

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391489** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.20

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.18

**(54) ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ ПУТЕМ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ
МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ**

(31) **63/116,004**

(72) Изобретатель:
**Торн Стивен Говард, Чжан Минжуй,
Бирд Дэниел Дж. (US)**

(32) **2020.11.19**

(33) **US**

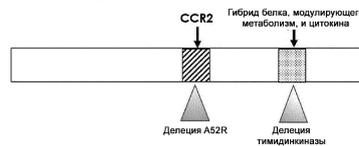
(86) **PCT/US2021/059887**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(87) **WO 2022/109133 2022.05.27**

(71) Заявитель:
**КАЛИВИР
ИММЬЮНОТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(57) Изобретение относится к модифицированным онколитическим вирусам. Модифицированные онколитические вирусы по изобретению включают модификацию в вирусном геноме, кодирующие экзогенные нуклеиновые кислоты для усиления онколитической иммунотерапии путем ремоделирования микроокружения опухоли и с улучшенной системной доставкой. Изобретение также относится к композициям, включающим модифицированные онколитические вирусы, к наборам, содержащим их, и к способам применения онколитических вирусов.



202391489

A1

A1

202391489

ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ ПУТЕМ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ

Перекрестная ссылка

По настоящей заявке испрашивается приоритет попредварительной заявке США № 63/116,004, поданной 19 ноября 2020, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены здесь посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и индивидуально указаны для включения посредством ссылки, и как если бы они были изложены целиком. В случае противоречия между термином, используемым в настоящей заявке, и термином, определенным во включенной ссылке, определение данного раскрытия имеет решающее значение.

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и, таким образом, включен посредством ссылки во всей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 15 ноября 2021 года, называется 199249_703601_SL.txt и имеет размер 10 425 байт.

Предшествующий уровень техники

В последние годы иммунотерапия стала чрезвычайно эффективным инструментом для лечения рака. При солидных опухолях иммунотерапия с использованием опосредованной моноклональными антителами блокады «контрольной точки» запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) и антигена, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4), привела к стойкому ответу, получив одобрение Управления по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) по целому ряду показаний (La-Beck et al., 2015; Mahoney et al., 2015). Эти одноагентные методы иммунотерапии не приводят к долгосрочным преимуществам у большинства пациентов (Herbst et al., 2014; Weber et al., 2015) из-за более доминирующих иммуносупрессивных механизмов, которые ограничивают функцию Т-клеток в микроокружении опухоли (Sharma et al., 2015). Необходима разработка усовершенствованной онколитической иммунотерапии для ремоделирования микроокружения опухоли с целью усиления

функции и дифференцировки Т-клеток и обеспечения усиленной системной доставки вируса.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, содержащие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, включающий белок, модулирующий метаболизм, или его функциональный фрагмент или вариант, причем экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, содержит полипептид, включающий PL-2 или его функциональный фрагмент, и полипептид, включающий лептин или его функциональный фрагмент; экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор хемокина, или его функциональный фрагмент или вариант, где рецептором хемокина является CCR2; и генетическую модификацию в вирусном геноме модифицированного онколитического вируса. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, содержит кодон-оптимизированный вариант кодирующей последовательности рецептора хемокина человека. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых слитый белок дополнительно содержит цитокин, или его функциональный фрагмент или вариант. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых генетическая модификация вирусного каркаса представляет собой мутацию или делецию гена A52R. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых делеция является полной или частичной делецией. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых онколитический вирус дополнительно содержит делецию гена тимидинкиназы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, где онколитический вирус включает вирус кори, полиовирус, поксвирус, вирус осповакцины, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус болезни Ньюкасла, вирус долины Сенека, лентивирус, менговирус или вирус миксомы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, где онколитический вирус представляет собой вирус оспы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых вирус оспы является вирусом осповакцины. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых вирус осповакцины представляет собой штамм вируса осповакцины Western Reserve, штамм Copenhagen, штамм INH, штамм Wyeth, штамм NYC60H, штамм Tian Tan, штамм Lister, штамм Ankara, штамм

USSR, штамм ACAM2000, штамм Paris, штамм Bern, штамм Temple of Heaven, штамм Dairen, штамм EM-63, штамм Evans, штамм King, штамм Patwadangar или штамм Tashkent. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, клонирована в локус гена тимидинкиназы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, клонирована в локус гена A52R. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых полипептид, кодирующий IL-2, или его функциональный фрагмент, содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99%, или примерно на 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 4. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых полипептид, кодирующий лептин, или его функциональный фрагмент содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99%, или примерно 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 5. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, содержащий белок, модулирующий метаболизм, или функциональный фрагмент, или его вариант, содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 1. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, или функциональный фрагмент, или его вариант, содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, дополнительно содержащие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую гиалуронидазу. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых гиалуронидаза представляет собой PH-20 или HysA.

В настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, содержащие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок лептин-

интерлейкин (IL)-2; экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CCR2, и делецию гена A52R. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, где онколитический вирус включает вирус кори, полиовирус, поксвирус, вирус осповакцины, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус болезни Ньюкасла, вирус долины Сенека, лентивирус, менговирус или вирус миксомы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых онколитический вирус представляет собой вирус оспы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых вирус оспы является вирусом осповакцины. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых вирус осповакцины представляет собой штамм вируса осповакцины Western Reserve, штамм Copenhagen, штамм INH, штамм Wyeth, штамм NYCBON, штамм Tian Tan, штамм Lister, штамм Ankara, штамм USSR, штамм ACAM2000, штамм Paris, штамм Bern, штамм Temple of Heaven, штамм Dairen, штамм EM-63, штамм Evans, штамм King, штамм Patwadangar или штамм Tashkent. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, которые дополнительно содержат делецию гена тимидинкиназы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок лептин-интерлейкин (IL)-2, клонирована в локус гена тимидинкиназы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, в которых нуклеиновая кислота, кодирующая CCR2, клонирована в локус гена A52R. Здесь представлены модифицированные онколитические вирусы любого из предыдущих описаний, дополнительно содержащие мутацию или делецию вирусного гена, выбранного из группы, состоящей из A1, A2, VH1, A33, I7, K7R, B8R, C12L, B15R, B14R, K1L, N1L, M2L, A49R, A46R, E3L, C4, C16 и их функционального домена, или фрагмента, или варианта, или любых их комбинаций. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы, дополнительно содержащие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одно из HMGB1, PIAS3, LIGHT, фракталкина, ITAC, IL15, IL15R α , CCL5, их функционального домена или фрагмента, или варианта, или любые их комбинации.

В настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, содержащие модифицированный онколитический вирус в соответствии с любым из предыдущих описаний. Далее в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, дополнительно содержащие по меньшей мере одно из солюбилизующего агента, вспомогательного вещества или фармацевтически приемлемого носителя. Далее в

настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, в которых вспомогательное вещество включает одно или более из буферного агента, стабилизатора, антиоксиданта, связующего агента, разбавителя, диспергирующего агента, контролирующего скорость агента, смазочного агента, глицерина, дезинтегранта, пластификатора, консерванта, или любые их комбинации. Далее в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, в которых вспомогательное вещество включает динатрия гидрофосфат дигидрат, натрия дигидрофосфат дигидрат, натрия хлорид, миоинозитол, сорбитол или любые их комбинации. Далее в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, которые не содержат консерванта. Далее в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, дополнительно содержащие одно или более из консерванта, разбавителя и носителя. Далее в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, дополнительно содержащие дополнительный активный ингредиент или его соль. Далее здесь представлены фармацевтические композиции, в которых солюбилизующим агентом является стерильная вода. Далее в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, дополнительно содержащие дополнительный активный ингредиент, где дополнительным активным ингредиентом является противораковый агент или другой онколитический вирус.

В настоящей заявке представлены наборы, содержащие модифицированный онколитический вирус любого из предыдущих описаний. Здесь представлены наборы, содержащие фармацевтическую композицию любого из предыдущих описаний. Также здесь представлены наборы, дополнительно содержащие по меньшей мере одно из противоракового агента или дополнительного онколитического вируса.

В настоящей заявке представлены способы усиления терапевтического эффекта модифицированного онколитического вируса при системной доставке модифицированного онколитического вируса субъекту по сравнению с системным введением эталонного вируса, содержащего мутацию ТК, но не экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, или экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор хемокина, включающие системное введение модифицированного онколитического вируса в соответствии с любым из предыдущих описаний, или фармацевтической композиции, как определено в любом из предыдущих описаний.

В настоящей заявке представлены способы лечения, включающие введение субъекту онколитического вируса согласно любому из предыдущих описаний, или фармацевтической композиции согласно любому из предыдущих описаний, где введение приводит к усилению системного иммунного ответа у субъекта по сравнению с введением

субъекту эталонного онколитического вируса, который включает делецию гена тимидинкиназы (ТК-), но не содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, включающий белок, модулирующий метаболизм, или его функциональный фрагмент или вариант, или экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор хемокина, или его функциональный фрагмент или вариант. Далее здесь представлены способы, в которых введение представляет собой системное введение. Далее здесь представлены способы, в которых системное введение включает по меньшей мере одно из внутриопухолевого, внутривенного, парентерального, интрадермального, внутримышечного, трансдермального, ректального, интрауретрального, интравагинального, интраназального, интратекального, интраперитонеального, интрадентального, подкожного, чрескожного, интратрахеального, интраартериального, интравезикального, ингаляционного, перорального введения, или любые их комбинации. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых введение является внутриопухолевым. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых введение осуществляют внутривенно. Далее в настоящей заявке представлены способы, при которых у субъекта обнаружен рак.

В настоящей заявке представлены способы лечения рака у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного онколитического вируса по любому из предыдущих описаний. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых рак является по меньшей мере одним из меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака брюшины, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака яичников, лейкоза, лимфомы, почечно-клеточной карциномы, рака поджелудочной железы, эпителиальной карциномы, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, рака шейки матки, карциномы толстой кишки, колоректального рака, рака двенадцатиперстной кишки, аденокарциномы поджелудочной железы, аденокистозного рака, саркомы, мезотелиомы, мультиформной глиобластомы, астроцитомы, множественной миеломы, карциномы предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы, аденокарциномы поджелудочной железы, плоскоклеточного рака головы и шеи, плоскоклеточного рака шейки матки, остеосаркомы, эпителиальной карциномы яичников, острой лимфобластной лимфомы, миелопролиферативного новообразования или любых их комбинаций. Далее здесь представлены способы, в которых модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в дозировке, которая составляет примерно от 10^6 БОЕ/мл до 10^{10} БОЕ/мл онколитического вируса. Далее в настоящей заявке представлены

способы, в которых модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в дозировке, которая содержит приблизительно 5×10^9 БОЕ/мл онколитического вируса. Далее здесь представлены способы, в которых модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят независимо в начальной дозе в течение первого периода времени, промежуточной дозе в течение второго периода времени и высокой дозе в течение третьего периода времени. Далее в настоящей заявке представлены способы, включающие независимое введение начальной, промежуточной и высокой дозы, при этом начальная доза ниже, чем промежуточная доза, а промежуточная доза ниже, чем высокая доза. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых первый, второй и третий периоды времени составляют каждый примерно от 1 недели до примерно 3 недель. Далее здесь представлены способы, в которых модифицированный онколитический вирус и фармацевтическая композиция независимо содержат жидкую лекарственную форму, которую вводят в объеме примерно от 1 мл до 5 мл, примерно от 5 мл до 10 мл, примерно от 15 мл до 20 мл, примерно от 25 мл до 30 мл, примерно от 30 мл до 50 мл, примерно от 50 мл до 100 мл, примерно от 100 мл до 150 мл, примерно от 150 мл до 200 мл, примерно от 200 мл до 250 мл, примерно от 250 мл до 300 мл, примерно от 300 мл до 350 мл, примерно от 350 мл до 400 мл, примерно от 400 мл до 450 мл, примерно от 450 мл до 500 мл, примерно от 500 мл до 750 мл, или от 750 мл до 1000 мл. Далее здесь представлены способы, в которых модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в жидкой лекарственной форме, твердой лекарственной форме, ингаляционной лекарственной форме, интраназальной лекарственной форме, липосомальной композиции, лекарственной форме, содержащей наночастицы, лекарственной форме, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной форме или в любых их комбинациях. Далее здесь представлены способы, в которых модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель или примерно 12 недель. Далее здесь представлены способы, в которых модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят один раз в день, два раза в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят внутривенно, интраперитонеально или путем внутриопухолевой инъекции. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых модифицированный онколитический

вирус или фармацевтическую композицию вводят в виде болюсной инъекции или медленной инфузии. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых введение модифицированного онколитического вируса или фармацевтической композиции приводит к первому пику вирусной нагрузки примерно через 1 час - примерно через 3 дня и второму пику вирусной нагрузки примерно через 3 дня - примерно через 10 дней после введения первой дозы. Далее здесь представлены способы, включающие применение дополнительной терапии, которую проводят в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель, или примерно 12 недель. Далее здесь представлены способы, в которых дополнительную терапию проводят один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели. Далее здесь представлены способы, в которых дополнительную терапию применяют в виде в жидкой лекарственной формы, твердой лекарственной формы, ингаляционной лекарственной формы, интраназальной лекарственной формы, липосомальной композиции, лекарственной формы, содержащей наночастицы, лекарственной формы, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной формы или любых их комбинаций. Далее здесь представлены способы, в которых дополнительную терапию проводят в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель или примерно 12 недель. Далее здесь представлены способы, в которых дополнительную терапию проводят один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели. Далее здесь представлены способы, в которых дополнительную терапию применяют с помощью жидкой лекарственной формы, твердой лекарственной формы, ингаляционной лекарственной формы, интраназальной лекарственной формы, липосомальной композиции, лекарственной формы, содержащей наночастицы, лекарственной формы, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной формы, или любых их комбинаций. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых дополнительную терапию применяют перорально, внутривенно, путем внутривенной инъекции или с помощью облучения. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых субъектом является человек. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых до введения модифицированного онколитического вируса или фармацевтической композиции у субъекта был диагностирован рак. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых до введения модифицированного онколитического вируса или фармацевтической композиции или дополнительной терапии у субъекта был

диагностирован рак. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых дополнительная терапия включает химиотерапию, облучение, онколитическую вирусную терапию дополнительным вирусом, лечение иммуномодулирующими белками, терапию CAR-T-клетками, противораковым средством, или любые их комбинации. Далее в настоящей заявке представлены способы, в которых дополнительная терапия включает введение иммуномодулирующего средства, содержащего антитело против CD33 и его варибельную область, антитело против CD11b и его варибельную область, ингибитор COX2, цитокин, хемокин, антитело против CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, или агонист TLR. Далее в настоящей заявке представлены способы, включающие применение дополнительной терапии, при этом дополнительная терапия включает введение противоракового агента, где противораковым агентом является химиотерапевтический агент.

Краткое описание чертежей

Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ этого раскрытия будет получено путем ссылки на следующее подробное описание, в котором излагаются иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы этого раскрытия, и прилагаемые к ним чертежи.

На Фигуре 1 показано схематическое представление генов, удаленных из каркаса вируса осповакцины, и экзогенных генов, замененных в соответствующих локусах для создания примерного модифицированного вируса осповакцины (сокращенно «ММС») из настоящего изобретения.

На Фигурах 2А-2D показан примерный модифицированный вирус осповакцины (сокращенно «ММС»), модифицированный для удаления генов А52R и ТК и вставки CCR2 и лептина-IL-2, демонстрирующий повышенный терапевтический эффект и системную доставку на моделях опухолей LLC (карциномы легкого Льюиса).

На Фигурах 3А - 3В показан примерный модифицированный вирус осповакцины (сокращенно «ММС»), демонстрирующий усиленный терапевтический эффект и системную доставку у предварительно иммунизированных мышей на моделях опухолей LLC.

На Фигуре 4 показан примерный модифицированный вирус осповакцины (сокращенно «ММС»), проявляющий повышенный терапевтический эффект на моделях опухолей RENCA (карциномы почки).

На Фигурах 5А-5В показано исследование биораспределения примерного модифицированного вируса осповакцины (сокращенно «NT428N»), который демонстрирует более высокую селективность к опухолям при низком накоплении в нормальных тканях.

Подробное описание изобретения

Определения

Терминология, используемая в настоящей заявке, предназначена только для описания конкретных случаев и не предназначена для ограничения. Используемые здесь формы единственного числа могут включать также формы множественного числа, если контекст явно не указывает на иное. Кроме того, в той мере, в какой термины «содержит», «содержащий», «включающий», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты используются либо в подробном описании, либо в формуле изобретения, такие термины предназначены для включения способом, аналогичным термину «содержащий».

Термин «примерно» или «приблизительно» может означать в пределах допустимого диапазона погрешностей для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как измеряется или определяется значение, например, от ограничений измерительной системы. Например, «приблизительно» может означать в пределах 1 или более чем 1 стандартного отклонения, в соответствии с практикой в данном значении. Если в заявке и формуле изобретения описаны конкретные значения, если не указано иное, следует предполагать, что термин «приблизительно» означает допустимый диапазон погрешностей для конкретного значения, например, $\pm 10\%$ от значения, модифицируемого термином «приблизительно».

Термины «индивидуум», «пациент» или «субъект» могут использоваться взаимозаменяемо. Ни один из терминов не требует и не ограничивается ситуациями, характеризующимися наблюдением (например, постоянным или периодическим) медицинского работника (например, врача, дипломированной медсестры, практикующей медсестры, помощника врача, санитаря или работника хосписа). В некоторых вариантах осуществления пациенты, субъекты или индивидуумы могут находиться под наблюдением медицинского работника.

Термины «гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты» или «экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты», используемые в настоящей заявке по отношению к конкретному вирусу, могут относиться к последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из источника, отличного от указанного вируса. Под «гетерологичным» геном, нуклеиновой кислотой, антигеном или белком понимают

нуклеиновокислотную или аминокислотную последовательность, которые отсутствуют в геноме поксвируса дикого типа (например, MVA или MVA-BN). «Гетерологичный ген», присутствующий в вирусе осповакцины, таком как MVA или MVA-BN, может быть включен в геном вируса осповакцины таким образом, чтобы после введения модифицированного вируса осповакцины в клетку-хозяина он экспрессировался в виде соответствующего гетерологичного генного продукта, такого как «гетерологичный антиген» и/или «гетерологичный белок». Экспрессия может быть достигнута путем функционального связывания гетерологичного гена с регуляторными элементами, которые обеспечивают экспрессию в клетке, инфицированной вирусом осповакцины. Регулирующие элементы включают натуральный или синтетический промотор вируса осповакцины.

Используемые в настоящей заявке термины «экспрессируемый», «экспрессировать», «экспрессия» и тому подобные, которые могут использоваться взаимозаменяемо, могут обозначать только транскрипцию, а также как транскрипцию, так и трансляцию представляющей интерес последовательности. Таким образом, в отношении экспрессии нуклеотидной последовательности, присутствующей в форме ДНК, продуктом, получающимся в результате этой экспрессии, может быть либо РНК (получающаяся в результате только транскрипции подлежащей экспрессии последовательности), либо полипептидная последовательность (получающаяся как в результате транскрипции, так и трансляции подлежащей экспрессии последовательности). Термин «экспрессия» может также включать возможность того, что как РНК, так и полипептидный продукт являются результатом указанной экспрессии и остаются вместе в одной и той же общей среде. Например, это тот случай, когда мРНК сохраняется после ее трансляции в полипептидный продукт. Используемый здесь термин «кассета экспрессии» может быть определен как часть вектора или рекомбинантного вируса, обычно используемого для клонирования и/или трансформации. Кассета экспрессии может состоять из (а) одной или нескольких кодирующих последовательностей (например, открытой рамки считывания (ORF), генов, нуклеиновых кислот, кодирующих белок и/или антиген), и (б) последовательностей, контролирующих экспрессию одной или нескольких кодирующих последовательностей (например, промотора). Дополнительно, кассета экспрессии может содержать 3'-нетранслируемую область (например, терминатор транскрипции, такой как терминатор транскрипции вируса осповакцины). «Кассета экспрессии» может использоваться взаимозаменяемо с термином «транскрипционная единица».

Термин «мутация», используемый в настоящей заявке, может относиться к делеции, вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, инверсии или замене, включая мутации, устраняющие открытую рамку считывания, как обычно понимают в данной области техники.

Термин «ген», используемый в настоящей заявке, может относиться к сегменту нуклеиновой кислоты, который кодирует отдельный белок или РНК (также называемый «кодирующей последовательностью» или «кодирующей областью»), при необходимости вместе с ассоциированными регуляторными областями, такими как промоторы, операторы, терминаторы и подобные, которые могут быть расположены выше или ниже от кодирующей последовательности.

Термины «мутантный вирус» и «модифицированный вирус», используемые в настоящей заявке взаимозаменяемо, могут относиться к вирусу, содержащему одну или несколько мутаций в своем геноме, включая, без ограничения указанными, делеции, вставки гетерологичных нуклеиновых кислот, инверсии, замены или их комбинации.

Термин «натуральный», используемый в настоящей заявке по отношению к вирусу, может указывать на то, что вирус может быть обнаружен в природе, т.е. он может быть выделен из источника в природе и не был преднамеренно модифицирован.

Термины «ингибирование», «уменьшение» или «предотвращение», или любая вариация этих терминов, упомянутых в настоящей заявке, могут включать любое измеримое снижение или полное ингибирование для достижения необходимого результата.

«Промотор», используемый в настоящей заявке, может представлять собой контрольную последовательность, которая представляет собой область нуклеиновокислотной последовательности, на которой контролируются инициация и скорость транскрипции. В определенных вариантах осуществления промотор может содержать генетические элементы, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие факторы транскрипции. Термины «функционально расположенный», «функционально связанный», «функционально сцепленный», «под контролем» и «под транскрипционным контролем» могут означать, что промотор находится в правильном функциональном местоположении и/или ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты для контроля инициации транскрипции и/или экспрессии этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления промотор может использоваться, а может и не использоваться в сочетании с «энхансером», который относится к цис-действующей регуляторной

последовательности, участвующей в активации транскрипции нуклеиновокислотной последовательности.

Используемый в настоящей заявке термин «промотор» может обозначать регуляторную область нуклеиновой кислоты, обычно ДНК, расположенную выше от последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии, которая содержит специфические элементы последовательности ДНК, которые распознаются и связываются, например, белковыми факторами транскрипции и полимеразы, ответственными за синтез РНК из кодирующей области активизируемого гена. Поскольку промоторы обычно находятся непосредственно рядом с рассматриваемым геном, позиции в промоторе обозначаются относительно сайта начала транскрипции, где начинается транскрипция ДНК для конкретного гена (т.е. позиции выше представляют собой отрицательные числа, отсчитываемые от -1, например, -100 - это позиция на 100 пар оснований выше). Таким образом, промоторная последовательность может содержать нуклеотиды вплоть до положения -1. Однако нуклеотиды из положения +1 не являются частью промотора, т.е. в связи с этим следует отметить, что кодон инициации трансляции (ATG или AUG) не является частью промотора. «Натуральный промотор вируса осповакцины» может быть эндогенным промотором генома вируса осповакцины. «Синтетический промотор вируса осповакцины» может означать рекомбинантный сконструированный промотор, активный для прямой транскрипции нуклеиновой кислоты, экспрессируемой вирусом осповакцины (например, модифицированным вирусом осповакцины в клетках CEF).

Используемый в настоящей заявке термин «функционально связанный» означает, что описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать по назначению, например, промотор для транскрипции подлежащей экспрессии нуклеиновой кислоты. Первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональной взаимосвязи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор размещен в положении, в котором он может направлять транскрипцию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и, при необходимости, соединяют две области, кодирующие белок, в одной и той же рамке считывания.

Термин «нуклеиновая кислота», «нуклеотидная последовательность», «нуклеиновокислотная последовательность» и «полинуклеотид» могут использоваться

взаимозаменяемо и относятся к РНК или ДНК, которые являются линейными или разветвленными, одно- или двухцепочечными, или их гибридом. Этот термин также охватывает гибриды РНК/ДНК. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированная ДНК любой последовательности, изолированная РНК любой последовательности, нуклеиновокислотные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, урацил, другие сахара и связующие группы, такие как фторрибоза и тиолат, и нуклеотидные ответвления. Последовательность нуклеотидов может быть дополнительно модифицирована после полимеризации, например, путем конъюгации, с маркирующим компонентом. Другими типами модификаций, включенными в это определение, являются кэпирование, замена одного или нескольких натуральных нуклеотидов аналогом и введение средств для присоединения полинуклеотида к белкам, ионам металлов, маркирующим компонентам, другим полинуклеотидам или твердой подложке. Полинуклеотиды могут быть получены химическим синтезом или выделены из микроорганизма.

Термин «открывающая рамка считывания» (ORF) может относиться к последовательности нуклеотидов, которая может быть переведена в аминокислоты. Как правило, такая ORF содержит стартовый кодон, последующую область, обычно имеющую длину, кратную 3 нуклеотидам, но не содержащую стоп-кодона (TAG, TAA, TGA, UAG, UAA или UGA) в данной рамке считывания. Как правило, ORF возникают естественным путем или создаются искусственно, например, с помощью генно-технологических средств. ORF может кодировать белок, в котором аминокислоты, в которые он может быть переведен, образуют цепь с пептидной связью.

Используемый в настоящей заявке термин «основная ORF» может означать ORF, при экспериментальном частичной или полной делеции которой, например, в модифицированном вирусе осповакцины, репликация или рост модифицированного вируса осповакцины, или как репликация, так и рост снижаются (например, по меньшей мере в 15 раз у мутанта по сравнению с модифицированным вирусом осповакцины без делеции). Способы определения репликации и роста вируса MVA хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, методы описаны в книге «Virus and Poxvirology, Methods and Protocols», Volume 269 Ed. By Stuart N. Isaacs (Humana Press (2004), см., например, Chapter 8, Growing Poxviruses and determining Virus Titer, Kotwal and Abrahams). Скорости вирусного роста MVA могут быть определены с помощью

флуоресценции GFP, как, например, описано в Orubu et al. (2012) PLOS One 7:e40167 с использованием, например, клеток CEF или способа, описанного в Hornemann et al. (2003), Journal of Virology 77: 8394-8407.

Оптимизация кодонов представляет собой метод, который может быть использован для максимизации экспрессии белка в организме путем повышения эффективности трансляции интересующего гена. Различные организмы часто проявляют особые предпочтения к одному из нескольких кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту, из-за мутационных сдвигов и естественного отбора. Например, у быстрорастущих микроорганизмов, таких как *E. coli*, оптимальные кодоны отражают состав их соответствующего пула геномных тРНК. Следовательно, кодоны с низкой частотой аминокислоты могут быть заменены кодонами для той же аминокислоты, но с высокой частотой в быстрорастущем микроорганизме. Соответственно, экспрессия оптимизированной последовательности ДНК улучшается в быстрорастущем микроорганизме. Как предусмотрено в настоящей заявке, полинуклеотидные последовательности могут быть оптимизированы по кодонам для оптимальной экспрессии полипептида в конкретном организме, таком как человек. Полинуклеотиды по раскрытию могут включать последовательности, которые являются дегенеративными в результате генетического кода, например, оптимизированного использования кодонов или адаптации использования кодонов для экспрессии у конкретного хозяина, в частности, для экспрессии у млекопитающих. Используемый в настоящей заявке термин «оптимизированный» или «оптимизация» может относиться к полинуклеотиду, который генетически сконструирован для увеличения его экспрессии у данного вида. Чтобы обеспечить оптимизированные полинуклеотиды, кодирующие белок, экспрессируемый модифицированным вирусом осповакцины по настоящему изобретению, например, белок рецептора хемокина, последовательность ДНК гена белка рецептора хемокина может быть модифицирована таким образом, чтобы (1) содержать кодоны, предпочтительные для высокоэкспрессируемых генов конкретного вида; (2) иметь содержание А+Т или G+C в составе нуклеотидных оснований до уровня, по существу обнаруженного у указанных видов; (3) формировать последовательность инициации указанных видов; или (4) устранять последовательности, которые вызывают дестабилизацию, неподходящее полиаденилирование, деградацию и терминацию РНК, или которые образуют шпильки вторичной структуры или сайты сплайсинга РНК. Повышенная экспрессия белка рецептора хемокина у указанных видов может быть достигнута путем использования частоты распределения использования кодонов у эукариотических и прокариотических организмов, или у конкретного вида. Термин «частота использования предпочтительного

кодона» может относиться к предпочтению, проявляемому конкретной клеткой-хозяином при использовании нуклеотидных кодонов для определения данной аминокислоты. Существует 20 природных аминокислот, большинство из которых определяются более чем одним кодоном. Следовательно, все вырожденные нуклеотидные последовательности могут быть включены в раскрытие до тех пор, пока аминокислотная последовательность белка (например, белка рецептора хемокина), кодируемого нуклеотидной последовательностью, функционально неизменна.

Термин «рекомбинантный» применительно к нуклеиновой кислоте, вектору, например, модифицированному вектору вируса осповакцины и т.п., может относиться к нуклеиновой кислоте, вектору или полученным путем искусственной комбинации двум или более гетерологичным в других отношениях сегментам нуклеиновокислотной последовательности, или к нуклеиновой кислоте, вектору или нуклеиновокислотной последовательности, содержащим такую искусственную комбинацию двух или более гетерологичных в остальном сегментов последовательности. Искусственная комбинация чаще всего достигается путем искусственных манипуляций с изолированными сегментами нуклеиновых кислот с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов генной инженерии. Как правило, «рекомбинантный» модифицированный вирус осповакцины, описанный в настоящей заявке, может относиться к модифицированным вирусам осповакцины, которые могут быть получены стандартными методами генной инженерии. Например, в некоторых аспектах модифицированные вирусы осповакцины по настоящему раскрытию, таким образом, могут быть генно-инженерными или генетически модифицированными вирусами осповакцины. Термин «рекомбинантный MVA», таким образом, может включать модифицированные вирусы осповакцины (например, MVA-BN), которые имеют стабильно интегрированную рекомбинантную нуклеиновую кислоту, например, в форме транскрипционной единицы, в своем геноме. Транскрипционная единица может включать промотор, энхансер, терминатор и/или сайленсер. Рекомбинантные модифицированные вирусы осповакцины по настоящему изобретению могут экспрессировать гетерологичные антигенные детерминанты, полипептиды или белки (антигены) при индукции регуляторных элементов.

Как используется в настоящей заявке, «терминатор транскрипции» может состоять из последовательностей ДНК, вовлеченных в специфическое завершение транскрипта РНК РНК-полимеразой. Вирус осповакцины, включающий РНК-полимеразу MVA, прекращает транскрипцию после сигнала РНК (UUUUUNU, TTTTNT или T5NT на уровне ДНК) в зарождающейся РНК (Earl et al. (1990), J. Virol. 64:2448-2451).

«Терминатор транскрипции» иногда может упоминаться в литературе как «сигнал терминации» и, таким образом, термины могут использоваться взаимозаменяемо.

Термины «белок», «пептид», «полипептид» и «полипептидный фрагмент» могут использоваться в настоящей заявке взаимозаменяемо и могут относиться к полимерам с аминокислотными остатками любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот, и он может прерываться химическими фрагментами, отличными от аминокислот. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или в результате вмешательства; например, образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любых других манипуляций или модификаций, таких как конъюгация с маркирующим или биоактивным компонентом.

Термин «гомология», используемый в настоящей заявке, может относиться к вычислениям «гомологии» или «процентной гомологии» между двумя или более нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, которые могут быть определены путем выравнивания последовательностей для целей оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в первую последовательности). Затем можно сравнить нуклеотиды в соответствующих положениях, и процент идентичности между двумя последовательностями может быть функцией количества идентичных положений, разделяемых последовательностями (т.е. $\% \text{ гомологии} = \frac{\text{количество идентичных положений}}{\text{общее количество положений}} \times 100$). Например, положение в первой последовательности может быть занято тем же нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы идентичны в этом положении. Процент гомологии между двумя последовательностями может быть функцией количества идентичных положений, разделяемых последовательностями, с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. В некоторых вариантах осуществления длина последовательности, выровненной для целей сравнения, может составлять по меньшей мере примерно 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 95% от длины эталонной последовательности. Поиск BLAST® позволяет определить гомологию между двумя последовательностями. Гомология может быть между целыми длинами двух последовательностей или между долями полных длин двух последовательностей. Эти две последовательности могут быть генами, нуклеотидными последовательностями, белковыми последовательностями, пептидными последовательностями, аминокислотными последовательностями или их

фрагментами. Фактическое сравнение двух последовательностей может быть выполнено хорошо известными способами, например, с использованием математического алгоритма. Неограничивающий пример такого математического алгоритма может быть описан в Karlin, S. and Altschul, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90- 5873-5877 (1993). Такой алгоритм может быть включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0), как описано в Altschul, S. et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997). При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут использоваться любые соответствующие параметры соответствующих программ (например, NBLAST). Например, параметры для сравнения последовательностей могут быть установлены на значение счета = 100, длина слова = 12 или могут варьировать (например, W=5 или W=20). Другие примеры включают алгоритм Майерса и Миллера, CABIOS (1989), ADVANCE, ADAM, BLAT и FASTA. В другом варианте осуществления процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием, например, программы GAP в программном пакете GCG (Accelrys, Кембридж, Великобритания).

Термин «субъект» может относиться к животному, включая, без ограничения указанными, примата (например, человека), корову, овцу, козу, лошадь, собаку, кошку, кролика, крысу или мышь. Термины «субъект» и «пациент» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо применительно, например, к млекопитающему субъекту, такому как субъект-человек.

Термин «животное», используемый в настоящей заявке, может включать млекопитающих, птиц и тому подобных. Животное или хозяин могут включать млекопитающих и человека. Животное может быть выбрано из группы, состоящей из лошадиных (например, лошадь), псовых (например, собаки, волки, лисы, койоты, шакалы), кошачьих (например, львы, тигры, домашние кошки, дикие кошки, другие крупные кошки и другие кошачьи, включая гепардов и рысь), овечьих (например, овца), крупного рогатого скота (например, корова), свиней (например, поросенок), козлиных (например, коза), птиц (например, курица, утка, гусь, индейка, перепел, фазан, попугай, вьюрки, ястреб, ворона, страус, эму и казуар), приматов (например, полуобезьяна, долгопят, мартышка, гиббон, обезьяна) и рыб.

Термины «лечить», «излечение» и «лечение» могут означать, что они включают облегчение или прекращение расстройства, болезни или состояния; или одного или нескольких симптомов, связанных с расстройством, болезнью или состоянием; или облегчение или устранение причины (причин) расстройства, болезни или состояния как таковых. Необходимы эффекты лечения могут включать, без ограничения указанными, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов,

уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или смягчение патологического состояния, и ремиссию или улучшение прогноза.

Термин «терапевтически эффективное количество» может относиться к количеству соединения, которое при введении может быть достаточным для предотвращения развития или облегчения в некоторой степени одного или нескольких симптомов расстройства, болезни или состояния, подлежащего лечению. Термин «терапевтически эффективное количество» может также относиться к количеству соединения, которое является достаточным для того, чтобы вызвать биологическую или медицинскую реакцию клетки, ткани, системы, животного или человека, необходимую для исследователя, ветеринара, врача-терапевта или клинициста.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель», «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество», «физиологически приемлемый носитель» или «физиологически приемлемое вспомогательное вещество» может относиться к фармацевтически приемлемому материалу, композиции или раствору, такому как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал. Компонент может быть «фармацевтически приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами фармацевтической композиции. Он также может быть пригоден для использования при контакте с тканями или органами людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции, иммуногенности, или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением пользы/риска. См. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Edition; Rowe et al., Eds., The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2005; and Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd Edition; Ash and Ash Eds., Gower Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, Gibson Ed., CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2004).

Термин «фармацевтическая композиция» может относиться к смеси соединения, раскрытого в настоящей заявке, с другими химическими компонентами, такими как разбавители или носители. Фармацевтическая композиция может облегчить введение соединения в организм. В данной области техники существует множество способов введения соединения, включая, без ограничения указанными, пероральное, инъекционное, аэрозольное, парентеральное и местное введение. Фармацевтические композиции также могут быть получены взаимодействием соединений с неорганическими или

органическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, салициловая кислота и тому подобное.

«Состав» может относиться к композиции, содержащей активный фармацевтический или биологический ингредиент, например, модифицированный вирус осповакцины по настоящему изобретению, наряду с одним или несколькими дополнительными компонентами. Термин «состав» может использоваться в настоящей заявке взаимозаменяемо с терминами «фармацевтическая композиция», «вакцинная композиция» и «вакцинный препарат». Составы могут быть жидкими или твердыми (например, лиофилизированными).

Термин «иммуногенная композиция» или «иммунологическая композиция» может охватывать композицию, которая может вызывать иммунный ответ против представляющего интерес антигена, экспрессируемого из модифицированного вируса осповакцины, как описано в настоящей заявке. Термин «вакцина или вакцинная композиция» может охватывать любую композицию, которая может индуцировать защитный иммунный ответ против представляющих интерес антигенов, или которая может эффективно защищать от представляющего интерес антигена; например, после введения или инъекции животному или человеку вызывает защитный иммунный ответ против антигена или обеспечивает эффективную защиту от антигена, экспрессируемого из вектора модифицированного вируса осповакцины. Композицию можно вводить отдельно или можно вводить последовательно с другими композициями или терапевтическими композициями, тем самым обеспечивая комбинированную композицию, коктейль или мультивалентную смесь из двух или более, таких как три, четыре, пять или шесть композиций.

«Противораковый агент», используемый в настоящей заявке, может относиться к средству или терапии, которые способны оказывать подавляющее влияние на рак у субъекта, например, путем уничтожения раковых клеток, индукции апоптоза в раковых клетках, снижения скорости роста раковых клеток, уменьшения заболеваемости или количества метастазов, уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, уменьшения кровоснабжения опухоли или раковых клеток, стимуляции иммунного ответа против раковых клеток или опухоли, предотвращения или ингибирования прогрессирования рака или увеличения продолжительности жизни субъекта, больного раком. Неограничивающие примеры противораковых агентов могут включать

биологические агенты (биотерапию), химиотерапевтические агенты и агенты для лучевой терапии.

Термин «прайм-буст вакцинация» может относиться к стратегии вакцинации, использующей первую, иницирующую инъекцию вакцины, нацеленной на специфический антиген, за которой с интервалами следуют одна или несколько усиливающих инъекций той же вакцины. Прайм-буст вакцинация может быть гомологичной или гетерологичной. Гомологичная прайм-буст вакцинация может использовать вакцину, содержащую один и тот же иммуноген и вектор, как для начальной инъекции, так и для одной или нескольких стимулирующих инъекций. Гетерологичная прайм-буст вакцинация использует вакцину, содержащую один и тот же иммуноген как для начальной инъекции, так и для одной или нескольких стимулирующих инъекций, но разные векторы для начальной инъекции и одной или нескольких стимулирующих инъекций. Например, гомологичная прайм-буст вакцинация может использовать модифицированный вектор вируса осповакцины, содержащий одни и те же нуклеиновые кислоты, экспрессирующие антигены, представляющие интерес, как для прайм-инъекции, так и для одной или нескольких бустерных инъекций. Напротив, при гетерологичной прайм-буст вакцинации может использоваться модифицированный вектор вируса осповакцины, содержащий нуклеиновые кислоты, экспрессирующие один антигенный белок для прайм-инъекции, и другие модифицированные векторы вируса осповакцины, экспрессирующие другой антигенный белок, не содержащийся в прайм-инъекции, или наоборот. Гетерологичная прайм-буст вакцинация может также включать различные комбинации, такие как, например, использование плазмиды, кодирующей иммуноген, в начальной инъекции и использование модифицированного вируса осповакцины, кодирующего тот же иммуноген, в одной или нескольких стимулирующих инъекциях, или использование рекомбинантного белка иммуногена в начальной инъекции и использование модифицированного вируса осповакцины, кодирующего тот же белковый иммуноген, в одной или нескольких стимулирующих инъекциях.

Вирусы

Способы и системы, представленные в настоящей заявке, могут быть применимы для получения множества различных вирусов, например, онколитических вирусов, например, рекомбинантных онколитических вирусов. В некоторых случаях способы и системы, представленные в настоящей заявке, могут быть применимы для получения вирусов осповакцины, например, рекомбинантных вирусов осповакцины.

Примеры онколитических вирусов, к которым применимы представленные в настоящей заявке способы и система, включают вирус кори, полиовирус, поксвирус,

вирус осповакцины, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус болезни Ньюкасла, вирус долины Сенека, лентивирус, менговирус и вирус миксомы. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус может включать поксвирус. В некоторых примерах онколитический вирус может быть вирусом осповакцины. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус может быть пригоден для системной доставки.

Модифицированные вирусы осповакцины

Используемый в настоящей заявке термин «модифицированный вирус осповакцины» или «рекомбинантный вирус осповакцины» может относиться к вирусу осповакцины, который был модифицирован, например, путем модификации, такой как введение мутаций вирусного каркаса, для экспрессии генов/эпитопов патогена (вирусных, бактериальных или паразитарных патогенов, вызывающих инфекционные заболевания), для экспрессии генов, которые усиливают Т-клеточный ответ, такой как экспрессия TRIF, экспрессия других восходящих и нисходящих молекул TRIF-пути. В некоторых вариантах осуществления введение мутации вирусного каркаса включает полную делецию или частичную делецию одного или нескольких генов вирулентности, или замены с одним или несколькими генами вирулентности вируса (неограничивающие примеры включают гены, которые, как известно, ингибируют цитокины, участвующие в иммунном ответе Th1, или в передаче сигналов врожденного иммунитета, или ингибиторы других компонентов иммунного ответа, или с генами вирулентности осповакцины, замененными более или менее мощными генами с эквивалентной функцией из других поксвирусов).

Модифицированные вирусы осповакцины по настоящему изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления, быть выбраны из группы, состоящей из штамма вируса осповакцины дикого типа и аттенуированных штаммов вируса осповакцины. Неограничивающие примеры штаммов вируса осповакцины могут включать штамм вируса осповакцины Western Reserve (ATCC VR-1354), тимидинкиназа-негативный вирус осповакцины Western Reserve, штамм Copenhagen, штамм IHD, штамм Wyeth (NYCBOH) (ATCC VR-1536), штамм Tian Tan, штамм Lister, штамм NYVAC, модифицированный вирус осповакцины Ankara (MVA) (ATCC VR-1508 или ATCC VR-1566), штамм USSR, штамм ACAM2000, штамм Paris, штамм Bern, штамм Temple of Heaven, штамм Dairen, штамм EM-63, штамм Evans, штамм King, штамм Patwadangar или штамм Tashkent.

В некоторых вариантах осуществления для разработки модифицированного онколитического вируса осповакцины, демонстрирующего усиленную системную доставку и иммунное ремоделирование микроокружения опухоли для усиления функции

и дифференцировки Т-клеток, штамм вируса осповакцины Western Reserve модифицировали путем удаления двух несущественных областей в геноме и добавления чужеродных генов для экспрессии слитого белка и рецептора хемокина. Локусы в вирусном каркасе вируса осповакцины, из которых был удален несущественный ген, также были сконструированы таким образом, чтобы получать чужеродные геномы.

Модификации каркаса вируса осповакцины

Удаленные области и добавленные чужеродные гены в соответствующих локусах подробно описаны на Фиг.1. Список несущественных генов, удаленных из вирусного каркаса, включает ген тимидинкиназы (показан как «ТК-») и ген А52R (показан как «А52R-»). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины может содержать гетерологичную нуклеиновокислотную последовательность, которая обеспечивает усиленную системную доставку и иммунное ремоделирование микроокружения опухоли для усиления функции и дифференцировки Т-клеток. Следовательно, гетерологичная нуклеиновая кислота в некоторых примерах может кодировать один или несколько слитых белков. Гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или белок, может быть клонирована в локус гена тимидинкиназы (ТК) вируса.

Полное удаление гена тимидинкиназы из вирусного каркаса признано Управлением по контролю за продуктами питания и лекарствами США как известная модификация безопасности опухолевого таргетинга, поскольку она ограничивает репликацию вируса клетками, экспрессирующими клеточную тимидинкиназу, которая активируется в большинстве опухолей.

Делеция гена А52R, ингибитора NF-κB, из вирусного каркаса усиливает реакцию Т-клеток памяти, приводящую к усиленному иммунному ответу (Di Pilato M, et al. J Virol 91: e00575-17). Делеция гена А52R высокоэффективна в качестве терапии рака, поскольку, в отличие от многих других делеций, это не снижает репликацию вируса *in vitro*.

Объединение делеций гена ТК и гена А52R в одном и том же каркасе вируса осповакцины привело к созданию двойного механизма безопасности и высокоэффективного онколитического вектора.

В некоторых случаях локусы делеции гена А52R на каркасе вакцины могут быть заменены экзогенной нуклеиновой кислотой, которая кодирует рецепторы хемокинов. Более конкретно, рецептором хемокина может быть рецептор CCR2, который может иметь целевой CCL2, экспрессируемый в опухоли. Экспрессия рецептора хемокина в вирусе приводит к целенаправленной и усиленной системной доставке *in situ* на клеточной основе.

В некоторых случаях локусы делеции гена ТК на каркасе вакцины могут быть заменены экзогенной нуклеиновой кислотой, которая кодирует слитый белок. Более конкретно, слитым белком может быть слитый белок лептин-интерлейкин (IL)-2. Слитый белок лептин-IL-2 повышает активность путем более эффективного таргетинга лептина на Т-клетках (для повышения активности) и регуляторных Т-клетках (для подавления их активности) и вне стромального рецептора лептина в опухоли. Более того, гибридизация IL-2 с лептином создает дополнительную терапевтическую активность за счет совместной стимуляции рецепторов IL-2. Слитый белок дополнительно создает большую молекулу, которая будет более эффективно удерживаться в опухоли и предотвращать системные эффекты. Структура и характеристики слитого белка описаны в документе WO2019148109 (полное раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Другие множественные модификации

В настоящей заявке в некоторых вариантах осуществления обеспечены вакцины, содержащие модифицированные вирусы осповакцины со вставками, мутациями или делециями в вирусном геноме (также упоминаемом здесь как вирусный каркас). Вирусы осповакцины модифицируют или отбирают таким образом, чтобы они обладали низкой токсичностью и накапливались в ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления модификации в вирусном каркасе/вирусном геноме представляют собой модификации, которые делают вирус осповакцины нереплицирующимся или обладающим низкой репликативной способностью. Неограничивающие примеры таких модификаций могут включать мутации в следующих вирусных генах: A1, A2, VH1, A33 и I7.

В некоторых вариантах осуществления мутация вирусного каркаса выбрана из группы, состоящей из полной или частичной делеции гена B15R, полной или частичной делеции гена K7R, полной или частичной делеции гена B14R, полной или частичной делеции гена N1L, полной или частичной делеции гена K1L, полной или частичной делеции гена M2L, полной или частичной делеции гена A49R, полной или частичной делеции гена VH1, полной или частичной делеции гена A33, полной или частичной делеции гена A1; полной или частичной делеции гена A2; полной или частичной делеции гена I7 и полной или частичной делеции гена A46R. Как используется в настоящей заявке, ссылка на вирусный ген может быть сделана путем ссылки на белок, кодируемый геном (например, ген A33 может означать ген, который кодирует белок A33).

В некоторых вариантах осуществления мутация вирусного каркаса, включая любые комбинации замены, вставки и делеции, может приводить к последовательности с менее чем 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90% или менее гомологии

последовательности с последовательностью вирусного гена дикого типа или вирусного белка, кодируемого этим геном. Вирусный ген и кодируемый им белок в некоторых вариантах осуществления выбран из группы, состоящей из B15R, K7R, B14R, N1L, K1L, M2L, A49R, VH1, A33, A1, A2, I7 и A46R.

В некоторых вариантах осуществления вирусный каркас может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или более мутаций в аминокислотной последовательности вирусного белка (например, вирусного антигена). Вирусный антиген в некоторых примерах выбран из группы, состоящей из B15R, K7R, B14R, N1L, K1L, M2L, A49R, VH1, A33, A1, A2, I7 и A46R.

Изобретение обеспечивает в некоторых вариантах осуществления модифицированные вирусы осповакцины, содержащие еще одну мутацию в геноме вируса (вирусном каркасе), которая усиливает Т-клеточное звено иммунного ответа. Мутацией может быть добавление, делеция или замена одной или нескольких нуклеиновых кислот в вирусном геноме (дикого типа или аттенуированных нативных штаммах вируса осповакцины).

В неограничивающих примерах мутация может представлять собой полную или частичную делецию генов, которые, как известно, ингибируют цитокины, участвующие в иммунном ответе Th1. В качестве неограничивающих примеров мутация может представлять собой делецию нуклеиновой кислоты, кодирующей B8R (белки, связывающие интерферон гамма (IFN-g)); C12L (белки, связывающие интерлейкин-18 (IL-18)).

В другом неограничивающем примере мутация может представлять собой полную или частичную делецию генов передачи сигналов врожденного иммунитета. В качестве неограничивающих примеров мутация может представлять собой делецию кодирующей нуклеиновой кислоты B18R (белков, связывающих интерферон I типа (IFN)); A52R (белков-ингибиторов ядерного фактора κB (NF-κB)); E3L (ингибиторов протеинкиназы (PKR)); C4, C16 (ингибиторов пути STING).

В другом неограничивающем примере мутация может представлять собой полную или частичную делецию генов, кодирующих белки для ингибирования других компонентов иммунного ответа. В качестве неограничивающих примеров, мутация может представлять собой полную или частичную делецию нуклеиновой кислоты, кодирующей B15, K7, B14, N1, K1, M2, A49, VH1, A46 или их комбинацию. Мутация вирусного каркаса может также включать замену генов вирулентности осповакцины в основном мощными генами эквивалентной функции из других поксвирусов.

Варианты аминокислотных последовательностей полипептидов по настоящему изобретению могут быть вариантами замены, вставки или делеции. Мутация в гене,

кодирующем вирусный полипептид, может влиять на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более несмежных или смежных аминокислот полипептида по сравнению с диким типом.

В вариантах делеции может отсутствовать один или несколько остатков белка нативного или дикого типа. Могут быть удалены отдельные остатки, или весь домен или его часть (например, каталитический или связывающий домен). Стоп-кодон может быть введен (путем замены или вставки) в кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты для получения усеченного белка. Инсерционные мутанты обычно включают добавление материала в нетерминальной точке полипептида. Это может включать введение иммунореактивного эпитопа или просто одного или нескольких остатков. Также могут быть получены терминальные добавки, называемые слитыми белками.

Варианты с заменой обычно содержат замену одной аминокислоты на другую в одном или нескольких участках внутри белка и могут быть сконструированы для модуляции одного или нескольких свойств полипептида с потерей других функций или свойств или без потери. Замены могут быть консервативными, то есть одна аминокислота заменяется другой с аналогичной формой и зарядом. Консервативные замены могут включать, например, замену аланина на серин, аргинина на лизин, аспарагина на глутамин или гистидин, аспартата на глутамин, цистеина на серин, глутамина на аспарагин, глутамат на аспартат, глицина на пролин, гистидина на аспарагин или глутамин, изолейцина на лейцин или валин, лейцина на валин или изолейцин, лизина на аргинин, метионина на лейцин или изолейцин, фенилаланина на тирозин, лейцин или метионин, серина на треонин, треонина на серин, триптофана на тирозин, тирозина на триптофан или фенилаланин, и валина на изолейцин или лейцин. Альтернативно, замены могут быть неконсервативными, так что это влияет на функцию или активность полипептида. Неконсервативные изменения обычно включают замену остатка на химически непохожий, такой как полярная или заряженная аминокислота на неполярную или незаряженную аминокислоту, и наоборот.

Представленные в настоящей заявке вирусы осповакцины содержат дополнительные вставки, мутации, делеции или замены в вирусном геноме. Вирус осповакцины по настоящему изобретению может содержать одну или несколько дополнительных вставок или частичных вставок экзогенных нуклеиновых кислот,

которые кодируют один или несколько рецепторов хемокинов, белок TRIF или их функциональный домен, или один или более из лептина, интерлейкина-2 (IL2), интерлейкина-15/интерлейкин-15Ra (IL15/IL15Ra), интерлейкина-7 (IL-7), слитого белка лептин-интерлейкин (например, слитого белка лептин-IL2, показанного в Примере 1 как L2). Модификации, такие как вставка рецептора хемокина, могут представлять собой вставку дикого типа и/или мутантного типа CXCR4, CCR2, CCL2. Вирус осповакцины может дополнительно содержать одну или несколько дополнительных делеций или частичных делеций одного или нескольких генов из A52R, B15R, K7R, A46R, N1L, E3L, K1L, M2L, C16, N2R, B8R, B18R, VH1, и функционального домена, или его фрагмента или варианта, или любые их комбинации. В некоторых примерах модификация содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует рецептор хемокина, такой как рецептор CXCR, рецепторы CC, рецептор CX3C, рецептор XC, его функциональный фрагмент или его вариант, или любые их комбинации. Примеры рецепторов хемокинов включают, без ограничения указанными, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CX3CR1, XCR1, их функциональный фрагмент или его вариант, или любые их комбинации. В некоторых случаях экзогенная нуклеиновая кислота, которая кодирует рецептор хемокина, содержит кодирование более чем одного рецептора хемокина. Например, нуклеиновая кислота может кодировать рецептор CXCR4 и CCR2, рецептор CXCR2 и CCR3, рецептор CXCR4 и CCR10 или любую другую их комбинацию. В некоторых случаях экзогенная нуклеиновая кислота, которая кодирует рецептор хемокина, содержит кодон-оптимизированную нуклеиновокислотную последовательность для усиленной экспрессии в вирусе, например, кодон-оптимизированный вариант кодирующей последовательности рецептора хемокина человека (такой как кодирующая последовательность CCR2 человека). Неограничивающие примеры нуклеиновой кислоты, кодирующей рецептор хемокина, приведены в SEQ ID NO: 2 и 3, и в некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, как описано в настоящей заявке, может содержать последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, как описано в настоящей заявке (например, слитый белок лептин-IL2), содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%,

примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии последовательности с SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая описанный в настоящей заявке слитый белок, содержит полипептид лептина и полипептид IL-2. В некоторых вариантах осуществления полипептид лептина содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-2 содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии с последовательностью из SEQ ID NO: 5.

Доставка модифицированных онколитических вирусов

В настоящей заявке представлены способы лечения состояния путем введения модифицированного онколитического вируса осповакцины, как описано здесь.

В некоторых вариантах осуществления количество модифицированного онколитического вируса осповакцины по настоящему изобретению, вводимого субъекту, может составлять примерно 10^3 до 10^{12} инфекционных вирусных частиц или бляшкообразующих единиц (БОЕ), или примерно от 10^5 до 10^{10} БОЕ, или примерно от 10^5 до 10^8 БОЕ, или примерно от 10^8 до 10^{10} БОЕ. В некоторых вариантах осуществления количество модифицированного онколитического вируса осповакцины по настоящему изобретению, вводимого субъекту, может составлять примерно от 10^3 до 10^{12} вирусных частиц или бляшкообразующих единиц (БОЕ), или примерно от 10^5 до 10^{10} БОЕ, или примерно от 10^5 до 10^8 БОЕ, или примерно от 10^8 до 10^{10} БОЕ. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению можно вводить в дозе, которая может составлять примерно от 10^3 БОЕ/дозу до 10^4 БОЕ/дозу, примерно от 10^4 БОЕ/дозу до 10^5 БОЕ/дозу, примерно от 10^5 БОЕ/дозу до 10^6 БОЕ/дозу, примерно от 10^7 БОЕ/дозу до 10^8 БОЕ/дозу, примерно от 10^9 БОЕ/дозу до 10^{10} БОЕ/дозу, примерно от 10^{10} БОЕ/дозу до 10^{11} БОЕ/дозу, примерно от 10^{11} БОЕ/дозу до 10^{12} БОЕ/дозу, примерно от 10^{12} БОЕ/дозу до 10^{13} БОЕ/дозу, примерно от 10^{13} БОЕ/дозу до 10^{14} БОЕ/дозу, или примерно от 10^{14} БОЕ/дозу до 10^{15} БОЕ/дозу. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять примерно 2×10^3 БОЕ/дозу, 3×10^3 БОЕ/дозу, 4×10^3 БОЕ/дозу, 5×10^3 БОЕ/дозу, 6×10^3 БОЕ/дозу, 7×10^3 БОЕ/дозу, 8×10^3 БОЕ/дозу, 9×10^3 БОЕ/дозу, примерно 10^4

БОЕ/дозу, примерно 2×10^4 БОЕ/дозу, примерно 3×10^4 БОЕ/дозу, примерно 4×10^4 БОЕ/дозу, примерно 5×10^4 БОЕ/дозу, примерно 6×10^4 БОЕ/дозу, примерно 7×10^4 БОЕ/дозу, примерно 8×10^4 БОЕ/дозу, примерно 9×10^4 БОЕ/дозу, примерно 10^5 БОЕ/дозу, 2×10^5 БОЕ/дозу, 3×10^5 БОЕ/дозу, 4×10^5 БОЕ/дозу, 5×10^5 БОЕ/дозу, 6×10^5 БОЕ/дозу, 7×10^5 БОЕ/дозу, 8×10^5 БОЕ/дозу, 9×10^5 БОЕ/дозу, примерно 10^6 БОЕ/дозу, примерно 2×10^6 БОЕ/дозу, примерно 3×10^6 БОЕ/дозу, примерно 4×10^6 БОЕ/дозу, примерно 5×10^6 БОЕ/дозу, примерно 6×10^6 БОЕ/дозу, примерно 7×10^6 БОЕ/дозу, примерно 8×10^6 БОЕ/дозу, примерно 9×10^6 БОЕ/дозу, примерно 10^7 БОЕ/дозу, примерно 2×10^7 БОЕ/дозу, примерно 3×10^7 БОЕ/дозу, примерно 4×10^7 БОЕ/дозу, примерно 5×10^7 БОЕ/дозу, примерно 6×10^7 БОЕ/дозу, примерно 7×10^7 БОЕ/дозу, примерно 8×10^7 БОЕ/дозу, примерно 9×10^7 БОЕ/дозу, примерно 10^8 БОЕ/дозу, примерно 2×10^8 БОЕ/дозу, примерно 3×10^8 БОЕ/дозу, примерно 4×10^8 БОЕ/дозу, примерно 5×10^8 БОЕ/дозу, примерно 6×10^8 БОЕ/дозу, примерно 7×10^8 БОЕ/дозу, примерно 8×10^8 БОЕ/дозу, примерно 9×10^8 БОЕ/дозу, примерно 10^9 БОЕ/дозу, примерно 2×10^9 БОЕ/дозу, примерно 3×10^9 БОЕ/дозу, примерно 4×10^9 БОЕ/дозу, примерно 5×10^9 БОЕ/дозу, примерно 6×10^9 БОЕ/дозу, примерно 7×10^9 БОЕ/дозу, примерно 8×10^9 БОЕ/дозу, примерно 9×10^9 БОЕ/дозу, примерно 10^{10} БОЕ/дозу, примерно 2×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 3×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 4×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 5×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 6×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 7×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 8×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 9×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 10^{10} БОЕ/дозу, примерно 2×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 3×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 4×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 5×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 6×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 7×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 8×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 9×10^{10} БОЕ/дозу, примерно 10^{11} БОЕ/дозу, примерно 2×10^{11} БОЕ/дозу, примерно 3×10^{11} БОЕ/дозу, примерно 4×10^{11} БОЕ/дозу, примерно 5×10^{11} БОЕ/дозу, примерно 6×10^{11} БОЕ/дозу, примерно 7×10^{11} БОЕ/дозу, примерно 8×10^{11} БОЕ/дозу, примерно 9×10^{11} БОЕ/дозу, или примерно 10^{12} БОЕ/дозу, примерно от 10^{12} БОЕ/дозу до 10^{13} БОЕ/дозу, примерно от 10^{13} БОЕ/дозу до 10^{14} БОЕ/дозу, или примерно от 10^{14} БОЕ/дозу до 10^{15} БОЕ/дозу. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять 5×10^9 БОЕ/дозу. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять до 5×10^9 БОЕ/дозу.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может содержать примерно от 10^3 вирусных частиц/дозу до 10^4 вирусных частиц/дозу, примерно

от 10^4 вирусных частиц/дозу до 10^5 вирусных частиц/дозу, примерно от 10^5 вирусных частиц/дозу до 10^6 вирусных частиц/дозу, примерно от 10^7 вирусных частиц/дозу до 10^8 вирусных частиц/дозу, примерно от 10^9 вирусных частиц/дозу до 10^{10} вирусных частиц/дозу, примерно от 10^{10} вирусных частиц/дозу до 10^{11} вирусных частиц/дозу, примерно от 10^{11} вирусных частиц/дозу до 10^{12} вирусных частиц/дозу, примерно от 10^{12} вирусных частиц/дозу до 10^{13} вирусных частиц/дозу, примерно от 10^{13} вирусных частиц/дозу до 10^{14} вирусных частиц/дозу или примерно от 10^{14} вирусных частиц/дозу до 10^{15} вирусных частиц/дозу.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению можно вводить в дозе, которая может составлять примерно от 10^3 до 10^4 БОЕ/кг, примерно от 10^4 БОЕ/кг до 10^5 БОЕ/кг, примерно от 10^5 БОЕ/кг до 10^6 БОЕ/кг, примерно от 10^7 БОЕ/кг до 10^8 БОЕ/кг, примерно от 10^9 БОЕ/кг до 10^{10} БОЕ/кг, примерно от 10^{10} БОЕ/кг до 10^{11} БОЕ/кг, примерно от 10^{11} БОЕ/кг до 10^{12} БОЕ/кг, примерно от 10^{12} БОЕ/кг до 10^{13} БОЕ/кг, примерно от 10^{13} БОЕ/кг до 10^{14} БОЕ/кг, или примерно от 10^{14} БОЕ/кг до 10^{15} БОЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять примерно 2×10^3 БОЕ/кг, 3×10^3 БОЕ/кг, 4×10^3 БОЕ/кг, 5×10^3 БОЕ/кг, 6×10^3 БОЕ/кг, 7×10^3 БОЕ/кг, 8×10^3 БОЕ/кг, 9×10^3 БОЕ/кг, примерно 10^4 БОЕ/кг, примерно 2×10^4 БОЕ/кг, примерно 3×10^4 БОЕ/кг, примерно 4×10^4 БОЕ/кг, примерно 5×10^4 БОЕ/кг, примерно 6×10^4 БОЕ/кг, примерно 7×10^4 БОЕ/кг, примерно 8×10^4 БОЕ/кг, примерно 9×10^4 БОЕ/кг, примерно 10^5 БОЕ/кг, 2×10^5 БОЕ/кг, 3×10^5 БОЕ/кг, 4×10^5 БОЕ/кг, 5×10^5 БОЕ/кг, 6×10^5 БОЕ/кг, 7×10^5 БОЕ/кг, 8×10^5 БОЕ/кг, 9×10^5 БОЕ/кг, примерно 10^6 БОЕ/кг, примерно 2×10^6 БОЕ/кг, примерно 3×10^6 БОЕ/кг, примерно 4×10^6 БОЕ/кг, примерно 5×10^6 БОЕ/кг, примерно 6×10^6 БОЕ/кг, примерно 7×10^6 БОЕ/кг, примерно 8×10^6 БОЕ/кг, примерно 9×10^6 БОЕ/кг, примерно 10^7 БОЕ/кг, примерно 2×10^7 БОЕ/кг, примерно 3×10^7 БОЕ/кг, примерно 4×10^7 БОЕ/кг, примерно 5×10^7 БОЕ/кг, примерно 6×10^7 БОЕ/кг, примерно 7×10^7 БОЕ/кг, примерно 8×10^7 БОЕ/кг, примерно 9×10^7 БОЕ/кг, примерно 10^8 БОЕ/кг, примерно 2×10^8 БОЕ/кг, примерно 3×10^8 БОЕ/кг, примерно 4×10^8 БОЕ/кг, примерно 5×10^8 БОЕ/кг, примерно 6×10^8 БОЕ/кг, примерно 7×10^8 БОЕ/кг, примерно 8×10^8 БОЕ/кг, примерно 9×10^8 БОЕ/кг, примерно 10^9 БОЕ/кг, примерно 2×10^9 БОЕ/кг, примерно 3×10^9 БОЕ/кг, примерно 4×10^9 БОЕ/кг, примерно 5×10^9 БОЕ/кг, примерно 6×10^9 БОЕ/кг, примерно 7×10^9 БОЕ/кг, примерно 8×10^9 БОЕ/кг, примерно 9×10^9 БОЕ/кг, примерно 10^{10} БОЕ/кг, примерно 2×10^{10} БОЕ/кг, примерно 3×10^{10} БОЕ/кг, примерно 4×10^{10} БОЕ/кг, примерно 5×10^{10} БОЕ/кг, примерно 6×10^{10} БОЕ/кг, примерно 7×10^{10} БОЕ/кг, примерно 8×10^{10} БОЕ/кг, примерно

9×10^{10} БОЕ/кг, примерно 10^{10} БОЕ/кг, примерно 2×10^{10} БОЕ/кг, примерно 3×10^{10} БОЕ/кг, примерно 4×10^{10} БОЕ/кг, примерно 5×10^{10} БОЕ/кг, примерно 6×10^{10} БОЕ/кг, примерно 7×10^{10} БОЕ/кг, примерно 8×10^{10} БОЕ/кг, примерно 9×10^{10} БОЕ/кг, примерно 10^{11} БОЕ/кг, примерно 2×10^{11} БОЕ/кг, примерно 3×10^{11} БОЕ/кг, примерно 4×10^{11} БОЕ/кг, примерно 5×10^{11} БОЕ/кг, примерно 6×10^{11} БОЕ/кг, примерно 7×10^{11} БОЕ/кг, примерно 8×10^{11} БОЕ/кг, примерно 9×10^{11} БОЕ/кг, или примерно 10^{12} БОЕ/кг, примерно от 10^{12} БОЕ/кг до 10^{13} БОЕ/кг, примерно от 10^{13} БОЕ/кг до 10^{14} БОЕ/кг, или примерно от 10^{14} БОЕ/кг до 10^{15} БОЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять 5×10^9 БОЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять до 5×10^9 БОЕ/кг.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять примерно от 10^3 вирусных частиц/кг до 10^4 вирусных частиц/кг, примерно от 10^4 вирусных частиц/кг до 10^5 вирусных частиц/кг, примерно от 10^5 вирусных частиц/кг до 10^6 вирусных частиц/кг, примерно от 10^7 вирусных частиц/кг до 10^8 вирусных частиц/кг, примерно от 10^9 вирусных частиц/кг до 10^{10} вирусных частиц/кг, примерно от 10^{10} вирусных частиц/кг до 10^{11} вирусных частиц/кг, примерно от 10^{11} вирусных частиц/кг до 10^{12} вирусных частиц/кг, примерно от 10^{12} вирусных частиц/кг до 10^{13} вирусных частиц/кг, примерно от 10^{13} вирусных частиц/кг до 10^{14} вирусных частиц/кг или примерно от 10^{14} вирусных частиц/кг до 10^{15} вирусных частиц/кг.

Жидкая лекарственная форма модифицированного онколитического вируса осповакцины, описанная в настоящей заявке, может содержать, в определенных вариантах осуществления, вирусную дозу примерно от 10^3 до 10^4 БОЕ/мл, примерно от 10^4 БОЕ/мл до 10^5 БОЕ/мл, примерно от 10^5 БОЕ/мл до 10^6 БОЕ/мл, примерно от 10^7 БОЕ/мл до 10^8 БОЕ/мл, примерно от 10^9 БОЕ/мл до 10^{10} БОЕ/мл, примерно от 10^{10} БОЕ/мл до 10^{11} БОЕ/мл, примерно от 10^{11} БОЕ/мл до 10^{12} БОЕ/мл, примерно от 10^{12} БОЕ/мл до 10^{13} БОЕ/мл, примерно от 10^{13} БОЕ/мл до 10^{14} БОЕ/мл, или примерно от 10^{14} БОЕ/мл до 10^{15} БОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять примерно 2×10^3 БОЕ/мл, 3×10^3 БОЕ/мл, 4×10^3 БОЕ/мл, 5×10^3 БОЕ/мл, 6×10^3 БОЕ/мл, 7×10^3 БОЕ/мл, 8×10^3 БОЕ/мл, 9×10^3 БОЕ/мл, примерно 10^4 БОЕ/мл, примерно 2×10^4 БОЕ/мл, примерно 3×10^4 БОЕ/мл, примерно 4×10^4 БОЕ/мл, примерно 5×10^4 БОЕ/мл, примерно 6×10^4 БОЕ/мл, примерно 7×10^4 БОЕ/мл, примерно 8×10^4 БОЕ/мл, примерно

9×10^4 БОЕ/мл, примерно 10^5 БОЕ/мл, 2×10^5 БОЕ/мл, 3×10^5 БОЕ/мл, 4×10^5 БОЕ/мл, 5×10^5 БОЕ/мл, 6×10^5 БОЕ/мл, 7×10^5 БОЕ/мл, 8×10^5 БОЕ/мл, 9×10^5 БОЕ/мл, примерно 10^6 БОЕ/мл, примерно 2×10^6 БОЕ/мл, примерно 3×10^6 БОЕ/мл, примерно 4×10^6 БОЕ/мл, примерно 5×10^6 БОЕ/мл, примерно 6×10^6 БОЕ/мл, примерно 7×10^6 БОЕ/мл, примерно 8×10^6 БОЕ/мл, примерно 9×10^6 БОЕ/мл, примерно 10^7 БОЕ/мл, примерно 2×10^7 БОЕ/мл, примерно 3×10^7 БОЕ/мл, примерно 4×10^7 БОЕ/мл, примерно 5×10^7 БОЕ/мл, примерно 6×10^7 БОЕ/мл, примерно 7×10^7 БОЕ/мл, примерно 8×10^7 БОЕ/мл, примерно 9×10^7 БОЕ/мл, примерно 10^8 БОЕ/мл, примерно 2×10^8 БОЕ/мл, примерно 3×10^8 БОЕ/мл, примерно 4×10^8 БОЕ/мл, примерно 5×10^8 БОЕ/мл, примерно 6×10^8 БОЕ/мл, примерно 7×10^8 БОЕ/мл, примерно 8×10^8 БОЕ/мл, примерно 9×10^8 БОЕ/мл, примерно 10^9 БОЕ/мл, примерно 2×10^9 БОЕ/мл, примерно 3×10^9 БОЕ/мл, примерно 4×10^9 БОЕ/мл, примерно 5×10^9 БОЕ/мл, примерно 6×10^9 БОЕ/мл, примерно 7×10^9 БОЕ/мл, примерно 8×10^9 БОЕ/мл, примерно 9×10^9 БОЕ/мл, примерно 10^{10} БОЕ/мл, примерно 2×10^{10} БОЕ/мл, примерно 3×10^{10} БОЕ/мл, примерно 4×10^{10} БОЕ/мл, примерно 5×10^{10} БОЕ/мл, примерно 6×10^{10} БОЕ/мл, примерно 7×10^{10} БОЕ/мл, примерно 8×10^{10} БОЕ/мл, примерно 9×10^{10} БОЕ/мл, примерно 10^{11} БОЕ/мл, примерно 2×10^{11} БОЕ/мл, примерно 3×10^{11} БОЕ/мл, примерно 4×10^{11} БОЕ/мл, примерно 5×10^{11} БОЕ/мл, примерно 6×10^{11} БОЕ/мл, примерно 7×10^{11} БОЕ/мл, примерно 8×10^{11} БОЕ/мл, примерно 9×10^{11} БОЕ/мл, или примерно 10^{12} БОЕ/мл, примерно от 10^{12} БОЕ/мл до 10^{13} БОЕ/мл, примерно от 10^{13} БОЕ/мл до 10^{14} БОЕ/мл, или примерно от 10^{14} БОЕ/мл до 10^{15} БОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять 5×10^9 БОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению может быть введен в дозе, которая может составлять до 5×10^9 БОЕ/мл.

В некоторых случаях, когда модифицированный онколитический вирус осповакцины может быть введен путем инъекции, дозировка может содержать приблизительно 10^3 вирусных частиц на инъекцию, 10^4 вирусных частиц на инъекцию, 10^5 вирусных частиц на инъекцию, 10^6 вирусных частиц на инъекцию, 10^7 вирусных частиц на инъекцию, 10^8 вирусных частиц на инъекцию, 10^9 вирусных частиц на инъекцию, 10^{10} вирусных частиц на инъекцию, 10^{11} вирусных частиц на инъекцию, 10^{12} вирусных частиц на инъекцию, 2×10^{12} вирусных частиц на инъекцию, 10^{13} вирусных частиц на инъекцию, 10^{14} вирусных частиц на инъекцию, или 10^{15} вирусных частиц на инъекцию. В других

случаях, когда модифицированный онколитический вирус осповакцины вводят путем инъекции, дозировка может содержать приблизительно 10^3 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^4 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^5 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^6 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^7 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^8 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^9 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{10} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{11} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{12} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 2×10^{12} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{13} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{14} инфекционных вирусных частиц на инъекцию или 10^{15} инфекционных вирусных частиц на инъекцию. В дополнительных вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины из настоящего изобретения может быть введен в дозе, которая может составлять примерно 10^3 50% ингибирующей дозы в тканевой культуре (TCID₅₀)/кг, 10^4 TCID₅₀/кг, 3×10^8 TCID₅₀/кг, 4×10^8 TCID₅₀/кг, 5×10^8 TCID₅₀/кг, 3×10^9 TCID₅₀/кг, 4×10^9 TCID₅₀/кг, 5×10^9 TCID₅₀/кг, 3×10^{10} TCID₅₀/кг, 4×10^{10} TCID₅₀/кг, или 4×10^{10} TCID₅₀/кг. Обратите внимание, что здесь 10^x альтернативно выражается как 1 eX . В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины может быть введен в одной или нескольких дозах. В некоторых вариантах осуществления вирус можно вводить в количестве, достаточном для индукции онколиза по меньшей мере примерно в 20% клеток опухоли, по меньшей мере примерно в 30% клеток опухоли, по меньшей мере примерно в 40% клеток опухоли, по меньшей мере примерно в 50% клеток в опухоли, по меньшей мере примерно в 60% клеток в опухоли, по меньшей мере примерно в 70% клеток в опухоли, по меньшей мере примерно в 80% клеток в опухоли или по меньшей мере примерно в 90% клеток в опухоли.

В некоторых вариантах осуществления единичная доза вируса может относиться к количеству, введенному субъекту или опухоли в течение 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 24-часового периода. В некоторых вариантах осуществления доза может быть распределена по времени или введена путем отдельной инъекции. В некоторых вариантах осуществления многократные дозы (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более доз) вируса осповакцины могут быть введены субъекту, например, когда повторное лечение может быть проведено в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней или недели от первой процедуры. В некоторых вариантах осуществления субъекту могут быть введены многократные дозы модифицированного онколитического вируса в течение периода 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более дней или недель. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус осповакцины или фармацевтическую композицию, как описано в настоящей заявке, можно вводить в

течение периода примерно от 1 недели до 2 недель, примерно от 2 недель до 3 недель, примерно от 3 недель до 4 недель, примерно от 4 недель до 5 недель, примерно от 6 недель до 7 недель, примерно от 7 недель до 8 недель, примерно от 8 недель до 9 недель, примерно от 9 недель до 10 недель, примерно от 10 недель до 11 недель, примерно от 11 недель до 12 недель, примерно от 12 недель до 24 недель, примерно от 24 недель до 48 недель, примерно 48 недель или примерно 52 недель, или более. Частота введения онколитического вируса осповакцины или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, может составлять, в определенных случаях, один раз в день, два раза в день, один раз в неделю, один раз в три недели, один раз в четыре недели (или один раз в месяц), один раз в 8 недель (или один раз в 2 месяца), один раз в 12 недель (или один раз в 3 месяца), или один раз в 24 недели (один раз в 6 месяцев). В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящей заявке, онколитический вирус осповакцины или фармацевтическая композиция могут быть введены независимо в начальной дозе в течение первого периода времени, промежуточной дозе в течение второго периода времени и высокой дозе в течение третьего периода времени. В некоторых вариантах осуществления начальная доза может быть ниже, чем промежуточная доза, а промежуточная доза может быть ниже, чем высокая доза. В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий периоды времени могут независимо составлять примерно от 1 недели до 2 недель, примерно от 2 недель до 3 недель, примерно от 3 недель до 4 недель, примерно от 4 недель до 5 недель, примерно от 6 недель до 7 недель, примерно от 7 недель до 8 недель, примерно от 8 недель до 9 недель, примерно от 9 недель до 10 недель, примерно от 10 недель до 11 недель, примерно от 11 недель до 12 недель, примерно от 12 недель до 24 недель, примерно от 24 недель до 48 недель, примерно 48 недель, или примерно 52 недели или более. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины, как описано в настоящей заявке, может быть введен с использованием схемы «прайм-буст».

В некоторых примерах субъект может быть переведен на диету с пониженным содержанием углеводов, например, кетогенную диету до, одновременно и после введения модифицированного онколитического вируса осповакцины или фармацевтической композиции, содержащей его, как описано в настоящей заявке, в соответствии с любым из описанных здесь способов лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект может быть переведен на диету, которая может включать потребление менее 500 граммов углеводов в день, менее 450 граммов углеводов в день, менее 400 граммов углеводов в день, менее 350 граммов углеводов в день, менее 300 граммов углеводов в день, менее 250 граммов углеводов в день, менее 200 граммов

углеводов в день, менее 150 граммов углеводов в день, менее 100 граммов углеводов в день, менее 90 граммов углеводов в день, менее 80 граммов углеводов в день, менее 70 граммов углеводов в день, менее 60 граммов углеводов в день, менее 50 граммов углеводов в день, менее 40 граммов углеводов в день, менее 30 граммов углеводов в день, менее 20 граммов углеводов в день, менее 10 граммов углеводов в день.

Примерным способом доставки модифицированного онколитического вируса осповакцины по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, к раковым или опухолевым клеткам может быть внутритропухолевая инъекция. Однако также могут быть использованы альтернативные способы введения, например, внутривенно, посредством инфузии, парентерально, внутривенно, интрадермально, внутримышечно, трансдермально, сублингвально, ректально, интрауретрально, интравагинально, интраназально, интратекально или интраперитонеально. Способы введения могут варьировать в зависимости от локализации и характера опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ введения может быть интрадентальным, трансдермальным, парентеральным, интраперитонеальным, внутривенным, внутримышечным, интраназальным, подкожным, регионарным (например, вблизи опухоли, в частности, с сосудистой сетью или смежной сосудистой сетью опухоли), чрескожным, интратекальным, интратрахеальным, интраперитонеальным, интраартериальным, интравезикальным, внутритропухолевым, ингаляционным, перфузионным, путем промывания или перорально. Инъекционную дозу модифицированного онколитического вируса осповакцины можно вводить в виде болюсной инъекции или в виде медленной инфузии. В некоторых вариантах осуществления модифицированный онколитический вирус осповакцины может быть введен пациенту из источника, имплантированного пациенту. В некоторых вариантах осуществления введение модифицированного онколитического вируса осповакцины может происходить путем непрерывной инфузии в течение выбранного периода времени. В некоторых случаях описанный здесь онколитический вирус осповакцины или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить в терапевтически эффективной дозе путем инфузии в течение периода примерно 15 минут, примерно 30 минут, примерно 45 минут, примерно 50 минут, примерно 55 минут, примерно 60 минут, примерно 75 минут, примерно 90 минут, примерно 100 минут или примерно 120 минут или более. Модифицированный онколитический вирус осповакцины или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить в виде жидкой дозы, где общий объем введения составляет примерно от 1 мл до 5 мл, примерно от 5 мл до 10 мл, примерно от 15 мл до 20 мл, примерно от 25 мл до 30 мл, примерно от 30

мл до 50 мл, примерно от 50 мл до 100 мл, примерно от 100 мл до 150 мл, примерно от 150 мл до 200 мл, примерно от 200 мл до 250 мл, примерно от 250 мл до 300 мл, примерно от 300 мл до 350 мл, примерно от 350 мл до 400 мл, примерно от 400 мл до 450 мл, примерно от 450 мл до 500 мл, примерно от 500 мл до 750 мл, или примерно от 750 мл до 1000 мл.

Комбинированная терапия

Способы из настоящего изобретения включают, в некоторых аспектах, введение модифицированного онколитического вируса, как описано в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, содержащей его, с последующей, предшествующей терапией или в комбинации с одной или несколькими дополнительными терапиями. Примеры дополнительной терапии могут включать, без ограничения указанными, химиотерапию, облучение, онколитическую вирусную терапию дополнительным вирусом, лечение иммуномодулирующими белками, противораковым агентом или любыми их комбинациями. Дополнительную терапию можно проводить одновременно или последовательно с введением модифицированного вируса, такого как онколитический вирус осповакцины. В некоторых вариантах осуществления способы настоящего раскрытия могут включать введение модифицированного онколитического вируса, как описано здесь, с последующим, предшествующим лечением или в комбинации с одним или более противораковыми агентами или методами лечения рака. Противораковые агенты могут включать, без ограничения указанными, химиотерапевтические агенты, радиотерапевтические агенты, цитокины, ингибиторы иммунных контрольных точек, антиангиогенные агенты, агенты, индуцирующие апоптоз, противораковые антитела и/или агенты, ингибирующие циклинзависимую киназу. В некоторых вариантах осуществления методы лечения рака могут включать химиотерапию, терапию биологическими агентами, лучевую терапию, иммунотерапию, гормональную терапию, антисосудистую терапию, криотерапию, токсинотерапию и/или хирургическое вмешательство, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления способы настоящего раскрытия могут включать введение модифицированного вируса, раскрытого здесь, с последующим, предшествующим лечением, или в комбинации с модифицированным онколитическим вирусом из настоящего раскрытия. Комбинация модифицированного онколитического вируса осповакцины с химиотерапией обеспечивает синергический эффект, которого не наблюдается у модифицированных онколитических вирусов, не содержащих модификаций модифицированного онколитического вируса. Синергический эффект вышеуказанной комбинации может быть выгодно использован для снижения дозы химиотерапии, такой как Таксол®. Таким образом, раскрытый в настоящей заявке способ лечения модифицированным вирусом может снизить токсичность, связанную с

химиотерапией, например, у пациентов, которые отвечают на химиотерапию, но страдают от побочных эффектов при терапевтических дозах. Синергетический эффект в определенных случаях может приводить к уменьшению роста опухоли по сравнению с одной только химиотерапией или онколитическим вирусом осповакцины. Примерное снижение роста опухоли может составлять приблизительно от 2% до 50%, например, примерно 5%, примерно 10%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 35%, примерно 45% или примерно 50%.

В некоторых вариантах осуществления лечение с использованием модифицированного онколитического вируса может применяться отдельно или в комбинации с одним или несколькими иммуномодулирующими агентами. Иммуномодулирующий агент может включать любое соединение, молекулу или вещество, способное подавлять противовирусный иммунитет, связанный с опухолью или раковым заболеванием. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий агент может быть способен подавлять врожденный иммунитет или адаптивный иммунитет к модифицированному вирусу. Неограничивающие примеры иммуномодулирующих агентов включают антитело против CD33 или его вариабельную область, антитело против CD11b или его вариабельную область, ингибитор COX2, например, целекоксиб, цитокины, такие как IL-12, GM-CSF, IL-2, IFN α 3 и IFN γ , и хемокины, такие как MIP-1, MCP-1 и IL-8. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий агент может включать модуляторы контрольных точек иммунитета, такие как, без ограничения указанными, анти-CTLA4, анти-PD-1 и анти-PD-L1 и агонисты TLR (например, Poly I:C). В некоторых примерах иммуномодулирующий агент может включать ингибитор иммунной контрольной точки, такой как антагонист PD-1 (например, антитело-антагонист, которое связывается с PD-1), антагонист PD-L1 (например, антитело-антагонист, которое связывается с PD-L1), антагонист CTLA-4 (например, антитело-антагонист, которое связывается с CTLA-4), антагонист A2AR (например, антитело-антагонист, которое связывается с A2AR), антагонист B7-H3 (например, антитело-антагонист, которое связывается с B7-H3), антагонист B7-H4 (например, антитело-антагонист, которое связывается с B7-H4), антагонист BTLA (например, антитело-антагонист, которое связывается с BTLA), антагонист IDO (например, антитело-антагонист, которое связывается с IDO), антагонист KIR (например, антитело-антагонист, которое связывается с KIR), антагонист LAG3 (например, антитело-антагонист, которое связывается с LAG3), антагонист TIM-3 (например, антитело-антагонист, которое связывается с TIM3). В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия может включать введение регулятора иммунной контрольной

точки. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть TGN1412. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть NKTR-214. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть MEDI0562. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть MEDI6469. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть MEDI6383. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть JTX-2011. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть Keytruda (пембролизумаб). В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть Opdivo (ниволумаб). В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть Yervoy (ипилимумаб). В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть тремелимумаб. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть Tecentriq (атезолизумаб). В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть MGA271. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть индоксимод. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть Эпакадостат. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть лирилумаб. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть BMS-986016. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть MPDL3280A. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть авелумаб. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть дурвалумаб. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть MEDI4736. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть MEDI4737. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть TRX518. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть МК-4166. В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть урелумаб (BMS-663513). В одном примере регулятором иммунной контрольной точки может быть PF-05082566 (PF-2566).

В некоторых примерах, где дополнительной терапией является облучение, примерные дозы могут составлять от 5000 Рад (50 Гр) до 100 000 Рад (1000 Гр), или 50 000 Рад (500 Гр), или другие подходящие дозы в указанных диапазонах. Альтернативно, доза облучения может составлять от 30 до 60 Гр, от 40 до 50 Гр, от 40 до 48 Гр или от 44 Гр или другие соответствующие дозы в указанных диапазонах, при этом дозу определяют, например, с помощью дозиметрического исследования, как описано выше. Термин «Гр», используемый здесь, может относиться к единице измерения для конкретной поглощенной дозы излучения, равной 100 Рад. Гр - это сокращение от «Грей».

В некоторых примерах, где дополнительной терапией является химиотерапия, примерные химиотерапевтические средства могут включать, без ограничения указанными, алкилирующие агенты (например, производные азотистого иприта, этиленимины, алкилсульфонаты, гидразины и триазины, нитромочевины и соли металлов), растительные алкалоиды (например, алкалоиды барвинка, таксаны, подофиллотоксины и аналоги камптотекана), противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины, хромомицины и т.п.), антиметаболиты (например, антагонисты фолиевой кислоты, антагонисты пиримидина, антагонисты пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы), ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы топоизомеразы II и различные антинеопластические средства (например, ингибиторы рибонуклеотидредуктазы, ингибиторы адренкортикостероидов, ферменты, антимицротубулиновые средства и ретиноиды). Примеры химиотерапевтических средств могут включать, без ограничения указанными, анастрозол (Arimidex®), бикалутамид (Casodex®), блеомицина сульфат (Blenoxane®), бусульфан (Myleran®), бусульфан для инъекций (Busulfex®), капецитабин (Xeloda®), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксид-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Leukeran®), цисплатин (Platinol®), кладрибин (Leustatin®), циклофосфамид (Cytosan® или Neosar®), цитарабин, цитозин арабинозид (Cytosar-U®), липосомы цитарабина для инъекции (DepoCyt®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (Актиномицин D, Космеган), даунорубицина гидрохлорид (Cerubidine®), липосомы даунорубицина цитрата для инъекций (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere®), доксорубицина гидрохлорид (Adriamycin®, Rubex®), этопозид (Vepesid®), флударабин фосфат (Fludara®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®), флутамид (Eulexin®), тезацитин, гемцитабин (дифтордезоксцитидин), гидроксимочевину (Hydrea®), идарубицин (Idamycin®), ифосфамид (IFEX®), иринотекан (Camptosar®), L-аспарагиназу (ELSPAR®), лейковорин кальция, мелфалан (Alkeran®), 6-меркаптопурин (Purinethol®), метотрексат (Folex®), митоксантрон (Novantrone®), милотарг, паклитаксел (Taxol®), феникс (Иттрий-90/МХ-DTPA), пентостатин, полифепрозан 20 с кармустиновым имплантатом (Gliadel®), тамоксифена цитрат (Nolvadex®), тенипозид (Vumon®), 6-тиогуанин, тиотепа, тирапазамин (Tirazone®), топотекана гидрохлорид для инъекций (Nuscampin®), винбластин (Velban®), винкристин (Oncovin®) и винорелбин (Navelbine®), Ибрутиниб, идеалалисиб и брентуксимаб ведотин.

Примеры алкилирующих агентов могут включать, без ограничения указанными, мустарген, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урамустин (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®,

Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen Mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), chlormethine (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ифосфамид (Mitoxana®), мелфалан (Alkeran®), Хлорамбуцил (Leukeran®), пипоброман (Amedel®, Vercyte®), триэтиленмеламин (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), триэтилентиофосфорамин, Темозоломид (Temodar®), тиотепа (Thioplex®), бусульфан (Busilvex®, Myleran®), кармустин (BiCNU®), ломустин (CeeNU®), стрептозоцин (Zanosar®) и дакарбазин (DTIC-Dome®). Дополнительные примеры алкилирующих агентов включают, без ограничения указанными, Оксалиплатин (Eloxatin®); Темозоломид (Temodar® и Temodal®); Дактиномицин (также известный как актиномицин-D, Cosmegen®); Мелфалан (также известный как L-PAM, L-сарколизин и phenylalanine mustard, Alkeran®); Альтретамин (также известный как гексаметилмеламин (HMM), Hexalen®); Кармустин (BiCNU®); Бендамустин (Treanda®); Бусульфан (Busulfex® и Myleran®); Карбоплатин (Paraplatin®); Ломустин (также известный как CCNU, CeeNU®); Цисплатин (также известный как CDDP, Platinol® и Platinol®-AQ); Хлорамбуцил (Leukeran®); Циклофосфамид (Cytoxan® и Neosar®); Дакарбазин (также известный как DTIC, DIC и имидазолкарбоксамид, DTIC-Dome®); Альтретамин (также известный как гексаметилмеламин (HMM), Hexalen®); Ифосфамид (Ifex®); Преднумустин; Прокарбазин (Matulane®); Мехлорэтамин (также известный как хлорметин, мастин и мехлорэтамин гидрохлорид, Mustargen®); Стрептозоцин (Zanosar®); Тиотепа (также известный как тиофосфоамид, TESPA и TSPA, Thioplex®); циклофосфамид (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); и Бендамустин HCl (Treanda®).

Примеры антрациклинов могут включать, без ограничения указанными, например, доксорубин (Adriamycin® и Rubex®); блеомицин (Lenoxane®); даунорубин (даунорубин гидрохлорид, дауномицин и рубидомицин гидрохлорид, Cerubidine®); даунорубин липосомальный (даунорубин цитрат в липосомах, DaunoXome®); митоксантрон (DHAD, Novantrone®); эпирубин (Ellence™); идарубин (Idamycin®, Idamycin PFS®); митомицин С (Mutamycin®); гелданамицин; гербимицин; равидомицин и дезацетилравидомицин.

Примеры алкалоидов барвинка могут включать, без ограничения указанными, винорелбина тартрат (Navelbine®), винкристин (Oncovin®) и виндезин (Eldisine®); винбластин (также известный как винбластин сульфат, винкалейкобластин и VLB, Alkaban-AQ® и Velban®); и винорелбин (Navelbine®).

Примеры ингибиторов протеасом могут включать, без ограничения указанными, бортезомиб (Velcade®); карфилзомиб (PX-171-007, (S)-4-метил-N-((S)-1-(((S)-4-метил-1-

((R)-2-метилоксиран-2-ил)-1-оксопентан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)-2-((S)-2-(2-морфолиноацетамидо)-4-фенилбутанамидо)-пентанамид); маризомиб (NPI-0052); иксазомиба цитрат (MLN-9708); деланзомиб (CEP-18770); и О-метил-N-[(2-метил-5-тиазолил)карбонил]-L-серил-О-метил-N-[(1S)-2-[(2R)-2-метил-2-оксиранил]-2-оксо-1-(фенилметил)этил]-L-серинамид (ONX-0912).

«В комбинации с», как используется в настоящей заявке, может означать, что модифицированный вирус, такой как онколитический вирус осповакцины, описанный здесь, или фармацевтическую композицию, содержащую его, и дополнительную терапию, такую как дополнительная терапия, включающая одно или несколько средств, применяют у субъекта как часть схемы или режима лечения. В определенных вариантах осуществления при использовании в комбинации может не требоваться, чтобы модифицированный онколитический вирус и один или несколько агентов физически объединяли перед введением, или чтобы их вводили в течение одного и того же периода времени. Например, и без ограничения, модифицированный онколитический вирус и один или несколько агентов могут быть введены одновременно субъекту, которого лечат, или могут быть введены одновременно или последовательно в любом порядке или в разные моменты времени.

Дополнительную терапию можно применять в различных вариантах осуществления в жидкой лекарственной форме, твердой лекарственной форме, суппозитории, ингаляционной лекарственной форме, интраназальной лекарственной форме, в липосомальной композиции, лекарственной форме, содержащей наночастицы, лекарственной форме, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной форме, или любых их комбинациях. В некоторых вариантах осуществления дополнительную терапию проводят в течение периода примерно от 1 недели до 2 недель, примерно от 2 недель до 3 недель, примерно от 3 недель до 4 недель, примерно от 4 недель до 5 недель, примерно от 6 недель до 7 недель, примерно от 7 недель до 8 недель, примерно от 8 недель до 9 недель, примерно от 9 недель до 10 недель, примерно от 10 недель до 11 недель, примерно от 11 недель до 12 недель, примерно от 12 недель до 24 недель, примерно от 24 недель до 48 недель, примерно 48 недель или примерно 52 недель, или более. Частота применения дополнительной терапии может составлять, в определенных случаях, один раз в день, два раза в день, один раз в неделю, один раз в три недели, один раз в четыре недели (или один раз в месяц), один раз в 8 недель (или один раз в 2 месяца), один раз в 12 недель (или один раз в каждые 3 месяца) или один раз в 24 недели (один раз в 6 месяцев). В некоторых вариантах осуществления способ лечения субъекта, страдающего раком, может включать введение субъекту эффективного количества модифицированного онколитического

вируса, например, модифицированного вируса осповакцины, согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способы из настоящего изобретения могут дополнительно включать введение субъекту эффективного количества одного или нескольких агентов. Например, и без ограничения, агент может быть противораковым агентом, иммуномодулирующим агентом или любыми их комбинациями, как описано выше.

Характеристика модифицированного вируса осповакцины

Как обсуждалось выше, в некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает вакцинную композицию, содержащую модифицированный вирус осповакцины, который является нереплицирующимся или плохо реплицирующимся. В некоторых вариантах осуществления, чтобы определить, является ли данный вирус компетентным к репликации или дефектным к репликации в типе клеток (например, в клеточной линии фибробластов), тип клеток инфицируют известным количеством тестируемого вируса, представляющим «входной» титр. Входные титры определяют до оценки свойств репликации с использованием чувствительных клеток для титрования входного вируса таким методом, как метод TCID₅₀. Вирусный инокулят разбавляют соответствующим образом для получения необходимого исходного титра. Инфекции выбранных типов клеток оставляют в общей сложности примерно на 4 дня, после чего готовят вирусные образцы путем лизиса инфицированных клеток. Затем эти образцы вируса титруют на клетках-индикаторах CEF, как описано ниже. Это «выходной» титр. Отношение выходного титра к входному ниже 1 указывает на то, что тестируемый вирус не способен к репликации в условиях тестирования, тогда как отношение выходного титра к входному, равное или превышающее 1, указывает на то, что тестируемый вирус способен к репликации в условиях тестирования.

В методе TCID₅₀ для определения репликативных свойств тестируемого вируса клетки по выбору могут быть посеяны в планшеты на 6 лунок в концентрации примерно 5×10^5 клеток/лунку и инкубированы в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ в соответствующей среде, такой как DMEM (Gibco, кат. № 61965-026) плюс 2% ЭТС. Среда для культивирования клеток можно удалить, и клетки можно инкубировать с вирусным инокулятом в течение одного часа при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Количество вируса, используемого для каждой инфекции различных типов клеток, может составлять примерно 5×10^4 TCID₅₀. Это может быть «входной» титр вируса, упомянутый выше. Через один час при 37°C инокулят можно удалить аспирацией, затем клетки 3 раза промывают DMEM и, наконец, добавляют 1 мл DMEM, 2% ЭТС и оставляют планшеты для инкубации примерно на 96 часов (4 дня) при 37°C, 5% CO₂. Заражение прекращают

путем замораживания планшетов при температуре -80°C . Они готовы к титровальному анализу. Полученный клеточный лизат, содержащий остатки инфицированных клеток и среду для инкубации, является образцом вируса, подлежащим титрованию для определения выходного титра. Таким образом, образец содержит как внутриклеточный, так и внеклеточный вирус.

Титровальный анализ образцов вируса из анализа репликации (иммуноокрашивание антителом, специфичным к вирусу осповакцины): Для определения выходного титра вируса клетки CEF высевают на 96-луночные планшеты в RPMI (Gibco, кат. № 61870-010), 7% ЭТС, 1% антибиотика/противогрибкового средства (Gibco, кат. № 15240-062) в концентрации 1×10^4 клеток/лунку и инкубируют в течение ночи при 37°C , 5% CO_2 . 6-луночные планшеты, в которых проводили эксперименты по заражению, можно заморозить/разморозить 3 раза и приготовить разведения от 10^{-1} до 10^{-12} с использованием питательной среды RPMI. Разведения вируса можно распределить по тестируемым клеткам в количестве 8 копий и инкубировать в течение пяти дней при 37°C , 5% CO_2 , чтобы обеспечить репликацию вируса. Тестируемые клетки можно зафиксировать (например, с использованием ацетона/метанола 1:1) в течение 10 минут, высушить на воздухе, промыть один раз промывочным буфером (ФБР/0,05% Tween 20) и инкубировать с поликлональным антителом, специфичным к вирусу осповакцины (например, Quartett Berlin, кат. № 9503-2057) при разведении 1:1000 в инкубационном буфере (ФБР/3% ЭТС) в течение одного часа при RT. После двукратного промывания промывочным буфером, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) вторичное антитело к IgG кролика (Promega Mannheim, кат. № W4011) можно добавлять в разведении 1:1000 в инкубационный буфер в течение одного часа при RT. Клетки можно снова дважды промыть промывочным буфером и инкубировать с окрашивающим раствором (3,3',5,5'-тетраметилбензидиновый хромогенный субстрат (1,2 mM; Seramun Diagnostic GmbH, кат. № S-002-5-TMB/), разбавленный 1:2 ФБР) в течение 15 минут при RT. Планшеты можно промыть один раз с помощью промывочного буфера. Используя микроскоп, на планшетах можно определить наличие инфицированных клеток, которые выглядят фиолетовыми (таблицы для подсчета см. в Приложении 3). Каждая лунка с фиолетовым окрашиванием может быть помечена как положительная на репликацию вируса, и титр рассчитывают с использованием метода Спирмена-Кербера (анализ TCID₅₀). Это «выходной» титр. С учетом значений, полученных таким образом, как для входных, так и для выходных титров, коэффициент амплификации Выход:Вход можно рассчитать как показатель степени репликации данного вируса в данном типе клеток. Используя описанную выше процедуру, можно легко определить, является ли и в какой

степени конкретный вирус компетентным к репликации в выбранной клеточной линии, например, в клетках фибробластов человека, клетках фибробластов курицы, клетках MRC-5.

Другие примерные способы, которые могут быть выполнены для оценки способности к репликации модифицированного вируса осповакцины, как описано в настоящей заявке, могут включать ПЦР-анализ с использованием сывороток млекопитающего или грызуна, инфицированных модифицированным вирусом осповакцины, анализ вирусных бляшек или любые их комбинации.

В настоящей заявке представлен один примерный способ анализа вирусных бляшек. Сливающиеся монослои восприимчивых клеток в колбах для культивирования тканей инфицируют вирусом осповакцины. После инкубации наблюдаются цитопатические эффекты (CPE), которые можно визуализировать путем образования ореола или кругового просветления клеточного монослоя. Среду для культивирования клеток можно заменить раствором, повышающим вязкость. Заменяемый раствор может включать желатин или карбоксиметилцеллюлозу, но не ограничивается ими. Чувствительные клетки включают HeLa, BS-C-1, HuTK CEF или ВНК, но не ограничиваются ими. Анализы на вирусные бляшки можно визуализировать путем окрашивания агентом, который увеличивает контрастность клеток, при оценке невооруженным глазом или с помощью микроскопии. Инкубационный период после заражения может составлять 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36, 48 или более часов, прежде чем можно будет заметить бляшки. Окрашивающим агентом может быть кристаллический фиолетовый краситель. Бляшки могут быть не менее 0,05 мм в диаметре. Вирус может быть получен в виде инокулята, причем инокулят представляет собой препарат с различными концентрациями или разведениями исходного вируса. Разбавление может быть выполнено с использованием коэффициента разбавления, равного 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 или более. Титр или концентрацию вируса можно измерить в бляшкообразующих единицах на мл (БОЕ/мл).

В настоящей заявке представлен один примерный способ анализа на основе ПЦР. Содержание вируса осповакцины может быть определено количественно с использованием подходов, основанных на кПЦР. Чтобы обнаружить присутствие генома вируса осповакцины, кПЦР используют для амплификации ДНК. Чтобы обнаружить присутствие продуктов экспрессии указанного генома вируса осповакцины, ОТ-кПЦР можно использовать для амплификации РНК. Праймеры кПЦР могут быть сконструированы для амплификации участка генома вируса осповакцины. Для ОТ-кПЦР праймеры могут быть сконструированы для обнаружения специфических продуктов

экспрессии генома осповакцины. Праймеры ОТ-кПЦР и кПЦР могут быть одинаковыми или отличаться. Область может состоять из 5, 10, 100, 200, 500, 1000, 5000, или более непрерывных пар оснований. ДНК и РНК могут быть выделены с использованием методов, известных специалисту в данной области техники. Для подходов, основанных на кПЦР, используют известный стандарт для определения концентрации или титра входного вируса.

Получение вирусов может потребовать количественного определения содержания вируса в вирусной композиции, такой как вакцинная композиция, содержащая модифицированный вирус осповакцины, как описано в настоящей заявке. Количественная оценка вируса может включать анализы на основе люминесценции, флуоресценции, определения белка или ПЦР, но не ограничиваются ими. Для количественного определения, основанного на флуоресценции, можно использовать проточную цитометрию. Анализы на основе ПЦР для количественного определения вируса могут включать методы, основанные на ПЦР. Присутствие вирусного генома может быть определено количественно и измерено для того, чтобы определить количество вируса, присутствующего в композиции. Введенный вирус может быть лизирован или инактивирован перед выделением генома нуклеиновой кислоты. Количественная оценка вируса может быть достигнута путем измерения содержания белка. В некоторых случаях содержание белка может быть измерено с помощью хроматографических анализов, ИФА, количественного иммуноблоттинга или других подходящих методов количественного определения белка. Измеряемый белок может быть микробным патогенным антигеном или антигеном, ассоциированным с опухолью.

Примерные варианты осуществления изобретения

В настоящей заявке представлен модифицированный онколитический вирус осповакцины, содержащий: (a) экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий белок, модулирующий метаболизм, или его функциональный фрагмент, или его вариант, (b) экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор хемокина, или его функциональный фрагмент или вариант, и (c) генетическую модификацию вирусного каркаса. Далее в настоящей заявке представлен вирус, в котором экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, содержит кодон-оптимизированный вариант кодирующей последовательности рецептора хемокина человека. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых слитый белок дополнительно содержит цитокин, или его функциональный фрагмент или вариант. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых рецептор хемокина

содержит по меньшей мере один из CXС-рецептора, СС-рецепторов, CX3С-рецептора, ХС-рецептора, их функциональный фрагмент или вариант, или любые их комбинации. Далее здесь представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых рецептор хемокина содержит по меньшей мере один из CXCR1, CXCR2, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CX3CR1, XCR1, их функциональный фрагмент или вариант, или любые их комбинации. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых рецептор хемокина содержит рецептор CXС, и в которых рецептор CXС содержит CXCR4. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых рецептором хемокина является CCR2. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых рецептор хемокина содержит кодон-оптимизированный CCR2. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых генетическая модификация вирусного каркаса представляет собой мутацию или делецию гена A52R. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых делеция представляет собой полную или частичную делецию. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых онколитический вирус осповакцины дополнительно содержит делецию гена тимидинкиназы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых вирус осповакцины представляет собой штамм вируса осповакцины Western Reserve (ATCC VR-1354), штамм Copenhagen, штамм INH, штамм Wyeth (ATCC VR-1536), штамм NYCBOH, штамм Tian Tan, штамм Lister, штамм Ankara (ATCC VR-1508 или ATCC VR-1566), штамм USSR, штамм ACAM2000, штамм Paris, штамм Bern, штамм Temple of Heaven, штамм Dairen, штамм EM-63, штамм Evans, штамм King, штамм Patwadangar или штамм Tashkent. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, клонирована в локус гена тимидинкиназы. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, клонирована в локус гена A52R. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, содержащий метаболически модулирующий белок, или его функциональный фрагмент или вариант, включает последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно

75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии последовательности с SEQ ID NO: 1. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, или его функциональный фрагмент или вариант, содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Далее в настоящей заявке представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, дополнительно содержащие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую гиалуронидазу. Далее здесь представлены модифицированные онколитические вирусы осповакцины, в которых гиалуронидаза представляет собой PH-20 или HysA.

В настоящей заявке представлен модифицированный онколитический вирус осповакцины, содержащий (а) экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок лептин-интерлейкин (IL)-2; (b) экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CCR2, и (c) делецию гена A52R. Далее в настоящей заявке представлен модифицированный онколитический вирус осповакцины, в котором вирусом осповакцины является штамм вируса осповакцины Western Reserve (ATCC VR-1354). Далее в настоящей заявке представлен модифицированный онколитический вирус осповакцины, который дополнительно содержит делецию гена тимидинкиназы. Далее представлен модифицированный онколитический вирус осповакцины, в котором экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок лептин-интерлейкин (IL)-2, клонирована в локус гена тимидинкиназы. Далее в настоящей заявке представлен модифицированный онколитический вирус осповакцины, в котором нуклеиновая кислота, кодирующая CCR2, клонирована в локус гена A52R. Далее в настоящей заявке представлен модифицированный онколитический вирус осповакцины, дополнительно содержащий мутацию или делецию вирусного гена, выбранного из группы, состоящей из A1, A2, VH1, A33, I7, K7R, B8R, C12L, B15R, B14R, K1L, N1L, M2L, A49R, A46R, E3L, C4, C16 и их функционального домена, или фрагмента или варианта, или любых их комбинаций. Далее в настоящей заявке представлен модифицированный онколитический вирус осповакцины, дополнительно содержащий экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одно из HMGB1, PIAS3, LIGHT, фракталкина, ITAC, IL15, IL15R-альфа, CCL5, их функционального домена или фрагмента, или варианта, или любые их комбинации.

В настоящей заявке представлена фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный онколитический вирус согласно настоящему изобретению. Далее в настоящей заявке представлена фармацевтическая композиция, дополнительно содержащая по меньшей мере одно из солубилизирующего агента, вспомогательного вещества или фармацевтически приемлемого носителя. Далее здесь представлена фармацевтическая композиция, в которой вспомогательное вещество включает одно или более из буферного агента, стабилизатора, антиоксиданта, связующего агента, разбавителя, диспергирующего агента, агента, регулирующего скорость, смазочного агента, глиданта, дезинтегранта, пластификатора, консерванта или любых их комбинаций. Далее здесь представлена фармацевтическая композиция, в которой вспомогательное вещество включает динатрия гидрофосфат дигидрат, натрия дигидрофосфат дигидрат, натрия хлорид, миоинозитол, сорбитол, или любые их комбинации. Далее здесь представлена фармацевтическая композиция, которая не содержит консерванта. Далее здесь представлена фармацевтическая композиция, дополнительно содержащая одно или более из консерванта, разбавителя и носителя. Далее в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, дополнительно содержащие дополнительный активный ингредиент или его соль. Далее здесь представлена фармацевтическая композиция, в которой солубилизирующим агентом является стерильная вода. Далее в настоящей заявке представлена фармацевтическая композиция, дополнительно содержащая дополнительный активный ингредиент, который является противораковым средством или другим онколитическим вирусом.

В настоящей заявке представлен набор, содержащий модифицированный онколитический вирус осповакцины по настоящему изобретению.

В настоящей заявке представлен набор, содержащий фармацевтическую композицию по настоящему изобретению. Далее здесь представлен указанный набор, дополнительно содержащий по меньшей мере одно из противоракового средства или дополнительного онколитического вируса.

В настоящей заявке представлен способ усиления терапевтического эффекта модифицированного онколитического вируса осповакцины при системной доставке модифицированного онколитического вируса осповакцины субъекту по сравнению с системным введением эталонного вируса осповакцины, содержащего мутацию ТК, но не экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, или экзогенную нуклеиновую кислоту кодирующий рецептор хемокина, включающий системное введение модифицированного онколитического вируса осповакцины или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

В настоящей заявке представлен способ лечения, включающий введение субъекту онколитического вируса осповакцины согласно настоящему изобретению, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, где введение приводит к усилению системного иммунного ответа у субъекта по сравнению с введением субъекту эталонного онколитического вируса осповакцины, который содержит делецию гена тиминдинкиназы (ТК-) и не включает ни одного из (а) и (b). Далее здесь представлен указанный способ, в котором введение представляет собой системное введение. Далее здесь представлен указанный способ, в котором системное введение включает по меньшей мере одно из перорального введения, внутривенного введения, интраназального введения, сублингвального введения, ректального введения, трансдермального введения, или любые их комбинации. Далее здесь представлен указанный способ, в котором субъект страдает раком.

В настоящей заявке представлен способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного онколитического вируса осповакцины по настоящему изобретению. Далее здесь представлен указанный способ по настоящему изобретению, в котором рак представляет собой по меньшей мере одно из меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака брюшины, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака яичников, лейкоза, лимфомы, почечно-клеточной карциномы, рака поджелудочной железы, эпителиальной карциномы, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, рака шейки матки, карциномы толстой кишки, колоректального рака, рака двенадцатиперстной кишки, аденокарциномы поджелудочной железы, аденокистозного рака, саркомы, мезотелиомы, мультиформной глиобластомы, астроцитомы, множественной миеломы, карциномы предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы, аденокарциномы поджелудочной железы, плоскоклеточного рака головы и шеи, плоскоклеточного рака шейки матки, остеосаркомы, эпителиальной карциномы яичников, острой лимфобластной лимфомы, миелопролиферативного новообразования, или любые их комбинации. Далее здесь представлен указанный способ по настоящему изобретению, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в дозировке, которая составляет примерно от 10^6 БОЕ/мл до 10^{10} БОЕ/мл онколитического вируса осповакцины. Далее здесь представлен указанный способ по настоящему изобретению, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в дозировке, которая содержит приблизительно 5×10^9 БОЕ/мл онколитического вируса осповакцины. Далее здесь представлен указанный

способ по настоящему изобретению, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят независимо в начальной дозе в течение первого периода времени, промежуточной дозе в течение второго периода времени и высокой дозе в течение третьего периода времени. Далее здесь представлен указанный способ, включающий независимое введение начальной, промежуточной и высокой дозы, при этом начальная доза ниже, чем промежуточная доза, а промежуточная доза ниже, чем высокая доза. Далее здесь представлен указанный способ, в котором первый, второй и третий периоды времени составляют каждый примерно от 1 недели до 3 недель. Далее здесь представлен указанный способ, в котором модифицированный онколитический вирус и фармацевтическая композиция независимо друг от друга содержат жидкую лекарственную форму, которую вводят в объеме примерно от 1 мл до 5 мл, примерно от 5 мл до 10 мл, примерно от 15 мл до 20 мл, примерно от 25 мл до 30 мл, примерно от 30 мл до 50 мл, примерно от 50 мл до 100 мл, примерно от 100 мл до 150 мл, примерно от 150 мл до 200 мл, примерно от 200 мл до 250 мл, примерно от 250 мл до 300 мл, примерно от 300 мл до 350 мл, примерно от 350 мл до 400 мл, от 400 мл до 450 мл, от 450 мл до 500 мл, примерно от 500 мл до 750 мл или от 750 мл до 1000 мл. Далее представлен указанный способ, в котором модифицированный онколитический вирус, онколитический вирус осповакцины или фармацевтическую композицию вводят в жидкой лекарственной форме, твердой лекарственной форме, ингаляционной лекарственной форме, интраназальной лекарственной форме, липосомальной композиции, лекарственной форме, содержащей наночастицы, лекарственной форме, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной форме, или любых их комбинациях. Далее здесь представлен указанный способ, в котором модифицированный онколитический вирус, онколитический вирус осповакцины или фармацевтическую композицию вводят в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель или примерно 12 недель. Далее здесь представлен указанный способ, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят один раз в день, два раза в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели. Далее здесь представлен указанный способ, в котором модифицированный онколитический вирус, онколитический вирус осповакцины или фармацевтическую композицию вводят внутривенно, интраперитонеально или путем внутриопухолевой инъекции. Далее здесь представлен указанный способ, в котором модифицированный онколитический вирус, онколитический вирус осповакцины или фармацевтическую композицию вводят в виде болюсной инъекции или медленной инфузии. Далее здесь представлен указанный способ, в котором введение

модифицированного онколитического вируса, онколитического вируса осповакцины или фармацевтической композиции приводит к первому пику вирусной нагрузки примерно через 1 час - примерно через 3 дня и второму пику вирусной нагрузки примерно через 3 дня - примерно через 10 дней после введения первой дозы. Далее здесь представлен указанный способ, включающий применение дополнительной терапии, в котором дополнительную терапию проводят в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель, или примерно 12 недель. Далее здесь представлен указанный способ, в котором дополнительную терапию проводят один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели. Далее здесь представлен указанный способ, в котором дополнительную терапию применяют в жидкой лекарственной форме, твердой лекарственной форме, ингаляционной лекарственной форме, интраназальной лекарственной форме, липосомальной композиции, лекарственной форме, содержащей наночастицы, лекарственной форме, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной форме или любых их комбинациях. Далее здесь представлен указанный способ, в котором дополнительную терапию проводят в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель или примерно 12 недель. Далее здесь представлен указанный способ, в котором дополнительную терапию проводят один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели. Далее здесь представлен указанный способ, в котором дополнительную терапию применяют в жидкой лекарственной форме, твердой лекарственной форме, ингаляционной лекарственной форме, интраназальной лекарственной форме, липосомальной композиции, лекарственной форме, содержащей наночастицы, лекарственной форме, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной форме или любых их комбинациях. Далее здесь представлен указанный способ, в котором дополнительную терапию применяют перорально, внутривенно, путем внутриопухолевой инъекции или с помощью облучения. Далее здесь представлен указанный способ, в котором субъектом является человек. Далее в настоящей заявке представлен указанный способ, в котором перед введением модифицированного онколитического вируса, онколитического вируса осповакцины или фармацевтической композиции у субъекта был диагностирован рак. Далее в настоящей заявке представлен указанный способ, в котором перед введением модифицированного онколитического вируса, онколитического вируса осповакцины или фармацевтической композиции или дополнительной терапии у субъекта был диагностирован рак. Далее в настоящей заявке

представлен указанный способ, в котором дополнительная терапия включает химиотерапию, облучение, онколитическую вирусную терапию дополнительным вирусом, лечение иммуномодулирующими белками, терапию CAR-T-клетками, противораковым агентом или любые их комбинации. Далее в настоящей заявке представлен указанный способ, в котором дополнительная терапия включает введение иммуномодулирующего агента, содержащего антитело против CD33 и его вариабельную область, антитело против CD11b и его вариабельную область, ингибитор COX2, цитокин, хемокин, антитело против CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против CD11b и его вариабельную область, антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, или агонист TLR. Далее здесь представлен указанный способ, включающий применение дополнительной терапии, которая включает введение противоракового агента, при этом противораковым агентом является химиотерапевтический агент.

Хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и описаны здесь, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты приведены только в качестве примера. Специалисты в данной области техники теперь будут иметь дело с многочисленными вариациями, изменениями и заменами, не отходя от изобретения. Следует понимать, что при осуществлении изобретения могут быть использованы различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящей заявке. Предполагается, что нижеследующие пункты формулы изобретения определяют объем изобретения и что таким образом будут охватываться способы и структуры, входящие в объем этих пунктов формулы изобретения и их эквивалентов.

Примеры

Для лучшего понимания настоящего изобретения и его многочисленных преимуществ следующие примеры приведены в качестве иллюстрации и без ограничения объема этого раскрытия.

Пример 1: Примерный модифицированный вирус осповакцины, модифицированный для удаления генов A52R и ТК и вставки CCR2 и лептина-IL-2, демонстрирует повышенный терапевтический эффект и системную доставку на опухолевых моделях LLC.

Целью этого исследования было изучение терапевтического эффекта и системной доставки модифицированного вируса осповакцины, как описано в настоящей заявке. В геном штаммов вируса осповакцины Western Reserve (WR) была внесена модификация путем удаления гена A52R и гена тимидинкиназы (ТК) и вставки экзогенной нуклеиновой

кислоты, кодирующей CCR2, и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок лептин-интерлейкин (IL)-2 (упоминаемый здесь как WR.Tk-.A52R-.CCR2.Лептин-IL2; также сокращенно «ММС»).

Одно исследование было выполнено на моделях опухолей LLC для сравнения примерного модифицированного вируса осповакцины с эталонным вирусом, который представлял собой штамм Western Reserve вируса осповакцины с делецией ТК (именуемый WR.ТК-), и растворителем (забуференным физиологическим раствором) в качестве контроля. Дозу 2×10^7 БОЕ вводили внутривенно для лечения мышей (C57/B6), которым подкожно имплантировали опухоли LLC, на 0-й и 3-й дни, когда опухоли достигали размера 50-100 мм³ [результаты показаны на Фиг.2А, 2В и 2С]. Было отмечено, что примерный модифицированный вирус осповакцины, введенный внутривенно, приводил к значительной задержке роста объема опухоли, как показано на Фиг.2А, по сравнению с контролем и эталонным вирусом. Далее, на Фиг.2В также показано, что вероятность выживания мышей также значительно повышалась при введении примерного модифицированного вируса осповакцины. Результат демонстрирует усиленный терапевтический эффект примерного модифицированного вируса осповакцины. Кроме того, объемы опухоли измеряли через 28 дней после введения вируса для каждой группы, получавшей примерный модифицированный вирус осповакцины или эталонный вирус, который представлял собой вирус WR.ТК-, или контроль [Фиг.2С]. Результаты, показанные на Фиг.2А, 2В и 2С, демонстрируют значительное усиление терапевтической активности при введении примерного модифицированного вируса осповакцины.

Другое исследование было выполнено на моделях опухолей LLC для сравнения системной доставки в опухоль примерного модифицированного вируса осповакцины с эталонным вирусом (WR.ТК- штаммом вируса осповакцины). Дозу 1×10^7 БОЕ вводили внутривенно мышам (C57/B6) с подкожно имплантированными опухолями LLC. Опухоли собирали через 24 часа после внутривенного введения, и количество вирусных геномов на миллиграмм опухоли определяли количественно с помощью кПЦР [Фиг.2D]. Результаты, как показано на Фиг.2D, указывают на значительно улучшенную системную доставку примерного модифицированного вируса осповакцины по сравнению с эталоном, WR.ТК- вирусом.

Приведенный выше пример ясно указывает на то, что примерный модифицированный вирус осповакцины демонстрирует значительно повышенную терапевтическую активность в отношении опухолей и высокую системную доставку к участкам опухоли.

Пример 2 – Примерный модифицированный вирус осповакцины по настоящему изобретению демонстрирует усиленный терапевтический эффект и системную доставку у предварительно иммунизированных мышей на моделях опухолей LLC.

Целью этого исследования было изучение терапевтического эффекта и системной доставки примерного модифицированного вируса осповакцины в соответствии с настоящим описанием у предварительно иммунизированных мышей по сравнению с неиммунизированными мышами.

В этом исследовании использовали мышей C57/B6, несущих подкожные опухоли LLC. Одной группе мышей была проведена иммунизация эталонным вирусом, которым являлся штамм вируса осповакцины WR.TK-, в дозе 1×10^6 БОЕ, путем одной инъекции за 30 дней до имплантации опухоли (отмечали как «ММС с иммунизацией» на Фиг.3А), а другая группа не была иммунизирована (отмечали как «ММС» на Фиг.3А).

Мышам делали две внутривенные инъекции любого вируса (2 дозы по 1×10^7 БОЕ/мл с интервалом в 3 дня), когда опухоли достигали 50-100 мм³, примерно через 10 дней после имплантации. Результаты исследования среднего объема опухоли показаны на Фиг.3А. Результаты показывают, что примерный модифицированный вирус осповакцины проявлял хорошую терапевтическую активность в опухолях как у иммунизированных, так и у неиммунизированных мышей по сравнению с мышами, которым вводили контрольный растворитель.

В другом исследовании изучали модели опухолей LLC для сравнения системной доставки в опухоль на примере мышей, иммунизированных и не иммунизированных модифицированным вирусом осповакцины. Были отобраны две группы мышей C57/B6 с подкожной опухолью. Одной группе провели иммунизацию эталонным вирусом, которым был штамм вируса осповакцины WR.TK-, в дозе 1×10^6 БОЕ, с одной инъекцией за 30 дней до имплантации опухоли, другая группа была представлена интактными мышами, несущими подкожные опухоли LLC, и другая группа не была иммунизирована. Обеим группам внутривенно вводили дозу 1×10^7 БОЕ, и опухоли удаляли через 24 часа после внутривенного введения. Определяли количество вирусных геномов на миллиграмм опухоли с помощью кПЦР [Фиг.3В]. Результаты, как представлено на Фиг.3В, указывают на хорошую системную доставку примерного модифицированного вируса осповакцины как в группе с предварительной иммунизацией («ММС с иммунизацией»), так и в группе без иммунизации («ММС без иммунизации»).

Приведенные выше исследования позволяют предположить, что примерный модифицированный вирус осповакцины демонстрирует улучшенную доставку и

терапевтическую эффективность как с предварительной иммунизацией, так и без нее, по сравнению с контрольными вирусами.

Пример 3 – Примерный модифицированный вирус осповакцины по настоящему изобретению демонстрирует усиленный терапевтический эффект на опухолевых моделях RENCA.

Целью этого исследования было изучение терапевтического эффекта примерного модифицированного вируса осповакцины согласно настоящему изобретению (включающего модификации, описанные в предыдущем примере) на моделях опухоли RENCA.

Исследование проводили на моделях опухолей RENCA для сравнения терапевтической активности примерного модифицированного вируса осповакцины с эталонным вирусом, который представлял собой штамм Western Reserve вируса осповакцины с делецией ТК (именуемый WR.ТК-), и растворителем (забуференным физиологическим раствором) в качестве контроля. Дозу 2×10^7 БОЕ любого вируса или контроль вводили внутривенно для лечения мышей BALB/c, которым имплантировали подкожные опухоли RENCA, когда опухоли достигали размера 50-100 мм³ [Фиг.4]. Результат для отдельных размеров опухоли мыши на 14-й день после первого лечения показан на Фиг.4. Результаты на Фиг.4 показывают, что примерный модифицированный вирус осповакцины, введенный внутривенно, приводил к значительно меньшим размерам опухоли по сравнению с эталонным WR.ТК- штаммом вируса осповакцины и контролем.

Пример 4 – Исследование биораспределения примерного модифицированного вируса осповакцины по настоящему изобретению показывает более высокую селективность в отношении опухолей при низком накоплении в нормальных тканях.

Целью этого исследования было изучение биораспределения примерного модифицированного вируса осповакцины (обозначенного как NT428N на Фиг.5А и Фиг.5В, содержащего модификации, описанные выше в Примере 1) по сравнению со штаммами эталонного вируса осповакцины (WR.ТК-А52R-) (показано как NT202N на Фиг.5А и Фиг.5В) в опухолях по сравнению со всеми другими тканями на моделях опухолей LLC.

В этом исследовании примерный модифицированный вирус осповакцины (NT428N) или вирус осповакцины с делецией генов ТК и А52R без экспрессии ССR2 или лептина (контрольный вирус, обозначенный как NT202N), вводили в дозе 1×10^7 БОЕ через хвостовую вену двум группам мышей. Одной группой мышей были мыши С57/В6 без опухоли [Фиг.5А], а другой группой были мыши С57/В6, несущие подкожные опухоли LLC [Фиг.5В]. Мышей умерщвляли через 72 часа после введения и забирали органы

(печень, селезенку, головной мозг, сердце, почки, желудочно-кишечный тракт, костный мозг, легкие и опухоль) и определяли вирусный геном методом кПЦР для групп без опухоли и с опухолью LLC [Фиг.5А и Фиг.5В]. Затем мышей умерщвляли через 10 дней после введения, и органы (печень, селезенку, головной мозг, сердце, почки, желудочно-кишечный тракт, костный мозг, легкие и опухоль) собирали для окрашивания Н&Е. Были проведены анализы на Н&Е, и был получен полный отчет о патологии [Таблица 1].

Исследование биораспределения на Фиг.5А и Фиг.5В демонстрирует, что примерный модифицированный вирус осповакцины (NT428N) показал более низкий титр во всех тканях по сравнению с контрольным вирусом (NT202N), и ни в одной ткани не было обнаружено увеличения вирусной нагрузки при экспрессии CCR2. У мышей, несущих опухоль, вирусный геном в опухоли был значительно выше, чем в любой другой ткани или органах.

Патологоанатомическое исследование в Таблице 1 показывает, что примерный модифицированный вирус осповакцины хорошо переносился и, как ожидается, будет безопаснее, чем аналогичные вирусы, используемые в настоящее время в клинических условиях.

Таблица 1. Отчет о патологии через 10 дней после лечения

Органы	Отчет
Головной мозг	Никаких существенных явлений не отмечено
Сердце	У одной мыши (из 6) в группах контроля вируса (202) наблюдалась очаговая дегенерация миокарда; в группах NT428N явлений не отмечено
Легкие	Без существенных явлений
Печень	Некоторые жировые изменения и микровезикулярный липидоз во всех группах вирусного лечения, не увеличивались с NT428N. В крови не обнаружено изменений уровня АсАТ/АлАТ.
Почки	Без существенных явлений
Селезенка	Экстремедуллярный гемопоэз и лимфоидная гиперплазия в группе LLC+NT202N; нет явлений с LLC+NT428N.
ЖКТ	Без существенных явлений
Опухоль	Некроз и воспаление наблюдались при лечении обоими вирусами, но отмечен самый высокий средний балл для LLC+NT428N. Также оценивали скорость митоза, но это было невозможно в группе LLC+NT428N, поскольку оставалось недостаточно живых опухолевых клеток, что указывает на большую эффективность вируса NT428N в уничтожении опухолевых клеток по сравнению с контрольным вирусом NT202N.

Последовательности

SEQ ID NO: 1 (нуклеиновокислотная последовательность гибрида лептина и IL2)

ATGCATTGGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTTGGCCCTATCTTTTCTATGT
 CCAAGCTGTGCCCATCCAAAAAGTCCAAGATGACACCAAAAACCCTCATCAAGAC
 AATTGTCACCAGGATCAATGACATTTACACACGCGAGTCAGTCTCCTCCAAACAG
 AAAGTCACCGGTTTGGACTTCATTCCTGGGCTCCACCCCATCCTGACCTTATCCA
 AGATGGACCAGACACTGGCAGTCTACCAACAGATCCTCACCAGTATGCCTTCCA
 GAAACGTGATCCAAATATCCAACGACCTGGAGAACCTCCGGGATCTTCTTCACGI
 GCTGGCCTTCTCTAAGAGCTGCCACTTGCCCTGGGCCAGTGGCCTGGAGACCTG
 GACAGCCTGGGGGGTGTCTGGAAGCTTCAGGCTACTCCACAGAGGTGGTGGCC
 CTGAGCAGGCTGCAGGGGTCTCTGCAGGACATGCTGTGGCAGCTGGACCTCAGC
 CCTGGGTGCGGAGGTGGCGGATCCGGCGGAGGTGGCTCAGGTGGCGGTGGATCA
 GGAGGAGGTGGATCAGCTAGCGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAG
 CTACAAGTGGAGCATTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATA
 ATTACAAGAATCCCAAACCTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAA
 GAAGGCCACAGAAGTCAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAAGTCAAACCTCT
 GGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGA
 CTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAACAAC
 ATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGA
 TGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTTGA

SEQ ID NO: 2 (Нуклеиновокислотная последовательность, которая кодирует CCR2, вариант 467):

ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAGCGGTGAAG
 AAGTCACCACCTTTTTTATTATGATTACGGTGCTCCCTGTCATAAATTTGACGTG
 AAGCAAATTGGGGCCCAACTCCTGCCTCCGCTCTACTCGCTGGTGTTCATCTTTG
 GTTTTGTGGGCAACATGCTGGTTCGTCCTCATCTTAATAAACTGCAAAAAGCTGAA
 GTGCTTGACTGACATTTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGATCTGCTTTTTCTTA
 TACTCTCCCATTGTGGGCTCACTCTGCTGCAAATGAGTGGGTCTTTGGGAATGC
 AATGTGCAAATTATTCACAGGGCTGTATCACATCGGTTATTTTGGCGGAATCTTC
 TTCATCATCCTCCTGACAATCGATAGATACCTGGCTATTGTCCATGCTGTGTTTGC
 TTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACCTGGTTG
 GTGGCTGTGTTTGTCTCTGTCCCAGGAATCATCTTTACTAAATGCCAGAAAGAAG
 ATTCTGTTTATGTCTGTGGCCCTTATTTTCCACGAGGATGGAATAATTTCCACACA
 ATAATGAGGAACATTTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTCATCATGGTCATCTGCT
 ACTCGGGAATCCTGAAAACCCTGCTTCGGGTGTCGAAACGAGAAGAAGAGGCATA
 GGGCAGTGAGAGTCATCTTACCATCATGATTGTTTACTTTCTCTTCTGGACTCCC
 TATAATATTGTCATTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTCGGCCTGAGTAACTG
 TGAAAGCACAGTCAACTGGACCAAGCCACGCGAGGTGACAGAGACTCTTGGGAT
 GACTCACTGCTGCATCAATCCCATCATCTATGCCTTCGTTGGGGAGAAGTTCAGA
 AGCCTTTTTACATAGCTCTTGGCTGTAGGATTGCCCACTCCAAAAACCAGTGT
 GTGGAGGTCCAGGAGTGAGACCAGGAAAGAATGTGAAAGTGACTACACAAGGA
 CTCCTCGATGGTTCGTGGAAAAGGAAAGTCAATTGGCAGAGCCCCTGAAGCCAGT
 CTCAGGACAAAGAAGGAGCCTAG

SEQ ID NO: 3 (Нуклеиновокислотная последовательность, которая кодирует CCR2, вариант 502):

ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCGGTTTATCAGAAATACCAACGAGAGCGGTGAAG
AAGTCACCACCTTTTTTGGATTATGATTACGGTGCTCCCTGTCATAAATTTGACGTG
AAGCAAATTGGGGCCCAACTCCTGCCTCCGCTCTACTCGCTGGTGTTCATCTTTG
GTTTTGTGGGCAACATGCTGGTCGTCCTCATCTTAATAAACTGCAAAAAGCTGAA
GTGCTTGACTGACATTTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGATCTGCTgTTcCTTAT
TACTCTCCCATTTGTGGGCTCACTCTGCTGCAAATGAGTGGGTCTTTGGGAATGCA
ATGTGCAAATTATTCACAGGGCTGTATCACATCGGTTATTTTGGCGGAATCTTCTT
CATCATCCTCCTGACAATCGATAGATACCTGGCTATTGTCCATGCTGTGTTTGCTT
TAAAAGCCAGGACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACCTGGTTGG
TGGCTGTGTTTGCTTCTGTCCCAGGAATCATCTTTACTAAATGCCAGAAAGAAGA
TTCTGTTTATGTCTGTGGCCCTTATTTTCCACGAGGATGGAATAATTTCCACACAA
TAATGAGGAACATTTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTCATCATGGTCATCTGCTA
CTCGGGAATCCTGAAAACCCTGCTTCGGTGTGCGAAACGAGAAGAAGAGGCATAG
GGCAGTGAGAGTCATCTTCACCATCATGATTGTTTACTTTCTCTTCTGGACTCCCT
ATAATATTGTCATTCTCCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTCGGCCTGAGTAACTGT
GAAAGCACCAGTCAACTGGACCAAGCCACGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATG
ACTCACTGCTGCATCAATCCCATCATCTATGCCTTCGTTGGGGAGAAGTTCAGAA
GCCTTTTTTCACATAGCTCTTGGCTGTAGGATTGCCCCACTCCAAAAACCAGTGTG
TGGAGGTCCAGGAGTGAGACCAGGAAAGAATGTGAAAGTGACTACACAAGGAC
TCCTCGATGGTCGTGGAAAAGGAAAGTCAATTGGCAGAGCCCCTGAAGCCAGTC
TTCAGGACAAAGAAGGAGCCTAG

SEQ ID NO: 4 (Нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая лептин).

GTAGGAATCGCAGCGCCAGCGGTTGCAAGGCCCAAGAAGCCCATCCTGGGAAGG
AAAATGCATTGGGGAACCCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTTGGCCCTATCTTTTCTA
TGTCCAAGCTGTGCCCATCCAAAAAGTCCAAGATGACACCAAAACCCATCAA
GACAATTGTCACCAGGATCAATGACATTTACACACGCAGTCAGTCTCCTCCAAA
CAGAAAGTCACCGGTTTGGACTTCATTCCTGGGCTCCACCCCATCCTGACCTTAT
CCAAGATGGACCAGACACTGGCAGTCTACCAACAGATCCTCACCAGTATGCCTTC
CAGAAACGTGATCCAAATATCCAACGACCTGGAGAACCTCCGGGATCTTCTTAC
GTGCTGGCCTTCTCTAAGAGCTGCCACTTGCCCTGGGCCAGTGGCCTGGAGACCT
TGGACAGCCTGGGGGGTGTCTGGAAGCTTCAGGCTACTCCACAGAGGTGGTGG
CCCTGAGCAGGCTGCAGGGGTCTCTGCAGGACATGCTGTGGCAGCTGGACCTCA
GCCCTGGGTGCTGAGGCCTTGAAGGTCACTCTTCTGCAAGGACTACGTTAAGGG
AAGGAACCTGGCTTCCAGGTATCTCCAGGATTGAAGAGCATTGCATGGACACC
CCTTATCCAGGACTCTGTCAATTTCCCTGACTCCTCTAAGCCACTCTTCCAAAGGC
ATAAGACCCTAAGCCTCCTTTTGCTTGAAACCAAGATATATACACAGGATCCTA
TTCTCACCAGGAAGGGGGTCCACCCAGCAAAGAGTGGGCTGCATCTGGGATTCC
CACCAAGGTCTTCAGCCATCAACAAGAGTTGTCTTGTCCCCTCTTGACCCATCTC
CCCCTCACTGAATGCCTCAATGTGACCAGGGGTGATTTTCAGAGAGGGCAGAGGG
GTAGGCAGAGCCTTTGGATGACCAGAACAAGGTTCCCTCTGAGAATTCCAAGGA
GTTCCATGAAGACCACATCCACACACGCAGGAACTCCAGCAACACAAGCTGGA
AGCACATGTTTATTTATTCTGCATTTTATTCTGGATGGATTTGAAGCAAAGCACCA
GCTTCTCCAGGCTCTTTGGGGTTCAGCCAGGGCCAGGGGTCTCCCTGGAGTGCAGT
TTCCAATCCATAGATGGGTCTGGCTGAGCTGAACCCATTTTGAGTGACTCGAGG
GTTGGGTTTCATCTGAGCAAGAGCTGGCAAAGGTGGCTCTCCAGTTAGTTCTCTCG
TAACTGGTTTCATTTCTACTGTGACTGATGTTACATCACAGTGTTTGCAATGGTGT
TGCCCTGAGTGGATCTCCAAGGACCAGGTTATTTAAAAGATTTGTTTTGTCAA
GTGTCATATGTAGGTGTCTGCACCCAGGGGTGGGGAATGTTTGGGCAGAAGGGA
GAAGGATCTAGAATGTGTTTTCTGAATAACATTTGTGTGGTGGGTCTTTGGAAG
GAGTGAGATCATTTTCTTATCTTCTGCAATTGCTTAGGATGTTTTTCATGAAAATA
GCTCTTTCAGGGGGGTGTGAGGCCTGGCCAGGCACCCCTGGAGAGAAGTTTCT
GGCCCTGGCTGACCCCAAAGAGCCTGGAGAAGCTGATGCTTTGCTTCAAATCCAT
CCAGAATAAAACGCAAAGGGCTGAAAGCCATTTGTTGGGGCAGTGGTAAGCTCT
GGCTTTCTCCGACTGCTAGGGAGTGGTCTTTCCATCATGGAGTGACGGTCCCAC
ACTGGTGACTIONGATCTTCAGAGCAGGGGTCTTGGTGTGACCCTCTGAATGGTC
CAGGGTTGATCACACTCTGGGTTTATTACATGGCAGTGTTCCTATTTGGGGCTTGC
ATGCCAAATTGTAGTTCTTGTCTGATTGGCTCACCCAAGCAAGGCCAAAATTACC
AAAAATCTTGGGGGGTTTTTACTCCAGTGGTGAAGAAAACCTCTTTAGCAGGTGG
TCCTGAGACCTGACAAGCACTGCTAGGCGAGTGCCAGGACTCCCAGGCCAGGC
CACCAGGATGGCCCTTCCCCTGGAGGTACATTCAGGAAGATGAAAGAGGAGG
TTTGGGGTCTGCCACCATCCTGCTGCTGTGTTTTTGCTATCACACAGTGGGTGGTG
GATCTGTCCAAGGAACTTGAATCAAAGCAGTTAACTTTAAGACTGAGCACCTG
CTTCATGCTCAGCCCTGACTGGTGTATAGGCTGGAGAAGCTCACCCAATAAACA
TTAAGATTGAGGCCTGCCCTCAGGGATCTTGCATTCAGTGGTCAAACCGCACT
CACCCATGTGCCAAGGTGGGGTATTTACCACAGCAGCTGAACAGCCAAATGCAT

GGTGCAGTTGACAGCAGGTGGGAAATGGTATGAGCTGAGGGGGGCCGTGCCAG
 GGGCCCACAGGGAACCCCTGCTTGCACTTTGTAACATGTTTACTTTTCAGGGCATC
 TTAGCTTCTATTATAGCCACATCCCTTTGAAACAAGATAACTGAGAATTTAAAAA
 TAAGAAAATACATAAGACCATAACAGCCAACAGGTGGCAGGACCAGGACTATA
 GCCCAGGTCCTCTGATACCCAGAGCATTACGTGAGCCAGGTAATGAGGGACTGG
 AACCAGGGAGACCGAGCGCTTTCTGGAAAAGAGGAGTTTCGAGGTAGAGTTTGA
 AGGAGGTGAGGGATGTGAATTGCCTGCAGAGAGAAGCCTGTTTTGTTGGAAGGT
 TTGGTGTGTGGAGATGCAGAGGTA AAAAGTGTGAGCAGTGAGTTACAGCGAGAGG
 CAGAGAAAGAAGAGACAGGAGGGCAAGGGCCATGCTGAAGGGACCTTGAAGGG
 TAAAGAAGTTTGATATTAAGGAGTTAAGAGTAGCAAGTTCTAGAGAAGAGGCT
 GGTGCTGTGGCCAGGGTGAGAGCTGCTCTGGAAAATGTGACCCAGATCCTCACA
 ACCACCTAATCAGGCTGAGGTGTCTTAAGCCTTTTGCTCACAAAACCTGGCACAA
 TGGCTAATTCCCAGAGTGTGAAACTTCCTAAGTATAAATGGTTGTCTGTTTTTGT
 ACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTTGGCCGGGTGCGGTGGCTCACGCCTGTAATC
 CCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGGGGATCACAAGGTCCTAGATGGCGAGC
 ATCCTGGCCAACATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAACACAAAAGTTAGCTG
 AGCGTGGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCCACTCGGGAGGCTGAGACAGGAGA
 ATCGCTTAAACCTGGGAGGCGGAGAGTACAGTGAGCCAAGATCGCGCCACTGCA
 CTCCGGCCTGATGACAGAGCGAGATTCCGTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTT
 TGTTTTTAAAAAATCTAAATAAAATAACTTTGCCCCCTGCAAAAAAAAAAAAAA
 AAAA

SEQ ID NO: 5 (Нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая IL-2) (ENA
 No. E00257.1)

AATTCTATGGCTCCGACTTCAAGTTCTACCAAGAAGACCCAGCTTCAATTAGAAC
 ATTTACTTCTAGATTTACAAATGATTCTGAATGGTATCAACAATTATAAGAATCC
 AAAGCTTACTCGTATGTTGACCTTTAAATTCTATATGCCTAAGAAGGCTACTGAA
 TAAAACACCTGCAGTGTTTAGAAGAAGAGCTCAAACCGTTAGAAGAAGTTCTG
 AATCTGGCTCAATCTAAAAACTTCCATTTACGTCCACGAGATCTTATCTCTAATAT
 TAACGTAATCGTTTTTGGAACTTAAAGGATCCGAAACTACCTTCATGTGTGAATAT
 GCTGACGAAACCGCTACGATCGTAGAATTTCTTAATCGATGGATTACTTTCTGTC
 AATCTATTATCTCTACCTTAACTTGAGTCGACG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный онколитический вирус, включающий:
 - экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий белок, модулирующий метаболизм, или его функциональный фрагмент или вариант, где экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, содержит:
 - полипептид, включающий IL-2 или его функциональный фрагмент, и
 - полипептид, включающий лептин или его функциональный фрагмент;
 - экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор хемокина, или его функциональный фрагмент или вариант, где рецептором хемокина является CCR2; и
 - генетическую модификацию в вирусном геноме модифицированного онколитического вируса.
2. Модифицированный онколитический вирус по п.1, в котором экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, содержит кодон-оптимизированный вариант кодирующей последовательности рецептора хемокина человека.
3. Модифицированный онколитический вирус по п.1, в котором слитый белок дополнительно содержит цитокин, или его функциональный фрагмент или вариант.
4. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-3, в котором генетическая модификация представляет собой мутацию или делецию гена A52R.
5. Модифицированный онколитический вирус по п.4, в котором делеция является полной или частичной делецией.
6. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-5, который дополнительно содержит делецию гена тимидинкиназы.
7. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-6, который включает вирус кори, полиовирус, поксвирус, вирус осповакцины, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус болезни Ньюкасла, вирус долины Сенека, лентивирус, менговирус или вирус миксомы.
8. Модифицированный онколитический вирус по п.7, который является вирусом оспы.
9. Модифицированный онколитический вирус по п.8, в котором вирус оспы является вирусом осповакцины.
10. Модифицированный онколитический вирус по п.9, в котором вирус осповакцины представляет собой штамм вируса осповакцины Western Reserve, штамм

Copenhagen, штамм IHД, штамм Wyeth, штамм NYCBOH, штамм Tian Tan, штамм Lister, штамм Ankara, штамм USSR, штамм ACAM2000, штамм Paris, штамм Bern, штамм Temple of Heaven, штамм Dairen, штамм EM-63, штамм Evans, штамм King, штамм Patwadangar или штамм Tash Kent.

11. Модифицированный онколитический вирус по п.10, в котором экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, клонирована в локус гена тимидинкиназы.

12. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-11, в котором экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, клонирована в локус гена A52R.

13. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-12, в котором полипептид, кодирующий IL-2, или его функциональный фрагмент содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 4.

14. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-12, в котором полипептид, кодирующий лептин, или его функциональный фрагмент содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 5.

15. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-14, в котором экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, включающий белок, модулирующий метаболизм, или его функциональный фрагмент или вариант, содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 1.

16. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-15, в котором экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор хемокина, или его функциональный фрагмент или вариант, содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% гомологии с последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

17. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-16, дополнительно содержащий экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую гиалуронидазу.

18. Модифицированный онколитический вирус по п.17, в котором гиалуронидаза представляет собой PH-20 или HysA.

19. Модифицированный онколитический вирус, включающий:

- экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок лептин-интерлейкин (IL)-2;

- экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CCR2, и

- делецию гена A52R.

20. Модифицированный онколитический вирус по п.19, который включает вирус кори, полиовирус, поксвирус, вирус осповакцины, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус болезни Ньюкасла, вирус долины Сенека, лентивирус, менговирус или вирус миксомы.

21. Модифицированный онколитический вирус по п.20, который представляет собой вирус оспы.

22. Модифицированный онколитический вирус по п.21, который представляет собой вирус осповакцины.

23. Модифицированный онколитический вирус по п.22, который представляет собой штамм вируса осповакцины Western Reserve, штамм Copenhagen, штамм IND, штамм Wyeth, штамм NYCBOH, штамм Tian Tan, штамм Lister, штамм Ankara, штамм USSR, штамм ACAM2000, штамм Paris, штамм Bern, штамм Temple of Heaven, штамм Dairen, штамм EM-63, штамм Evans, штамм King, штамм Patwadangar или штамм Tashkent.

24. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.19-23, который дополнительно содержит делецию гена тимидинкиназы.

25. Модифицированный онколитический вирус по п.24, в котором экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок лептин-интерлейкин (IL)-2, клонирована в локус гена тимидинкиназы.

26. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.19-25, в котором нуклеиновая кислота, кодирующая CCR2, клонирована в локус гена A52R.

27. Модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-26, дополнительно содержащий мутацию или делецию вирусного гена, выбранного из группы, состоящей из A1, A2, VH1, A33, I7, K7R, B8R, C12L, B15R, B14R, K1L, N1L, M2L, A49R, A46R, E3L, C4, C16 и их функционального домена, или фрагмента или варианта, или любых их комбинаций.

28. Модифицированный онколитический вирус по п.27, дополнительно содержащий экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере одно из

HMGB1, PIAS3, LIGHT, фракталкина, ITAC, IL15, IL15R α , CCL5, их функционального домена или фрагмента, или варианта, или любых их комбинаций.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-28.

30. Фармацевтическая композиция по п.29, дополнительно содержащая по меньшей мере одно из солубилизирующего агента, вспомогательного вещества или фармацевтически приемлемого носителя.

31. Фармацевтическая композиция по п.30, в которой вспомогательное вещество включает одно или более из буферного агента, стабилизатора, антиоксиданта, связующего агента, разбавителя, диспергирующего агента, агента, регулирующего скорость, смазочного агента, глиданта, дезинтегранта, пластификатора, консерванта или любые их комбинации.

32. Фармацевтическая композиция по п.30, в которой вспомогательное вещество включает динатрия гидрофосфат дигидрат, натрия дигидрофосфат дигидрат, натрия хлорид, миоинозитол, сорбитол или любые их комбинации.

33. Фармацевтическая композиция по любому из пп.29-32, которая не содержит консерванта.

34. Фармацевтическая композиция по любому из пп.29-32, дополнительно содержащая одно или более из консерванта, разбавителя и носителя.

35. Фармацевтическая композиция по любому из пп.29-34, дополнительно содержащая дополнительный активный ингредиент или его соль.

36. Фармацевтическая композиция по любому из пп.30-35, в которой солубилизирующим агентом является стерильная вода.

37. Фармацевтическая композиция по любому из пп.29-36, дополнительно содержащая дополнительный активный ингредиент, который является противораковым агентом или другим онколитическим вирусом.

38. Набор, содержащий модифицированный онколитический вирус по любому из пп.1-28.

39. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по пп.29-37.

40. Набор по п.38 или п.39, дополнительно содержащий по меньшей мере одно из противоракового агента или дополнительного онколитического вируса.

41. Способ усиления терапевтического эффекта модифицированного онколитического вируса при системной доставке модифицированного онколитического вируса субъекту по сравнению с системным введением эталонного вируса, содержащего мутацию ТК, но не экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, или

экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор хемокина, включающий системное введение модифицированного онколитического вируса по любому из пп.1-28 или фармацевтической композиции по любому из пп.29-37.

42. Способ лечения, включающий введение субъекту онколитического вируса по любому из пп.1-28, или фармацевтической композиции по любому из пп.29-37, где введение приводит к усилению системного иммунного ответа у субъекта, по сравнению с введением субъекту эталонного онколитического вируса, который содержит делецию гена тиминкиназы (ТК-) и не содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, включающий модулирующий метаболизм белок или его функциональный фрагмент или вариант, или экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор хемокина, или его функциональный фрагмент или вариант.

43. Способ по п.42, в котором введение представляет собой системное введение.

44. Способ по любому из пп.41-43, в котором системное введение включает по меньшей мере одно из внутриопухолевого, внутривенного, парентерального, интрадермального, внутримышечного, трансдермального, ректального, интрауретрального, интравагинального, интраназального, интратекального, интраперитонеального, интрадентального, подкожного, чрескожного, интратрахеального, интраартериального, интравезикального, ингаляционного, перорального введения, или любые их комбинации.

45. Способ по п.44, где введение является внутриопухолевым.

46. Способ по п.44, где введение является внутривенным.

47. Способ по любому из пп.41-46, в котором у субъекта обнаружен рак.

48. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного онколитического вируса по любому из пп.1-28.

49. Способ по п.47 или п.48, в котором рак представляет собой по меньшей мере одно из меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака брюшины, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака яичников, лейкоза, лимфомы, почечно-клеточного рака, рака поджелудочной железы, эпителиальной карциномы, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака двенадцатиперстной кишки, аденокарциномы поджелудочной железы, аденокистозного рака, саркомы, мезотелиомы, мультиформной глиобластомы, астроцитомы, множественной миеломы, карциномы предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы, аденокарциномы поджелудочной

железы, плоскоклеточного рака головы и шеи, плоскоклеточного рака шейки матки, остеосаркомы, эпителиальной карциномы яичников, острой лимфобластной лимфомы, миелопролиферативного новообразования, или любые их комбинации.

50. Способ по любому из пп.41-49, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в дозировке, которая составляет примерно от 10^6 БОЕ/мл до 10^{10} БОЕ/мл онколитического вируса.

51. Способ по любому из пп.41-49, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в дозировке, которая составляет приблизительно 5×10^9 БОЕ/мл онколитического вируса.

52. Способ по любому из пп.41-51, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят независимо в начальной дозе в течение первого периода времени, промежуточной дозе в течение второго периода времени и высокой дозе в течение третьего периода времени.

53. Способ по п.52, включающий независимое введение начальной, промежуточной и высокой дозы, при этом начальная доза ниже, чем промежуточная доза, а промежуточная доза ниже, чем высокая доза.

54. Способ по п.52 или п.53, в котором первый, второй и третий периоды времени составляют каждый примерно от 1 недели до 3 недель.

55. Способ по любому из пп.41-54, в котором модифицированный онколитический вирус и фармацевтическая композиция независимо друг от друга содержат жидкую лекарственную форму, которую вводят в объеме примерно от 1 мл до 5 мл, примерно от 5 мл до 10 мл, примерно от 15 мл до 20 мл, примерно от 25 мл до 30 мл, примерно от 30 мл до 50 мл, примерно от 50 мл до 100 мл, примерно от 100 мл до 150 мл, примерно от 150 мл до 200 мл, примерно от 200 мл до 250 мл, примерно от 250 мл до 300 мл, примерно от 300 мл до 350 мл, примерно от 350 мл до 400 мл, примерно от 400 мл до 450 мл, примерно от 450 мл до 500 мл, примерно от 500 мл до 750 мл, или примерно от 750 мл до 1000 мл.

56. Способ по любому из пп.41-55, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в жидкой лекарственной форме, твердой лекарственной форме, ингаляционной лекарственной форме, интраназальной лекарственной форме, липосомальной композиции, лекарственной форме, содержащей наночастицы, лекарственной форме, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной форме, или любых их комбинациях.

57. Способ по любому из пп.41-56, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в течение примерно 1 недели, примерно

2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель, или примерно 12 недель.

58. Способ по любому из пп.41-57, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят один раз в день, два раза в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели.

59. Способ по любому из пп.41-58, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят внутривенно, интраперитонеально или посредством внутриопухолевого введения.

60. Способ по любому из пп.41-59, в котором модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию вводят в виде болюсной инъекции или медленной инфузии.

61. Способ по любому из пп.41-60, в котором введение модифицированного онколитического вируса или фармацевтической композиции приводит к возникновению первого пика вирусной нагрузки примерно через 1 час - примерно через 3 дня и второго пика вирусной нагрузки примерно через 3 дня - примерно через 10 дней после введения первой дозы.

62. Способ по любому из пп.41-61, включающий применение дополнительной терапии, которую проводят в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель или примерно 12 недель.

63. Способ по п.62, в котором дополнительную терапию проводят один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели.

64. Способ по п.62 или п.63, в котором дополнительную терапию применяют в жидкой лекарственной форме, твердой лекарственной форме, ингаляционной лекарственной форме, интраназальной лекарственной форме, липосомальной композиции, лекарственной форме, содержащей наночастицы, лекарственной форме, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной форме или любых их комбинациях.

65. Способ по любому из пп.62-64, в котором дополнительную терапию проводят в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель, примерно 8 недель, примерно 9 недель, примерно 10 недель или примерно 12 недель.

66. Способ по любому из пп.62-65, в котором дополнительную терапию проводят один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели.

67. Способ по любому из пп.62-66, в котором дополнительную терапию применяют в жидкой лекарственной форме, твердой лекарственной форме, ингаляционной

лекарственной форме, интраназальной лекарственной форме, липосомальной композиции, лекарственной форме, содержащей наночастицы, лекарственной форме, содержащей микрочастицы, полимерной лекарственной форме, или любых их комбинациях.

68. Способ по любому из пп.62-67, в котором дополнительную терапию проводят перорально, внутривенно, путем внутриопухолевой инъекции или путем облучения.

69. Способ по любому из пп.41-68, в котором субъектом является человек.

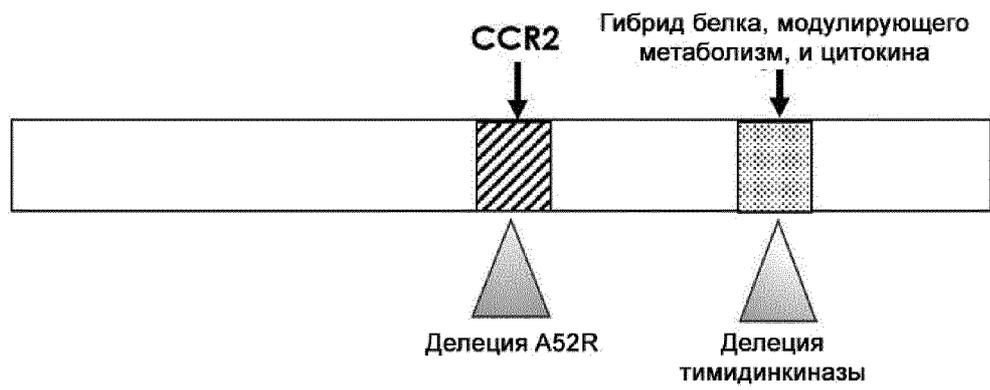
70. Способ по любому из пп.41-69, в котором до введения модифицированного онколитического вируса или фармацевтической композиции у субъекта был диагностирован рак.

71. Способ по любому из пп.41-70, в котором до введения модифицированного онколитического вируса или фармацевтической композиции, или дополнительной терапии у субъекта был диагностирован рак.

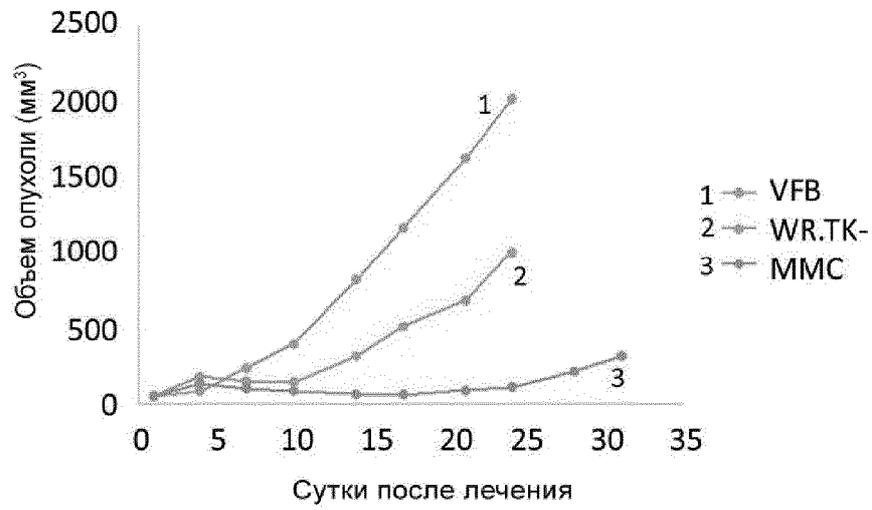
72. Способ по любому из пп.62-71, в котором дополнительная терапия включает химиотерапию, облучение, онколитическую вирусную терапию дополнительным вирусом, лечение иммуномодулирующими белками, терапию CAR-T-клетками, противораковым агентом, или любые их комбинации.

73. Способ по п.72, в котором дополнительная терапия включает введение иммуномодулирующего агента, содержащего антитело против CD33 и его вариабельную область, антитело против CD11b и его вариабельную область, ингибитор COX2, цитокин, хемокин, антитело против CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, или агонист TLR.

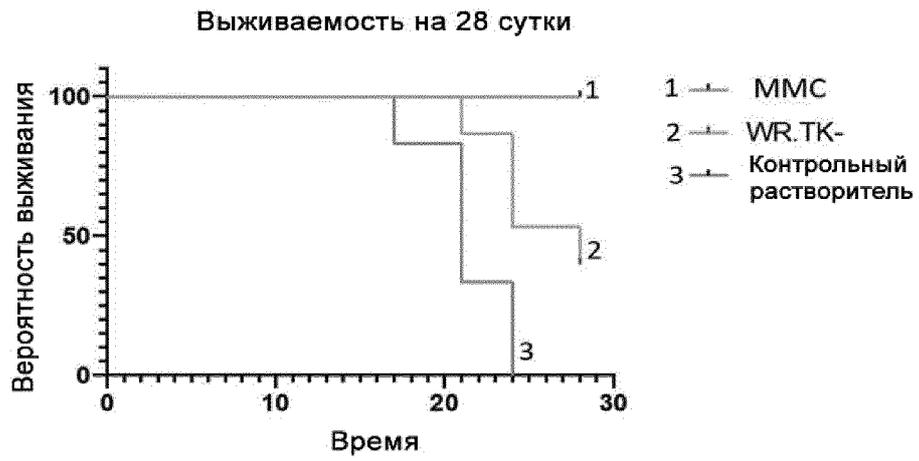
74. Способ по п.73, включающий применение дополнительной терапии, которая включает введение противоракового агента, где противораковым агентом является химиотерапевтический агент.



Фиг. 1



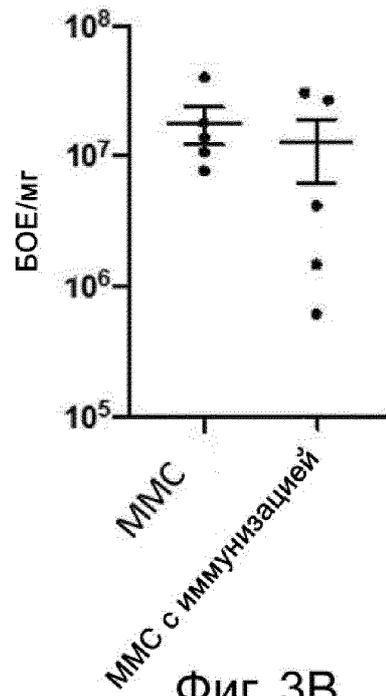
Фиг. 2А



Фиг. 2В

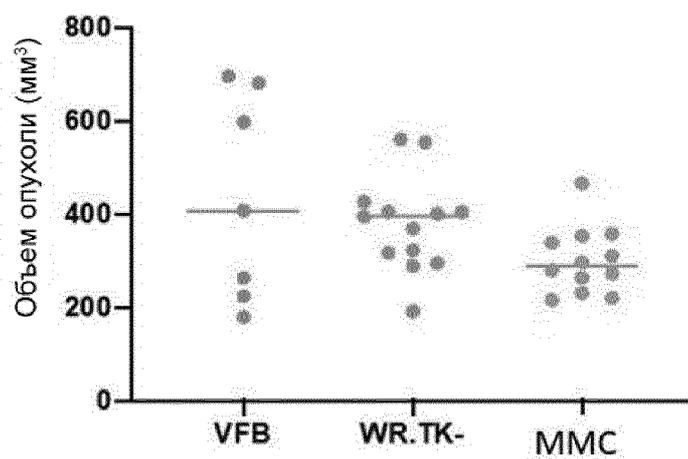


Фиг. 3А

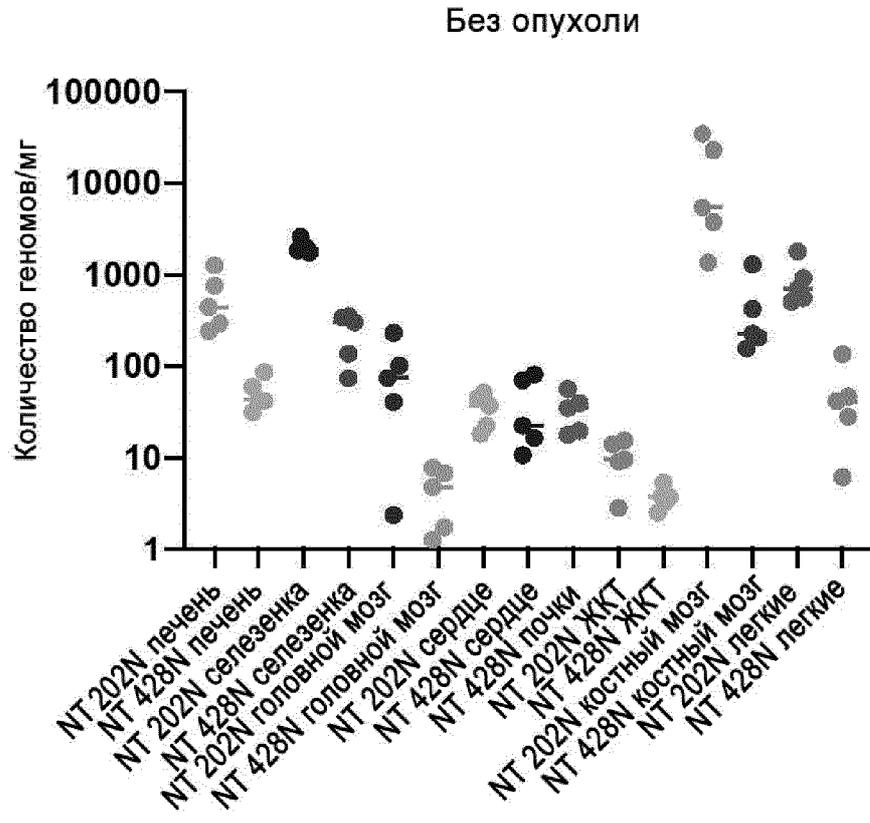


Фиг. 3В

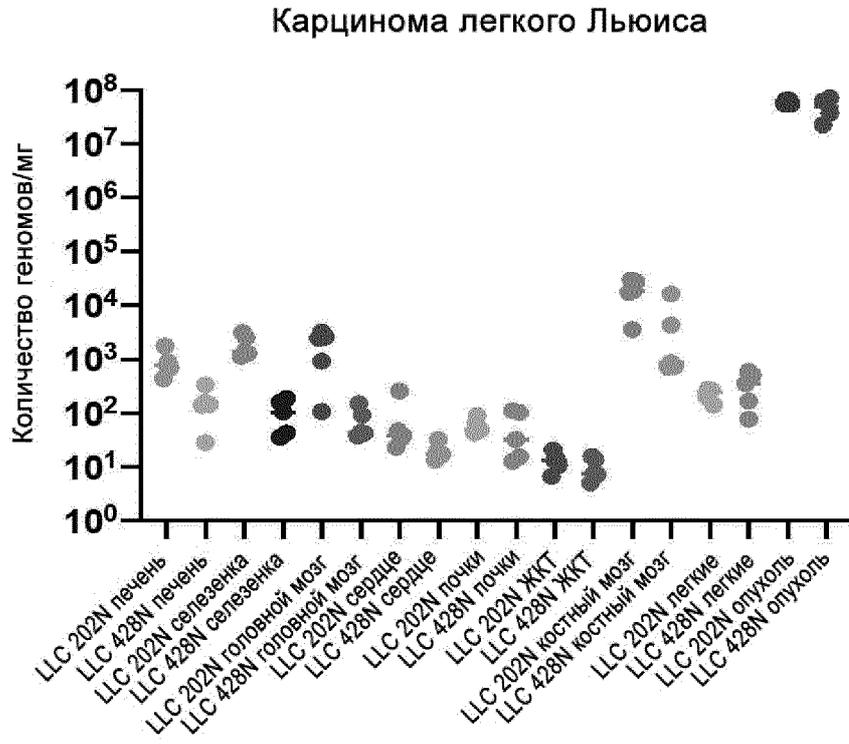
RENCA (14 сутки после лечения)



Фиг. 4



Фиг. 5А



Фиг. 5В