изобретении могут быть получены с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники. Для получения антител, которые специфично распознают антиген можно использовать антигенный полипептид/белок, включая слитые белки, в том числе клетки (рекомбинантные или природные), экспрессирующие указанный полипептид (например, активированные Т-клетки). Указанный полипептид может представлять собой "зрелый" полипептид или его биологически активный фрагмент или производное.

Скрининг антител можно проводить с использованием анализов для измерения связывания с антигеном и/или анализов для измерения способности антагонизировать рецептор. Примером количественного анализа связывания является ИФА, в частности, с использованием слитого белка (необязательно содержащего репортер), который иммобилизован на планшетах, и с использованием конъюгированного вторичного антитела для выявления анти-антигенного антитела, связанного со слитым белком.

Домены константной области молекулы антитела по настоящему изобретению, если они присутствуют, могут быть выбраны с учетом предполагаемой функции молекулы антитела и, в частности, эффекторных функций, которые могут потребоваться. Например, домены константной области могут быть доменами IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека. В частности, можно использовать домены константной области IgG человека, особенно изотипов IgG1 и IgG3, когда молекула антитела предназначена для терапевтических целей, и требуются эффекторные функции антитела. В альтернативном варианте, могут

быть использованы изотипы IgG2 и IgG4, когда молекула антитела предназначена для терапевтических целей и эффекторные функции антитела не требуются, например, для просто агонизирующей деятельности или для нейтрализации мишени. Понятно, что также могут быть использованы варианты последовательности этих доменов константной области. Например, можно использовать молекулы IgG4, в которых серин в положении 241 заменен на пролин, как описано в Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30(1), 105-108.

Для определенных функций антитела, например, для доставки сигналов активации к клеткам, несущим молекулу-мишень антитела, таким как клетки иммунной системы, может быть выгодно использовать мембранно-закрепленные версии антитела, так что антитело будет экспрессироваться на поверхности экспрессирующей клетки. Такие экспрессированные на клеточной поверхности молекулы обеспечивают эффективное мультимерное взаимодействие между сигнальной молекулой-мишенью на поверхности другой клетки, что улучшает доставку сигналов активации от молекулы-мишени в клетку-реципиент.

Преимуществом аденовирусов по настоящему изобретению является способность экспрессировать антитела полной длины, фрагменты антител, такие как scFv, мультиспецифичные антитела, в частности биспецифичные антитела, такие как биспецифичный активатор Т-клеток, как описано в настоящем изобретении.

В одном варианте реализации последовательность, кодирующая антитело или фрагмент антитела (такой как биспецифичный активатор Т-клеток согласно настоящему изобретению), содержит или дополнительно содержит участок внутренней посадки рибосомы. "Участок внутренней посадки рибосомы" (IRES) в контексте настоящей заявки означает нуклеотидную последовательность, которая обеспечивает инициацию трансляции в середине последовательности матричной РНК (мРНК).

В одном варианте реализации кодируемые терапевтические белки или пептиды представляют собой целевые специфичные белки, полипептиды или пептиды.

"Целевые специфичные белки или пептиды" в контексте настоящей заявки относятся либо к самим целевым белкам, либо к различным белкам или пептидам, которые непосредственно связываются (например, специфичны к мишени), или иным образом модифицируют уровни целевых белков или пептидов. Примером первого будет цитокин, тогда как примером второго будет антитело против этого цитокина.

Рассматриваемые "мишени", как правило, относятся к конкретным клеткам, клеточным продуктам, антигенам или сигнальным путям, ассоциированным с заболеванием, особенно с раком. "Мишень", в зависимости от контекста, также относится к мРНК или ее аналогу, транскрибируемому из гена, кодирующего белок или полипептид, который, например, можно ингибировать с помощью технологии типа РНК-и. Таким образом, в контексте РНК, например технологии РНК-и, мишенью является мРНК, которая кодируется геном мишени.

Примеры рассматриваемых мишеней включают, среди прочего, стимулирующие корецепторы Т-клеток и лиганды к ним, ингибирующие молекулы корецепторов Т-клеток и лиганды к ним, рецепторы и лиганды к ним, экспрессируемые регуляторными Т-клетками, миелоидные супрессорные клетки и иммуносупрессивные иммунные клетки, рецепторы дендритных клеток и антиген-презентирующих клеток и лиганды к ним, медиаторы процессинга и презентации антигенов, цитокины и цитокиновые рецепторы, хемокины и хемокиновые рецепторы, факторы транскрипции и регуляторы транскрипции, молекулы внутриклеточного транспорта и регуляторы функции клеток, рецепторы и продукты микроокружения опухолевых клеток и опухолевых клеток, внутриклеточные ферменты опухолевых клеток, такие как IDO, антигены для распознавания иммунными клетками.

Таким образом, в одном варианте реализации используемый в настоящем изобретении термин "мишень" относится к белку или полипептиду, который может, например, быть ингибирован, нейтрализован или активирован, например, антителом или его связывающим фрагментом, в зависимости от ситуации. "Мишень" в контексте цитокинов относится к самому цитокину или антителу или его связывающему фрагменту, специфичному к цитокину. Таким образом, вирус может кодировать и экспрессировать сам цитокин, поскольку его высвобождение может стимулировать иммунные ответы "хозяина". В контексте лигандов, мутированные формы лиганда могут кодироваться вирусом, который конкурирует с природным лигандом за связывание с рецептором. Мутированный лиганд может иметь повышенную аффинность связывания с рецептором, например, так, что он имеет низкую скорость диссоциации, тем самым занимая рецептор и увеличивая или уменьшая передачу сигналов от него. В альтернативном варианте, активность мутированного лиганда может быть снижена по сравнению с лигандом дикого типа, тем самым снижая связывание и общую активность через рецептор из природного лиганда.

В одном варианте реализации вирус или конструкция согласно настоящему изобретению кодирует пролекарство, иммуномодулятор и/или фермент.

Используемый в настоящем изобретении термин "пролекарство" означает молекулу, которую вводят в виде неактивного (или менее чем полностью активного) производного, которое впоследствии превращается в активный фармакологический агент в организме, часто путем нормальных метаболических процессов. Пролекарство служит своего рода предшественником предполагаемого лекарства. Фермент, преобразующий пролекарство, служит в качестве фермента, который превращает пролекарство в его

фармакологически активную форму.

Используемый в настоящем изобретении термин "иммуномодулятор" означает модулятор иммунного ответа. Иммуномодуляторы функционируют при регулировании иммунного ответа до желаемого уровня, например при иммунопотенцировании, иммуносупрессии или индукции иммунологической толерантности.

Т-клеткам требуется два сигнала, чтобы стать полностью активированными. Первый сигнал, который является антигенспецифичным, подается через рецептор Т-клеток, который взаимодействует с молекулами пептида-MHC на мембране антигенпрезентирующих клеток (APC). Второй сигнал, костимулирующий сигнал, является неспецифичным по антигену и обеспечивается взаимодействием между костимулирующими молекулами, экспрессируемыми на мембране APC и Т-клетки. Таким образом, "костимулирующая молекула" в контексте настоящей заявки означает молекулу, обеспечивающую дополнительный сигнал к антигенспецифичному сигналу, который требуется Т-клеткам для их активации, пролиферации и выживания. Примеры костимулирующих молекул включают, среди прочего, CD28, CD80, CD86, CD83 и 4-1BB.

Используемый в настоящем изобретении термин "фермент" означает вещество, которое действует как катализатор в живых организмах, регулируя скорость, с которой протекают химические реакции, не изменяясь в ходе этого.

Ниже приведено неисчерпывающее обсуждение иллюстративных целевых пептидов/полипептидов и белков.

В одном варианте реализации мишенью является белок контрольной точки, такой как белок иммунной контрольной точки или белок контрольной точки клеточного цикла. Примеры контрольных белков включают, среди прочего CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT или CD160, например CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2. В одном варианте реализации предложено антитело или его связывающий фрагмент, которые специфичны к одному из них. Таким образом, в одном варианте реализации трансген или трансгенная кассета кодирует антитело или фрагмент антитела, специфичные к CTLA-4, PD-1, PD-L1 или PD-L2. В одном варианте реализации аденовирус экспрессирует антитело или фрагмент антитела, специфичные к CTLA-4, PD-1, PD-L1 или PD-L2.

В одном варианте реализации антитело представляет собой антитело-ингибитор контрольной точки, например анти-PD-L1. В одном варианте реализации аденовирус экспрессирует полноразмерное анти-PD-Ll антитело человека. В одном варианте реализации экспрессия полноразмерного антитела против PD-L1 человека находится под контролем эндогенного промотора, такого как главной поздний промотор (MLP), в частности, в положении B_Y. В одном варианте реализации аденовирус экспрессирует scFv-форму антитела против PD-L1 человека. В одном варианте реализации экспрессия scFv-формы антитела против PD-L1 человека находится под контролем эндогенного промотора, такого как главной поздний промотор, в частности, в положении B_Y.

В одном варианте реализации предоставлен вирус или конструкция согласно настоящему изобретению, кодирующая антитело или его связывающий фрагмент, для полноразмерного антитела или scFv, специфичного к CTLA-4, например, как показано в качестве примера в настоящем изобретении.

В одном варианте реализации мишенью является один или более, независимо выбранных из группы, включающей CD16, CD25, CD33, CD332, CD127, CD31, CD43, CD44, CD162, CD301a, CD301b и галектин-3. В одном варианте реализации предлагается антитело или его связывающий фрагмент, специфичный к ним, например полноразмерное антитело или scFv.

В одном варианте реализации мишенью, например, на которую может быть нацелено антитело или связывающий фрагмент, является одно или более независимо выбранных из группы, включающей лиганд FLT-3, лиганд FLT-3, TLR, лиганды TLR, CCR7, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, лиганд GITR, IFN-α2, IL-12, IL-23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, рецептор TSLP, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 и CD304.

В одном варианте реализации мишенью биспецифичного активатора Т-клеток, используемого в настоящем изобретении, является антиген опухолевых клеток.

В одном варианте реализации мишенью является одно или более независимо выбранных из группы, включающей CEA, MUC-1, EpCAM, HER рецепторы HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, углеводные антигены Le^y, Le^x, Le^b, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-кадгерин, SPARC, ErbB2, ErbB3.

В одном варианте реализации мишенью биспецифичного активатора Т-клеток, используемого в настоящем изобретении, является антиген, который присутствует в строме опухоли.

В одном варианте реализации мишенью биспецифичного активатора Т-клеток, используемого в настоящем изобретении, является одно или более независимо выбранных из группы, включающей FAP, TREM1, IGFBP7, FSP-1, рецептор тромбоцитарного фактора роста-α (PDGFR-α), рецептор тромбоцитарного фактора роста-β (PDGFR-β) и виментин.

В одном варианте реализации мишенью, например, на которую может быть нацелено антитело или связывающий фрагмент (например биспецифичный активатор Т-клеток) является раковая мишень.

В одном варианте реализации мишенью является одно или более независимо выбранных из группы, включающей OX40, лиганд OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, лиганд CD40, TL1A, CD70, CD137, GITR, 4-1BB, ICOS или лиганд ICOS, например CD40 и лиганд CD40.

В одном варианте реализации трансгенная кассета кодирует лиганд, содержащий CD40 или лиганд CD40, или антитело, фрагмент антитела или кшРНК, нацеленный на CD40 или лиганд CD40. В одном варианте реализации аденовирус экспрессирует лиганд, содержащий CD40 или лиганд CD40, или антитело, фрагмент антитела или кшРНК, нацеленный на (специфичный к) CD40 или лиганд CD40.

В одном варианте реализации мишенью является один или более цитокинов, независимо выбранных из группы, включающей IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35. Интерлейкин -2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFNα, IFNβ, IFN©, TNFα, TGFβ, лимфотоксин α (LTA) и GM-CSF.

В одном варианте реализации трансгенная кассета кодирует антитело или фрагмент антитела, специфичные к IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFNα, IFN©, TNFα, TGFβ или лимфотоксину α (LTA). В одном варианте реализации аденовирус экспрессирует IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFNα, IFN©, TNFα, TGFβ or лимфотоксин α (LTA).

В одном варианте реализации аминокислотная последовательность IFNγ представляет собой SEQ ID NO: 68. In В одном варианте реализации аминокислотная последовательность IFNα представляет собой SEQ ID NO: 69. В одном варианте реализации аминокислотная последовательность TNFα представляет собой SEQ ID NO: 70.

В одном варианте реализации мишенью является хемокин, например один или более независимо выбранных из группы, включающей IL-8, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 и CRTH2.

В одном варианте реализации трансгенная кассета кодирует антитело или фрагмент антитела, специфичные к CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 или CXCR4. В контексте хемокинов мишень включает в себя ситуации, когда вирусы кодируют и экспрессируют хемокин, например, чтобы индуцировать или усиливать иммунные ответы хозяина на рак.

В одном варианте реализации аденовирус экспрессирует антитело или фрагмент антитела, специфичные к CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 или CXCR4.

В одном варианте реализации мишенью является одно или более независимо выбранных из группы, включающей STAT3, STAT1, STAT4, STAT6, CTIIA, MyD88 и члены семейства NFκB, например, белок является мишенью для ингибитора, например антитела или его связывающего фрагмента, или мРНК, транскрибированная с соответствующего гена, ингибируется механизмом, таким как РНК-и.

В одном варианте реализации, мишенью является HSp70 или регулятор выживаемости и гибели клеток, такой как сурвивин, например, на белок направлен ингибитор, например антитело или его связывающий фрагмент, или мРНК, транскрибированная с соответствующего гена, ингибируется механизмом, таким как РНК-и.

В одном варианте реализации мишенью является одно или более независимо выбранных из группы, включающей амфирегулин, BTC, NRG1a, NRG1b, NRG3, TGFα, LRIG1, LRIG3, EGF, EGF-L6, эпиген, HB-EGF, EGFR, Her2, Her3 и Her4, например, белок является мишенью для ингибитора, например антитела или его связывающего фрагмента, или мРНК, транскрибированная с соответствующего гена, ингибируется механизмом, таким как РНК-и.

В одном варианте реализации мишенью является лиганд или рецептор для одного или нескольких независимо выбранных из группы, включающей hedgehog, FGF, IGF, Wnt, VEGF, TNF, TGFβ, PDGF и Notch.

В одном варианте реализации аденовирус экспрессирует антитело или фрагмент антитела, специфичные к VEGF. В одном варианте реализации антитело представляет собой анти-VEGF антитело. Например, такое как антитело, имеющее аминокислотную последовательность антитела бевацизумаб или его эквивалента. В одном варианте реализации аденовирус экспрессирует полноразмерное антитело против человеческого VEGF. В одном варианте реализации экспрессия полноразмерного антитела против VEGF человека находится под контролем эндогенного промотора, такого как главный поздний промотор (MLP), в частности, в положении B_Y. В одном варианте реализации аденовирус экспрессирует scFv форму антитела против VEGF человека. В одном варианте реализации экспрессия scFv-формы антитела против VEGF человека находится под контролем эндогенного промотора, такого как главный поздний промотор, в частности, в положении B_Y.

В одном варианте реализации целью мишенью является IDO.

В одном варианте реализации мишенью является антиген для распознавания иммунными клетками (такими как Т-клетки, активированные биспецифичным активатором Т-клеток), один или более белков или пептидов, независимо выбранных из группы, включающей иммуногенные белки из инфекционных

организмов, таких как антигены цитомегаловируса, антигены гриппа, поверхностные и ядерные антигены гепатита B, анатоксин дифтерии, Crm197, анатоксин столбняка; пептиды, полученные из таких антигенов, которые представляют собой известные эпитопы Т-клеток или антител, или генно-инженерные композиты или мультимеры таких антигенов; полученные из опухоли белки в качестве антигенов; пептиды, полученные из таких антигенов, которые являются известными эпитопами Т-клеток или антител; и генно-инженерные композиты или мультимеры таких антигенов, например WT1, MUC1, LMP2, идиотип, HPV E6&E7, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE A3, не-мутантный p53, мутантный p53, NY-ESO-1, GD2, PSMA, PCSA, PSA, gp100, CEA, MelanA/MART1, мутантный Ras, протеиназа 3 (PR1), bcr-abl, тирозиназа, сурвивин, PSA, hTERT, в частности WT1, MUC1, HER-2/neu, NY-ESO-1, сурвивин или hTERT.

Специалист поймет, что существует множество возможностей для последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют данную аминокислотную последовательность из-за избыточности кодонов, что молчащие мутации пар оснований нуклеиновых кислот лишены иммуногенных свойств, и настоящим изобретением предусмотрены все последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют данную аминокислотную последовательность, определенную в любой из SEQ ID NO.

В одном варианте реализации пептид, полипептид или белок, кодируемый трансгеном, представляет собой мимотоп. Используемый в настоящем изобретении термин "мимотоп" означает молекулу, часто пептид, которая имитирует структуру эпитопа. Последнее свойство вызывает ответ антитела, сходный с тем, который вызывается эпитопом. Антитело к данному эпитопному антигену распознает мимотоп, имитирующий указанный эпитоп. Мимотопы обычно получают из библиотек фагового дисплея посредством биопаннинга. Вакцины с использованием мимотопов находятся в стадии разработки. Таким образом, антитела с известной специфичностью могут быть использованы для скрининга библиотек (например, библиотек пептидов в фаговом дисплее - например, библиотек последовательностей Ab или библиотек пептидов, не являющихся антителами, особенно оптимизированных для получения пептидов с более стабильными трехмерными конформациями). Получение мимотопов хорошо описано в данной области техники (см. Tribbick G, Rodda S. Combinatorial methods for discovery of peptide ligands which bind to antibody-like molecules. J Mol Recognit. 2002 15(5):306-10; Masuko T, Ohno Y, Masuko K, Yagi H, Uejima S, Takechi M, Hashimoto Y. Towards therapeutic antibodies to membrane oncoproteins by a robust strategy using rats immunized with transfectants expressing target molecules fused to green fluorescent protein. Cancer Sci. 2011 102(1):25-35).

В одном варианте реализации мимотоп или другие разработанные вакцинные антигены кодируются трансгеном и экспрессируются для индукции ответа антител у пациента-реципиента, когда индуцированные антитела оказывают желаемый терапевтический эффект. В одном варианте реализации слитые белки GFP-пептид с пептидными последовательностями из желаемого человеческого лиганда используются для индукции ответов аутореактивных антител, например, пептидной области PD-L1, которая, как известно, важна для связывания с молекулой-мишенью. PD-1 может быть генетически связан с GFP или другими высокоиммуногенными чужеродными белками-носителями, так что ответ иммунного антитела на пептид включает антитела, которые перекрестно реагируют с природной молекулой PDL1 и, таким образом, служат для блокирования взаимодействий PD-L1:PD-1 так же, как и прямое кодирование анти-PDLl антитела. Идеи для создания вакцин, индуцирующих ответы аутореактивных антител, хорошо описаны в данной области техники (см. Spohn G, Bachmann MF. Therapeutic vaccination to block receptor-ligand interactions. Expert Opin Biol Ther. 2003 3(3):469-76; Link A, Bachmann MF. Immunodrugs: breaking B- but not T-cell tolerance with therapeutic anticytokine vaccines. Immunotherapy 2010 2(4):561-74; Delavallee L, Assier E, Semerano L, Bessis N, Boissier MC. Emerging applications of anticytokine vaccines. Expert Rev Vaccines. 2008 7(10):1507-17).

В одном или нескольких вариантах реализации используемый трансген кодирует последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 2, 4, 7,11 или 16.

В другом варианте реализации используемый трансген кодирует последовательность, которая исключает аффинную метку дека-His на С-конце, например, как показано в вирусе, указанном в любой из SEQ ID NO: 72-78.

Преимуществом аденовирусом по настоящему изобретению является их способность экспрессировать и высвобождать формы антител (таких как биспецифичный активатор Т-клеток) и другие белки, такие как цитокины, кодируемые трансгеном в нем, в культуральный супернатант in vitro или в строму опухолевой ткани in vivo. Лидерные последовательности могут способствовать кодированию белков/полипептидов или пептидов, выходящих из раковой клетки. Следовательно, в одном варианте реализации кодированный "белок" содержит лидерную последовательность. Используемый в настоящем изобретении термин "лидерная последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, расположенной между промоторной последовательностью и кодирующей областью, которая может регулировать экспрессию гена на уровне транскрипции или трансляции.

В одном варианте реализации кодирующая последовательность кодирует пептид. Используемый в настоящем изобретении термин "пептид" относится к аминокислотной цепи, которая не является полнофункциональным белком. Как правило, это фрагмент, который сохраняет часть или всю функцию белка, фрагментом которого он является, или может распознаваться иммунной системой, например пептиды из

8 или более аминокислот, которые могут распознаваться Т-клетками.

В одном варианте реализации трансген представляет собой репортерный ген, кодирующий, например, агент визуализации, включающий агенты биолюминесцентной, флуоресцентной визуализации (включая активируемые агенты флуоресцентной визуализации), такие как люцифераза, GFP или eGFP или красный флуоресцентный белок.

Используемый в настоящем изобретении термин "репортерный ген" или "репортерная последовательность" означает ген или последовательность ДНК, которая производит продукт, легко обнаруживаемый в эукариотических клетках, и может использоваться в качестве маркера для определения активности другого гена, с которым его ДНК была тесно связана или объединена. Репортерные гены придают клеткам или организмам, которые их экспрессируют, характеристики, которые легко выявить и измерить, или являются селектируемыми маркерами. Репортерные гены часто используются в качестве индикатора того, был ли определенный ген поглощен или экспрессирован популяцией клеток или организмов. Примеры распространенных репортерных генов включают, среди прочего, LacZ, люциферазу, GFP, eGFP, неомицин-фосфотрансферазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, натрий-йодид-симпортер (NIS), нитроредуктазу (например, NfsA, NfsB), внутриклеточные металлопротеины, HSV1-tk или рецептор эстрогена.

В одном варианте реализации генетический материал (в частности, трансген) не кодирует или не экспрессирует репортерный ген, такой как агент визуализации, люцифераза, GFP или eGFP.

Вирусы согласно настоящему изобретению могут быть исследованы на предмет их предпочтения в отношении определенного типа опухоли путем исследования его литического потенциала в панели опухолевых клеток, например, линии опухолевых клеток толстой кишки включают HT-29, DLD-1, LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48 и Colo320DM. Любые доступные клеточные линии опухоли толстой кишки будут в равной степени полезны для такой оценки.

Клеточные линии предстательной железы включают клетки DU145 и PC-3. Клеточные линии поджелудочной железы включают клетки Panc-1. Клеточные линии опухоли молочной железы включают клеточную линию MDA231, а клеточные линии яичников включают клеточную линию OVCAR-3. Линии гемопоэтических клеток включают, среди прочего, В-лимфоидные клетки Раджи и Дауди, эритробластоидные клетки K562, миелоидные клетки U937 и Т-лимфоидные клетки HSB2. Другие доступные линии опухолевых клеток будут в равной степени полезны.

Настоящее изобретение также распространяется на новые последовательности, раскрытые в настоящем изобретении. В одном варианте реализации вирус показан в любой из последовательностей, раскрытых в настоящем изобретении, например, в любой из SEQ ID NO: 34-37 или последовательности, по меньшей мере, на 95% идентичной ей, например, как изложено в любой из SEQ ID NO: 79-82.

Составы.

Настоящее изобретение также распространяется на фармацевтический состав, содержащий вирус, описанный в настоящем изобретении.

В одном варианте реализации предложен жидкий парентеральный препарат, например, для инфузии или инъекции способного к репликации онколитика, в соответствии с настоящим изобретением, отличающийся тем, что данный состав обеспечивает дозу в диапазоне от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на объем дозы.

"Парентеральный состав" означает состав, предназначенный для доставки через желудочно-кишечный тракт. Типичные пути парентеральной доставки включают инъекцию, имплантацию или инфузию. В одном варианте реализации состав предоставляют в форме для болюсной доставки.

В одном варианте реализации парентеральный состав находится в форме инъекции. Инъекция включает внутривенную, подкожную, внутриопухолевую или внутримышечную инъекцию. "Инъекция" в настоящем изобретении означает введение жидкости в организм через шприц. В одном варианте реализации способ по настоящему изобретению не включает внутриопухолевую инъекцию.

В одном варианте реализации парентеральный состав находится в форме инфузии.

"Инфузия" в настоящем изобретении означает введение жидкостей с более медленной скоростью с помощью капельницы, инфузионного насоса, шприцевой помпы или эквивалентного устройства. В одном варианте реализации инфузию вводят в течение периода времени в диапазоне от 1,5 мин до 120 мин, например приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15, 16, 17, 18, 19 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 65, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 или 115 мин.

В одном варианте реализации одна доза состава составляет менее 100 мл, например 30 мл, например, вводимых с помощью шприцевой помпы. В одном варианте реализации одна доза состава составляет менее 10 мл, например 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мл. В одном варианте реализации одна доза состава составляет менее 1 мл, например 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 мл.

В одном варианте реализации инъекцию вводят в виде медленной инъекции, например, в течение от 1,5 до 30 мин.

В одном варианте реализации состав предназначен для внутривенного (в/в) введения. Этот путь особенно эффективен для доставки онколитического вируса, поскольку обеспечивает быстрый доступ к большинству органов и тканей и особенно полезен для лечения метастазов, например, укоренившихся метастазов, особенно тех, которые расположены в областях с высокой васкуляризацией, таких как печень

и легкие.

Терапевтические составы обычно будут стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другого парентерального состава, подходящего для введения человеку, и может быть приготовлена в виде предварительно заполненного устройства, такого как шприц или флакон, особенно в виде однократной дозы.

Такой состав, как правило, содержит фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, например, нетоксичный, изотонический носитель, который совместим с вирусом и в котором вирус стабилен в течение необходимого периода времени.

Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования диспергатора или поверхностно-активного вещества, такого как лецитин, или неионного поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат 80 или 40. В дисперсиях поддержанию необходимого размера частиц может способствовать присутствие поверхностно-активного вещества. Примеры изотонических агентов включают сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия в композиции.

В одном варианте реализации используемые парентеральные препараты могут содержать один или более из следующих буферов, например 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту, фосфатный буфер и/или трис-буфер, сахар, например, декстрозу, маннозу, сахарозу или подобное, соль, такую как хлорид натрия, хлорид магния или хлорид калия, детергент, такой как неионное поверхностно-активное вещество, такое как Brij, PS-80, PS-40 или подобное. Состав также может содержать консервант, такой как ЭДТА или этанол, или комбинацию ЭДТА и этанола, которые, как считается, предотвращают один или более путей возможной деградации.

В одном варианте реализации состав будет содержать очищенный онколитический вирус в соответствии с настоящим изобретением, например, от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на дозу, например от 1×10^{10} до 1×10^{12} вирусных частиц на дозу. В одном варианте реализации концентрация вируса в составе находится в диапазоне 2×10^{8} до 2×10^{14} вирусных частиц/мл, например 2×10^{12} вирусных частиц/мл.

В одном варианте реализации парентеральный состав содержит глицерин.

В одном варианте реализации состав содержит онколитический аденовирус, как описано в настоящем изобретении, HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту), глицерин и буфер.

В одном варианте реализации парентеральный состав состоит из вируса по настоящему изобретению, HEPES, например, 5 мМ, глицерина, например, 5-20% (об./об.), соляную кислоту, например, для доведения pH до диапазона 7-8, и воду для инъекций.

В одном варианте реализации 0,7 мл вируса по изобретению в концентрации 2×10^{12} вирусных частиц/мл готовят в 5 мМ HEPES, 20% глицерине с конечным pH 7,8.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей приведено в монографии Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

В одном варианте реализации состав предоставляется в виде состава для местного введения, включая ингаляцию.

Подходящие ингаляционные препараты включают ингаляционные порошки, дозирующие аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, или ингаляционные растворы, не содержащие газы-пропелленты. Ингаляционные порошки в соответствии с настоящим изобретением обычно содержат вирус, описанный в настоящем изобретении, с физиологически приемлемым наполнителем.

Эти ингаляционные порошки могут содержать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиспирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом. Целесообразно использовать моно- или дисахариды, применяя лактозу или глюкозу, например, но не исключительно, в форме их гидратов.

Частицы для осаждения в легких требуют размера частиц менее 10 мкм, например, 1-9 мкм, например, от 0,1 до 5 мкм, в частности, от 1 до 5 мкм. Размер частиц, несущих вирус, имеет первостепенное значение, и, таким образом, в одном варианте реализации вирус согласно настоящему изобретению может быть адсорбирован или абсорбирован на частице, такой как частица лактозы заданного размера.

Газы-пропелленты, которые можно использовать для приготовления вдыхаемых аэрозолей, известны в данной области техники. Подходящие газы-пропелленты выбраны из углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан, и галогенуглеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеупомянутые газообразные пропелленты могут быть использованы сами по себе или в их смесях.

Особенно подходящими газами-пропеллентами являются галогенированные производные алканов, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Из вышеупомянутых галогенированных углеводородов особенно пригодны TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси.

Ингаляционные аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, могут также содержать другие ингредиенты,

такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, смазывающие вещества и средства для регулирования pH. Все эти ингредиенты известны в данной области техники.

Ингаляционные аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, согласно изобретению могут содержать до 5 мас.% активного вещества. Аэрозоли согласно изобретению содержат, например, от 0,002 до 5 мас.%, от 0,01 до 3 мас.%, от 0,015 до 2 мас.%, от 0,1 до 2 мас.%, от 0,5 до 2 мас.% или от 0,5 до 1 мас.%. вес активного ингредиента.

В качестве альтернативы местное введение в легкие может также осуществляться путем введения состава в виде жидкого раствора или суспензии, например, с использованием устройства, такого как распылитель, например распылитель, соединенный с компрессором (например, распылитель Pari LC-Jet Plus®, подключенный к компрессору Pari Master® производства Pari Respiratory Equipment, Inc., Ричмонд, Вирджиния).

Вирус по изобретению может быть доставлен диспергированным в растворителе, например в форме раствора или суспензии, например, как уже описано выше для парентеральных составов. Он может быть суспендирован в подходящем физиологическом растворе, например, физиологическом растворе или другом фармакологически приемлемом растворителе или забуференном растворе. Забуференные растворы, известные в данной области техники, могут содержать от 0,05 до 0,15 мг динатрийэдетата, от 8,0 до 9,0 мг NaCl, от 0,15 до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 до 0,30 мг безводной лимонной кислоты и от 0,45 до 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды, для получения pH приблизительно 4,0-5,0.

Терапевтические суспензии или составы растворов также могут содержать одно или более вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества хорошо известны в данной области техники и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевину, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), EDTA, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Состав, как правило, будет предоставляться в практически стерильной форме с использованием стерильных способов изготовления.

Это может включать получение и стерилизацию путем фильтрации забуференного растворителя/раствора, используемого для приготовления состава, асептического суспендирования антитела в стерильном забуференном растворителе/растворе и дозирования препарата в стерильные сосуды способами, известными специалистам в данной области техники.

Распыляемая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть предоставлена, например, в виде единичных стандартных доз (например, герметичных пластиковых контейнеров или флаконов), упакованных в фольгированные конверты. Каждый флакон содержит стандартную дозу в объеме, например, 2 мл растворителя/буферного раствора.

Лечение.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение распространяется на вирус или состав с ним, как описано в настоящем изобретении, для применения при лечении, в частности, для лечения рака.

В одном варианте реализации данный способ лечения предназначен для применения при лечении опухоли, в частности солидной опухоли.

Под опухолью в контексте настоящей заявки подразумевается патологическая масса ткани, возникающая в результате неконтролируемого и прогрессирующего чрезмерного деления клеток, также называемая новообразованием. Опухоли могут быть доброкачественными (не злокачественными) или злокачественными. Понятие "опухоль" охватывает все формы рака и метастазы.

В одном варианте реализации опухоль представляет собой солидную опухоль. Солидная опухоль может быть локализованной или метастазированной.

В одном варианте реализации опухоль имеет эпителиальное происхождение.

В одном варианте реализации опухоль представляет собой злокачественное новообразование, такое как колоректальный рак, гепатома, рак простаты, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак щитовидной железы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи или рак легкого.

В одном варианте реализации опухоль представляет собой колоректальное злокачественное образование.

"Злокачественная опухоль" в контексте настоящей заявки означает раковые клетки.

В одном варианте реализации онколитический аденовирус используют для лечения или профилактики метастазирования.

В одном варианте реализации способ или состав по настоящему изобретению используют для лечения лекарственно-устойчивых форм рака.

В одном варианте реализации вирус вводят в сочетании с введением дополнительного лечения или терапии рака.

В одном варианте реализации предложен вирус или состав в соответствии с настоящим изобретением для использования при получении лекарственного средства для лечения рака, например рака, описанного выше.

В другом аспекте предлагается способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества вируса или препарата в соответствии с настоящим изобретением пациенту, нуждаю-

щемуся в этом, например пациенту-человеку.

В одном варианте реализации онколитический вирус или состав по настоящему изобретению вводят в сочетании с другой терапией.

Термин "в сочетании" в настоящем изобретении предназначен для охвата случаев, когда онколитический вирус вводят до, одновременно и/или после лечения или терапии рака.

Лечение рака включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, таргетную терапию и/или химиотерапию.

Используемый в настоящем изобретении термин "лечение рака" относится к лечению терапевтическим соединением или биологическим агентом, например антителом, предназначенным для лечения рака и/или поддерживающей терапии.

В одном варианте реализации лечение рака выбирают из любой другой противораковой терапии, включая химиотерапевтическое средство, таргетное противораковое средство, лучевую терапию, радиоизотопную терапию или любую их комбинацию.

В одном варианте реализации вирус по настоящему изобретению, такой как онколитический аденовирус, можно использовать в качестве предварительного лечения до терапии, такой как операция (неоадъювантная терапия), для уменьшения опухоли, для лечения метастазирования и/или предотвращения метастазирования или дальнейшего метастазирования. Онколитический аденовирус может быть использован после терапии, такой как операция (адъювантная терапия), для лечения метастазирования и/или предотвращения метастазирования или дальнейшего метастазирования.

Используемый в настоящем изобретении термин "параллельно" относится к назначению дополнительного лечения рака одновременно или приблизительно в то же время, что и состав с онколитическим аденовирусом. Такое лечение может содержаться в том же составе или назначаться в виде отдельного состава.

В одном варианте реализации вирус вводят в сочетании с введением химиотерапевтического агента.

Используемый в настоящем изобретении термин "химиотерапевтическое средство" предназначен для обозначения специфичных противоопухолевых химических агентов или лекарственных средств, которые избирательно разрушают злокачественные клетки и ткани. Например, алкилирующие агенты, антиметаболиты, антрациклины, растительные алкалоиды, ингибиторы топоизомеразы и другие противоопухолевые средства. Другие примеры химиотерапии включают доксорубицин, 5-фторурацил (5-FU), паклитаксел, капецитабин, иринотекан и платины, такие как цисплатин и оксалиплатин. Предпочтительная доза может быть выбрана практикующим врачом в зависимости от характера рака, подлежащего лечению.

В одном варианте реализации терапевтическое средство представляет собой ганцикловир, который может способствовать контролю иммунных реакций и/или васкуляризации опухоли.

В одном варианте реализации один или более видов лечения, применяемых в способе по настоящему изобретению, являются метрономными, то есть непрерывным или частым лечением низкими дозами противораковых лекарственных средств, часто назначаемыми одновременно с другими способами терапии.

Онколитические аденовирусы подгруппы B, в частности Ad11 и полученные из них, такие как EnAd, могут быть особенно синергетическими с химиотерапевтическими средствами, поскольку они, повидимому, имеют механизм действия, который в значительной степени не зависит от апоптоза, убивая раковые клетки с помощью преимущественно некролитического механизма. Кроме того, иммуносупрессия, возникающая во время химиотерапии, может позволить онколитическому вирусу функционировать с большей эффективностью.

"Терапевтическая доза" в настоящем изобретении относится к количеству вируса, такого как онколитический аденовирус, которое подходит для достижения желаемого терапевтического эффекта при использовании в подходящем режиме лечения, например, ослабляет симптомы заболевания или состояния. Доза может считаться терапевтической дозой при лечении рака или метастазов, когда количество вирусных частиц может быть достаточным для того, чтобы привести к следующему: рост опухоли или метастазирования замедлен или остановлен, или обнаружено, что опухоль или метастаз уменьшаются в размере и/или продолжительность жизни пациента увеличивается. Подходящие терапевтические дозы, как правило, представляют собой баланс между терапевтическим эффектом и переносимой токсичностью, например, когда побочный эффект и токсичность являются переносимыми, учитывая полезный эффект, достигнутый этой терапией.

В одном варианте реализации вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему изобретению (включая состав, содержащий их) вводят еженедельно, например, одну неделю 1 дозу вводят в день 1, 3, 5, а затем одну дозу каждую последующую неделю.

В одном варианте реализации вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему изобретению (включая состав, содержащий их) вводят раз в две недели или три недели, например, вводят на неделе 1 в дни 1, 3 и 5 и на неделе 2 или 3 также вводят в дни 1, 3 и 5. Этот режим дозирования может повторяться столько раз, сколько необходимо.

В одном варианте реализации вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему изо-

бретению (включая состав, содержащий их) вводят ежемесячно.

В одном варианте реализации вирусы и конструкции по настоящему изобретению получают рекомбинантными способами. Специалист поймет, что геном вооруженного аденовируса может быть получен другими техническими средствами, включая полный синтез генома или плазмиды, включающей часть всего генома. Специалист поймет, что в случае синтеза генома область инсерции может не содержать нуклеотиды сайта рестрикции, поскольку последние являются артефактами после инсерции генов с использованием методов клонирования.

В одном варианте реализации геном вооруженного аденовируса полностью изготовлен синтетическим путем, например, согласно SEQ ID NO: 34-37.

Изобретение в настоящем изобретении далее распространяется на аденовирус формулы (I) или ее подформулы, полученный или допускающий получение путем вставки трансгена или трансгенной кассеты.

"Является" в настоящем изобретении означает "содержащий".

В контексте данного описания "содержащий" следует интерпретировать как "включающий".

Варианты реализации изобретения, содержащие определенные признаки/элементы, также подразумеваются как расширяемые до альтернативных вариантов реализации, "состоящих" или "состоящих по существу" из соответствующих элементов/признаков.

Там, где это технически целесообразно, варианты реализации изобретения могут быть объединены.

Технические ссылки, такие как патенты и заявки, включены в данный патент посредством ссылки.

Любые варианты реализации, конкретно и явно указанные в настоящем изобретении, могут составлять основу отказа от ответственности либо по отдельности, либо в сочетании с одним или несколькими дополнительными вариантами реализации.

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно GB1614607.8, GB1700663.6, GB1706219.1 и GB1713765.4, включенным в настоящий документ посредством ссылки. Эти документы могут использоваться для исправления ошибок в настоящей спецификации, в частности ошибок в списке последовательностей.

Настоящее изобретение далее описано, только для иллюстрации, в следующих примерах, которые ссылаются на прилагаемые фигуры, на которых изображено следующее:

Описание фигур

Фиг. 1. (A) Схематическое изображение антитела биспецифичного активатора Т-клеток по настоящему изобретению, содержащего или не содержащего необязательную декагистидиновую аффинную метку. Ig SP: сигнальный пептид; 10His: декагистидиновая аффинная метка; L: GS линкер; VL: вариабельный легкий домен; VH вариабельный тяжелый домен. (B) плазмидная карта для pSF-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-клеток. (C) плазмидная карта для pSF-CMV-FAP Бисп.актив.Т-клеток. (D) плазмидная карта для pSF-CMV-Control Бисп.актив.Т-клеток.

Фиг. 2. (A) Дот-блоттинг, показывающий количественную оценку рекомбинантных биспецифичных активаторов Т-клеток. (B) график, показывающий результаты ИФА для FAP. (C) график, показывающий результаты ИФА для EpCAM.

Фиг. 3. Уровни экспрессии CD69 (A) и CD25 (B) для Т-клеток, со-культивированных отдельно или с клетками NHDF в присутствии биспецифичного активатора Т-клеток к FAP и контрольного биспецифичного активатора Т-клеток, измеренные с использованием проточной цитометрии.

Фиг. 4. (A) уровни экспрессии IFN γ для Т-клеток, совместно культивированных отдельно или с клетками NHDF в присутствии биспецифичного активатора Т-клеток к FAP и контрольного биспецифичного активатора Т-клеток, измеренные путем внутриклеточного окрашивания цитокинов. Графики (B) и (C) показывают уровни экспрессии CD69 и CD25 для Т-клеток, совместно культивированных отдельно или с клетками DLD в присутствии биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM и контрольного биспецифичного активатора Т-клеток, анализ методом проточной цитометрии.

Фиг. 5. (A) уровни экспрессии IFN-γ для Т-клеток, совместно культивированных с клетками DLD в присутствии биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM и контрольного биспецифичного активатора Т-клеток, измеренные путем внутриклеточного окрашивания цитокинов. Графики (B) и (C), показывающие уровни CD69 и CD25 для МКПК, совместно культивированных с клетками DLD в присутствии биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM и контрольного биспецифичного активатора Т-клеток, анализ методом проточной цитометрии.

Фиг. 6. (A) результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток NHDF, совместно культивированных с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к FAP или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток. (B) график результатов ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток BTC100, совместно культивированных с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к FAP или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток. (C) Изображения клеток NHDF после совместного культивирования с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к FAP по сравнению с контрольным биспецифичным активатором Т-клеток.

Фиг. 7. (A) точечные диаграммы, показывающие экспрессию FAP в различных клетках, полученных от пациентов. (B) график, показывающий % клеток, экспрессирующих EpCAM и FAP по различным клеткам и клеточным линиям.

Фиг. 8. (A) дозозависимость NHDF для биспецифичного активатора Т-клеток к FAP с увеличением концентрации биспецифичного активатора Т-клеток. (B) и (C) результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток DLD, совместно культивированных с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток.

Фиг. 9. (A) результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток SKOV, совместно культивированных с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток. (B) результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток MCF7, совместно культивированных с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток.

Фиг. 10. Дозозависимость NHDF для биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM с увеличением концентрации биспецифичного активатора Т-клеток.

Фиг. 11. (A) экспрессия FAP в клетках CHO, определенная с помощью FAP или изотипного контрольного антитела и проанализированная методом проточной цитометрии. (B) результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток CHO или CHO-FAP, совместно культивированных с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к FAP или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток.

Фиг. 12. Активация Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) клетками CHO по сравнению с CHO-FAP, анализ методом проточной цитометрии.

Фиг. 13. (A) графики экспрессии EpCAM линий родительских клеток в сравнении со стабильным трансфицированным вариантом, определенная окрашиванием EpCAM или с помощью изотипного контрольного антитела и проанализированная с помощью проточной цитометрии. (B) результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток CHO или CHO-EpCAM, совместно культивированных с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток.

Фиг. 14. Активация Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) клетками CHO по сравнению с CHO-EpCAM, анализ методом проточной цитометрии.

Фиг. 15. (A) Способность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP активировать CD4+ или CD8+ Т-клетки (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25), анализ методом проточной цитометрии. (B) график результатов ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток NHDF, совместно культивированных с CD4+ или CD8+ Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к FAP или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток.

Фиг. 16. (A) Активация CD4+ и CD8+ Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) клетками DLD в присутствии EpCAM или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток, анализ методом проточной цитометрии. (B) результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток DLD, совместно культивированных с CD4+ или CD8+ Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток.

Фиг. 17. (A) количество CD3+ Т-клеток из асцита, культивируемых с контролем или биспецифичным активатором Т-клеток к FAP. (B) уровни экспрессии CD25 Т-клеток из асцита, культивируемых с контролем или биспецифичным активатором Т-клеток к FAP. (C) количество FAP+ клеток из асцита, культивируемых с контролем или биспецифичным активатором Т-клеток к FAP.

Фиг. 18. (A) Схематическое изображение генома аденовирусов по настоящему изобретению. (B) графики, сравнивающие кинетику экспрессии, управляемой промотором CMV и SA.

Фиг. 19. (A) количественное определение количества обнаруженных вирусных геномов на клетку для NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd. (B) онколитическая активность NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 или EnAd, оценка путем инфицирования клеток A549.

Фиг. 20. (A) Активация Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) вирусами NG-601, NG-602, NG-605 и NG-606 при совместном культивировании с CHO-FAP, анализ методом проточной цитометрии. (B) активация Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) вирусами NG-601, NG-602, NG-605 и NG-606 при совместном культивировании с CHO-EpCAM, анализ методом проточной цитометрии.

Фиг. 21. Результаты экспериментов по определению количества биспецифичного активатора Т-клеток FAP, полученного из NG-605 и NG-606.

Фиг. 22. Результаты экспериментов по определению количества биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, полученного из NG-601 и NG-602.

Фиг. 23. Микроскопические изображения клеток Ad293, инфицированных NG-607, NG-608, NG-609 и NG-610.

Фиг. 24. (A) цитотоксичность клеток DLD, инфицированных EnAd, анализ с использованием XCELLigence. (B) цитотоксичность клеток SKOV, инфицированных EnAd, анализ с использованием XCELLigence. (C) цитотоксичность клеток NHDF, инфицированных EnAd, анализ с использованием XCELLigence.

Фиг. 25. (A) способность NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd убивать клетки NHDF, анализ с использованием XCELLigence. (B) способность NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd убивать клет-

ки NHDF, по данным ЛДГ-анализа.

Фиг. 26. Графики активации Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) вирусами NG-603, NG-604, NG-605, NG-606, совместно культивированных с клетками NHDF, SKOV и Т-клетками, анализ методом проточной цитометрии.

Фиг. 27. (A) график активации Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) вирусами NG-603, NG-604, NG-605, NG-606, совместно культивированных с клетками NHDF и SKOV, в сравнении с одной только SKOV, анализ методом проточной цитометрии. (B) график цитотоксичности клеток NHDF, инфицированных NG-605 и NG-606, по данным ЛДГ-анализа.

Фиг. 28. Неподвижные изображения из видеороликов в режиме таймлапс лизиса клеток NHDF рекомбинантными биспецифичным активатором Т-клеток к FAP, EnAd, NG-603 или NG-605.

Фиг. 29. Неподвижные изображения из видеороликов в режиме таймлапс лизиса NHDF клеток вирусами NG-607, NG-608, NG-609 или NG-610.

Фиг. 30. Цитотоксичность клеток DLD, инфицированных EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 в присутствии Т-клеток или в отсутствие Т-клеток, анализ с помощью XCELLigence.

Фиг. 31. Цитотоксичность клеток DLD, инфицированных EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 в присутствии Т-клеток или в отсутствие Т-клеток, по данным ЛДГ-анализа.

Фиг. 32. Активация Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) вирусами EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604, анализ методом проточной цитометрии.

Фиг. 33. Результаты экспериментов по определению способности NG-601 убивать опухолевые клетки DLD при различной множественности инфицирования (MOI) в присутствии или отсутствии CD3+ Т-клеток, оценка с помощью xCELLigence.

Фиг. 34. Способность EnAd и NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 убивать опухолевые клетки SKOV в присутствии или в отсутствие CD3+ Т-клеток, оценка с помощью xCELLigence.

Фиг. 35. Способность EnAd и NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 убивать опухолевые клетки SKOV в присутствии или в отсутствие CD3+ Т-клеток, по данным ЛДГ-анализа.

Фиг. 36. Активация Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) с вирусами EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604, совместно культивированных с опухолевыми клетками SKOV, анализ методом проточной цитометрии.

Фиг. 37. Активация Т-клеток (на основании уровней экспрессии CD69 и CD25) вирусами EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604, совместно культивированных с асцитными клетками, анализ методом проточной цитометрии.

Фиг. 38. Неподвижные изображения из видео лизиса клеток NHDF вирусами EpCAM-биспецифичный активатор Т-клеток, EnAd, NG-601 или NG-603.

Фиг. 39. Микроскопические изображения асцитных клеток, полученных от пациента, зараженного вирусами по настоящему изобретению, и окрашенных EnAd-CMV-GFP и EnAd-SA-GFP в качестве репортеров для определения инфицирования и поздней стадии экспрессии вирусных генов.

Фиг. 40. (A) график, показывающий уровни экспрессии CD25 на CD3+ Т-клетках в образцах асцита, которые были инфицированы вирусами по настоящему изобретению. (B) график, показывающий количество FAP+ клеток в образцах асцита, которые были инфицированы вирусами по настоящему изобретению.

Фиг. 41. Микроскопические изображения асцитных клеток, полученных от больного раком, инфицированных вирусами по настоящему изобретению и окрашенных EnAd-CMV-GFP и EnAd-SA-GFP в качестве репортеров для определения инфицирования и поздней стадии экспрессии вирусных генов.

Фиг. 42. Количество CD3+ Т-клеток в образцах асцита, полученных от больного раком, и инфицированных вирусами по настоящему изобретению.

Фиг. 43. Уровни экспрессии CD25 на CD3+ Т-клетках в образцах асцита, полученных от больного раком, и инфицированных вирусами по настоящему изобретению.

Фиг. 44. Количество FAP+ клеток в образцах асцита, полученных от больного раком, и инфицированных вирусами по настоящему изобретению.

Фиг. 45. Характеристика биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM и его влияние на полученные из МКПК Т-клетки (A) Схема структуры EpCAM-нацеленного биспецифичного активатора Т-клеток и неспецифичного контрольного биспецифичного активатора Т-клеток. Домены VL и VH связаны с гибкими пептидными линкерами (L), богатыми серином и глицином для гибкости и растворимости. Ig SP - сигнальный пептид иммуноглобулина легкой цепи; 10His - декагистидиновая аффинная метка. (B) Индукция маркеров активации CD69 и (C) CD25 на CD3-очищенных МКПК, культивированных отдельно или с клетками DLD (5:1) в присутствии содержащих биспецифичный активатор Т-клеток супернатантов. CD69 и CD25 измеряли проточной цитометрией через 24 ч совместного культивирования. Значимость оценивали по сравнению с изотипом IgG. (D) Процент IFNγ-положительных Т-клеток через 6 ч в совместной культуре с клетками DLD (5:1) и содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами. (E) Пролиферация, представленная индексом деления и процентом популяции родительских Т-клеток, участвующих в пролиферации, окрашенных CFSE Т-клеток в совместной культуре с клетками DLD (5:1) и содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами. Флуоресценцию изме-

ряли проточной цитометрией через 5 дней после совместного культивирования. Индекс деления был смоделирован с использованием программы для определения пролиферации Flowjo. (F) Дегрануляция Т-клеток, измеренная путем экстернализации CD107a, в совместной культуре с клетками DLD (5:1) и содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами. Экстернализацию оценивали путем совместного культивирования со специфичным к CD107a антителом в течение 6 ч с последующим анализом проточной цитометрией. (G) Уровни цитокинов измеряли с помощью панели человеческих Th-цитокинов LEGENDplex с использованием супернатантов из ко-культур Т-клеток с клетками DLD (5:1) в присутствии содержащих биспецифичный активатор Т-клеток супернатантов в течение 48 ч. Каждое экспериментальное условие измеряли в трех биологических повторностях, и данные представляли как среднее значение ±CO. Значение оценивали по сравнению с необработанными клетками, если не указано иное, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

Фиг. 46. Характеристика рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM (A) Дот-блоттинг для оценки количества биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, продуцируемого трансфицированными клетками HEK293A. (B) ИФА, измеряющий уровень связывания EpCAM контролями или рекомбинантным EpCAM или неспецифичным биспецифичным активатором Т-клеток. Значимость оценивали путем сравнения с контрольным образцом пустого вектора с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, ***p<0,001.

Фиг. 47. Оценка антигенспецифичности, опосредованной биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM цитотоксичности для Т-клеток (A) Индукция маркера активации CD25 на CD3+ Т-клетках в совместной культуре с клетками CHO или CHO-EpCAM (5:1) и содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами, по данным анализа FACS через 24 ч совместной культуры. (B) Цитотоксичность клеток CHO или CHO-EpCAM, культивируемых с содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами, отдельно или в сокультуре с Т-клетками. Цитотоксичность оценивали по высвобождению ЛДГ в культуральные супернатанты после 24 ч инкубации. (C) Цитотоксичность множественных EpCAM-положительных клеток карциномы через 24 ч в совместной культуре с Т-клетками (1:5) и содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами. Жизнеспособность измеряли анализом MTS через 24 ч совместного культивирования. (D) Уровни экспрессии EpCAM (N=1), оцененные с помощью FACS-анализа EpCAM-положительных клеточных линий в (C), по сравнению с фоновой флуоресценцией, измеренной с использованием контрольного изотипического антитела. (AC) Каждое экспериментальное условие измеряли в трех биологических повторностях, и данные представляли как среднее значение ±CO. Значимость оценивали по сравнению с необработанными лунками или контрольными лунками только с Т-клетками, с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Фиг. 48. Цитотоксичность EnAd, экспрессирующего биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM в клетках SKOV3.

Клетки SKOV3 инкубировали с EnAd или рекомбинантными вирусами в отсутствие (A) или в присутствии (B) Т-клеток, и измеряли цитотоксичность по высвобождению ЛДГ в указанные моменты времени. Значимость оценивали путем сравнения с неинфицированными контрольными лунками с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, ***p<0,001.

Фиг. 49. Идентификация Т-клеток, ответственных за опосредованную биспецифичным активатором Т-клеток цитотоксичность (A) биспецифичный активатор Т-клеток-опосредованная активация CD4 и CD8 Т-клеток через 24 ч после совместного культивирования CD3 Т-клеток с клетками DLD (5:1) и содержащим биспецифичный активатор Т-клеток супернатантом. Активацию оценивали по поверхностной экспрессии CD69 и CD25 и измеряли с помощью проточной цитометрии. (B) Пролиферативный ответ окрашенных CFSE CD4 и CD8 Т-клеток в совместной культуре с клетками DLD и инкубированных с содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами. Флуоресценцию измеряли после 5 дней инкубации с помощью анализа FACS. (C) Дегрануляция CD4 и CD8 клеток после 6-часового совместного культивирования с клетками DLD и содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами. Специфичное к CD107a антитело добавляли в культуральную среду на время совместного культивирования, и оценивали дегрануляцию с помощью проточной цитометрии. (D) Цитотоксичность субпопуляции CD4 или CD8 Т-клеток оценивали по высвобождению ЛДГ в супернатант после 24-часовой инкубации клеток DLD с CD4- или CD8-очищенными Т4-клетками (1:5) и супернатантом, содержащим биспецифичный активатор Т-клеток. Каждое экспериментальное условие измеряли в трех биологических повторностях, и данные представляли как среднее значение ±CO. Лечение биспецифичным активатором Т-клеток EpCAM сравнивали с контрольным биспецифичным активатором Т-клеток, если не указано иное, и оценивали значимость с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Фиг. 50. Цитотоксичность и активация Т-клеток EnAd, экспрессирующим биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM в клетках DLD Цитотоксичность для инфицированных клеток DLD в отсутствии (A) или присутствии Т-клеток (B). Клетки DLD инфицировали и совместно культивировали с Т-

клетками, и измеряли цитотоксичность по высвобождению ЛДГ в указанные моменты времени. (C-D) Т-клетки из (B) собирали и окрашивали на маркеры активации CD69 (C) или CD25 (D) и анализировали с помощью проточной цитометрии. (E-F) Количественная оценка биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, продуцируемого из клеток DLD, инфицированных рекомбинантными вирусами. Стандартная кривая высвобождения ЛДГ (Abs) из DLD в совместной культуре с CD3+ клетками и различными известными количествами рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM (E). Параллельно инкубировали совместные культуры с разбавленными супернатантами (в 10000 раз) 3-дневных инфицированных клеток DLD (F). Стандартная кривая позволила приблизительное определение биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, произведенного в количестве 165 мкг и 50 мкг на миллион клеток DLD для EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. и EnAd-SA-EpCAM Бисп.акт.Т-кл. соответственно. Значимость оценивали путем сравнения с неинфицированными контрольными скважинами с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, ***p<0,001.

Фиг. 51. Характеристика онколитического вируса EnAd, экспрессирующего биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM с использованием клеточных линий и Т-клеток, полученных из МКПК. (A) Клетки DLD инфицировали родительским EnAd или рекомбинантным вирусом (100 вч/клетку) и собирали из лунок через 24 или 72 ч. Репликацию оценивали путем измерения геномов с использованием кПЦР ч учетом вирусного гексона. (B) Цитотоксичность клеток DLD, инфицированных EnAd или рекомбинантным вирусом, при возрастающих концентрациях вируса. Цитотоксичность измеряли методом MTS через 5 дней после инфицирования. (C) Супернатанты из 3-дневных неинфицированных или неинфицированных вирусом клеток HEK293A оценивали на экспрессию трансгена с помощью иммуноблот-анализа и зондировали анти-His антителом. (D) Индукция маркера активации CD25 CD3-положительных Т-клеток, культивируемых с CHO или CHO-EpCAM (E:T 5:1) и разведенными супернатантами HEK293A из (D). Активацию измеряли по поверхностной экспрессии CD25 с помощью проточной цитометрии. (E) Цитотоксичность клеток CHO или CHO-EpCAM, инкубированных с супернатантами HEK293A из (D) отдельно или в совместной культуре с CD3-очищенными МКПК (E:T 5:1). Супернатанты HEK293A разбавляли в 300 раз.

Цитотоксичность оценивали по ЛДГ, высвобождаемому в супернатант после 24-часовой инкубации. Каждое экспериментальное условие измеряли в трех биологических повторностях, и данные представляли как среднее значение ±CO. Значимость оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки при сравнении каждого экспериментального условия с необработанными клетками, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Фиг. 52. Клеточный состав экссудата злокачественного новообразования (A) Репрезентативное изображение (образец плеврального выпота, пациент 3 из фиг. 57), демонстрирующее скрининг асцитных и экссудатных жидкостей по их клеточному составу оценка методом проточной цитометрии. (B) в таблице указано абсолютное количество каждого типа клеток (в выборке 10000 клеток).

Фиг. 53. Превосходящая активность EnAd, экспрессирующего биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, в линии частично устойчивых к EnAd клеток (A-B) Жизнеспособность клеток SKOV3 отслеживали в режиме реального времени в течение 160 ч с помощью анализа цитотоксичности на основе xCELLigence. Клетки SKOV3 высевали и инфицировали вирусами EnAd или EnAd, вооруженными биспецифичным активатором Т-клеток, в момент 0 ч, причем неинфицированные клетки служили в качестве отрицательного контроля. В (B) CD3-очищенные МКПК (5:1) добавляли через 2 ч после инфицирования, и измеряли импеданс с 15-минутными интервалами. (C-D) CD3-очищенные МКПК культивировали с клетками SKOV3 (5:1), которые были инфицированы родительским EnAd или рекомбинантными вооруженными вирусами. В каждый момент времени Т-клетки собирали и анализировали на предмет поверхностной экспрессии CD69 (C) или CD25 (D) с помощью проточной цитометрии. (E) Последовательности изображений таймлапс, показывающих совместные культуры клеток карциномы SKOV3 (неокрашенные), фибробластов NHDF (красные) и CD3-очищенных МКПК (синие), инфицированных EnAd, EnAd-CMVEpCAM Бисп.актив.Т-кл. или неинфицированных. Апоптоз визуализировали с использованием реагента CellEvent Caspase 3/7 (зеленый). Изображения были получены на инвертированном микроскопе Nikon TE 2000-E Eclipse с интервалами 15 мин, охватывающими период 96 ч. Репрезентативные изображения были записаны в указанные моменты времени; исходное увеличение ×10; масштабная линейка 100 мкм. (A-D). Каждое экспериментальное условие измеряли в трех биологических повторностях, и данные представляли как среднее значение ±CO. Значимость оценивали сравнением с неинфицированными контролями с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Фиг. 54. Экспрессия PD1 и влияние антител PD1 на опосредованную биспецифичным активатором Т-клеток активацию Т-клеток (A) Экспрессию PD1 эндогенными Т-клетками после их первоначального выделения из плевральных выпотов оценивали с помощью проточной цитометрии. (B-D) Неочищенные суммарные клетки из плевральных выпотов (от трех разных пациентов) инкубировали в 100% жидкости из того же плеврального экссудата в присутствии свободного биспецифичного активатора Т-клеток, EnAd или рекомбинантного вируса. Через 5 дней собирали общую популяцию клеток и определяли ко-

личество (B) CD3+ Т-клеток и клеток, которые были (C) CD25+. (D) Количество EpCAM+ клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Значимость оценивали путем сравнения с необработанными контрольными лунками с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, ***p<0,001.

Фиг. 55. EnAd, экспрессирующий биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, может избирательно уничтожать первичные опухолевые клетки человека у пациентов, ранее прошедших химиотерапию (A) Цитотоксичность EpCAM+ клеток или (B) FAP+ фибробластов, сначала выделенных из асцита трех пациентов и размноженных ex vivo, затем инкубированных с рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток или инфицированных EnAd или рекомбинантным вирусом. Цитотоксичность измеряли проточной цитометрией через 5 дней. (C) Индукция маркера активации CD25 на CD3-положительных Т-клетках, культивируемых с асцитными EpCAM+ и FAP+ клетками из (A + B). Каждое экспериментальное условие измеряли в трех биологических повторностях, и данные представляли как среднее значение ±CO. Значимость оценивали путем сравнения с необработанными лунками с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Фиг. 56. Биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM может преодолеть иммуносупрессивные эффекты асцитной жидкости и активировать эндогенные Т-клетки (A-B) полученные из МКПК Т-клетки инкубировали с антителами против CD3 в культуральной среде RPMI или в присутствии 100% перитонеальной асцитной жидкости от пяти пациентов с раком яичников. (A) Через 24 ч индукции Т-клеток анализировали маркеры активации CD69 и CD25 и (B) измеряли дегрануляцию Т-клеток с помощью экстернализации CD107a, используя проточную цитометрию. (C) Жизнеспособность клеток MCF7 отслеживали в режиме реального времени в течение 60 ч с помощью анализа цитотоксичности на основе xCELLigence. Клетки MCF7 высевали и инкубировали с контролем или биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM через 25 ч в присутствии среды RPMI или 100% асцитной жидкости №1 или №2. Необработанные клетки служили отрицательным контролем. Одновременно добавляли CD3- очищенные МКПК (5:1) и измеряли импеданс с 15-минутными интервалами. (D) Эндогенные неочищенные суммарные клетки из перитонеального асцита инкубировали в 100% асцитной жидкости в присутствии свободного EpCAM или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток. Через 24 ч общую популяцию клеток собирали и измеряли количество CD3+/CD69+ и CD3+/CD25+ клеток с помощью проточной цитометрии. Каждое экспериментальное условие измеряли в трех биологических повторностях, и данные представляли как среднее значение ±CO. Значимость оценивали путем сравнения с RPMI (A + B), необработанными образцами (D) или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток (E) с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Фиг. 57. EnAd, экспрессирующий биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, может активировать эндогенные Т-клетки для уничтожения эндогенных опухолевых клеток в плевральных экссудатах злокачественных новообразований.

Неочищенные суммарные клетки из плевральных выпотов (от четырех разных пациентов) инкубировали в 100% жидкости из того же плеврального экссудата в присутствии свободного биспецифичного активатора Т-клеток, EnAd или рекомбинантного вируса. Через 5 дней собирали общую популяцию клеток и определяли количество (A) CD3+ Т-клеток и клеток, которые были (B) CD25+. (C) Количество EpCAM+ клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. (D) Репрезентативные изображения (увеличение×10; масштабная шкала 100 мкм) и анализ проточной цитометрией клеток плеврального выпота пациента 3 (раковых клеток и лимфоцитов) после обработки EnAd или EnAd-CMVEpCAM Бисп.актив.Т-кл. (E) Через 5 дней измеряли уровни цитокинов с помощью панели человеческих цитокинов LEGENDplex с использованием культур плеврального выпота после инкубации со свободным рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток или инфицирования EnAd или рекомбинантным вирусом. Каждое экспериментальное условие измеряли в трех биологических повторностях, и данные представляли как среднее значение ±CO. Значимость оценивали путем сравнения с необработанными контрольными образцами с использованием однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным критерием Тьюки, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Фиг. 58. Количество IL-10, измеренное в нормальной сыворотке (NS) или жидкости экссудата злокачественного новообразования пациента (A: перитонеальный асцит, P: плевральный выпот) с использованием набора IL-10 Human ELISA MAX (Biolegend, 430604).

Фиг. 59. Опосредованная CD3/28 микросферами активация Т-клеток МКПК (на основании уровней CD69/CD25) в жидкостях пациента в сравнении с нормальной сывороткой, по данным проточной цитометрии. A: экссудатная жидкость пациента, P: плевральная жидкость.

Фиг. 60. Опосредованная CD3/28 микросферами дегрануляция Т-клеток МКПК (на основании экспрессии CD107a) в жидкостях пациента. A: асцит, P: плевральная жидкость.

Фиг. 61. Корреляция между уровнями IL-10 в жидкостях пациента и опосредованной CD3/CD28-микросферами дегрануляцией Т-клеток.

Фиг. 62. Опосредованная микросферами с биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM активация Т-клеток МКПК (на основании экспрессии CD69/CD25) в жидкостях пациента. A: асцит, P: плевральная жидкость.

Фиг. 63. Опосредованная микросферами с биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM дегрануляция Т-клеток МКПК (на основании экспрессии CD107a) в жидкостях пациента. A: асцит, P: плевральная жидкость.

Фиг. 64. Цитотоксичность для SKOV3, опосредованная микросферами с биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM в жидкостях пациента. A: асцит, P: плевральная жидкость.

Фиг. 65. Опосредованная биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM активация Т-клеток (на основании экспрессии CD25/CD69) в среде RPMI по сравнению с асцитной жидкостью.

Фиг. 66. Способность EnAd-SA-EpCAM Бисп. акт.Т-клеток и EnAd-SA-Control Бисп.акт.Т-кл. индуцировать опосредованный Т-клетками лизис клеток-мишеней в среде RPMI по сравнению с асцитной жидкостью. ((A) количество CD3+. (B) экспрессия CD25 Т-клетками. (C) количество EpCAM+клеток, определенное методом проточной цитометрии.

Фиг. 67. Способность EnAd-SA-EpCAM Бисп.акт.Т-клеток и EnAd-SA-Control Бисп.акт.Т-клеток индуцировать опосредованный Т-клетками лизис клеток-мишеней в асцитной жидкости (образцы 7 пациентов). (A) количество CD3+. (B) экспрессия CD25 Т-клетками. (C) количество EpCAM+ клеток, определенное методом проточной цитометрии. См. обозначения фиг. 67A.

Фиг. 68. Сравнение активации выработки Т-клеточных цитокинов рекомбинантным белком биспецифичного активатора Т-клеток к FAP в присутствии человеческих фибробластов и поликлональной активацией с анти-CD3/CD28-микросферами. (A) Уровни IFNγ, измеренные ИФА. (B) Уровни цитокинов, измеренные с помощью набора цитокиновых микросфер.

Фиг. 69. FAP-нацеленный биспецифичный активатор Т-клеток индуцирует дегрануляцию Т-клеток и специфичную цитотоксичность FAP+ клеток (A) Дегрануляция Т-клеток в культуре с клетками NHDF (5:1) и (B) содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами. Дегрануляцию оценивали путем экстернализации CD107a после 6-часового культивирования со специфичным антителом к CD107a и измеряли проточной цитометрией. Микросферы CD3/CD28 Dynabeads использовали в качестве положительного контроля. (C) Цитотоксичность клеток NHDF через 24 ч при совместном культивировании с Т-клетками (1:5) и 10-кратном серийном разведении содержащих биспецифичный активатор Т-клеток супернатантов. Цитотоксичность оценивали по высвобождению ЛДГ в культуральные супернатанты. (D) Лизис NHDF по данным высвобождения ЛДГ (слева) и индукцию CD25 на Т-клетках (справа) оценивали после 24-часового совместного культивирования с Т-клетками, полученными из МКПК (1:5), от шести здоровых доноров, и содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами.

Фиг. 70. EnAd, экспрессирующий биспецифичный активатор Т-клеток к FAP, избирательно убивает FAP+ фибробласты и снижает TGFb в образцах перитонеального асцита (A, B) Количество FAP+ фибробластов (A) и EpCAM+ опухолевых клеток (B) после 72 ч культивирования с Т-клетками, полученными из МКПК, и EnAd или рекомбинантными вирусами. Асцитные клетки были впервые выделены у трех пациентов с асцитом и размножены ex vivo. Количество клеток измеряли через 72 ч после инфицирования методом проточной цитометрии. (C) Индукцию маркера активации CD25 на CD3 клетках, полученных из МКПК, из (A) измеряли через 72 ч после инфицирования. (D) Уровни TGFb измеряли с помощью ИФА с использованием супернатантов, собранных из (A).

Фиг. 71. Активация эндогенных опухоль-ассоциированных Т-клеток и ассоциированная гибель FAP+ клеток в образцах биопсии асцита злокачественного новообразования пациента белком биспецифичного активатора Т-клеток к FAP и вирусами EnAd-FAP Бисп.акт.Т-кл. (A) Активация Т-клеток, измеренная по экспрессии CD25. (B) остаточное количество FAP+ клеток, измеренное с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 72. Влияние блокирующих PD-L1 антител на опосредованную биспецифичным активатором Т-клеток активацию Т-клеток в образце пациента (A) Экспрессию PD1 эндогенными Т-клетками и PD-L1 на FAP + клетках после их первоначального выделения из перитонеального асцита оценивали с помощью проточной цитометрии. (B) Неочищенные суммарные клетки из перитонеального асцита инкубировали в 50% жидкости из того же экссудата в присутствии свободного биспецифичного активатора Т-клеток, EnAd или рекомбинантного вируса с или без блокирующего анти-PD-L1 антитела. Через 2 дня общую популяцию клеток собирали, и количественно определяли количество CD25+ Т-клеток с помощью проточной цитометрии. (C) Количество гамма-интерферона в культуральных супернатантах из (B, D), измеренное с помощью ИФА. (D) Количество остаточных FAP+ клеток в (B) измеряли с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 73. EnAd, экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток, активируют и перенаправляют Т-клетки из образцов биопсии пациента лизировать фибробласты NHDF (A) Экспрессия PD-1 эндогенными Т-клетками после выделения из здоровых доноров или образцов биопсии экссудата злокачественного новообразования. Экспрессию PD-1 измеряли проточной цитометрией. (B) Доля CD3+ клеток в неочищенной клеточной популяции МКПК и образцов раковой биопсии, измеренная с помощью проточной цитометрии. (C) Уровни гамма-интерферона, измеренные ИФА в культуральных супернатантах, со-

бранных из (B) через 120 ч после обработки. (D) Жизнеспособность фибробластов NHDF контролировали в режиме реального времени в течение 130 ч с помощью анализа цитотоксичности xCELLigence в совместной культуре с МКПК или суммарными клетками биопсии рака (1:5) и содержащим биспецифичный активатор Т-клеток супернатантом.

Фиг. 74. Влияние образцов иммуносупрессивной асцитной жидкости на активацию опосредованную микросферами с биспецифичным активатором Т-клеток к FAP и анти-CD3/CD28 микросферами Т-клеток МКПК. (A) Т-клетки МКПК, активированные анти-CD3/Cd28 Dynabeads. (B) Т-клетки МКПК, активированные контрольными или биспецифичным активатором Т-клеток к FAP в присутствии клеток NHDF. NS: нормальная сыворотка, A: перитонеальный асцит.

Фиг. 75. EnAd экспрессирующий биспецифичный активатор Т-клеток к FAP, поляризует CD11b+ макрофаги у пациентов с асцитом в направлении более воспалительного фенотипа (A) Неочищенные суммарные клетки из образца асцита инкубировали в 50% асцитной жидкости в присутствии свободного биспецифичного активатора Т-клеток, или вируса, экспрессирующего биспецифичный активатор Т-клеток. В качестве положительного контроля была использована обработка гамма-интерфероном. Через 3 дня собирали общую популяцию клеток и измеряли индукцию маркера активации CD25 на клетках CD3+ с помощью проточной цитометрии. (B) Уровни гамма-интерферона в культуральных супернатантах из (A) измеряли с помощью ИФА. (C) Через 3 дня измеряли уровни экспрессии CD68, CD86, CD206 и CD163 на клетках CD11b+ из (A) с помощью проточной цитометрии. Показаны репрезентативные спектры проточной цитометрии из трех повторностей, вместе с полным набором данных.

Фиг. 76. Характеристика структуры и клеточного состава солидной опухоли предстательной железы (A) Окрашивание EpCAM, (B) окрашивание CD8, (C) окрашивание FAP. (D) Репрезентативные иммуногистохимические изображения индукции CD25 в срезах опухоли предстательной железы после обработки вирусами, экспрессирующими биспецифичный активатор Т-клеток. Биоптаты опухоли нарезали толщиной 300 мкм вибратомом Leica, культивировали и инфицировали во вставках и собирали после 7 дней обработки. (E) Уровни IFNg в культуральной среде срезов ткани, измеренные с помощью ИФА. Супернатанты собирали из срезов культур злокачественной и доброкачественной ткани в указанный момент времени. (F) Уровни IL-2 в культуральной среде злокачественной и доброкачественной ткани, измеренные ИФА.

Фиг. 77A-C. Схематическое представление трансгенных кассет, использованных в примере 33.

Фиг. 77D. Количество вирусных геномов, обнаруженных на клетку в опухолевых клетках, обработанных NG-611, NG-612 и NG-617.

Фиг. 78. Процент Т-клеток, экспрессирующих CD69 (a), CD25 (b) HLA-DR (c), CD40L (d) или CD107a клеточной поверхности (e) после совместного культивирования с EpCam, экспрессирующими клетки SKOV, и супернатантами, собранными из клеток A549 через 24, 48 или 72 ч после обработки вирусными частицами NG-611 по сравнению с NG-612, enadenotucirev или необработанными контрольными супернатантами.

Фиг. 79. Процент Т-клеток, экспрессирующих CD69 (a), CD25 (b), HLA-DR (c), CD40L (d) или CD107a клеточной поверхности (e) после совместного культивирования с FAP, экспрессирующими клетки MRC-5, и супернатантами, собранными из клеток A549 через 24, 48 или 72 ч после обработки вирусными частицами NG-612 по сравнению с NG-611, enadenotucirev или необработанными контрольными супернатантами.

Фиг. 80. Процент клеток MRC-5, которые экспрессируют EpCAM и FAP.

Фиг. 81. Экспрессия IFNγ в супернатантах сокультур Т-клеток с клетками SKOV (A) или MRC-5 (B), инкубированными с супернатантами, собранными из клеток A549 через 24, 48 или 72 ч после обработки вирусными частицами NG-611, NG-612 или enadenotucirev, или необработанными контрольными супернатантами.

Фиг. 82. Противоопухолевая эффективность и иммунная активация вирусов, экспрессирующих биспецифичный активатор Т-клеток, in vivo, (a) объем опухоли у мышей, получавших физиологический раствор, enadenotucirev или NG-611. (b) соотношение CD8 к CD4 Т-клеткам в опухолях, обработанных NG-611, по сравнению с обработанными вирусом enadenotucirev или необработанными контрольными.

Фиг. 83. Схематическое изображение трансгенных кассет, (a) NG-615, (b) NG-640, (c) NG-641.

Фиг. 84. Количество вирусных геномов, обнаруженных на клетку в опухолевых клетках, обработанных NG-612 и NG-615.

Фиг. 85. Экспрессия IFNα, MIP1α и Flt3L в клеточном супернатанте NG-615 по сравнению с супернатантом обработанных вирусом enadenotucirev и необработанных контрольных опухолевых клеток.

Фиг. 86. Количество Т-клеток, экспрессирующих CD69 (a), CD25 (b), HLA-DR (c), CD40L (d) или CD107a клеточной поверхности (e) после совместного культивирования с FAP-экспрессирующими клетками MRC-5 и супернатантом, собранными из клеток A549 через 24, 48 или 72 ч после обработки вирусными частицами NG-615 по сравнению с NG-612, enadenotucirev или необработанными контрольными супернатантами.

Фиг. 87. Экспрессия IFNγ в супернатантах совместного культивирования Т-клеток с клетками MRC-

5, инкубированными с супернатантами, собранными из клеток A549 через 24, 48 или 72 ч после обработки вирусными частицами NG-612, NG-615 или enadenotucirev или необработанными контрольными супернатантами.

Фиг. 88. Схематическое изображение трансгенной кассеты NG-618.

Фиг. 89. Детектирование поверхностной экспрессии FAP на клетках MRC-5 (a) или экспрессии EpCam на клетках SKOV (b) после инкубации с супернатантами, собранными из клеток A549, через 72 ч после обработки вирусными частицами NG-611, NG-612, NG-615 или enadenotucirev.

Фиг. 90. Процент Т-клеток, экспрессирующих CD24 (a), CD40L (b) или CD107a клеточной поверхности (c) после совместного культивирования с FAP-экспрессирующими клетками MRC-5, и супернатантами, собранными из клеток A549 через 72 ч после обработки вирусными частицами NG-618 по сравнению с enadenotucirev или необработанными контролями.

Фиг. 91. Процент Т-клеток, экспрессирующих CD24 (a), CD40L (b) или CD107a клеточной поверхности (c) после совместного культивирования с EpCam-экспрессирующими клетки SKOV, и супернатантами, собранными из клеток A549 через 72 ч после обработки вирусными частицами NG-618, по сравнению с enadenotucirev или необработанными контролями.

Фиг. 92. Процент погибших клеток MRC-5 (a) или SKOV (b) после совместного культивирования с Т-клетками и супернатантами, собранными из клеток A549 в течение 72 ч после обработки вирусными частицами NG-618, по сравнению с enadenotucirev или необработанными контролями.

Последовательности

SEQ ID NO: 1: кодирующая последовательность ДНК анти-EpCAM биспецифичного активатора Т-клеток с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной дека-His- меткой.

SEQ ID NO: 2: последовательность белка анти-EpCAM биспецифичного активатора Т-клеток, с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной дека-His-меткой.

SEQ ID NO: 3: кодирующая последовательность ДНК анти-FAP биспецифичного активатора Т-клеток, с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной дека-His-меткой.

SEQ ID NO: 4: аминокислотная последовательность анти-FAP биспецифичного активатора Т-клеток, с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной дека-His-меткой.

SEQ ID NO: 5: кодирующая последовательность ДНК контрольного (анти-FHA) биспецифичного активатора Т-клеток, с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной дека-His-меткой.

SEQ ID NO: 6: аминокислотная последовательность контрольного (анти-FHA) биспецифичного активатора Т-клеток с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной дека-His-меткой.

SEQ ID NO: 7: аминокислотная последовательность анти-CD3 ScFv.

SEQ ID NO: 8: VH анти-CD3.

SEQ ID NO: 9: VL анти-CD3.

SEQ ID NO: 10: линкерная последовательность анти-CD3 ScFv.

SEQ ID NO: 11: анти-FAP ScFv.

SEQ ID NO: 12: VL домен анти-FAP.

SEQ ID NO: 13: VH домен анти-FAP.

SEQ ID NO: 14: линкерная последовательность анти-FAP и анти-EpCAM.

SEQ ID NO: 15: лидерная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток.

SEQ ID NO: 16: анти-EpCAM ScFv.

SEQ ID NO: 17: VL анти-EpCAM.

SEQ ID NO: 18: VH анти-EpCAM.

SEQ ID NO: 19: контрольный биспецифичный активатор Т-клеток (анти-FHA).

SEQ ID NO: 20: контрольный (анти-FHA) ScFv.

SEQ ID NO: 21: контрольный (анти-FHA) VL.

SEQ ID NO: 22: контрольный (анти-FHA) VH.

SEQ ID NO: 23: линкерная последовательность контрольного (анти-FHA) ScFv.

SEQ ID NO: 24: последовательность дека-His-метки.

SEQ ID NO: 25: FAP биспецифичный активатор Т-клеток-P2A-RFP [КУРСИВ =лидерная, ЖИРНЫЙ = сайт расщепления фурином. ПОДЧЕРКИВАНИЕ = последовательность P2A, нижний регистр = RFP).

SEQ ID NO: 26: контрольный (анти-FHA) биспецифичный активатор Т-клеток-P2A-RFP [КУРСИВ = лидерная, ЖИРНЫЙ = сайт расщепления фурином, ПОДЧЕРКИВАНИЕ = последовательность P2A, нижний регистр = RFP).

SEQ ID NO: 27: кодирующая последовательность ДНК EpCAM человека.

SEQ ID NO: 28: аминокислотная последовательность EpCAM человека.

SEQ ID NO: 29: кодирующая последовательность ДНК FAP человека.

SEQ ID NO: 30: аминокислотная последовательность FAP человека.

SEQ ID NO: 31: последовательность промотора CMV.

SEQ ID NO: 32: поздняя последовательность полиаденилирования SV40.

SEQ ID NO: 33: нулевая последовательность.

SEQ ID NO: 34: NG-601 (EnAd-CMV-EpCAM биспецифичный активатор Т-клеток).

SEQ ID NO: 35: NG-602 (EnAd-SA-EpCAM биспецифичный активатор Т-клеток).

SEQ ID NO: 36: NG-605 (EnAd-CMV-FAP биспецифичный активатор Т-клеток).

SEQ ID NO: 37: NG-606 (EnAd-SA-FAP биспецифичный активатор Т-клеток).

SEQ ID NO: 38: геном EnAd.

SEQ ID NO: 39: последовательность ДНК B_X, соответствующая и включающая п.н. 28166-28366 генома EnAd.

SEQ ID NO: 40: последовательность ДНК B_Y, соответствующая и включающая п.н. 29345-29379 генома EnAd.

SEQ ID NO: 41: HIS-метка.

SEQ ID NO: 42: последовательность акцептора сплайсинга.

SEQ ID NO: 43: последовательность полиаденилирования SV40.

SEQ ID NO: 44: нуклеотидная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к EpCam (OKT3).

SEQ ID NO: 45: нуклеотидная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP (OKT3).

SEQ ID NO: 46: нуклеотидная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP (aCD3).

SEQ ID NO: 47: трансгенная кассета NG-611.

SEQ ID NO: 48: трансгенная кассета NG-612.

SEQ ID NO: 49: трансгенная кассета NG-613.

SEQ ID NO: 50: вставка сайта рестрикции (B_X).

SEQ ID NO: 51: вставка сайта рестрикции (B_Y).

SEQ ID NO: 52: последовательность промотора CMV.

SEQ ID NO: 53: последовательность промотора PGK.

SEQ ID NO: 54: последовательность промотора CBA.

SEQ ID NO: 55: короткая последовательность ДНК акцептора сплайсинга (SSA).

SEQ ID NO: 56: последовательность ДНК акцептора сплайсинга (SA).

SEQ ID NO: 57: разветвленная последовательность ДНК акцептора сплайсинга (bSA).

SEQ ID NO: 58: последовательность Козака (Нулевая последовательность).

SEQ ID NO: 59: пример стартового кодона.

SEQ ID NO: 60: участок внутренней посадки рибосомы (IRES).

SEQ ID NO: 61: пептид P2A.

SEQ ID NO: 62: пептид F2A.

SEQ ID NO: 63: пептид E2A.

SEQ ID NO: 64: пептид T2A.

SEQ ID NO: 65: последовательность полиаденилирования (polyA).

SEQ ID NO: 66: лидерная последовательность.

SEQ ID NO: 67: лидерная последовательность.

SEQ ID NO: 68: аминокислотная последовательность IFNF.

SEQ ID NO: 69: аминокислотная последовательность IFNα.

SEQ ID NO: 70: аминокислотная последовательность TNFα.

SEQ ID NO: 71: последовательность ДНК, соответствующая области E2B генома EnAd (п.н. 10355-5068).

SEQ ID NO: 72: кодирующая последовательность ДНК анти-EpCAM Биспецифичного активатора Т-клеток, с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной дека-His-меткой.

SEQ ID NO: 73: последовательность белка анти-EpCAM биспецифичного активатора Т-клеток, с N-концевой сигнальной последовательностью без С-концевой аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 74: кодирующая последовательность ДНК анти-FAP биспецифичного активатора Т-клеток, с N-концевой сигнальной последовательностью без С-концевой аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 75: аминокислотная последовательность анти-FAP биспецифичного активатора Т-клеток, с N-концевой сигнальной последовательностью без С-концевой аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 76: кодирующая последовательность ДНК контрольного (анти-FHA) биспецифичного активатора Т-клеток, с N-концевой сигнальной последовательностью без С-концевой аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 77: аминокислотная последовательность контрольного (анти-FHA) биспецифичного активатора Т-клеток с N-концевой сигнальной последовательностью без С-концевой аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 78: контрольный биспецифичный активатор Т-клеток (анти-FHA) без С-концевой аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 79: NG-601 (EnAd-CMV-EpCAM биспецифичный активатор Т-клеток) без аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 80: NG-602 (EnAd-SA-EpCAM биспецифичный активатор Т-клеток) без аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 81: NG-605 (EnAd-CMV-FAP биспецифичный активатор Т-клеток) без аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 82: NG-606 (EnAd-SA-FAP биспецифичный активатор Т-клеток) без аффинной дека-His-метки.

SEQ ID NO: 83: нуклеотидная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к EpCam (OKT3).

SEQ ID NO: 84: нулевая последовательность.

SEQ ID NO: 85: нуклеотидная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP (OKT3).

SEQ ID NO: 86: нулевая последовательность.

SEQ ID NO: 87: нуклеотидная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP (aCD3).

SEQ ID NO: 88: трансгенная кассета NG-611.

SEQ ID NO: 89: трансгенная кассета NG-612.

SEQ ID NO: 90: трансгенная кассета NG-613.

SEQ ID NO: 91: трансгенная кассета NG-614.

SEQ ID NO: 92: трансгенная кассета NG-617.

SEQ ID NO: 93: аминокислотная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к EpCam (OKT3).

SEQ ID NO: 94: аминокислотная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP (OKT3).

SEQ ID NO: 95: аминокислотная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP (aCD3).

SEQ ID NO: 96: геном NG-611.

SEQ ID NO: 97: геном NG-612.

SEQ ID NO: 98: геном NG-613.

SEQ ID NO: 99: геном NG-614.

SEQ ID NO: 100: геном NG-617.

SEQ ID NO: 101: геном NG-615.

SEQ ID NO: 102: геном NG-640.

SEQ ID NO: 103: геном NG-641.

SEQ ID NO: 104: нулевая последовательность.

SEQ ID NO: 105: нуклеотидная последовательность Flt3L.

SEQ ID NO: 106: нулевая последовательность.

SEQ ID NO: 107: нуклеотидная последовательность MIP1α.

SEQ ID NO: 108: последовательность гибкого линкера.

SEQ ID NO: 109: нуклеотидная последовательность IFNα.

SEQ ID NO: 110: нуклеотидная последовательность CXCL10.

SEQ ID NO: 111: нуклеотидная последовательность CXCL9.

SEQ ID NO: 112: трансгенная кассета NG-615.

SEQ ID NO: 113: трансгенная кассета NG-640.

SEQ ID NO: 114: трансгенная кассета NG-641.

SEQ ID NO: 115: аминокислотная последовательность FLT3L.

SEQ ID NO: 116: аминокислотная последовательность MIP1α.

SEQ ID NO: 117: аминокислотная последовательность IFNα.

SEQ ID NO: 118: аминокислотная последовательность CXCL9.

SEQ ID NO: 119: аминокислотная последовательность CXCL10.

SEQ ID NO: 120: геном NG-618.

SEQ ID NO: 121: нуклеотидная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток EpCam NG-618.

SEQ ID NO: 122: нуклеотидная последовательность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP NG-618.

SEQ ID NO: 123: трансгенная кассета NG-618.

SEQ ID NO: 124-297 являются линкерными последовательностями.

SEQ ID NO: 298: геном NG-616.

Примеры

Пример 1.

Были сконструированы рекомбинантные биспецифичные активаторы Т-клеток и получены белки, как описано в этом примере.

Конструирование биспецифичного активатора Т-клеток.

Биспецифичный активатор Т-клеток создают путем объединения двух одноцепочечных фрагментов антител (ScFv) различной специфичности гибким линкером Gly4Ser. Фрагменты ScFv создают путем объединения доменов VH и VL из родительских моноклональных антител с помощью линкера. Каждый биспецифичный активатор Т-клеток был сконструирован с N-концевой сигнальной последовательностью для секреции клетками млекопитающих и С-концевой декагистидиновой аффинной меткой для обнаружения и очистки. Биспецифичные активаторы Т-клеток были сконструированы стандартными методами клонирования ДНК и вставлены в векторы экспрессии белка (фиг. 1). Анти-EpCAM биспецифичный активатор Т-клеток относится к патенту WO 2005040220 (SEQ ID NO: 63) с добавлением сигнальной последовательности и аффинной метки. Анти-FAP биспецифичный активатор Т-клеток был создан de novo с использованием анти-FAP ScFv из патента WO2010037835A2 и анти-CD3 ScFv из патента WO 2005040220 (SEQ ID 63 в нем) с добавлением сигнальной последовательности и аффинной метки. В качестве контрольного биспецифичного активатора Т-клеток использовали анти-FHA (филаментный гемагглютинин из Bordetella pertussis) ScFv из работы Hussein et al., 2007 (Hussein AH et al. (2007) "Construction and characterization of single-chain variable fragment antibodies directed against the Bordetella pertussis surface adhesins filamentous hemagglutinin and pertactin". Infect Immunity 75, 5476-5482) и анти-CD3 ScFv из патента WO 2005040220 (SEQ ID NO: 63 в нем) с добавлением сигнальной последовательности и аффинной метки. Кодирующие ДНК и аминокислотные последовательности для этих биспецифичных активаторов Т-клеток соответствуют SEQ ID NO: 1-6. Получение рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток Рекомбинантные белки биспецифичного активатора Т-клеток были получены путем клонирования соответствующих последовательностей в вектор pSF-CMV с использованием промотора CMV (SEQ ID NO: 31) для управления экспрессией белка (фиг. 1). Концентрацию плазмидной ДНК для плазмид, pSF-CMV-EpCAM биспецифичный активатор Т-клеток, pSF-CMV-FAP биспецифичный активатор Т-клеток и pSF-CMV-Control биспецифичный активатор Т-клеток (табл. 2), измеряли с помощью прибора NanoDrop. Пустой вектор pSF-CMV включен в качестве отрицательного контроля. По 54,7 мкг каждого разводили 4 мл OptiMEM. 109,2 мкг PEI (линейный, мол.вес 25000, Polysciences, США) разбавляли в 4 мл среды OptiMEM и смешивали с 4 мл разбавленной ДНК для получения комплексов ДНК-PEI (соотношение ДНК:PEI 1:2 (вес/вес)). После инкубации при комнатной температуре в течение 20 мин эту сложную смесь доливали до 18 мл средой OptiMEM, и эту смесь для трансфекции добавляли в колбу T175, содержащую клетки Ad293 при конфлюентности 90%. После инкубации клеток со смесью для трансфекции в течение 4 ч в условиях 37°C, 5% CO_2, к клеткам добавляли 30 мл клеточной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением глютамина, без фенолового красного), и колбы инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 48 ч. Другая колба клеток была трансфицирована параллельно смесью pSF-CMV-GFP для гарантии эффективной эффективности трансфекции. Для сбора секретируемого белка супернатант трансфицированных клеток собирали и центрифугировали при 350 g при 4°C в течение 5 мин для удаления клеточных компонентов (Allegra X-15R, Beckman Coulter). Супернатанты переносили в центробежные фильтрующие установки 10 k Amicon Ultra-15 MWCO (Millipore). После центрифугирования при 4750 об/мин и 4°C объем ретентата регулировали с помощью проточной фильтрации до получения более высокой 50-кратной концентрации. Аликвоты концентрированного белка хранили при -80°C.

Таблица 2

Префикс "p" в обозначениях указывает на то, что конструкция является плазмидой

ID плазмиды	**Кодирующая последовательность SEQ ID NO:**	**[плазмидная ДНК] нг/мл**
pSF-CMV-EpCAMБиспецифичный активатор Т-клеток	SEQ ID NO: 1	3717
pSF-CMV-FAPБиспецифичный активатор Т-клеток	SEQ ID NO: 3	6700
pSF-CMV-ControlБиспецифичный активатор Т-клеток	SEQ ID NO: 5	5300
pSF-Lenti-EpCAM	SEQ ID NO: 27	2529,3
pSF-Lenti-FAP	SEQ ID NO: 29	659,6

Детектирование рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток.

Для детектирования биспецифичного активатора Т-клеток, С-концевую дека-гистидиновую аффинную метку можно зондировать анти-His антителом, используя метод вестерн-блоттинга. Образцы белка доводили буфером для лизиса до конечного объема 15 мкл, включая 2,5 мкл 6х буфера для образца Laemmli SDS, содержащего р-меркаптоэтанол и SDS. Образцы инкубировали в течение 5 мин при 95°С для денатурирования белков и наносили на 15-луночные 10% заранее изготовленные полиакриламидные гели (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, BioRad, Великобритания). Гели анализировали при 180 В в течение 45 мин в 1-кратном подвижном буфере в системе Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad, Великобритания). Белки из SDS гелей переносили на нитроцеллюлозные мембраны мокрым электроблоттингом при 300 мА и 4°С в течение 90 мин в 1-кратном буфере для переноса в ячейке Mini Trans-Blot Cell (BioRad, Великобритания). Перенос осуществляли в присутствии пакета со льдом для ограничения нагрева. Затем нитроцеллюлозную мембрану блокировали 5%-ным молоком в PBS-T на шейкере в течение 1 ч при комнатной температуре и зондировали анти-His антителом (С-концевым) (мышиный α-6xHis, клон 3D5, Invitrogen, Великобритания, № 46-0693), разбавленный 1:5000 в PBS/5% молока. После инкубации на шейкере в течение ночи при 4°С мембрану промывали и зондировали поликлональным вторичным α-мышиный иммуноглобулин-антителом, меченным HRP (1:10 000 в PBS/5% молока, Dako, № P0161) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации применяли субстрат Super Dignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), следуя инструкциям производителя, с экспонированием рентгеновской пленки и проявкой в автоматическом процессоре пленки. Результаты продемонстрировали экспрессию и секрецию белка биспецифичного активатора Т-клеток из клеток Ad293, трансфицированных плазмидами экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток, но не родительским вектором. Количественное определение рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток.

Для измерения количества рекомбинантного белка биспецифичного активатора Т-клеток использовали метод дот-блоттинга, для сравнения сигнала биспецифичного активатора Т-клеток с His-меченным (С-концевой 10His) стандартом белка (10×His-меченный человеческий катепсин D, Biolegend, № 556704). Готовили двукратные серийные разведения образцов биспецифичного активатора Т-клеток и стандарта белка, и по 1,5 мкл каждого непосредственно наносили на нитроцеллюлозную мембрану и сушили на воздухе в течение 20 мин. Затем выполняли протокол блокирования и окрашивания, описанный выше для вестерн-блоттинга. Молярная концентрация стандарта белка была отрегулирована так, чтобы обеспечить концентрацию биспецифичного активатора Т-клеток 250 мкг/мл. Результаты (фиг. 2А) продемонстрировали экспрессию и секрецию белка биспецифичного активатора Т-клеток из клеток Ad293, трансфицированных плазмидами экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток. ИФА-анализ связывания FAP.

FAP-связывающую активность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP и контрольного (анти-FHA) биспецифичного активатора Т-клеток (SEQ ID NO: 4 и 6), секретируемых из клеток, трансфицированных pSF-CMV-FAP биспецифичный активатор Т-клеток или pSF-CMV-Control биспецифичный активатор Т-клеток, оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Супернатанты пустого вектора pSF-CMV были включены в качестве отрицательного контроля. Планшеты для ИФА (96-луночный микропланшет Nunc Immuno MaxiSorp) готовили путем покрытия в течение ночи при 4°С человеческим FAP/сепразным белком (100 нг/лунку, Sino Biological Inc, № 10464-H07H-10) в буфере PBS. Между всеми последующими стадиями связывания планшеты промывали PBS 0,05% Твин 20. Планшеты блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре 5% BSA в PBS 0,05% Твин 20. Аликвоты белка биспецифичного активатора Т-клеток или белка, собранного из трансфицированных пустым вектором pSF-CMV лунок разбавляли в 10 раз в PBS/5% BSA/0,05% Твин 20. Все образцы добавляли в покрытые FAP планшеты и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Детектирующее антитело, анти-His (С-конец) антитело (мышиный анти-6xHis, клон 3D5, Invitrogen, Великобритания, № 46-0693), разводили 1:1000 и применяли в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем конъюгированный с HRP анти-мышиный Fc (1:1000 в PBS/5% молока, Dako) применяли в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего проводили определение HRP с помощью раствора субстрата HRP, 3.3.5.5'-тераметилэтилендиамина (TMB, Thermo-Fisher). Для прекращения реакции использовали стоп-раствор, а проявленный цвет измеряли при 450 нм на планшет-ридере. Поглощение при 450 нм наносили на график для биспецифичного активатора Т-клеток к FAP, контрольного биспецифичного активатора Т-клеток и супернатантов пустого вектора, демонстрируя специфичное связывание биспецифичного активатора Т-клеток к FAP с белком FAP. Полученные результаты (фиг. 2В) показывают специфичное связывание биспецифичного активатора Т-клеток к FAP, но не контрольного биспецифичного активатора Т-клеток с рекомбинантным белком FAP. ИФА-анализ связывания EpCAM.

EpCAM-связывающую активность биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM и контрольного биспецифичного активатора Т-клеток (SEQ ID NO: 2 и 6), секретируемых из клеток, трансфицированных pSF-CMV-EpCAM биспецифичный активатор Т-клеток или pSF-CMV-Control биспецифичный активатор Т-клеток, оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Супернатанты пустого вектора pSF-CMV были включены в качестве отрицательного контроля. Планшеты для ИФА (96-луночный мик-

ропланшет Nunc Immuno MaxiSorp) готовили путем покрытия в течение ночи при 4°C человеческим белком EpCAM/TROP-1 (50 нг/лунку, Sino Biological Inc, № 10694-H02H-50) в буфере PBS. Между всеми последующими стадиями связывания планшеты промывали PBS 0,05% Твин 20. Планшеты блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с 5% BSA в PBS 0,05% Твин 20. Аликвоты белка биспецифичныого активатора Т-клеток или белка, собранного из трансфицированных пустым вектором pSF-CMV лунок разводили в 10 раз в PBS/5% BSA/0,05% Твин 20. Все образцы добавляли в покрытые EpCAM планшеты и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Детектирующее антитело, анти-His (C-конец) антитело (мышиный анти-6xHis, клон 3D5, Invitrogen, Великобритания, № 46-0693), разводили 1: 5000 и применяли в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем конъюгированный с HRP антимышиный Fc (1:5000 в PBS/5% молока, Dako) применяли в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего проводили определение HRP с помощью раствора субстрата HRP, 3,3,5,5'-тераметилэтилендиамина (TMB, Thermo-Fisher). Для прекращения реакции использовали стоп-раствор, а проявленный цвет измеряли при 450 нм на планшет-ридере. Поглощение при 450 нм наносили на график для биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, контрольного биспецифичного активатора Т-клеток и супернатантов пустого вектора, демонстрируя специфичное связывание биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM с рекомбинантным EpCAM. Результаты (фиг. 2C) показывают специфичное связывание биспецифичного активатора Т-клеток к EpTEAM, но не контрольного биспецифичного активатора Т-клеток с рекомбинантным белком EpCAM.

Пример 2.

Функциональную активность рекомбинантных белков биспецифичного активатора Т-клеток оценивали в ряде различных анализов до конструирования содержащих трансген биспецифичного активатора Т-клеток вирусов EnAd.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) МКПК человека выделяли центрифугированием в градиенте плотности либо из свежих образцов человеческой крови здоровых доноров, либо из концентратов лейкоцитов цельной крови, полученных из NHS Blood and Transplant UK в Оксфорде. В каждом случае образцы разбавляли 1:2 PBS и 25 мл этой смеси наслаивали на 13 мл фиколла (1,079 г/мл, Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare) в пробирке Falcon на 50 мл. Образцы центрифугировали (Allegra X-15R, Beckman Coulter) при 1600 об/мин в течение 30 мин при 22°C с самой низкой установкой замедления для сохранения разделения фаз. После центрифугирования можно было наблюдать 4 слоя, которые включали слой плазмы в верхней части, за которым следовала граница раздела, содержащий МКПК, слой фиколла и слой эритроцитов и гранулоцитов в нижней части. МКПК собирали с использованием пипетки Пастера и дважды промывали PBS (1200 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре) и ресуспендировали в среде RPMI с добавлением 10% FBS.

Выделение CD3-положительных Т-клеток.

CD3-положительные (CD3+) Т-клетки экстрагировали из МКПК путем деплеции не-CD3-клеток с использованием набора для выделения Т-клеток Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, № 130-096-535) в соответствии с протоколом производителя.

Обработка первичных образцов асцита.

Первичные образцы человеческого асцита были получены из онкологического отделения больницы Черчилля (больница Оксфордского университета) от пациентов с множественными показаниями, включая, среди прочего, рак яичников, поджелудочной железы, молочной железы и желудка. После получения клеточные и жидкие фракции разделяли, замораживали аликвоты жидкости при -20°C для хранения и последующего анализа. Клеточную фракцию обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов (Roche, № 11814389001) для удаления эритроцитов, следуя инструкциям производителя. Типы клеток, присутствующие в каждом образце, определяли путем окрашивания на наличие EpCAM, EGFR, FAP, CD45, CD11b, CD56, CD3, CD4, CD8, PD1 и CTLA4 и анализировали проточной цитометрией. Затем клетки использовали свежими для экспериментов по активации Т-клеток ex vivo и экспериментов по лизису клеток-мишеней. В некоторых случаях клетки пассировали в DMEM с добавлением 10% FBS для использования в более поздних экспериментах.

Поддержание клеточной линии.

Все клеточные линии поддерживали в среде DMEM (Sigma-Aldrich, Великобритания) или RPMI (Sigma-Aldrich, Великобритания), как указано в табл. 3, с добавлением 10% (по объему) эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, GibcoTM) и 1% (об./об.) пенициллина/стрептомицина (10 мг/мл, Sigma-Aldrich, Великобритания) в увлажненном инкубаторе (MCO-17AIC, Sanyo) при 37°C и 5% CO_2, если не указано иное. Клетки разделяли каждые 2-3 дня до достижения конфлюентности путем ферментативной диссоциации с трипсином/ЭДТА (0,05% трипсина, 0,02% ЭДТА, Sigma-Aldrich, Великобритания). В этом процессе культуральную среду аспирировали и клетки промывали 15 мл PBS, а затем клетки обрабатывали 2 мл трипсина/ЭДТА в течение 2-10 мин при 37°C. Трипсин нейтрализовали 10 мл среды DMEM, содержащей 10% FBS, и часть клеток переносили в новые колбы, содержащие свежую среду. Для обычной клеточной культуры в среду добавляли 10% FBS, для инфицирования и трансфекций вирусной плазмиды добавляли 2% FBS и для трансфекций рекомбинантных плазмид биспецифичного активатора Т-клеток FBS не добавляли.

Таблица 3

Клеточная линия	Происхождение клеток	Культуральная среда	Источник
Полученные из асцита клеточные линии	Первичный асцит человека	DMEM	NHS Blood & Transplant UK
BTC100	Первичные фибробласты, ассоциированные с раком легких человека (CAF)	DMEM	Оксфордский университет
CHO-K1	Клетки яичника китайского хомячка, адгезивные	RPMI	ATCC
Стабильные клеточные линии CHO-K1	Клетки яичника китайского хомячка, адгезивные	RPMI	-
DLD1	Колоректальная аденокарцинома человека	RPMI	ATCC
HEK 293A	Человеческие эмбриональные клетки почек, адгезивные	DMEM	ATCC
Стабильные клеточные линии HEK 293A	Человеческие эмбриональные клетки почек, адгезивные	DMEM	-
HEK 293T	Человеческие эмбриональные клетки почек, адгезивные	DMEM	ATCC
MCF-7	Человек, молочная железа, грудь, адгезивные	DMEM	ATCC
Нормальные кожные фибробласты человека (NHDF)	Нормальные первичные кожные фибробласты взрослого человека	DMEM	ATCC
SKOV3	Аденокарцинома яичника человека	DMEM	ATCC

Статистика.

В случаях, когда сравнивались два условия, статистический анализ проводили с использованием t-критерия. Во всех остальных случаях статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа.

Характеристика активации Т-клеток человека рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток к FAP.

Сравнивали способность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP индуцировать активацию Т-клеток в присутствии или отсутствии нормальных клеток дермальных фибробластов человека (NHDF). CD3+ Т-клетки человека (70000 клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном) со-культивировали отдельно или с клетками NHDF (10: 1 Т: NHDF) в присутствии одной среды или 300 нг/мл FAP или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток. Клетки со-культивировали в течение 24 ч при 37°C и затем собирали с помощью безферментативного буфера для диссоциации клеток (Thermo, № 13151014). Уровни экспрессии CD69 (фиг. 3A) и CD25 (фиг. 3B) на CD45+ Т-клетках затем анализировали окрашиванием антител и проточной цитометрией, и представляли данные в виде средне-геометрических значений флуоресценции (gMFI). В качестве положительного контроля для активации Т-клеток использовали иммобилизованное на чашках анти-CD3 антитело (7,5 мкг/мл). Биспецифичный активатор Т-клеток к FAP селективно индуцировал экспрессию маркеров активации CD69 и CD25 на Т-клетках, указывая, что он способен активировать Т-клетки.

Во втором аналогичном эксперименте Т-клетки оценивали путем внутриклеточного окрашивания цитокинов через 6 ч после совместного культивирования с клетками NHDF (200 000 клеток CD3+ плюс 40000 NHDF в лунках 96-луночного планшета) и 300 нг/мл FAP или контрольного биспецифичного ак-

тиватора Т-клеток. CD45+ Т-клетки внутриклеточно окрашивали для определения экспрессии IFNγ с помощью брефельдина А, добавленного в культуральную среду за 5 ч до сбора. В качестве положительного контроля стимулировали Т-клетки растворимым PMA (10 нг/мл) и иономицином (1 мкг/мл). Результаты, показанные на фиг. 4А, показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к FAP в присутствии NHDF приводит к значительно большему количеству экспрессирующих IFNγ Т-клеток по сравнению с контрольным биспецифичным активатором Т-клеток.

Пример 3.

Был проведен ряд экспериментов, аналогичных экспериментам в примере 2, для характеристики рекомбинантного белка биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM. Характеристика активации Т-клеток человека рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток EpCAM.

Сравнивали способность биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM индуцировать активацию Т-клеток в присутствии или отсутствии EpCAM-положительной клеточной линии DLD. CD3+ Т-клетки человека (70000 клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном) со-культивировали отдельно или с клетками DLD (10:1 T:DLD) в присутствии только среды или 600 нг/мл EpCAM или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток. Клетки со-культивировали в течение 24 ч при 37°C и затем собирали с помощью безферментативного буфера для диссоциации клеток. Уровни экспрессии CD69 и CD25 на CD45+ Т-клетках затем анализировали окрашиванием антител и проточной цитометрией, и данные представляли в виде среднегеометрических значений флуоресценции (gMFI). Иммобилизованное на чашках анти-CD3 антитело (7,5 мкг/мл) использовали в качестве положительного контроля для активации Т-клеток. Биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM селективно индуцировал экспрессию маркеров активации CD69 и CD25 на Т-клетках, указывая на то, что он способен активировать Т-клетки (фиг. 4В и С).

В аналогичном эксперименте Т-клетки оценивали путем внутриклеточного окрашивания цитокинов через 6 ч после сокультивирования с клетками DLD (200 000 CD3+ Т-клеток плюс 40000 клеток DLD на лунку 96-луночного планшета) и 300 нг/мл EpCAM или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток. CD45+ Т-клетки внутриклеточно окрашивали для определения экспрессии IFNγ с помощью брефельдина А, добавленного в культуральную среду за 5 ч до сбора. В качестве положительного контроля Т-клетки стимулировали растворимым PMA (10 нг/мл) и иономицином (1 мкг/мл). Результаты показали, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM в присутствии DLD приводил к значительно большему количеству Т-клеток, экспрессирующих IFNγ, по сравнению с контрольным биспецифичным активатором Т-клеток (фиг. 5А).

В другом аналогичном эксперименте МКПК от 8 различных доноров крови использовали для оценки донор-зависимых изменений в опосредованной биспецифичным активатором Т-клеток активации Т-клеток. DLD (7000 клеток) сокультивировали с 100000 МКПК в 96-луночном планшете с U-образным дном в присутствии только среды или 300 нг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM. Клетки со-культивировали в течение 24 ч при 37°C и затем собирали. Затем уровни экспрессии CD69 и CD25 на CD45+ Т-клетках анализировали окрашиванием антител и проточной цитометрией, и данные представляли в виде среднегеометрических значений флуоресценции (gMFI). Результаты показали, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM индуцировал экспрессию маркеров активации CD69 и CD25 в CD3+ Т-клетках от всех 8 доноров (фиг. 5В и С).

Пример 4.

В этом примере оценивали способность рекомбинантных Т-клеток, активированных биспецифичным активатором Т-клеток к FAP индуцировать гибель клеток-мишеней фибробластов.

Биспецифичный активатор Т-клеток к FAP индуцирует опосредованный Т-клетками лизис FAP-положительных клеточных линий и первичных клеток NHDF (7000 клеток) сокультивировали с 70000 Т-клеток в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном в присутствии только среды или 300 нг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к FAP. После 24 ч сокультивирования супернатанты собирали и определяли цитотоксичность с помощью ЛДГ-анализа, следуя инструкциям производителя. Результаты на фиг. 6А показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к FAP значительно увеличивает лизис клеток NHDF. В аналогичном эксперименте 7000 первичных клеток фибробластов легких (BTC100) сокультивировали с 70000 CD3+ Т-клеток с или без 300 нг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к FAP. После 24 ч сокультивирования супернатанты собирали и определяли цитотоксичность с помощью ЛДГ-анализа. Результаты на фиг. 6В и С показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к FAP значительно увеличивает лизис клеток первичных ассоциированных с раком фибробластов человека (CAF). Экспрессия FAP этими и другими клеточными линиями, полученными от пациентов, показана на фиг. 7.

Дозозависимость для лизиса клеток, опосредованного биспецифичным активатором Т-клеток к FAP, оценивали путем сокультивирования 8000 клеток NHDF с 40000 Т-клеток и концентрациями биспецифичныого активатора Т-клеток в диапазоне от 2×10^{3} до 2×10^{-2} нг/мл. После сокультивирования в течение 24 ч при 37°C проводили ЛДГ-анализ на супернатантах для определения цитотоксичности клеток-мишеней. Кривые дозозависимости аппроксимировали с использованием четырехпараметрической

модели нелинейной аппроксимации, интегрированной в GraphPad Prism, получая значение EC50 для биспецифичного активатора Т-клеток к FAP 3,2 нг/мл. Результаты (фиг. 8A) показывают дозозависимость между концентрацией биспецифичного активатора Т-клеток к FAP и цитотоксичностью, измеренной с помощью ЛДГ-анализа (показана как Abs_{490}).

Пример 5.

Исследования, аналогичные приведенным в примере 4, были использованы для демонстрации способности Т-клеток, активированных рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM индуцировать гибель опухолевых клеток-мишеней. Биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM индуцирует опосредованный Т-клетками лизис EpCAM-положительных клеточных линий.

Опухолевые клетки DLD (7000 клеток) совместно культивировали с 70000 Т-клеток в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном в присутствии только среды или 300 нг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM. После 24 ч совместного культивирования супернатанты собирали и определяли цитотоксичность с помощью ЛДГ-анализа. Результаты на фиг. 8B показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM значительно увеличивает лизис клеток DLD (экспрессия EpCAM на клетках DLD показана на фиг. 8C).

В аналогичном эксперименте 4000 клеток SKOV совместно культивировали с 40000 CD3+ Т-клеток с или без 300 нг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM. После 24 ч совместного культивирования супернатанты собирали и определяли цитотоксичность с помощью ЛДГ-анализа. Результаты на фиг. 9A показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM значительно увеличивает лизис клеток SKOV. В другом подобном эксперименте 5000 клеток MCF7 совместно культивировали с 50000 CD3+ Т-клеток с или без 300 нг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM. После 24 ч совместного культивирования супернатанты собирали и определяли цитотоксичность с помощью ЛДГ-анализа. Результаты на фиг. 9B показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM также значительно увеличивает лизис клеток MCF7.

Дозозависимость для опосредованного биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM лизиса клеток оценивали путем совместного культивирования 8000 DLD с 40000 Т-клеток и концентрациями EpCAM или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток в диапазоне от 2×10^{3} до 2×10^{-2} нг/мл. После совместного культивирования в течение 24 ч при 37°C на супернатантах проводили ЛДГ-анализ для определения цитотоксичности клеток-мишеней. Кривые дозозависимости аппроксимировали с использованием четырехпараметрической модели нелинейной аппроксимации, интегрированной в GraphPad Prism, генерируя значение EC50 для биспецифичного активатора Т-клеток к FAP 7,4 нг/мл. Результаты на фиг. 10 показывают дозозависимость между концентрацией биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM и цитотоксичностью.

В заключение, результаты этого примера демонстрируют, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM способен индуцировать опосредованный Т-клетками лизис нескольких EpCAM-положительных опухолевых клеточных линий.

Пример 6.

Стабильные экспрессирующие FAP клеточные линии CHO и Ad293 были изготовлены в качестве средства для демонстрации специфичности биспецифичного активатора Т-клеток к FAP к антигену FAP путем сравнения с родительскими нетрансфицированными клетками. Получение FAP-экспрессирующих стабильно трансфицированных клеточных линий Белковая последовательность гена FAP была получена из базы данных NCBI (SEQ ID 30), и подвергнута обратной транскрипции для генерации кодирующей последовательности ДНК, которая была синтезирована Oxford Genetics Ltd (Оксфорд, Великобритания). Ген FAP клонировали в вектор pSF-Lenti стандартными методами клонирования, получая вектор pSF-Lenti-FAP. Клетки HEK293T трансфицировали лентивирусным вектором экспрессии FAP наряду с pSF-CMV-HIV-Gag-Pol, pSF-CMV-VSV-G, pSF-CMV-HIV-Rev. Липофектамин 2000 использовали в качестве реагента для трансфекции и добавляли к ДНК вектора при соотношении ДНК:липофектамин 1:2 и инкубировали с клетками при 37°C. Супернатант, содержащий лентивирус, собирали через 48 ч и смешивали с полибреном (конечная концентрация, 8 мкг/мл). Смесь лентивирус/полибрен добавляли к посеянным клеткам Ad293 или CHO и инкубировали при 37°C. На четвертый день супернатант заменяли средой, содержащей пуромицин (2 мкг/мл для Ad293 и 7,5 мкг/мл для CHO). Затем клонально отбирали стабильные варианты и определяли экспрессию FAP родительских клеточных линий или стабильно трансфицированного варианта окрашиванием FAP или изотипическим контрольным антителом и анализировали проточной цитометрией (фиг. 11A).

Опосредованный биспецифичным активатором Т-клеток к FAP лизис клеток-мишеней специфичен в отношении FAP-экспрессирующих клеток.

Клетки CHO или CHO-FAP (7000 клеток) совместно культивировали отдельно или с Т-клетками человека (70000) в присутствии только среды или 2 мкг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к FAP в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном. После 24-часовой инкубации супернатанты собирали и измеряли цитотоксичность клеток-мишеней с помощью ЛДГ-анализа цитотоксичности, как описано в примере 4 (фиг. 11B). Активацию Т-клеток также определяли путем анализа уровней экспрессии CD69 и CD25 проточной цитометрией (фиг. 12). Цитотоксичность наблюдалась только при

культивировании клеток CHO-FAP с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к FAP. Это указывает на то, что опосредованная биспецифичным активатором Т-клеток к FAP активация Т-клеток и лизис клеток-мишеней являются высокоспецифичными и ограничиваются клетками, экспрессирующими FAP, но не FAP-негативной родительской клеточной линией.

Пример 7.

Стабильные EpCAM-экспрессирующие клеточные линии CHO и Ad293 были изготовлены в качестве средства для демонстрации специфичности биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM к антигену EpCAM путем сравнения с родительскими нетрансфицированными клетками.

Получение EpCAM-экспрессирующих стабильно трансфицированных клеточных линий Белковая последовательность гена EpCAM была получена из базы данных NCBI (SEQ ID 28), и подвергнута обратной транскрипции для генерации кодирующей последовательности ДНК, которая была синтезирована Oxford Genetics Ltd (Оксфорд, Великобритания). Ген EpCAM клонировали в вектор pSF-Lenti стандартными методами клонирования, получая вектор pSF-Lenti-EpCAM. Клетки HEK293T трансфицировали лентивирусным вектором экспрессии EpCAM наряду с pSF-CMV-HIV-Gag-Pol, pSF-CMV-VSV-G, pSF-CMV-HIV-Rev. Липофектамин 2000 использовали в качестве реагента для трансфекции и добавляли к ДНК вектора при соотношении ДНК:липофектамин 1:2 и инкубировали с клетками при 37°C. Супернатант, содержащий лентивирус, собирали через 48 ч и смешивали с полибреном (конечная концентрация, 8 мкг/мл). Смесь лентивирус/полибрен добавляли к посеянным клеткам Ad293 или CHO и инкубировали при 37°C. На четвертый день супернатант заменяли средой, содержащей пуромицин (2 мкг/мл для Ad293 и 7,5 мкг/мл для CHO). Затем клонально отбирали стабильные варианты и определяли экспрессию EpCAM родительских клеточных линий или стабильно трансфицированного варианта окрашиванием EpCAM или изотопическим контрольным антителом и анализировали проточной цитометрией (фиг. 13A).

Опосредованный биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM лизис клеток-мишеней специфичен в отношении EpCAM- экспрессирующих клеток Клетки CHO или EpCAM (7000 клеток) совместно культивировали отдельно или с Т-клетками человека (70000) в присутствии только среды или 2 мкг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном. После 24-часовой инкубации супернатанты собирали и измеряли цитотоксичность клеток-мишеней с помощью ЛДГ-анализа цитотоксичности (фиг. 13B). Активацию Т-клеток также определяли путем анализа уровней экспрессии CD69 и CD25 проточной цитометрией (фиг. 14). Цитотоксичность наблюдалась только при культивировании клеток CHO-EpCAM с Т-клетками и биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM. Это указывает на то, что опосредованная биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM активация Т-клеток и лизис клеток-мишеней являются высокоспецифичными и ограничиваются клетками, экспрессирующими EpCAM, но не EpCAM-отрицательной родительской клеточной линией.

Пример 8.

В следующем эксперименте оценивали способность рекомбинантного белка биспецифичного активатора Т-клеток к FAP активировать CD4 или CD8 Т-клетки и способность каждой из этих субпопуляций Т-клеток лизировать клетки NHDF. $CD3^+$ Т-клетки (35000) совместно культивировали с 7000 NHDF- клеток в присутствии 300 нг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к FAP в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Клетки собирали и окрашивали антителами к CD4 или CD8 и CD69 и CD25 и анализировали проточной цитометрией. Результаты (фиг. 15A) продемонстрировали, что биспецифичный активатор Т-клеток к FAP индуцировал увеличение маркеров активации CD69 и CD25 как в CD4+, так и в CD8+ Т-клетках.

В аналогичном эксперименте оценивали способность каждой субпопуляции Т-клеток (CD4 и CD8) убивать клетки-мишени. CD4+ Т-клетки экстрагировали из очищенных от CD3 клеток путем положительной селекции с использованием набора для выделения CD4 Т-клеток CD4 T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, № 130-045-101), в соответствии с протоколом производителя, с клетками CD8 в неизолированном отфильтрованном потоке. В лунках 96-луночного планшета с U-образным дном совместно культивировали 7000 NHDF с 35000 Т-клеток CD4+ или CD8+ вместе с 300 нг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к FAP и инкубировали при 37°C. Через 24 ч супернатанты собирали и измеряли цитотоксичность клеток-мишеней с помощью ЛДГ-анализа цитотоксичности. Результаты (фиг. 15B) показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к FAP индуцировал как CD4+, так и CD8+ Т-клетки убивать NHDF-клетки.

Пример 9.

Была оценена способность биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM активировать CD4+ или CD8+ Т-клетки и способность каждой субпопуляции лизировать опухолевые клетки DLD. CD3+ Т-клетки (35000) культивировали совместно с 7000 клеток DLD в присутствии 300 нг/мл контроля или биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Клетки собирали и окрашивали антителами к CD4 или CD8 и CD69 и CD25 и анализировали проточной цитометрией. Полученные результаты (фиг. 16A) продемонстрировали, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM индуцирует повышение маркеров активации CD69 и CD25 как в CD4+, так и в CD8+ Т-клетках. В аналогичном эксперименте оценивали способ-

ность каждой субпопуляции Т-клеток (CD4 и CD8) убивать клетки-мишени. CD4+ Т-клетки экстрагировали из CD3-очищенных клеток путем положительной селекции с использованием набора для выделения CD4 Т-клеток в соответствии с протоколом производителя, при этом клетки CD8 находились в невыбранном отфильтрованном потоке. В лунках 96-луночного планшета с U-образным дном совместно культивировали 7000 DLD с 35000 Т-клеток CD4+ или CD8+ с 300 нг/мл контроля или биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM и инкубировали при 37°C. Через 24 ч супернатанты собирали и измеряли цитотоксичность клеток-мишеней с помощью анализа цитотоксичности ЛДГ (фиг. 16B). Результаты показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM индуцирует как CD4+, так и CD8+ Т-клетки убивать клетки DLD.

Пример 10.

Характеристика опосредованной биспецифичным активатором Т-клеток к FAP активации аутологичных опухоль-ассоциированных лимфоцитов из первичного асцита злокачественного новообразования.

Для оценки активности белков биспецифичного активатора Т-клеток с использованием клеток, полученных от онкологических больных, для тестирования собирали образцы первичных асцитических жидкостей злокачественных новообразований, содержащих как CD3+ Т-клетки, так и FAP+ клетки. Неочищенные асцитные клетки (то есть, без изменений после получения) высевали с плотностью 250 000 клеток на лунку 96-луночного планшета с U-образным дном либо в 100% асцитную жидкость, либо в среду с добавлением 1% человеческой сыворотки в присутствии контроля 500 нг/мл или биспецифичного активатора Т-клеток к FAP. Необработанные лунки служили отрицательным контролем. После инкубации при 37°C в течение 5 дней собирали общую популяцию клеток и определяли количество CD3+ Т-клеток (фиг. 17A) и уровни экспрессии CD25 на CD3+ Т-клетках (фиг. 17B). Общее количество клеток на лунку определяли, используя микросферы Precision counting beads. Полученные результаты демонстрируют, что биспецифичный активатор Т-клеток к FAP приводит к значительному увеличению активации Т-клеток опухоль-ассоциированными Т-клеток у больных раком. В качестве продолжения эксперимента, описанного выше, собирали клетки из одинаковых лунок и определяли количество FAP+ клеток с помощью проточной цитометрии (фиг. 17C). Общее количество клеток на лунку определяли, используя микросферы Precision counting beads. Полученные результаты показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к FAP приводит к значительному снижению количества аутологичных FAP-экспрессирующих клеток в образце асцита.

Пример 11.

Рекомбинантные экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток вирусы EnAd были сконструированы, произведены и очищены с использованием способов, описанных ниже. Получение экспрессирующего биспецифичный активатор Т-клеток Enadenotucirev EnAd представляет собой компетентный по репликации химерный аденовирус группы B, который содержит частые негомологичные нуклеотидные замены Ad3 на Ad11p в области E2B, почти полную делецию E3 и меньшую делецию E4, локализованную с E4orf4 (Kuhn et al., Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer, PLoS One, 2008 Jun 18; 3(6): e2409). Схематическое представление генома аденовирусов, использованных в этом исследовании, показано на фиг. 18A.

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для создания плазмид pEnAd2.4-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-CMV-FAP Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-SA-FAP Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-CMV-ControlBi, pEnAd2.4-SA-Control Бисп.актив.Т-кл. (табл. 4) путем прямой вставки кассеты, кодирующей биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM (SEQ ID NO: 1), биспецифичный активатор Т-клеток к FAP (SEQ ID NO: 3) или контрольный биспецифичный активатор Т-клеток (SEQ ID NO: 5). Трансгенная кассета содержала короткую акцепторную сплайсинговую 5'-последовательность (SEQ ID NO: 33) или экзогенный промотор CMV (SEQ ID NO: 31), последовательность кДНК EpCAM, FAP или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток и 3'-последовательность полиаденилирования (SEQ ID NO: 32) Конструирование плазмиды подтверждали секвенированием ДНК. Экзогенный промотор CMV является конститутивно активным и, таким образом, приводит к ранней экспрессии трансгенов. Последовательность акцептора сплайсинга управляет экспрессией под контролем вирусного главного позднего промотора и приводит к более поздней экспрессии трансгена после инициации репликации вирусного генома. Кинетику этой промоторно-управляемой экспрессии можно наблюдать на фиг. 18B, где в качестве трансгена использовали GFP.

Таблица 4

ID плазмиды	[плазмидная ДНК] нг/мл
pEnAd2.4-CMV-EpCAMБисп.актив.Т-кл.	205,3
pEnAd2.4-SA-EpCAMБисп.актив.Т-кл.	325,2
pEnAd2.4-CMV-FAPБисп.актив.Т-кл.	1322,8
pEnAd2.4-SA-FAPБисп.актив.Т-кл.	3918,3
pEnAd2.4-CMV-ControlБисп.актив.Т-кл.	189,1
pEnAd2.4-SA-ControlБисп.актив.Т-кл.	236,2
pEnAd2.4-CMV-FAPБисп.актив.Т-кл.-RFP	1599
pEnAd2.4-SA-FAPБисп.актив.Т-кл.-RFP	1872
pEnAd2.4-CMV-ControlБисп.актив.Т-кл.-RFP	1294
pEnAd2.4-SA-ControlБисп.актив.Т-кл.-RFP	2082

Получение и характеристика вирусов.

Плазмиды EnAd2.4-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-CMV-FAP Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-SA-FAP Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-CMV-Control Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-SA-Control Бисп.актив.Т-кл. были линеаризованы рестрикционным расщеплением ферментом AscI для получения линейного генома вируса.

Расщепленную ДНК очищали экстракцией изопропанолом и осаждали в течение 16 ч, при -20°C в 300 мкл >95% этанола с чистотой для молекулярной биологии и 10 мкл 3 М ацетата натрия. Осажденную ДНК осаждали центрифугированием при 14000 об/мин 5 мин и промывали в 500 мкл 70% этанола перед повторным центрифугированием при 14000 об/мин, в течение 5 мин. Гранулы чистой ДНК высушивали на воздухе и ресуспендировали в 100 мкл воды. Затем 6,25 мкг ДНК смешивали с 15,6 мкл реагента для трансфекции, липофектамина в OptiMEM, и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем трансфекционную смесь добавляли в колбу Т-25, содержащую клетки Ad293, выращенные до конфлюэнтности 80%. После инкубации клеток с трансфекционной смесью в течение 4 ч при 37°C, 5% CO_2 к клеткам добавляли 4 мл клеточной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы и глютамином с добавлением 10% FBS) и колбы инкубировали при 37°C, 5% CO_2. Трансфицированные клетки Ad293 контролировали каждые 24 ч и дополняли дополнительными средами каждые 48-72 ч. Выработку вируса контролировали по наблюдению значительного цитопатического эффекта (CPE) в клеточном монослое. Как только наблюдался интенсивный CPE, вирус собирали из клеток Ad293 с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. Отдельные вирусные клоны отбирали путем серийного разбавления собранного лизата и повторного инфицирования клеток Ad293 и сбора из лунок, содержащих отдельные бляшки. Серийные инфицирования клеток Ad293 проводили после того, как инфицирование достигало полного CPE, чтобы амплифицировать вирусный материал. Выработку жизнеспособного вируса во время амплификации подтверждали наблюдением значительного CPE в клеточном монослое.

Очистка вирусов.

После амплификации активного вирусного материала, вирусы очищали центрифугированием с двойным градиентом плотности хлорида цезия (бэндинг) для получения вирусного материала NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605 и NG-606. Эти материалы титровали с помощью анализа micoBCA (Life Technologies), следуя инструкциям производителя (табл. 5).

Таблица 5

ID EnAd	NG ID №:	SEQ ID вирусного генома	вч/мл	TCID50/мл
EnAd-CMV-EpCAMБисп.актив.Т-кл.	NG-601	SEQ ID NO: 34	$2{,}2494x10^{12}$	$1{,}26x10^{11}$
EnAd-SA-EpCAMБисп.актив.Т-кл.	NG-602	SEQ ID NO: 35	$4{,}21746x10^{12}$	$1{,}58x10^{11}$

EnAd-CMV-ControlБисп.актив.Т-кл.	NG-603		1,42607x10^{12}	5,01x10^{10}
EnAd-SA-ControlБисп.актив.Т-кл.	NG-604		3,31073x10^{12}	2,00x10^{11}
EnAd-CMV-FAPБисп.актив.Т-кл.	NG-605	SEQ ID NO: 36	1,64653x10^{12}	1,58x10^{11}
EnAd-SA-FAPБисп.актив.Т-кл.	NG-606	SEQ ID NO: 37	1,28148x10^{12}	3,98x10^{10}
EnAd-CMV-ControlБисп.актив.Т-кл.-P2A-RFP	NG-607		5,963x10^{12}	1,26x10^{9}
EnAd-SA-ControlБисп.актив.Т-кл.-P2A-RFP	NG-608		1,51848x10^{12}	6,31x10^{9}
EnAd-CMV-FAPБисп.актив.Т-кл.-P2A-RFP	NG-609		1,57517x10^{12}	7,94x10^{9}
EnAd-SA-FAPБисп.актив.Т-кл.-P2A-RFP	NG-610		7,74881x10^{11}	5,01x10^{10}

Пример 12.

Активность вирусов NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605 и NG-606 была охарактеризована с использованием способов, описанных ниже.

Характеристика активности EnAd, кодирующих биспецифичный активатор Т-клеток, по сравнению с EnAd в клеточных линиях карциномы.

Способность NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 или EnAd к репликации анализировали путем инфицирования клеток карциномы легкого A549 и оценивали с помощью кПЦР. Клетки A549 высевали в лунки 24-луночного планшета при плотности клеток 2×10^5 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, при 37°C, 5% CO_2, затем клетки либо инфицировали 100 вирусными частицами на клетку (ppc), либо оставляли неинфицированными. Содержимое лунок собирали через 24, 48 или 72 ч после инфицирования и очищали ДНК с использованием мини-набора определения геномной ДНК PureLink (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Общее содержание вирусных геномов количественно определяли с помощью кПЦР для каждого экстрагированного образца или стандарта с использованием набора праймеров-специфичных для гена EnAd гена в реакционной смеси, подробно описанной в табл. 6. кПЦР выполняли согласно программе в табл. 7.

Таблица 6

Реагент	**Объем/лунку (мкл)**
2 × qPCRBIO, смесь зондов (PCRBiosystems)	10
EnAd, прямой праймер	0,08
EnAd, обратный праймер	0,08
EnAd, зонд	0,8
NFW	4,04
Образец	5
Объем лунки	20

Таблица 7

Число циклов	**Температура (^{o}C)**	**Продолжительность (сек)**
1	95	120
40	95 60-65	5 20-30

Количественное определение обнаруженных вирусных геномов на клетку продемонстрировало, что репликация вирусов NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd была сопоставимой в клеточной линии A549 (фиг. 19A).

Онколитическую активность NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 или EnAd оценивали по инфицированию A549 (фиг. 19B). Клетки A549 высевали в 96-луночный планшет при плотности клеток $1,5\times10^4$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, затем инфицировали клетки нарастающим числом ppc вируса (5-кратное серийное разведение, от $4,1\times10^{-7}$ до 5000 ppc ви-

руса) или оставляли неинфицированными. Цитотоксичность A549 измеряли в день 5 с помощью анализа клеточной пролиферации CellTiter 96® AQueous One Solution (MTS) (Promega, № G3582). Кривые дозозависимости аппроксимировали с использованием четырехпараметрической модели нелинейной аппроксимации, интегрированной в GraphPad Prism. Значения IC50, полученные для каждого вируса, продемонстрировали, что онколитическая активность NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd была сопоставимой для каждого вируса. Подтверждение экспрессии функционального трансгена биспецифичного активатора Т-клеток из NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606.

Чтобы определить, продуцируют ли вирусы NG-601, NG-602, NG-605, NG-606 функциональные биспецифичные активаторы Т-клеток, были проведены анализы активации Т-клеток с использованием клеточных линий CHO, CHO-EpCAM и CHO-FAP в качестве клеток-мишеней. 10000 клеток-мишеней совместно культивировали с 50000 CD3+ Т-клеток в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном и вирусными супернатантами Ad293, разведенными в 100 раз в культуральной среде, и инкубировали в течение 24 ч, при 37°C, 5% CO_2. Т-клетки собирали и окрашивали антителами, специфичными к CD25 и CD69, и анализировали проточной цитометрией. Результаты (фиг. 20A и 20B) показали, что вирусы NG-601 и NG-602 экспрессировали функциональный трансген биспецифичного активатора Т-клеток, который активировал Т-клетки при совместной культивировании с клетками CHO-EpCAM, а NG-605 и NG-606 экспрессировали функциональный трансген биспецифичного активатора Т-клеток, который активировал Т-клетки при совместном культивировании с клетками CHO-ФАП, но не при совместном культивировании с клетками CHO.

Количественное определение экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток в клеточной линии карциномы толстой кишки.

Оценивали количество экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток инфицированием вирусами NG-601, NG-602, NG-605, NG-606 линии клеток карциномы толстой кишки человека. Клетки DLD высевали в 6-луночные культуральные планшеты с плотностью $1,2\times 10^6$ клеток на лунку. Через 18 ч после посева клетки DLD инфицировали EnAd, NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 с плотностью 100 ppc. Клетки культивировали в течение 72 ч, затем супернатанты собирали из лунок и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин для удаления клеточного дебриса. Осветленные супернатанты затем использовали для киллинг-анализа, и сравнивали цитотоксичность со стандартной кривой, полученной с рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток известной концентрации, позволяющей определить количество биспецифичного активатора Т-клеток в вирусных супернатантах.

Для определения количества биспецифичного активатора Т-клеток к FAP, производимого из NG-605 и NG-606, был проведен анализ цитотоксичности, в котором 8000 NHDF совместно культивировали с 40000 CD3+ Т-клеток и вирусными супернатантами DLD, разведенными 1 в 10^3, 1 в 10^4 и 1 в 10^5. Стандартную кривую получали путем инкубации Т-клеток NHDF и CD3+ с FAP или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток при 10-кратных серийных разведениях от 3333 до $3,33\times10^{-4}$ нг/мкл. Супернатанты собирали через 24 ч после обработки, и измеряли цитотоксичность с помощью ЛДГ-анализа. Количество экспрессированного биспецифичного активатора Т-клеток определяли путем сравнения цитотоксичности вирусных супернатантов с таковой на стандартной кривой рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток. Полученные результаты (фиг. 21) показали, что вирусы NG-605 и NG-606 производят 9,8 и 49,2 мкг биспецифичного активатора Т-клеток к FAP на миллион клеток DLD соответственно.

Чтобы определить количество биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, производимого из NG-601 и NG-602, был проведен анализ цитотоксичности, в котором 8000 клеток DLD совместно культивировали с 40000 CD3+ Т-клеток и вирусными супернатантами DLD, разведенными 1 в 10^3, 1 в 10^4 и 1 в 10^5. Стандартную кривую получали путем инкубации Т-клеток DLD и CD3+ с EpCAM или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток при 10-кратных серийных разведениях от 3333 до $3,33\times10^{-4}$ нг/мкл. Супернатанты собирали через 24 ч после обработки, и измеряли цитотоксичность с помощью ЛДГ-анализа (фиг. 22). Количество экспрессированного биспецифичного активатора Т-клеток определяли путем сравнения цитотоксичности вирусных супернатантов с таковой на стандартной кривой рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток. Результаты показали, что вирусы NG-601 и NG-602 производят 165 и 50,3 мкг EpCAM биспецифичного активатора Т-клеток на миллион клеток DLD соответственно.

Пример 13.

В дополнение к кодированию FAP или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток вирусы NG-607, NG-608, NG-609, NG-610 также несут трансген красного флуоресцентного белка (RFP) для визуализации инфицированных клеток с использованием методов флуоресцентной микроскопии (SEQ ID NO: 25 и 26, табл. 4). Функциональные активности этих вирусов были охарактеризованы с использованием способов, описанных ниже.

Подтверждение экспрессии трансгена из NG-607, NG-608, NG-609, NG-610 Способность вирусов NG-607, NG-608, NG-609 и NG-610 вырабатывать их трансген биспецифичного активатора Т-клеток оценивали путем инфицирования клеток Ad293. Клетки Ad293 высевали в 6-луночный планшет с плотно-

стью 1×10^6 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 24 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки инфицировали вирусами с плотностью 100 ppc или оставляли неинфицированными. Через 48 ч после инфицирования бляшки облучали флуоресцентной ртутной лампой и фотографировали (фиг. 23). Результаты показали, что вирусы NG-607, NG-608, NG-609 и NG-610 экспрессируют трансген RFP.

Пример 14.

В следующей серии экспериментов оценивали способность EnAd и экспрессирующих биспецифичный активатор Т-клеток к FAP или контрольный биспецифичный активатор Т-клеток вирусов NG-603, NG-604, NG-605, NG-606, NG-607, NG-608, NG-609, NG-610 убивать клетки-мишени, включая опухолевые клетки и фибробласты.

В первом исследовании оценивали способность EnAd убивать клетки DLD с использованием технологии xCELLigence. Клетки DLD высевали в 48-луночный E-планшет с плотностью $1,2\times10^4$ клеток/лунку и инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки инфицировали вирусами EnAd с плотностью 100 ppc или оставляли неинфицированными. Для измерения цитотоксичности для клеток-мишеней использовали XCELLigence каждые 15 мин в течение 8-дневного периода инкубации. Результаты (фиг. 24A) показывают, что EnAd мог эффективно убивать клетки DLD в течение этого периода времени. В аналогичном эксперименте оценивали способность EnAd убивать клетки SKOV с использованием технологии xCELLigence. Клетки SKOV высевали в 48-луночный E-планшет с плотностью 1×10^4 клеток/лунку и инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки инфицировали вирусами EnAd с плотностью 100 ppc или оставляли неинфицированными. Для измерения цитотоксичности для клеток-мишеней использовали XCELLigence каждые 15 мин в течение 8-дневного периода инкубации. Результаты (фиг. 24B) показывают, что клетки SKOV устойчивы к EnAd-опосредованной цитотоксичности в течение этого периода времени.

В аналогичном эксперименте способность EnAd убивать клетки NHDF также оценивалась с использованием технологии xCELLigence. Клетки NHDF высевали в 48-луночный E-планшет с плотностью 4×10^3 клеток/лунку и инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки либо инфицировали EnAd 100 ppc, либо оставляли неинфицированными. Для измерения цитотоксичности в отношении клеток-мишеней использовали XCELLigence каждые 15 мин в течение того же периода времени, что и для клеток A549 и SKOV. Результаты (фиг. 24C) показывают, что EnAd не способен убивать клетки NHDF в течение времени наблюдения.

В аналогичном эксперименте оценивали способность NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd убивать клетки NHDF в совместной культуре с опухолевыми клетками SKOV и $CD3^+$ Т-клетками с использованием xCELLigence. Клетки NHDF и клетки SKOV высевали в 48-луночный E-планшет с плотностью 4×10^3 и 1×10^3 клеток/лунку соответственно. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки либо инфицировали 100 ppc EnAd, NG-603, NG-604, NG-605 или NG-606, либо оставляли неинфицированными. После 2-часовой инкубации в каждую лунку добавляли 37 500 CD3+ Т-клеток. Для измерения цитотоксичности в отношении клеток-мишеней использовали xCELLigence каждые 15 мин. Результаты (фиг. 25A) демонстрируют, что экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к FAP вирусы NG-605 и NG606, но не EnAd или контрольные экспрессирующие биспецифичные активаторы Т-клеток вирусы NG-603 и NG-604, были способны индуцировать лизис клеток NHDF, причем кинетика зависела от промотора, используемого для экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток (быстрее с промотором CMV).

В аналогичном эксперименте оценивали способность NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd убивать клетки NHDF в совместной культуре с SKOV и CD3+ Т-клетками с использованием ЛДГ-анализа цитотоксичности. Клетки NHDF и клетки SKOV высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном с плотностью 8×10^3 и 2×10^3 клеток/лунку, соответственно, и либо инфицировали 100 ppc EnAd, NG-603, NG-604, NG-605 или NG-606, либо оставляли неинфицированными. После 2-часовой инкубации в каждую лунку добавляли 75000 CD3+ Т-клеток и планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO_2. Супернатанты собирали через 0, 24, 48 и 96 ч после обработки, и измеряли цитотоксичность ЛДГ-анализом цитотоксичности. Результаты (фиг. 25B) демонстрируют, что экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к FAP вирусы NG-605 и NG606, но не EnAd или контрольные экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток вирусы NG-603 и NG-604, были способны индуцировать лизис клеток NHDF, причем кинетика зависела от промотора, используемого для экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток. В качестве продолжения вышеописанного эксперимента с ЛДГ-анализом клетки также собирали через 0, 24, 48 и 96 ч после обработки, окрашивали антителами к CD45, CD69 и CD25 и анализировали проточной цитометрией. Результаты (фиг. 26) демонстрируют, что экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к FAP вирусы NG-605 и NG-606, но не EnAd или контрольные экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток вирусы NG-603 и NG-604, были способны индуцировать активацию Т-клеток с кинетикой, зависящей от промотора, используемого для экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток.

В аналогичном эксперименте оценивали зависимость от FAP для способности индуцировать опосредованную биспецифичным активатором Т-клеток к FAP активацию Т-клеток. В 96-луночном планше-

те с U-образным дном клетки SKOV высевали в количестве 2×10^3 клеток/лунку отдельно или в комбинации с клетками NHDF в количестве 8×10^3 клеток/лунку. Вирусные частицы добавляли в каждую лунку в количестве 100 ppc, и планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO_2. Через 2 ч добавляли 75000 CD3+ Т-клеток, и инкубировали планшеты дополнительно. Через 96 ч после инфицирования клетки собирали и окрашивали на наличие CD45 и CD25 и анализировали проточной цитометрией (фиг. 27A). Результаты демонстрируют, что экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к FAP вирусы NG-605 и NG-606 индуцировали активацию Т-клеток только в присутствии FAP-положительных клеток NHDF.

В аналогичном эксперименте была исследована специфичность управляемой промотором (CMV или вирусом MLP/SA) экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток в NG-605 и NG-606. В 96-луночном планшете с U-образным дном высевали клетки NHDF в количестве 4×10^3 клеток/лунку. В каждую лунку добавляли 100 вирусных частиц на клетку, и планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO_2. Через 2 ч добавляли 40000 клеток CD3, и планшеты инкубировали дополнительно. Через 72 ч после инфицирования собирали супернатанты и измеряли цитотоксичность с помощью ЛДГ-анализа цитотоксичности. Результаты (фиг. 27B) демонстрируют, что вирус NG-605, управляемый CMV, но не NG-606, управляемый SA, был способен опосредовать уничтожение клеток NHDF при инфицировании только клеток NHDF.

Эти результаты показывают, что как NG-605, так и NG-606 способны вызывать активацию Т-клеток и лизис клеток-мишеней, хотя кинетический профиль немного отличается в зависимости от используемого промотора.

Были получены видео в режиме таймлапс для наблюдения лизиса клеток-мишеней, опосредованного вирусами или Т-клетками, рекомбинантными биспецифичным активатором Т-клеток к FAP, EnAd, NG-603 или NG-605. Клетки NHDF окрашивали красителем CellTracker Orange CMTMR (Life Tech, № C2927), а Т-клетки $CD3^+$ окрашивали набором для определения пролиферации клеток CellTrace Violet Cell Proliferation (Life Tech, № C34557) в соответствии с протоколами производителя. Окрашенные NHDF высевали в 24-луночный планшет в количестве $7,5\times10^3$ клеток/лунку в совместной культуре с опухолевыми клетками DLD или SKOV $1,35\times10^4$. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2. Затем клетки обрабатывали 300 нг/мл биспецифичного активатора Т-клеток к FAP или инфицировали 100 ppc EnAd, NG-603 и NG-605 или оставляли необработанными. После двухчасовой инкубации в необходимые лунки добавляли 100000 окрашенных CD3+ Т-клеток в дополнение к 1,5 мкМ реагента CellEventCaspase 3-7 (Life Tech, № C10423). Видео было получено на инвертированном микроскопе Nikon TE 2000-E Eclipse, при этом изображения получали каждые 15 мин в течение 96 ч. Кадры из видео показаны на фиг. 28. Результаты показывают, что рекомбинантные биспецифичный активатор Т-клеток к FAP и NG-605, но не EnAd или NG-603, способны индуцировать быстрый лизис клеток NHDF.

В аналогичном эксперименте клетки NHDF окрашивали красителем CellTracker Green CMFDA (Life Tech, № C2925), а Т-клетки $CD3^+$ окрашивали набором для определения пролиферации клеток CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (Life Tech, № C34557) в соответствии с протоколами производителя. Окрашенные NHDF высевали в 24-луночный планшет в количестве $7,5\times10^3$ клеток/лунку в совместной культуре с опухолевыми клетками DLD или SKOV $1,35\times10^4$. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2. Затем клетки инфицировали 100 ppc NG-607, NG-608, NG-609 или NG-610 или оставляли неинфицированными. После двухчасовой инкубации в необходимые лунки добавляли 100000 окрашенных CD3+ Т-клеток. Видео было получено на инвертированном микроскопе Nikon TE 2000-E Eclipse, при этом изображения получали каждые 15 мин в течение 96 ч. Кадры из видео показаны на фиг. 29. Результаты показывают, что все вирусы приводят к инфицированию опухолевых клеток (RFP, красная флуоресценция, положительные), но только NG-609 и NG-610 были способны индуцировать быстрый лизис совместно культивированных клеток NHDF.

Пример 15.

В этой серии экспериментов оценивали способность EnAd и несущих биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM или контрольный биспецифичный активатор Т-клеток вирусов NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 убивать клетки-мишени, включая опухолевые клетки и фибробласты.

Характеристика активации человеческих Т-клеток и лизиса EPCAM-положительных клеток-мишеней с помощью EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604.

Способность EnAd и NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 убивать опухолевые клетки DLD в присутствии или в отсутствие CD3+ Т-клеток оценивали с использованием технологии xCELLigence. Клетки DLD высевали в 48-луночный E-планшет в количестве $1,2\times10^4$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки либо инфицировали EnAd в количестве 100 ppc, либо оставляли неинфицированными. Через 2 ч после инфицирования в необходимые лунки добавляли 75 000 CD3+ Т-клеток. Для измерения цитотоксичности в отношении клеток-мишеней использовали XCELLigence каждые 15 мин. Результаты (фиг. 30) демонстрируют, что NG-601 и NG-602 приводят к значительно более быстрой цитотоксичности в отношении DLD зависимым от Т-клеток образом.

В аналогичном эксперименте оценивали способность EnAd и NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 убивать опухолевые клетки DLD в присутствии или в отсутствие CD3+ Т-клеток с использованием ЛДГ-

анализа цитотоксичности. Клетки DLD высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном в количестве 2×10^4 клеток/лунку и либо инфицировали EnAd в количестве 100 ppc, либо оставляли неинфицированными. Через 2 ч после инфицирования в необходимые лунки добавляли 150 000 CD3+ Т-клеток. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO_2, собирали супернатант и анализировали с использованием ЛДГ-анализа цитотоксичности через 0, 24, 48 и 72 ч после инфицирования. Результаты (фиг. 31) демонстрируют, что NG-601 и NG-602 приводят к более быстрой цитотоксичности в отношении DLD зависимым от Т-клеток образом.

В качестве продолжения вышеописанного эксперимента с ЛДГ-анализом клетки также собирали через 0, 24, 48 и 96 ч после обработки, окрашивали антителами к CD45, CD69 и CD25 и анализировали проточной цитометрией для определения статуса активации CD3+ Т-клеток. Результаты (фиг. 32) демонстрируют, что экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM вирусы NG-601 и NG-602, но не EnAd или контрольные экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток вирусы NG-603 и NG-604, были способны индуцировать активацию Т-клеток с кинетикой, зависящей от промотора, используемого для экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток.

В другом эксперименте оценивали способность NG-601 убивать опухолевые клетки DLD при различной множественности инфицирования (MOI) в присутствии или отсутствии CD3+ Т-клеток с использованием технологии xCELLigence. Клетки DLD высевали в 48-луночный E-планшет в количестве 2×10^4 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки либо инфицировали NG-601 при MOI (ppc) в диапазоне от 0,001 до 10, либо оставляли неинфицированными. Через 2 ч после инфицирования в необходимые лунки добавляли 150 000 CD3+ Т-клеток. Для измерения цитотоксичности клеток-мишеней использовали xCELLigence каждые 15 мин. Результаты (фиг. 33) демонстрируют, что NG-601 приводит к более быстрой цитотоксичности DLD зависимым от Т-клеток образом при MOI всего 0,001.

В аналогичном эксперименте оценивали способность EnAd и NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 убивать опухолевые клетки SKOV в присутствии или в отсутствие CD3+ Т-клеток с использованием технологии xCELLigence. Клетки SKOV высевали в 48-луночный E-планшет в количестве 1×10^4 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки инфицировали EnAd (100 ppc), либо оставляли неинфицированными. Через 2 ч после инфицирования в необходимые лунки добавляли 50000 CD3+ Т-клеток. Для измерения цитотоксичности клеток-мишеней использовали xCELLigence каждые 15 мин. Результаты (фиг. 34) свидетельствуют о том, что клетки SKOV устойчивы к EnAd-опосредованной цитотоксичности в течение периода этого исследования, однако NG-601 и NG-602 были способны индуцировать быстрый лизис клеток SKOV в присутствии $CD3^+$ Т-клеток.

В аналогичном эксперименте оценивали способность EnAd и NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 убивать клетки SKOV в присутствии или в отсутствие CD3+ Т-клеток с использованием ЛДГ-анализа цитотоксичности. Клетки SKOV высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном в количестве 2×10^4 клеток/лунку и либо инфицировали EnAd (100 ppc), либо оставляли неинфицированными. Через 2 ч после инфицирования в необходимые лунки добавляли 150 000 CD3+ Т-клеток. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO_2, собирали супернатант и анализировали с использованием ЛДГ-анализа цитотоксичности через 0, 24, 48 и 72 ч после инфицирования. Результаты (фиг. 35) согласуются с предыдущими данными и позволяют предположить, что клетки SKOV устойчивы к EnAd-опосредованной цитотоксичности в течение этого периода времени, однако NG-601 и NG-602 способны индуцировать быстрый лизис клеток SKOV в присутствии CD3+ Т-клеток. В качестве продолжения вышеописанного эксперимента с ЛДГ-анализом клетки также собирали через 0, 24, 48 и 96 ч после обработки, окрашивали антителами к CD45, CD69 и CD25 и анализировали проточной цитометрией для определения статуса активации CD3+ Т-клеток (фиг. 36). Результаты показывают, что экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM вирусы NG-601 и NG-602, но не EnAd или контрольные экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток вирусы NG-603 и NG-604, были способны индуцировать активацию Т-клеток с кинетикой, зависящей от промотора, используемого для экспрессии биспецифичного активатор Т-клеток.

В аналогичном эксперименте оценивали способность EnAd и NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 активировать CD3+ Т-клетки, полученные от онкологических больных, из образца CD3+ EpCAM-негативного первичного асцита. EpCAM-положительные клетки DLD высевали в количестве 1×10^4 клеток на лунку в 96-луночный U-образный планшет и совместно культивировали с 100000 асцитных клеток (без изменений после получения). Клетки инфицирования вирусными частицами в количестве 100 ppc, либо оставляли неинфицированными. После инкубации при 37°C в течение 48 ч собирали общую популяцию клеток и определяли уровень экспрессии CD25 на CD3+ Т-клетках методом проточной цитометрии. Результаты (фиг. 37) демонстрируют, что экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM вирусы NG-601 и NG-602, но не EnAd или контрольные экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток вирусы NG-603 и NG-604, способны индуцировать активацию Т-клеток у полученных от пациентов $CD3^+$ Т-клеток.

Результаты показывают, что оба вируса с биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM, NG-601 и NG-602, были способны индуцировать активацию Т-клеток и лизис клеток-мишеней, хотя кинетиче-

ский профиль немного отличался в зависимости от используемого промотора.

Были получены видео в режиме таймлапс для наблюдения лизиса клеток-мишеней, опосредованного вирусами или Т-клетками, рекомбинантными биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM, EnAd, NG-603 или NG-605. Клетки NHDF окрашивали красителем CellTracker Orange CMTMR (Life Tech, № C2927), а Т-клетки CD3+ окрашивали набором набор для определения пролиферации клеток CellTrace Violet Cell Proliferation (Life Tech, № C34557) в соответствии с протоколами производителя. Окрашенные NHDF высевали в 24-луночный планшет в количестве $7{,}5\times10^3$ клеток/лунку в совместной культуре с опухолевыми клетками DLD или SKOV в количестве $1{,}35\times10^4$. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2. Затем клетки обрабатывали 300 нг/мл биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM или инфицировали 100 ppc EnAd, NG-603 и NG-605 или оставляли необработанными. После двухчасовой инкубации в необходимые лунки добавляли 100000 окрашенных CD3+ Т-клеток в дополнение к 1,5 мкМ реагента CellEvent Caspase 3-7 (Life Tech, № C10423). Видеоролики были получены на инвертированном микроскопе Nikon TE 2000-E Eclipse, при этом изображения получали каждые 15 мин в течение 96 ч. Кадры из видео показаны на фиг. 28. Результаты показывают, что рекомбинантные биспецифичный активатор Т-клеток EpCAM и NG-605 приводят к быстрому лизису клеток-мишеней как DLD, так и SKOV, но NHDF оставались незатронутыми.

Пример 16.

В этом примере оценивали активацию аутологичных опухоль-ассоциированных лимфоцитов из FAP+ первичного злокачественного асцита от больных раком вирусами EnAd, NG-603, NG-604, NG-605 и NG-606. Образцами пациентов, которые считались пригодными для дальнейшего анализа, были содержавшие CD3+ Т-клетки и FAP+ клетки. В первом эксперименте неочищенные (то есть не измененные с момента получения) асцитные клетки от пациента высевали в количестве 250 000 клеток на лунку 96-луночного планшета с U-образным дном в 100% асцитной жидкости. Клетки инфицировали вирусами в количестве 100 ppc, а необработанные лунки служили отрицательным контролем. EnAd-CMV-GFP и EnAd-SA-GFP также были включены в эксперимент в качестве репортера для определения инфицирования и поздней стадии экспрессии вирусного гена, соответственно, и полученные микрофотографии показаны на фиг. 39. После инкубации при 37°C в течение 5 дней общую популяцию клеток собирали и определяли уровень экспрессии CD25 на CD3+ Т-клетках (фиг. 40A). Общее количество клеток на лунку определяли используя микросферы Precision counting beads. Результаты показывают, что вирусы с биспецифичным активатором Т-клеток к FAP NG-605 и NG-606 приводят к значительному увеличению активации Т-клеток опухоль-ассоциированными лимфоцитами. В качестве продолжения эксперимента, описанного выше, собирали клетки из лунок-дубликатов и определяли количество эндогенных FAP+ клеток методом проточной цитометрии. Общее количество клеток на лунку определяли, используя микросферы Precision counting beads. Результаты (фиг. 40B) показывают, что NG-605 и NG-606 приводили к значительному уменьшению количества аутологичных FAP-экспрессирующих клеток в образцах асцита, что позволяет предположить, что некоторые FAP+ клетки были убиты активированными Т-клетками.

Во втором эксперименте неочищенные (то есть не измененные после получения) асцитные клетки от больного раком высевали в количестве 250000 клеток на лунку 96-луночного планшета с U-образным дном либо в 100% асцитную жидкость, либо в среду с добавлением 1% человеческой сыворотки. Клетки инфицировали вирусами в количестве 100 ppc, а необработанные лунки служили отрицательным контролем. EnAd-CMV-GFP и EnAd-SA-GFP также были включены в качестве репортера для определения инфицирования и экспрессии вирусных генов на поздней стадии, соответственно, и полученные микрофотографии показаны на фиг. 41. После инкубации при 37°C в течение 5 дней собирали общую популяцию клеток и определяли количество CD3+ Т-клеток (фиг. 42) и уровень экспрессии CD25 на CD3+ Т-клетках (фиг. 43). Общее количество клеток на лунку определяли, используя микросферы Precision counting beads. Результаты показывают, что для этого пациента рекомбинантные биспецифичный активатор Т-клеток к FAP и NG-605, но не NG-606, приводили к значительному увеличению активации Т-клеток опухоль-ассоциированными лимфоцитами в средах. Ни один из вирусов не привел к активации в асцитной жидкости.

В качестве продолжения эксперимента, описанного выше, собирали клетки из лунок-дубликатов и определяли количество FAP+ клеток методом проточной цитометрии (фиг. 44). Общее количество клеток на лунку определяли, используя микросферы Precision counting beads. Результаты показывают, что рекомбинантные биспецифичный активатор Т-клеток к FAP и NG-605, но не NG-606, приводят к значительному снижению числа аутологичных FAP-экспрессирующих клеток в средах. Ни один из вирусов не привел к снижению количества FAP+ клеток в асцитной жидкости.

Пример 17. Материалы и методы.

Клеточные линии.

Клетки HEK293A, DLD, SKOV3, MCF7, A431, A549 и PC3 (ATCC) культивировали в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM, Sigma-Aldrich, Великобритания), а клетки CHO (ATCC) в среде Мемориального института Розуэлл-Парка (RPMI-1640, Sigma, Олдрич, Великобритания). В питательную среду добавляли 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, Великобритания) и

1% (об./об.) пенициллинп/стрептомицинп (10 мг/мл, Sigma-Aldrich), и клетки содержали в увлажненной атмосфере при 37°C и 5% CO_2. Для вирусного инфицирования и трансфекции вирусных плазмид клетки содержали в DMEM с добавлением 2% FBS. Для трансфекции рекомбинантных плазмид биспецифичного активатора Т-клеток клетки содержали в DMEM без FBS. Экспрессию EpCAM в линиях клеток-мишеней определяли проточной цитометрией. Получение стабильных EpCAM-экспрессирующих клеточных линий Белковая последовательность гена EpCAM была получена из базы данных NCBI (SEQ ID 28), и подвергнута обратной транскрипции для генерации кодирующей последовательности ДНК, которая была синтезирована Oxford Genetics Ltd (Оксфорд, Великобритания). Ген EpCAM клонировали в вектор pSF-Lenti стандартными методами клонирования, получая вектор pSF-Lenti-EpCAM. Клетки HEK293T трансфицировали с использованием Липофектамина 2000 лентивирусным вектором экспрессии EpCAM наряду с pSF-CMV-HIV-Gag-Pol, pSF-CMV-VSV-G, pSF-CMV-HIV-Rev (Oxford Genetics Ltd). Супернатанты, содержащие лентивирус, собирали через 48 ч и смешивали с полибреном (8 мкг/мл). Смесь лентивирус/полибрен добавляли к клеткам CHO и инкубировали при 37°C. На четвертый день супернатант заменяли средой, содержащей 7,5 мкг/мл пуромицина. Затем клонально отбирали стабильные варианты и определяли экспрессию EpCAM родительских клеточных линий или стабильно трансфицированного варианта окрашиванием EpCAM или изотопическим контрольным антителом и анализировали проточной цитометрией. Положительные клоны размножали и использовали в дальнейших экспериментах. Получение мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) и выделение Т-клеток МКПК выделяли центрифугированием в градиенте плотности (Boyum, 1968) из концентратов лейкоцитов цельной крови, полученных из NHS Blood and Transplant UK (Оксфорд, Великобритания). Кровь разбавляли 1:2 PBS и наслаивали на фиколл (1079 г/мл, Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare) перед центрифугированием при 400 g в течение 30 мин при 22°C с длительным замедлением. После центрифугирования МКПК собирали и дважды промывали PBS (300 г в течение 10 мин при комнатной температуре) и ресуспендировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS. CD3-положительные Т-клетки экстрагировали из МКПК путем деплеции не-CD3-клеток с использованием набора для выделения Т-клеток Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, № 130-096-55) в соответствии с протоколом производителя. Для дальнейшей изоляции CD4- и CD8-положительных Т-клеток CD3-Т-клетки прошли еще один цикл очистки с использованием микросфер CD4+ (Miltenyi Biotec, №130-045-101).

Обработка первичного асцита и плеврального выпота.

Образцы первичного асцита злокачественного новообразования и плеврального выпота человека были получены из больницы Черчилля, больницы Оксфордского университета (Оксфорд, Великобритания) после информированного согласия пациентов с множественными признаками прогрессирующей карциномы, в том числе яичников, поджелудочной железы, молочной железы и легких. Эта работа была одобрена комитетом по этике исследований Оксфордского центра исследований по гистопатологии. После получения клеточные и жидкие фракции были разделены, и жидкость использовали немедленно, или аликвоты хранили при -20°C для последующего анализа. Клеточную фракцию обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов (Roche, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Количество и жизнеспособность клеток определяли окраской трипановым синим. Типы клеток, присутствующие в каждом образце, определяли окрашиванием антителами на EpCAM, EGFR, FAP, CD45, CD11b, CD56, CD3, CD4, CD8, PD1 и CTLA4 и анализировали проточной цитометрией. Для экспериментов по активации Т-клеток ex vivo и лизиса клеток-мишеней использовали свежие клетки и жидкость. В некоторых случаях адгезивные клетки пассировали в DMEM с добавлением 10% FBS и размножали для последующего использования.

Конструирование и получение биспецифичного активатора Т-клеток.

Биспецифичные активаторы Т-клеток были получены путем объединения двух scFv различной специфичности гибким GS-линкером. Каждый scFv создавали путем объединения доменов VH и VL из родительских моноклональных антител с помощью линкера. Каждый биспецифичный активатор Т-клеток обладал N-концевой сигнальной последовательностью легкой цепи иммуноглобулина (Ig) для секреции клетками млекопитающих и С-терминальной декагистидиновой аффинной меткой для детектирования и очистки. Биспецифичные активаторы Т-клеток были сконструированы стандартными методами клонирования ДНК и вставлены в вектор экспрессии белка (pSFCMV-Amp) для экспрессии и секреции конститутивного белка, управляемой промотором цитомегаловируса (CMV). Плазмидную ДНК pSF-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. или pSF-CMV-Control Бисп.актив.Т-кл. трансфицировали в клетки HEK293A с использованием полиэтиленимина (PEI, линейный, MW 25000, Polysciences, США) при следующих условиях, к клеткам добавляли 55 мкг плазмидной ДНК:110 мкг PEI (соотношение ДНК:PE11:2 (мас./мас.), инкубировали при 37°C в течение 4 ч, затем заменяли свежей бессывороточной средой DMEM и дополнительно инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 48 ч. Клетки трансфицировали параллельно pSF-CMV-GFP для гарантии эффективности трансфекции. Для сбора секретируемого белка супернатант трансфицированных клеток собирали и центрифугировали при 350 g, 4°C в течение 5 мин для удаления клеточных компонентов. Супернатанты были перенесены в Центробежный фильтр 10000 MWCO Amicon Ultra-15 (Millipore). После центрифугирования при 4750 g и 4°C объем ретентата регулировали проточной фильтрацией, чтобы получить в 50 раз более высокую концентрацию. Аликвоты концентрированно-

го белка хранили при -80°C. Получение экспрессирующих биспецифичный активатор Т-клеток EnAdenotucirev Плазмиды pEnAd2.4-CMV-EpCAM Бисп.акт.Т-кл., pEnAd2.4-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-CMV-Control Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-SA-Control Бисп.актив.Т-кл. были получены путем прямой инсерции трансгенной кассеты, кодирующей биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM или контрольный биспецифичный активатор Т-клеток в базовую плазмиду EnAd pEnAd2.4 с использованием технологии сборки Gibson. Трансгенная кассета содержала короткую акцепторную сплайсинговую 5'-последовательность или экзогенный промотор CMV, за которым "справа" следовала последовательность кДНК биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток и 3'-последовательность полиаденилирования. Схема вставленной трансгенной кассеты показана на фиг. 18. Правильное конструирование плазмиды было подтверждено секвенированием ДНК. Плазмиды EnAd2.4-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., pEnAd2.4-CMV-Control Бисп.актив.Т-кл. и pEnAd2.4-SA-Control Бисп.актив.Т-кл. были линеаризованы рестрикционным расщеплением ферментом AscI перед трансфекцией в клетках HEK293. Выработку вируса контролировали по наблюдению значительного цитопатического эффекта (CPE) в клеточном монослое. Как только наблюдался интенсивный CPE, вирус собирали из клеток HEK293A с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. Отдельные вирусные клоны отбирали путем серийного разбавления собранного лизата и повторного инфицирования клеток HEK293A и сбора из лунок, содержащих отдельные бляшки. Серийные инфицирования клеток HEK293A проводили после того, как инфицирование достигало полного CPE, чтобы амплифицировать вирусный материал. После амплификации активного вирусного материала, вирусы очищали центрифугированием с двойным градиентом плотности хлорида цезия (бэндинг) для получения вирусного материала EnAd-CMVEpCAM Бисп.актив.Т-кл., EnAd-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., EnAdCMV-Control Бисп.актив.Т-кл., EnAd-SA-Control Бисп.актив.Т-кл. Эти материалы титровали по TCID50 и с помощью анализа PicoGreen (Life Technologies), следуя инструкциям производителя.

Приготовление супернатантов.

Чтобы оценить опосредованное биспецифичным активатором Т-клеток высвобождение цитокинов, клетки DLD (20 000) высевали с 100 000 CD3+ Т-клеток в 96-луночный планшет с плоским дном отдельно или с 2 нг/мкл EpCAM или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток. После 48 ч инкубации при 37°C и 5% CO_2 супернатанты собирали, компоненты клеток удаляли центрифугированием, и аликвоты хранили при -20°C. Для оценки экспрессии трансгена биспецифичного активатора Т-клеток из рекомбинантных вирусов клетки HEK293A (1×10^6) или DLD ($1{,}2\times10^6$) инфицировали EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., EnAd-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., EnAd-CMVControl Бисп.актив.Т-кл., EnAd-SA-Control Бисп.актив.Т-кл. или EnAd в количестве 100 вч/клетку. Клетки культивировали в течение 72 ч, после чего цитопатический эффект (CPE) усиливался. Супернатанты собирали и центрифугировали в течение 5 мин, 300 г для удаления клеточного дебриса и хранили при -20°C для последующего анализа.

Иммуноблоттинг.

Для измерения концентрации рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток, полученного в результате трансфекций плазмиды использовали дот-блоттинг. Готовили двукратные серийные разведения каждого биспецифичного активатора Т-клеток и стандарта белка (10×His-меченого (С-конец) катепсина D человека, Biolegend, № 556704). Молярная концентрация стандарта белка была отрегулирована так, чтобы обеспечивать концентрацию биспецифичного активатора Т-клеток 100 мкг/мл. Два мкл каждого образца и стандарта белка наносили непосредственно на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану высушивали на воздухе, блокировали и зондировали антителом α-6xHis (С-конец) (1: 5000, клон 3D5, Invitrogen, Великобритания, № 46-0693) для обнаружения белков, с меткой His на С-конце, с последующим промыванием и инкубацией с вторичным анти-мышиным антителом (1:10000, Dako, № P0161) и детектированием с помощью субстрата SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher, № 34075) в соответствии с инструкциями производителя. Супернатанты инфицированных вирусом клеток HEK293A анализировали вестерн-блоттингом на экспрессию биспецифичного активатора Т-клеток. Супернатанты фракционировали с помощью SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану в соответствии с протоколами производителя (Bio-Rad). Далее мембраны обрабатывали идентично протоколу дот-блоттинга, описанному выше.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Для оценки связывания EpCAM готовили планшеты для ИФА путем покрытия в течение ночи при 4°C человеческим белком EpCAM/TROP-1 (50 нг/лунку, Sino Biological Inc, № 10694-H02H-50). Планшеты блокировали в течение 1 ч при температуре окружающей среды 5% BSA с последующей инкубацией с разбавленными супернатантами HEK293A, трансфицированных биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM, контрольным биспецифичным активатором Т-клеток и пустым pSF-CMV вектором (2 ч, комнатная температура). Планшеты трижды промывали PBS-T и затем после каждого последующего этапа связывания. Планшеты инкубировали с анти-His антителом (С-конец) (1:5000, клон 3D5, № 46-0693, Invitrogen, Великобритания) в течение 1 ч, при комнатной температуре, а затем с HRP-конъюгированным анти-мышиным-Fc (1:1000 в PBS/5% молока, Dako) в течение 1 ч при комнатной температуре. Детектирование HRP проводили с использованием 3.3.5.5'-тераметилэтилендиамина (TMB, Thermo-Fisher), а для

прекращения реакции использовали стоп-раствор. Поглощение на 450 нм измеряли на планшет-ридере Wallac 1420 (Perkin Elmer).

Проточная цитометрия.

Анализ проточной цитометрией проводили на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences), и обрабатывали данные с помощью программного обеспечения Flowjo v10.0.7r2 (TreeStar Inc., США). Для классификации различных клеточных популяций использовали антитела, специфичные к CD45 (HI30, Biolegend), CD11b (ICRF44, Biolegend), EpCAM (9C4, Biolegend) и FAP (427819, R&D Systems). Для анализа популяций Т-клеток использовались следующие клоны антител, связанные с различными флуорофорами: CD69 (FN50, Biolegend), CD25 (BC96, Biolegend), IFNγ (4S.B3, Biolegend), антитело αCD107a (H4A3, Biolegend), CD3 (HIT3a, Biolegend), CD4 (OKT4, Biolegend), CD8a (HIT8a, Biolegend), PD1 (H4A3, Biolegend). В каждом случае использовали соответствующее изотипическое контрольное антитело.

Характеристика активации Т-клеток человека Уровни экспрессии CD69 и CD25.

Способность рекомбинантных биспецифичных активаторов Т-клеток к EpCAM или несущих биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM вирусов индуцировать активацию Т-клеток оценивали по поверхностной экспрессии CD69 и CD25. CD3 клетки человека (75000 клеток/лунку в 96-луночных планшетах с плоским дном) из образцов МКПК или асцита культивировали отдельно или с клетками-мишенями DLD, SKOV, CHO, CHOEpCAM или из асцита (15000) в присутствии только среды, EpCAM или контрольного белка биспецифичного активатора Т-клеток (2 нг/мкл) или рекомбинантного вируса (100 вч/клетку). В некоторых случаях добавляли анти-PD1 антитело (Invivogen, № hpdlni-mab7) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. Клетки CD3 инкубировали с микросферами CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Fisher, № 11131D) в качестве положительного контроля для активации Т-клеток. Клетки культивировали в течение 24 ч при 37°C, если не указано иное, и затем собирали с помощью ферментативного буфера для диссоциации клеток (Gibco, № 13151014). Все клетки окрашивали антителами на поверхностную экспрессию CD69, CD25, CD3, CD4 или CD8 и анализировали проточной цитометрией. Влияние асцитной жидкости на активацию Т-клеток (CD69, CD25) исследовали поликлональной активацией CD3-очищенных МКПК (100000) путем инкубации с иммобилизованным на чашке анти-CD3 антителом (7,5 мкг/мл, HIT3a, Biolegend, № 300313) в RPMI-1640 или жидкостях, выделенных из образцов асцита злокачественного новообразования.

Экспрессия IFNγ.

Способность биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM индуцировать активность Т-клеток оценивали по экспрессии IFNγ, с помощью совместного культивирования Т-клеток в течение 6 ч с клетками DLD (200 000 CD3 клеток/лунку, 40000 DLD клеток/лунку 96-луночного планшета с плоским дном) и 2 нг/мкл рекомбинантного EpCAM или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток. В качестве положительного контроля Т-клетки стимулировали растворимым коктейлем для активации клеток PMA/иономицин (Biolegend, № 423301). Брефельдин А (GolgiPlug, BD Biosciences) добавляли в культуральную среду за 5 ч до сбора урожая, после чего CD3+ Т-клетки собирали и внутриклеточно окрашивали на экспрессию IFNγ и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Пролиферация Т-клеток.

Для изучения пролиферации Т-клеток 100 000 меченных CFSE (набор CellTrace CFSE, Invitrogen, № C34554) CD3+ Т-клеток инкубировали с 20000 клеток DLD в 96-луночном планшете, с 2 нг/мкл EpCAM или контрольного биспецифичного активатора Т-клеток. Через пять дней после совместного культивирования клетки окрашивали на CD3, CD4 или CD8, и измеряли CFSE-флуоресценцию жизнеспособных CD3+ Т-клеток с помощью проточной цитометрии, с нормализованным общим количеством клеток, с использованием микросфер Precision counting beads (5000/лунку, Biolegend, № 424902). Данные по флуоресценции анализировали и строили модель с помощью функции аппроксимации пролиферации программного обеспечения Flowjo v7.6.5. Данные представлены в виде процента исходных клеток, которые вошли в цикл пролиферации (% разделившихся) или среднего числа делений клеток, которые претерпела клетка в исходной популяции (индекс деления).

Дегрануляция CD107a.

Клетки DLD (15 000 клеток/лунку) совместно культивировали с 75 000 Т-клеток CD3+ в 96-луночном планшете с плоским дном в присутствии одной среды или 2 нг/мкл контрольного биспецифичного активатора Т-клеток или биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM. αCD107a или изотипические контрольные антитела добавляли непосредственно в культуральную среду. Монензин (GolgiStop, BD Biosciences) добавляли через 1 час инкубации при 37°C и 5% CO_2, а затем выполняли дальнейшую инкубацию в течение 5 ч. Затем клетки собирали, окрашивали на наличие CD3, CD4 или CD8 и анализировали проточной цитометрией.

Высвобождение цитокинов.

Количество цитокинов в супернатантах, собранных из культур DLD/МКПК или клеток плеврального выпота, определяли с использованием панели LEGENDplex Human T Helper Cytokine (Biolegend, № 740001) и проточной цитометрии, следуя инструкциям производителя. Цитокины, включенные в анализ:

IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFNγ и TNFα.

Анализ цитотоксичности в отношении клеток-мишеней in vitro.

Цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, опосредованную рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток или вирусами, оценивали с помощью высвобождения ЛДГ или анализа MTS. Клетки-мишени (DLD, SKOV, HT-29, A431, A549, PC3, CHO, CHO-EpCAM) совместно культивировали с Т-клетками CD3, CD4 или CD8 (E:T 5:1) в 96-луночном планшете с плоским дном в присутствии только среды, разбавленных супернатантов или вируса (100 вч/клетку). После 24 ч совместного культивирования (если не указано иное) собирали супернатанты и клетки и определяли цитотоксичность с помощью ЛДГ-анализа (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, № G1780) или анализа жизнеспособности MTS (CellTiter 96, Cell Proliferation Assay, Promega, № G3580) согласно инструкциям производителя. Количество биспецифичного активатора Т-клеток, продуцируемого из инфицированных вирусом DLD клеток, определяли путем сравнения цитотоксичности, индуцированной разбавленными вирусными супернатантами, с цитотоксичностью стандартной кривой, полученной с использованием рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток.

Для оценки онколитической активности вирусов клетки DLD высевали в 96-луночный планшет (25000 клеток/лунку) в течение 18 ч при 37°C и 5% CO_2, затем инфицировали нарастающим числом вч/клетку (5-кратное серийное разведение, от 100 до $5{,}12\times10^{-5}$ вч/клетку) или оставляли неинфицированными. Цитотоксичность DLD измеряли на 5 день с помощью MTS анализа жизнеспособности. Строили кривые дозозависимости и определяли IC50 с использованием четырехпараметрической нелинейной модели аппроксимации, интегрированной в программное обеспечение Prism 7 (GraphPad Software). Жизнеспособность клеток контролировали в режиме реального времени с использованием технологии xCELLigence RTCA DP (Acea Biosciences). Клетки DLD, SKOV3 или MCF7 высевали в 48-луночный E-планшет в количестве 12000 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки обрабатывали биспецифичным активатором Т-клеток (2 нг/мкл) или инфицировали вирусом (100 вч/клетку) или оставляли необработанными. Через 2 ч после инфицирования в необходимые лунки добавляли 75 000 клеток CD3+. Импеданс клеток измеряли каждые 15 мин в течение периода до 160 ч. Для анализов цитотоксичности ex vivo неочищенные клетки из образцов асцита или плеврального выпота ресуспендировали в асцитной жидкости и высевали ($1{,}5\times10^{5}$/лунку) в 96-луночные планшеты с плоским дном. После инкубации в течение указанной продолжительности при 37°C, 5% CO_2, супернатанты анализировали с помощью ЛДГ-анализа, или все клетки собирали с помощью буфера для диссоциации клеток, окрашивали на наличие CD3, CD25 и EpCAM и анализировали с помощью проточной цитометрии. Для экспериментов по блокированию PD1 было включено анти-PD1 антитело (2,5 мкг/мл, Invivogen, № hpd1ni-mab7).

Репликация вирусного генома и кПЦР.

Способность EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., EnAd-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., EnAd-CMV-Control Бисп.актив.Т-кл., EnAd-SAControl Бисп.актив.Т-кл. или EnAd к репликации их геномов анализировали с помощью посева клеток DLD в 24-луночный планшет (150 000 клеток/лунку) в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, перед инфицированием вирусом в количестве 100 вч/клетку. Клетки из лунок собирали через 24 и 72 ч после инфицирования и очищали ДНК с помощью мини-набора для выделения геномной ДНК PureLink (Invitrogen, № K182001) в соответствии с протоколом производителя. Общее содержание вирусных геномов определяли количественно с помощью кПЦР против гексона EnAd с использованием наборов специфичных праймеров-зондов (праймеры: TACATGCA-CATCGCCGGA/CGGGCGAACTGCACCA, зонд:CCGGACTCAGGTACTCCGAAGCATCCT).

Микроскопия.

Изображения по методу светлого поля и в флуоресцентном свете получали на микроскопе Zeiss Axiovert 25. Были сняты видеоролики в режиме таймлапс для наблюдения лизиса клеток-мишеней, опосредованного вирусами или Т-клетками, с помощью EnAd или EnAd-CMVEpCAM Бисп.актив.Т-кл. Неинфицированные клетками были использованы в качестве отрицательного контроля. Клетки NHDF окрашивали красителем CellTracker Orange CMTMR (Life Technologies, № C2927), а клетки CD3+ окрашивали набором CellTrace Violet Cell Proliferation (Life Technologies, № C34557) в соответствии с протоколами производителя. Окрашенные NHDF высевали в 24-луночный планшет в количестве 7500 клеток/лунку в сокультуре со SKOV3 в количестве 13 500 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2. Затем клетки обрабатывали 300 нг/мл биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM или инфицировали 100 вч/клетку EnAd или EnAd2.4-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. или оставляли необработанными. После 2 ч инкубации в необходимые лунки добавляли 100000 окрашенных CD3+ в дополнение к 1,5 мкМ реагента CellEvent Caspase 3-7 (Life Technologies, № C10423). Изображения были получены на инвертированном микроскопе Nikon TE 2000-E Eclipse (10-кратный оптический объектив) с интервалами 15 мин, охватывающими период 96 ч. Видеоролики в режиме таймлапс (12 кадров в секунду) были созданы с использованием программного обеспечения ImageJ.

Статистика.

Во всех случаях, когда сравнивались более двух экспериментальных условий, статистический ана-

лиз проводился с использованием однофакторного дисперсионного анализа на основе ретроспективного критерия Тьюки. Все данные представлены в виде среднее значение ± стандартное отклонение. Используемые уровни значимости составляли P = 0,01-0,05 (*), 0,001-0,01 (**), 0,0001-0,001 (***). Все эксперименты in vitro проводили в трех повторностях, если не указано иное.

Пример 18. Получение и производство биспецифичного активатора Т-клеток, нацеленного на EpCAM.

Биспецифичный активатор Т-клеток, нацеленный на EpCAM, был сконструирован путем соединения двух scFv, специфичных в отношении CD3ε и EpCAM, с гибким глицин-сериновым (GS) линкером. Также был произведен контрольный биспецифичный активатор Т-клеток, распознающий CD3ε и нерелевантный антиген (филаментный гемагглютинин адгезии (FHA) Bordetella pertussis). Оба биспецифичных активатора Т-клеток были сконструированы так, чтобы содержать N-концевую сигнальную последовательность для секреции млекопитающими и С-концевую декагистидиновую аффинную метку для обнаружения и очистки (фиг. 45A). Чтобы охарактеризовать функциональность рекомбинантных биспецифичных активаторов Т-клеток, их клонировали в векторы экспрессии под контролем транскрипции немедленно-раннего промотора CMV (pSF-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. и pSF-CMV-Control Бисп.актив.Т-кл., соответственно). Адгезивные клетки HEK293 (HEK293A) трансфицировали векторами экспрессии, а супернатанты собирали и концентрировали в 50 раз для дальнейшего анализа. Для оценки количества произведенного биспецифичного активатора Т-клеток образцы серийно разводили и оценивали, используя анти-His, в анализе дот-блоттинга, используя меченый декагистидином катепсин D в качестве стандарта. Таким образом можно было оценить, что уровень биспецифичных активаторов Т-клеток, продуцируемых в супернатанте, составляет приблизительно 20 мкг/мл через 48 ч после трансфекции ($1,8\times10^7$ клеток HEK293A) (фиг. 46A). Специфичное связывание биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, но не контрольного биспецифичного активатора Т-клеток, с рекомбинантным белком EpCAM было продемонстрировано с помощью ИФА (фиг. 46B).

Пример 19. Характеристика активации Т-клеток человека рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM.

Способность рекомбинантного белка биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM активировать Т-клетки, полученные из МКПК, оценивали путем добавления нестимулированных первичных CD3+ клеток человека в культуру клеток колоректальной карциномы DLD человека, которые, как известно, экспрессируют EpCAM на своей поверхности (Karlsson et al., 2008). Добавление 2,5 нг/мл биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM (в качестве супернатанта из трансдуцированных клеток HEK293A) привело к значительному повышению маркеров активации Т-клеток CD69 и CD25 (фиг. 45B и C), тогда как контрольный биспецифичный активатор Т-клеток не оказывал эффекта. Воздействие биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM на CD3 клетки в отсутствие опухолевых клеток дало очень умеренное повышение CD69 и CD25, и это показывает, что опосредованная антителами кластеризация CD3 необходима для полной активации этим связыванием анти-CD3. Т-клетки, стимулированные биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM в присутствии опухолевых клеток, также показали значительное повышение выработки гамма-интерферона (фиг. 45D) и пролиферации клеток (фиг. 45E), тогда как контрольный биспецифичный активатор Т-клеток не оказывал эффекта. Цель активации Т-клеток заключается в том, чтобы вызвать опосредованную дегрануляцией цитотоксичность, и экспрессия поверхностного CD107a/LAMP1 (указывающая на дегрануляцию, Aktas et al.) была сильно повышена воздействием биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, но не контроля (фиг. 45F).

Высвобождение цитокинов после опосредованной биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM активации Т-клеток, полученных из МКПК, в присутствии клеток DLD было охарактеризовано с помощью проточной цитометрии с использованием набора микросфер для определения цитокинов. Как и прежде, контрольный биспецифичный активатор Т-клеток проявлял небольшую активность, хотя биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM вызывал высвобождение нескольких цитокинов, включая высокие уровни IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, гамма-интерферона и TNF (фиг. 45G). Выработка IL-2, гамма-интерферона и TNF обычно ассоциирована с Th1-ответом, тогда как IL-6 и IL-10 чаще связаны с Th2-ответом (Mosmann & Sad, 1996).

Пример 20. Специфичность рекомбинантных биспецифичных активаторов Т-клеток к EpCAM.

Большинство эпителиальных клеток человека экспрессируют EpCAM, поэтому для оценки того, является ли эффект биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM антиген-специфичным, были сконструированы клетки яичника китайского хомяка (клетки CHO) с использованием лентивирусного вектора для экспрессии человеческого EpCAM на их поверхности. В присутствии биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM и CHO-EpCAM клеток экзогенно добавленные Т-клетки, полученные из МКПК, показали сильную активацию (оцениваемую по экспрессии CD25, см. фиг. 47A) и ассоциированную цитотоксичность (фиг. 47B), которая не наблюдалась у родительских контрольных клеток CHO или контрольных биспецифичных активаторов Т-клеток. Это указывает на то, что цитотоксичность биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM является антигенспецифичной.

Затем мы оценили, может ли биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM убивать ряд опухоле-

вых клеток и зависит ли уровень наблюдаемой цитотоксичности, опосредованной биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM, от плотности экспрессии EpCAM. Цитотоксичность Т-клеток в присутствии биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM измеряли в шести различных клеточных линиях карциномы, причем наибольшая цитотоксичность наблюдалась в DLD и A431, а наименьшая в A549 и PC3 (фиг. 47C). Это показало слабую ассоциацию с поверхностными уровнями EpCAM (определенными с помощью проточной цитометрии), причем клетки A549 и PC3 показали самые низкие уровни, а DLD - самые высокие (фиг. 47D). Это говорит о том, что наличие и уровень экспрессии EpCAM действительно влияют на степень цитотоксичности, хотя другие факторы (возможно, внутренняя устойчивость клеток к гранзим-опосредованному апоптозу) также играют роль в определении общего уровня уничтожения клеток.

Пример 21. Опосредованная биспецифичным активатором Т-клеток активация субпопуляций CD4+ и CD8+ Т-клеток.

Чтобы определить, какие типы Т-клеток активируются биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM, полученные из МКПК Т-клетки инкубировали с клетками DLD и активировали с использованием биспецифичных активаторов Т-клеток, а затем выполняли анализ проточной цитометрией. Как CD4+, так и CD8+ клетки демонстрировали высокие уровни экспрессии CD69 и CD25 (фиг. 49A), хотя процент активированных CD4 клеток, как правило, был немного выше. Опосредованную биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM пролиферацию Т-клеток оценивали с использованием окрашивания CFSE (фиг. 49B) и дегрануляции по экспрессии CD197a/LAMPl (фиг. 49C), и как и в предыдущем примере наблюдали сходные уровни активации как для CD4+, так и для CD8+ клеток. Наконец, уровни цитотоксичности в отношении опухолевых клеток сравнивали с использованием биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM для активации очищенных субпопуляций CD4+ и CD8+. Все препараты Т-клеток показали одинаковую цитотоксичность (фиг. 49D), показывая, что как CD4+, так и CD8+ клетки могут вносить вклад в наблюдаемую опосредованную биспецифичным активатором Т-клеток цитотоксичность.

Пример 22. Экспрессия биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM из онколитического аденовируса, EnAdenotucirev.

EnAdenotucirev (EnAd) представляет собой онколитический аденовирус, химеру аденовируса группы B типа 11 и типа 3 с мозаичной областью E2B, почти полной делецией E3 и меньшей делецией E4, локализованной на E4orf4 (Kuhn 2008). В настоящее время этот вирус проходит несколько клинических испытаний ранних фаз для лечения рака, сочетая в себе хорошую системную фармакокинетику и многообещающую клиническую активность с возможностью кодировать и экспрессировать трансгены (Calvo 2014, Boni 2014). Биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM был закодирован в EnAd непосредственно "справа" от гена фибера, с помощью челночного вектора, вставленного в основную цепь вируса сборкой методом Гибсона (фиг. 18). Биспецифичный активатор Т-клеток был помещен либо под транскрипционным контролем немедленно-раннего промотора CMV (EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл.), либо был помещен "справа" от сайта акцептора сплайсинга для главного позднего промотора аденовируса (MLP; EnAd-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл.). В первой конфигурации биспецифичный активатор Т-клеток должен быть экспрессирован всякий раз, когда вирус успешно заражает клетку, тогда как экспрессия с сайта акцептор сплайсинга MLP будет происходить только тогда, когда MLP активируется в клетках, которые являются пермиссивными для репликации вируса. Также был введен контрольный биспецифичный активатор Т-клеток (распознающий CD3 и FHA) для создания двух соответствующих контрольных вирусов.

Вирусы были клонированы, восстановлены в клетках HEK293A, после чего большую партию каждого из них готовили в сосуде HYPERFlask и дважды очищали с помощью бэндинга хлоридом цезия. Инфицирование DLD родительским EnAd и рекомбинантными вирусами, несущими биспецифичный активатор Т-клеток дало одинаковые количества вирусных геномов (по данным измерения с помощью кПЦР) во всех протестированных временных точках, что указывает на то, что трансген биспецифичного активатора Т-клеток не влияет на кинетику репликации вируса (фиг. 51A). Затем мы исследовали репликационные и онколитические свойства вирусов в отсутствие Т-клеток человека. Клетки DLD инфицировали партиями вируса с нарастающими количествами вирусных частиц (вч)/клетку, и цитотоксичность измеряли MTS анализом на 5-й день. Все рекомбинантные вирусы, включая вирусы с биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM и контрольными биспецифичными активаторами Т-клеток, регулируемые промотором CMV или акцептором сплайсинга, показали цитотоксическую активность, неотличимую от родительского вируса, показывая, что генетическая модификация не изменила внутреннюю онколитическую активность вируса (фиг. 51B).

Чтобы оценить экспрессию и секрецию биспецифичного активатора Т-клеток, использовали экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток вирусы EnAd для заражения клеток HEK293A, а супернатанты через 72 ч исследовали вестерн-блоттингом с использованием анти-His антитела. Как показано на фиг. 51C, все четыре вируса (два экспрессирующих контрольный биспецифичный активатор Т-клеток и два экспрессирующих биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM) демонстрировали одинаковые уровни биспецифичного активатора Т-клеток, секретируемого в супернатант.

Пример 23. Избирательное уничтожение EpCAM-положительных клеток с помощью продуцируемого вирусом биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM.

Супернатанты из EnAd-EpCAM бисп.актив.Т-кл.-инфицированных клеток HEK293A добавляли в культуры клеток CHO и CHO-EpCAM либо с Т-клетками, полученными из МКПК, либо без них; активацию Т-клеток и цитотоксичность в отношении клеток CHO/CHO-EpCAM измеряли через 24 ч. В случае клеток CHO не наблюдалось ни увеличения экспрессии CD25 в Т-клетках (фиг. 51D), ни какой-либо цитотоксичности при любой обработке (фиг. 51E). Однако Т-клетки, инкубированные с клетками CHO-EpCAM, показали значительное увеличение экспрессии CD25 при использовании супернатантов из клеток HEK293A, которые были инфицированы вирусами EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. или EnAd-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. (фиг. 51D). Как и ожидалось, это трансформировалось в избирательную цитотоксичность в отношении клеток CHO-EpCAM, только когда Т-клетки были добавлены в присутствии супернатанта из клеток 293A, которые были инфицированы вирусами EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. или EnAd-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. (фиг. 51E). Важно отметить, что цитотоксичность отсутствовала в отсутствие Т-клеток или при использовании супернатантов из HEK293A, когда клетки были инфицированы EnAd, экспрессирующим контрольный биспецифичный активатор Т-клеток.

Пример 24. Превосходная цитотоксичность EnAd, экспрессирующего биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM.

EnAd быстро убивает большинство клеток карциномы непосредственным онколизом (Kuhn 2008), хотя некоторые клетки, в частности клетки карциномы яичника SKOV3, частично устойчивы и убиваются медленнее. Поэтому мы пришли к выводу, что последствия вооружения вируса End для секреции биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, ведущего к цитотоксической активации Т-клеток, могут быть особенно очевидны в клетках SKOV3. Поэтому клетки были подвергнуты воздействию вируса (100 вч/клетку) через 24 ч после посева, и гибель клеток контролировали системой xCELLigence. Полученные из МКПК Т-клетки добавляли (или не добавляли) к культуре клеток SKOV3 через 2 ч. В отсутствие Т-клеток опухолевые клетки росли в течение приблизительно 72 ч (что проявляется в увеличении сигнала клеточного индекса на фиг. 53A), но затем рост клеток достигал плато и оставался стабильным, независимо от инфицирования вирусом, вплоть до истечения, по меньшей мере, 160 ч). Все протестированные вирусы, включая родительский EnAd, не вызывали заметной цитотоксичности в отношении клеток-мишеней в течение времени измерений. Однако при совместном культивировании с Т-клетками, полученными из МКПК, вирусы, вооруженные как CMV, так и SA-EpCAM бисп.актив.Т-кл., индуцировали быстрый лизис SKOV3, причем CMV индуцировал лизис в течение 16 ч, а SA - в течение 44 ч после добавления Т-клеток (фиг. 53B). Важно, что родительский EnAd или неспецифичные контрольные вирусы, несущие биспецифичный активатор Т-клеток, не продемонстрировали лизиса клеток-мишеней за этот период времени даже с добавлением Т-клеток. Этот результат был подтвержден ЛДГ-анализом, в котором были созданы со-культуры, идентичные вышеуказанным, с измерением цитотоксичности через 24, 48 и 96 ч после инфицирования (фиг. 48). Эти результаты подтверждаются аналогичными результатами в клетках DLD, в которых вирусы, экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, индуцировали цитотоксичность значительно быстрее, чем контрольные несущие биспецифичный активатор Т-клеток вирусы (фиг. 50A+B).

Чтобы подтвердить, что цитотоксичность клеток-мишеней опосредуется активацией Т-клеток, CD3 клетки собирали в каждый момент времени и определяли статус активации по экспрессии CD69 и CD25, демонстрируя кинетику экспрессии, сходную с наблюдаемой для цитотоксичности (фиг. 53C и D, фиг. 50C и D). Приблизительное количество биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM, вырабатываемого из инфицированных клеток DLD, определяли путем сравнения цитотоксичности (Abs490), индуцированной супернатантами инфицированных DLD, с цитотоксичностью, индуцированной известными количествами рекомбинантного биспецифичного активатора Т-клеток (то есть создавая стандартную кривую (Abs490)). DLD в сокультуре с CD3-очищенными МКПК (1:5) инкубировали с рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток (фиг. 50E) или инфицированным супернатантом DLD (фиг. 50F), и измеряли высвобождение ЛДГ через 24 ч. Это позволило нам определить, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM вырабатывался в количестве 165 мкг и 50 мкг на миллион DLD для EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. и EnAd-SAEpCAM Бисп.актив.Т-кл., соответственно. EC50 для биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM составляет 7,4 нг/мл (фиг. 50E и F), и поэтому биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM вырабатывается рекомбинантным вирусом на уровнях, которые могут достигать терапевтических доз.

Цитотоксичность EnAd, экспрессирующего биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, визуализировали с помощью видеомикроскопии в режиме тайм-лапс.

Опухолевые клетки.

SKOV3 (без метки) совместно инкубировали с нормальными человеческими фибробластами (EpCAM-негативными, помеченными красным, служащими нецелевыми контрольными клетками) и производными от МКПК Т-клетками (помеченными синим) в присутствии окрашивания каспазой (реагент CellEvent Caspase 3-7 образует зеленое пятно при активации каспаз). Как и в предыдущем примере, комбинация EnAd, экспрессирующего биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, в сочетании с экзоген-

ными Т-клетками дала исключительно высокую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток SKOV3, которые демонстрировали сильную индукцию апоптоза при инфицировании EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., но не родительским EnAd. Важно, что EpCAM-отрицательные NHDF в совместной культуре оставались жизнеспособными на протяжении всего процесса. Репрезентативные флуоресцентные изображения в разные моменты времени из видео с клетками SKOV3 показаны на фиг. 53E. Также приведены видео в режиме тайм-лапс, показывающие клетки DLD (которые по своей природе более чувствительны к вирусу), со культивируемые с NHDF.

Пример 25. Биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM может преодолевать иммуносупрессию, активировать эндогенные Т-клетки и убивать эндогенные опухолевые клетки в перитонеальном асците злокачественного новообразования.

Три клинических образца перитонеального асцита злокачественного новообразования, содержащие EpCAM-положительные опухолевые клетки и первичные фибробласты (в качестве контроля, не экспрессирующие EpCAM клетки), размножали ex vivo, и смешанные популяции первичных клеток инкубировали с Т-клетками, полученными из МКПК, а затем обрабатывали свободным биспецифичным активатором Т-клеток или 100 вч/клетку EnAd-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. в культуральной среде. Через 72 ч уровень EpCAM-положительных клеток-мишеней (фиг. 55A) или нецелевых FAP-положительных фибробластов (фиг. 55B) измеряли с помощью проточной цитометрии. Активацию Т-клеток анализировали путем измерения экспрессии CD25 (фиг. 55C). Свободный биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM и экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM вирусы индуцировали активацию Т-клеток, что приводило к деплеции EpCAM-положительных опухолевых клеток, при этом первичные FAP-положительные (EpCAM-негативные) фибробласты не демонстрировали изменений в количестве. Это наблюдалось во всех образцах пациентов, и ни один из других препаратов не показал каких-либо существенных эффектов. Это показывает, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM (или кодирующий его онколитический вирус) может опосредовать активацию и селективную цитотоксичность Т-клеток, полученных из МКПК, в отношении опухолевых клеток асцита яичников человека.

Экссудаты злокачественных новообразований, вероятно, представляют собой среду потенциальной иммунной толерантности с подавленными иммунными реакциями, обычно наблюдаемыми у пациентов с поздней стадией метастатического рака. Чтобы проверить эту гипотезу, мы поликлонально стимулировали полученные из МКПК Т-клетки анти-CD3-антителами в культуральных средах или в присутствии 100% асцитной жидкости у пяти пациентов со злокачественными новообразованиями брюшной полости. В то время как в среде RPMI анти-CD3-антитело давало приблизительно 50% Т-клеток, положительных как по CD25, так и по CD69, присутствие асцитной жидкости, по-видимому, ослабляло активацию Т-клеток, что проявлялось снижением опосредованного антителами повышения экспрессии CD69/CD25, и это было особенно заметно для жидкости пациента № 2 (фиг. 56A). Это подтверждает наше мнение о том, что компоненты асцитной жидкости могут оказывать иммуносупрессивное или вызывающее толерантность воздействие. Однако это ослабление в увеличении маркеров активации не коррелировало с подавлением дегрануляции Т-клеток, при экстернализации CD107a в асцитической жидкости, сходной с таковой в культуральной среде (фиг. 56B). Отсюда следует, что биспецифичные активаторы Т-клеток могут быть способны обойти ассоциированные с опухолевым микроокружением механизмы иммуносупрессии Т-клеток (Nakamura & Smyth, 2016). Поэтому мы исследовали способность производных из МКПК Т-клеток и биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM опосредовать цитотоксичность клеток-мишеней в присутствии иммунодепрессивной асцитной жидкости. Т-клетки, инкубированные с асцитной жидкостью 1 и 2, индуцировали лизис линии клеток MCF7 аденокарциномы молочной железы человека, сходный с лизисом в культуральной среде RPMI (измерено с использованием xCELLigence), хотя цитотоксичность показала задержку приблизительно 8 ч в присутствии асцитной жидкости пациента № 2 (фиг. 56C). В дополнение к наличию иммуносупрессивной жидкости и опухолевых клеток асцит содержит опухоль-ассоциированные лимфоциты и поддерживающие клетки опухолевой стромы, что дает уникальную опухолеподобную модельную систему для тестирования опосредованной биспецифичным активатором Т-клеток активации эндогенных Т-клеток, полученных от пациента. После 24-часовой инкубации всех эндогенных клеток и асцитной жидкости со свободным рекомбинантным биспецифичным активатором Т-клеток оценивали активацию Т-клеток пациента (фиг. 56D). В этой важной с клинической точки зрения обстановке биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM (но не контрольный аналог) индуцировал экспрессию CD69 и CD25, хотя CD25 - на более низких уровнях, когда эксперимент проводили в 100% асцитной жидкости, не в простой среде. Эти данные свидетельствуют, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM способен преодолеть, по меньшей мере, некоторые из иммуносупрессивных эффектов перитонеальной асцитной жидкости для активации эндогенных Т-клеток. Цитотоксичность оценивали путем измерения высвобождения ЛДГ, и биспецифичный активатор Т-клеток вызывал значительный рост как при проведении эксперимента в среде, как и в 100% асцитной жидкости. Это указывает на то, что некоторые из асцитных клеток были убиты опосредованной биспецифичным активатором Т-клеток цитотоксичностью, хотя, учитывая множественные типы клеток, присутствующие в первичном асците, невозможно определить, какая часть опухолевых клеток погибает.

Пример 26. EnAd, экспрессирующий биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, может активировать эндогенные Т-клетки для уничтожения эндогенных опухолевых клеток в плевральных экссудатах злокачественных новообразований.

Чтобы изучить влияние экспрессирующих биспецифичный активатор Т-клеток EpCAM вирусов в другой с клинической точки зрения обстановке, мы получили несколько образцов плевральных экссудатов от пациентов с различными злокачественными новообразованиями. При первоначальном скрининге (пример показан на фиг. 52) подходящими для дальнейшего анализа образцами были сочтены образцы, содержащие CD3 и EpCAM-положительные клетки. Мы также оценили экспрессию PD1 эндогенными Т-клетками после их первоначального выделения, и хотя только 10% Т-клеток, полученных из МКПК, экспрессируют PD1, все Т-клетки образцов выпота злокачественного новообразования были по меньшей мере на 40% положительными в отношении PD1, и иногда этот процент достигал 100% (фиг. 54). Неочищенные клетки в массе (выделенные центрифугированием и ресуспендированные) инкубировали при фиксированных концентрациях в 100% жидкости плеврального экссудата в присутствии 500 нг/мл свободного биспецифичного активатора Т-клеток к EpCAM или 100 вч/клетку вируса, кодирующего биспецифичный активатор Т-клеток. Через 5 дней собирали общую популяцию клеток и измеряли общее количество CD3+ клеток (фиг. 57A). По сравнению с необработанными контролями пролиферация Т-клеток проявлялась только в образцах, получавших свободный биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM или EnAd, кодирующий биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM. Это подтверждает, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM связывался с мишенью EpCAM и перекрёстно связывался с CD3 стимулируя эндогенные Т-клетки. Также определяли уровень экспрессии CD25 на CD3 клетках (фиг. 57B). Свободный биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM индуцировал значительную активацию Т-клеток опухоль-ассоциированных лимфоцитов (по оценке экспрессии CD25) во всех образцах пациентов, даже в вероятной иммуно-аллергической среде плевральной экссудатной жидкости. Добавление анти-PD1-блокирующего антитела не оказывало влияния на опосредованную биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM активацию Т-клеток в этой ситуации (фиг. 54B и C). Между пациентами наблюдались заметные вариации (хотя между образцами одного и того же пациента они были незначительными), при этом активация варьировалась от 50% до 90% в зависимости от донора. Точно так же образцы, обработанные EnAd, экспрессирующими биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, показали высокую активацию у некоторых пациентов (от 10-20% до 80%, как для EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл., так и для EnAd-SA-EpCAM Бисп.акт.Т-кл.).

Интересно, что у пациента, продемонстрировавшего самую низкую активацию, опосредованную биспецифичным активатором Т-клеток, также был отмечен самый низкий уровень фоновой активации Т-клеток. Родительские EnAd, или EnAd, экспрессирующие контрольные биспецифичные активаторы Т-клеток, или свободные контрольные биспецифичные активаторы Т-клеток не вызывали стимуляции выше фона. Мы оценили способность экспрессирующих биспецифичный активатор Т-клеток вирусов опосредовать нацеленную на EpCAM цитотоксичность путем измерения остаточных уровней EpCAM-положительных клеток с помощью проточной цитометрии в конце пятидневной инкубации (фиг. 57C). Свободный биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM и два вируса, кодирующих биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, вызывали заметную деплецию аутологичных EpCAM-экспрессирующих клеток в каждом случае, тогда как другие виды обработки оказывали незначительное влияние или вообще не влияли на уровень EpCAM-положительных клеток. В случае образца № 1 жизнеспособность всех вирусов, основанных на EnAd, была несколько ниже по сравнению с необработанным контролем, и это, вероятно, отражает последствия прямого вирусного онколиза. В связи с отсутствием влияния PD1-блокирующего антитела на активацию Т-клеток, оно не оказывало воздействия на уничтожение клеток-мишеней, опосредованное биспецифичным активатором Т-клеток к EpCAM, при почти полной цитотоксичности клеток EpCAM+ (пациенты 2, 3 и 4) в отсутствие PD1-блокатора (фиг. 54D).

Различные эффекты родительского EnAd и EnAd-CMV-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. показаны с помощью микроскопии на фиг. 57D, где экспрессия биспецифичного активатора Т-клеток уменьшает присутствие опухолевых клеток и расширяет популяцию Т-клеток. Соответствующие графики проточной цитометрии подтверждают существенное расширение и активацию Т-клеток после обработки вирусом, экспрессирующим биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM.

Наконец, были охарактеризованы эффекты различных обработок путем измерения уровней ключевых продуцируемых цитокинов, с использованием набора белков LEGENDplex (фиг. 57E). С большим отрывом, наибольшее увеличение было в экспрессии гамма-интерферона, выросшей почти в 1000 раз после обработки свободным биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM или EnAd, кодирующим биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM. Эти два вида обработки также вызывали приблизительно 10-кратное увеличение экспрессии IL-5, IL-13, фактора некроза опухоли (TNF), IL17A и IL17F, характерных для активированных Т-клеток. Один EnAd (или экспрессирующий контрольный биспецифичный активатор Т-клеток) также вызывал 10-кратное увеличение гамма-интерферона, но в остальном ни одна обработка не вызывала каких-либо заметных изменений в экспрессии цитокинов.

Пример 27. Обсуждение.

Онколитические вирусы предлагают новую интригующую стратегию, объединяющую несколько

терапевтических методов в одном таргетном, самоусиливающемся агенте (Keller & Bell, 2016; Seymour & Fisher, 2016). Поскольку они избирательно реплицируются в раковых клетках и распространяются от клетки к клетке, считается, что некоторые онколитические вирусы опосредуют гибель клеток неапоптическими путями смерти (Ingemarsdotter et al., 2010; Li et al., 2013), в рамках процесса, позволяющего вирусным частицам ускользать из умирающих клеток. В частности, EnAd убивает клетки с помощью провоспалительного процесса, известного как онкоз или ишемическая гибель клеток (Dyer, 2017). Этот неапоптотический механизм смерти вызывает высвобождение нескольких провоспалительных клеточных компонентов, таких как АТФ, HMGB1 и воздействие кальретикулина (известных как молекулярные структуры, ассоциированные с повреждениями, DAMP) (Weerasinghe & Buja, 2012), и, вероятно, имеет решающее значение для способности вируса способствовать эффективному противораковому иммунному ответу. Однако в дополнение к последствиям прямого лизиса, вирусы дают возможность кодировать и экспрессировать другие противоопухолевые биопрепараты, устраняя проблемы с доставкой и гарантируя, что биопрепарат достигает своей самой высокой концентрации в микроокружении опухоли. Imlygic кодирует GM-CSF, однако потенциал для вооружения вирусов практически безграничен и предоставляет много интересных возможностей для разработки мультимодальных терапевтических стратегий с аддитивным или синергетическим противораковым эффектом (de Gruijl et al., 2015; Hermiston & Kuhn, 2002).

Кодирование биспецифичного активатора Т-клеток в онколитических вирусах обеспечивает мощное средство для активации инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, чтобы они превращались в цитотоксические и лизирующие антиген-положительные клетки-мишени, обеспечивая полностью отдельную терапевтическую модальность в отличие от эффектов прямого вирусного лизиса. В этом исследовании мы показали, что направленная биспецифичным активатором Т-клеток цитотоксичность полностью антиген-специфична, может быть опосредована как CD4, так и CD8 Т-клетками (Brischwein et al., 2006) и может быть включена в онколитический аденовирус и экспрессироваться только в клетках, которые допускают репликацию вируса. Кроме того, настоящее исследование впервые показывает, что эндогенные Т-клетки в биоптатах жидкого рака могут быть активированы биспецифичным активатором Т-клеток и вирус-кодированными биспецифичными активаторами Т-клеток и могут убивать эндогенные опухолевые клетки без какой-либо дополнительной стимуляции или обращения вспять подавления иммунитета. Важно отметить, что это может происходить даже в первичных жидкостях, которые включают микроокружение перитонеального асцита или плевральных выпотов в качестве суррогатов иммуносупрессивного микроокружения солидных опухолей. Вооружение онколитических вирусов с целью экспрессии биспецифичного активатора Т-клеток объединяет два совершенно разных терапевтических механизма: первый обеспечивает литическую гибель опухолевых клеток, которые являются пермиссивными для вирусного инфицирования, а второй направлен на цитотоксичность Т-клеток через определенный, выбранный антиген. Это обеспечивает значительную гибкость в разработке терапевтического подхода, возможно, с использованием биспецифичного активатора Т-клеток для доставки цитотоксичности к опухоль-ассоциированным клеткам, которые относительно устойчивы к непосредственному уничтожению вирусом. Например, хотя мы привели в настоящем изобретении пример использования технологии биспецифичного активатора Т-клеток, который распознает ассоциированный с карциномой антиген (EpCAM), подход на основе биспецифичного активатора Т-клеток также можно использовать для нацеливания цитотоксичности на ассоциированные с опухолью фибробласты или другие стромальные клетки. Действительно, даже когда мишени для распознавания биспецифичным активатором Т-клеток не ограничиваются экспрессией в микроокружении опухоли, связь выработки биспецифичного активатора Т-клеток с репликацией вируса позволяет пространственно ограничивать экспрессию биспецифичного активатора Т-клеток в опухоли, сводя к минимуму системную токсичность. Это важно, так как биспецифичный активатор Т-клеток, вводимый внутривенно, показывает относительно короткую кинетику циркуляции (Klinger et al., 2012) и часто ассоциирован со значительной нецелевой токсичностью вне опухоли (Teachey et al., 2013).

Возможность кодирования биспецифичного активатора Т-клеток в онколитических вирусах ранее уже была изучена с использованием онколитического вируса осповакцины с Ephrin A2-нацеленным биспецифичным активатором Т-клеток. Этот агент показал, что биспецифичный активатор Т-клеток к Ephrin может опосредовать активацию МКПК и антигенно-направленное уничтожение опухолевых клеток как in vitro, так и in vivo. Интересно, что хотя биспецифичный активатор Т-клеток мог активировать Т-клетки, он не приводил к пролиферации Т-клеток без добавления экзогенного IL-2, тогда как биспецифичный активатор Т-клеток, использованный в настоящем исследовании, приводил к обширной пролиферации как МКПК in vitro, так и опухоль-ассоциированных лимфоцитов с использованием клинических образцов биопсии ex vivo.

Мы полагаем, что наблюдаемые различия могут отражать различный дизайн биспецифичного активатора Т-клеток, различные используемые онколитические вирусы или, возможно, зависят от плотности антигена, дающей достаточное перекрестное сшивание CD3 на Т-клетках.

Одной из основных целей терапии онколитическими вирусами является создание противоопухолевого Т-клеточного ответа, который распознает специфичные для пациента неоантигены, а также "общие" опухоль-ассоциированные антигены. Литические вирусы могут делать это путем стимуляции улучшен-

ной презентации антигена путем лизиса опухолевых клеток в контексте DAMP наряду со связанными с вирусом патоген-ассоциированными молекулярными структурами (PAMP). Иммуногистохимическое окрашивание резецированных опухолей толстой кишки после внутривенной доставки EnAd показывает, что вирус способствует сильному притоку CD8+ Т-клеток в опухолевую ткань (Garcia-Carbonero, 2017). Однако, хотя это потенциально очень мощный подход, адаптивные Т-клеточные ответы в конечном итоге зависят от экспрессии опухолевыми клетками антигенов MHC класса I, что позволяет таргетное уничтожение клеток. Утрата экспрессии MHC является хорошо документированной стратегией иммунного уклонения для опухолей (Garrido et al., 2016).

Следует отметить, что обе цитотоксические стратегии, которые непосредственно применяются вооруженными биспецифичный активатор Т-клеток онколитическими вирусами, действуют независимо от экспрессии MHC класса I опухолевыми клетками и, следовательно, могут применяться для уничтожения раковых клеток, даже когда опухолевые клетки утратили экспрессию MHC.

Таким образом, настоящее исследование демонстрирует, что кодирование биспецифичного активатора Т-клеток в EnAd обеспечивает особенно многообещающую стратегию для достижения целевой экспрессии в диссеминированных опухолях, используя известную стабильность в крови и системную биодоступность вируса, которая уже изучалась в нескольких ранних фазах клинических испытаний. Примечательно, что в исследовании, где вирус вводили внутривенно за несколько дней до резекции первичного рака толстой кишки, последующая иммуногистологическая оценка срезов опухоли показала, что вирус достиг областей через опухоли и дал сильные внутриядерные гексоновые сигналы, что указывает на успешное инфицирование и репликацию вируса избирательно в опухолевых клетках. Это подтверждает доклинические данные (Di et al., 2014; Illingworth, 2017), свидетельствующие о том, что этот вирус стабилен в 100% крови человека и должен быть способен к направленному на опухоль инфицированию диссеминированных и метастатических злокачественных новообразований у пациентов-людей. Биспецифичные активаторы Т-клеток могут быть закодированы EnAd без потери онколитической вирулентности (фиг. 51B), что отражает значительную способность вируса к упаковке трансгена. Присутствие трансгена не будет влиять на физико-химические свойства вирусных частиц, поэтому модифицированные вирусы должны демонстрировать точно такую же клиническую фармакокинетику, что и родительский агент, и должны быть способны экспрессировать закодированный биспецифичный активатор Т-клеток избирательно в опухолях по всему организму. Это обеспечивает захватывающий и потенциально очень эффективный новый подход к системной таргетной иммунотерапии рака, который теперь должен быть приоритетным для клинической оценки.

Пример 28.

Иммуносупрессия активации Т-клеток человека и цитотоксичности клеток-мишеней экссудатными жидкостями злокачественного новообразования пациента.

Экссудаты злокачественных новообразований представляют собой среду потенциальной иммунной толерантности с подавленными иммунными реакциями, что обычно наблюдается у пациентов с метастатическим раком поздней стадии. Количество IL-10, считающегося противовоспалительным цитокином, измеряли в нормальной сыворотке или экссудатных жидкостях злокачественных новообразований пациента (A, перитонеальный асцит; P, плевральный выпот) с использованием набора Human IL-10 ИФА MAX (Biolegend, 430604). Уровни IL-10 в экссудатах (88,1-633,4 пг/мл) значительно превышали уровни, измеренные в нормальной сыворотке (7,2-10 пг/мл). См. фиг. 58.

Была исследована способность CD3/CD28-микросфер (Gibco, 11161D) активировать Т-клетки МКПК в присутствии нормальной сыворотки, асцита или плевральной жидкости. Т-клетки МКПК человека (100000 клеток на лунку в 96-луночном планшете) обрабатывали CD3/CD28 микросферами (следуя инструкциям производителя) в нормальной сыворотке или экссудате пациента (50%). В качестве отрицательного контроля Т-клетки оставляли необработанными в каждой жидкости. После 24 ч культивирования клетки собирали и затем анализировали уровни экспрессии CD69 и CD25 на CD3+ Т-клетках окрашиванием антителами и проточной цитометрией, представляя в виде процента от дважды положительных клеток (CD69+ CD25+) (фиг. 59). В нормальной сыворотке анти-CD3/CD28 микросферы давали приблизительно 60% Т-клеток дважды положительных как по CD25, так и по CD69, тогда как присутствие асцитной жидкости ослабляло активацию Т-клеток в 6/12 жидкостей.

В аналогичном эксперименте 100000 Т-клеток обрабатывали CD3/CD28 микросферами в присутствии нормальной сыворотки, асцита или плевральной жидкости (50%). Анти-CD107a или изотипическое контрольное антитело добавляли непосредственно в культуральную среду. Через 1 ч добавляли монензин (BD Golgistop, BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Еще через 5 ч клетки собирали и анализировали проточной цитометрией для определения дегрануляции (фиг. 60). В нормальной сыворотке анти-CD3/CD28 микросферы давали приблизительно 22,5% дегранулированных Т-клеток, тогда как присутствие асцитной жидкости ослабляло активацию Т-клеток в 10/12 жидкостей. Уровень дегрануляции значительно коррелировал (коэффициент Пирсона, $r = -0,7645$; $p = 0,0038$) с количеством IL-10 в каждой жидкости (фиг. 61).

В аналогичном эксперименте 75000 Т-клеток совместно культивировали с 15000 SKOV3 и EpCAM в присутствии нормальной сыворотки, асцита или плевральной жидкости (50%). Т-клетки обрабатывали

контрольным биспецифичным активатором Т-клеток в каждой жидкости в качестве отрицательного контроля. После 24 ч культивирования клетки собирали, и затем анализировали уровни экспрессии CD69 и CD25 на CD3+ Т-клетках окрашиванием антителами и проточной цитометрией, представляя в виде процента от дважды положительных клеток (CD69+ CD25+) (фиг. 62). В нормальной сыворотке биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM обеспечивал приблизительно 67,6% Т-клеток, дважды положительных как по CD25, так и по CD69, тогда как присутствие асцитной жидкости ослабляло активацию Т-клеток в 0/12 жидкостей и слегка индуцировало активацию в 4/10 жидкостей.

В аналогичном эксперименте 75000 Т-клеток совместно культивировали с 15000 SKOV3 и EpCAM в присутствии нормальной сыворотки, асцита или плевральной жидкости (50%). Т-клетки обрабатывали контрольным биспецифичным активатором Т-клеток в каждой жидкости в качестве отрицательного контроля. Анти-CD107a или изотипическое контрольное антитело добавляли непосредственно в культуральную среду. Через 1 ч добавляли монензин (BD Golgistop, BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Еще через 5 ч клетки собирали и анализировали проточной цитометрией для определения дегрануляции (фиг. 63). В нормальной сыворотке несущие биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM микросферы давали приблизительно 41,4% дегранулированных Т-клеток, тогда как присутствие асцитной жидкости ослабляло активацию Т-клеток в 2/12 жидкостей.

Способность EnAd-SA-EpCAM Бисп.актив.Т-кл. и EnAd-SA-Control Бисп.актив.Т-кл. индуцировать Т-клеточный лизис клеток-мишеней в жидкостях экссудата злокачественного новообразования оценивали с использованием технологии xCELLigence. Клетки SKOV высевали в 48-луночный E-планшет в количестве 10^4 клеток/лунку соответственно. Планшеты инкубировали в течение 18 ч, 37°C, 5% CO_2, прежде чем клетки были либо инфицированы 100 вирусными частицами на клетку (ppc), либо были оставлены неинфицированными. Через 2 ч добавляли Т-клетки МКПК (5:1) в нормальной сыворотке или экссудатной жидкости пациента (конечная концентрация, 50%). xCELLigence использовали для измерения цитотоксичности клеток-мишеней каждые 10 мин (фиг. 64). Результаты показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток-опосредованный лизис SKOV3 Т-клетками не зависит от используемой жидкости. Неочищенные асцитные клетки (следовательно, без изменений после получения) высевали в количестве 100 000 клеток на лунку 96-луночного планшета с плоским дном в среде RPMI или асцитной жидкости. Клетки обрабатывали EpCAM или контрольным биспецифичным активатором Т-клеток, причем необработанные лунки служили отрицательным контролем. После инкубации при 37°C в течение 24 ч клетки собирали и определяли уровень экспрессии CD25 и CD69 в клетках CD3 (фиг. 65). Результаты демонстрируют, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM приводил к значительному увеличению активации Т-клеток (CD69/CD25 дважды положительных) ассоциированных с опухолью лимфоцитов, при незначительном увеличении асцитной жидкостью.

В аналогичном эксперименте неочищенные асцитные клетки (следовательно, без изменений после получения) высевали в количестве 100000 клеток на лунку 96-луночного планшета с плоским дном в среде RPMI или асцитной жидкости. Клетки обрабатывали EpCAM, контрольными вирусами с биспецифичным активатором Т-клеток или рекомбинантными вирусамис биспецифичным активатором Т-клеток (100 вч/клетку), причем необработанные лунки служили отрицательным контролем (фиг. 66). После инкубации при 37°C в течение 5 дней собирали общую популяцию клеток и определяли количество CD3+ клеток (фиг. 66A) и уровень экспрессии CD25 в CD3 клетках (фиг. 66B), а также количество эндогенных $EpCaM^+$ клеток, определяемое проточной цитометрией (фиг. 66C). Общее количество клеток на лунку определяли, используя микросферы Precision counting beads. Результаты показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM и EnAd, экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, приводят к значительному увеличению активации Т-клеток (число CD3, CD25) опухоль-ассоциированных лимфоцитов и цитотоксичности $EpCAM^+$ клеток как в среде RPMI, так и в асцитной жидкости.

В качестве продолжения эксперимента, приведенного выше, еще шесть образцов экссудата пациента (итого - 7) обрабатывали идентично в асцитической жидкости (фиг. 67), и определяли количестве CD3+ (фиг. 67A), экспрессию CD25 Т-клеток (фиг. 67B) и количество $EpCAM^+$ клеток (фиг. 67C) методом проточной цитометрии. Результаты показывают, что биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM и EnAd, экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM, воспроизводимым образом приводят к значительному увеличению активации Т-клеток (число CD3, CD25) опухоль-ассоциированных лимфоцитов и цитотоксичности клеток $EpCAM^+$ в ряде образцов биопсии экссудатов.

Пример 29.

Биспецифичный активатор Т-клеток к FAP опосредует активацию Т-клеток и уничтожение FAP+ клеток различными донорными Т-клетками.

В других экспериментах методы, описанные в примере 2, использовались для дальнейшей оценки Т-клеточно-активирующих свойств рекомбинантного белка биспецифичного активатора Т-клеток к FAP, протестированного в сокультурах NHDF и Т-клеток, по сравнению с контрольным биспецифичным активатором Т-клеток и активацией поликлональных Т-клеток с использованием анти-CD3/CD28 микросфер Dynabeads. Супернатанты, взятые после 24 ч культивирования, тестировали с помощью ИФА на наличие IFNγ (фиг. 68A) и с помощью набора микросфер цитокинов (панель цитокинов Т-хелперов человека

LEGENDplex, BioLegend № 74001) для панели цитокинов (фиг. 68B). Контрольный биспецифичный активатор Т-клеток не вызывал значительного изменения какого-либо цитокина, однако биспецифичный активатор Т-клеток к FAP приводил к сильному повышению гамма-интерферона, IL-2, TNFα, IL-17 и IL-10, что согласуется с различными субпопуляциями стимулируемых Т-клеток, и выработка IFNγ была намного выше, чем вызванная анти-CD3/CD28.

Стимуляция биспецифичным активатором Т-клеток к FAP, но не контрольным биспецифичным активатором Т-клеток, в присутствии клеток NHDF также индуцировала быструю дегрануляцию (в течение 6 ч) Т-клеток субпопуляций как CD4+, так и CD8+, что было определено по экстернализации CD107a/LAMP1 на поверхности Т-клеток (по данным проточной цитометрии), что сильно коррелирует с их способностью убивать клетки-мишени (фиг. 69A и B). Это индуцирование дегрануляции с помощью биспецифичного активатора Т-клеток к FAP транслировалось в мощный лизис фибробластов (фиг. 69C), что было измерено по высвобождению ЛДГ через 24 ч совместного культивирования с Т-клетками МКПК (EC50 ~ 2,5 нг/мл) при индуцированной активации Т-клеток и цитотоксичности, наблюдаемой при использовании 6/6 донорских Т-клеток (фиг. 69D). Контрольный биспецифичный активатор Т-клеток не индуцировал никакой цитотоксичности, в соответствии с тем, что Т-клетки оставались в инактивированном состоянии.

Пример 30.

Влияние биспецифичного активатора Т-клеток к FAP и EnAd-FAP -Бисп.актив.Т-кл. вирусов на клетки первичных образцов асцита злокачественного новообразования от разных пациентов.

В качестве продолжения исследований, описанных в примере 16, получали свежий первичный перитонеальный асцит злокачественного новообразования от других больных раком для изучения активности вируса EnAd с биспецифичным активатором Т-клеток kFAP.

Три образца пациентов, содержащие как опухолевые клетки $EpCAM^+$, так и фибробласты FAP+, размножали ex vivo, и смешанные (адгезивные) клеточные популяции культивировали с Т-клетками, полученными из МКПК, и немодифицированными или экспрессирующими биспецифичный активатор Т-клеток вирусами EnAd. Через 72 ч собирали общее количество клеток и определяли количество клеток FAP+ (фиг. 70A) и $EpCAM^+$ (фиг. 70B) с помощью проточной цитометрии. Кроме того, измеряли статус активации Т-клеток (по экспрессии CD25) (фиг. 70C). Инфицирование как EnAd-CMV-FAP Бисп.актив.Т-кл., так и EnAd-SA-FAP Бисп.актив.Т-кл. индуцировало активацию Т-клеток и деплецию FAP+ клеток во всех образцах пациентов, без значительного изменения уровней $EpCAM^+$ опухолевых клеток. Родительские EnAd или контрольные вирусы не вызывали наблюдаемой активации Т-клеток, при этом количества FAP+ клеток оставались сходными с неинфицированным контролем.

Важно, что эта деплеция в FAP+ фибробластах последовательно приводила к сильному снижению уровней иммуносупрессивного цитокина TGFβ, обнаруженного в супернатантах (фиг. 70D).

Во второй серии экспериментов были оценены суммарные (и неочищенные) клетки из пяти образцов биопсии пациентов для оценки активности эндогенных опухоль-ассоциированных Т-клеток в образцах. Клетки высевали в 50% асцитную жидкость и обрабатывали рекомбинантным контролем или белками биспецифичного активатора Т-клеток к FAP или вирусами EnAd или EnAd-биспецифичный активатор Т-клеток 100 вч/клетку. После 5 дней инкубации измеряли активацию Т-клеток (по экспрессии CD25) и остаточное количество клеток FAP+ с помощью проточной цитометрии (фиг. 71A и B). Во всех 3 образцах пациентов рекомбинантные биспецифичные активаторы Т-клеток к FAP и EnAd-CMV-FAP Бисп.актив.Т-кл. индуцировали сильную активацию Т-клеток, при этом активировалось до ~80% Т-клеток, полученных от пациентов, что вызывало заметную деплецию фибробластов FAP+. Интересно, что EnAd-SA-FAP-Бисп.актив.Т-кл. индуцировал экспрессию CD25 в 2/3 образцов без видимой активации или деплеции FAP+ клеток у пациента 1. Это, вероятно, обусловлено недостаточным присутствием опухолевых клеток для инфицирования вирусом и выработки белка биспецифичного активатора Т-клеток (опухолевые EpCAM+ клетки не были обнаружены в этом образце с помощью проточной цитометрии), что соответствует требованию наличия опухолевых клеток для экспрессии трансгена, управляемого MLP (SA) (это, вероятно, также объясняет отсутствие активации Т-клеток и деплеции FAP+ клеток вирусом EnAd-SA-FAP-Бисп.актив.Т-кл. в образце асцита пациента, показанном на фиг. 42-44). В совокупности эти данные показывают, что EnAd, экспрессирующий биспецифичный активатор Т-клеток к FAP, может, после инфицирования опухолевых клеток, воспроизводимо приводить к активации опухоль-ассоциированных Т-клеток для уничтожения эндогенных фибробластов.

В другом эксперименте было исследовано, можно ли повысить активность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP путем блокирования контрольной точки PD-1, используя образец биопсии пациента, в котором Т-клетки были на 73,6% PD-1-положительными, а FAP+ клетки были на 62,9% PDL1-положительными (фиг. 72A). Совместные культуры, аналогичные описанным выше, проводили в присутствии или в отсутствие очищенного блокирующего мышиного антитела IgG2b к PDL1 человека (BioLegend, клон 29E.2A3) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. Через 2 дня культивирования собирали все клетки и измеряли остаточные FAP+ клетки и активацию Т-клеток. Включение блокирующего анти-PDL1-антитела приводило к умеренному увеличению индукции CD25 (фиг. 72B) и двукратному увели-

чению выработки IFNγ (фиг. 72C) без изменения деплеции FAP+ клеток (фиг. 72D) с почти полным лизисом к дню 2 в любой ситуации.

Сообщалось, что опухоль-ассоциированные лимфоциты (TAL), выделенные из асцита пациента с раком яичника, имеют повышенную экспрессию PD-1 и нарушенные эффекторные функции, включая цитотоксичность и выработку IFNg. В соответствии с этим, экспрессия PD-1 была в 2 раза выше на клетках CD3+ от шести асцитных биоптатов больных раком, чем на мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) от трех здоровых доноров (фиг. 73A). Чтобы оценить функциональность Т-клеток в этих образцах биоптатов рака, клетки NHDF и неочищенные клетки МКПК или асцита (% CD3+ клеток для каждого из образцов показаны на фиг. 73B) совместно культивировали с контролем или FAP Бисп.актив.Т-кл.- содержащими супернатантами, собирали супернатанты через 5 дней и тестировали на IFNγ с помощью ИФА (фиг. 73C). Контрольный биспецифичный активатор Т-клеток не индуцировал IFNγ. Три образца асцитных клеток продуцировали IFNγ на уровне, аналогичном уровню образцов МКПК, в то время как три других показали ослабленный ответ на биспецифичный активатор Т-клеток к FAP. Далее мы исследовали способность этих Т-клеток индуцировать биспецифичный активатор Т-клеток-опосредованный лизис NHDF клеток. NHDF высевали, добавляли МКПК или асцитные клетки вместе с содержащими биспецифичный активатор Т-клеток супернатантами и отслеживали жизнеспособность клеток в культуре в режиме реального времени с использованием системы анализа цитотоксичности xCELLigence. Несмотря на вариабельность в выработке IFNγ, все образцы асцита индуцировали полную цитотоксичность клеток NHDF при добавлении с биспецифичным активатором Т-клеток к FAP, причем общая скорость лизиса, опосредованного биспецифичным активатором Т-клеток NHDF, была аналогична скорости, наблюдаемой при воздействии МКПК (фиг. 73D). Чтобы исследовать, может ли биспецифичный активатор Т-клеток к FAP опосредовать активацию Т-клеток в образцах экссудата злокачественного новообразования пациента (все в количестве 50%), Т-клетки МКПК активировали контрольными биспецифичным активатором Т-клеток или биспецифичным активатор Т-клеток к FEP в присутствии клеток NHDF или активировали анти-CD3/CD28 микросферами Dynabeads, либо в 50% нормальной сыворотке человека (NS), либо в других (бесклеточных) образцах экссудата злокачественного новообразования. В то время как в нормальной сыворотке 74% Т-клеток были активированы (дважды положительные как по CD25, так и по CD69) через 24 ч после стимуляции анти-CD3/CD28 микросферами, 3/5 тестируемых образцов асцитной жидкости значительно ослабляли активацию Т-клеток по сравнению с ответом в NS (нормальной сыворотке) (фиг. 74A). Однако, когда МКПК культивировали с NHDF и стимулировали с помощью биспецифичного активатора Т-клеток к FAP, заметного подавления активации Т-клеток в присутствии любой экссудатной жидкости не наблюдалось (фиг. 74B), демонстрируя, что биспецифичный активатор Т-клеток к FAP может преодолевать иммуносупрессивные механизмы, чтобы активировать Т-клетки.

Пример 31.

EnAd-FAP Бисп.актив.Т-кл.-опосредованный онколиз и стимуляция Т-клеток поляризуют CD11b+ TAM у пациентов с асцитом в направлении более активированного фенотипа.

Чтобы изучить, ассоциированы ли выработка цитокинов Th1, включая IFNγ, TNFα и IL-2, опосредованной биспецифичным активатором Т-клеток к FAP активацией Т-клеток, и последующее удаление фибробластов FAP+ (и ассоциированное снижение TGFβ1) с другими сдвигами в микроокружении опухоли от иммуносупрессивного и проонкогенного действия в направлении противоопухолевой активности, оценивали влияние на опухоль-ассоциированные макрофаги (TAM) в неразделенном образце асцитных клеток. Общую массу неочищенных асцитных клеток пациента высевали в 50% асцитной жидкости и обрабатывали свободным контролем или биспецифичным активатором Т-клеток к FAP или инфицировали EnAd-SA-контрольн.Бисп.актив.Т-кл. или EnAd-SA-FAP Бисп.актив.Т-кл. вирусом (100 вч/клетку). Параллельно некоторые клетки обрабатывали IFNγ, чтобы индуцировать активированный фенотип миелоидных клеток CD11b. После 3 дней инкубации сначала определяли статус активации Т-клеток; измеряли CD25+ клетки с помощью проточной цитометрии и секрецию IFNγ - с помощью ИФА.

Обработка биспецифичным активатором Т-клеток к FAP и EnAd-SA-FAP Бисп.актив.Т-кл. привела к превращению приблизительно 60% CD3+ Т-клеток в CD25+ (фиг. 75A) и большим количествам IFNγ в супернатантах культуры (фиг. 75B). Никакого увеличения по сравнению с фоном для контрольного биспецифичного активатора Т-клеток или контрольного вируса в отношении экспрессии CD25 или IFNγ не наблюдалось. Чтобы оценить поляризацию TAM, уровни экспрессии CD64 и CD86 (M1 или "активированные" маркеры макрофагов) и CD206 и CD163 (маркеры M2 или TAM) измеряли на клетках CD11b+ методом проточной цитометрии (фиг. 75C). Обработка свободным биспецифичным активатором Т-клеток к FAP или EnAd, экспрессирующим FAP биспецифичный активатор Т-клеток, индуцирует более активированный фенотип, что проявляется значительным увеличением экспрессии CD64 и сильным снижением CD206 и CD163 - аналогично тому, что наблюдается, когда IFNγ вводится в отмеренном количестве в культуры. В то время как в этом эксперименте обработка свободным биспецифичным активатором Т-клеток к FAP или контрольным вирусом не вызывала явного изменения CD86 выше фонового уровня, EnAd, экспрессирующий биспецифичный активатор Т-клеток к FAP, индуцировал значительное

увеличение экспрессии CD86, указывая на то, что инфицирование вирусом EnAd и активность биспецифичного активатора Т-клеток к FAP могут синергически активировать первичные миелоидные клетки в супрессивной опухолевой микросреде, такой как образцы асцетической жидкости злокачественных новообразований, протестированные в настоящем изобретении. В этом исследовании обработка IFNγ индуцировала умеренное снижение CD86, что указывает на то, что сильное повышение CD86, наблюдаемое EnAd-SA-FAP Бисп.актив.Т-кл., может происходить через IFNγ-независимый механизм.

Пример 32.

EnAd-FAP Бисп.актив.Т-кл. активирует инфильтрирующие опухоль лимфоциты и индуцирует цитотоксичность в биоптатах солидных опухолей предстательной железы ex vivo.

Культуры срезов тканей представляют собой одну из наиболее реалистичных доклинических моделей различных тканей, органов и опухолей. Чтобы оценить активность вирусов, экспрессирующих биспецифичный активатор Т-клеток к FAP, в этой высоко клинически значимой ситуации, были изучены несколько парных пункционных биоптатов злокачественной и доброкачественной ткани простаты из резецированных простат человека. При первоначальном скрининге было воспроизводимо показано, что ткань предстательной железы имеет кольцевые кольца опухолевых EpCAM+клеток (фиг. 76A) в промежутках между большими областями стромы, содержащими рассеянные CD8 Т-клетки (фиг. 76B). Окрашивание FAP было обнаружено на фибробластах, прилегающих к областям опухоли (фиг. 76C).

Сердцевины органов нарезали вибратомом до толщины 300 мкм, и готовили культуры срезов в присутствии вируса ($1{,}5\times10^9$ вч/срез) или оставляли неинфицированными. Через 7 дней препараты фиксировали, заключали в парафин, делали срезы и оценивали состояние активации Т-клеток иммуногистохимическим методом (IHC) путем окрашивания на экспрессию CD25 (фиг. 76D). Только образцы, получавшие EnAd-CMV-FAP Бисп.актив.Т-кл. или EnAd-SA-FAP Бисп.актив.Т-кл., показали активацию инфильтрирующих опухоль Т-клеток, проявляющуюся сильным окрашиванием CD25. Ни необработанные, ни обработанные контрольным вирусом образцы не имели детектируемых CD25-положительных клеток. Супернатанты из этих культур срезов, взятые через 4 и 7 дней после инфицирования, тестировали на IFNγ и IL-2 с помощью ИФА, причем повышение IFNγ обнаруживали у злокачественных, но не доброкачественных культур срезов простаты, инфицированных вирусом биспецифичный активатор Т-клеток к FAP (фиг. 76E), а повышение IL-2 обнаруживали в культурах с вирусом EnAd-SA-FAP Бисп.актив.Т-кл. (фиг. 76F). EnAd-SA-FAP Бисп.актив.Т-кл. индуцировал более высокие количества IFNγ, которые становились обнаружимыми раньше, чем вирус, несущий CMV-управляемый биспецифичный активатор Т-клеток к FAP.

Пример 33. Вирусы EnAd, экспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к EpCAM или FAP.

Было создано пять вирусов (NG-611, NG-612, NG-613, NG-614, NG-617), которые кодируют единственный биспецифичный активатор Т-клеток (табл. 8).

Таблица 8

ID вируса	**Трансгенная кассета**
NG-611 (SEQ ID NO: 96)	SSA[1]-EpCamБисп.актив.Т-кл.[2]-His[3]-PA[4]
NG-612 (SEQ ID NO: 97)	SSA[1]-FAPБисп.актив.Т-кл.[5]-His[3]-PA[4]
NG-613 (SEQ ID NO: 98)	SA[6]-FAPБисп.актив.Т-кл.[5]-His[3]-PA[4]
NG-614 (SEQ ID NO: 99)	SA[6]-FAPБисп.актив.Т-кл.[7]-His[3]-PA[4]
NG-617 (SEQ ID NO: 100)	SSA[1]-FAPБисп.актив.Т-кл.[5]-PA[4]

[1] SEQ ID NO: 55; [2] SEQ ID NO: 83; [3] SEQ ID NO: 84; [4] SEQ ID NO: 65; [5] SEQ ID NO: 85; [6] SEQ ID NO: 86; [7] SEQ ID NO: 87.

В каждой трансгенной кассете кДНК, кодирующая биспецифичный активатор Т-клеток, была фланкирована на 5'-конце либо короткой последовательностью акцептора сплайсинга (SSA, SEQ ID NO: 55), либо более длинной последовательностью акцептора сплайсинга (SA, SEQ ID NO: 86). На 3'-конце биспецифичного активатора Т-клеток последовательность позднего поли(A) SV40 (PA, SEQ ID NO: 65) была закодирована с предшествующей либо гистидиновой меткой (HIS, SEQ ID NO: 41), либо с отсутствующей меткой. В вирусах NG-611, NG-612, NG-613 и NG-617 в анти-CD3 части молекулы биспецифичного активатора Т-клеток был использован одноцепочечный вариант мышиного моноклонального античеловеческого CD3ε антитела OKT3.

Получение вируса.

Использовали плазмиду pEnAd2.4 для получения плазмид pNG-611, pNG-612, pNG-613, pNG-614 и pNG-617 путем прямой инсерции синтезированных трансгенных кассет (SEQ ID NO: 88-92 соответственно). Трансгенная кассета pNG-611 кодирует EpCam-нацеленный биспецифичный активатор Т-клеток (SEQ ID NO: 93), трансгенные кассеты pNG-612, pNG-613 и pNG-617 кодируют FAP- нацеленный биспецифичный активатор Т-клеток (SEQ ID NO: 94), и трансгенная кассета pNG-614 кодирует FAP-нацеленный биспецифичный активатор Т-клеток с SEQ ID NO: 95. Схемы трансгенных кассет показаны

на фиг. 77A-C. Конструирование плазмидной ДНК было подтверждено рестрикционным анализом и секвенированием ДНК.

Плазмиды pNG-611, pNG-612, pNG-613, pNG-614 и pNG-617 были линеаризованы рестрикционным расщеплением с помощью фермента AscI для получения геномов вируса. Вирусы были амплифицированы и очищены в соответствии с методами, приведенными ниже.

Расщепленную ДНК очищали экстракцией фенолом/хлороформом и осаждали в течение 16 ч, при -20°C в 300 мкл этанола >95% с чистотой для молекулярной биологии и 10 мкл 3 М ацетата натрия. Осажденную ДНК осаждали центрифугированием при 14000 об/мин, в течение 5 мин и промывали в 500 мкл 70% этанола перед повторным центрифугированием, 14000 об/мин, 5 мин. Осадок чистой ДНК сушили на воздухе, ресуспендировали в 500 мкл OptiMEM, содержащей 15 мкл реагента для трансфекции липофектамина, и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем смесь для трансфекции добавляли по каплям в колбу T-25, содержащую клетки 293, выращенные до конфлюентности 70%. После инкубации клеток со смесью для трансфекции в течение 2 ч при 37°C, 5% CO_2, в клетки добавляли 4 мл клеточной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы с глютамином, дополненным 2% FBS) и колбы инкубировали при 37°C, 5% CO_2.

Трансфицированные клетки 293 контролировали каждые 24 ч и добавляли дополнительно среды каждые 48-72 ч. Получение вируса контролировали путем наблюдения значительного цитопатического эффекта (CPE) в клеточном монослое. Как только наблюдался интенсивный CPE, вирус собирали из клеток 293 с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. Собранные вирусы использовали для повторного заражения клеток 293 с целью амплификации вирусного материала. Получение жизнеспособного вируса во время амплификации подтверждали наблюдением значительного CPE в клеточном монослое. После наблюдения CPE вирус собирали из клеток 293 с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. Амплифицированный вирусный материал использовали для дальнейшей амплификации, затем вирусы очищали двойным бэндингом с хлоридом цезия для получения очищенного вирусного материала.

Активность вируса, оцененная с помощью кПЦР.

Клетки A549, либо инфицированные в течение 72 ч вирусами 1ppc NG-611, NG-612, NG-617, enadenotucirev, либо оставленные неинфицированными, использовали для количественного определения вирусной ДНК с помощью кПЦР. Супернатанты клеток собирали и осветляли центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин. ДНК экстрагировали из 45 мкл супернатанта с использованием набора Qiagen DNeasy в соответствии с протоколом производителя. Для стандартной кривой использовали частицы вируса enadenotucirev ($2,5\times10^{10}$-$2,5\times10^{5}$ вч), также полученные и экстрагированные с помощью набора DNeasy. Каждый экстрагированный образец или стандарт анализировали с помощью кПЦР с использованием специфичного для данного вирусного гена праймера-зонда для раннего гена E3.

Количественное определение количества обнаруженных вирусных геномов на клетку продемонстрировало, что NG-611, NG-612 и NG-617 показали значительную репликацию генома в клеточных линиях A549 (фиг. 77D). Этот результат был сходным для всех протестированных вирусов, включая родительский вирус enadenotucirev, указывая на то, что включение трансгена биспецифичного активатора Т-клеток не влияет на репликативную активность вируса. В неинфицированных клетках вирусных геномов обнаружено не было (данные не показаны).

Активация и дегрануляция Т-клеток, опосредованная вирусами, экспрессирующими биспецифичный активатор Т-клеток.

Инфицирование клеток карциномы.

Клетки A549 высевали в 24-луночные планшеты при плотности $2,5\times10^{5}$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки инфицировали вирусами 1ppc NG-611, NG-612, enadenotucirev или оставляли неинфицированными. Через 24, 48 или 72 ч после инфицирования супернатанты собирали из клеток, очищали центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин и быстро замораживали.

Анализ Т-клеток.

FAP-экспрессирующие клеточные линии фибробластов легкого MRC-5 или EpCam-экспрессирующие клетки карциномы яичника SKOV3 высевали в 48-луночные планшеты при плотностях $5,7\times10^{4}$ клеток/лунку и $1,2\times10^{5}$ клеток/лунку соответственно. Планшеты инкубировали в течение 4 ч, 37°C, 5% CO_2, затем среду заменяли 150 мкл/лунку оттаявшего супернатанта, собранного с планшетов A549. Затем очищенные CD3 Т-клетки, выделенные из донорских МКПК человека, также добавляли в планшеты, чтобы получить соотношение Т-клеток к MRC-5 или SKOV3 2 к 1. Совместные культуры инкубировали в течение 16 ч, 37°C, 5% CO_2, затем собирали клеточные супернатанты для анализа ИФА и собирали Т-клетки для анализа проточной цитометрией. Культуральные среды, содержащие неадгезивные клетки, удаляли из лунок для совместного культивирования и центрифугировали (300×g). Супернатант осторожно удаляли, разводили 1 в 2 с помощью PBS 5% BSA и хранили для анализа ИФА. Монослои адгезивных клеток промывали один раз PBS и затем отделяли с помощью трипсина. Трипсин инактивировали с помощью среды RPMI с 10% FBS, и клетки добавляли к клеточным осадкам, которые ранее

были собраны из культуральных супернатантов. Клетки центрифугировали (300×g), супернатант отбрасывали и осадок клеток промывали в 200 мкл PBS. Клетки снова центрифугировали, затем ресуспендировали в 50 мкл PBS-содержащей Live/Dead Aqua (Life tech) в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки промывали один раз в буфере FACs перед окрашиванием панелями непосредственно конъюгированных антител: анти-CD3, конъюгированное с AF700; анти-CD25, конъюгированное с BV421; анти-HLA-DR, конъюгированное с PE/CY5; анти-CD40b, конъюгированное с BV605; анти-CD69, конъюгированное с PE, и анти-CD107a, конъюгированное с FITC. Образец клеток из каждой ситуации совместного культивирования также окрашивали соответствующими изотипическими контрольными антителами. Все окрашивание проводили в буфере FACs в общем объеме 50 мкл/лунку в течение 15 мин, 4°C. Затем клетки дважды промывали буфером FACs (200 мкл), затем ресуспендировали в 200 мкл буфера FACs и анализировали проточной цитометрией (Attune).

Повышенная экспрессия маркеров активации Т-клеток.

Анализ проточной цитометрией активации Т-клеток оценивали по экспрессии маркеров активации Т-клеток CD25, CD69, HLA-DR и CD40L или маркера дегрануляции Т-клеток, CD107a на живых одиночных клетках. Эти данные показали, что при совместном культивировании с EpCam+ клетками SKOV3 количество Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD69, HLA-DR, CD40L или CD107a клеточной поверхности, значительно повышалось при добавлении в клетки супернатантов NG-611 по сравнению с NG-612, enadenotucirev или необработанными контрольными супернатантами (фиг. 78). Для всех этих маркеров через 24 ч супернатанты из инфицированных клеток A549 стимулировали небольшую активацию Т-клеток, однако через 48 ч после инфицирования супернатанты стимулировали значительную активацию Т-клеток по всем маркерам. Это также имело место через 72 ч после инфицирования.

При совместном культивировании с клетками FAP+ MRC-5 количество Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD69, HLA-DR, CD40L или CD107a клеточной поверхности, значительно увеличивалось при добавлении супернатантов NG-612 в клетки по сравнению с супернатантами NG-611, enadenotucirev или необработанными контрольными супернатантами (фиг. 79). Некоторую активацию Т-клеток можно также было наблюдать с вирусом NG-611, что, вероятно, связано с низкой, но обнаружимой экспрессией EpCam (~5%) на клеточных линиях MRC-5, захватывающих биспецифичный активатор Т-клеток к EpCam, экспрессируемый вирусом NG-611 (фиг. 80). Для всех этих маркеров небольшая активация Т-клеток стимулировалась супернатантами из клеток A549, инфицированных в течение 24 ч, однако, через 48 ч после инфицирования супернатанты стимулировали значительную активацию Т-клеток уже по всем маркерам. Маркеры CD25 и CD69 были также активированы после инкубации с супернатантами, собранными через 72 ч после инфицирования, однако маркеры активации, HLA-DR, CD40L и CD107a были обнаружены на более низких уровнях с супернатантами, собранными через 72 ч после инфицирования, чем через 48 ч после инфицирования. Это может быть связано с высоким уровнем биспецифичного активатора Т-клеток, присутствующим на этой более поздней стадии инфицирования, ведущей к быстрой и мощной активации Т-клеток, что означает, что эффекторные функции необходимо измерять в моменты времени ранее чем через 16 ч после инкубации с супернатантами.

Для выявления экспрессии IFNγ супернатанты совместного культивирования разводили в буфере для анализа 5% BSA/PBS (в диапазоне от 1:10 до 1:1000) и выполняли ИФА с использованием набора Human IFN gamma Quantikine ИФА (R&D systems) согласно протоколу производителя. Концентрацию секретируемого IFNγ определяли интерполяцией по стандартной кривой. Экспрессия IFNγ может быть обнаружена только в супернатантах совместных культур с использованием NG-611 на клетках SKOV3 (фиг. 81A) или NG-611, NG-612 на клетках MRC-5 (фиг. 81B).

Пример 34: Иммунная активация и противоопухолевая эффективность вирусов, экспрессирующих биспецифичный активатор Т-клеток in vivo.

Гуманизированные гематопоэтические стволовые клетки CD34+ NSG-мышей (Jackson Labs) имплантировали с опухолевыми клетками HCT116 подкожно на обоих боках животных через 18 недель после приживления. Как только опухоли достигли 80-400 мм^3, мышей сгруппировали так, чтобы у каждой группы лечения было эквивалентное распределение объемов опухолей, по 7 мышей на группу. Мышам внутривенно вводили физиологический раствор, enadenotucirev или NG-611 по 5×10^9 частиц на инъекцию, 2 инъекции на опухоль. Обработаны были опухоли на обоих боках. Измерения объема опухоли 3-4 раза в неделю показали, что обработка NG-611 приводила к значительному противоопухолевому ответу вплоть до 20 дней после введения дозы по сравнению с enadenotucirev или необработанным контролем (фиг. 82a). Через 20 дней после введения дозы по одной опухоли от 4 мышей в каждой группе обрабатывали для анализа проточной цитометрией, а оставшиеся опухоли замораживали на сухом льду.

Проточная цитометрия.

Образцы опухоли механически дезагрегировали сразу после резекции в небольшом объеме среды RPMI. Затем дезагрегированные опухоли пропускали через клеточный фильтр 70 мкм и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Клеточные осадки ресуспендировали в 100 мкл PBS-содержащей Live/Dead Aqua (Life tech), в течение 15 мин на льду. Клетки промывали один раз в буфере для FACs (5% BSA PBS) перед окрашиванием панелью антител с непосредственным конъюгированием: анти-CD8

(RPA-T8, AF700); анти-CD4 (RPA-T4, PE); анти-CD45 (2D1, APC-Fire 750); анти-CD3 (OKT3, PerCP-Cy5.5); анти-CD25 (M-A251, PE-Dazzle 594); анти-CD69 (FN50, APC); анти-HLA-DR (L243, BV605); анти-CD107a (H4A3, FITC). Пул суспензий опухолевых клеток также окрашивали соответствующими контрольными изотипическими антителами. Все окрашивание проводили в буфере FACs в общем объеме 50 мкл/лунку в течение 20 мин при 4°C. Клетки трижды промывали буфером FACs (200 мкл) перед ресуспендированием в 200 мкл буфера FACs и анализом проточной цитометрией (Attune). Анализ FACs показал, что соотношение Т-клеток CD8 к CD4 в опухоли было значительно увеличено в опухолях, обработанных NG-611, по сравнению с контрольными, обработанными или не обработанными вирусом enadenotucirev (фиг. 82b).

Пример 35. Вирусы EnAd, коэкспрессирующие биспецифичный активатор Т-клеток к FAP, и иммуномодулирующие цитокины и хемокины.

Было создано три вируса (NG-615, NG-640 и NG-641), которые кодировали биспецифичный активатор Т-клеток к FAP и иммуномодулирующие белки (табл. 9).

Таблица 9

ID вируса	Трансгенная кассета
NG-615 (SEQ ID NO: 101)	SSA[1]-FAPБисп.актив.Т-кл.[2]-E2A[3]-Flt3L[4]-P2A[5]-MIP1α[6]-T2A[7]-IFNα[8]-PA[9]
NG-640 (SEQ ID NO: 102)	SSA[1]-FAPБисп.актив.Т-кл.[2]-P2A[5]-CXCL10[10]-T2A[7]-CXCL9[11]-PA[6]
NG-641 (SEQ ID NO: 103)	SSA[1]-FAPБисп.актив.Т-кл.[5]-P2A[5]-CXCL10[10]-T2A[7]-CXCL9[11]-E2A[3]-IFNα[8]-PA[6]
NG-615 (SEQ ID NO: 298)	SA[12]-FAPБисп.актив.Т-кл.[2]-E2A[3]-Flt3L[4]-P2A[5]-MIP1α[6]-T2A[7]-IFNα[8]-PA[9]

[1] SEQ ID NO: 55; [2] SEQ ID NO: 87; [3] SEQ ID NO: 63; [4] SEQ ID NO: 105; [5] SEQ ID NO: 61; [6] SEQ ID NO: 107; [7] SEQ ID NO: 64; [8] SEQ ID NO: 109; [9] SEQ ID NO: 65; [10] SEQ ID NO: 110; [11] SEQ ID NO: 111; [12] SEQ ID NO: 86.

Получение вируса.

Использовали плазмиду pEnAd2.4 для получения плазмид pNG-615, pNG-616, pNG-640 и pNG-641 путем прямой инсерции синтезированных трансгенных кассет (SEQ ID NO: 112-114, соответственно). NG-615 и NG-616 содержат четыре трансгена, кодирующих FAP-нацеленный биспецифичный активатор Т-клеток (SEQ ID NO: 94), Flt3L (SEQ ID NO: 115), MIP1α SEQ ID NO: 116) и IFNα (SEQ ID NO: 117). NG-640 и NG-641 кодируют FAP-нацеленный биспецифичный активатор Т-клеток (SEQ ID NO: 94), CXCL9 (SEQ ID NO: 118) и CXCL10 (SEQ ID NO: 119), NG-641 также содержит четвертый трансген, кодирующий IFNα (SEQ ID NO: 117). Схемы трансгенных кассет показаны на фиг. 83A-C. Конструкция плазмидной ДНК была подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием ДНК.

Плазмиды pNG-615, pNG-616, pNG-640 и pNG-641 были линеаризованы рестрикционным расщеплением ферментом AscI для получения геномов вируса. Вирусы амплифицировали и очищали в соответствии со способами, подробно описанными в примере 33.

Активность вируса, оцененная с помощью кПЦР и трансгенного ИФА.

Инфицирование клеток карциномы.

Клетки A549, инфицированные в течение 72 ч в количестве 1 ppc вирусами NG-615, enadenotucirev или оставленные неинфицированными, использовали для количественного определения вирусной ДНК с помощью кПЦР и анализа экспрессии трансгена с помощью ИФА. Супернатанты клеток собирали и осветляли центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин. Затем 45 мкл супернатанта использовали для анализа ДНК, а оставшийся супернатант использовали для ИФА.

кПЦР.

ДНК экстрагировали из образца супернатанта с использованием набора Qiagen DNeasy в соответствии с протоколом производителя. Для стандартной кривой использовали частицы вируса enadenotucirev ($2{,}5\times10^{10}$-$2{,}5\times10^{5}$ вч), также полученные и экстрагированные с помощью набора DNeasy. Каждый экстрагированный образец или стандарт анализировали с помощью кПЦР с использованием специфичного для данного вирусного гена праймера-зонда для раннего гена E3. Количественное определение количества обнаруженных вирусных геномов на клетку продемонстрировало, что NG-615 демонстрирует значительную репликацию генома в клеточных линиях A549 на уровне, сходном с уровнем родительского вируса enadenotucirev (фиг. 84). Эти данные указывают на то, что включение биспецифичного активатора Т-клеток и трех иммуномодулирующих трансгенов не оказывает значительного влияния на репликативную активность вируса. В неинфицированных клетках вирусных геномов обнаружено не было.

ИФА.

ИФА для IFNα проводили с использованием набора Verikine Human IFNα (Pbl assay science), ИФА для MIP1α проводили с использованием набора Human CCL3 Quantikine ИФА (R & D systems), и ИФА

для Flt3L проводили с использованием набора Flt3L human ИФА (Abcam).

Все анализы проводили в соответствии с протоколом производителя.

Концентрации секретируемых IFNα, MIPα или FLt3L определяли путем интерполяции по стандартным кривым. Экспрессию IFNα, MIP1α и Flt3L можно было обнаружить в клеточном супернатанте NG-615, но не enadenotucirev или необработанных контрольных клеток (фиг. 85).

Активация и дегрануляция Т-клеток, опосредованная вирусами, экспрессирующими биспецифичный активатор Т-клеток.

Инфицирование клеток карциномы.

Клетки A549 высевали в 24-луночные планшеты при плотности $2,5\times10^5$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки инфицировали вирусами 1ppc NG-612, NG-615, enadenotucirev или оставляли неинфицированными. Через 24, 48 или 72 ч после инфицирования супернатанты собирали из клеток, очищали центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин и быстро замораживали.

Анализ Т-клеток.

FAP-экспрессирующие клеточные линии фибробластов легкого MRC-5 высевали в 48-луночные планшеты при плотностях $5,7\times10^4$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 ч, 37°C, 5% CO_2, затем среду заменяли 150 мкл/лунку размороженного супернатанта, собранного с планшетов A549. Затем очищенные CD3 Т-клетки, выделенные из доноров МКПК человека, также добавляли в планшеты, чтобы получить соотношение Т-клеток к MRC-5 2 к 1. Совместные культуры инкубировали в течение 16 ч, 37°C, 5% CO_2, затем собирали клеточные супернатанты для анализа ИФА и собирали Т-клетки для анализа проточной цитометрией в соответствии со способами, описанными в примере 29.

Повышенная экспрессия маркеров активации Т-клеток.

Анализ проточной цитометрией активации Т-клеток оценивали по экспрессии маркеров активации Т-клеток CD25, CD69, HLA-DR и CD40L или маркера дегрануляции Т-клеток, CD107a на живых, CD3+, одиночных клетках. Эти данные показали, что при совместном культивировании с FAP+ клетками MRC-5 количество Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD69, HLA-DR, CD40L или CD107a значительно повышалось при добавлении в клетки супернатантов NG-615 или 612 по сравнению с enadenotucirev или необработанными контрольными супернатантами (фиг. 86). Секреция стимулирующего цитокина IFNγ

Для выявления экспрессии IFNγ супернатанты совместного культивирования разбавляли в буфере для анализа 5%BSA/PBS (в диапазоне от 1:10 до 1:1000) и проводили ИФА с использованием набора Human IFN gamma Quantikine (RandD Systems) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию секретируемого IFNγ определяли интерполяцией по стандартной кривой. Экспрессию IFNγ можно было обнаружить только в супернатантах совместных культур с использованием супернатантов A549, инфицированных NG-612 или NG-615 (фиг. 87).

Пример 36. Вирус EnAd, совместно экспрессирующий биспецифичный активатор Т-клеток, нацеленный на FAP, и биспецифичный активатор Т-клеток, нацеленный на EpCam.

Был создан вирус NG-618, который кодировал две молекулы биспецифичного активатора Т-клеток, одну нацеленную на EpCam (биспецифичный активатор Т-клеток к EpCam) и одну нацеленную на FAP (биспецифичный активатор Т-клеток к FAP) (табл. 10).

Таблица 10

ID вируса	**Трансгенная кассета**
NG-618 (SEQ ID NO: 120)	SSA[1]-EpCAMБисп.актив.Т-кл.[2]-P2A[3]-FAPБисп.актив.Т-кл.[4]-PA[5]

[1] SEQ ID NO: 55; [2] SEQ ID NO: 121; [3] SEQ ID NO: 106; [4] SEQ ID NO: 122; [5] SEQ ID NO: 65.

Получение вируса.

Использовали плазмиду pEnAd2.4 для получения плазмиды pNG-618 путем прямой инсерции синтезированных трансгенных кассет (SEQ ID NO: 123). Вирус NG-618 содержит два трансгена, кодирующих биспецифичный активатор Т-клеток, нацеленный на EpCat (SEQ ID NO: 93), и биспецифичный активатор Т-клеток, нацеленный на FAP (SEQ ID NO: 95). Схема трансгенной кассеты показана на фиг. 88. Конструирование плазмидной ДНК было подтверждено рестрикционным анализом и секвенированием ДНК.

Плазмида pNG-618 была линеаризована рестрикционным расщеплением ферментом AscI для получения геномов вируса. Вирусы амплифицировали и очищали в соответствии со способами, подробно описанными в примере 33.

Активация и дегрануляция Т-клеток, опосредованная вирусами, экспрессирующими биспецифичный активатор Т-клеток.

Инфицирование клеток карциномы.

Клетки A549 высевали в 24-луночные планшеты при плотности $1,2\times10^6$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клетки инфицировали вирусами NG-611, NG-612, NG-

618, enadenotucirev или оставляли неинфицированными. Через 72 ч после инфицирования супернатанты собирали из клеток, очищали центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин.

Анализ Т-клеток.

FAP-экспрессирующие клеточные линии легких фибробластов MRC-5 и EpCam-экспрессирующие клетки A549 высевали в 24-луночные планшеты с плотностью $1,5\times10^5$ клеток/лунку. Клетки MRC-5 и A549 также смешивали в соотношении 1:1 и высевали в 24-луночные планшеты с общей плотностью $1,5\times10^5$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 ч, 37°C, 5% CO_2, затем среду заменяли 300 мкл/лунку размороженного супернатанта, собранного с планшетов A549. Затем в планшеты также добавляли очищенные CD3 Т-клетки, выделенные из донорских МКПК человека, чтобы получить соотношение Т-клеток к клеткам MRC-5 или SKOV3 2 к 1.

Совместные культуры.

инкубировали в течение 16 ч, 37°C, 5% CO_2, затем клеточные супернатанты собирали для анализа ИФА, а Т-клетки, MRC-5 и A549 собирали для анализа проточной цитометрией.

Детектирование FAP и EpCat на клетках MRC-5 или SKOV.

Анализ проточной цитометрией обнаружимых FAP или EpCam на поверхности клеток MRC-5 или SKOV, соответственно, оценивали путем однократной промывки клеток в буфере FACs перед окрашиванием панелями антител с прямым конъюгированием: анти-FAP, конъюгированное с AF647; анти-EpCam конъюгированное с PE. Анализ показал, что экспрессия FAP больше не выявлялась на клетках MRC-5, которые были инкубированы с супернатантом из клеток, инфицированных вирусом, экспрессирующим FAP-нацеленный биспецифичный активатор Т-клеток, NG-618, но была обнаружена на >80% клеток, инкубированных с супернатантами, от клеток, обработанных EnAd, или необработанных клеток (фиг. 89A). Эти данные указывают на то, что FAP-нацеленный биспецифичный активатор Т-клеток, продуцируемый вирусами NG-618, связывается с его мишенью FAP на клетках MRC-5, препятствуя связыванию анти-FAP антитела. Живые, большие, одиночные клетки SKOV были оценены на обнаружимость экспрессии EpCam. Экспрессия EpCam была обнаружимой лишь на низких уровнях в клетках SKOV, которые были инкубированы с супернатантами из клеток, инфицированных вирусом, экспрессирующим EpCam-нацеленный биспецифичный активатор Т-клеток, NG-618 (17% клеток), но была обнаружена на >40% клеток, инкубированных с супернатантами. из клеток, обработанных EnAd или необработанных клеток (фиг. 89B). В совокупности эти данные показывают, что NG-618 продуцирует молекулы биспецифичного активатора Т-клеток, которые связываются с белками-мишенями EpCam и FAP.

Повышенная экспрессия маркеров активации Т-клеток.

Анализ методом проточной цитометрией активации Т-клеток оценивали по экспрессии маркеров активации Т-клеток CD25, CD69, HLA-DR и CD40L или маркера дегрануляции Т-клеток CD107a, на живых, CD3+, одиночных клетках. Эти данные показали, что при совместном культивировании с FAP+ клетками MRC-5 количество Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD40L или CD107a, значительно увеличивалось, когда в клетки добавляли супернатанты NG-618, по сравнению с enadenotucirev или необработанными контрольными супернатантами (фиг. 90). Количество Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD40L или CD107a, также было значительно увеличено, когда супернатанты NG-618 были добавлены к EpCam+ клеткам SKOV3 по сравнению с enadenotucirev или необработанными контрольными супернатантами (фиг. 91). Эти данные показывают, что обе молекулы биспецифичного активатора Т-клеток, экспрессируемые вирусом NG-618, являются функциональными с точки зрения индукции активации Т-клеток.

Анализ опосредованного Т-клетками таргетного уничтожения клеток (MRC-5 и SKOV.

При анализе проточной цитометрией жизнеспособность клеток MRC-5 и SKOV оценивали путем окрашивания клеток в 50 мкл PBS, содержащего Live/Dead Aqua (Life tech), в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки промывали один раз в буфере FACs перед окрашиванием панелями непосредственно конъюгированных антител: анти-FAP, конъюгированных с AF647; анти-EpCam, конъюгированных с PE. Жизнеспособность клеток MRC-5 и SKOV была значительно снижена после инкубации с образцами супернатанта NG-618, тогда в супернатантах enadenotucirev или необработанных контрольных супернатантах значительной гибели клеток обнаружено не было, фиг. 92. Эти данные демонстрируют функциональную способность ко-экспрессированных NG-618 биспецифичных активаторов Т-клеток, нацеленных на FAP и EpCam, индуцировать опосредованное Т-клетками уничтожение клеток-мишеней.

Последовательности

SEQ ID NO: 25: FAP Бисп.актив.Т-кл.-P2A-RFP (*КУРСИВ* = лидерная, **ЖИРНЫЙ** = сайт расщепления фурином, ПОДЧЕРКИВАНИЕ = последовательность P2A, нижний регистр = RFP)

*MGWSCIILFLVATATGVHS*DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPKLL
IFWASTRESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG
GSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPNYNQKFKGRV
TITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSDVQLVQSGAE
VKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAY
MELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGGADDIVLTQSPATLSLSP
GERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYY
CQQWSSNPLTFGGGTKVEIKHHHHHHHHHHH**RRKRGSG**ATNFSLLKQAGDVEENPGPmselikenmhmkly
megtvnnhhfkctsegegkpyegtqtmkikvveggplpfafdilatsfmygskafinhtqgipdffkqsfpegftwerittyedggvltat
qdtsfqngciiynvkingvnfpsngpvmqkktrgweantemlypadgglrghsqmalklvgggylhcsfkttyrskkpaknlkmpgf
hfvdhrlerikeadketyveqhemavakycdlpsklghr

SEQ ID NO: 26: Контроль (анти-FHA) Бисп.актив.Т-кл.-P2A-RFP (*КУРСИВ* = лидерная, **ЖИРНЫЙ** = сайт расщепления фурином, ПОДЧЕРКИВАНИЕ = последовательность P2A, нижний регистр = RFP)

*MGWSCIILFLVATATGVHS*ELDIVMTQAPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYNYLHWYQQKPGQPPKLLI
YLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPLTFGAGTKLEIKSSGGGGSGGGGGGS
SRSSLEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTGYTMHWVRQSHGKSLEWIGGINPKNGGIIYNQKFQGK
ATLTVDKSSSTASMELRSLTSDDSAVYYCARRVYDDYPYYYAMDYWGQGTSVTVSSAKTTPPSVTSGGGGS
DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTI
TTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGGADDIVL
TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTIN
SLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKHHHHHHHHHHH**RRKRGSG**ATNFSLLKQAGDVEENPGPm
selikenmhmklymegtvnnhhfkctsegegkpyegtqtmkikvveggplpfafdilatsfmygskafinhtqgipdffkqsfpegftw
erittyedggvltatqdtsfqngciiynvkingvnfpsngpvmqkktrgweantemlypadgglrghsqmalklvgggylhcsfkttyrs
kkpaknlkmpgfhfvdhrlerikeadketyveqhemavakycdlpsklghr

SEQ ID NO: 33: последовательность акцептора сплайсинга

CAGG

SEQ ID NO: 55 короткая последовательность ДНК акцептора сплайсинга (SSA) (нулевая последовательность)

CAGG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Онколитический аденовирус, содержащий последовательность формулы (I)

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_A\text{-}B_2\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad (I)$$

где B_1 представляет собой связь или содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

B_A содержит -E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или содержит E3;

B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или и то, и другое;

B_B содержит L5;

B_Y представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или и то, и другое;

B_3 представляет собой связь или содержит E4;

причем указанный аденовирус в положении B_Y кодирует первый биспецифичный активатор Т-клеток, который не связывается с антигеном опухоли, содержащий по меньшей мере два связывающих домена, при этом

один из указанных связывающих доменов является специфичным к компоненту комплекса Т-клеточного рецептора (TCR), и

один из указанных связывающих доменов указанного биспецифичного активатора Т-клеток является специфичным к антигену, который присутствует в строме опухоли, выбранному из белка активации фибробластов (FAP), TREM1, IGFBP7, FSP-1, рецептора тромбоцитарного фактора роста-α (PDGFR-α), рецептора тромбоцитарного фактора роста-β (PDGFR-β) и виментина; и

причем указанный аденовирус представляет собой Enadenotucirev (EnAd) или аденовирус серотипа 11 (Ad11).

2. Онколитический аденовирус по п.1, отличающийся тем, что указанный компонент комплекса TCR представляет собой CD3, например CD3ε, CD3γ или CD3δ, в частности CD3ε.

3. Онколитический аденовирус по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что указанный кодируемый биспецифичный активатор Т-клеток содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности, и VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности.

4. Онколитический аденовирус по п.3, отличающийся тем, что указанный кодируемый биспецифичный активатор Т-клеток содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности.

5. Онколитический аденовирус по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный антиген, который присутствует в строме опухоли, представляет собой FAP.

6. Онколитический аденовирус по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанный кодируемый биспецифичный активатор Т-клеток содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности, и VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности.

7. Онколитический аденовирус по п.6, отличающийся тем, что указанный кодируемый биспецифичный активатор Т-клеток содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или 75 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из указанных последовательностей.

8. Онколитический аденовирус по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный аденовирус является химерным, способен к репликации, например, является компетентным в отношении репликации, или является дефектным по репликации.

9. Онколитический аденовирус по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанный биспецифичный активатор Т-клеток, кодируемый в положении B_Y, находится под контролем главного позднего промотора.

10. Онколитический аденовирус по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что указанный аденовирус дополнительно кодирует второй биспецифичный активатор Т-клеток.

11. Онколитический аденовирус по п.10, отличающийся тем, что оба биспецифичных активатора Т-клеток кодированы в положении B_Y.

12. Онколитический аденовирус по п.10 или 11, отличающийся тем, что указанный второй биспецифичный активатор Т-клеток содержит домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности, и VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности.

13. Онколитический аденовирус по п.12, отличающийся тем, что указанный кодируемый биспеци-

фичный активатор Т-клеток содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 73 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из указанных последовательностей.

14. Онколитический аденовирус по п.1 или 7, отличающийся тем, что указанный аденовирус содержит последовательность SEQ ID NO: 36, 37, 81, 82, 97, 98, 99 или 100.

15. Онколитический аденовирус по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что указанный аденовирус кодирует 2, 3 или 4 дополнительных трансгена, например, отличающийся тем, что между каждым из трансгенов кодирован различный пептид расщепления.

16. Онколитический аденовирус по п.15, отличающийся тем, что указанный дополнительный трансген(ы) кодирует цитокин, хемокин и/или иммуномодулятор.

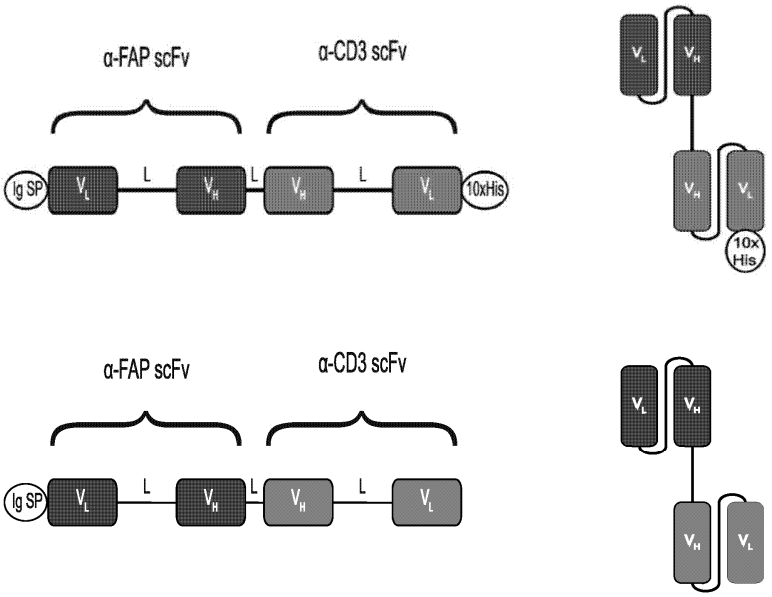
17. Онколитический аденовирус по любому из пп.15, 16, отличающийся тем, что все указанные дополнительные трансгены кодированы в положении B_Y.

18. Онколитический аденовирус по любому из пп.15-17, отличающийся тем, что по меньшей мере один дополнительный трансген кодирует цитокин, например, выбранный из MIP1α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFNα, IFNβ, IFNγ, TNFα, лимфотоксина α (LTA), Flt3L, GM-CSF и IL-8.

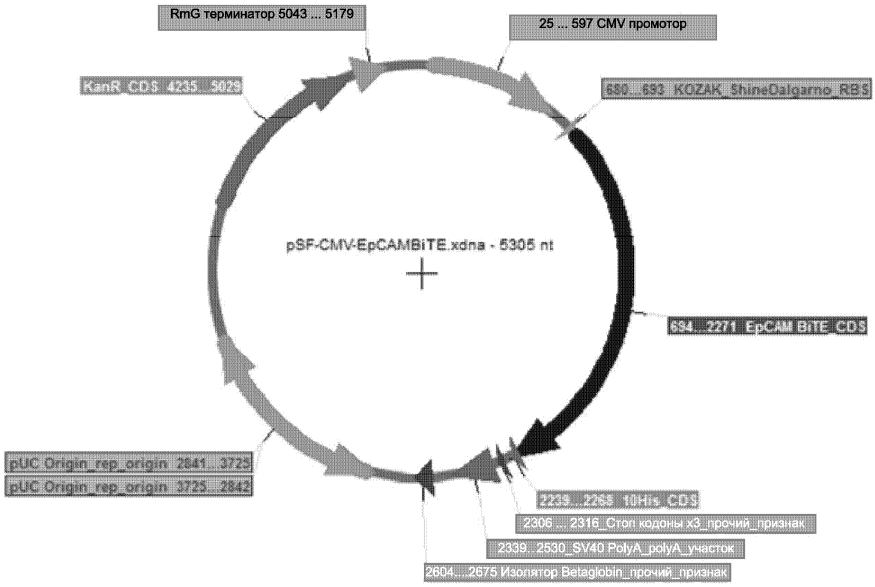
19. Онколитический аденовирус по любому из пп.15-18, отличающийся тем, что по меньшей мере один дополнительный трансген кодирует хемокин, например, выбранный из CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19 и CCL21.

20. Композиция для лечения рака, содержащая терапевтически эффективное количество аденовируса по любому из пп.1-19 и разбавитель или носитель.

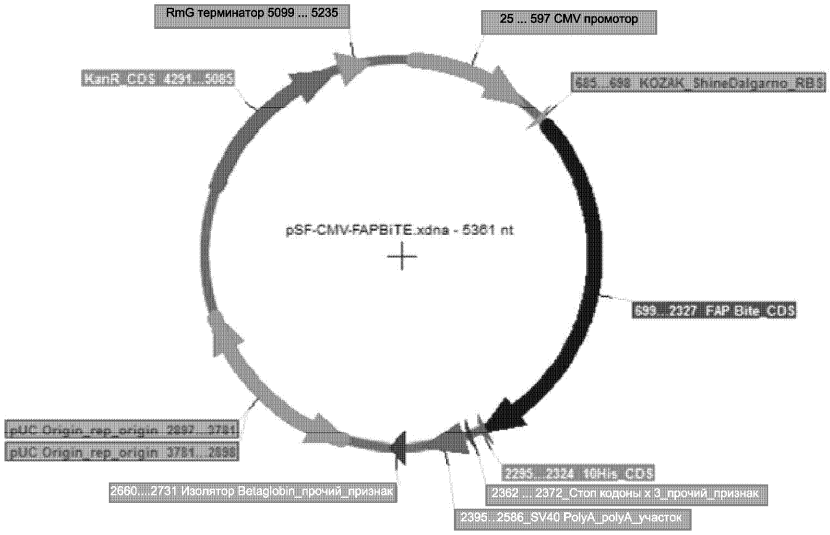
21. Способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества онколитического аденовируса по любому из пп.1-19 или композиции по п.20.



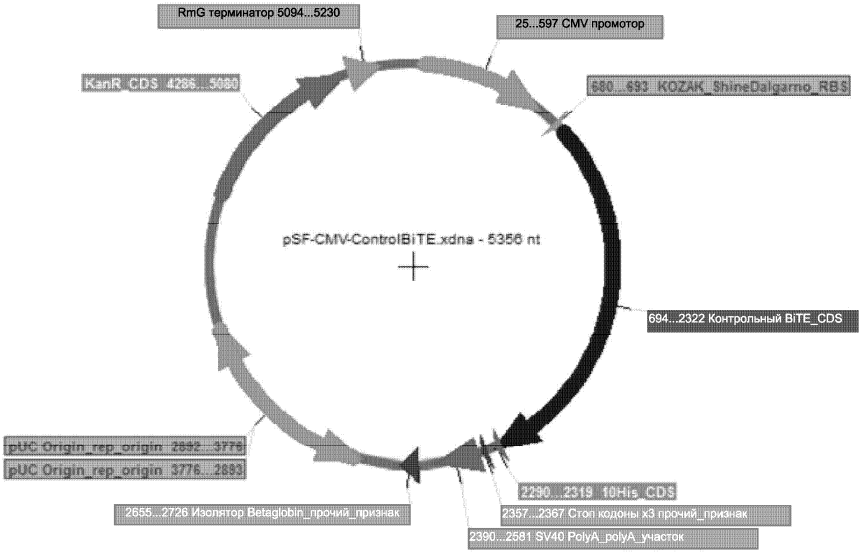
Фиг. 1А



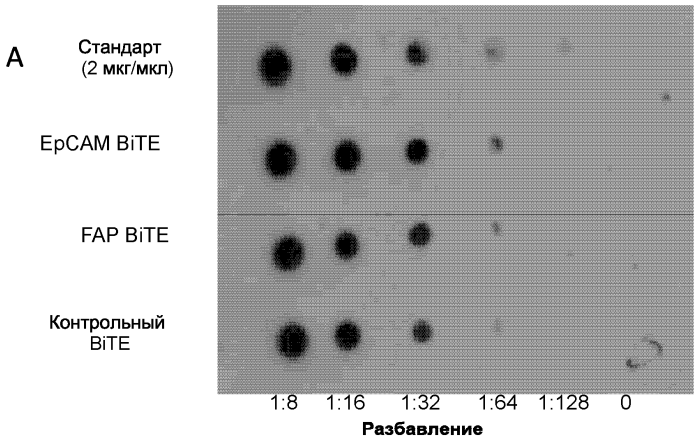
Фиг. 1B

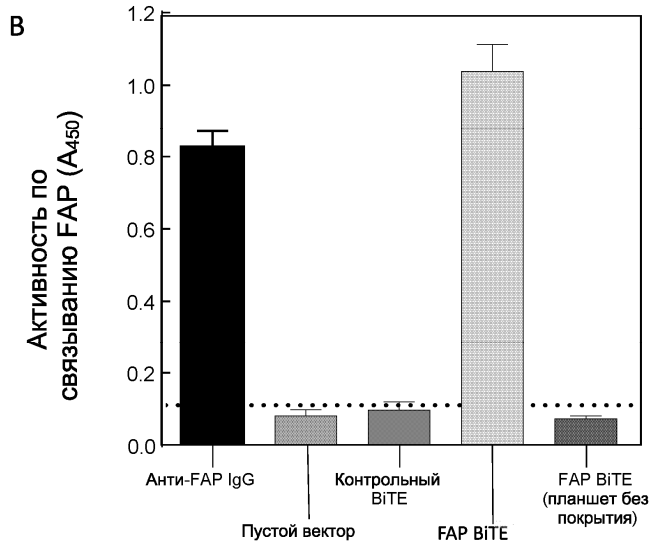


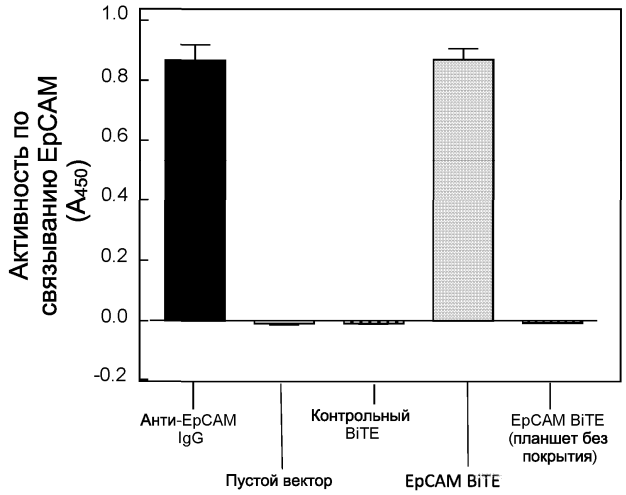
Фиг. 1C



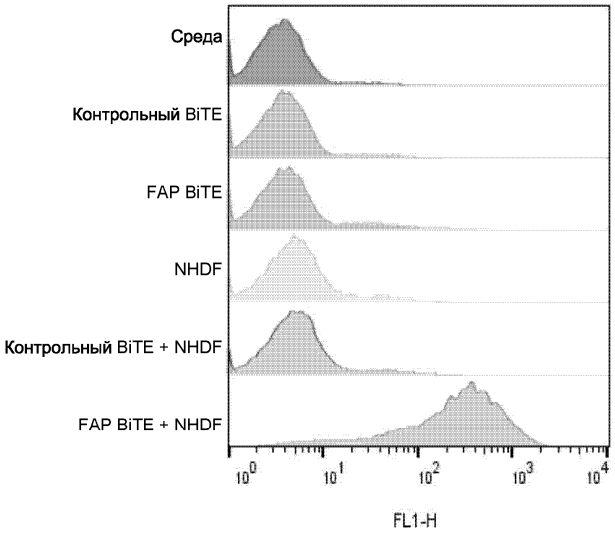
Фиг. 1D

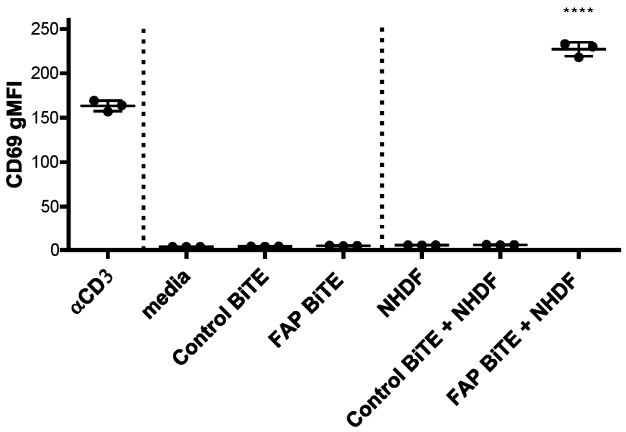

A
Стандарт
(2 мкг/мкл)
EpCAM BiTE
FAP BiTE
Контрольный
BiTE
1:8
1:16
1:32
1:64
1:128
0
Разбавление


B
Активность по связыванию FAP (A450)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Анти-FAP IgG
Пустой вектор
Контрольный BiTE
FAP BiTE
FAP BiTE (планшет без покрытия)

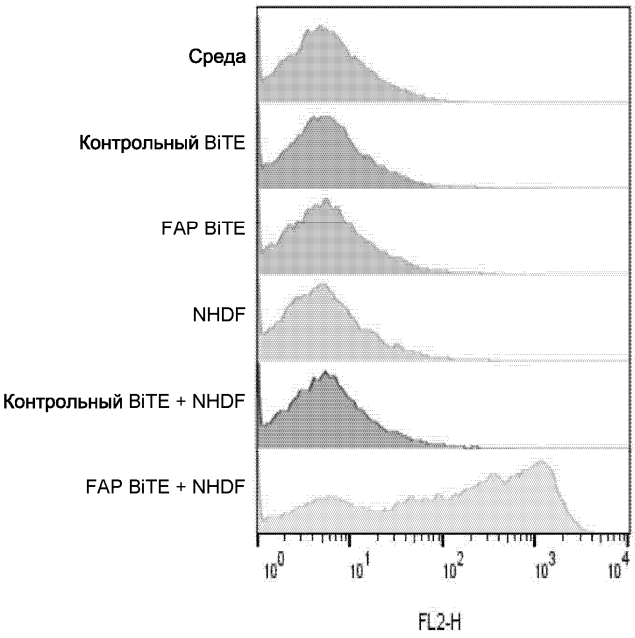

Активность по связыванию EpCAM (A450)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Анти-EpCAM IgG
Пустой вектор
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
EpCAM BiTE (планшет без покрытия)

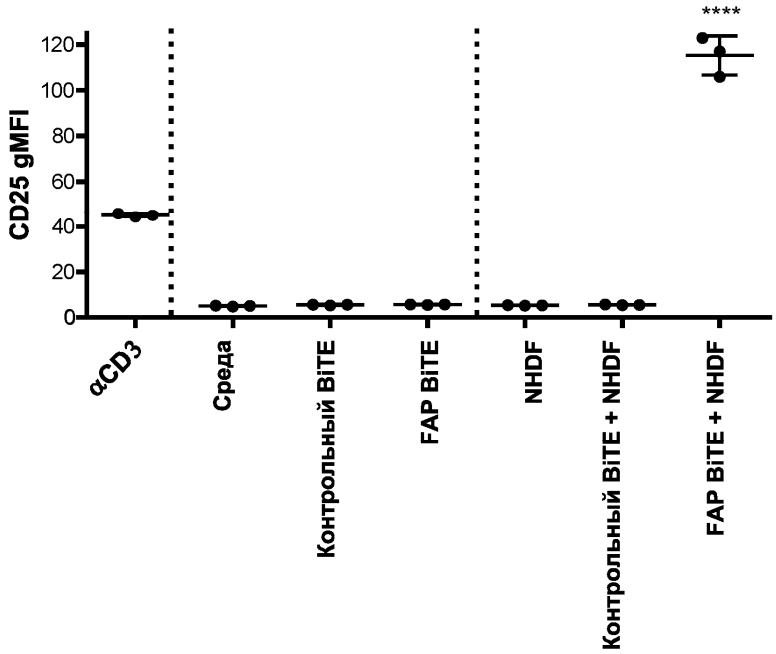
Фиг. 2C


Среда
Контрольный BiTE
FAP BiTE
NHDF
Контрольный BiTE + NHDF
FAP BiTE + NHDF
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

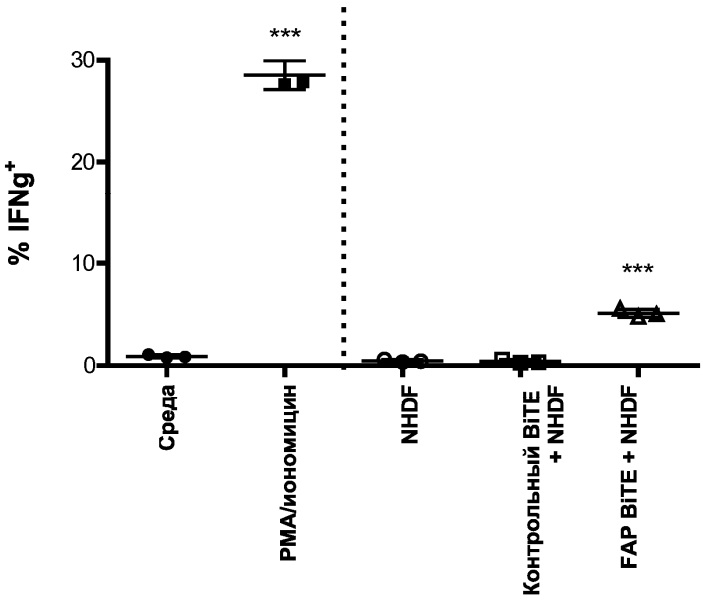

CD69 gMFI
250
200
150
100
50
0
****
αCD3
media
Control BiTE
FAP BiTE
NHDF
Control BiTE + NHDF
FAP BiTE + NHDF

Фиг. 3A

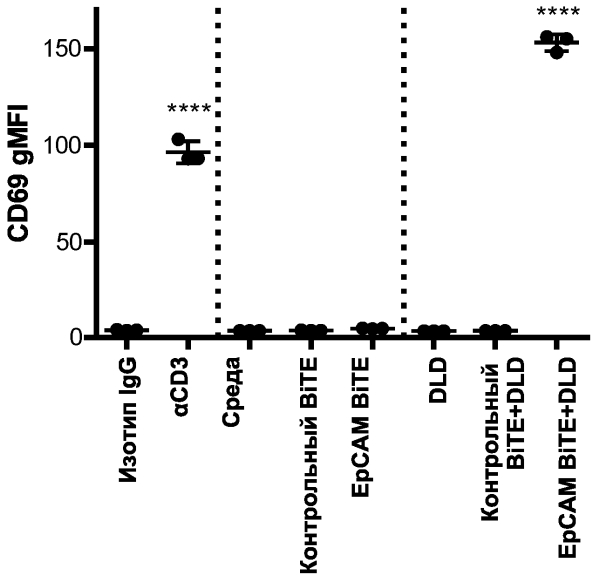

Среда
Контрольный BiTE
FAP BiTE
NHDF
Контрольный BiTE + NHDF
FAP BiTE + NHDF
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H


****
CD25 gMFI
120
100
80
60
40
20
0
αCD3
Среда
Контрольный BiTE
FAP BiTE
NHDF
Контрольный BiTE + NHDF
FAP BiTE + NHDF

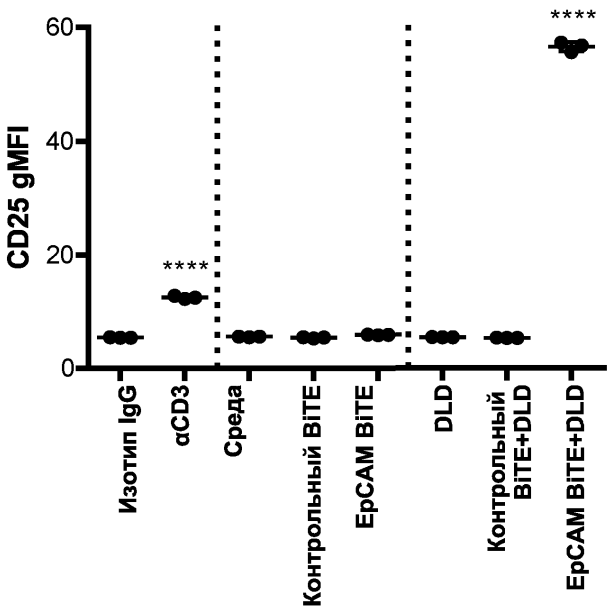
Фиг. 3B


% IFNg+
30
20
10
0
***
***
Среда
PMA/иономицин
NHDF
Контрольный BiTE + NHDF
FAP BiTE + NHDF

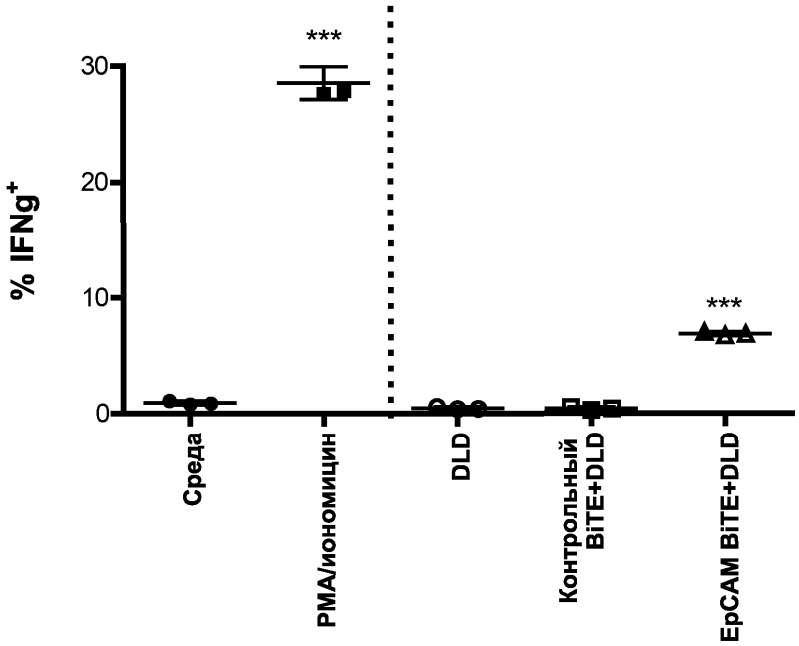
Фиг. 4A


CD69 gMFI
150
100
50
0
****
****
Изотип IgG
αCD3
Среда
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
DLD
Контрольный BiTE+DLD
EpCAM BiTE+DLD

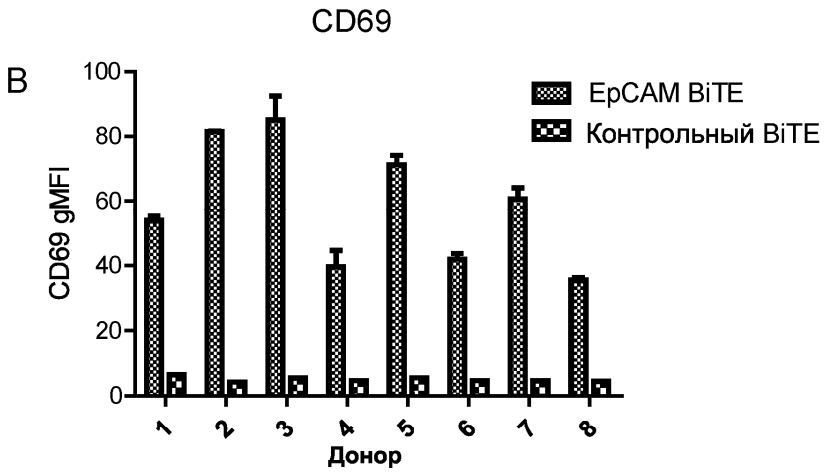
Фиг. 4B

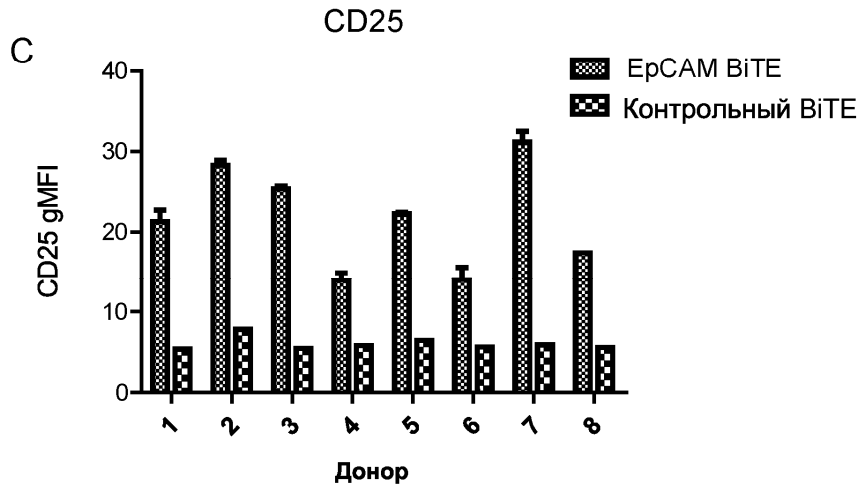

CD25 gMFI
60
40
20
0
****
****
Изотип IgG
αCD3
Среда
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
DLD
Контрольный BiTE+DLD
EpCAM BiTE+DLD

Фиг. 4C

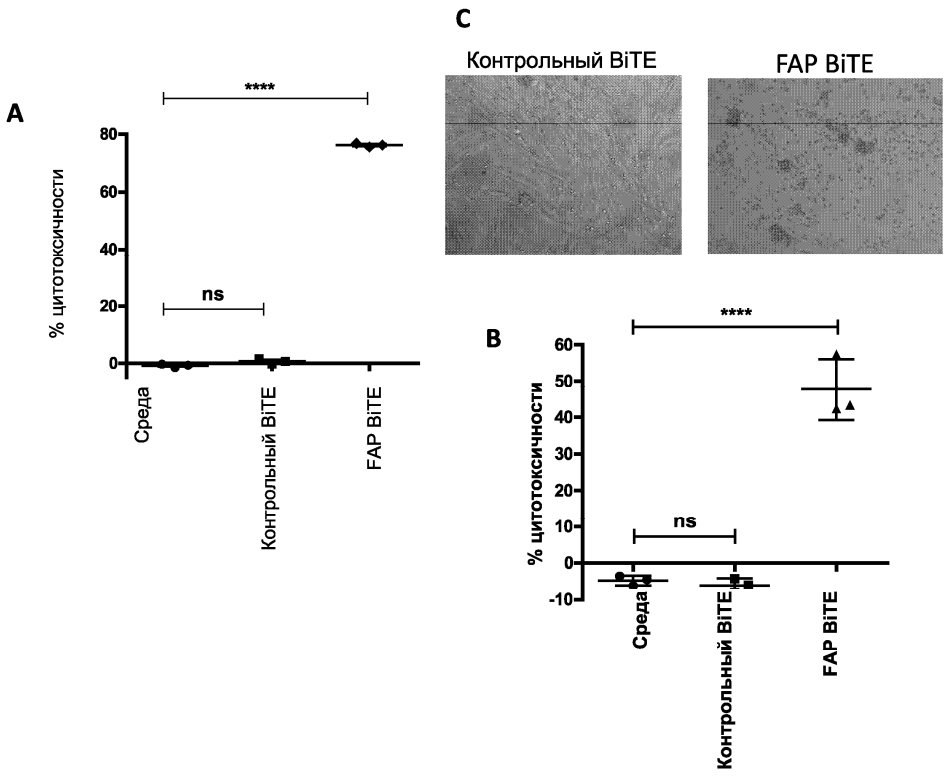

% IFNg+
30
20
10
0
***
***
Среда
PMA/иономицин
DLD
Контрольный BiTE+DLD
EpCAM BiTE+DLD

Фиг. 5A

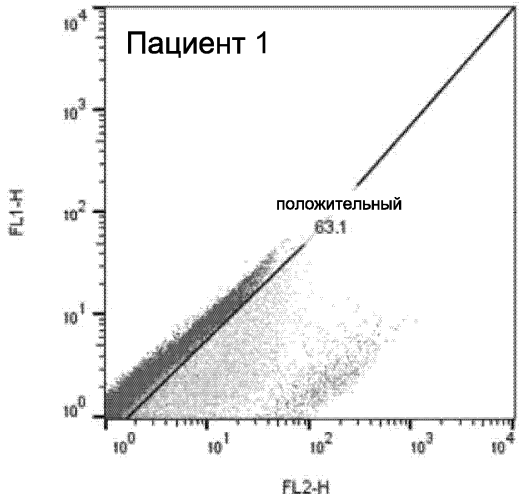




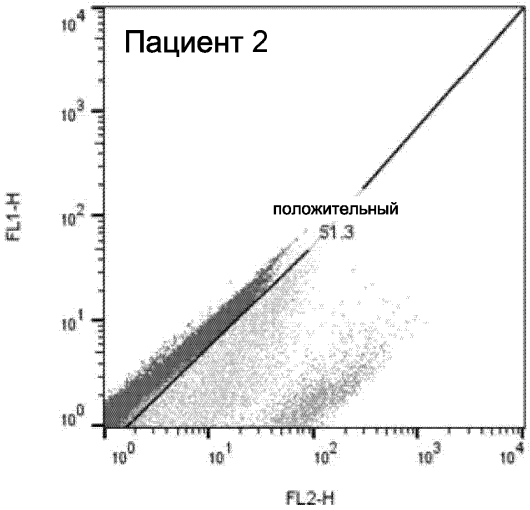
Фиг. 5(продолжение)


A
****
ns
% цитотоксичности
80
60
40
20
0
Среда
Контрольный BiTE
FAP BiTE
C
Контрольный BiTE
FAP BiTE
B
****
ns
% цитотоксичности
60
50
40
30
20
10
0
-10
Среда
Контрольный BiTE
FAP BiTE

Фиг. 6

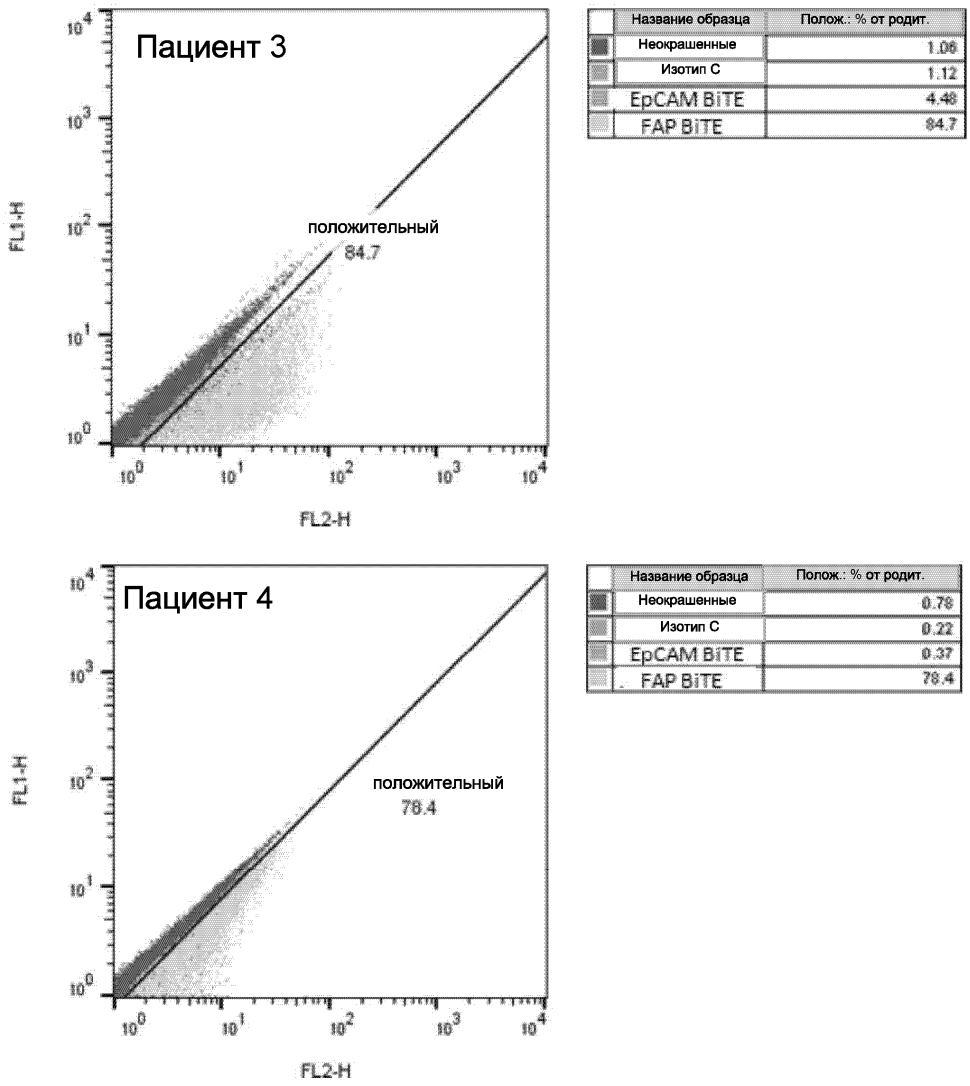


Название образца	Полож.: % от родит.
Неокрашенные	0.19
Изотип С	0.41
EpCAM BiTE	15.7
FAP BiTE	63.1

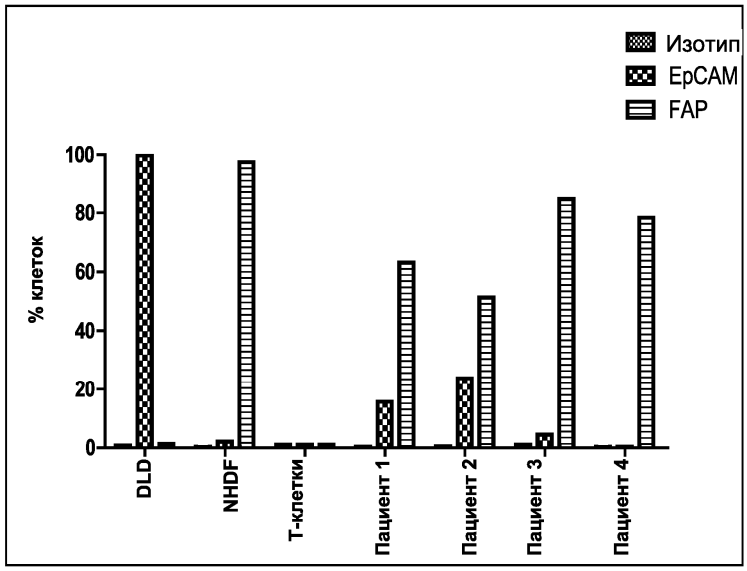


Название образца	Полож.: % от родит.
Неокрашенные	0.45
Изотип С	0.56
EpCAM BiTE	23.9
FAP BiTE	51.3

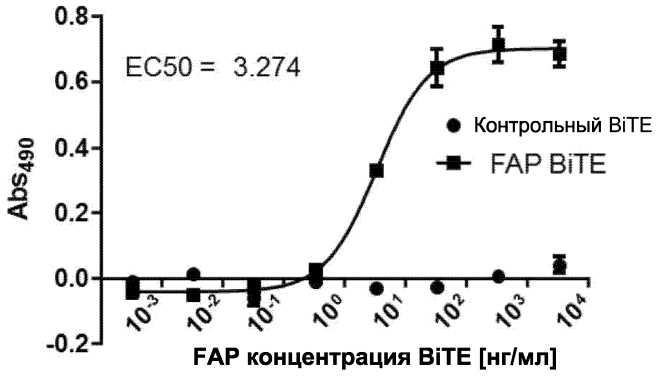
Фиг. 7А



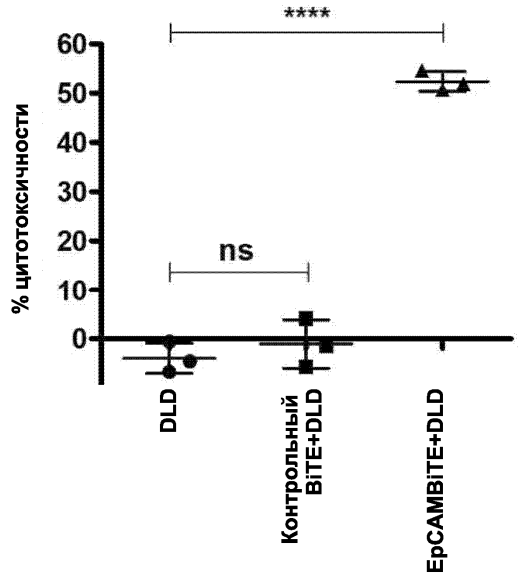
Фиг. 7A (продолжение)



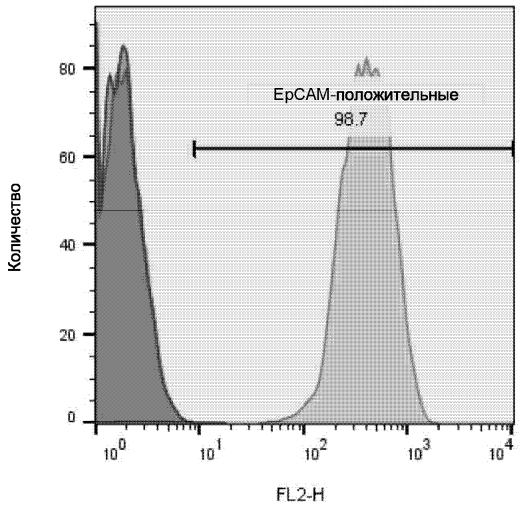
Фиг. 7B



Фиг. 8A

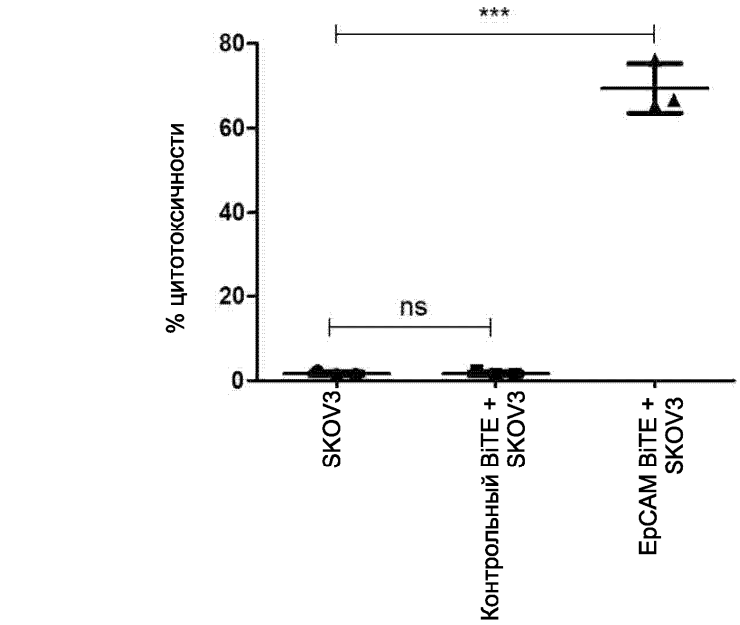


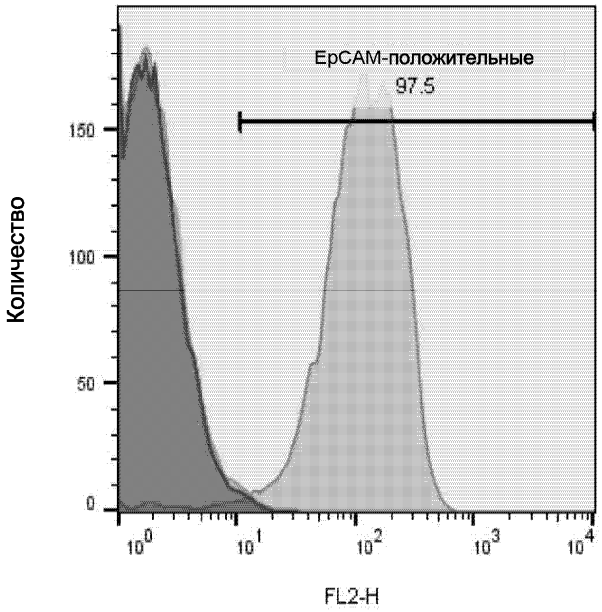
Фиг. 8B



	Название образца	EpCAM-положит.: % от родит.	Среднее геометрическое: FL2-H
	[DLD неокраш. 021]	0.40	1.77
	[DLD iso.022]	0.36	1.81
	[DLD ep.023]	98.7	361

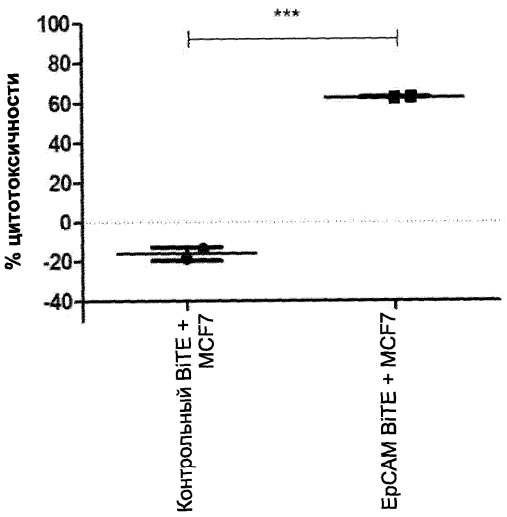
Фиг. 8C

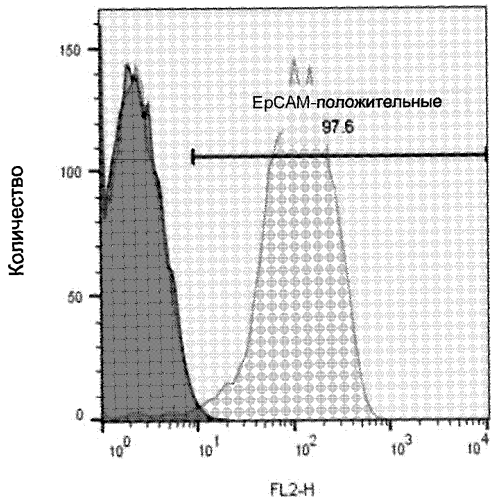




	Название образца	EpCAM-положит.: % от родит.	Средн. геометр.: FL2-H
	[Skov неокрашен.024]	1.48	1.99
	[Skov iso.025]	1.53	2.00
	[Skov ep.026]	97.5	103

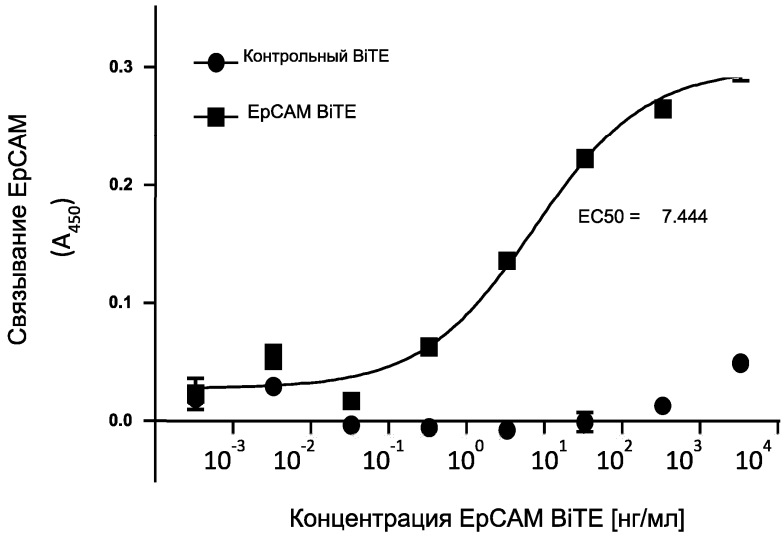
Фиг. 9A



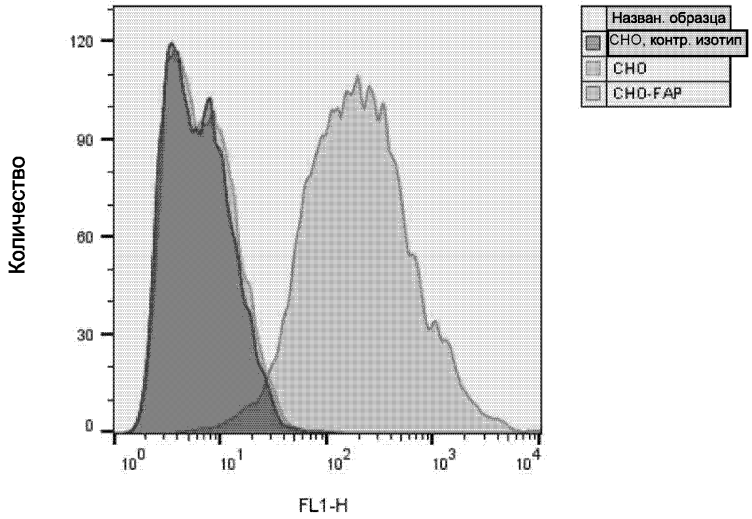


	Название образца	EpCAM-положит. % от родит.	Средн. геом. FL2-H
	[MCF7 неокрашен.018]	0.84	2.24
	[MCF7 iso.019]	0.86	2.21
	[MCF7 ep.020]	97.6	101

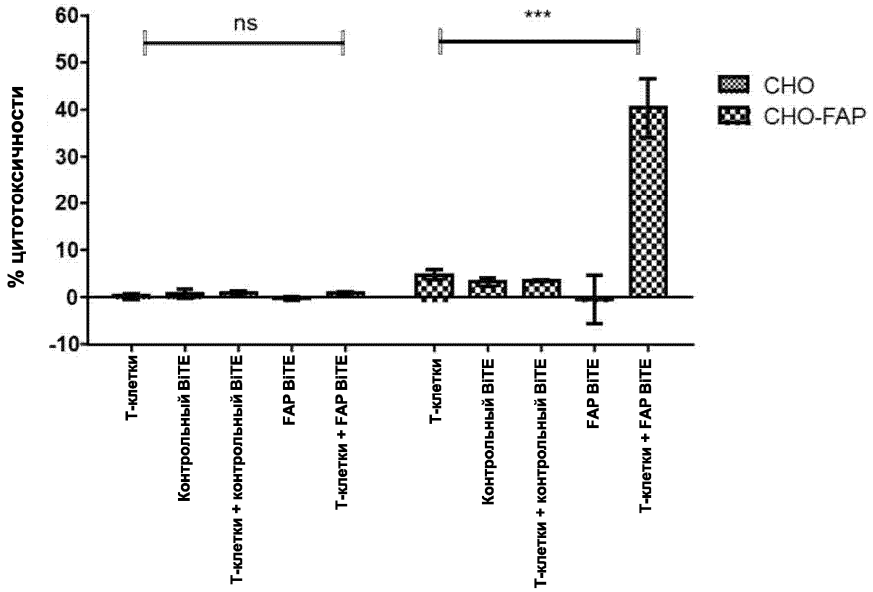
Фиг. 9B



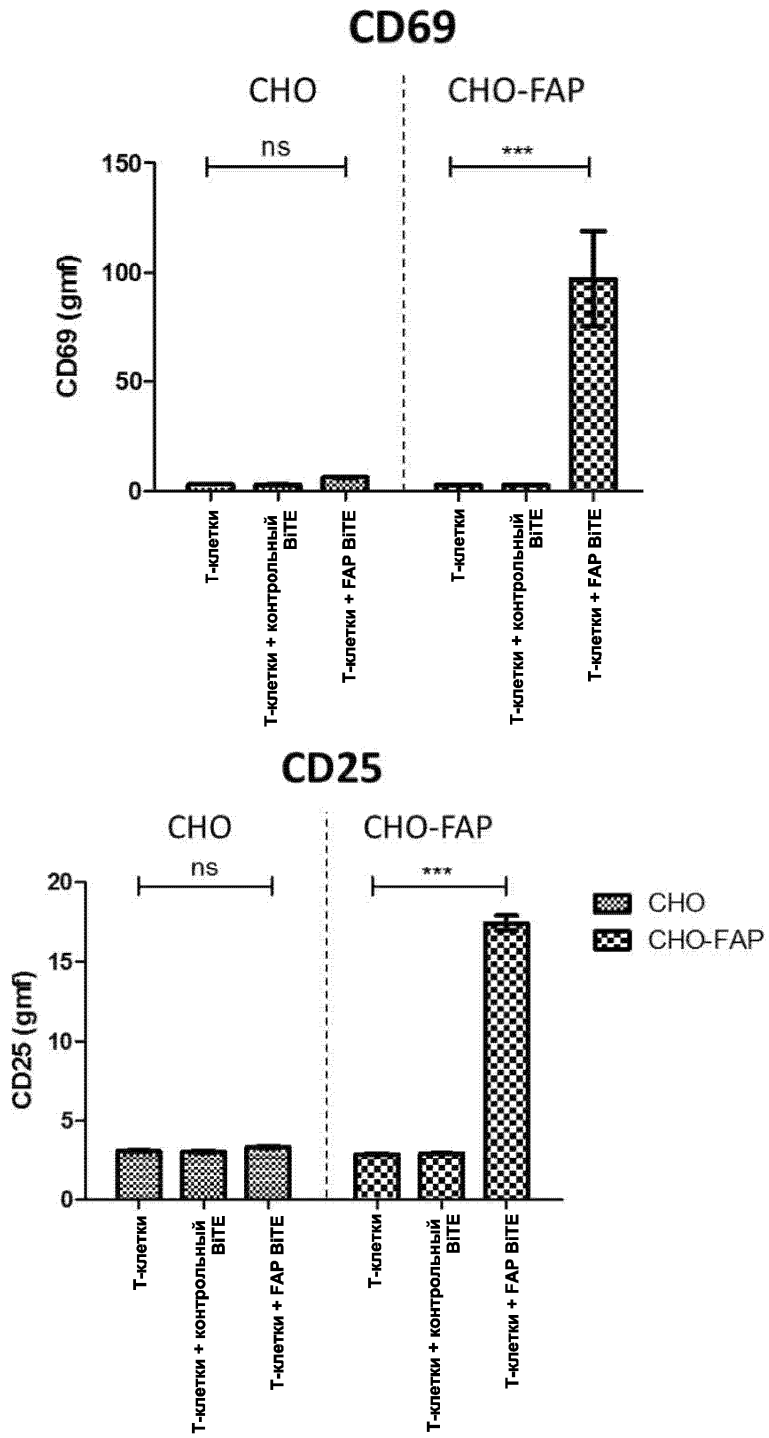
Фиг. 10



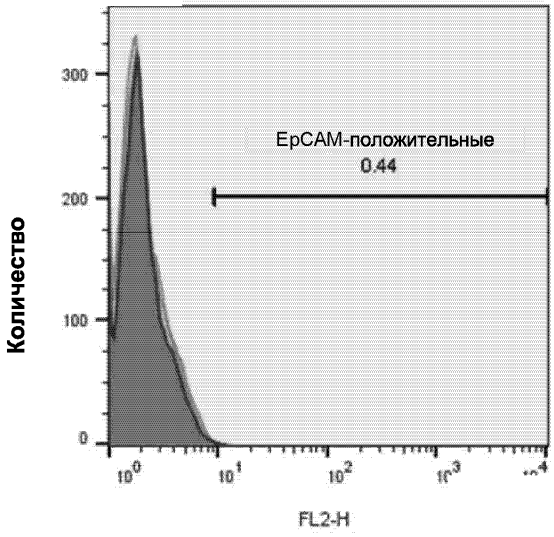
Фиг. 11A



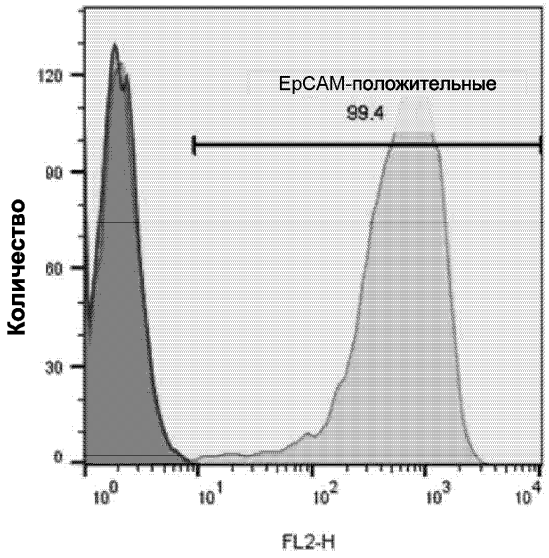
Фиг. 11B


CD69
CHO
CHO-FAP
ns
***
150
100
50
0
CD69 (gmf)
Т-клетки
Т-клетки + контрольный BiTE
Т-клетки + FAP BiTE
Т-клетки
Т-клетки + контрольный BiTE
Т-клетки + FAP BiTE
CD25
CHO
CHO-FAP
ns
***
20
15
10
5
0
CD25 (gmf)
CHO
CHO-FAP
Т-клетки
Т-клетки + контрольный BiTE
Т-клетки + FAP BiTE
Т-клетки
Т-клетки + контрольный BiTE
Т-клетки + FAP BiTE

Фиг. 12

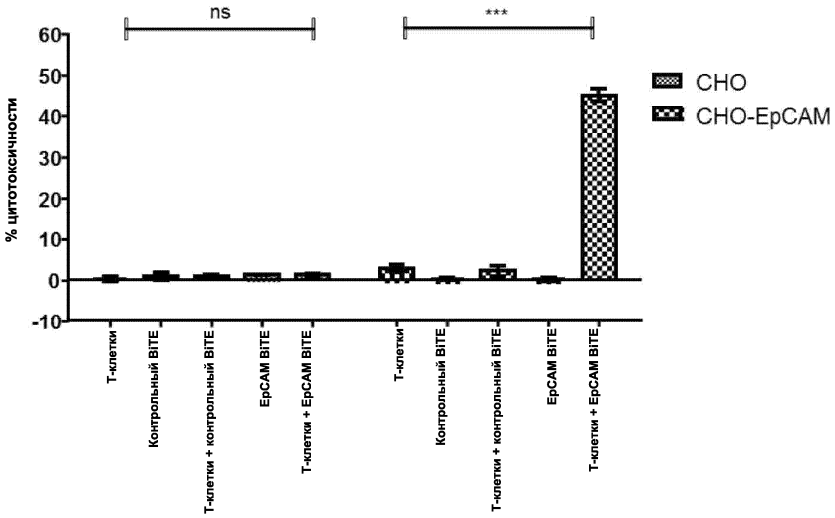


	Название образца	EpCAM-положит.: % от родит.	Средн. геометр.: FL2-H
■	[CHO неокраш. 036]	0.38	2.06
□	[CHO iso.037]	0.42	2.08
□	[CHO ep.038]	0.44	2.02

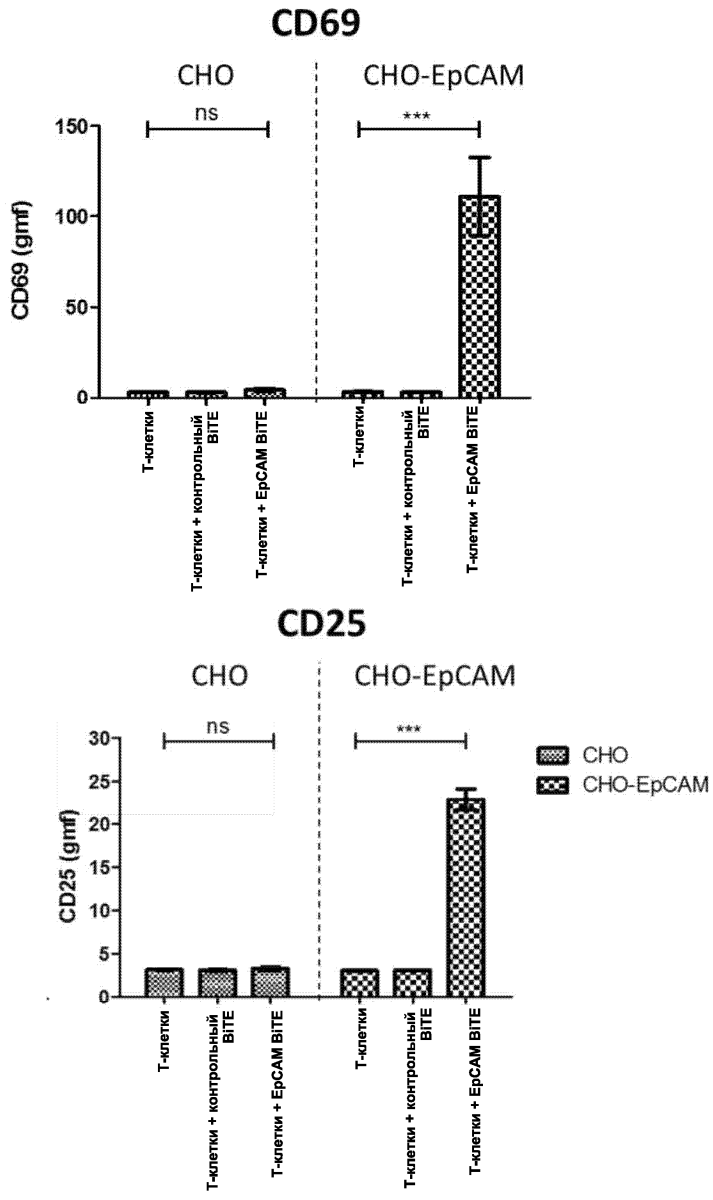


	Название образца	EpCAM-положит.: % от родит.	Среднее геометрич.: FL2-H
■	[CHO неокрашенные 039]	0.093	2.03
□	[CHO-epcam iso.040]	0.15	2.05
□	[CHO-epcam ep.041]	99.4	513

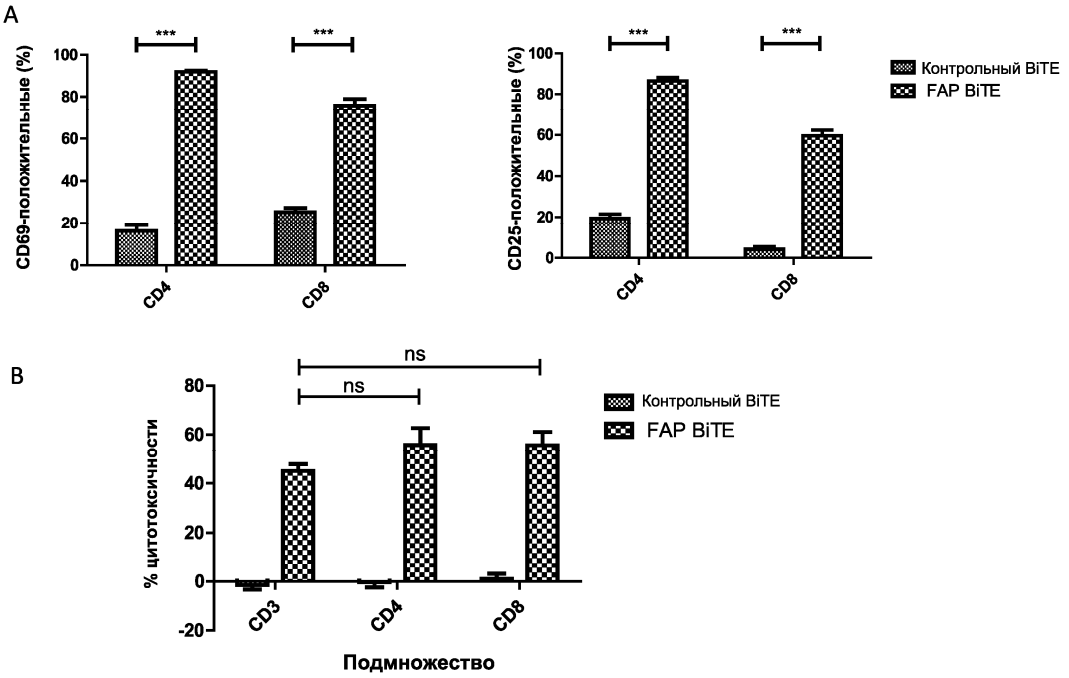
Фиг. 13A



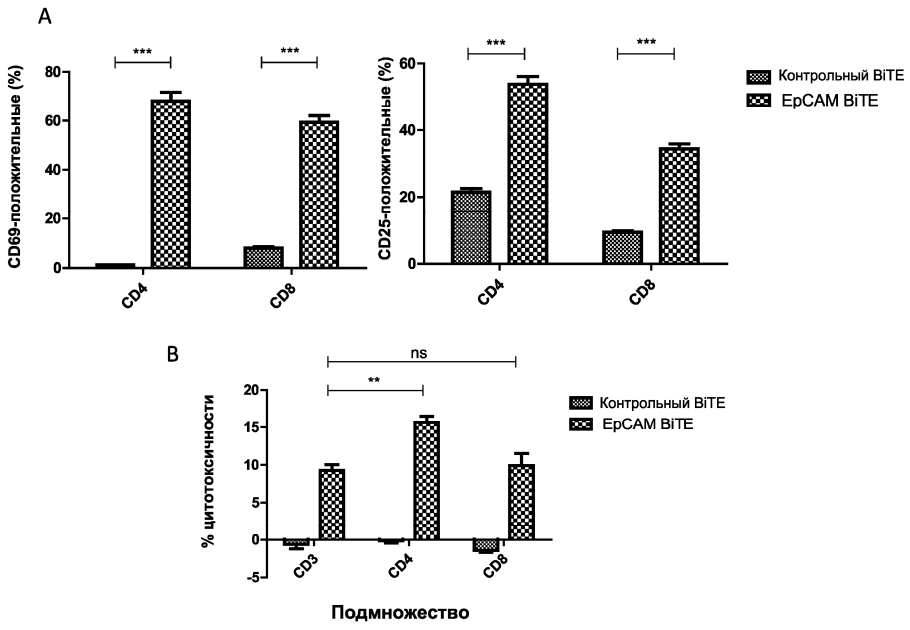
Фиг. 13B



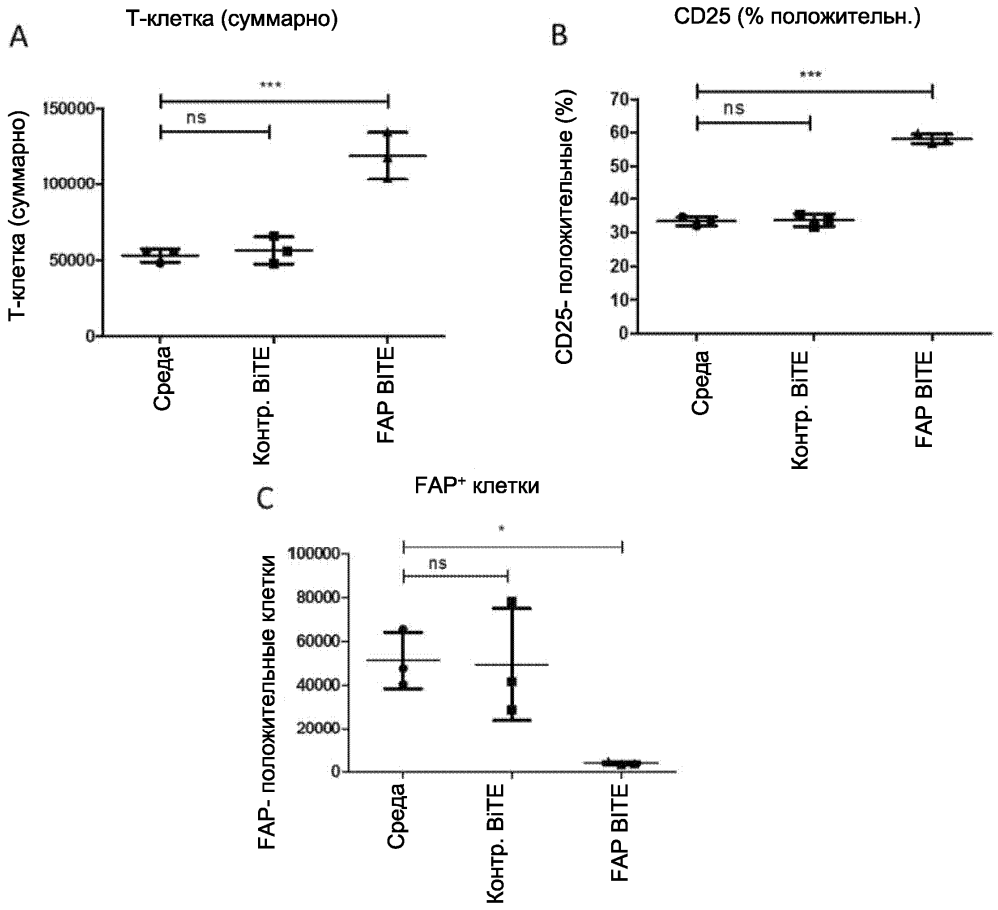
Фиг. 14


A
CD69-положительные (%)
CD25-положительные (%)
***
CD4
CD8
Контрольный BiTE
FAP BiTE
B
% цитотоксичности
ns
CD3
CD4
CD8
Подмножество

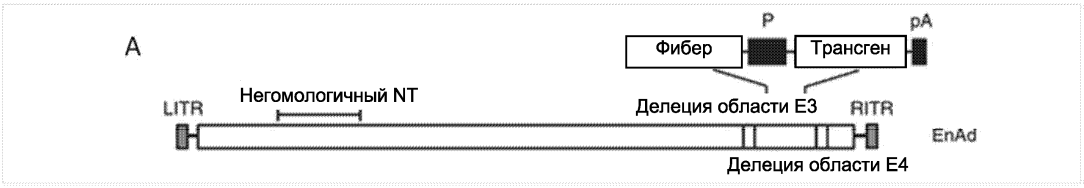
Фиг. 15

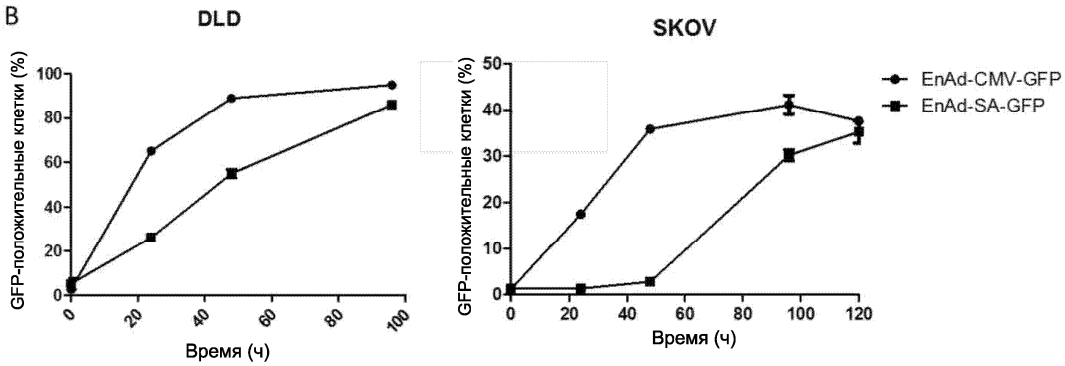

A
CD69-положительные (%)
CD25-положительные (%)
***
CD4
CD8
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
B
% цитотоксичности
ns
**
CD3
CD4
CD8
Подмножество

Фиг. 16

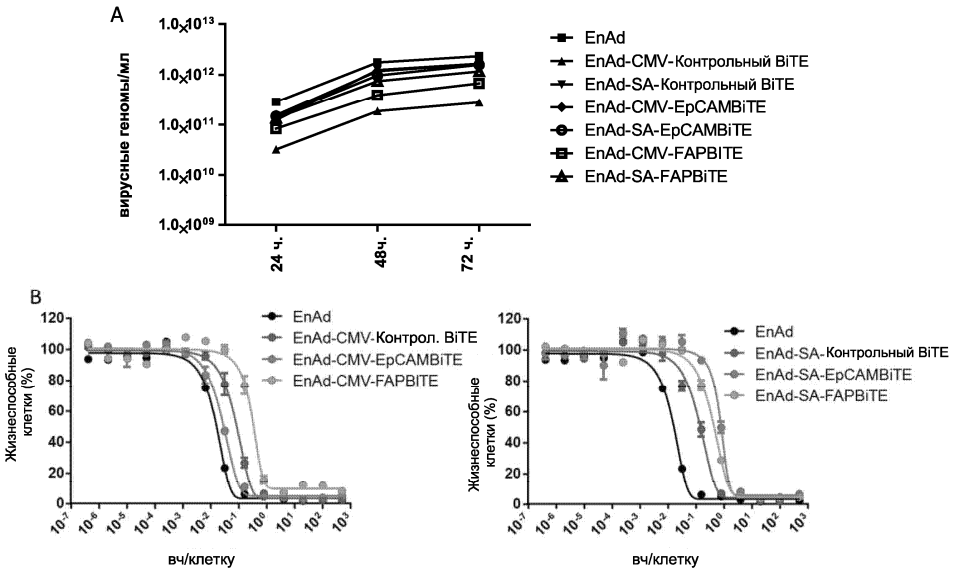

A
Т-клетка (суммарно)
Т-клетка (суммарно)
150000
100000
50000
0
***
ns
Среда
Контр. BiTE
FAP BITE
B
CD25 (% положительн.)
CD25- положительные (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
***
ns
Среда
Контр. BiTE
FAP BITE
C
FAP+ клетки
FAP- положительные клетки
100000
80000
60000
40000
20000
0
*
ns
Среда
Контр. BiTE
FAP BITE

Фиг. 17

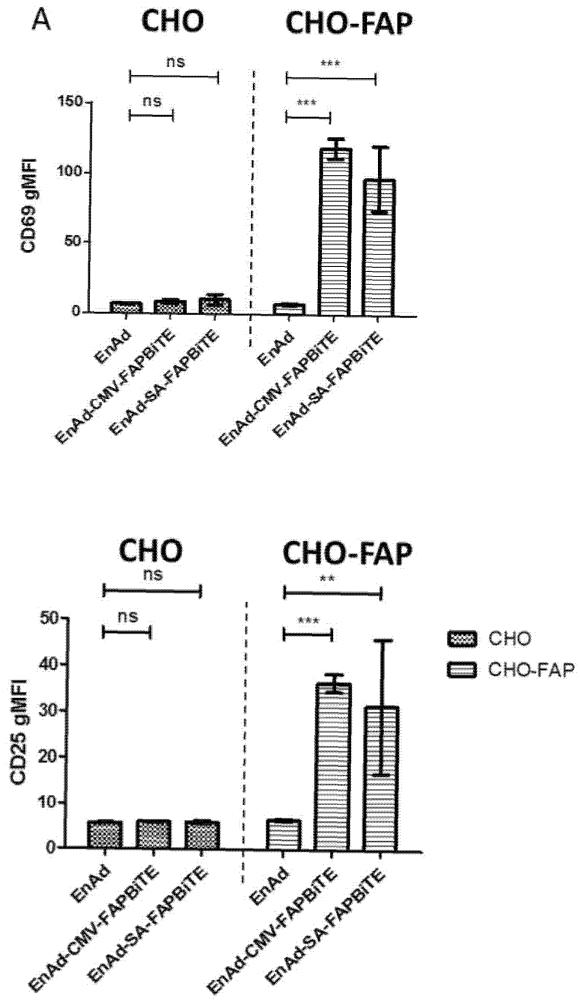

A
P
pA
Фибер
Трансген
LITR
Негомологичный NT
Делеция области E3
RITR
EnAd
Делеция области E4


B
DLD
SKOV
GFP-положительные клетки (%)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Время (ч)
GFP-положительные клетки (%)
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
120
Время (ч)
EnAd-CMV-GFP
EnAd-SA-GFP

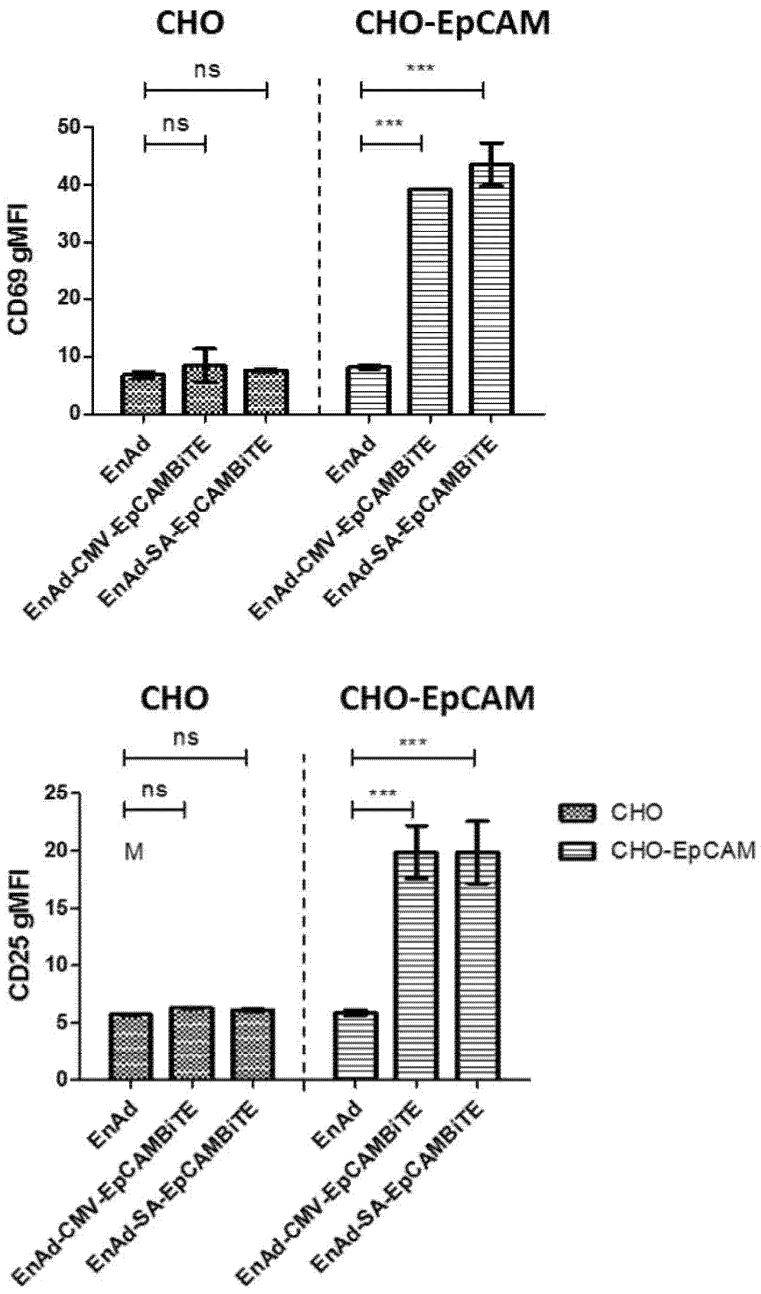
Фиг. 18



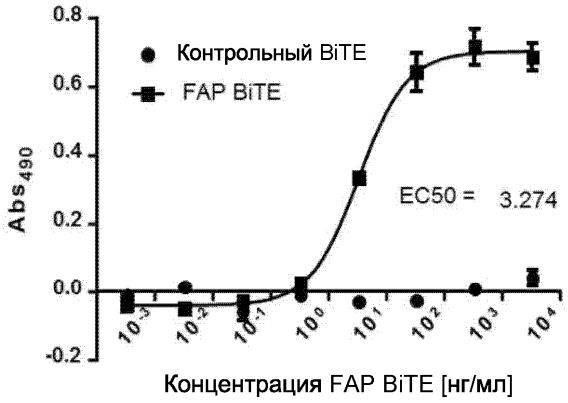
Фиг. 19

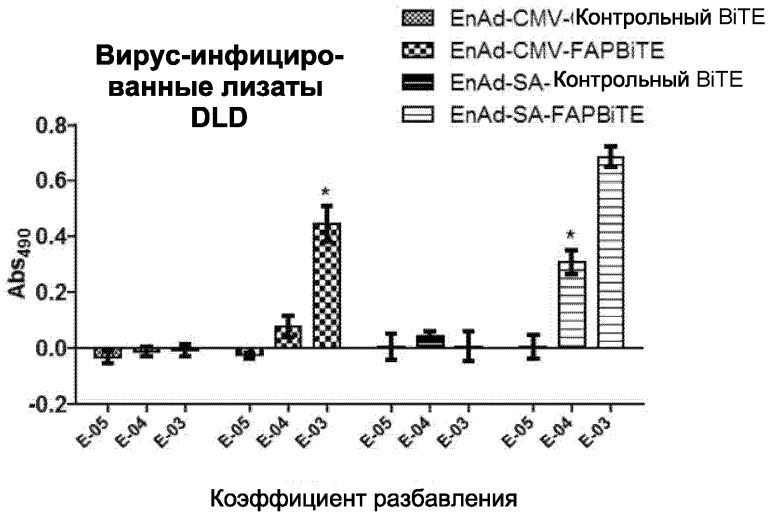


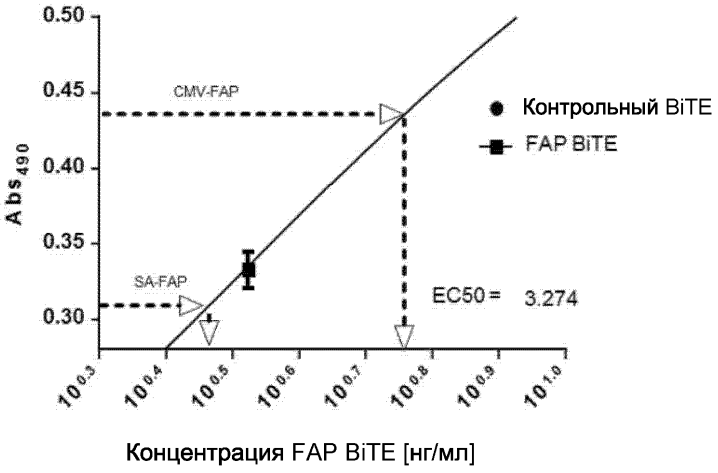
Фиг. 20A


CHO
CHO-EpCAM
ns
ns
***
***
CD69 gMFI
50
40
30
20
10
0
EnAd
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
EnAd
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
CHO
CHO-EpCAM
ns
ns
***
***
M
CD25 gMFI
25
20
15
10
5
0
CHO
CHO-EpCAM
EnAd
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
EnAd
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

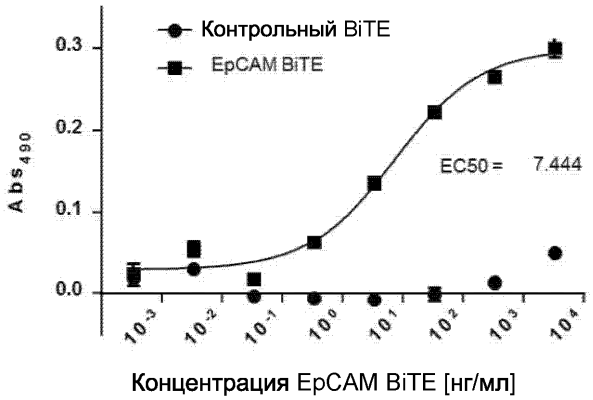
Фиг. 20B

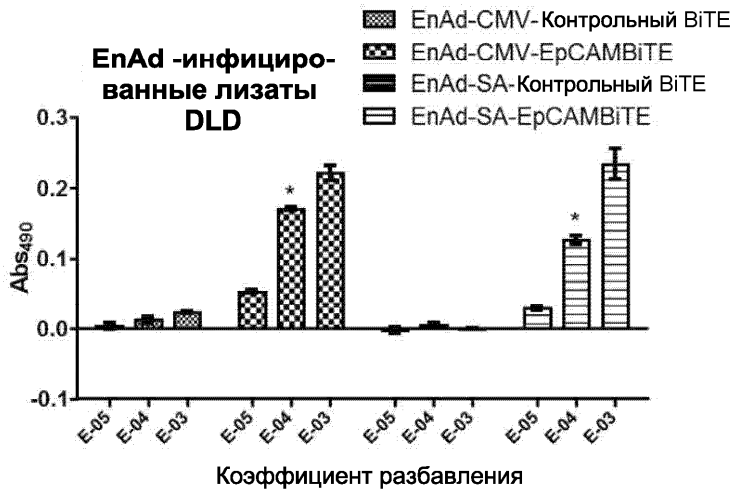

Контрольный BiTE
FAP BiTE
EC50 = 3.274
Abs490
Концентрация FAP BiTE [нг/мл]

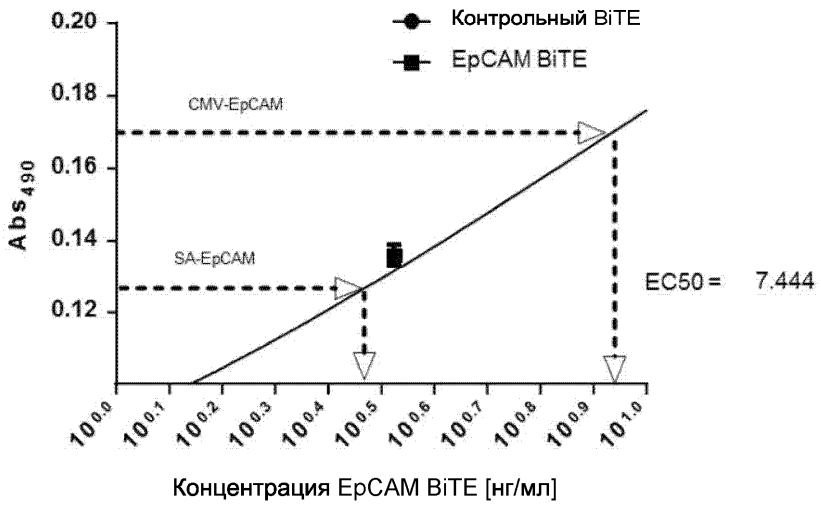

Вирус-инфициро-
ванные лизаты
DLD
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE
Abs490
Коэффициент разбавления


CMV-FAP
SA-FAP
Контрольный BiTE
FAP BiTE
EC50 = 3.274
Abs490
Концентрация FAP BiTE [нг/мл]

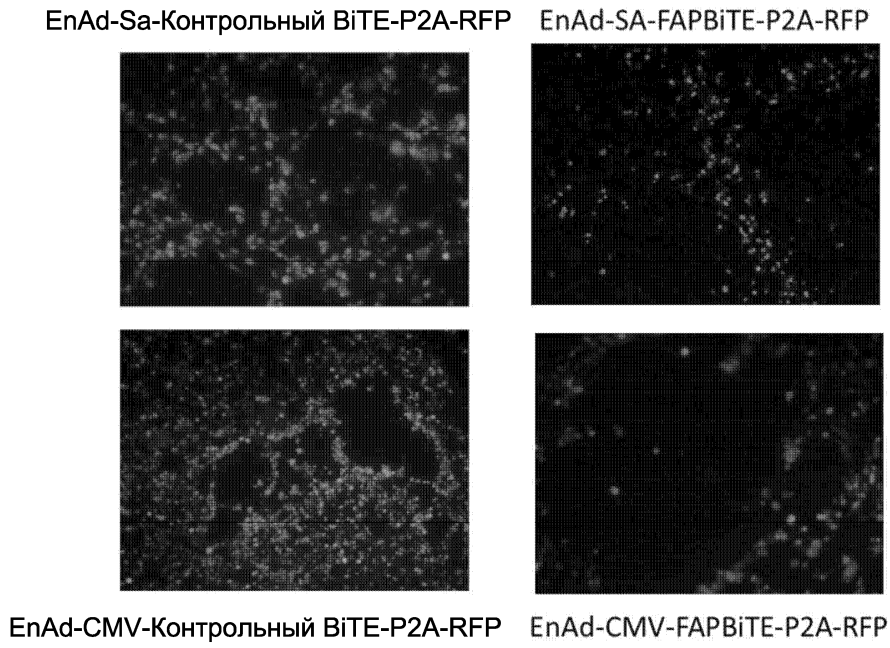
Фиг. 21


Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
Abs490
EC50 = 7.444
Концентрация EpCAM BiTE [нг/мл]

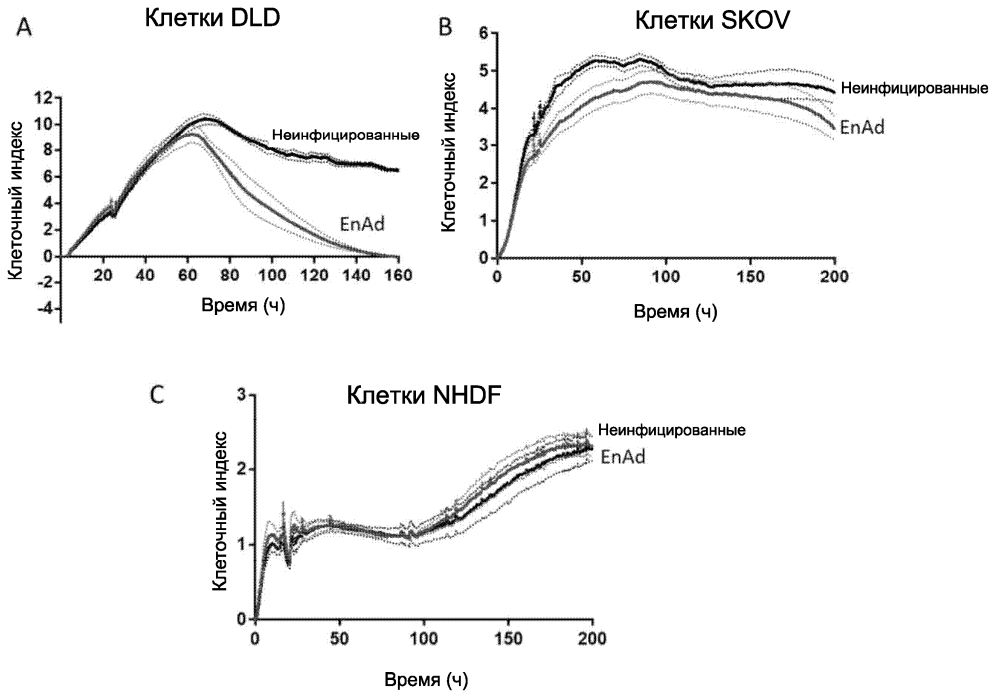

EnAd -инфициро-
ванные лизаты
DLD
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
Abs490
Коэффициент разбавления


Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
CMV-EpCAM
SA-EpCAM
Abs490
EC50 = 7.444
Концентрация EpCAM BiTE [нг/мл]

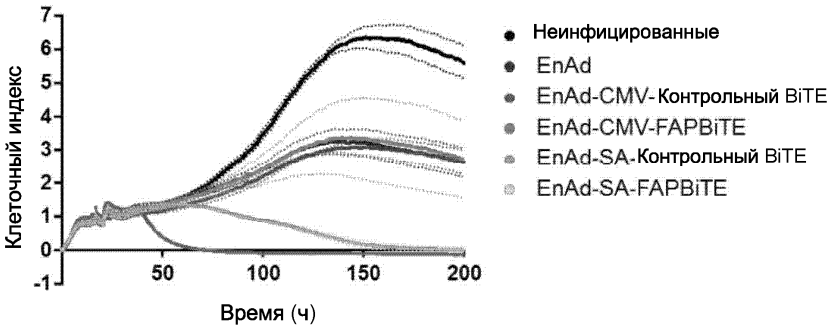
Фиг. 22



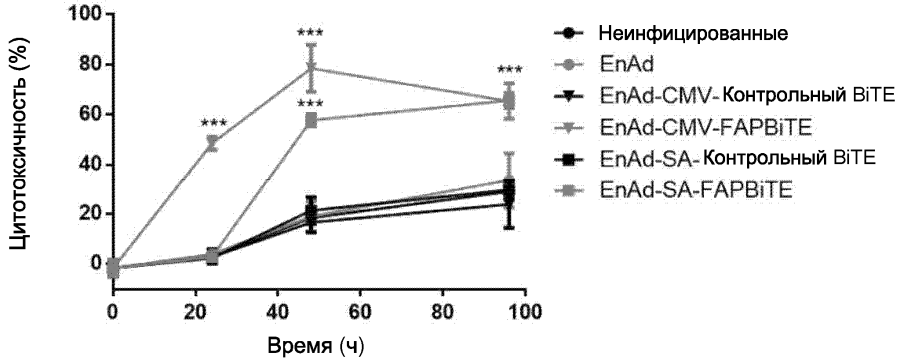
Фиг. 23



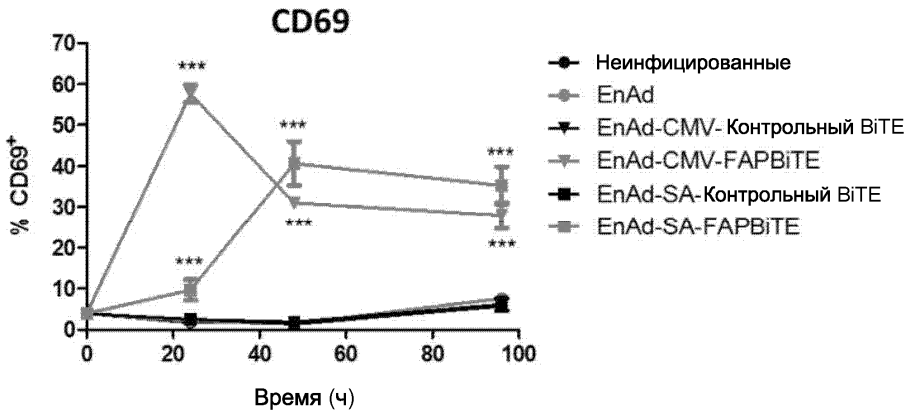
Фиг. 24

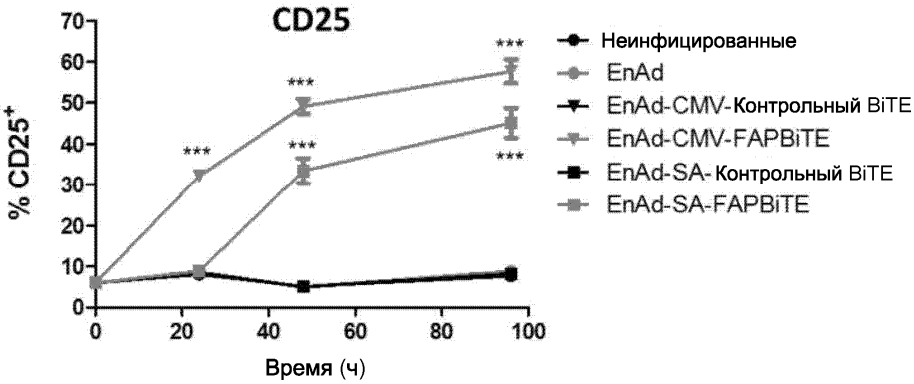


Фиг. 25A

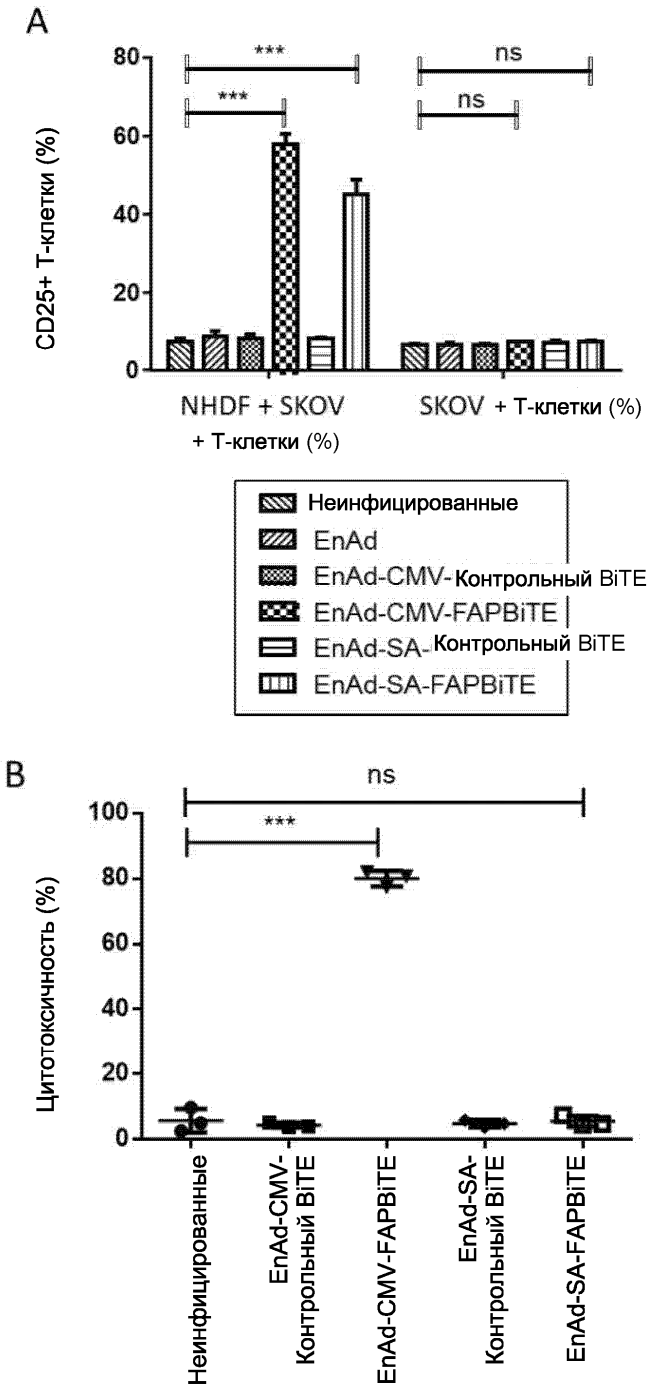


Фиг. 25B

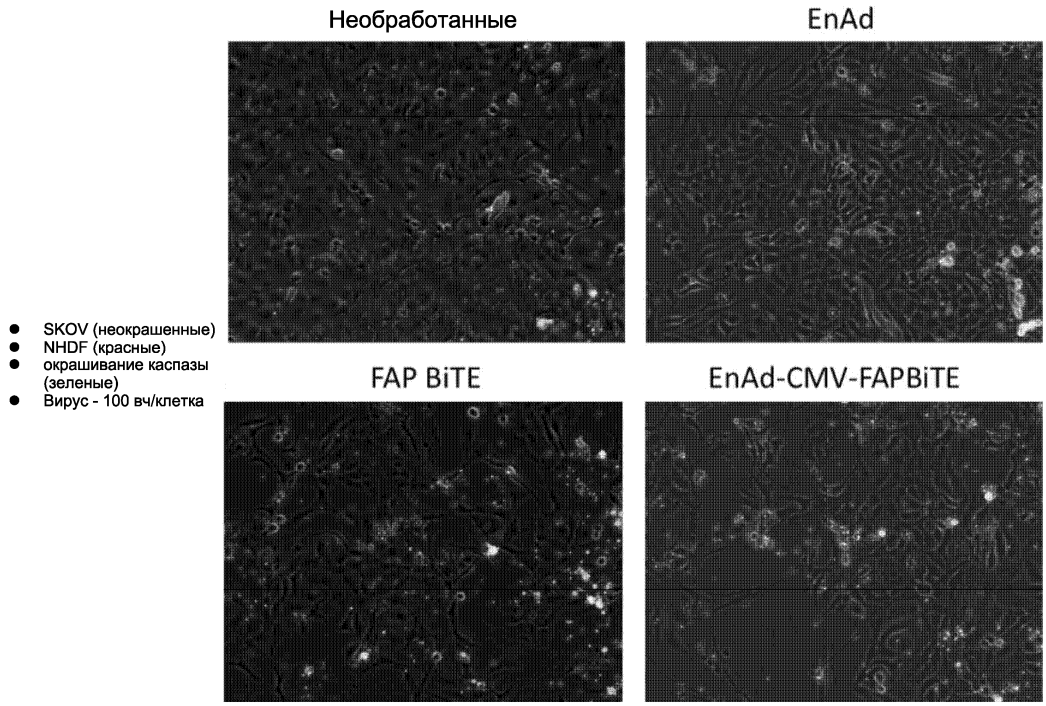




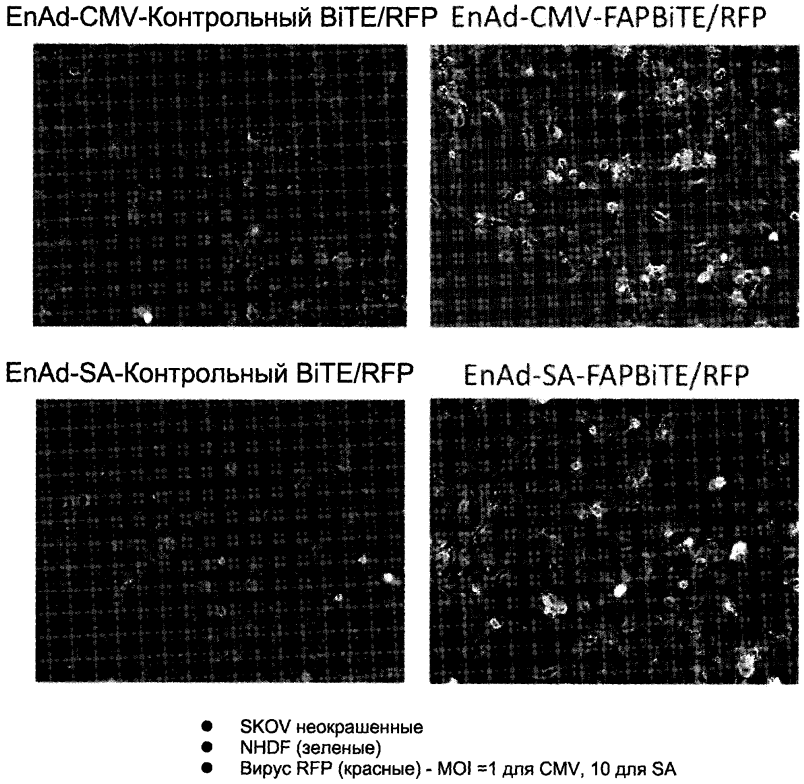
Фиг. 26


A
CD25+ Т-клетки (%)
80
60
40
20
0
***
***
ns
ns
NHDF + SKOV + Т-клетки (%)
SKOV + Т-клетки (%)
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE
B
Цитотоксичность (%)
100
80
60
40
20
0
ns
***
Неинфицированные
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE

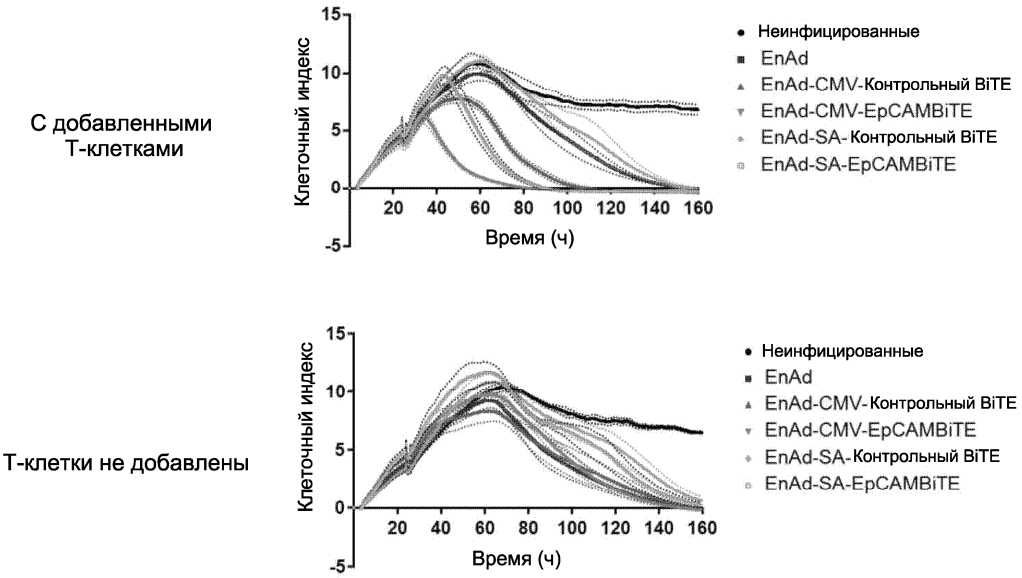
Фиг. 27


Необработанные
EnAd
FAP BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
SKOV (неокрашенные)
NHDF (красные)
окрашивание каспазы (зеленые)
Вирус - 100 вч/клетка

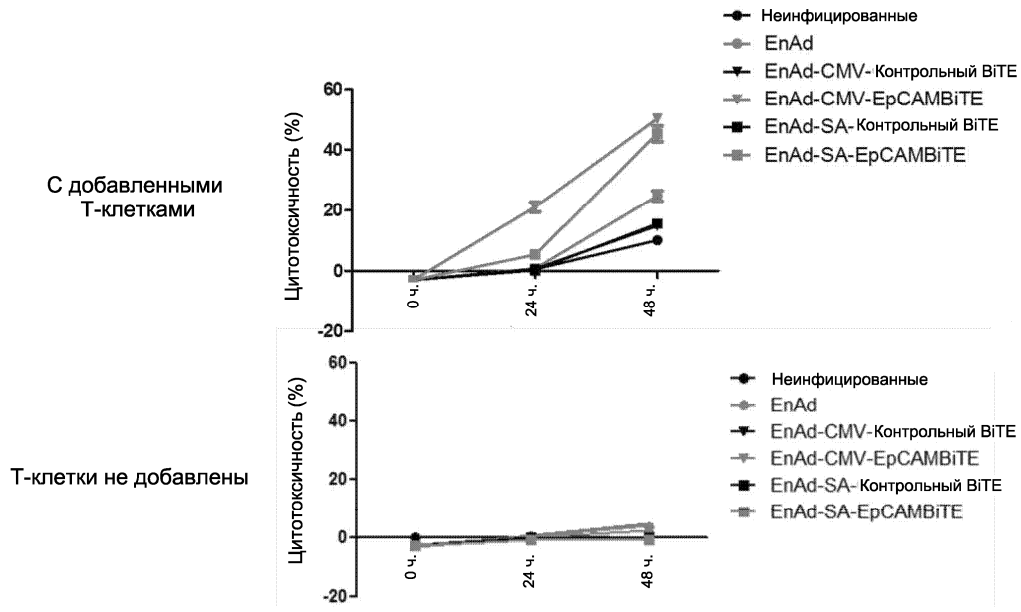
Фиг. 28


EnAd-CMV-Контрольный BiTE/RFP
EnAd-CMV-FAPBiTE/RFP
EnAd-SA-Контрольный BiTE/RFP
EnAd-SA-FAPBiTE/RFP
SKOV неокрашенные
NHDF (зеленые)
Вирус RFP (красные) - MOI =1 для CMV, 10 для SA

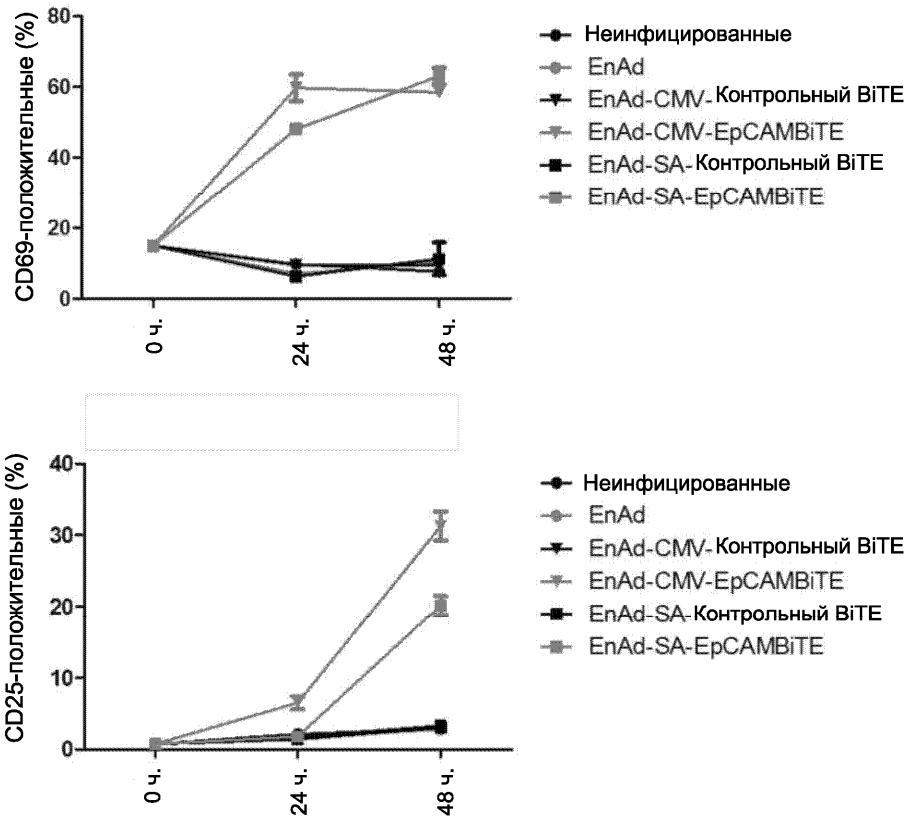
Фиг. 29


С добавленными Т-клетками
Клеточный индекс
Время (ч)
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
Т-клетки не добавлены
Клеточный индекс
Время (ч)
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

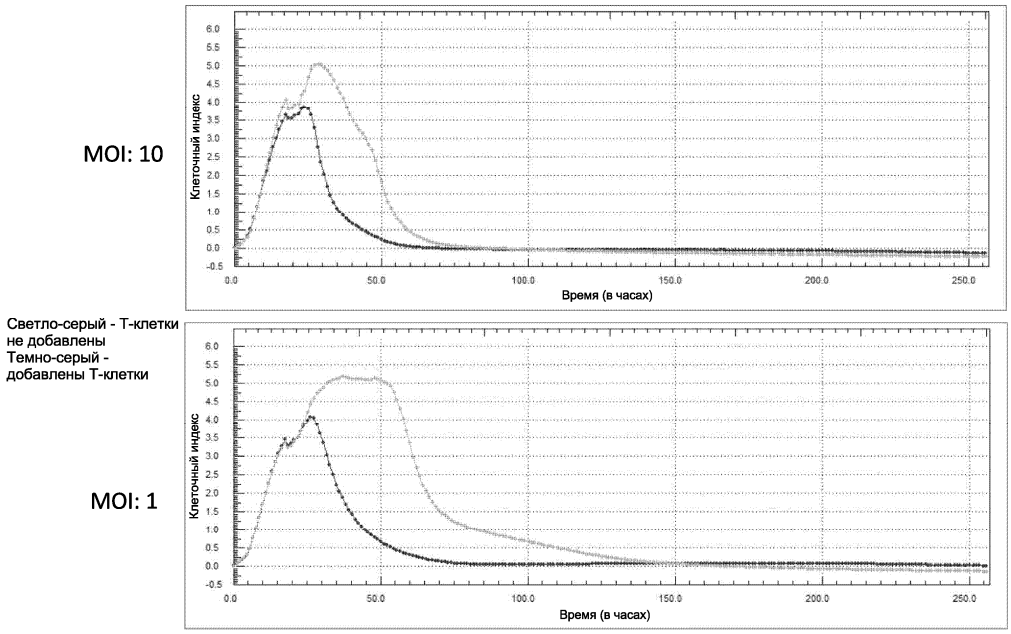
Фиг. 30


С добавленными Т-клетками
Цитотоксичность (%)
0 ч.
24 ч.
48 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
Т-клетки не добавлены
Цитотоксичность (%)
0 ч.
24 ч.
48 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

Фиг. 31


CD69-положительные (%)
80
60
40
20
0
0 ч.
24 ч.
48 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
CD25-положительные (%)
40
30
20
10
0
0 ч.
24 ч.
48 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

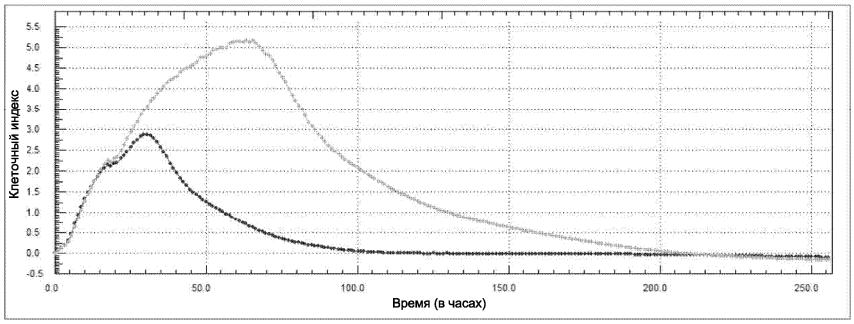
Фиг. 32


MOI: 10
MOI: 1
Светло-серый - Т-клетки не добавлены
Темно-серый - добавлены Т-клетки
Клеточный индекс
Время (в часах)
0.0
50.0
100.0
150.0
200.0
250.0

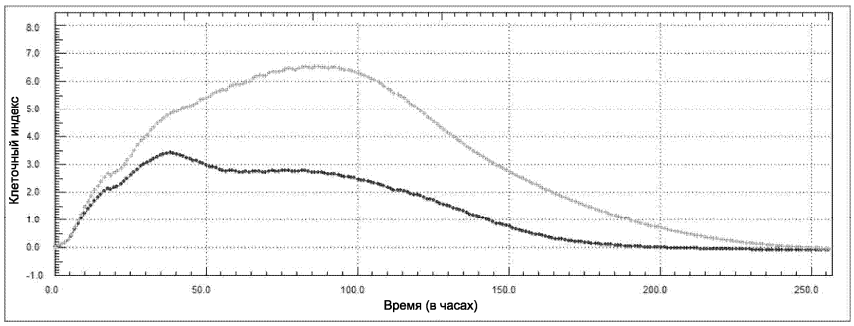
Фиг. 33

MOI: 0.1

Светло-серый - Т-клетки не добавлены
Темно-серый - добавлены Т-клетки



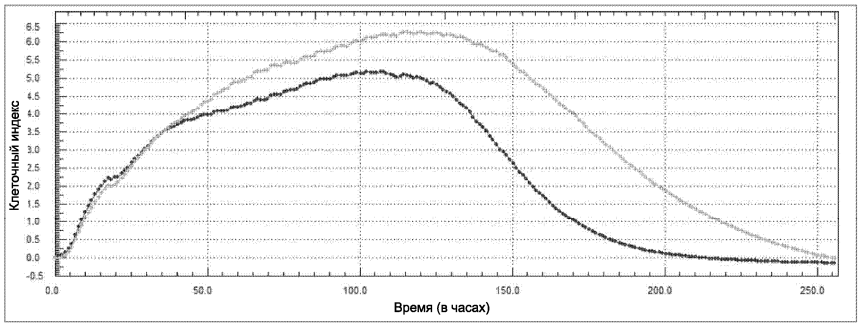
MOI: 0.01



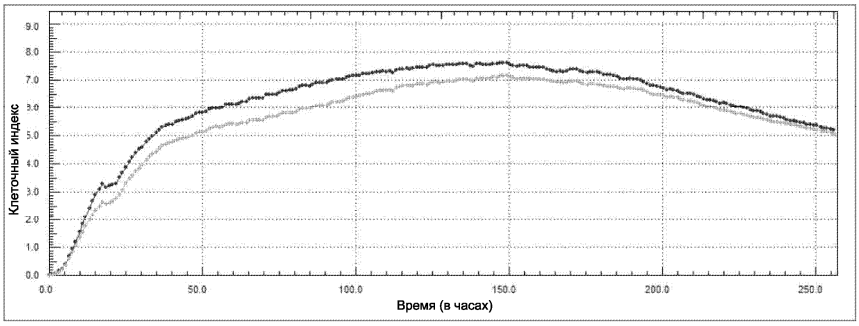
Фиг. 33 (продолжение)

MOI: 0.001

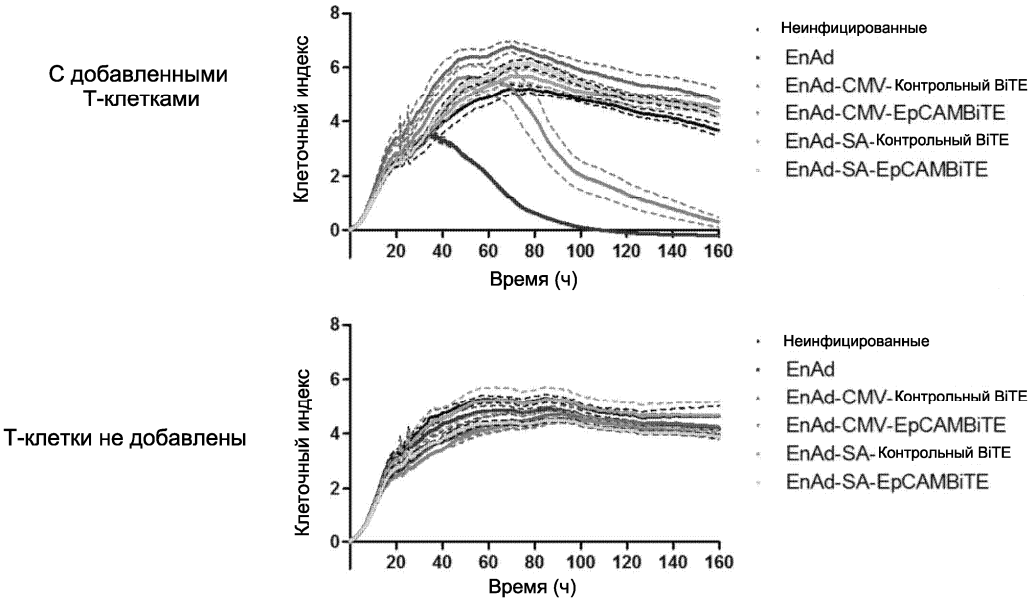
Светло-серый - Т-клетки не добавлены
Темно-серый - добавлены Т-клетки



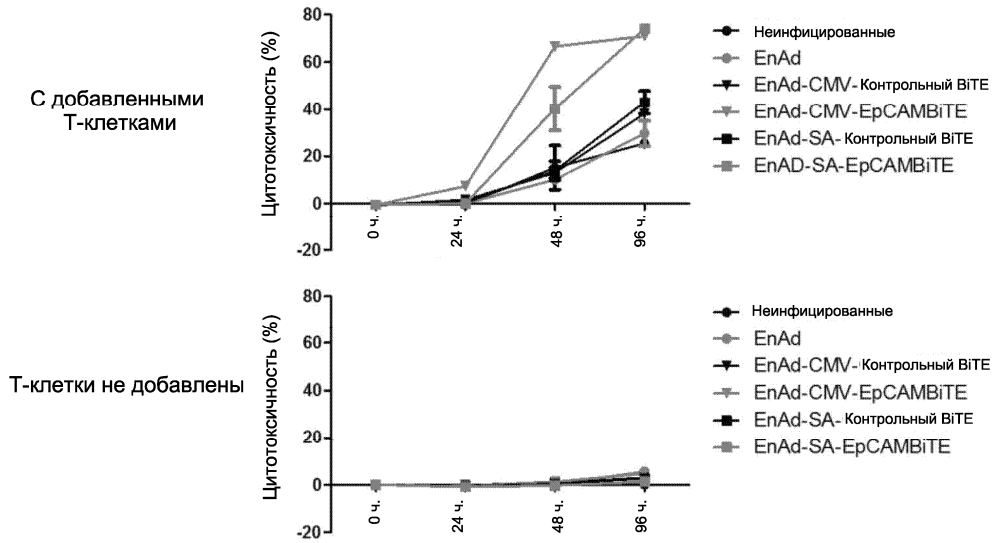
MOI: 0



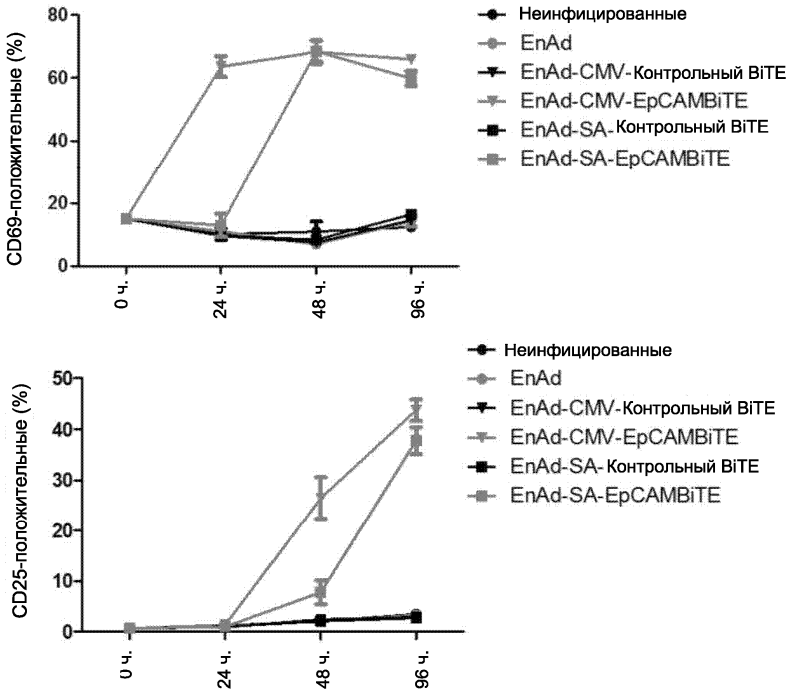
Фиг. 33 (продолжение)


С добавленными Т-клетками
Клеточный индекс
Время (ч)
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
Т-клетки не добавлены
Клеточный индекс
Время (ч)
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

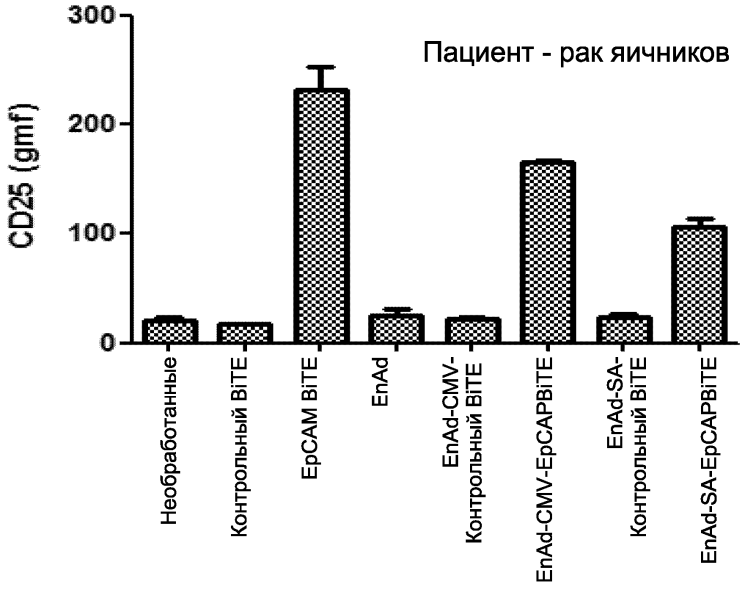
Фиг. 34


С добавленными Т-клетками
Цитотоксичность (%)
0 ч.
24 ч.
48 ч.
96 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAD-SA-EpCAMBiTE
Т-клетки не добавлены
Цитотоксичность (%)
0 ч.
24 ч.
48 ч.
96 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

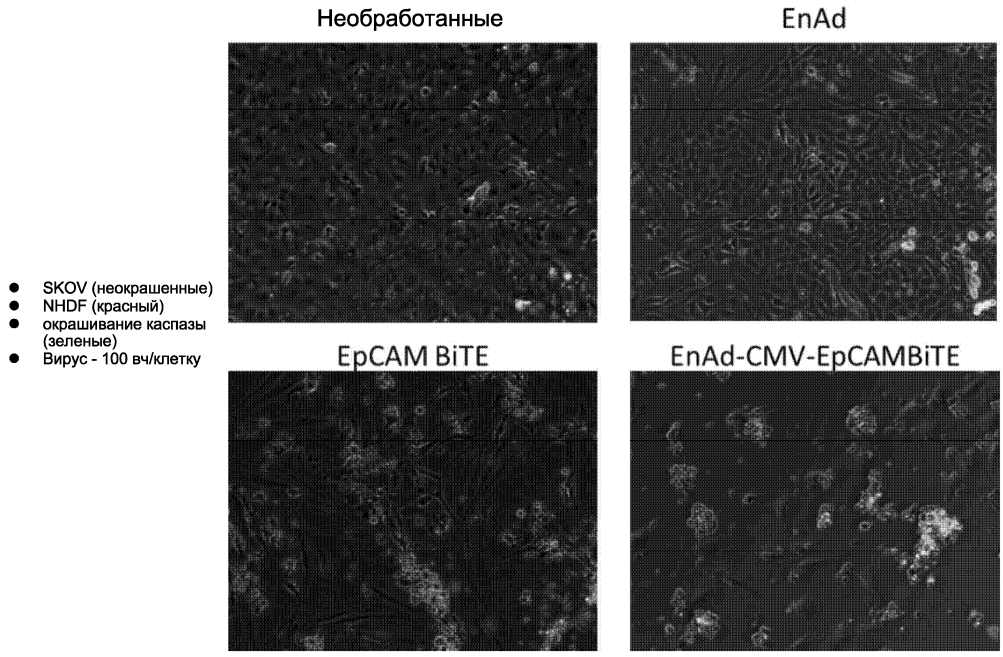
Фиг. 35


CD69-положительные (%)
80
60
40
20
0
0 ч.
24 ч.
48 ч.
96 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
CD25-положительные (%)
50
40
30
20
10
0
0 ч.
24 ч.
48 ч.
96 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

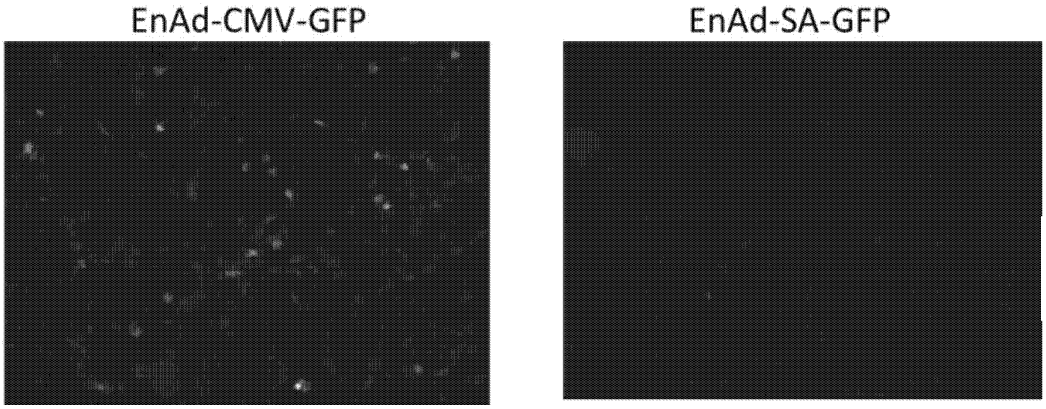
Фиг. 36


Пациент - рак яичников
CD25 (gmf)
300
200
100
0
Необработанные
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAPBiTE

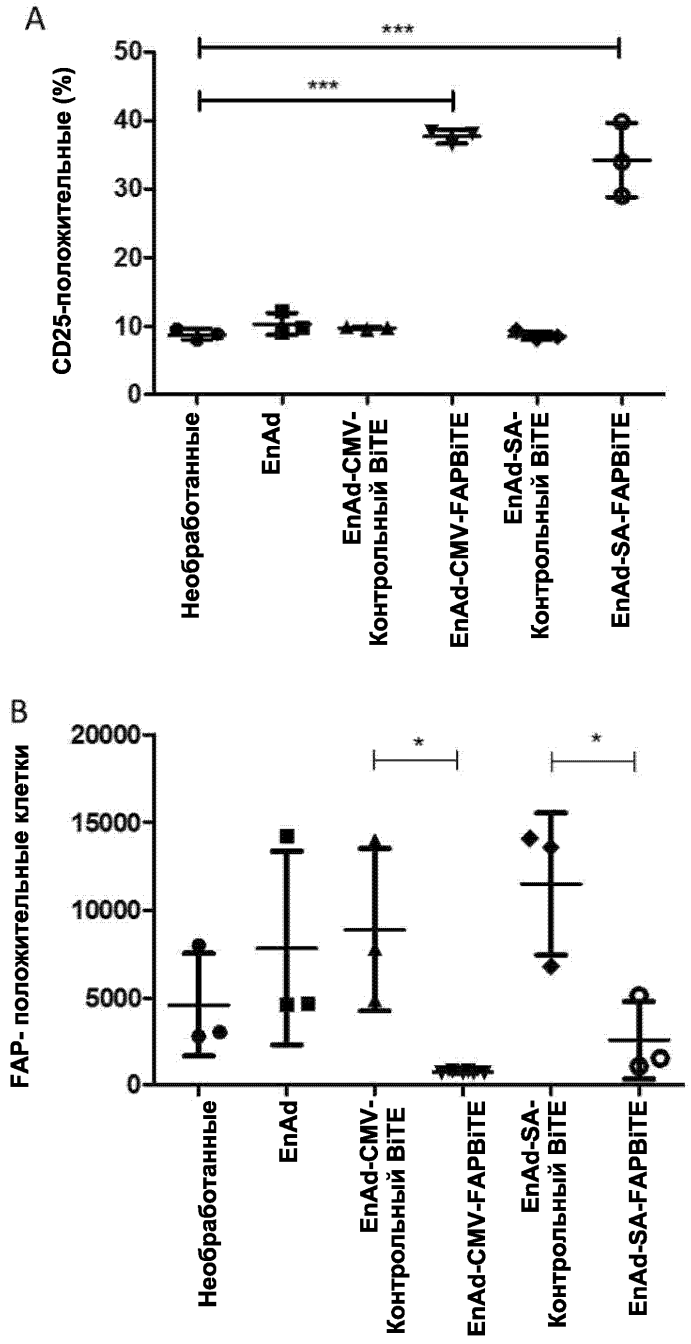
Фиг. 37


Необработанные
EnAd
SKOV (неокрашенные)
NHDF (красный)
окрашивание каспазы (зеленые)
Вирус - 100 вч/клетку
EpCAM BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE

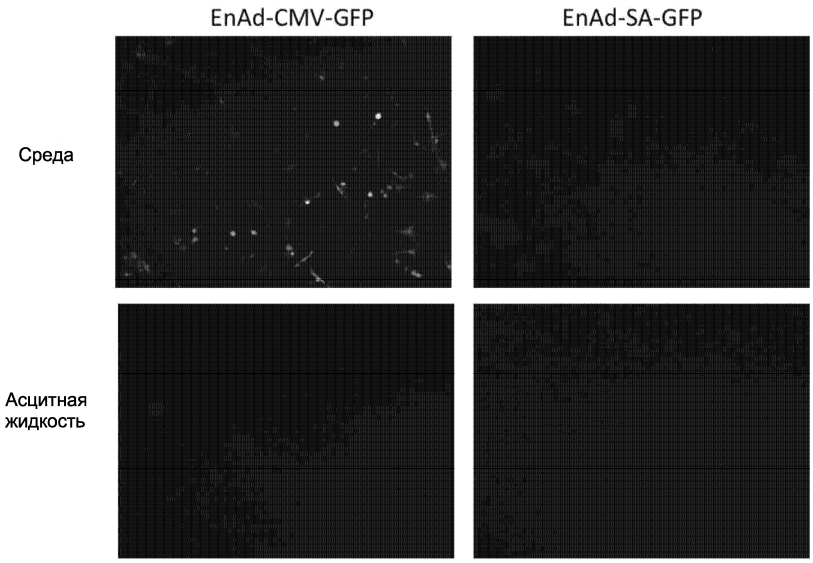
Фиг. 38


EnAd-CMV-GFP
EnAd-SA-GFP

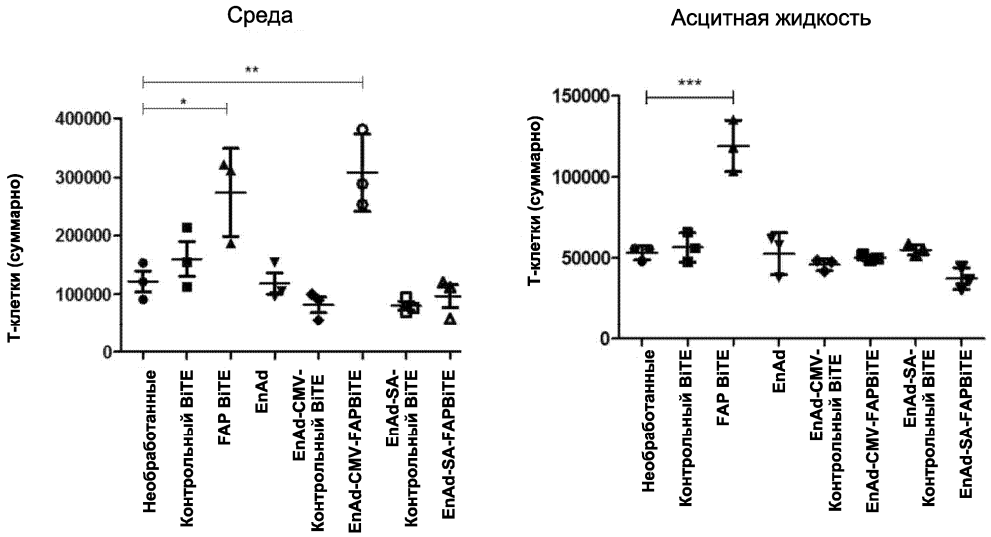
Фиг. 39


A
CD25-положительные (%)
50
40
30
20
10
0
***
***
Необработанные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE
B
FAP- положительные клетки
20000
15000
10000
5000
0
*
*
Необработанные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE

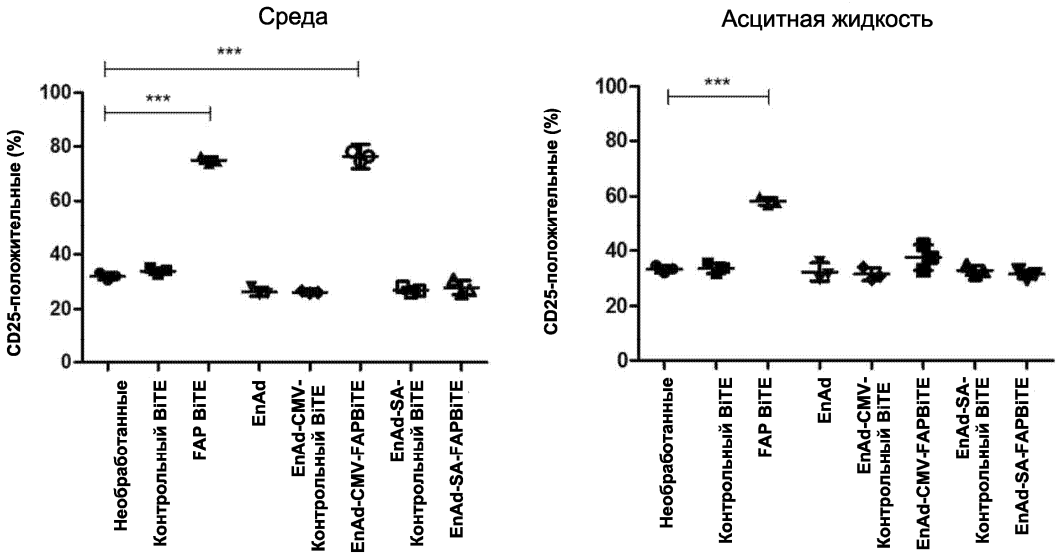
Фиг. 40



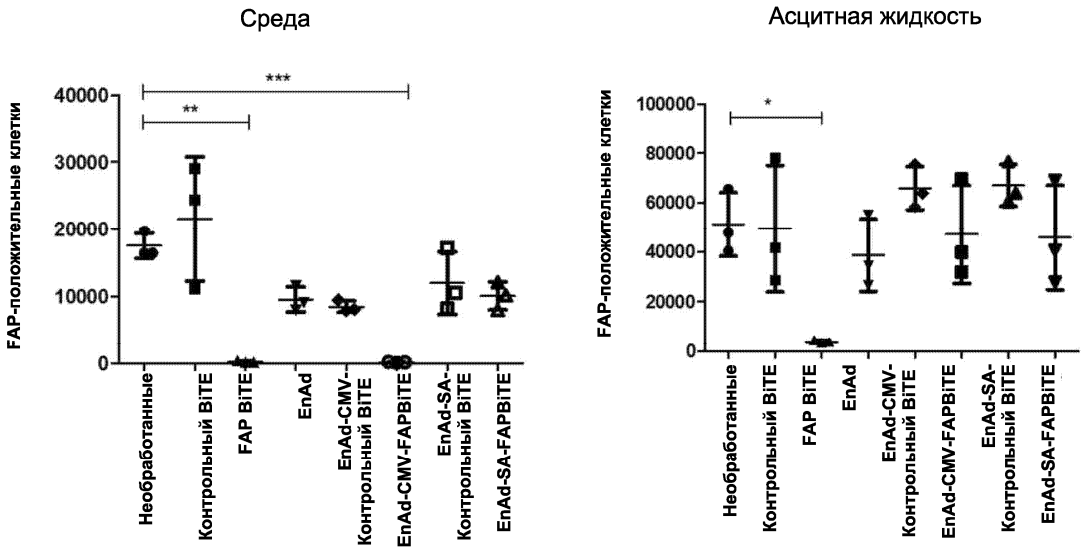
Фиг. 41



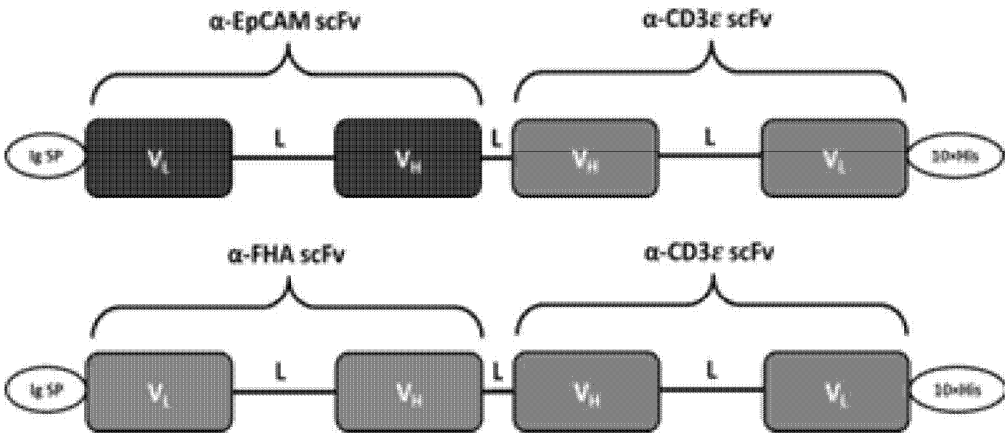
Фиг. 42



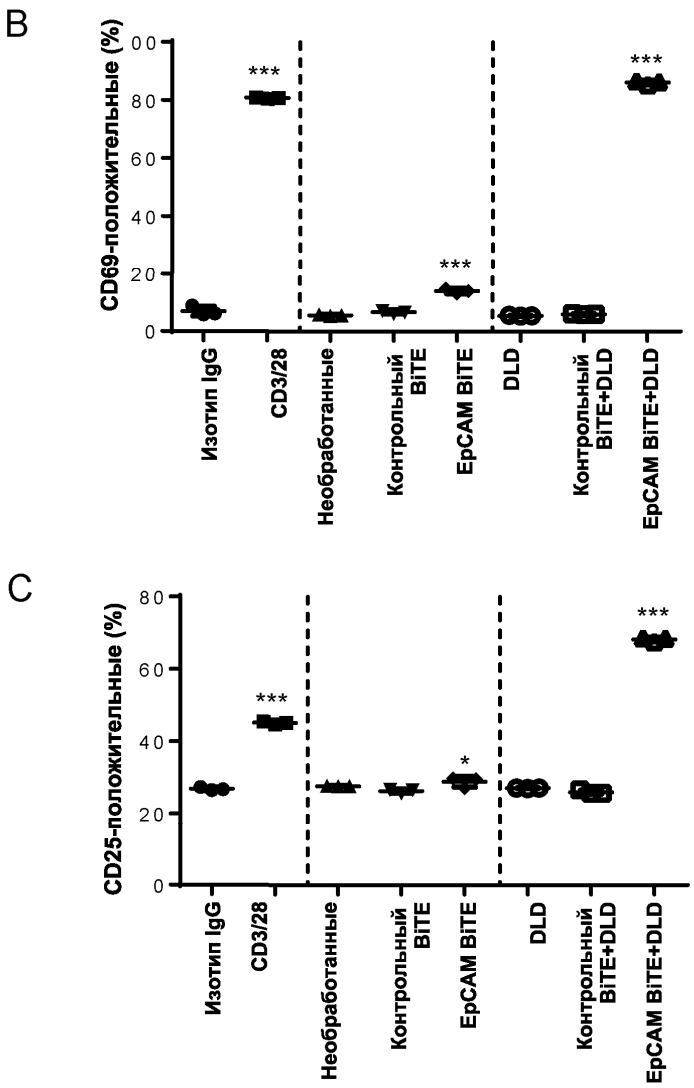
Фиг. 43



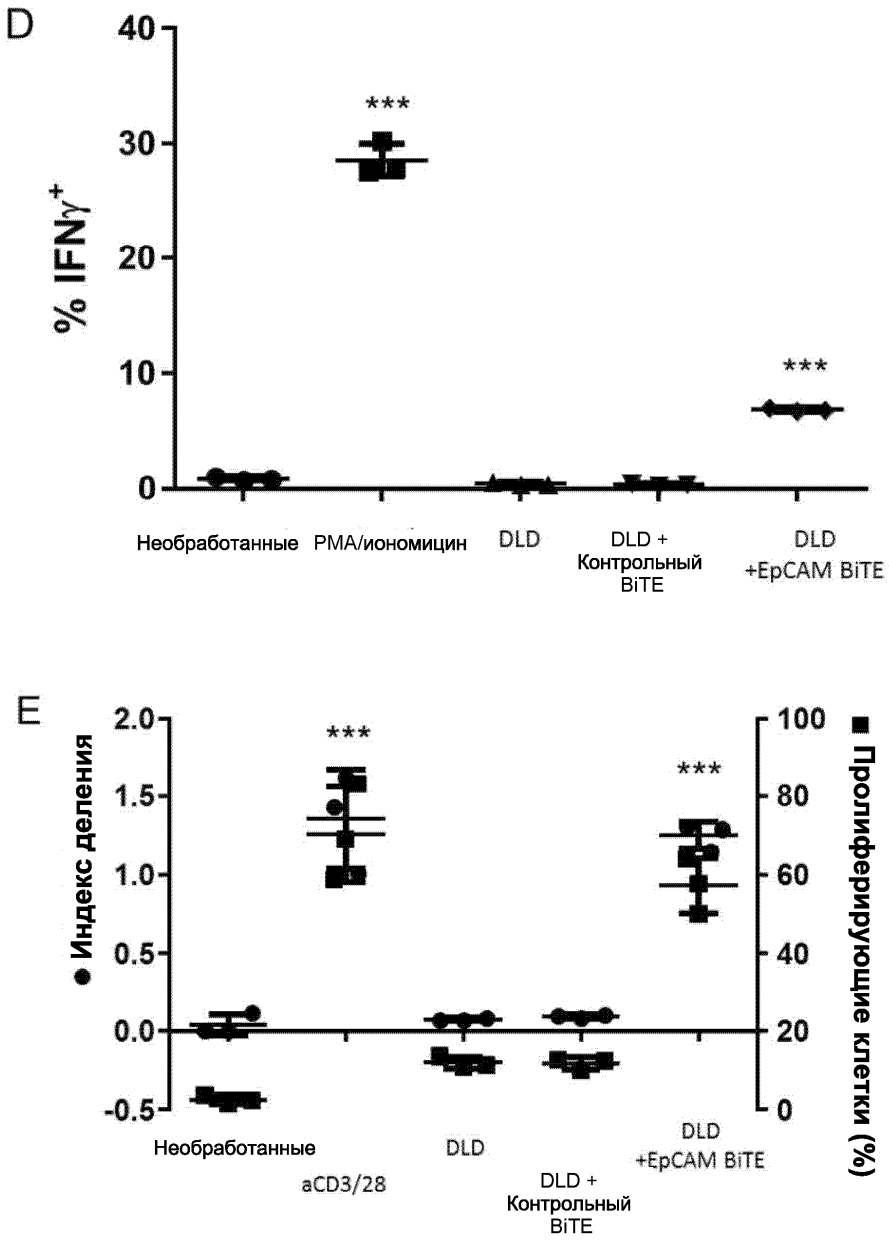
Фиг. 44



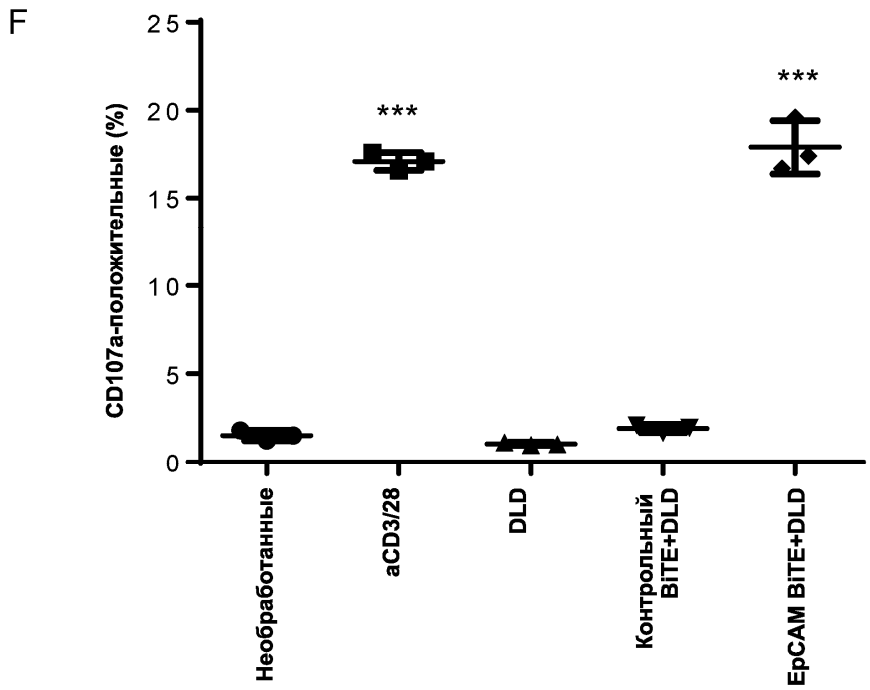
Фиг. 45A



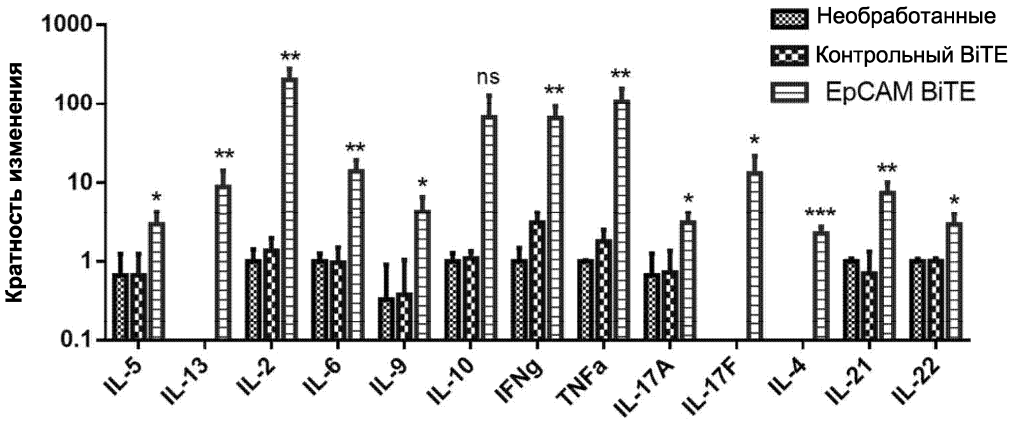
Фиг. 45 (продолжение)



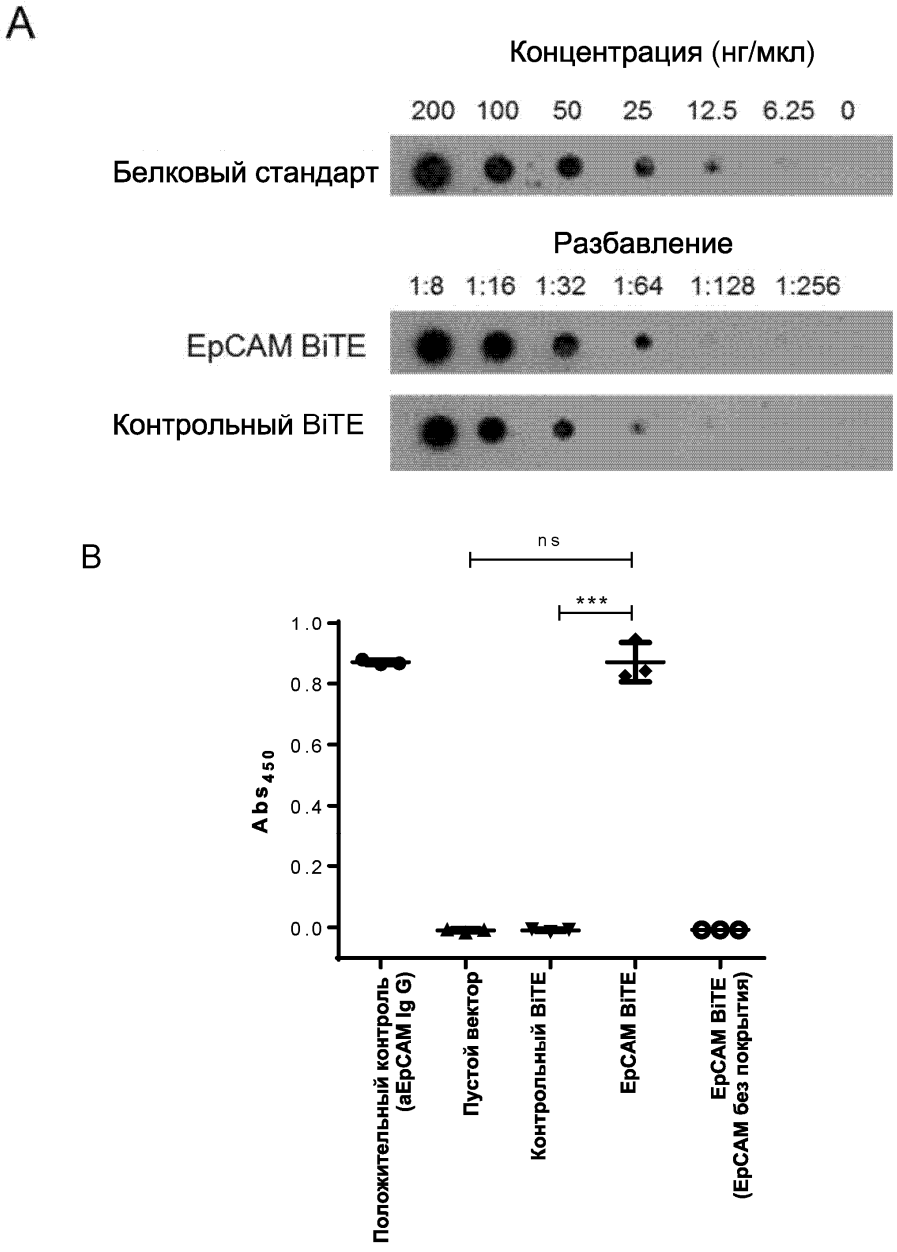
Фиг. 45 (продолжение)



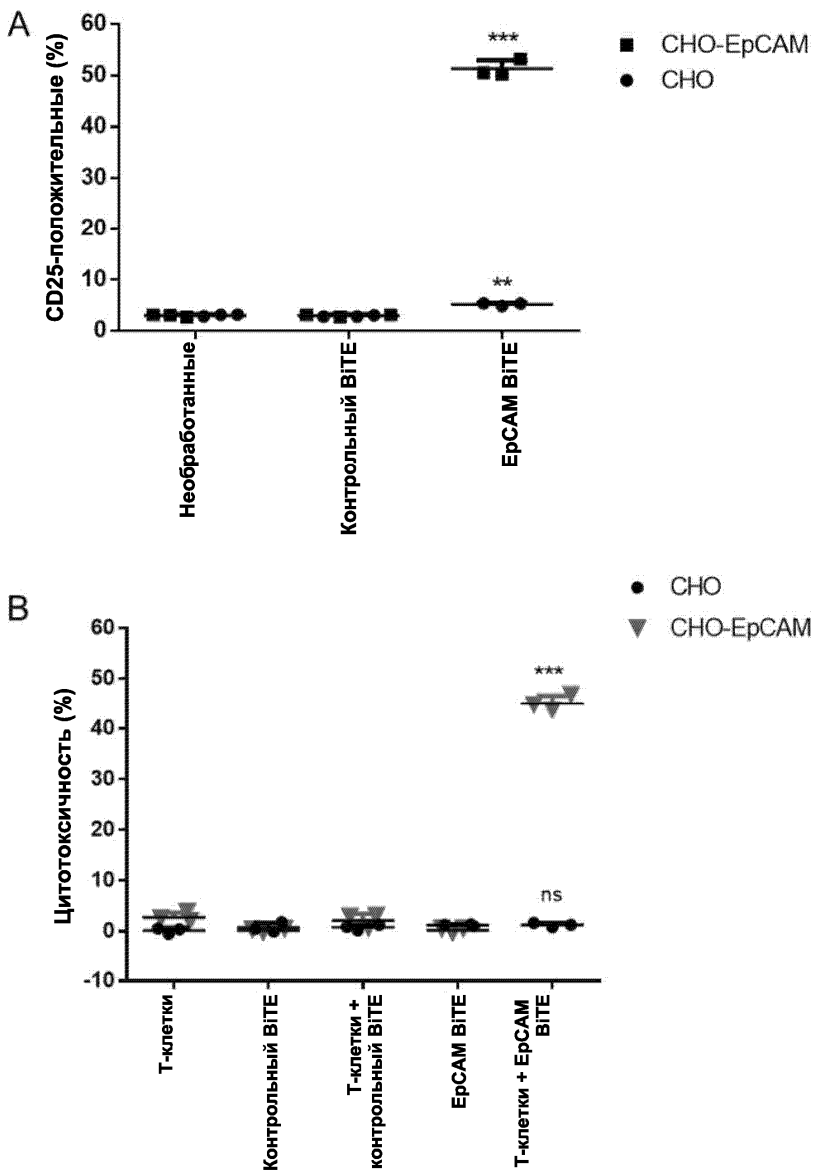
Фиг. 45 (продолжение)



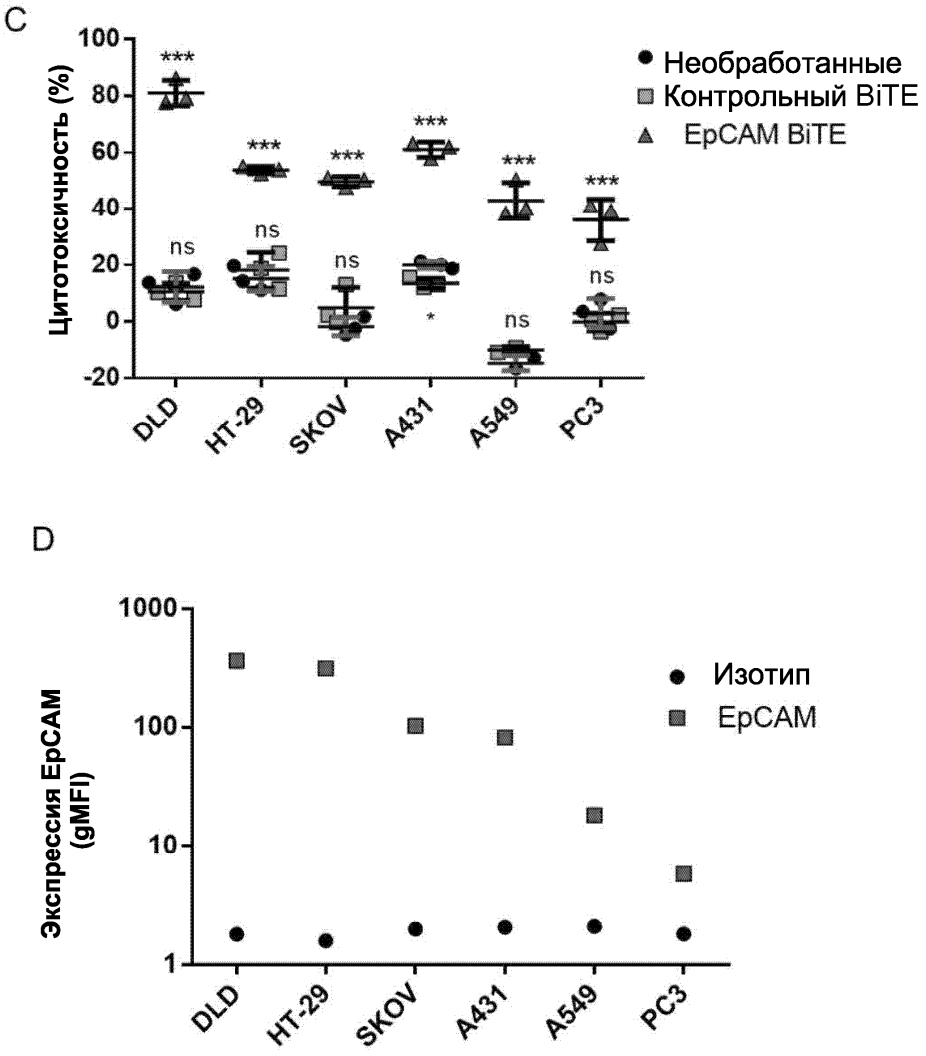
Фиг. 45G


A
Концентрация (нг/мкл)
200 100 50 25 12.5 6.25 0
Белковый стандарт
Разбавление
1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256
EpCAM BiTE
Контрольный BiTE
B
ns
***
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Abs450
Положительный контроль (aEpCAM Ig G)
Пустой вектор
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
EpCAM BiTE (EpCAM без покрытия)

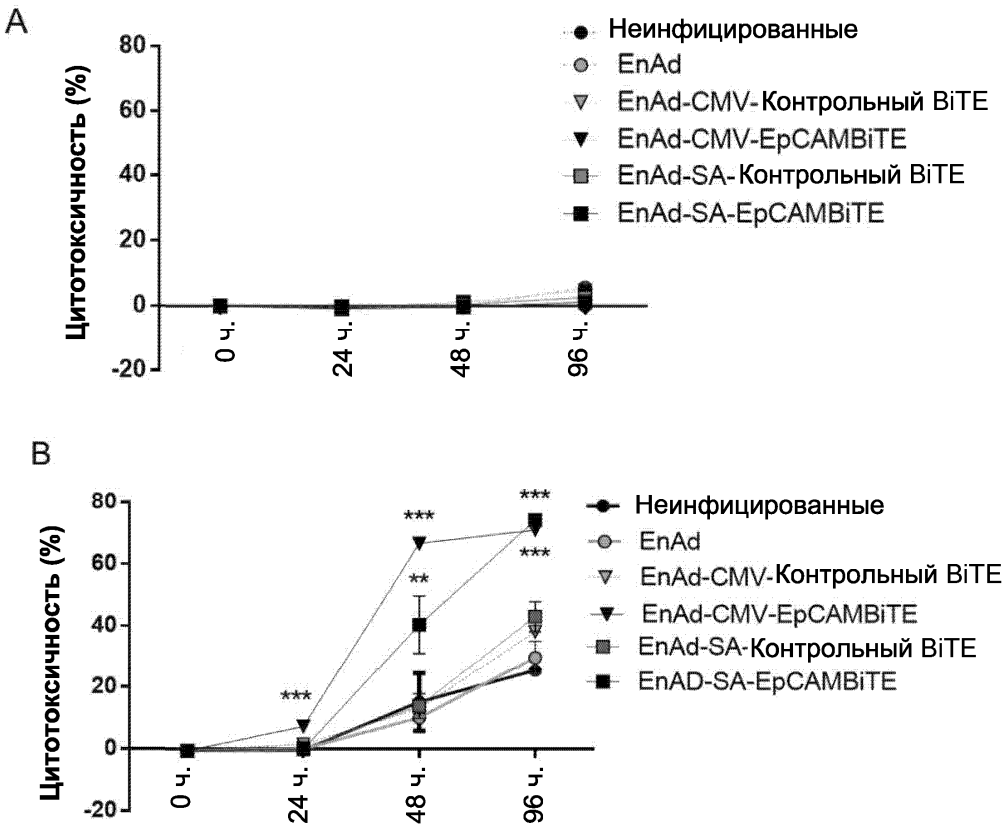
Фиг. 46


A
CD25-положительные (%)
60
50
40
30
20
10
0
***
**
CHO-EpCAM
CHO
Необработанные
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
B
Цитотоксичность (%)
60
50
40
30
20
10
0
-10
***
ns
CHO
CHO-EpCAM
T-клетки
Контрольный BiTE
T-клетки + контрольный BiTE
EpCAM BiTE
T-клетки + EpCAM BiTE

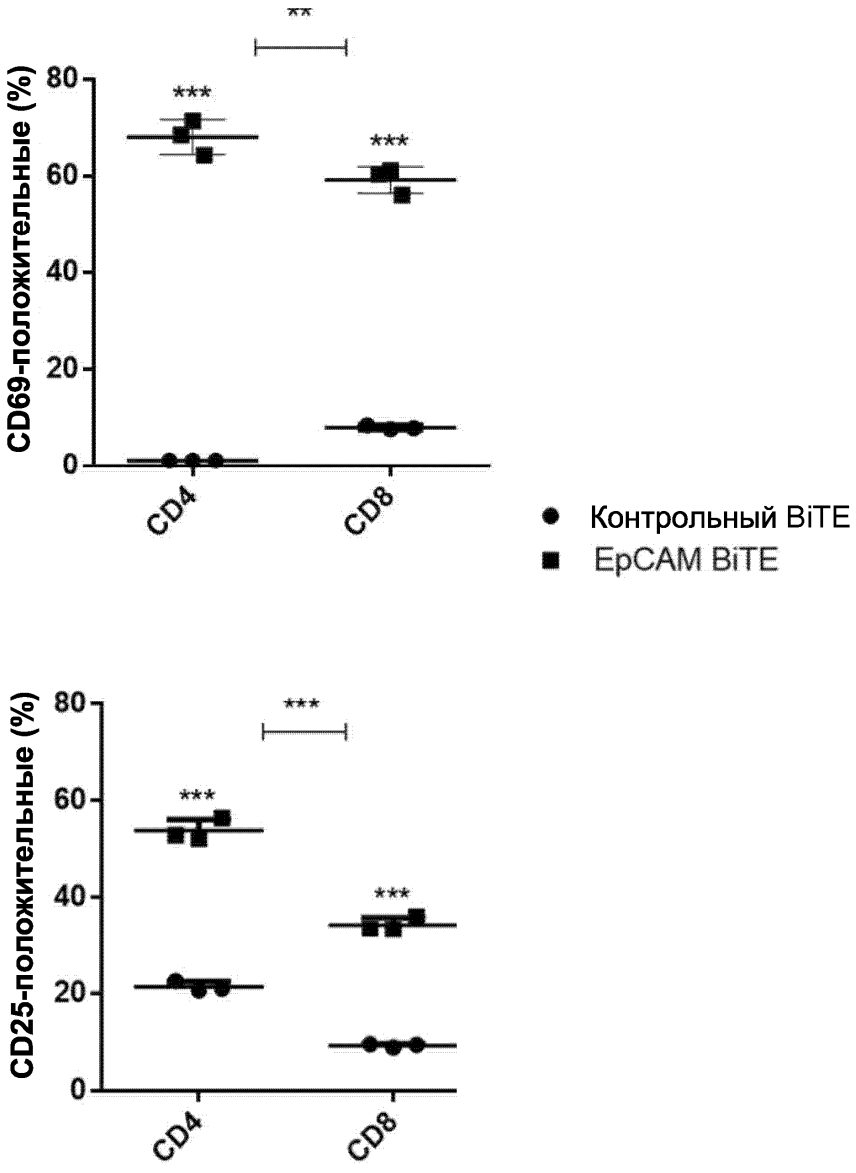
Фиг. 47



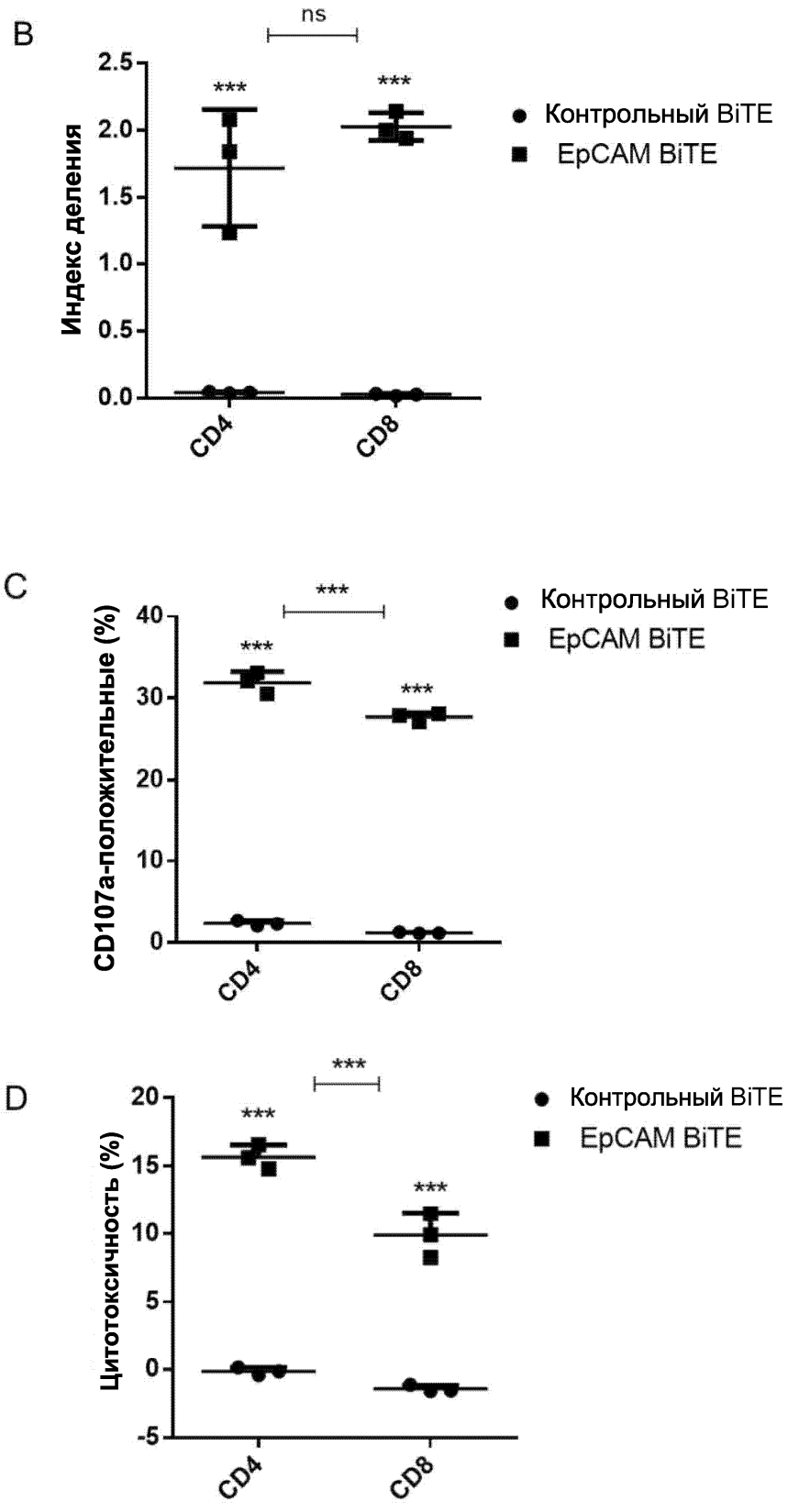
Фиг. 47 (продолжение)


A
Цитотоксичность (%)
80
60
40
20
0
-20
0 ч.
24 ч.
48 ч.
96 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
B
Цитотоксичность (%)
80
60
40
20
0
-20
0 ч.
24 ч.
48 ч.
96 ч.
***
**
***
***
***
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAD-SA-EpCAMBiTE

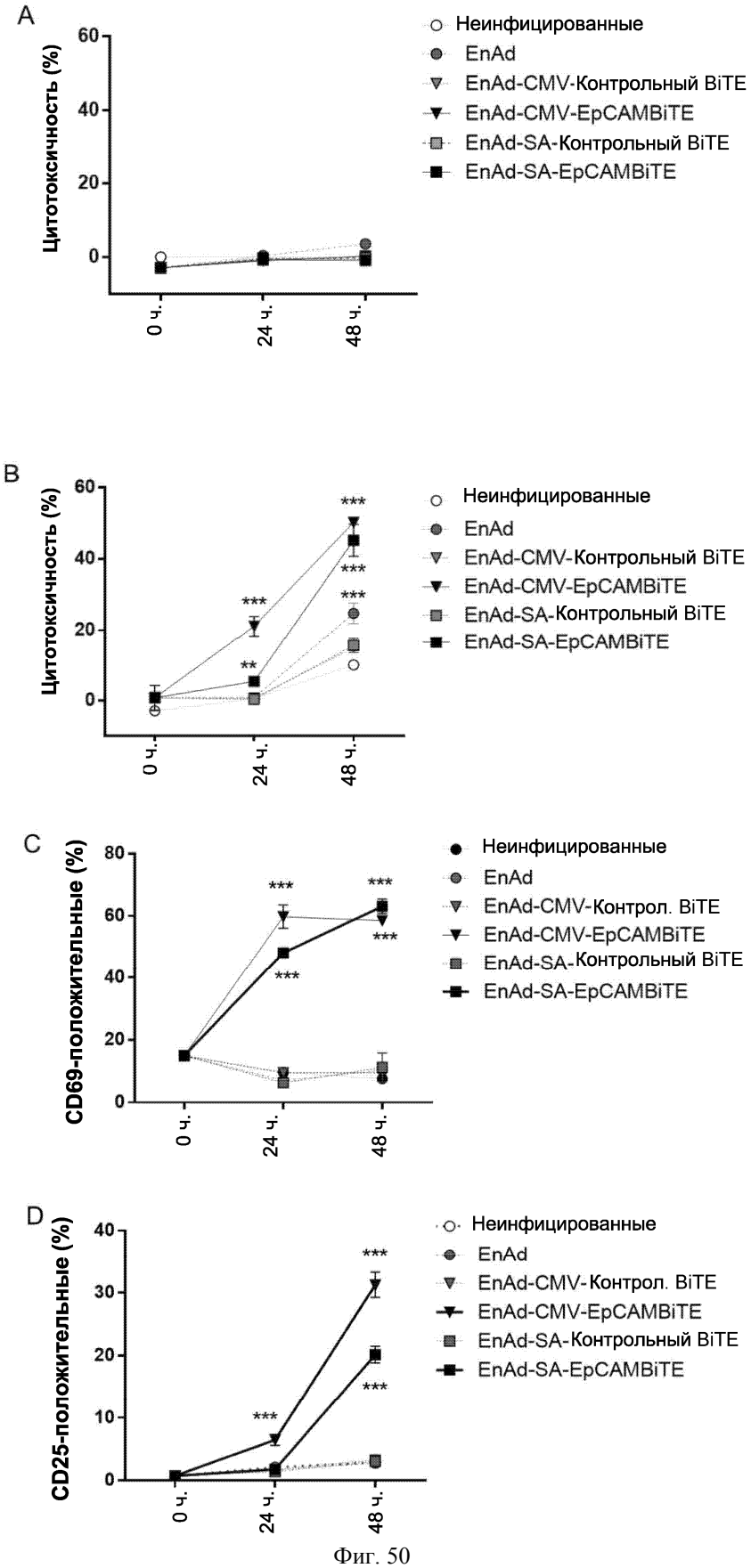
Фиг. 48


**
***
***
CD69-положительные (%)
80
60
40
20
0
CD4
CD8
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
***
***
***
CD25-положительные (%)
80
60
40
20
0
CD4
CD8

Фиг. 49A

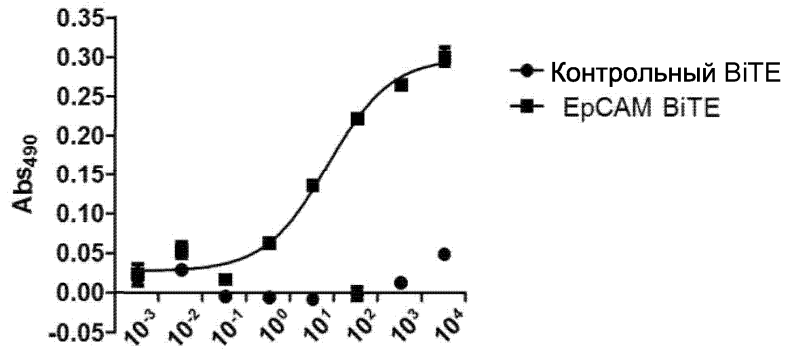


Фиг. 49 (продолжение)


A
Цитотоксичность (%)
60
40
20
0
0 ч.
24 ч.
48 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
B
Цитотоксичность (%)
***
**
C
CD69-положительные (%)
80
60
40
20
0
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрол. BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
D
CD25-положительные (%)
40
30
20
10
0

Фиг. 50

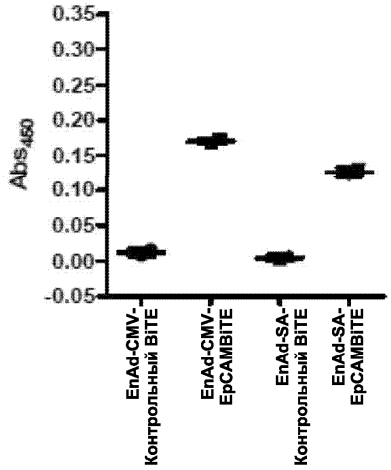
E



Концентрация BiTE [нг/мл]

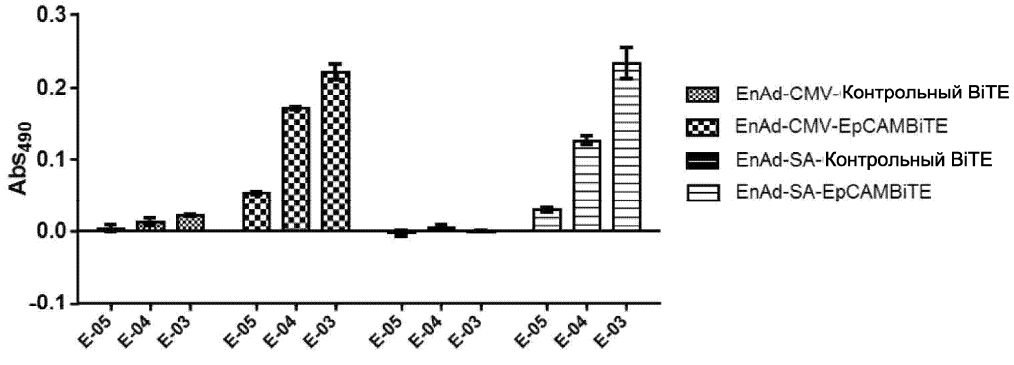
EC50 7.444

F



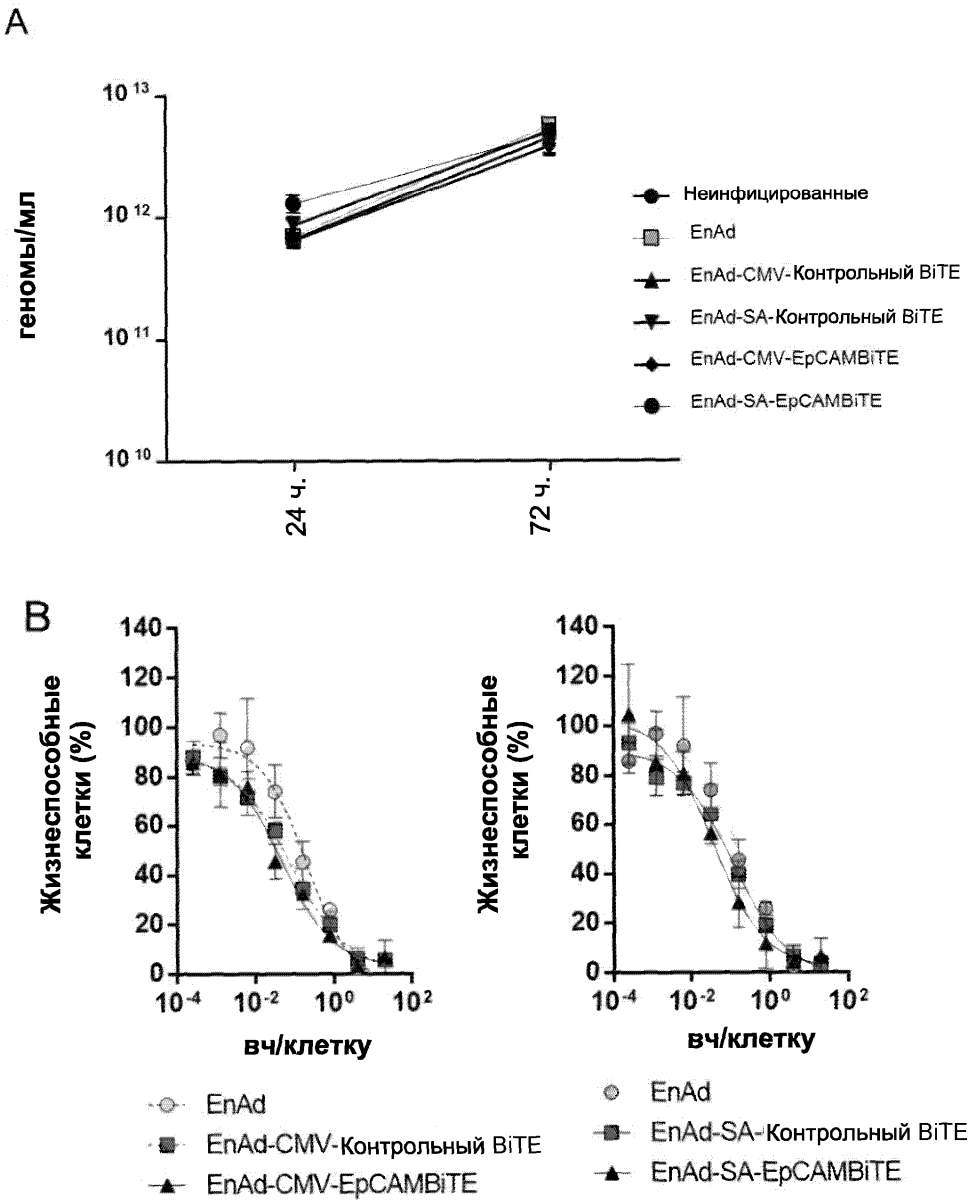
Инфицированный супернатант DLD

G

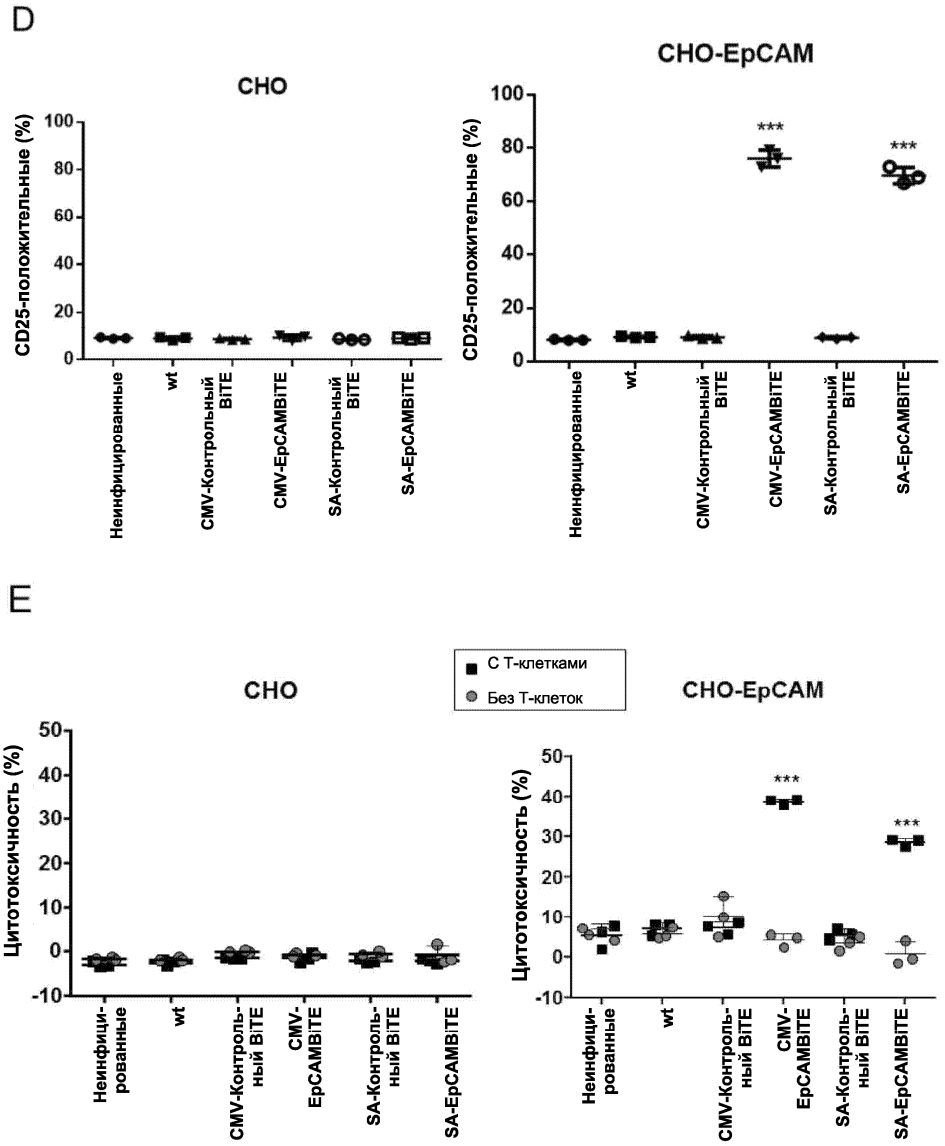


Коэффициент разбавления

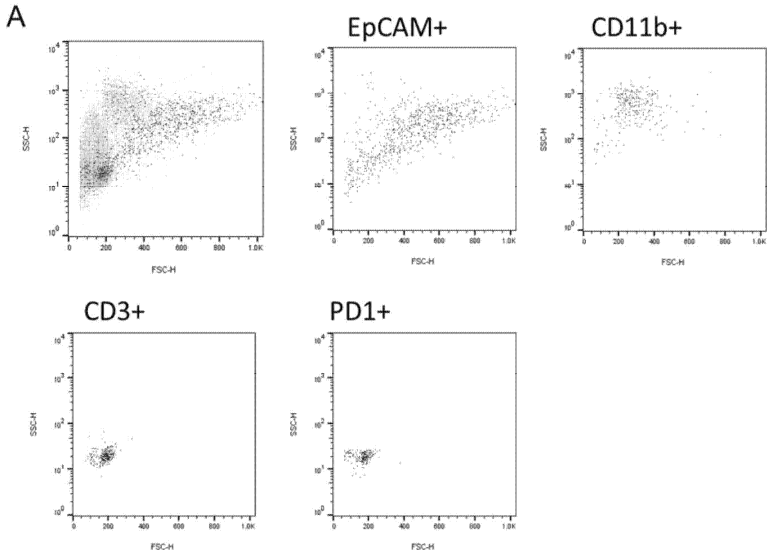
Фиг. 50 (продолжение)


A
геномы/мл
10 13
10 12
10 11
10 10
24 ч.
72 ч.
Неинфицированные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
B
Жизнеспособные клетки (%)
вч/клетку
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
C
кДа:
Неинфицированные
wt
CMV-Контрольный BiTE
SA-Контрольный BiTE
CMV-EpCAMBiTE
SA-EpCAMBiTE
100 -
70 -
55 -
35 -

Фиг. 51



Фиг. 51 (продолжение)



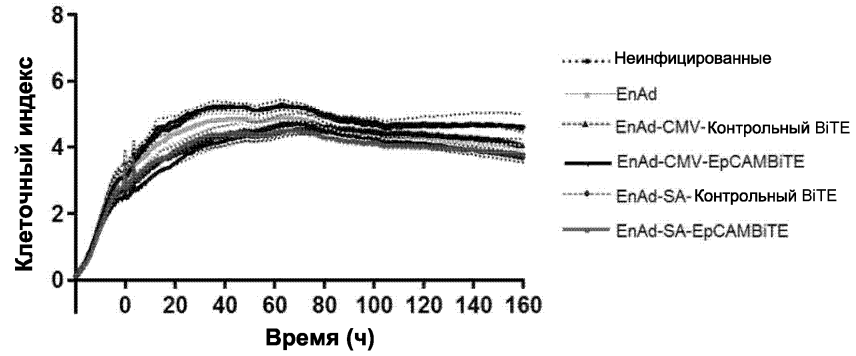
Фиг. 52

B

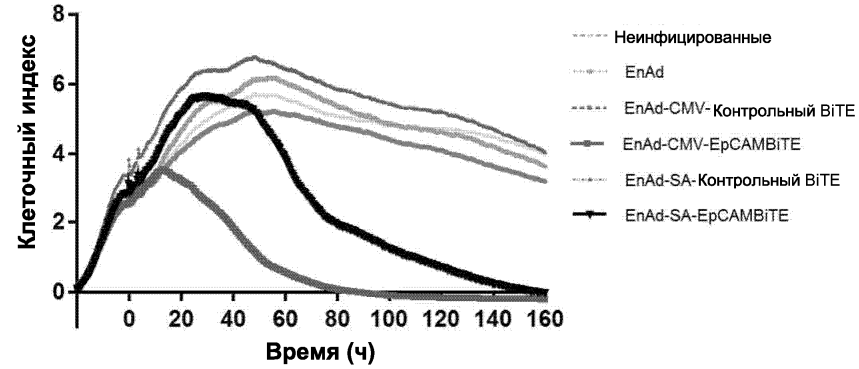
Субпопуляция	Количество
EpCAM	749
CD3	289
PD1	206
CD11b	277
Всего:	10000

Фиг. 52

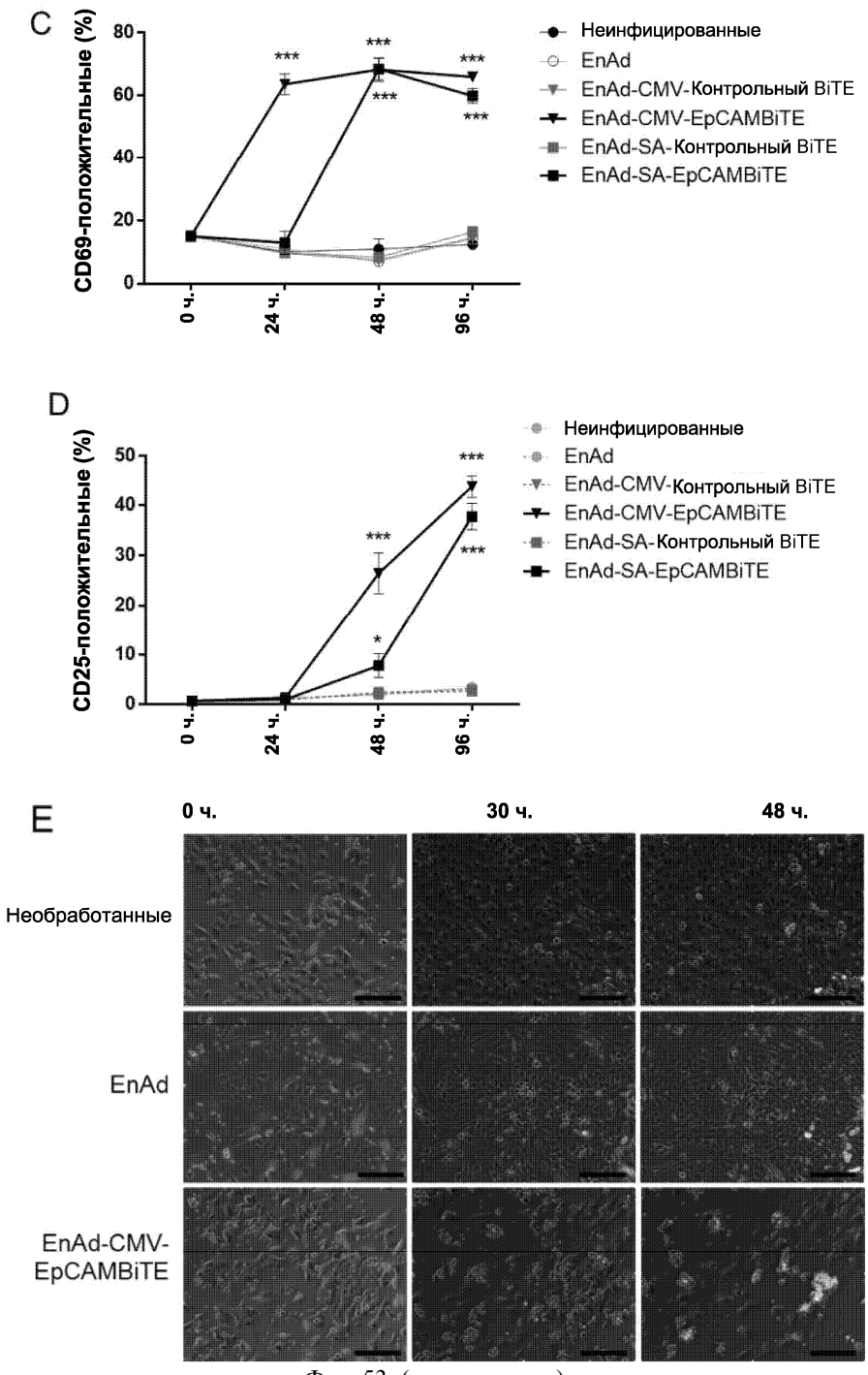
A



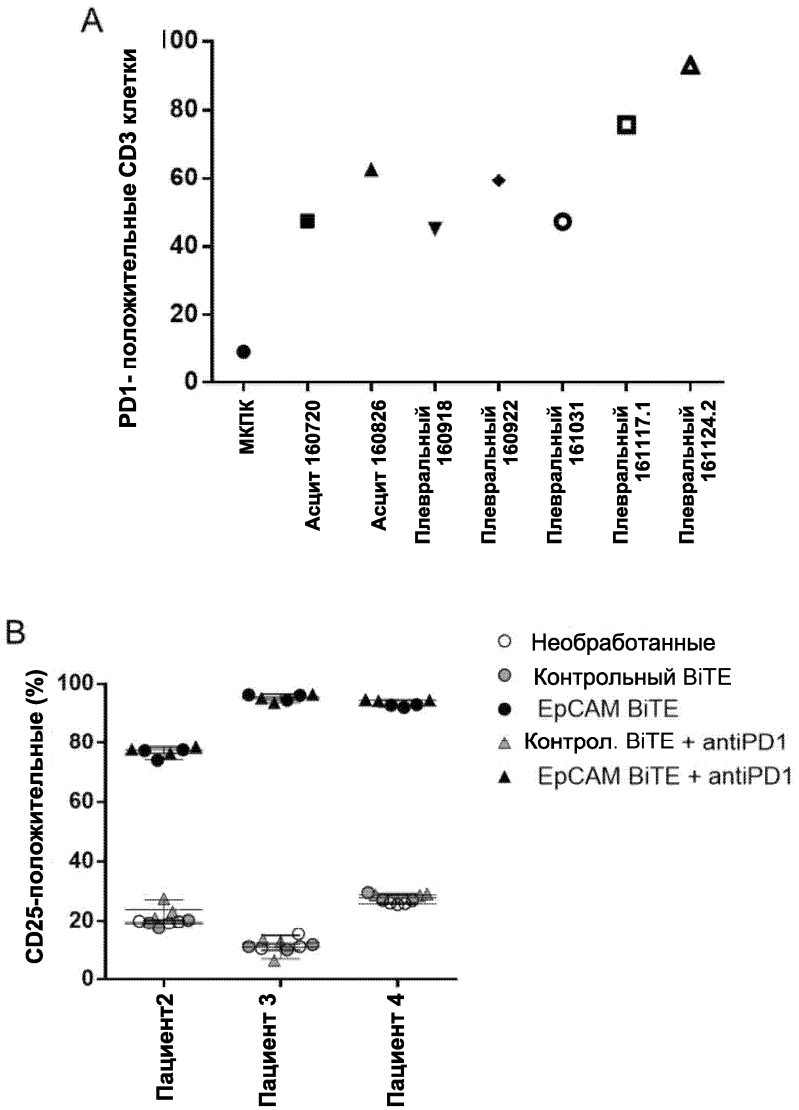
B



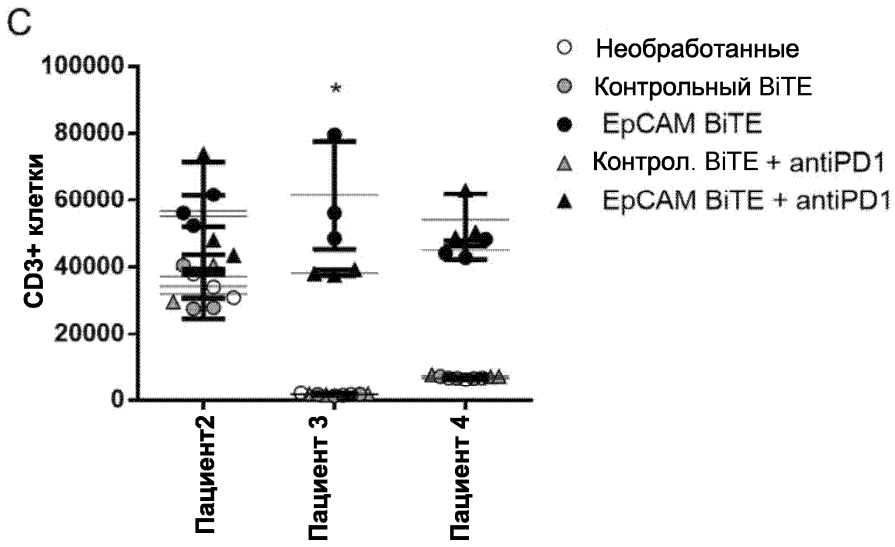
Фиг. 53

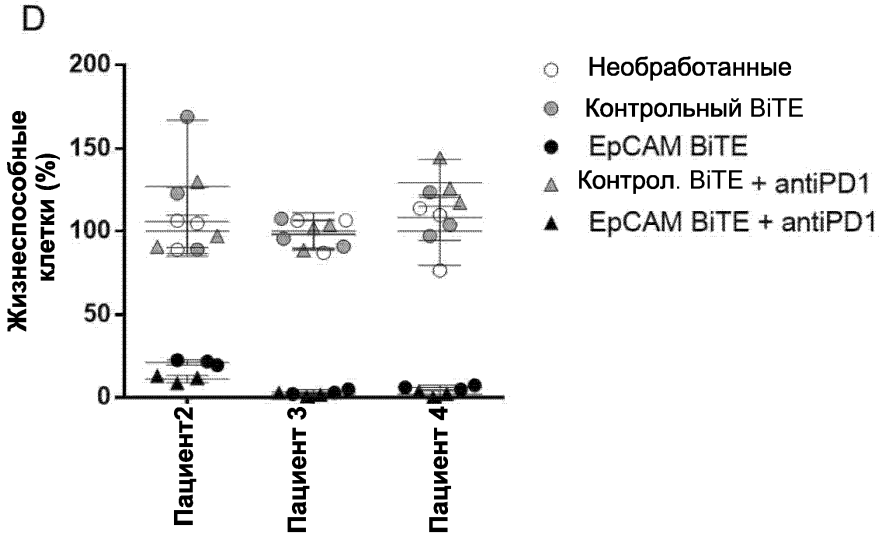


Фиг. 53 (продолжение)

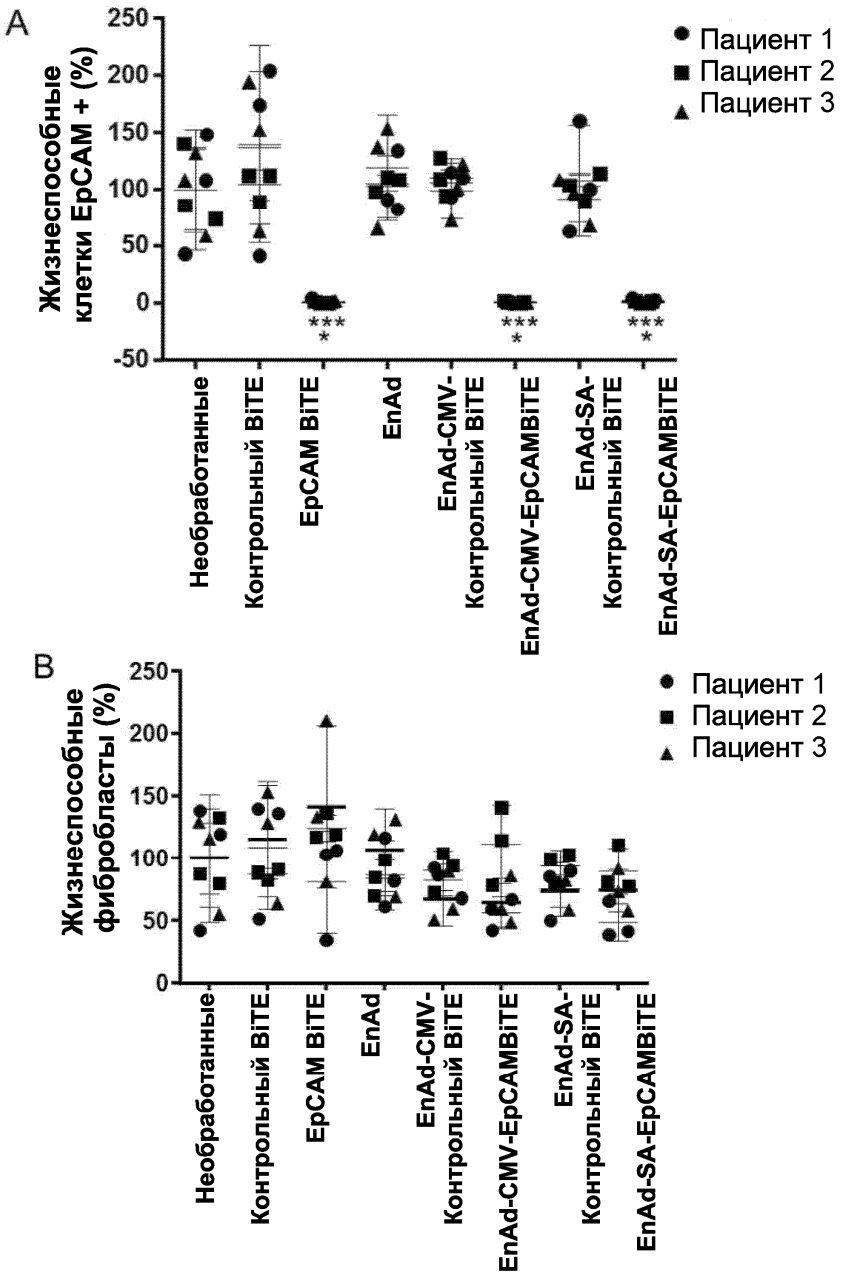

A
PD1- положительные CD3 клетки
100
80
60
40
20
0
МКПК
Асцит 160720
Асцит 160826
Плевральный 160918
Плевральный 160922
Плевральный 161031
Плевральный 161117.1
Плевральный 161124.2
B
CD25-положительные (%)
100
80
60
40
20
0
Пациент2
Пациент 3
Пациент 4
Необработанные
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
Контрол. BiTE + antiPD1
EpCAM BiTE + antiPD1

Фиг. 54

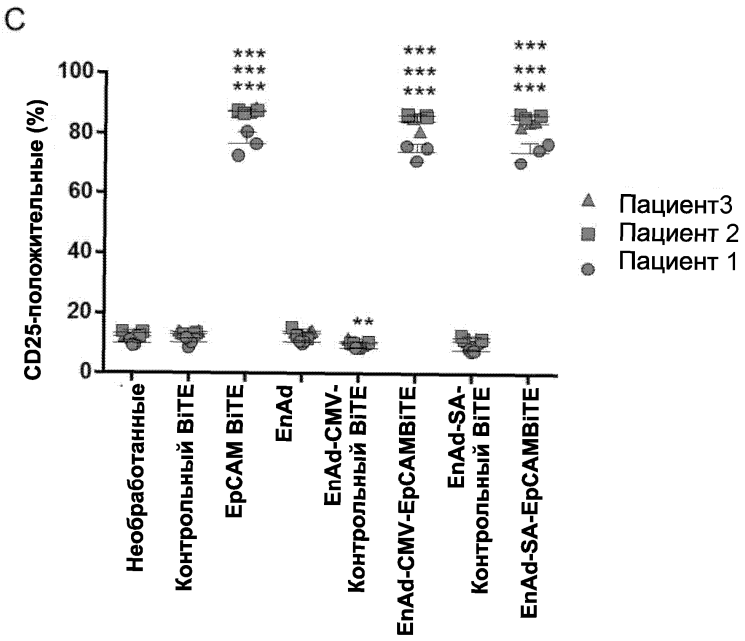




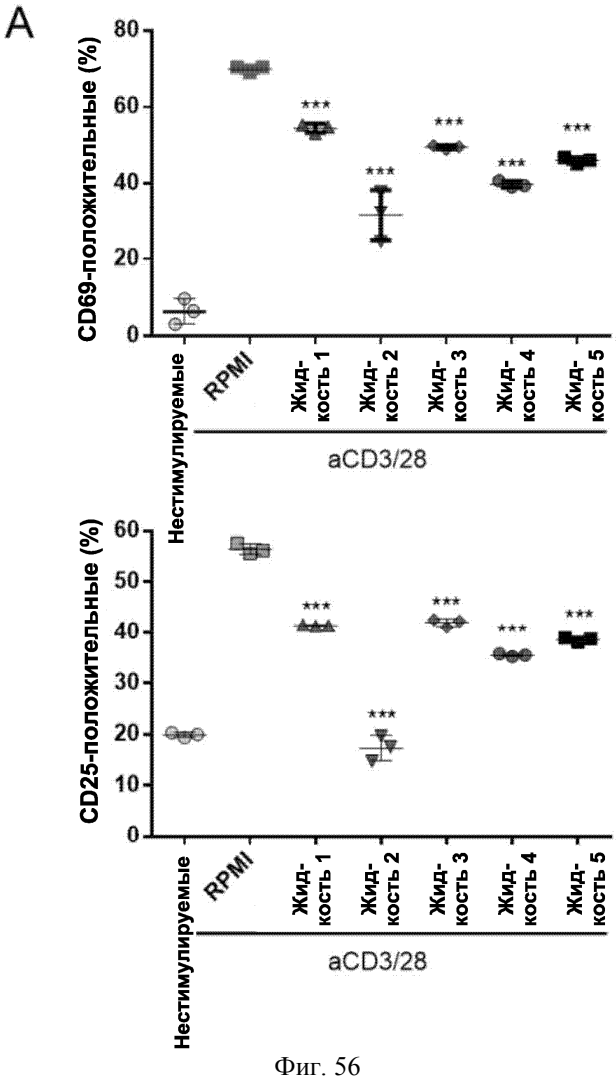
Фиг. 54 (продолжение)


A
Жизнеспособные клетки EpCAM + (%)
250
200
150
100
50
0
-50
***
*
***
*
***
*
Пациент 1
Пациент 2
Пациент 3
Необработанные
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
B
Жизнеспособные фибробласты (%)
250
200
150
100
50
0
Пациент 1
Пациент 2
Пациент 3
Необработанные
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

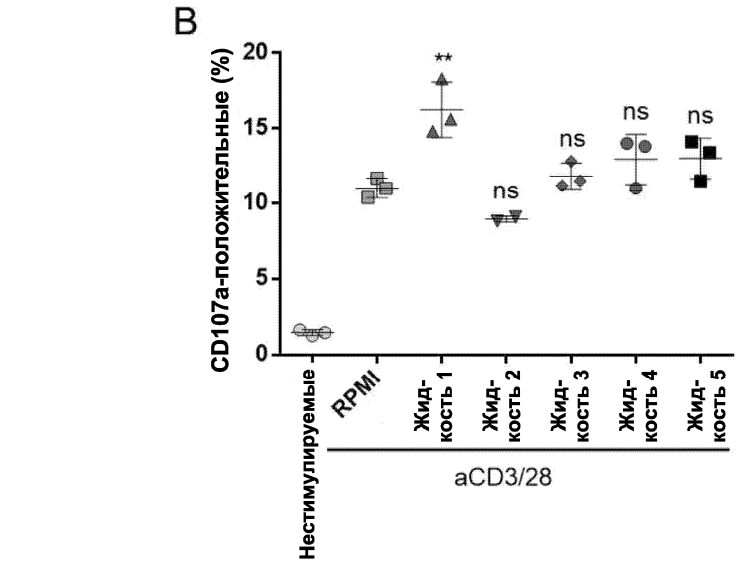
Фиг. 55

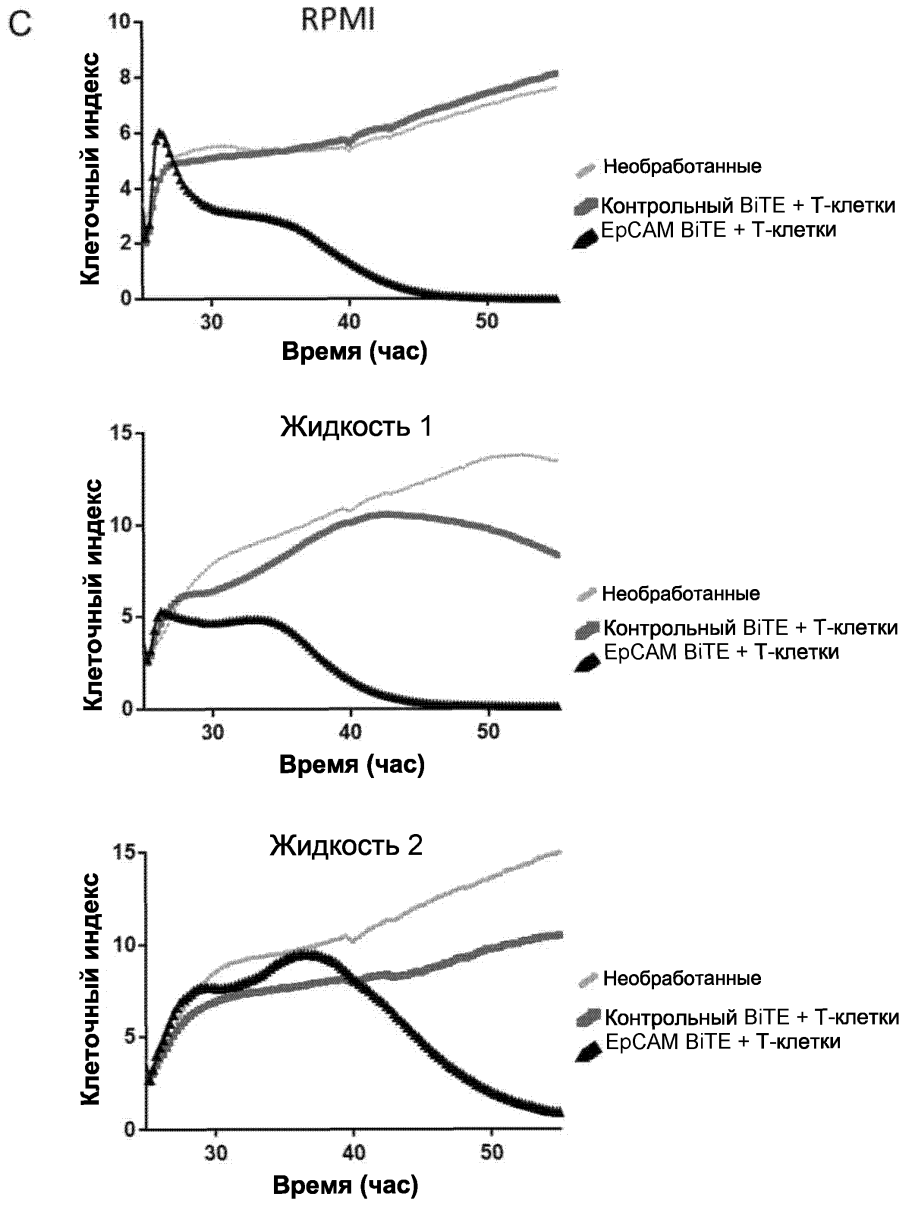


Фиг. 55 (продолжение)

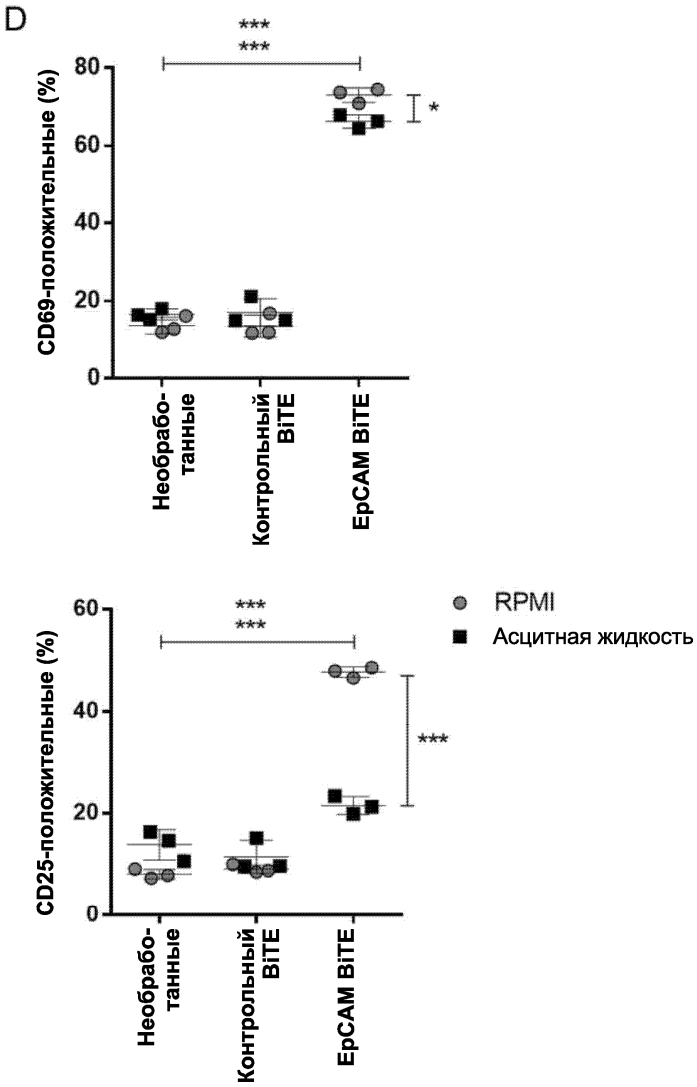


Фиг. 56

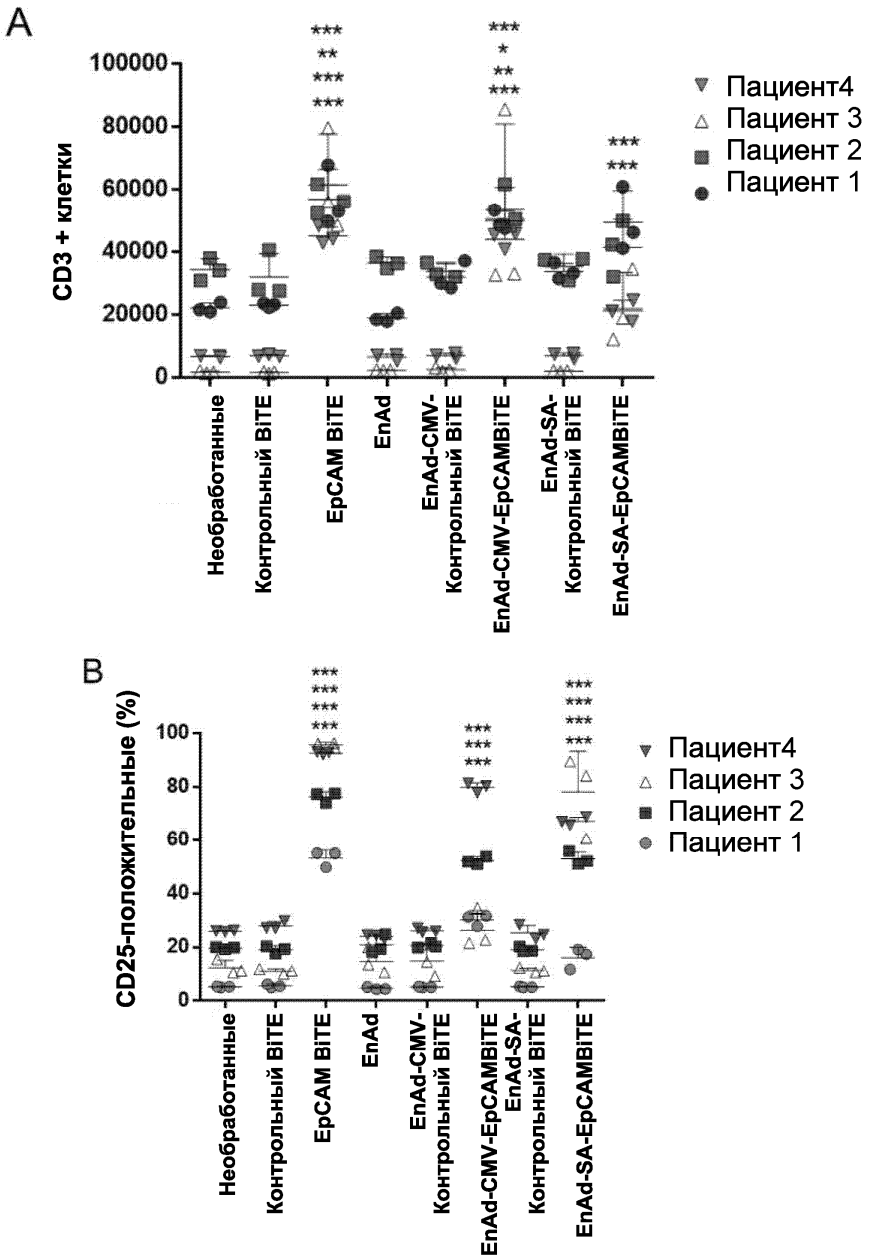




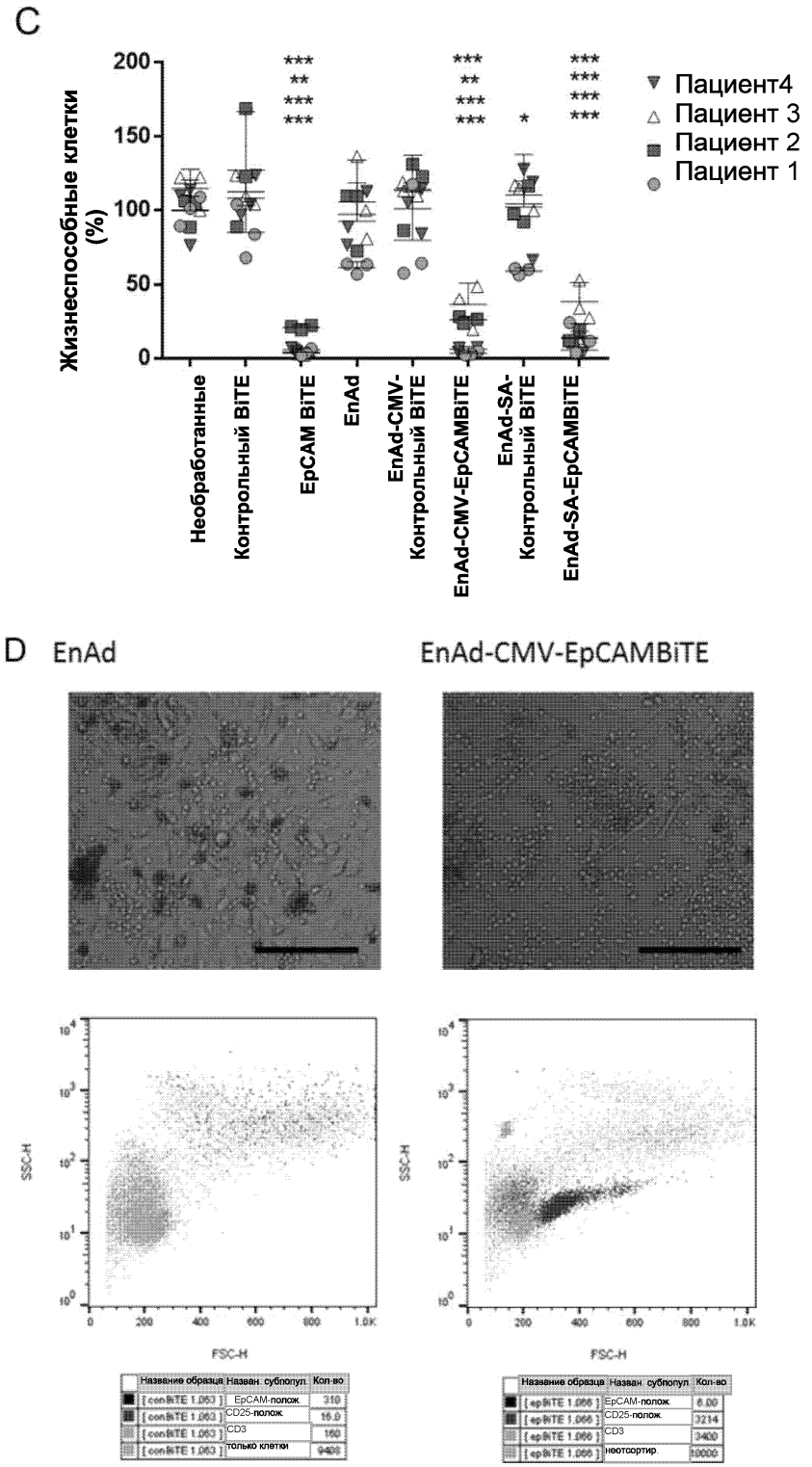
Фиг. 56 (продолжение)



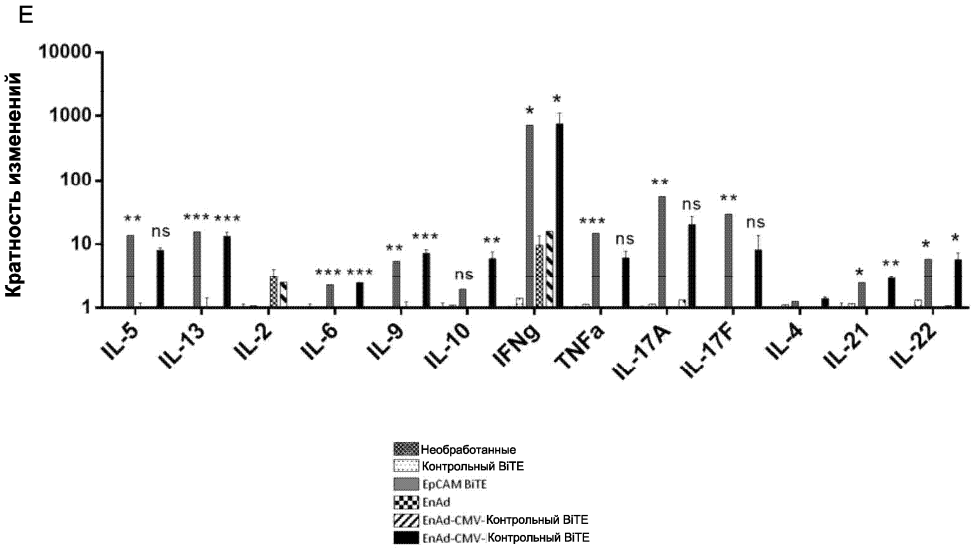
Фиг. 56 (продолжение)


A
CD3 + клетки
100000
80000
60000
40000
20000
0
Пациент4
Пациент 3
Пациент 2
Пациент 1
Необработанные
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
B
CD25-положительные (%)
100
80
60
40
20
0
Пациент4
Пациент 3
Пациент 2
Пациент 1
Необработанные
Контрольный BiTE
EpCAM BiTE
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

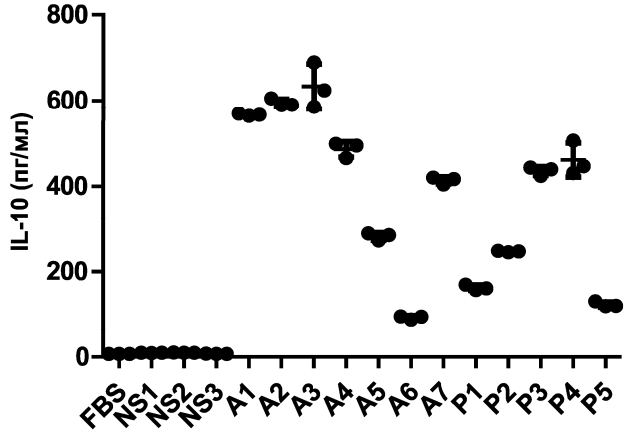
Фиг. 57



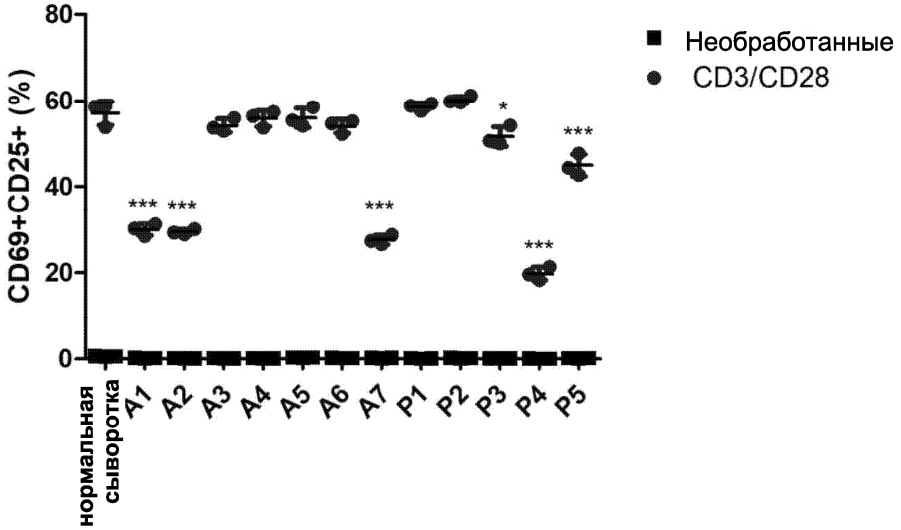
Фиг. 57 (продолжение)



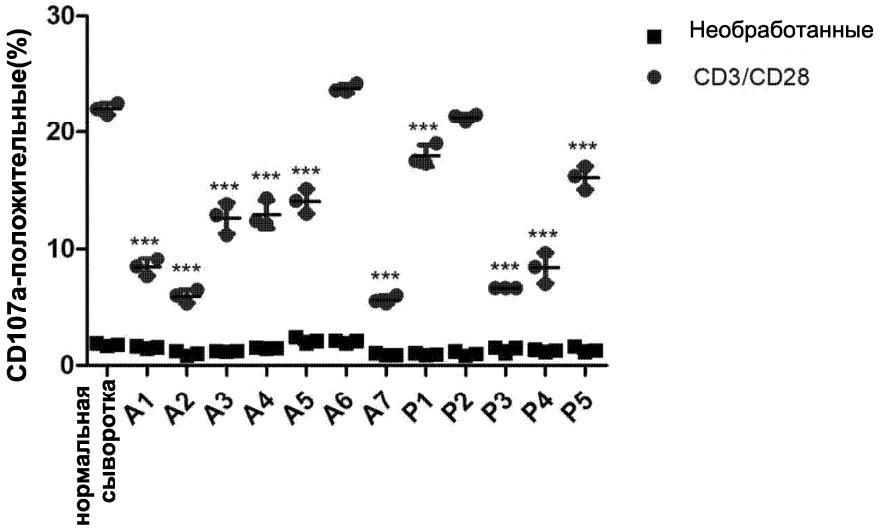
Фиг. 57 (продолжение)



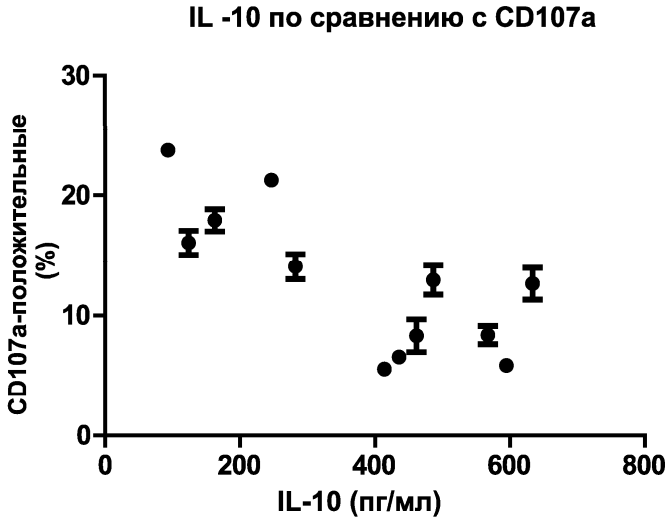
Фиг. 58



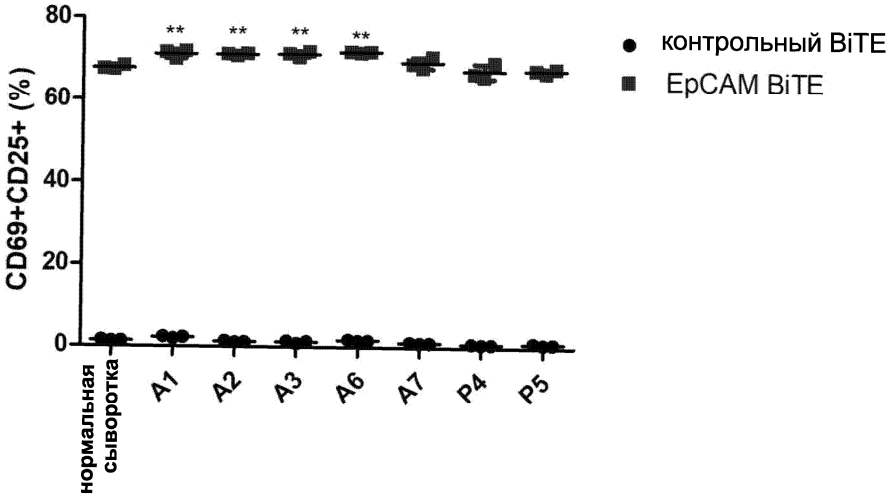
Фиг. 59



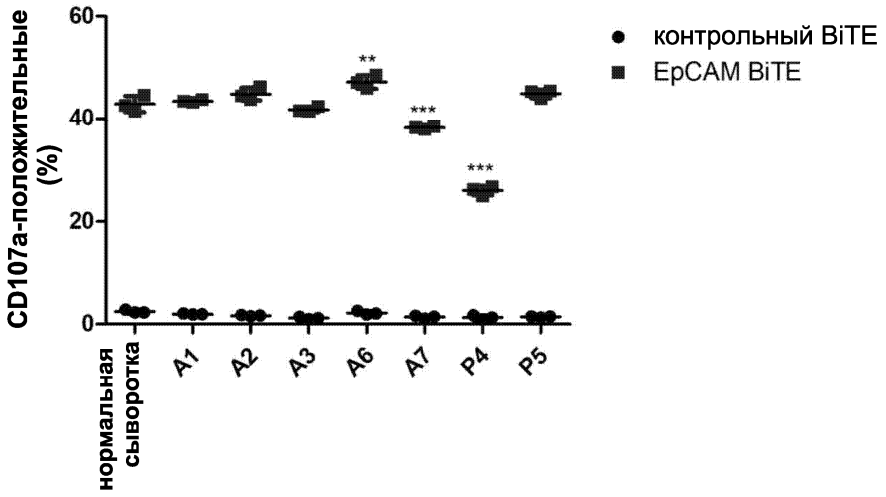
Фиг. 60



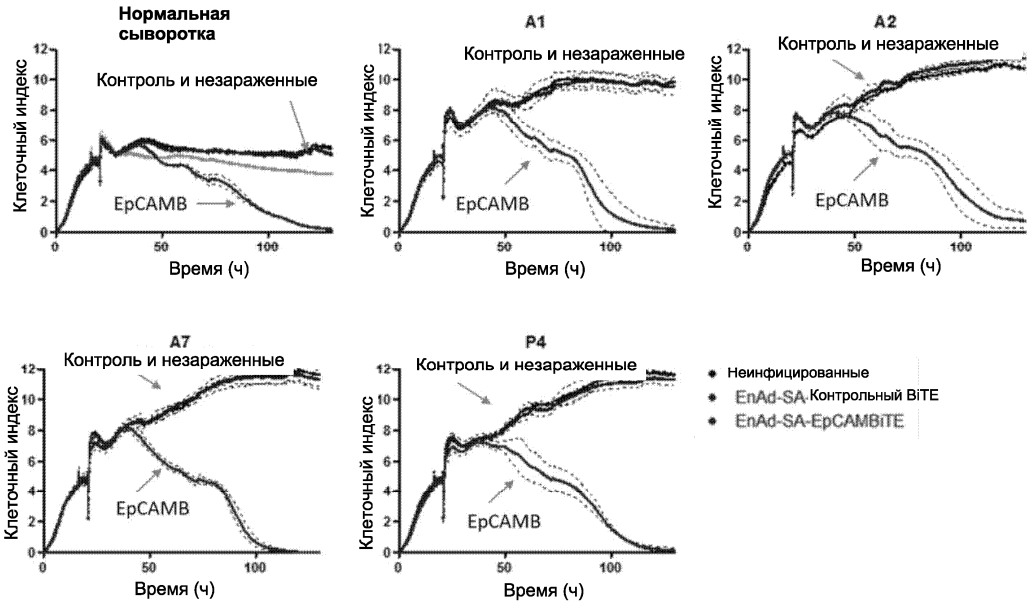
Фиг. 61



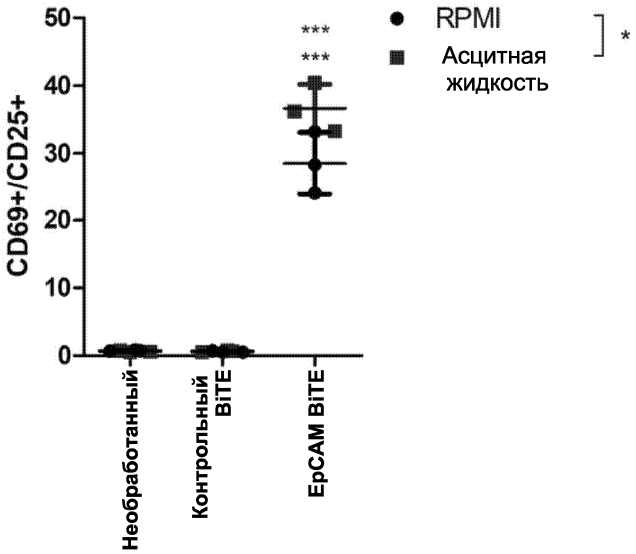
Фиг. 62



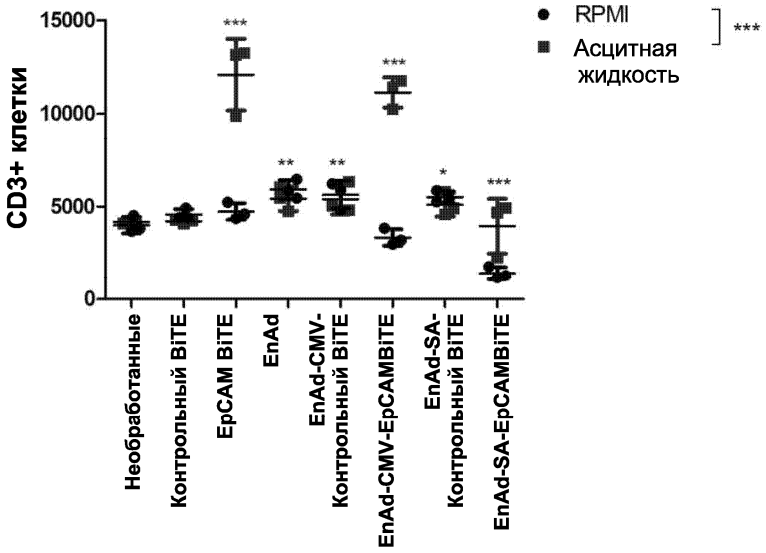
Фиг. 63



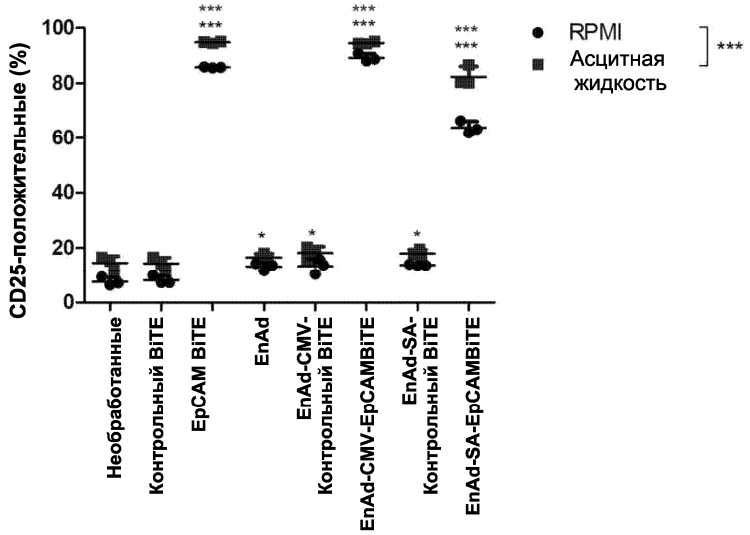
Фиг. 64



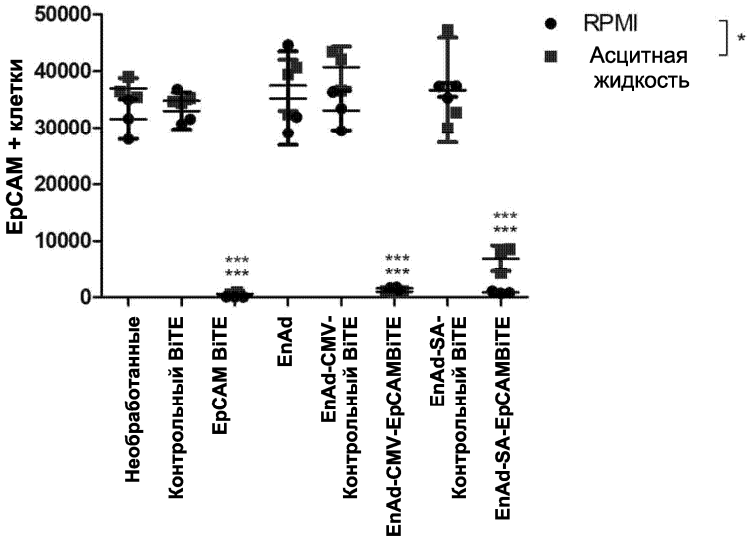
Фиг. 65



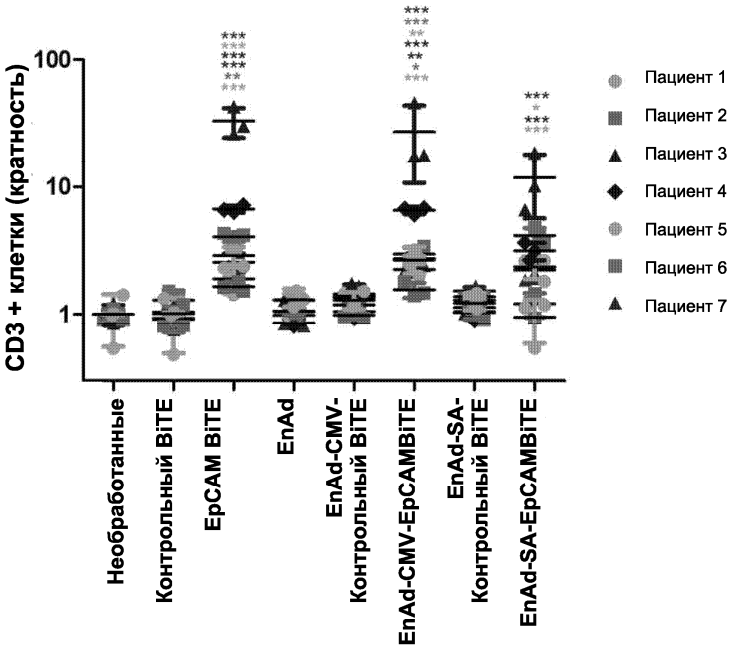
Фиг. 66A



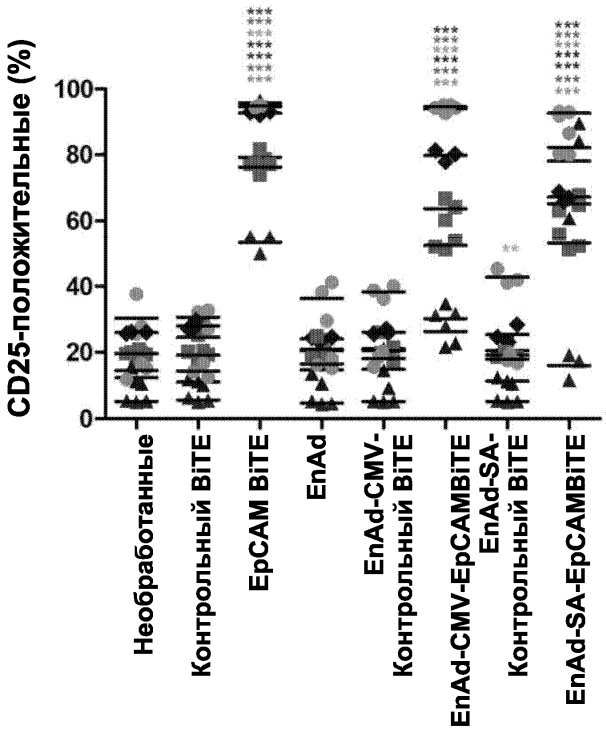
Фиг. 66B



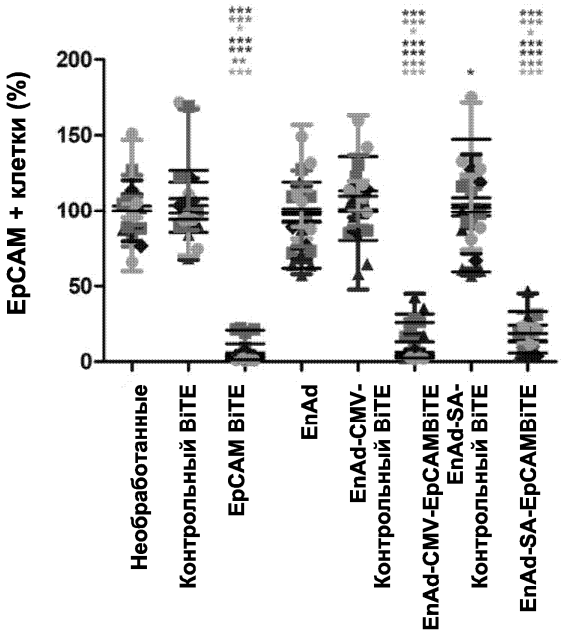
Фиг. 66C



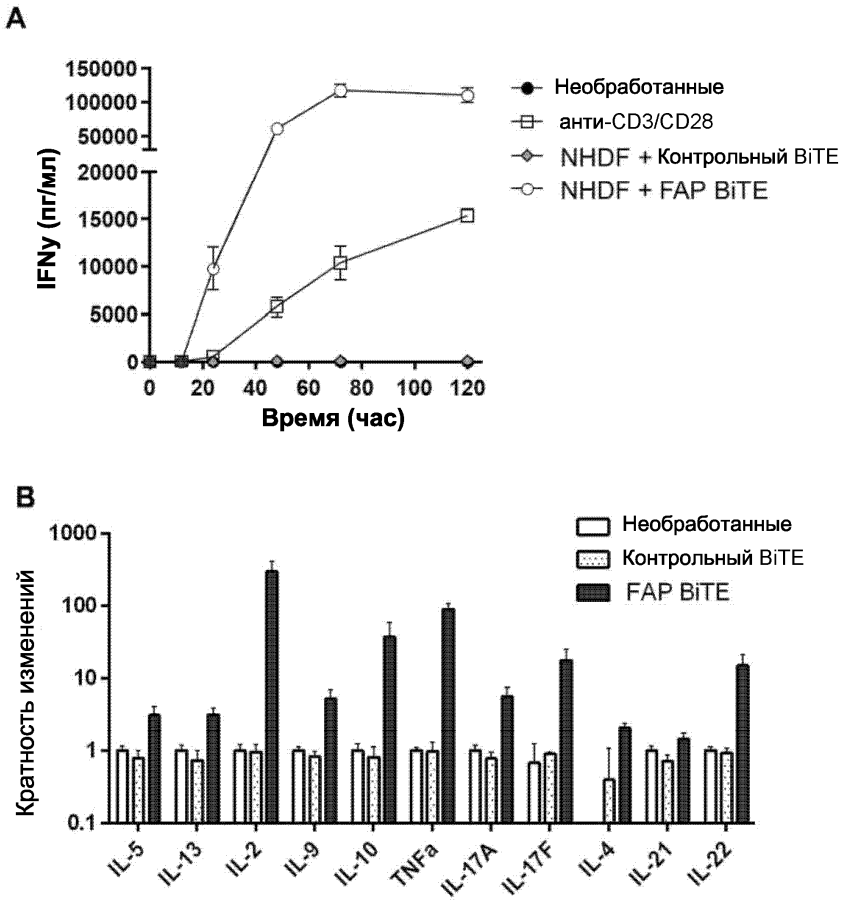
Фиг. 67A



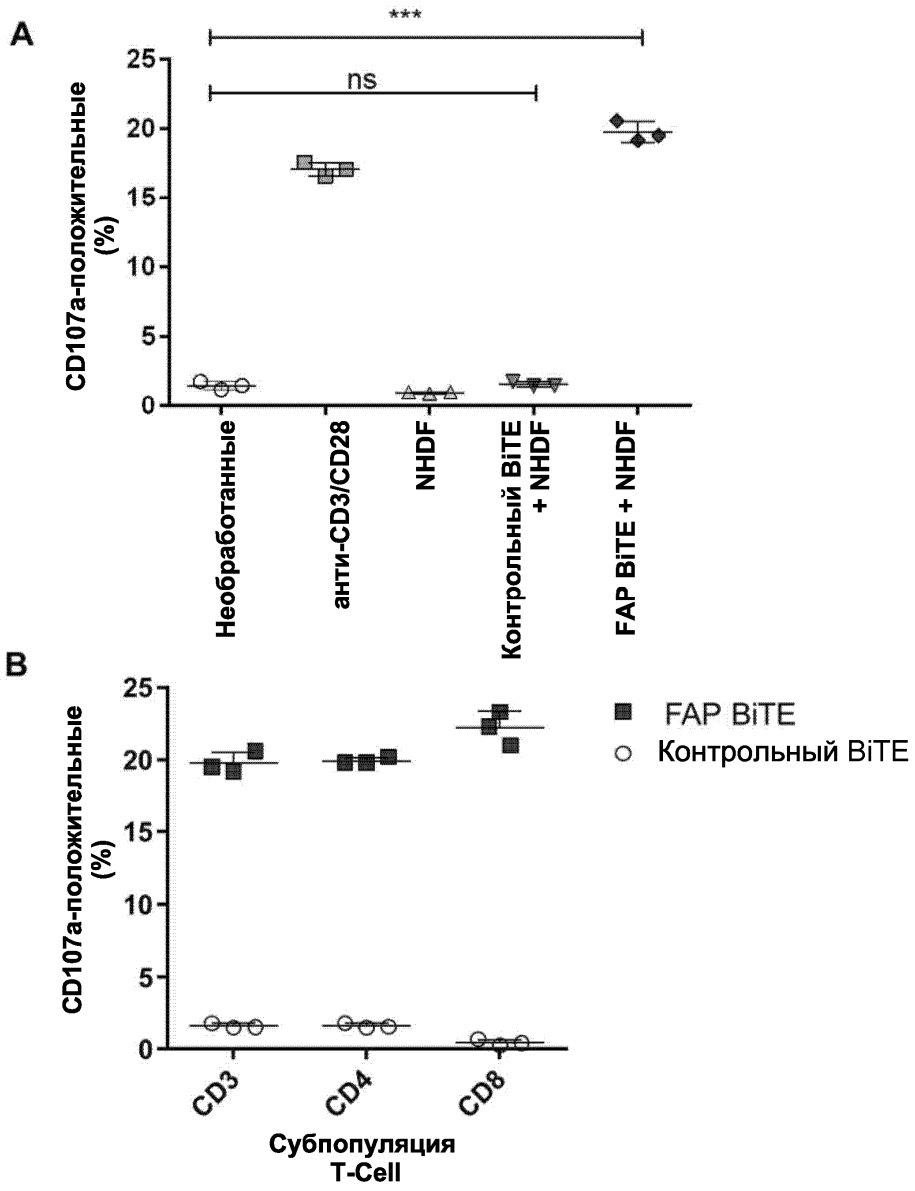
Фиг. 67B



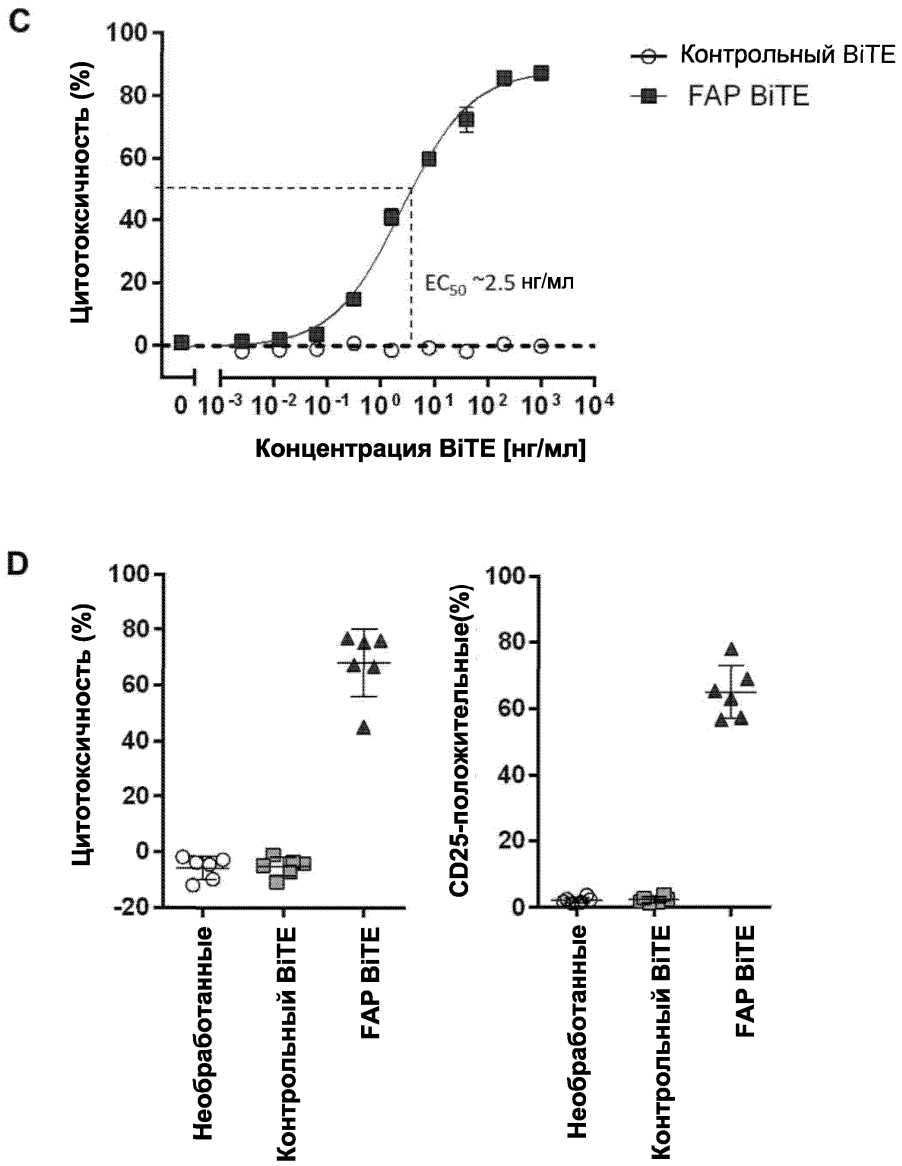
Фиг. 67C



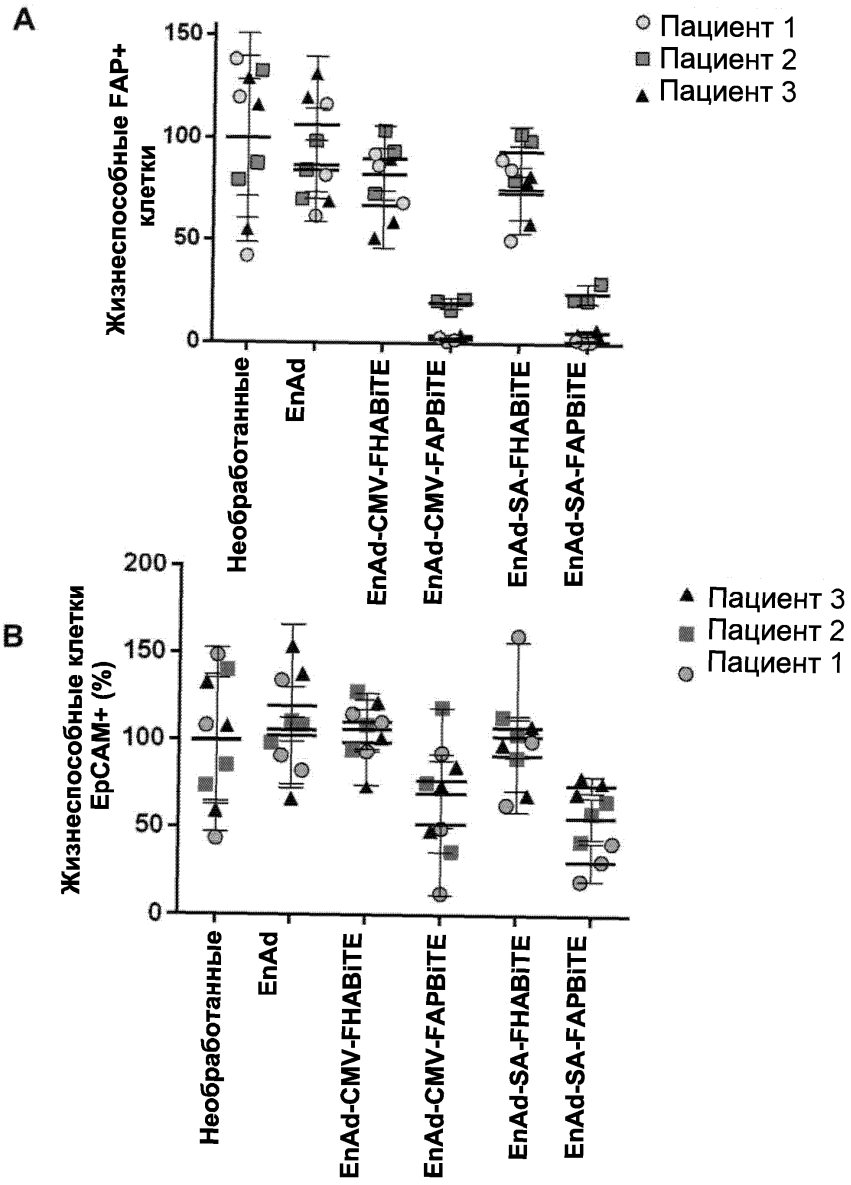
Фиг. 68


A
***
ns
25
20
15
10
5
0
CD107a-положительные (%)
Необработанные
анти-CD3/CD28
NHDF
Контрольный BiTE + NHDF
FAP BiTE + NHDF
B
25
20
15
10
5
0
CD107a-положительные (%)
FAP BiTE
Контрольный BiTE
CD3
CD4
CD8
Субпопуляция T-Cell

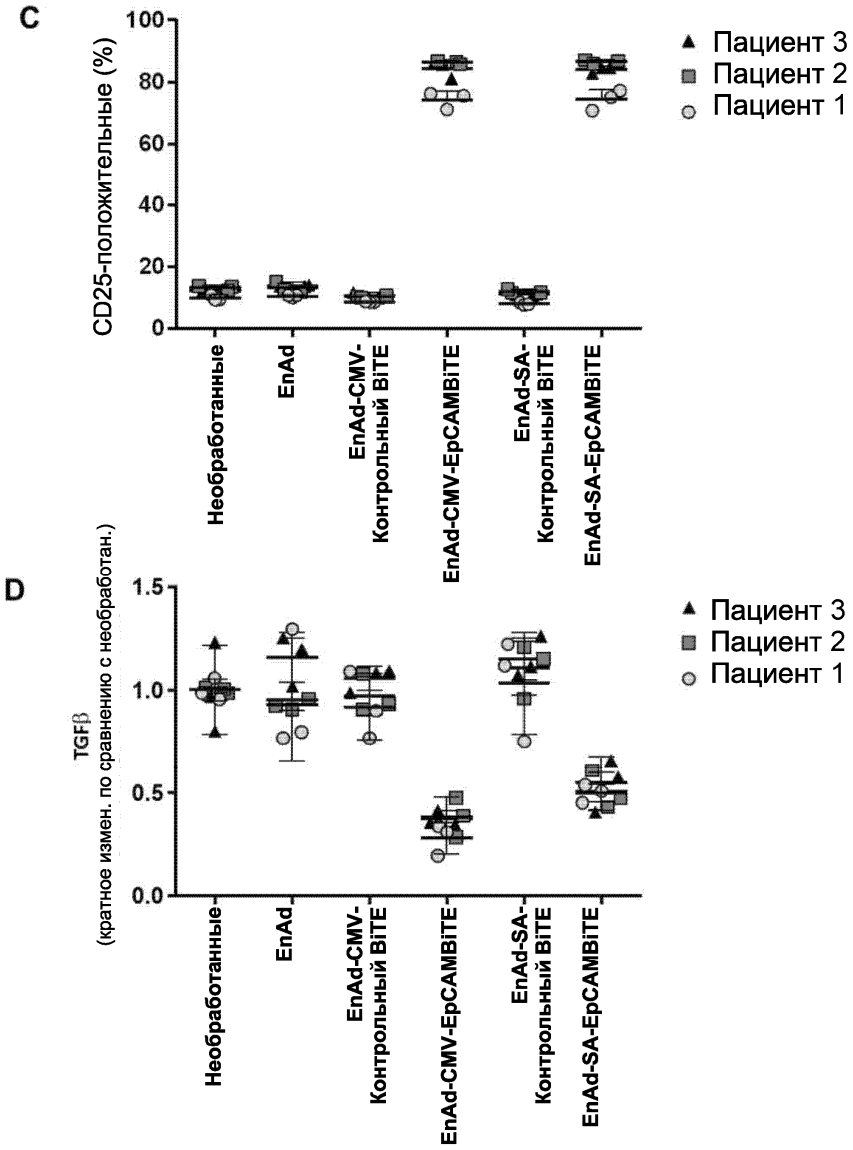
Фиг. 69


C
Цитотоксичность (%)
100
80
60
40
20
0
Контрольный BiTE
FAP BiTE
EC50 ~2.5 нг/мл
0 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104
Концентрация BiTE [нг/мл]
D
Цитотоксичность (%)
CD25-положительные(%)
Необработанные
Контрольный BiTE
FAP BiTE

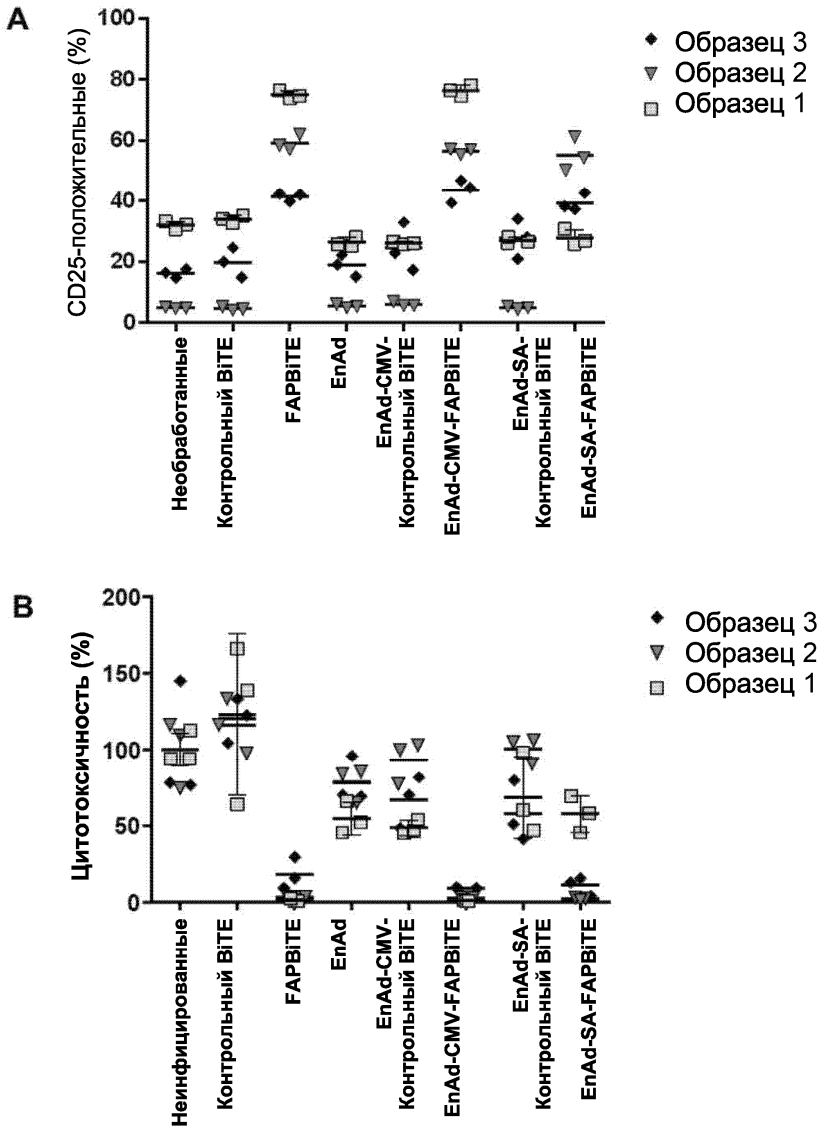
Фиг. 69


A
Жизнеспособные FAP+ клетки
150
100
50
0
Пациент 1
Пациент 2
Пациент 3
Необработанные
EnAd
EnAd-CMV-FHABiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-FHABiTE
EnAd-SA-FAPBiTE
B
Жизнеспособные клетки EpCAM+ (%)
200
150
100
50
0
Пациент 3
Пациент 2
Пациент 1
Необработанные
EnAd
EnAd-CMV-FHABiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-FHABiTE
EnAd-SA-FAPBiTE

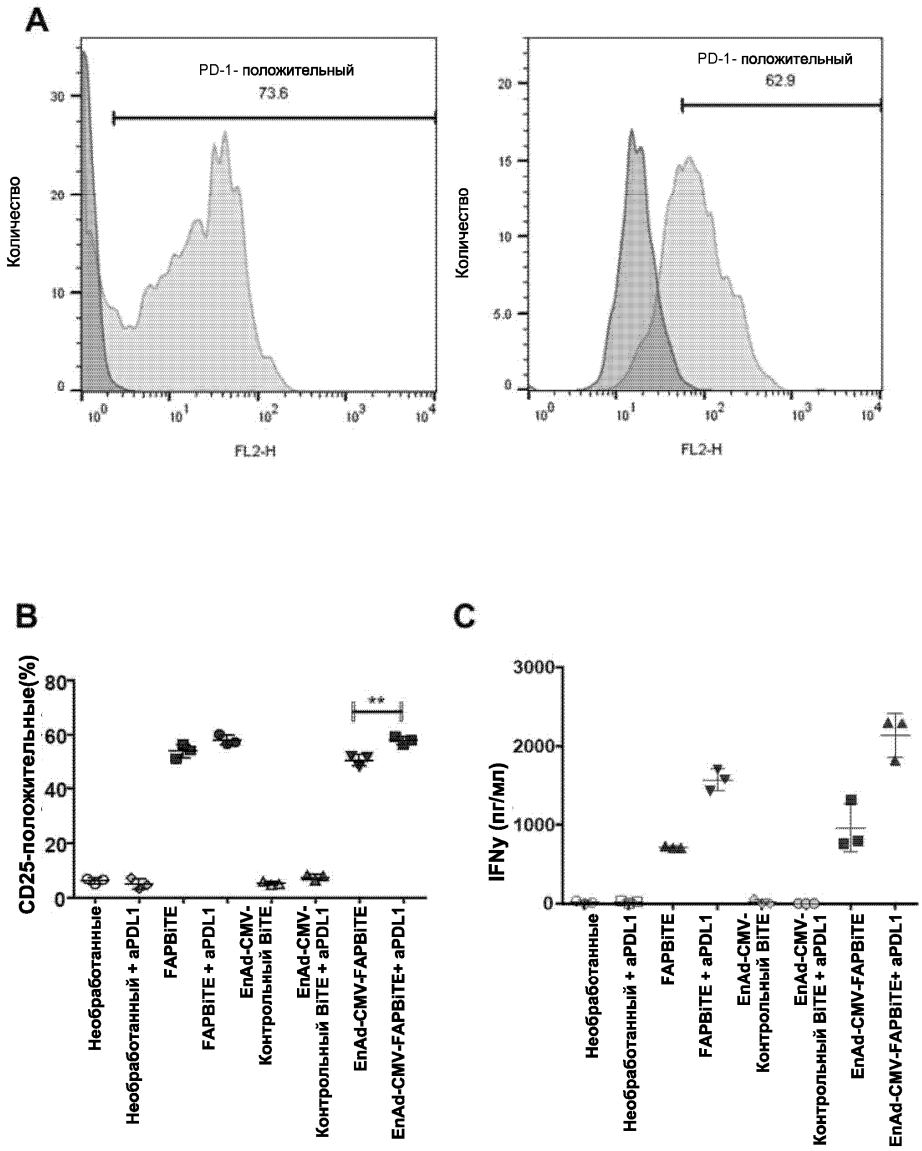
Фиг. 70


C
CD25-положительные (%)
100
80
60
40
20
0
Пациент 3
Пациент 2
Пациент 1
Необработанные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
D
TGFβ
(кратное измен. по сравнению с необработан.)
1.5
1.0
0.5
0.0
Пациент 3
Пациент 2
Пациент 1
Необработанные
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE

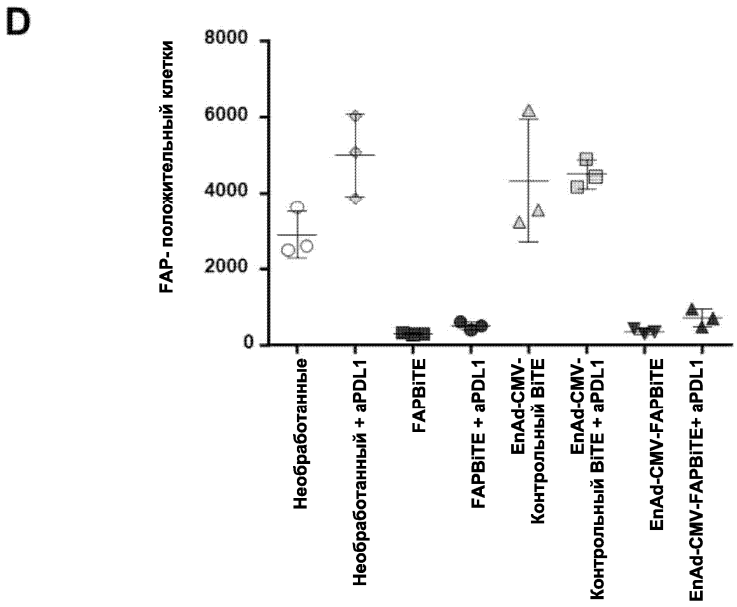
Фиг. 70


A
CD25-положительные (%)
100
80
60
40
20
0
Образец 3
Образец 2
Образец 1
Необработанные
Контрольный BiTE
FAPBiTE
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE
B
Цитотоксичность (%)
200
150
100
50
0
Образец 3
Образец 2
Образец 1
Неинфицированные
Контрольный BiTE
FAPBiTE
EnAd
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE

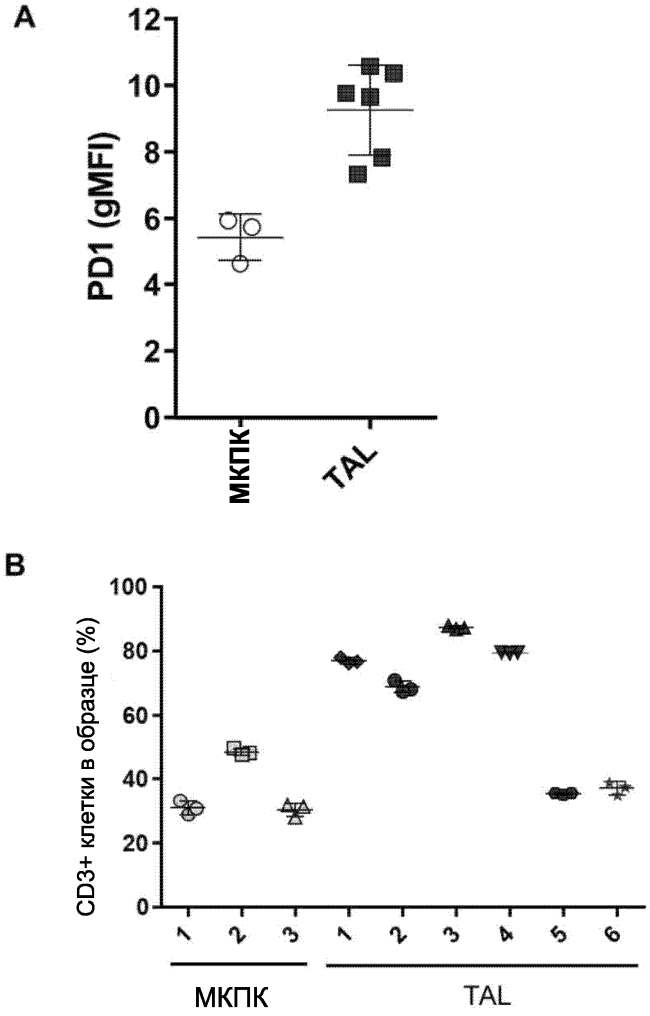
Фиг. 71


A
PD-1- положительный
73.6
Количество
FL2-H
PD-1- положительный
62.9
Количество
FL2-H
B
CD25-положительные(%)
**
Необработанные
Необработанный + aPDL1
FAPBiTE
FAPBiTE + aPDL1
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-Контрольный BiTE + aPDL1
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE+ aPDL1
C
IFNγ (пг/мл)
Необработанные
Необработанный + aPDL1
FAPBiTE
FAPBiTE + aPDL1
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-Контрольный BiTE + aPDL1
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE+ aPDL1

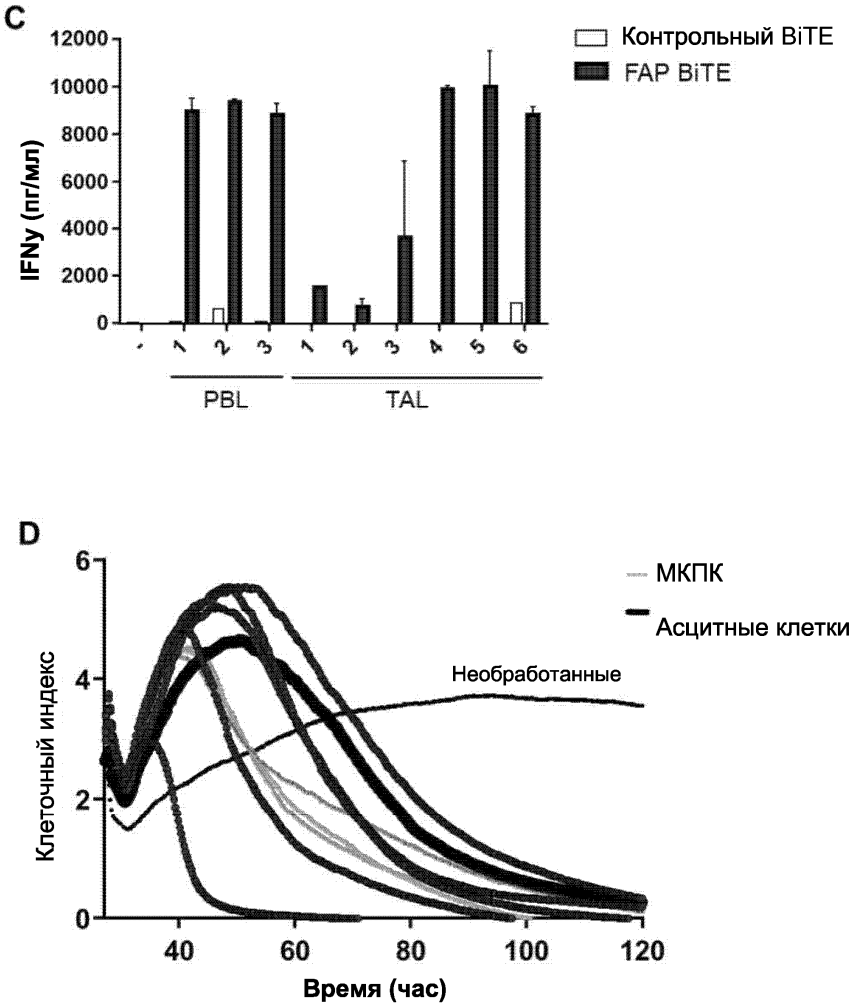
Фиг. 72


D
FAP- положительный клетки
Необработанные
Необработанный + aPDL1
FAPBiTE
FAPBiTE + aPDL1
EnAd-CMV-Контрольный BiTE
EnAd-CMV-Контрольный BiTE + aPDL1
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE+ aPDL1

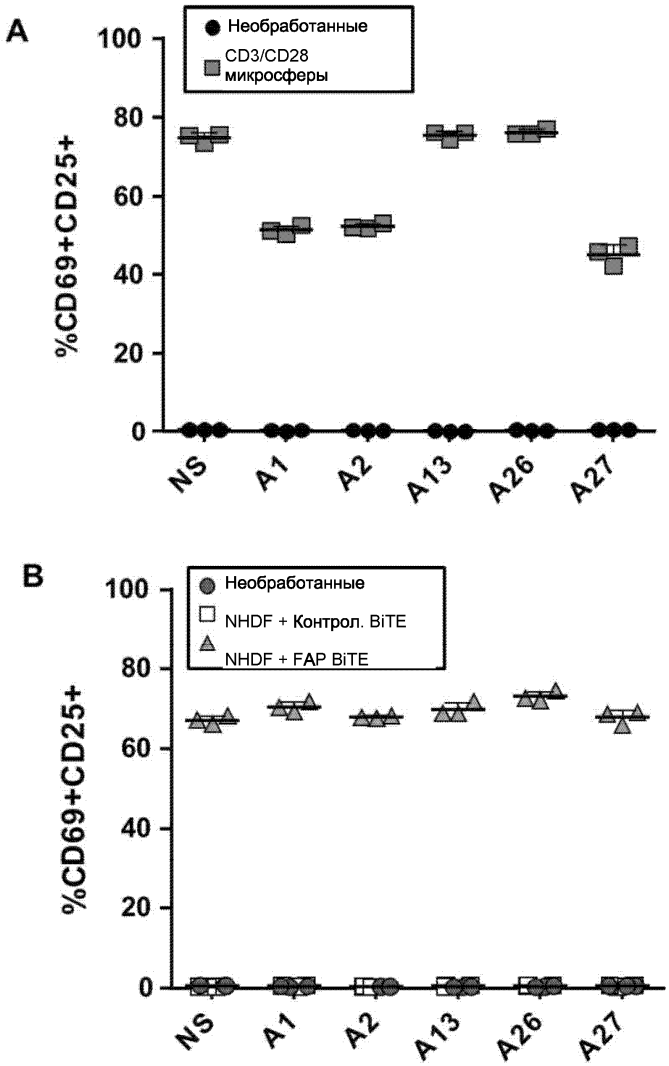
Фиг. 72


A
PD1 (gMFI)
12
10
8
6
4
2
0
МКПК
TAL
B
CD3+ клетки в образце (%)
100
80
60
40
20
0
1
2
3
1
2
3
4
5
6
МКПК
TAL

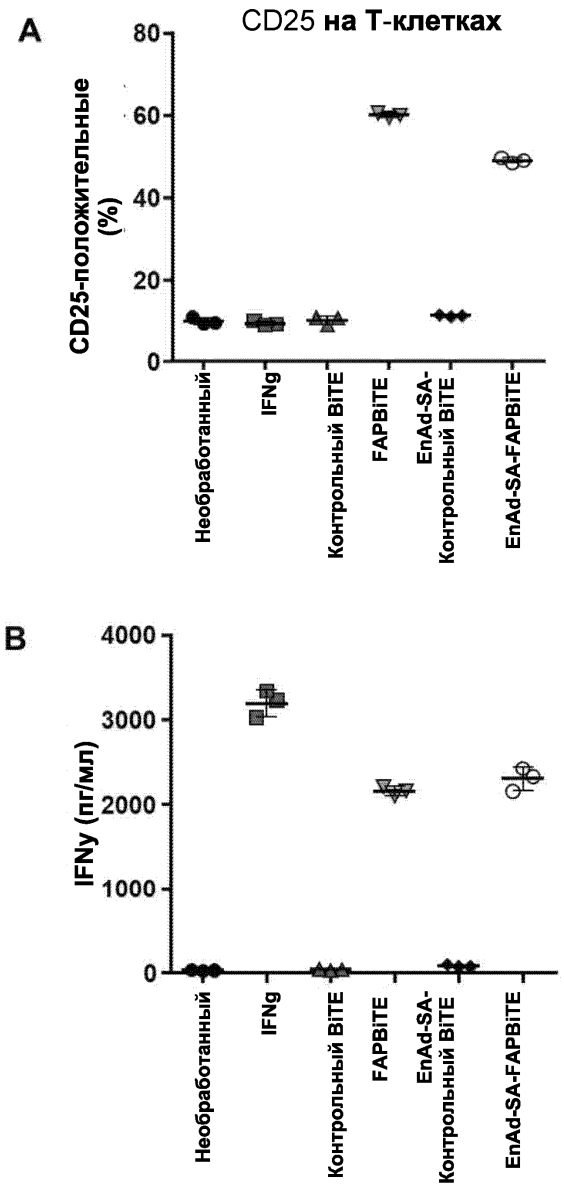
Фиг. 73


C
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
IFNγ (пг/мл)
Контрольный BiTE
FAP BiTE
-
1
2
3
1
2
3
4
5
6
PBL
TAL
D
6
4
2
0
Клеточный индекс
МКПК
Асцитные клетки
Необработанные
40
60
80
100
120
Время (час)

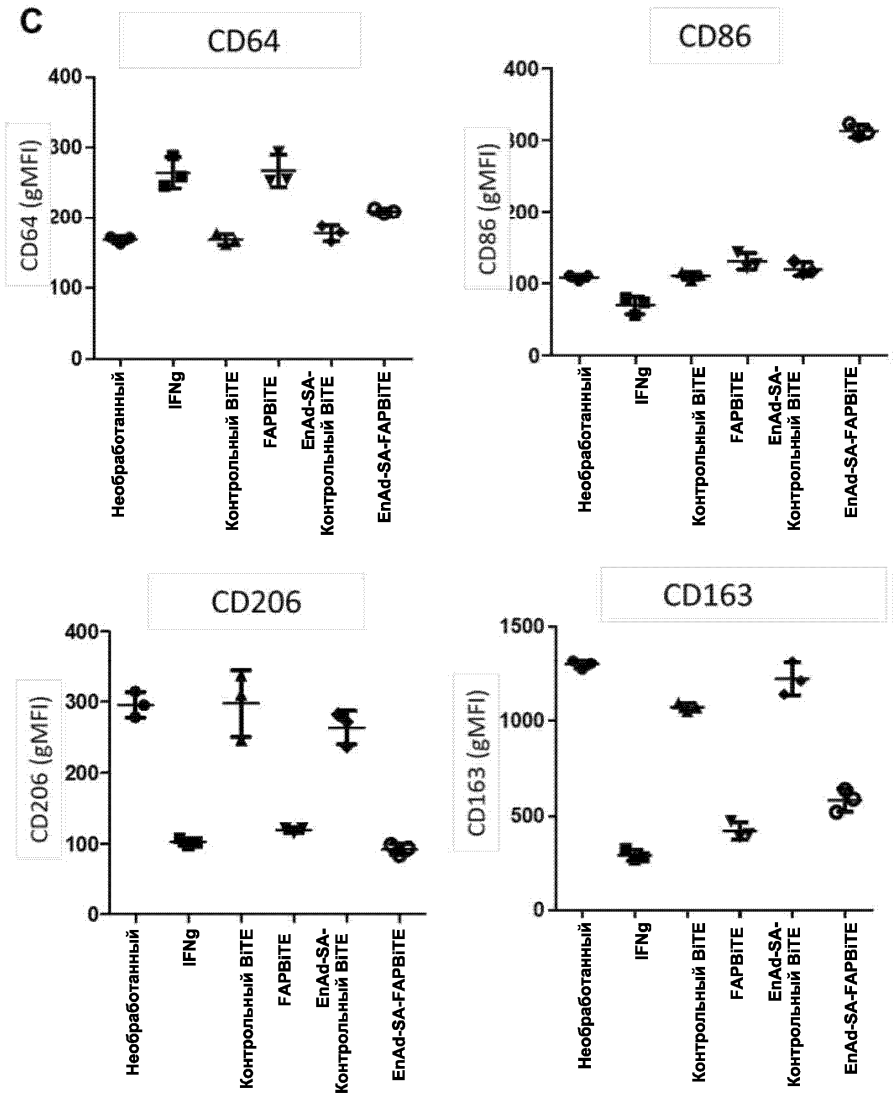
Фиг. 73


A
Необработанные
CD3/CD28 микросферы
%CD69+CD25+
100
80
60
40
20
0
NS
A1
A2
A13
A26
A27
B
Необработанные
NHDF + Контрол. BiTE
NHDF + FAP BiTE
%CD69+CD25+
100
80
60
40
20
0
NS
A1
A2
A13
A26
A27

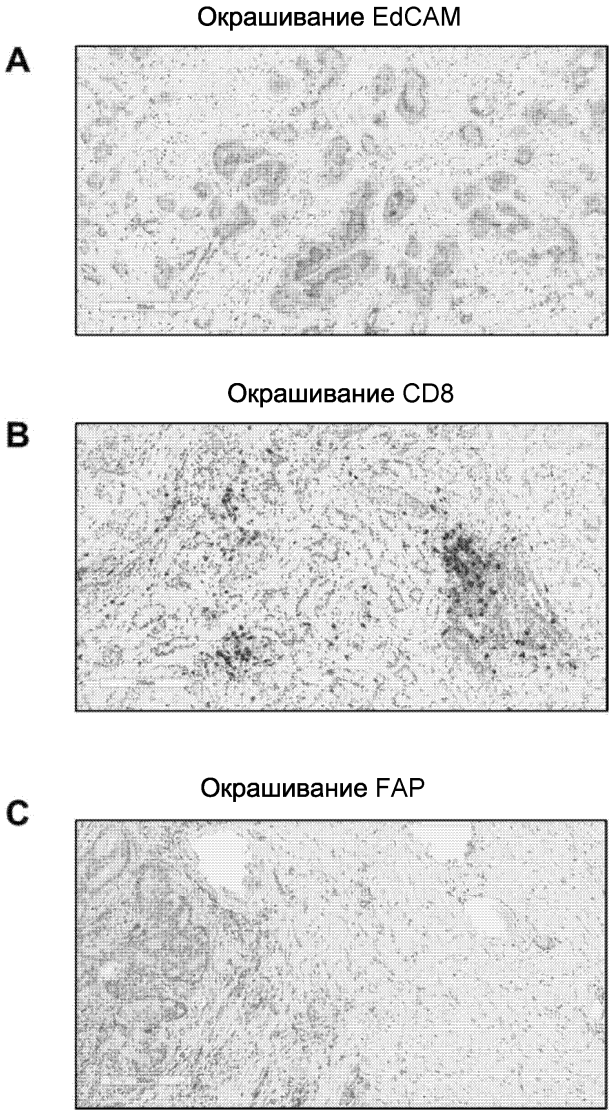
Фиг. 74


A
CD25 на Т-клетках
CD25-положительные (%)
80
60
40
20
0
Необработанный
IFNg
Контрольный BiTE
FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE
B
IFNγ (пг/мл)
4000
3000
2000
1000
0
Необработанный
IFNg
Контрольный BiTE
FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE

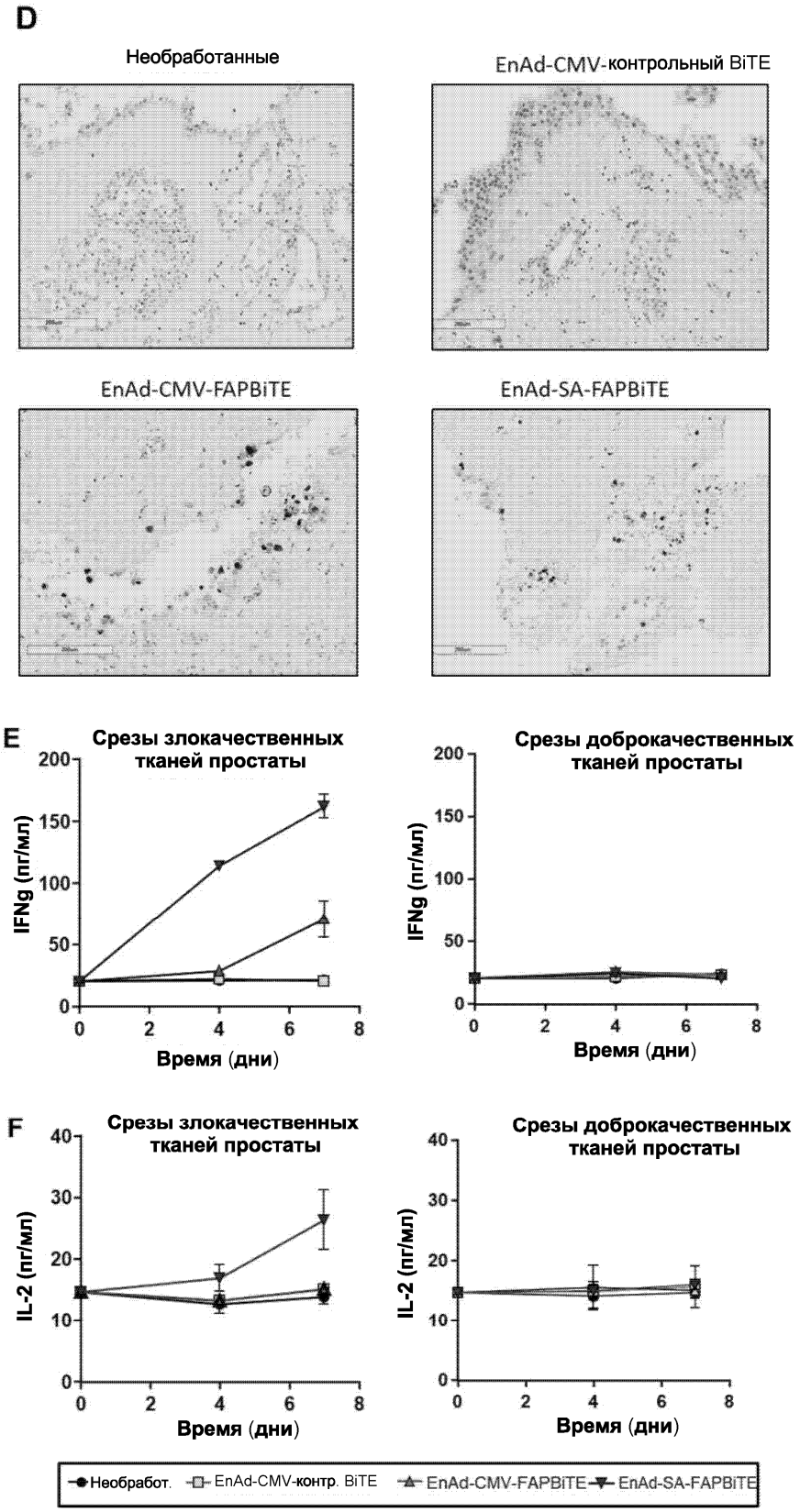
Фиг. 75


C
CD64
CD64 (gMFI)
400
300
200
100
0
Необработанный
IFNg
Контрольный BiTE
FAPBiTE
EnAd-SA-Контрольный BiTE
EnAd-SA-FAPBiTE
CD86
CD86 (gMFI)
CD206
CD206 (gMFI)
CD163
CD163 (gMFI)
1500
1000
500

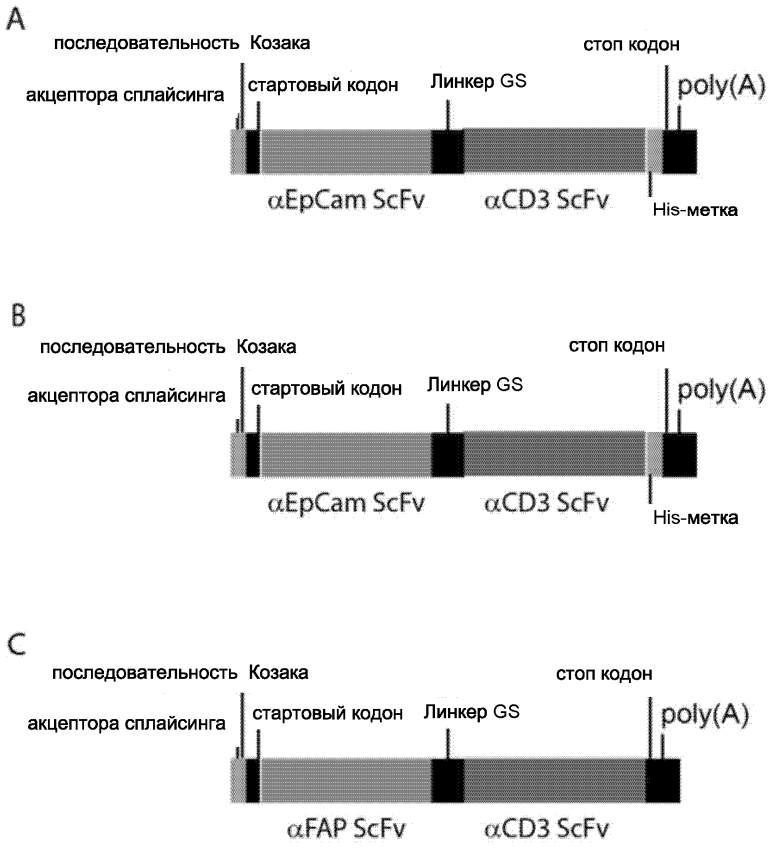
Фиг. 75



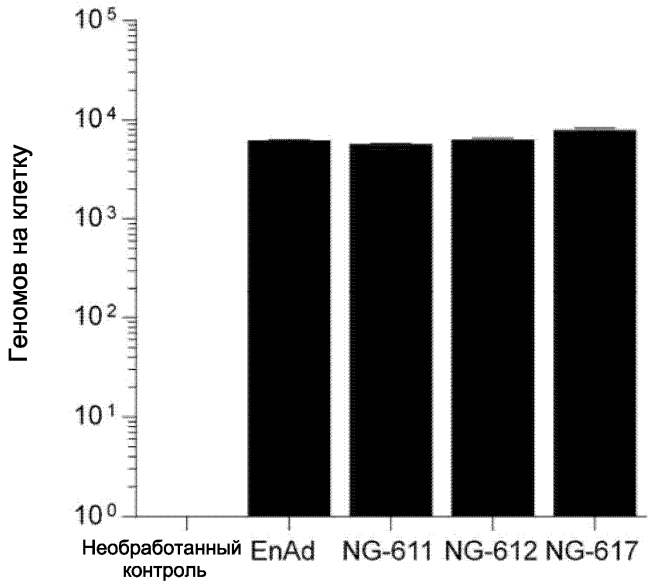
Фиг. 76


D
Необработанные
EnAd-CMV-контрольный BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-FAPBiTE
E
Срезы злокачественных тканей простаты
Срезы доброкачественных тканей простаты
IFNg (пг/мл)
Время (дни)
F
Срезы злокачественных тканей простаты
Срезы доброкачественных тканей простаты
IL-2 (пг/мл)
Время (дни)
Необработ.
EnAd-CMV-контр. BiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-FAPBiTE

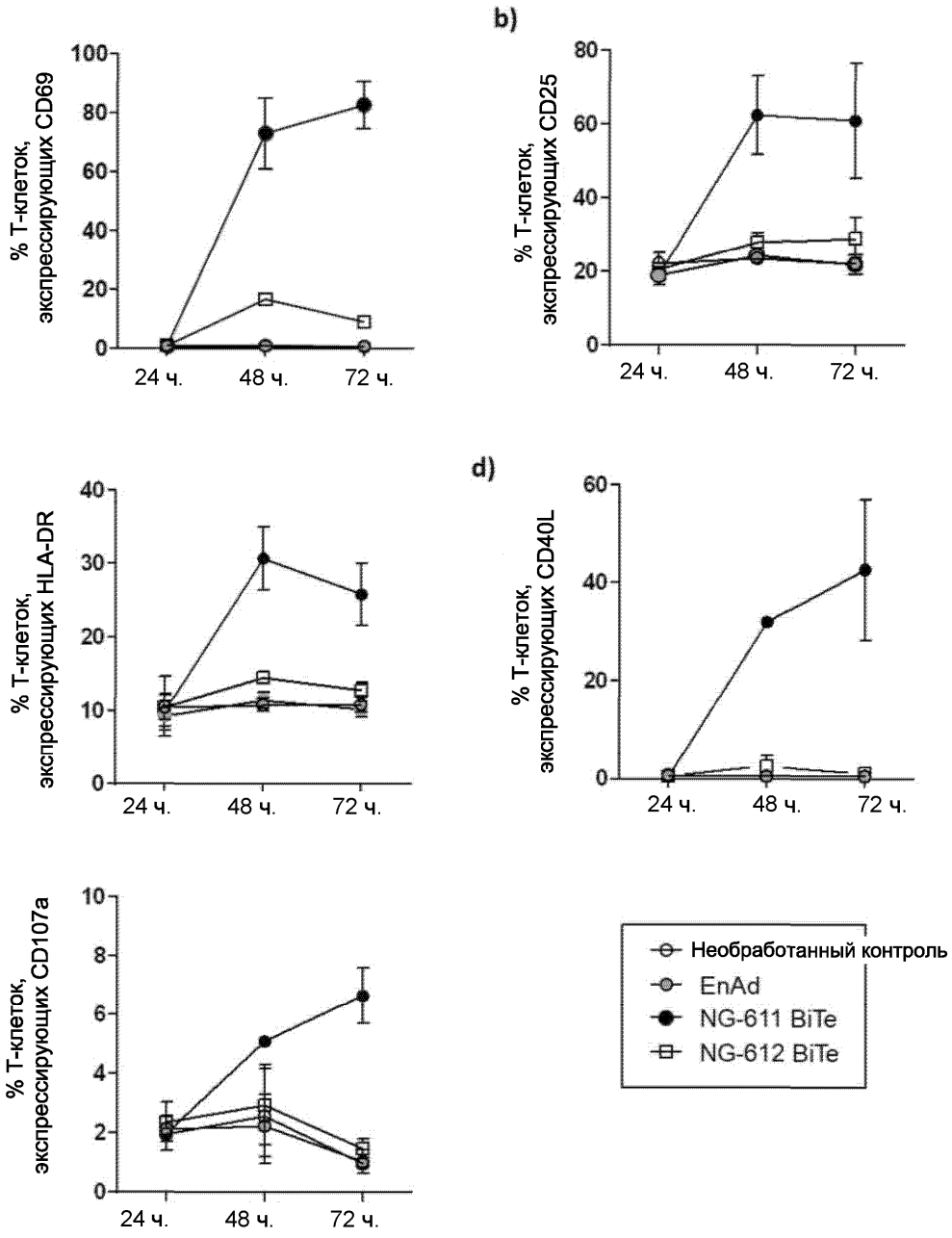
Фиг. 76



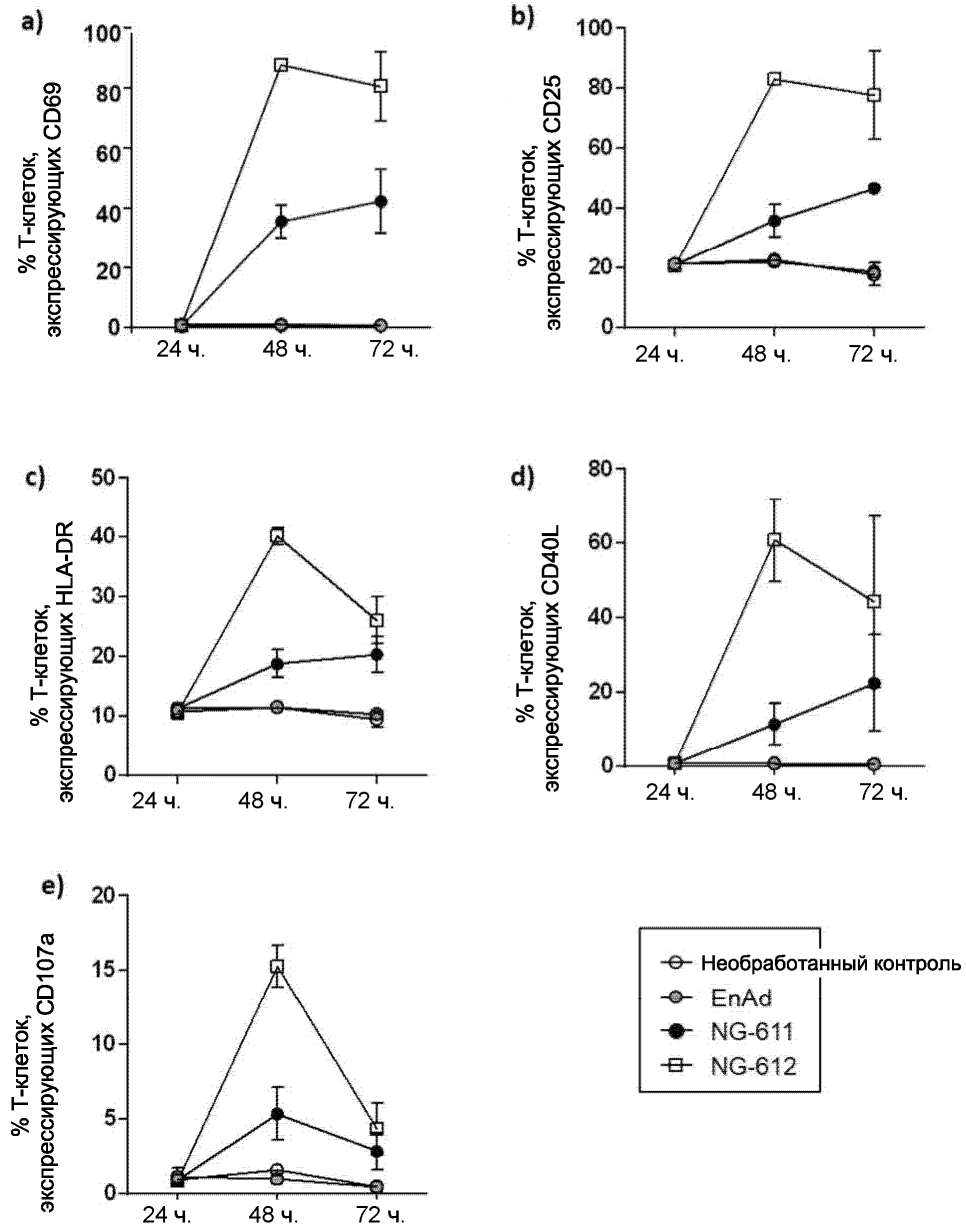
Фиг. 77



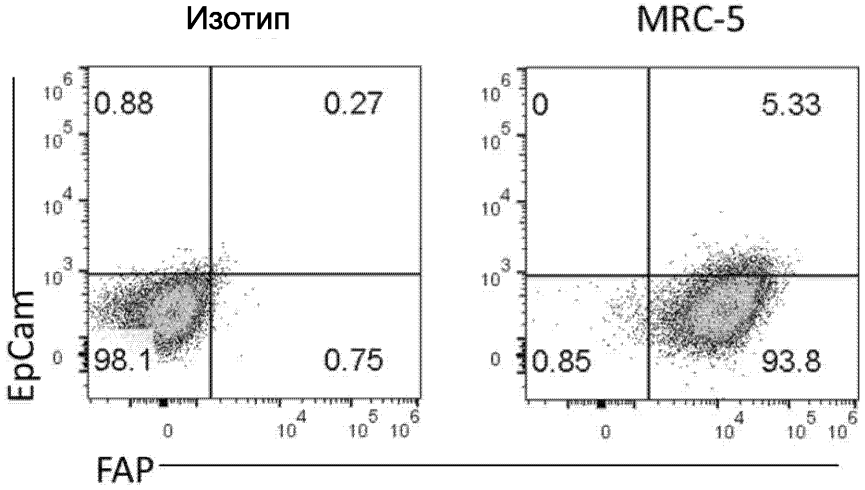
Фиг. 77D


b)
% Т-клеток, экспрессирующих CD69
% Т-клеток, экспрессирующих CD25
d)
% Т-клеток, экспрессирующих HLA-DR
% Т-клеток, экспрессирующих CD40L
% Т-клеток, экспрессирующих CD107a
24 ч.
48 ч.
72 ч.
Необработанный контроль
EnAd
NG-611 BiTe
NG-612 BiTe

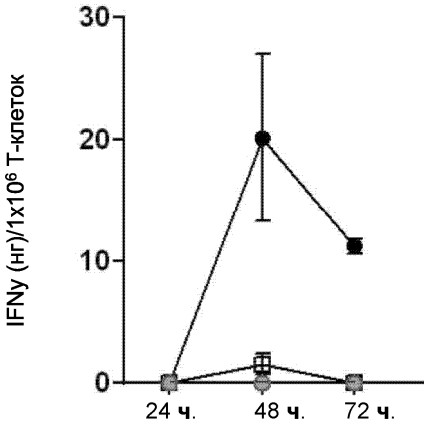
Фиг. 78


a)
% Т-клеток, экспрессирующих CD69
b)
% Т-клеток, экспрессирующих CD25
c)
% Т-клеток, экспрессирующих HLA-DR
d)
% Т-клеток, экспрессирующих CD40L
e)
% Т-клеток, экспрессирующих CD107a
24 ч.
48 ч.
72 ч.
Необработанный контроль
EnAd
NG-611
NG-612

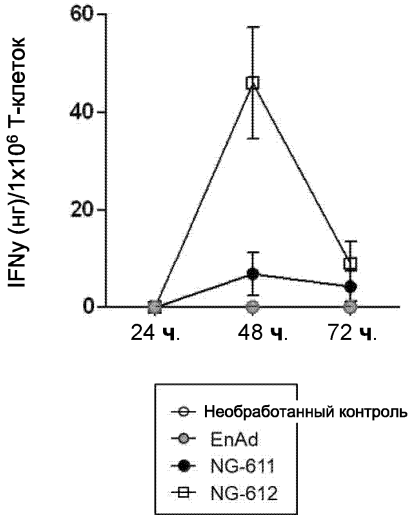
Фиг. 79


Изотип
MRC-5
EpCam
FAP
0.88
0.27
98.1
0.75
0
5.33
0.85
93.8

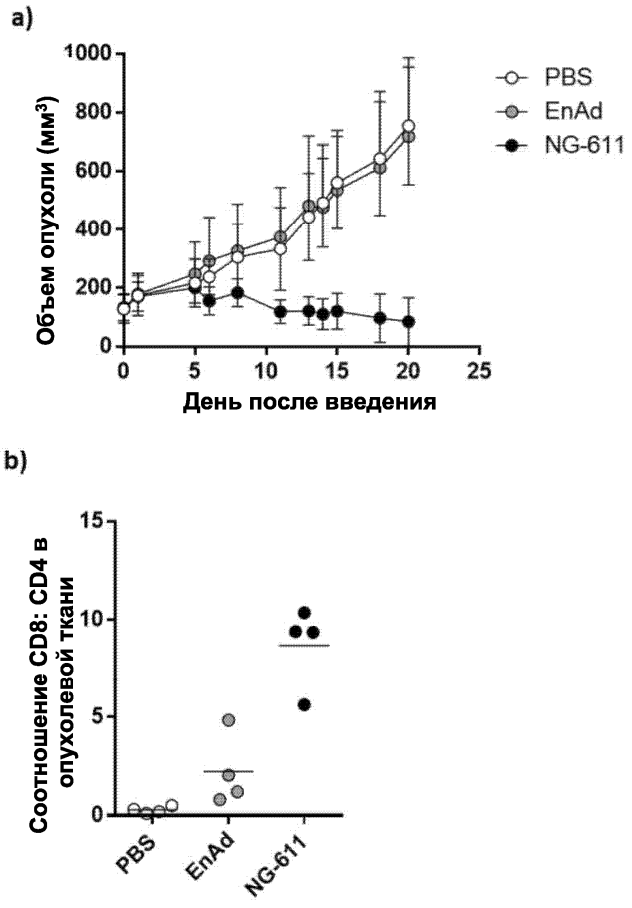
Фиг. 80



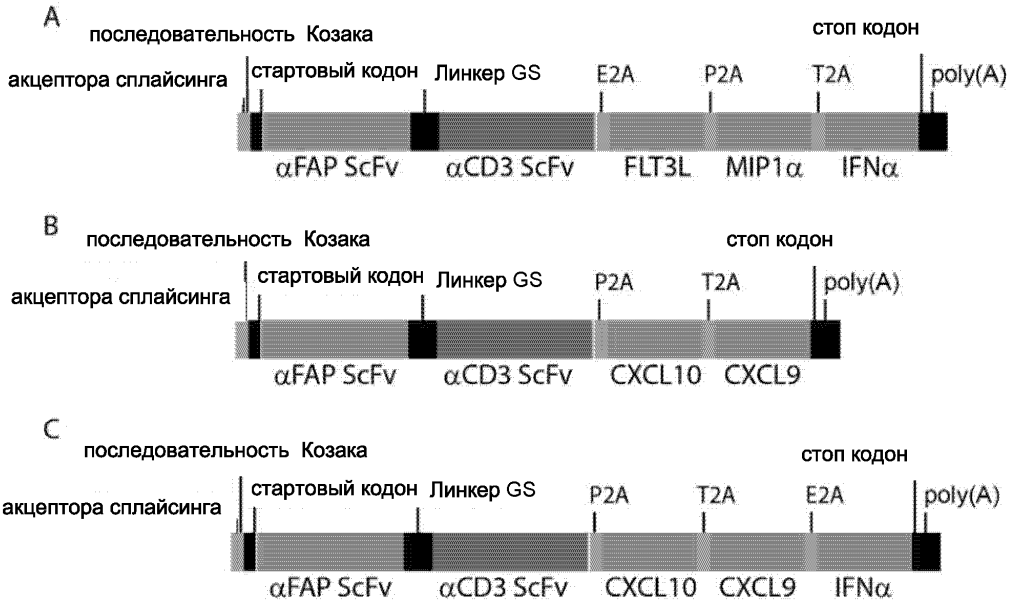
Фиг. 81A



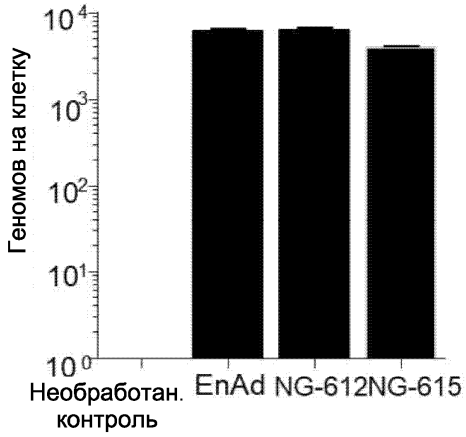
Фиг. 81B


a)
Объем опухоли (мм³)
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
День после введения
PBS
EnAd
NG-611
b)
Соотношение CD8: CD4 в опухолевой ткани
15
10
5
0
PBS
EnAd
NG-611

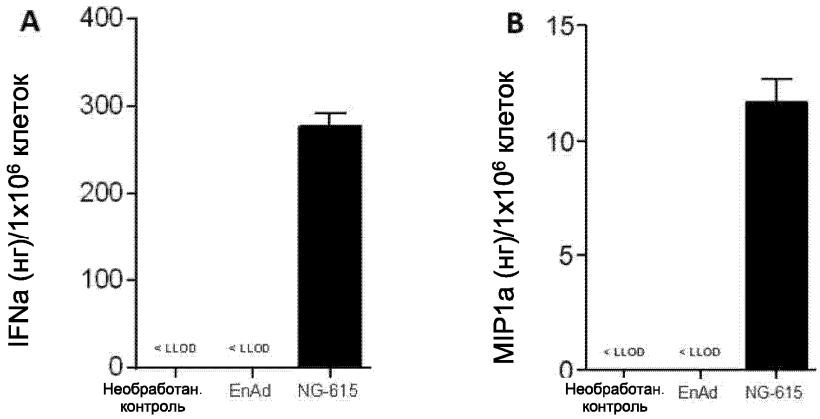
Фиг. 82

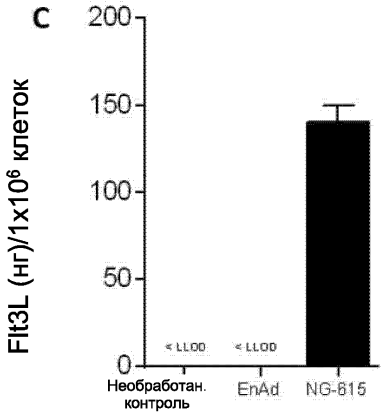

A
последовательность Козака
акцептора сплайсинга
стартовый кодон
Линкер GS
E2A
P2A
T2A
poly(A)
стоп кодон
αFAP ScFv
αCD3 ScFv
FLT3L
MIP1α
IFNα
B
последовательность Козака
акцептора сплайсинга
стартовый кодон
Линкер GS
P2A
T2A
poly(A)
стоп кодон
αFAP ScFv
αCD3 ScFv
CXCL10
CXCL9
C
последовательность Козака
акцептора сплайсинга
стартовый кодон
Линкер GS
P2A
T2A
E2A
poly(A)
стоп кодон
αFAP ScFv
αCD3 ScFv
CXCL10
CXCL9
IFNα

Фиг. 83

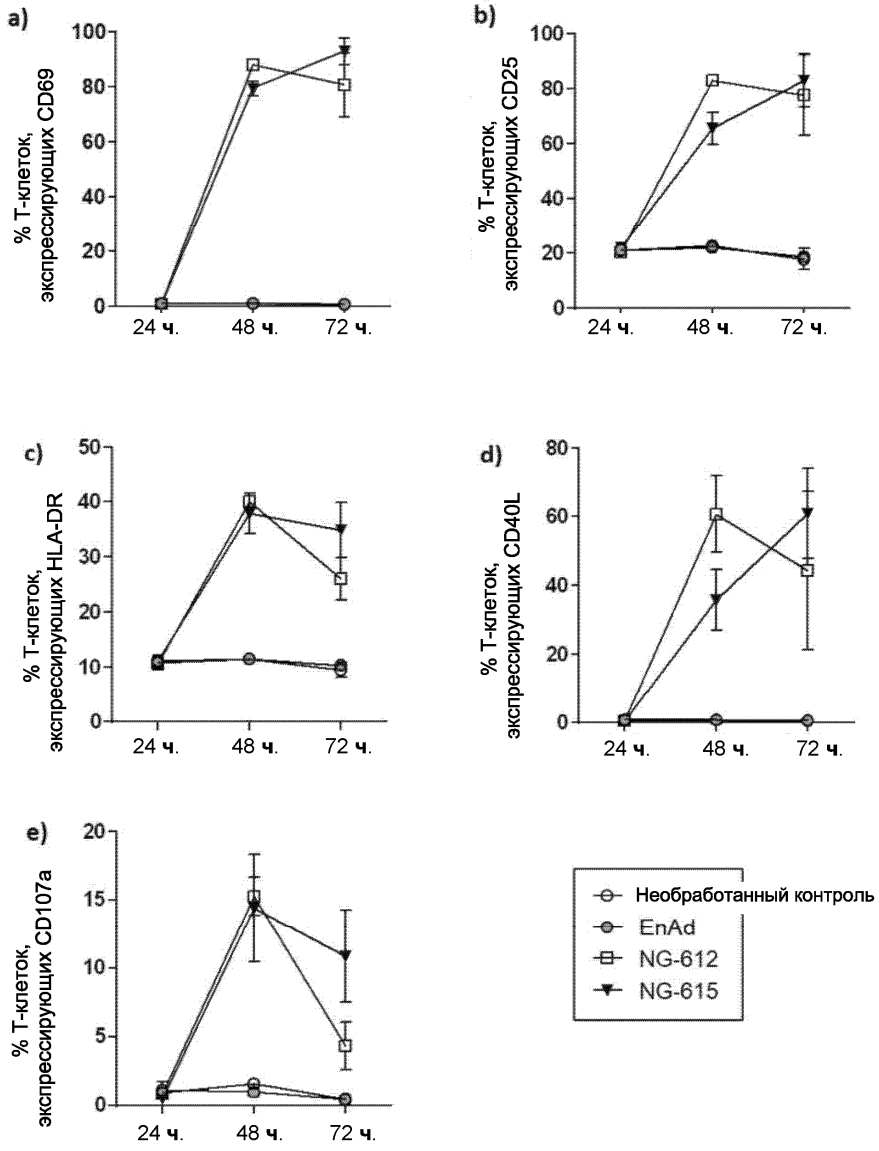

Геномов на клетку
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
Необработан. контроль
EnAd
NG-612
NG-615

Фиг. 84

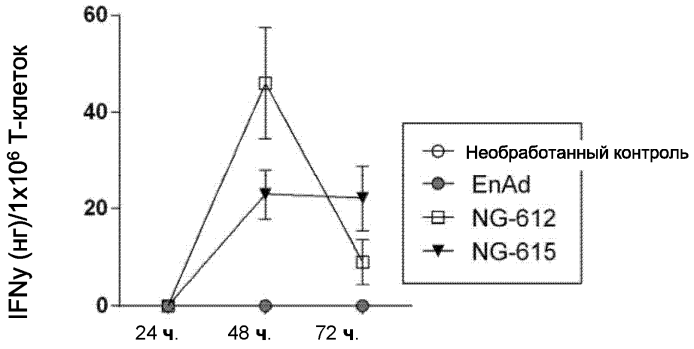

A
IFNa (нг)/1x10⁶ клеток
400
300
200
100
0
< LLOD
< LLOD
Необработан. контроль
EnAd
NG-615
B
MIP1a (нг)/1x10⁶ клеток
15
10
5
0
< LLOD
< LLOD
Необработан. контроль
EnAd
NG-615


C
Flt3L (нг)/1x10⁶ клеток
200
150
100
50
0
< LLOD
< LLOD
Необработан. контроль
EnAd
NG-615

Фиг. 85

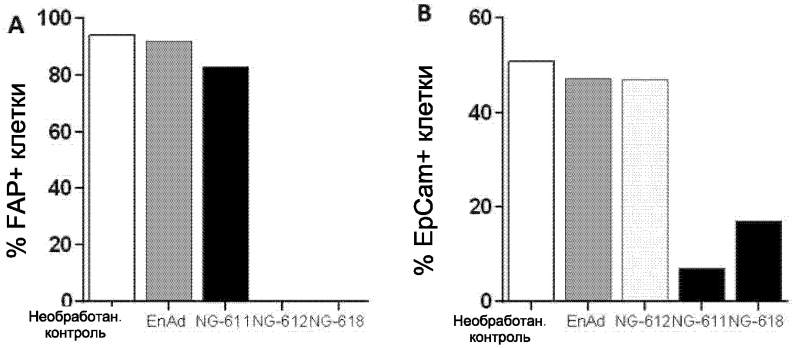


Фиг. 86

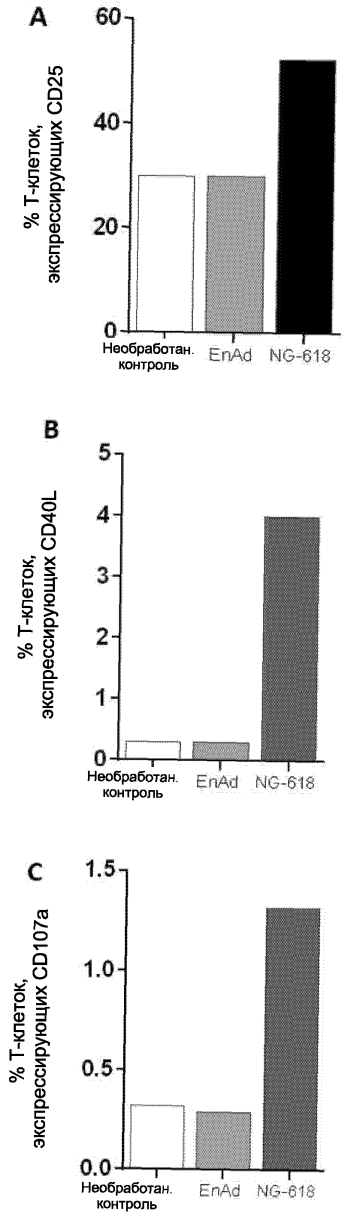


Фиг. 87

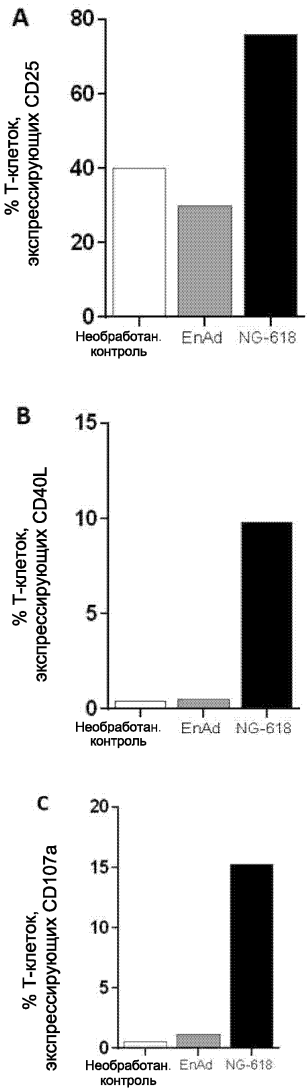
Фиг. 88


A
% FAP+ клетки
100
80
60
40
20
0
Необработан. контроль
EnAd
NG-611
NG-612
NG-618
B
% EpCam+ клетки
60
40
20
0
Необработан. контроль
EnAd
NG-612
NG-611
NG-618

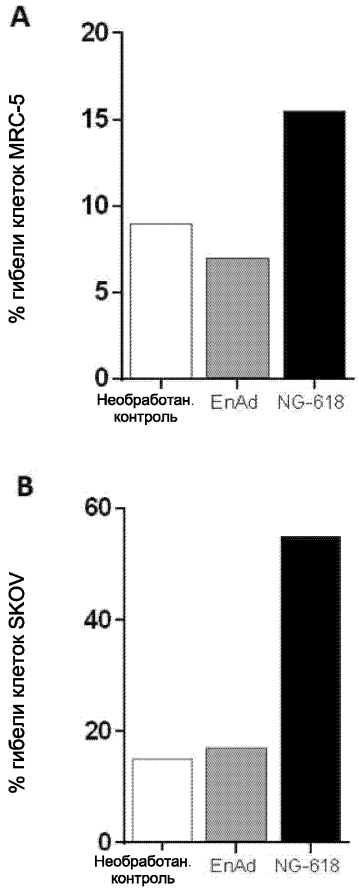
Фиг. 89


A
% Т-клеток, экспрессирующих CD25
60
40
20
0
Необработан. контроль
EnAd
NG-618
B
% Т-клеток, экспрессирующих CD40L
5
4
3
2
1
0
Необработан. контроль
EnAd
NG-618
C
% Т-клеток, экспрессирующих CD107a
1.5
1.0
0.5
0.0
Необработан. контроль
EnAd
NG-618

Фиг. 90


A
% Т-клеток, экспрессирующих CD25
80
60
40
20
0
Необработан. контроль
EnAd
NG-618
B
% Т-клеток, экспрессирующих CD40L
15
10
5
0
Необработан. контроль
EnAd
NG-618
C
% Т-клеток, экспрессирующих CD107a
20
15
10
5
0
Необработан. контроль
EnAd
NG-618

Фиг. 91


A
% гибели клеток MRC-5
20
15
10
5
0
Необработан. контроль
EnAd
NG-618
B
% гибели клеток SKOV
60
40
20
0
Необработан. контроль
EnAd
NG-618

Фиг. 92