



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2010115220/15, 16.10.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.10.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
18.10.2007 US 60/960,893(43) Дата публикации заявки: **27.11.2011** Бюл. № 33(45) Опубликовано: **27.11.2013** Бюл. № 33(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **US 2007196346 A1, 23.08.2007. RU**
94038046, 10.11.1997. US 2004013649 A1,
22.01.2004. WO 9504548 A1, 16.02.1995.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **18.05.2010**(86) Заявка РСТ:
US 2008/080229 (16.10.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/052328 (23.04.2009)

Адрес для переписки:

**191036, Санкт-Петербург, а/я 24,
"НЕВИНПАТ", пат.пов. А.В.Поликарпову**

(72) Автор(ы):

**ДЕЛЬКЭР Ален (US),
ЛАУС Райнер (US),
МЭНДЛ Стефани (US),
РАУНТРИ Райан БЛЭР (US),
ЛЕГРАНД Фатема (US)**

(73) Патентообладатель(и):

Бавэриан Нордик Инк. (US)**(54) ПРИМЕНЕНИЕ MVA (МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ВИРУС КОРОВЬЕЙ ОСПЫ АНКАРА)
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПРОСТАТЫ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к композициям, наборам, способам профилактики и терапии рака с использованием рекомбинантных вирусов MVA (модифицированный вирус коровьей оспы Анкара), кодирующих антигены, ассоциированные с опухолью: PSA (простато-специфический антиген) и PAP (простатическая

кислая фосфатаза). Данные рекомбинантные вирусы MVA способны индуцировать В- и Т-клеточные ответы. Заявленные рекомбинантные модифицированные вирусы эффективны в профилактике и терапии рака. Также рекомбинантные вирусы MVA можно применять в комбинации с таксаном. 5 н. и 18 з.п. ф-лы, 27 ил., 6 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010115220/15, 16.10.2008**

(24) Effective date for property rights:
16.10.2008

Priority:

(30) Convention priority:
18.10.2007 US 60/960,893

(43) Application published: **27.11.2011 Bull. 33**

(45) Date of publication: **27.11.2013 Bull. 33**

(85) Commencement of national phase: **18.05.2010**

(86) PCT application:
US 2008/080229 (16.10.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/052328 (23.04.2009)

Mail address:

**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",
pat.pov. A.V.Polikarpovu**

(72) Inventor(s):

**DEL'KEhR Alen (US),
LAUS Rajner (US),
MEhNDL Stefani (US),
RAUNTRI Rajan BLEhR (US),
LEGRAND Fatema (US)**

(73) Proprietor(s):

Baveharian Nordik Ink. (US)

(54) USING MVA (MODIFIED VACCINIA ANKARA) FOR TREATING PROSTATE CANCER

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to compositions, kits, method of preventing and treating cancer using tumour-associated recombinant MVA (modified vaccinia Ankara) viruses coding the antigens: PSA (prostate specific antigen) and PAP

(prostatic acid phosphatase). The given recombinant MVA viruses are able to induce B- and T-cell responses. The recombinant MVA viruses may be also used in a combination with taxane.

EFFECT: recombinant modified viruses are effective in preventing and treating cancer.

23 cl, 27 dwg, 6 ex

R U 2 4 9 9 6 0 6 C 2

R U 2 4 9 9 6 0 6 C 2

Данное изобретение относится к профилактике и лечению раковых заболеваний, конкретно рака простаты, с использованием вирусов MVA, кодирующих антигены, ассоциированные с опухолью, конкретно простато-специфический антиген (PSA) и простатическую кислую фосфатазу (PAP).

5 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Модифицированный вирус коровьей оспы Анкара (MVA) является родственным вирусу коровьей оспы, члену рода Orthopoxvirus в семействе Poxviridae. MVA генерировали 516 последовательными пассажами вируса коровьей оспы (CVA) штамма Анкара на фибробластах куриного эмбриона (для обзора смотрите Mayr, A., et al. *Infection* 3:6-14 (1975)). В результате этих долговременных пассажей геном образующегося вируса MVA имел делеции примерно 31 т.п.о. его геномной последовательности и, следовательно, был описан как имеющий репликацию, в значительной степени органиченную клетками-хозяевами - клетками птиц (Meyer, H. et al., *J. Gen. Virol.* 72:1031-1038 (1991)). В целом ряде животных моделей было показано, что образующийся MVA был в значительной степени авирулентным (Meyr, A. & Danner, K., *Dev. Biol. Stand.* 41:225-34 (1978)). Кроме того, это штамм MVA протестировали в клинических испытаниях в качестве вакцины для иммунизации против человеческой натуральной оспы (Mayr et al., *Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org.* B 167:375-390 (1987); Stickl et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99:2386-2392 (1974)). Эти исследования включали свыше 120000 человек, включая пациентов, подверженных высокому риску, и доказали, что по сравнению с вакцинами на основе вируса коровьей оспы, MVA имел пониженную вирулентность или инфективность при индукции хорошего специфического иммунного ответа. В следующие десятилетия MVA преобразовали при помощи генной инженерии для применения в качестве вирусного вектора для экспрессии рекомбинантных генов или в качестве рекомбинантной вакцины (Sutter, G. et al., *Vaccine* 12:1032-40 (1994)).

30 Даже несмотря на то, что Mayr et al. продемонстрировали на протяжении 1970 гг., что MVA является высокоаттенуированным и авирулентным у человека и млекопитающих, некоторые исследователи сообщали, что MVA не является полностью аттенуированным в линиях клеток млекопитающих и человека, так как в этих клетках может происходить остаточная репликация (Blanchard et al., *J Gen Virol* 79:1159-1167 (1998); Carroll & Moss, *Virology* 238:198-211 (1997); Altenberger, патент США №5185146; Ambrosini et al., *J Neurosci Res* 55(5):569 (1999)). Предполагается, что результаты, доложенные в этих публикациях, были получены с разными известными штаммами MVA, так как использованные вирусы существенно отличались по их свойствам, особенно по их характеру роста в разных линиях клеток. Такая остаточная репликация является нежелательной по разным причинам, включая соображения безопасности в связи с применением у людей.

45 Были описаны штаммы MVA, имеющие улучшенные профили безопасности, для разработки более безопасных продуктов, таких как вакцины или лекарственные средства. Смотрите патенты США №6761893 и 6193752. Такие штаммы способны к репродуктивной репликации в клетках и линиях клеток, не являющихся человеческими, особенно в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), но не способны к репродуктивной репликации в определенных линиях клеток человека, которые, как известно, обеспечивают репликацию известных штаммов вируса коровьей оспы. Эти линии клеток включают линию клеток человеческих кератиноцитов, HaCat (Boukamp et al. *J Cell Biol* 106(3):761-71 (1988)), линию клеток человеческого рака шейки матки, HeLa (ATCC No. CCL-2), линию клеток почки человеческого эмбриона, 293

(ЕСАСС No. 85120602) и линию клеток человеческой остеосаркомы кости, 143В (ЕСАСС No. 91112502). Такие вирусные штаммы также не способны к репродуктивной репликации *in vivo*, например, в определенных мышечных штаммах, таких как трансгенная мышечная модель AGR 129, которая имеет сильно ослабленный иммунитет и является высокочувствительной к реплицирующемуся вирусу. Смотрите патент США №6761893. Был описан один такой штамм MVA и его производные и рекомбинанты, именуемые "MVA-BN®". Смотрите патенты США №6761893 и 6193752.

Каждый из MVA и MVA-BN® был сконструирован для применения в качестве вирусного вектора для экспрессии рекомбинантных генов или в качестве рекомбинантной вакцины. Смотрите, например, Sutter, G. et al., *Vaccine* 12:1032-40 (1994), патенты США №6761893 и 6193752.

Заболевания, связанные с раком, являются ведущей причиной смертности и заболеваемости во всем мире. Например, оценивается, что только в США один из шести мужчин будет страдать от рака простаты. Кроме того, аутопсические исследования показывают, что значительная доля мужского населения имеет данное заболевание, хотя и на его самых ранних, незлокачественных стадиях, уже к возрасту 30 лет. Смотрите, например, Taichman et al., *JCI* 117(9):2351-2361 (2007); Webster et al., *J. Clin. Oncol.* 23:8262-8269 (2005). Недавние подходы для иммунотерапии рака включали вакцинацию антигенами, ассоциированными с опухолью. В определенных случаях такие подходы включали применение системы доставки для стимуляции иммунных ответов хозяина на антигены, ассоциированные с опухолью. Такие системы доставки включали рекомбинантные вирусные векторы, а также клеточные терапии. Смотрите, например, Harrop et al., *Front. Biosci.* 11:804-817 (2006); Arlen et al., *Semin. Oncol.* 32:549-555 (2005); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (suppl. 2): 14567-14571 (2004). MVA использовали в качестве носителя вакцины для онкофетального антигена 5T4 в клинических испытаниях у пациентов с метастатическим раком прямой и ободочной кишки, метастатическим раком почки и раком простаты, невосприимчивым к гормонам. Amato, RJ., *Expert Opin. Biol. Ther.* 7(9):1463-1469 (2007).

К числу известных антигенов, ассоциированных с опухолью, относятся простато-специфический антиген (PSA) и простатическая кислая фосфатаза (PAP). Смотрите, например, Taichman et al., *JCI* 117(9):2351-2361 (2007); Webster et al., *J. Clin. Oncol.* 23: 8262-8269 (2005). PSA продуцируется простатой и обнаруживается в повышенном количестве в крови мужчин, которые имеют рак простаты, доброкачественную гиперплазию простаты, или инфекцию, или воспаление простаты. PSA был идентифицирован как мишень для подходов клеточно-опосредованной иммунотерапии для лечения рака. Смотрите, например, McNeel, D.G., *Curr. Opin. Urol.* 17:175-181 (2007); Nelson W.G., *Curr. Opin. Urol.* 17:157-167 (2007). PAP является ферментом, измеряемым в крови, уровни которого могут быть повышенными у пациентов с раком простаты, который распространился или метастазировал где-либо. PAP не увеличивается, если опухоль не распространилась вовне анатомической капсулы простаты, либо путем локализованной инвазии, либо удаленного метастаза. Следовательно, этот простатический опухолевый антиген исследуется как антиген-мишень в нескольких испытаниях человеческой вакцины, причем некоторые из них имеют доказательство клинической пользы. Смотрите, например, McNeel, D.G., *Curr. Opin. Urol.* 17:175-181 (2007); Waechterle-Men et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 66:811-821 (2006); Machlenkin et al. *Cancer Immunol Immunother.* 56(2):217-226 (2007).

Вакцины, содержащие PAP, генерировали с использованием рекомбинантного

вируса коровьей оспы, очищенной PAP, ДНК вакцин и дендритных клеток, нагруженных антигенами. Valone et al., *The Cancer Journal* 7:

Suppl 2:S53-61 (2001); Fong et al., *J. Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):7150-6; Fong et al., *J. Immunol.* 159(7):3,113-7 (1997); Johnson et al., *Vaccine* 24(3):293-303 (2006); Johnson et al., *Cancer Immunol Immunother.* 56(6):885-95 (2007). В одном исследовании, когда дендритные клетки, импульсно меченые PAP-GM-CSF, инъецировали крысам, не было обнаружено антител к PAP. (Valone et al. at S55). В другом исследовании введение рекомбинантного вируса коровьей оспы, содержащего гены, кодирующие крысиную PAP или человеческую PAP, не генерировало измеримый антительный ответ к крысиной или человеческой PAP (Fong et al. (1997) at 3116-7). В другом исследовании PAP-специфичный IgG мог быть определен в сыворотке животных, иммунизированных белком hPAP, а также у животных, которые получили вакцинацию вирусом коровьей оспы, кодирующим человеческую PAP, с последующим введением белка hPAP в качестве бустер-иммунизации, но не у животных, дважды иммунизированных вирусом коровьей оспы, кодирующим человеческую PAP (Johnson et al. (2007) at 890).

Активная иммунотерапия рака основана на индукции иммунного ответа против опухолевых клеток у раковых пациентов. Индукция как гуморальных, так и клеточных компонентов адаптивного иммунитета против широкого спектра антигенов, ассоциированных с опухолью (ТАА), и сопутствующая активация компонентов врожденного иммунитета являются существенными для максимальной эффективности активного иммунотерапевтического продукта. Конкретно считается, что адаптивный иммунитет Типа 1 или Th1, характеризующийся индукцией антигенспецифичных IFN γ -продуцирующих цитотоксичных Т-клеток (Т-клетки CD8), является важным для противораковой иммунотерапии.

Несмотря на недавние успехи в лечении рака, рак простаты остается второй ведущей причиной смерти среди раковых пациентов в Америке. Таким образом, необходимы терапевтические подходы, которые могли бы лучше ослабить данное заболевание путем нацеливания на многие аспекты роста опухоли и образования метастазов.

Таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел, использовали в качестве химиотерапевтических агентов для раковых пациентов. Смотрите, например, Tannock et al., *N. Engl. J. Med.* 351:1502-1512 (2004). Химиотерапию таксанами объединяли с разными обработками противоопухолевыми вакцинами, что приводило к разнообразным результатам. Смотрите Chu et al., *J. Immunotherapy* 29:367-380 (2006); Machiels et al., *Cancer Res.* 61:3689-3697 (2001); Prell et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 55:1285-1293 (2006); Arlen et al., *Clinical Breast Cancer* 7:176-179 (2006); и Arlen et al., *Clinical Cancer Res.* 12:1260-1269 (2006). Обзор комбинации противораковых вакцин с химиотерапиями сделан у Chong et al., *Expert Opin. Pharmacother.* 6:1-8 (2005); Emens et al., *Endocrine-Related Cancer* 12:1-17 (2005); и McNeel, D.G., *Curr. Opin. Urol.* 17:175-181 (2007).

Основываясь на вышеуказанном, в данной области существует потребность в реагентах и способах для противораковой терапии.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение охватывает способы, реагенты и наборы для профилактики рака и для лечения раковых пациентов как с первичными опухолями, так и с метастазами рака.

Данное изобретение охватывает способ лечения ракового пациента-человека,

включающий введение данному пациенту рекомбинантного MVA, кодирующего полипептид, содержащий человеческий простато-специфический антиген (PSA), и полипептид, содержащий антиген человеческой простатической кислой фосфатазы (PAP). В одном воплощении MVA представляет собой MVA-BN. В одном воплощении вирус MVA содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2. В одном воплощении антиген PSA и антиген PAP вставлены в межгенную область 014L/015L MVA. В определенных воплощениях раковое заболевание представляет собой рак простаты или метастаз рака простаты.

В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят перед введением дозы таксана, уничтожающей опухолевые клетки. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят в то же самое время, что и дозу таксана, уничтожающую опухолевые клетки. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят после дозы таксана, уничтожающей -опухолевые клетки. В предпочтительных воплощениях таксаном является доцетаксел или паклитаксел.

Данное изобретение охватывает наборы для профилактики рака простаты, содержащие рекомбинантный MVA, кодирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PSA, и полипептид, содержащий человеческий антиген PAP, и инструкции по введению рекомбинантного MVA до определения рака простаты.

Данное изобретение охватывает наборы для лечения рака простаты, содержащие рекомбинантный MVA, кодирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PSA, и полипептид, содержащий человеческий антиген PAP, и инструкции по введению рекомбинантного MVA пациенту с раком простаты.

Данное изобретение охватывает наборы для лечения ракового пациента, содержащие рекомбинантный MVA, кодирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PSA, и полипептид, содержащий человеческий антиген PAP, и инструкции по введению рекомбинантного MVA до, в то же самое время или после лечения дозой таксана, уничтожающей опухолевые клетки.

Данное изобретение охватывает рекомбинантный вирус MVA, экспрессирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PAP. В одном воплощении данный вирус MVA содержит SEQ ID NO:2. В одном воплощении MVA представляет собой MVA-BN.

Данное изобретение охватывает рекомбинантный вирус MVA, экспрессирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PSA, и полипептид, содержащий человеческий антиген PAP. В одном воплощении данный вирус MVA содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1. В одном воплощении данный вирус MVA содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2. В одном воплощении MVA представляет собой MVA-BN.

Данное изобретение охватывает иммуногенную композицию, содержащую рекомбинантный вирус MVA, кодирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PAP, где данная иммуногенная композиция индуцирует В-клеточные и Т-клеточные иммунные ответы против PAP при введении хозяину.

Данное изобретение охватывает иммуногенную композицию, содержащую рекомбинантный вирус MVA, кодирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PAP, где данная иммуногенная композиция индуцирует антитела против PAP при введении хозяину. В одном воплощении данный вирус MVA содержит SEQ ID NO: 2.

Данное изобретение охватывает иммуногенную композицию, содержащую рекомбинантный вирус MVA, кодирующий полипептид, содержащий человеческий

антиген PSA, и полипептид, содержащий человеческий антиген PAP, где данная иммуногенная композиция индуцирует В-клеточные и Т-клеточные иммунные ответы против PSA и PAP при введении хозяину.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

5 Фиг.1А-Б. Схематические карты генома MVA-BN®. На 1А показаны положения шести сайтов делеции в геноме MVA-BN®: заштрихованные отрезки и буквы (от А до О) идентифицируют фрагменты расщепления рестрикционным ферментом HindIII, а положения и размеры последовательностей CVA, которые отсутствуют в MVA-BN®,
10 показаны на стрелках. На 1Б показаны рестрикционные фрагменты HindIII (буквы от А до О) и сайт IGR 014L/015L, используемый для генерации MVA-BN-PRO.

Фиг.2. Схематическое представление вируса MVA-BN-PRO. Карта генома MVA-BN® (карта рестрикции HindIII, указано буквами А-О), описывающая рекомбинантную вставку, клонированную в межгенной области 014L/015L: гены PSA и PAP, каждый из
15 которых находится под контролем промотора АТ1 вируса коровьей оспы (АТ1).

Фиг.3А-Б. Определение PAP (А) и PSA (Б) в супернатанте культур клеток СТ26, инкубируемых с MVA-BN-PRO. Клетки СТ26 в плотности 6×10^5 клеток на лунку (темные квадраты и треугольники) или клетки 6Е4 (серые квадраты) инфицировали
20 либо MVA-BN-PRO (квадраты), либо MVA-BN® (треугольники) при указанной множественности заражения (МОИ). Через 24 часа супернатанты клеток собирали и уровни белков PAP и PSA измеряли ферментативным анализом PAP и ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) PSA, соответственно.

Фиг.4А-Б. Антительные ответы против PSA (А) и против PAP (Б) у мышей, обработанных MVA-BN-PRO. Животных иммунизировали три раза (сутки 1, 15 и 29)
25 либо MVA-BN-PRO (белые квадраты), либо MVA-BN® (черные квадраты). Пробы крови брали до обработки, в сутки 14, 28 и 42. Титры представляют собой обратную величину последнего разведения с ОП (оптическая плотность) по меньшей мере в 2
30 раза большей, чем фон (сыворотка в том же самом разведении от животных, обработанных TBS). Титры, показанные как ноль, были отрицательными при наименьшем протестированном разведении сыворотки (1:50).

Фиг.5А-Б. Т-клеточные ответы против PSA и против PAP у мышей, обработанных MVA-BN-PRO. Спленоциты от животных, иммунизированных MVA-BN-PRO (А) и контрольных животных, (иммунизированных) TBS (Б), инкубировали с
35 последовательностями OPL из PAP (серые квадраты), PSA (белые квадраты) или HER2 (черные квадраты) в указанных концентрациях. Пятна, указывающие на IFN- γ -продуцирующие Т-клетки, подсчитывали с использованием ImmunoSpot Analyzer.
40 Средние значения от лунок в тройной повторности и стандартное отклонение представлены для каждой протестированной концентрации OPL.

Фиг.6А-Б. Т-клеточный вклад CD4 и CD8 в MVA-BN-PRO-опосредованные Т-клеточные ответы. Животных иммунизировали MVA-BN-PRO четыре раза (сутки 1, 15, 29 и 49), и спленоциты собирали через шесть суток после последней обработки,
45 спленоциты, обедненные CD8 (А), и спленоциты, обедненные CD4 (Б), инкубировали с последовательностями OPL из PAP (серые квадраты), PSA (белые квадраты) или HER2 (черные квадраты) в указанных концентрациях. Данный анализ проводили, как описано для Фиг.5.

Фиг.7А-Е. Профилактическое предупреждение роста опухоли у мышей, обработанных MVA-BN-PRO. Животных обрабатывали 3 раза с 3-х недельными интервалами указанными TCID50 (средняя цитопатогенная доза) вируса, разведенного
50 в TBS. Через шесть недель после третьей обработки животных внутривожно

заражали 1×10^5 опухолевых клеток E5, экспрессирующих PSA. Рост опухоли измеряли дважды в неделю, используя циркуль. Объем опухоли рассчитывали как: $(L \times W^2)/2$ (Длина \times Ширину²)/2).

5 7А-7Д: рост опухоли у отдельных мышей представлен для каждой экспериментальной группы. 7Е: средние размеры опухолей и стандартное отклонение представляли для всех экспериментальных групп.

10 Фиг.8. Предупреждение роста опухоли у мышей, обработанных MVA-BN-PRO. Сравнение измерений в сутки 29 в двух отдельных экспериментах. Животных обрабатывали три раза с 2-недельными интервалами (серые символы) 2×10^6 TCID₅₀ указанного вируса, разведенного в TBS. Через две недели после последней обработки животных внутрикожно заражали 1×10^5 опухолевых клеток E5, экспрессирующих PSA.

15 Рост опухоли измеряли дважды в неделю, используя циркуль. Объем опухоли рассчитывали как: $(L \times W^2)/2$. Точки показывают объемы опухолей для каждого животного в сутки 29 после имплантации опухоли. Для сравнения данные от соответствующих групп отдельного эксперимента, описанного на Фиг.7, представлены черными символами. Оба представленных здесь эксперимента
20 проводили при аналогичных условиях за исключением длительности интервалов обработки (3-недельный интервал по сравнению с 2-недельным) и времени имплантации опухолевых клеток (шесть недель по сравнению с двумя неделями после третьей обработки).

25 Фиг.9А-Е. Терапевтическое подавление роста опухоли у мышей, обработанных MVA-BN-PRO. Мышей BALB/c (10 животных в каждой группе) заражали клетками E6 (1×10^5 клеток, инъецированных внутрикожно) в сутки 1 и обрабатывали подкожно в сутки 1, 8 и 15 одним из TBS (Д), MVA-BN® (5×10^6 или 5×10^7 TCID₅₀; А и Б) или MVA-BN-PRO (5×10^6 или 5×10^7 TCID₅₀; В и Г). Мышей
30 умерщвляли в сутки 22. Панели А-Д показывают размеры опухолей отдельных мышей. Средние размеры опухолей и стандартные отклонения для каждой группы показаны на панели Е. Рост опухоли измеряли дважды в неделю, используя циркуль. Объем опухоли рассчитывали как: $(L \times W^2)/2$. Указанные погрешности представляют
35 стандартные отклонения (SD).

40 Фиг.10. Подавление PAP-позитивного опухолевого роста у мышей, обработанных MVA-BN-PRO. Мышей BALB/c (10 животных в каждой группе) заражали СТ26-PAP (5×10^5 клеток, инъецированных внутривенно) в сутки 1 и обрабатывали внутрибрюшинно в сутки 4 одним из TBS, MVA-BN (5×10^7 TCID₅₀)
или MVA-BN-PRO (2×10^6 и 5×10^7 TCID₅₀). Мышей умерщвляли в сутки 14 и взвешивали их легкие. Точки на графике представляют массу легкого отдельных мышей. Горизонтальные отрезки показывают среднюю массу легкого для каждой
45 группы.

50 Фиг.11. Ответы антител против PSA и против PAP, индуцированные у мышей BALB/c или C57BL/6. Самцов мышей BALB/c и C57BL/6 (5 животных в каждой группе) иммунизировали в сутки 1, 15 и 29 5×10^7 TCID₅₀ MVA-BN-PRO. Пробы крови брали в сутки 42, и последовательные разведения объединенных сывороток анализировали на присутствие IgG против PSA или против PAP посредством ELISA. Титры рассчитывали как обратное значение последнего разведения с ОП по меньшей мере в 2 раза большей, чем фон (определенный как сыворотка в том же самом разведении от животных, обработанных TBS). Точки данных для сыворотки с титрами

ниже наименьшего протестированного разведения (<125) были произвольно помещены на оси X, расположенной на одно разведение ниже первого разведения анализа (62,5) для графических целей.

5 Фиг.12. Ответы Т-клеток у пациентов, обработанных MVA-BN-PRO. PBMC (однойядерные клетки периферической крови) из крови пациента J-D-1001 отбирали до
обработки (базовый уровень) или после обработки MVA-BN-PRO (TC3). Клетки
инкубировали в течение 40 часов с одним из белка PSA, пептидной библиотеки,
10 перекрывающей PSA (OPL), белка PAP, PAP OPL, пулами пептидов ГКГ (главный
комплекс гистосовместимости) Класса I и Класса II, происходящими из антигенов,
ассоциированных с опухолью (ТАА), или MVA-BN в концентрации, указанной на
графике. Активацию Т-клеток определяли ELISpot (иммуноферментный спот-анализ),
измеряя секретируемый IFN- γ . Для каждого условия стимуляции результаты выражены
15 как среднее число клеток, образующих пятна IFN- γ (SFC), на 2×10^5 PBMC.
Значения SFC получали из среднего значения (сигнала) от черырёх лунок за вычетом
фона.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 Рекомбинантный MVA, экспрессирующий человеческие антигены PSA и PAP (MVA-BN-PRO), тестировали в ряде анализов *in vitro* и *in vivo*. Экспрессию обоих простато-специфичных антигенов, кодируемых MVA-BN-PRO (PSA и PAP), в эукариотических клетках, инкубируемых с MVA-BN-PRO, оценивали с использованием набора для определения PSA и функционального анализа для фосфатазной активности,
25 соответственно. Анализы ELISA и ELISpot использовали для мониторинга индукции антител против PSA и против PAP и Т-клеточных иммунных ответов у мышей, обработанных MVA-BN-PRO. Противоопухолевую активность MVA-BN-PRO оценивали в PSA-моделях опухоли как в профилактической постановке, так и в
терапевтической постановке.

30 Эти исследования продемонстрировали, что (1) захват MVA-BN-PRO клетками *in vitro* приводит к экспрессии и PAP, и PSA в сходных количествах; (2) обработка мышей MVA-BN-PRO имеет результатом гуморальные анти-PSA и анти-PAP и Th1 клеточные иммунные ответы, (3) обработка мышей MVA-BN-PRO ингибирует
35 рост PSA (+) опухолей как в профилактических, так и в терапевтических постановках, (4) обработка мышей MVA-BN-PRO ингибирует рост PAP (+) опухолей в терапевтической постановке, (5) у человека обработка MVA-BN-PRO увеличивала уровни как анти-PSA Т-клеток, так и анти-PAP Т-клеток, и (6) обработка MVA-BN-PRO у человека приводила к распространению Т-клеточных ответов на другие
40 опухолевые антигены. Таким образом, MVA-BN-PRO активирует иммунную систему путем запуска антигенспецифичных гуморальных и клеточных ответов ТМ-типа, что приводит к значительной терапевтической активности *in vivo* против опухолей, экспрессирующих PSA и PAP. Следовательно, MVA-BN-PRO является
привлекательной вакциной-кандидатом для иммунотерапии рака простаты у людей.

45 MVA-BN-PRO является мощным иммуногеном, способным индуцировать защитный противоопухолевый иммунитет, который предотвращает рост опухоли в профилактической постановке и который также подавляет рост сформировавшихся опухолей. Профилактические и терапевтические противоопухолевые активности MVA-BN-PRO были опосредованы анти-PSA-специфичными адаптивными иммунными
50 ответами. Однако адаптивные иммунные ответы были индуцированы против обоих простато-специфичных антигенов, PSA и PAP, кодируемых MVA-BN-PRO. Сопутствующая активация адаптивных ответов против многих опухолевых антигенов

позволяет MVA-BN-PRO более эффективно бороться с опухолями и увеличивает потенциал успешного лечения раковых пациентов.

В одном воплощении данное изобретение охватывает применение рекомбинантных вирусов MVA для терапии рака простаты. Рекомбинантные MVA генерируют вставкой гетерологичных последовательностей в вирус MVA. Примерами штаммов вируса MVA, которые являются полезными в воплощении настоящего изобретения на практике, и которые были депонированы согласно требованиям Будапештского соглашения, являются штаммы MVA 572, депонированные в Европейской коллекции культур клеток животных (ECACC), Salisbury (Великобритания) с депозитарным номером ECACC 9401270727 января 1994, и MVA 575, депонированный с номером ECACC 001207077 декабря 2000. MVA-BN®, депонированный 30 августа 2000 в Европейской коллекции культур клеток (ECACC) под номером V00083008 и его производные, являются дополнительными показательными штаммами.

Несмотря на то, что MVA-BN® является предпочтительным из-за его большей безопасности (меньшей компетентности по репликации), все MVA являются подходящими для этого изобретения. Согласно одному воплощению настоящего изобретения штаммом MVA является MVA-BN® и его производные. Смотрите PCT/EP01/13628, который, тем самым, является включенным посредством ссылки.

В определенных воплощениях рекомбинантный MVA экспрессирует антиген, ассоциированный с опухолью. В одном воплощении антигеном, ассоциированным с опухолью, является PSA. В одном воплощении антигеном, ассоциированным с опухолью, является PAP. В предпочтительном воплощении MVA экспрессирует два антигена, ассоциированных с опухолью, предпочтительно антиген PSA и PAP. В одном воплощении два данных антигена, ассоциированных с опухолью, содержат нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2. В одном воплощении два данных антигена, ассоциированных с опухолью, экспрессируются из кассеты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:3.

В других воплощениях антиген, ассоциированный с опухолью, модифицирован таким образом, чтобы он включал один или более чужеродных эпитопов T_H. Как здесь описано, такие противораковые иммунотерапевтические агенты являются полезными для профилактики и/или лечения рака, включая метастазы рака. Данное изобретение обеспечивает применение таких агентов в схемах первичной/бустерной вакцинации людей и других млекопитающих с иммунизацией, включая пациентов с ослабленным иммунитетом; и в индукции как гуморальных, так и клеточных иммунных ответов, такой как индукция Th1 иммунного ответа в присутствующем Th2 окружении.

Термин «полипептид» относится к полимеру из двух или более аминокислот, связанных друг с другом пептидными или модифицированными пептидными связями. Данные аминокислоты могут быть встречающимися в природе, а также не встречающимися в природе или химическим аналогом встречающейся в природе аминокислоты. Данный термин также относится к белкам, т.е. к функциональным биомолекулам, содержащим по меньшей мере один полипептид; если они содержат по меньшей мере два полипептида, они могут образовывать комплексы, быть ковалентно связанными или могут быть нековалентно связанными. Полипептид(ы) в белке могут быть гликозилированными и/или липидированными, и/или могут содержать простетические группы.

Термин «неспособный к репродуктивной репликации» в линиях человеческих клеток, таких как линии клеток HaCAT (Boukamp et al. 1988, J Cell Biol 106(3): 761-71)

или HeLa, используется в настоящей заявке, как определено в WO 02/42480. Таким образом, вирус, который «не способен к репродуктивной репликации» в линии клеток, представляет собой вирус, который показывает степень амплификации меньше 1 в этой линии клеток. «Степень амплификации» вируса представляет собой отношение 5 вируса, продуцированного из инфицированной клетки (выход), к количеству, исходно используемому для инфицирования клеток в первом месте (вход). Отношение «1» между выходом и входом определяет амплификационный статус, где количество вируса, продуцированного из инфицированных клеток, является таким же, что и 10 количество, исходно используемое для инфицирования клеток. Согласно одному воплощению настоящего изобретения вирусы, которые «не способны к репродуктивной репликации» в человеческих клеточных линиях, могут иметь степень амплификации 1,0 (среднее значение) или менее, или даже 0,8 (среднее значение) или менее в любой из вышеуказанных человеческих клеточных линий HeLa, HaCat и 143B.

15 В определенных воплощениях MVA представляет собой MVA-BN®, депонированный 30 августа 2000 года в Европейской коллекции культур клеток (ECACC) под номером V00083008, и описанный в патентах США №6761893 и 6193752. Как описано в этих публикациях патентов, MVA-BN® не подвергается 20 репродуктивной репликации в линиях клеток 293, 143B, HeLa и HaCat. В частности MVA-BN® демонстрирует степень амплификации от 0,05 до 0,2 в линии клеток почки человеческого эмбриона 293. В линии клеток человеческой остеосаркомы кости 143B MVA-BN® демонстрирует степень амплификации от 0,0 до 0,6. MVA-BN® демонстрирует степень амплификации от 0,04 до 0,8 в линии клеток 25 человеческой аденокарциномы шейки матки HeLa, и от 0,02 до 0,8 в линии клеток человеческих кератиноцитов HaCat. MVA-BN® имеет степень амплификации от 0,01 до 0,06 в клетках почки африканской зеленой мартышки (CV1: ATCC No.CCL-70).

30 Степень амплификации MVA-BN® составляет более 1 в фибробластах куриных эмбрионов (CEF: первичные культуры), как описано в патентах США №6761893 и 6193752. Данный вирус можно легко размножить и амплифицировать в первичных культурах CEF со степенью более 500.

35 В определенных воплощениях рекомбинантный MVA представляется собой производное MVA-BN®. Такие «производные» включают вирусы, демонстрирующие по существу те же самые характеристики репликации, что и депонированный штамм (ECACC No. V00083008), но имеющие отличия в одной или в более чем одной частях его генома. Данные «производные» не обязательно происходят от MVA-BN®. Вирусы, 40 имеющие те же самые «характеристики репликации», что и депонированный вирус, представляют собой вирусы, которые реплицируются с такими же степенями амплификации, что и депонированный штамм, в клетках CEF и в линиях клеток HeLa, HaCat и 143B; и которые показывают аналогичные характеристики репликации *in vivo*, определенные, например, в трансгенной мышшиной модели AGR129.

45 Данное изобретение охватывает вирусы MVA, которые имеют одно или оба из следующих свойств MVA-BN:

- способность к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбриона (CEF), но отсутствие способности к репродуктивной репликации в линии 50 клеток человеческих кератиноцитов (HaCaT), линии клеток почки человеческого эмбриона (293), линии клеток человеческой остеосаркомы кости (143B) и в линии клеток человеческой аденокарциномы шейки матки (HeLa); и

- неспособность реплицироваться в мышшиной модели, которая способна продуцировать зрелые В- и Т-клетки, и, как таковая, имеет сильно ослабленный

иммунитет и является высокочувствительной к реплицирующемуся вирусу.

В определенных воплощениях MVA представляет собой рекомбинантный вирус коровьей оспы, который содержит дополнительные нуклеотидные последовательности, которые являются гетерологичными по отношению к вирусу коровьей оспы. В некоторых таких воплощениях гетерологичные последовательности кодируют эпитопы, которые индуцируют ответ иммунной системы. Таким образом, в определенных воплощениях рекомбинантный MVA используют для вакцинации против белков или агентов, содержащих данный эпитоп. В предпочтительном воплощении данный эпитоп представляет собой антиген, ассоциированный с опухолью, предпочтительно PSA или PAP. В одном воплощении антиген PSA содержит последовательность SEQ ID NO:1. В одном воплощении антиген PAP содержит последовательность SEQ ID NO:2.

В определенных воплощениях гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты вставлена в несущественную область вирусного генома. В некоторых из этих воплощений гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты вставлена в природный сайт делеции генома MVA, как описано в PCT/EP96/02926. Способы вставки гетерологичных последовательностей в геном вируса оспы известны квалифицированному специалисту в данной области. В определенных воплощениях гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты вставлена в межгенную область генома MVA, как описано в опубликованной заявке на патент США 20050244428. В одном воплощении данной межгенной областью является IGR 014L/015L.

В определенных воплощениях фармацевтические композиции содержат один или более чем один фармацевтически приемлемый и/или одобренный носитель, добавку, антибиотик, консервант, адъювант, разбавитель и/или стабилизатор. Такие добавки, например, включают, но не ограничиваются ими, воду, физиологический раствор, глицерин, этанол, увлажнители или эмульгаторы и забуферивающие pH вещества. Типичными носителями обычно являются большие, медленно метаболизируемые молекулы, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот, липидные агрегаты или тому подобное.

Для получения вакцин MVA может быть превращен в физиологически приемлемую форму. В определенных воплощениях такое получение основано на опыте в получении вакцин на основе поксвирусов, используемых для вакцинации против натуральной оспы, как описано, например, в Stickl, H. et al., Dtsch. med. Wschr. 99:2386-2392 (1974).

Типичное получение описано ниже. Очищенный вирус с титром 5×10^8 TCID₅₀/мл, приготовленный в виде препарата в 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7,4, хранят при -80°C. Для получения доз вакцины, например, 10^2 - 10^8 частиц вируса можно лиофилизировать в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) в присутствии 2% пептона и 1% человеческого альбумина в ампуле, предпочтительно в стеклянной ампуле. В качестве альтернативы, дозы вакцины можно получать путем ступенчатой сушки замораживанием вируса в препарате. В определенных воплощениях данный препарат содержит дополнительные добавки, такие как маннит, декстран, сахар, глицин, лактоза, поливинилпирролидон или другие добавки, такие как, например, без ограничения ими, антиоксиданты или инертный газ, стабилизаторы или рекомбинантные белки (например человеческий сывороточный альбумин), подходящими для введения *in vivo*. Ампулу затем запаивают, и ее можно хранить при

подходящей температуре, например, от 4°C до комнатной температуры, в течение нескольких месяцев. Однако при отсутствии такой необходимости ампулу предпочтительно хранят при температурах ниже -20°C.

В разных воплощениях, включающих вакцинацию или терапию, лиофилизат растворяют в 0,1-0,5 мл водного раствора, предпочтительно физиологического раствора или Tris буфера, и вводят либо системно, либо местно, т.е. парентеральным, подкожным, внутривенным, внутримышечным, интраназальным, внутрикожным или любым другим путем введения, известным квалифицированному практику.

Оптимизация способа введения, дозы и числа введений находится в пределах квалификации и знаний квалифицированного специалиста в данной области.

В определенных воплощениях штаммы ослабленного вируса коровьей оспы являются полезными для индукции иммунных ответов у животных с ослабленным иммунитетом, например, у обезьян (CD4<400/мкл крови), инфицированных SIV (вирус иммунодефицита обезьян), или у людей с ослабленным иммунитетом. Термин «ослабленным иммунитетом» описывает статус иммунной системы индивидуума, которая демонстрирует лишь неполные иммунные ответы или имеет пониженную эффективность защиты против инфекционных агентов.

Некоторые типичные антигены, ассоциированные с опухолью

В определенных воплощениях у субъекта продуцируется иммунный ответ против полипептидного антигена, ассоциированного с клеткой. В некоторых таких воплощениях полипептидный антиген, ассоциированный с клеткой, представляет собой антиген, ассоциированный с опухолью.

В определенных воплощениях полипептидный антиген, ассоциированный с клеткой, представляет собой антиген на основе собственного белка, отличный от антигена, ассоциированного с опухолью, который относится к другим патологическим процессам, или вирусный антиген, или антигены, происходящие из внутриклеточного паразита или бактерии. В определенных случаях такие антигены, ассоциированные с патогенами, часто являются относительно слабыми иммуногенами (например антигены из микобактерий, таких как *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium leprae*, а также из простейших, таких как *Plasmodium spp.*).

В данной области известны многочисленные антигены, ассоциированные с опухолью. Типичные антигены, ассоциированные с опухолью, включают, без ограничения ими, 5-альфа-редуктазу, альфа-фетопроtein, AM-1, APC, April, BAGE, бета-катенин, Bcl12, bcr-abl, CA-125, CASP-8/FLICE, катепсины, CD19, CD20, CD21, CD23, CD22, CD33, CD35, CD44, CD45, CD46, CD5, CD52, CD55, CD59, CDC27, CDK4, CEA, c-мус, Cox-2, DCC, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, фарнезилтрансферазу, FGF8b (фактор роста фибробластов 8b), FGF8a, FLK-1/KDR, рецептор фолиевой кислоты, G250, семейство GAGE, гастрин 17, гастрин-рилизинг гормон, GD2/GD3/GM2, GnRH, GnTV, GP1, gp100/Pmel17, gp-100-in4, gp15, gp75LPP-1, hCG, гепараназу, Her2/neu, HMTV, Hsp70 (белок теплового шока 70), hTERT, IGFR1, IL-13R (интерлейкин-13R), iNOS, Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, семейство MAGE, маммаглобин, MAP17, мелан-А/MART-1, мезотелин, MIC A/B, MT-MMP, муцин, NY-ESO-1, остеонектин, p15, P170/MDR1, p53, p97/меланотрансферрин, PAI-1, PDGF (фактор роста тромбоцитов), uPA, PRAME, пробазин, прогенипоинтин, PSA, PAP, PSM, RAGE-1, Rb, RCAS1, RCAS1, SART-1, семейство SSX, STAT3, STn, TAG-72, TGF-альфа (фактор роста опухоли-альфа), TGF-бета, тимозин-бета-15, TNF-альфа (фактор некроза опухоли-альфа), TP1, TRP-2, тирозиназу, VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), ZAG, p16INK4 и глутатион-8-трансферазу. Конкретные примеры

антигенов, ассоциированных с опухолью, при раке простаты включают, но не ограничиваются ими, PSA, простато-специфичный мембранный антиген (PSMA), PAP и антиген стволовых клеток простаты (PSCA).

Антигены PSA и PAP

5 Данное изобретение охватывает антигены PSA и PAP, которые являются полноразмерными или фрагментами PSA и PAP. Предпочтительно антигены PSA и PAP являются человеческими. В другом воплощении PSA и/или PAP является крысиным или мышинным. В предпочтительном воплощении антигены PSA и PAP
10 кодируются, соответственно, нуклеотидными последовательностями SEQIDNO:1 и SEQIDNO:2.

В одном воплощении антиген PAP является фрагментом PAP. Предпочтительные фрагменты содержат аминокислоты 181-95, 112-120, 133-152, 155-163, 173-192, 199-213, 228-242, 248-257, 299-307 или 308-322 человеческого PAP. Смотрите Waeckerle-Men et al., Cancer Immunol. Immunother. 55:1524-1533 (2006); Klyushnenkova et al., Prostate 67(10):
15 1019-28 (2007); Matsueda et al., Clin Cancer Res. 11(19 Pt 1):6933-43 (2005); Harada et al., Oncol Rep. 12(3):601-7 (2004); Machlenkin et al., Cancer Res. 65(14):6435-6442 (2005); и McNeel et al., Cancer Res. 61(13):5161-7 (2001), которые тем самым являются
20 включенными посредством ссылки. В одном воплощении полипептид содержит один из этих эпитопов. В других воплощениях полипептид содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 этих эпитопов. Каждая из возможных комбинаций этих эпитопов специфически включена.

В определенных воплощениях фрагмент PAP содержит 25, 50, 75, 100, 125, 150,
25 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 или 375 последовательных аминокислот человеческого PAP. Фрагменты PAP можно анализировать на сохранение эпитопов с использованием хорошо известных в данной области анализов. Смотрите, например, Klyushnenkova et al., Prostate 67(10):1019-28 (2007); Matsueda et al., Clin Cancer Res. 11(19 Pt
30 1):6933-43 (2005), которые тем самым являются включенными посредством ссылки.

ДНК, кодирующие эти фрагменты, можно генерировать посредством ПЦР (полимеразная цепная реакция) или другими обычными методиками молекулярной биологии.

В одном воплощении антиген PSA является фрагментом PSA. Предпочтительные
35 фрагменты включают аминокислоты 16-24 или 154-163 человеческого PSA. Смотрите Waeckerle-Men et al., Cancer Immunol. Immunother. 55:1524-1533 (2006); Matsueda et al., Clin Cancer Res. 11(19 Pt 1):6933-43 (2005), которые тем самым являются включенными посредством ссылки. В одном воплощении полипептид содержит один
40 из этих эпитопов. В других воплощениях полипептид содержит оба этих эпитопа.

Фрагменты PSA можно анализировать на сохранение эпитопов с использованием хорошо известных в данной области анализов, таких как сканирование эпитопов. В определенном воплощении фрагмент PSA содержит 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200,
45 225 или 250 последовательных аминокислот человеческого PSA.

ДНК, кодирующие эти фрагменты, можно генерировать посредством ПЦР или другими обычными методиками молекулярной биологии.

Разные модифицированные полипептидные антигены PAP и PSA и способы можно
получить способами, хорошо известными в данной области. Например, можно
50 использовать способы, описанные в патенте США №7005498 и в публикациях заявок на патенты США №2004/0141958 и 2006/0008465, которые тем самым включены посредством ссылки.

Следует рассматривать следующие параметры:

1. Известные и предсказанные эпитопы CTL;
2. Гомологию с родственными белками;
3. Сохранение остатков цистеина;
4. Предсказанные структуры петель, α -спиралей и β -складчатых структур;
5. Потенциальные сайты N-гликозилирования;
6. Предсказание экспонированных и внутренних аминокислотных остатков;
7. Доменная организация.

Области с высокой степенью гомологии с другими родственными белками вероятно являются структурно важными для «общей» третичной структуры и, следовательно, для узнавания антителами, тогда как области с низкой гомологией возможно можно заменить лишь с местными изменениями структуры в качестве последствия.

Остатки цистеина часто участвуют в образовании внутримолекулярных дисульфидных мостиков и, таким образом, участвуют в третичной структуре и не должны заменяться. Области, для которых предсказано образование альфа-спиральных или бета-складчатых структур, следует избегать в качестве точек вставки чужеродных эпитопов, так как считается, что эти области участвуют в сворачивании белка.

Потенциальные сайты N-гликозилирования следует сохранять, если маннозилирование белка является желательным.

Области, предсказанные (по их гидрофобным свойствам) как внутренние в молекуле, предпочтительно следует сохранять, так как они могли бы участвовать в сворачивании. Напротив, области, экспонированные в раствор, могли бы служить как положения-кандидаты для вставки модельных ТН эпитопов Р2 и Р30.

Наконец, следует принимать во внимание доменную организацию белка из-за ее релевантности для структуры и функции белка.

Эффект модификаций PSA и PAP можно анализировать иммунизациями животных, таких как мыши, для определения эффекта модификаций на гуморальный и клеточный иммунные ответы.

Модифицированные антигены, ассоциированные с опухолью

В определенных воплощениях полипептидный антиген, ассоциированный с клеткой, модифицируют так, что индуцируется ответ CTL (цитотоксический Т-лимфоцит) против клетки, которая презентует эпитопы, происходящие из полипептидного антигена, на ее поверхности, при презентации в ассоциации с молекулой МНС I класса (главный комплекс гистосовместимости) на поверхности APC (антигенпрезентирующая клетка). В некоторых таких воплощениях по меньшей мере один первый чужеродный ТН эпитоп при презентации ассоциирован с молекулой МНС II класса на поверхности APC. В некоторых таких воплощениях антиген, ассоциированный с клеткой, представляет собой антиген, ассоциированный с опухолью.

Типичные APC, способные к презентации эпитопов, включают дендритные клетки и макрофаги. Дополнительные типичные APC включают пино- или фагоцитирующие APC, которые способны одновременно представлять 1) эпитопы CTL, связанные с молекулами МНС I класса, и 2) ТН эпитопы, связанные с молекулами МНС II класса.

В определенных воплощениях модификации PSA и/или PAP осуществляют таким образом, что после введения субъекту индуцируются поликлональные антитела, которые предпочтительно реагируют с PSA и/или с PAP. Такие антитела могли бы атаковать и устранять опухолевые клетки, а также предупреждать развитие метастазов из метастатических клеток. Эффекторный механизм этого

противоопухолевого эффекта был бы опосредован комплементом и зависимой от антител клеточной цитотоксичностью. Кроме того, индуцированные антитела также могли бы ингибировать рост раковых клеток посредством ингибирования зависимой от факторов роста олиго-димеризации и интернализации рецепторов. В определенных воплощениях такие модифицированные полипептидные антигены PSA и/или PAP могут индуцировать ответы CTL, направленные против известных и/или предсказанных эпитопов PSA и/или PAP, воспроизводимых опухолевыми клетками. В предпочтительном воплощении антигены PSA и PAP индуцируют В-клеточный и Т-клеточный ответ против этих антигенов.

В определенных воплощениях модифицированный полипептидный антиген PSA и/или PAP содержит эпитоп CTL полипептидного антигена, ассоциированного с клеткой, и вариацию, где данная вариация содержит по меньшей мере один эпитоп CTL чужеродного T_H эпитопа. Такие отдельные модифицированные полипептидные антигены PSA и/или PAP, содержащие по меньшей мере один эпитоп CTL и вариацию, содержащую по меньшей мере один эпитоп CTL чужеродного T_H эпитопа, и способы их получения описаны в патенте США №7005498 и в публикациях заявок на патенты США №2004/0141958 и 2006/0008465.

В определенных воплощениях чужеродный T_H эпитоп представляет собой встречающийся в природе «случайный» Т-клеточный эпитоп. Такие случайные Т-клеточные эпитопы являются активными у большей доли индивидуумов видов животных или человеческого населения. В определенных воплощениях вакцина содержит такие случайные Т-клеточные эпитопы. В некоторых таких воплощениях применение случайных Т-клеточных эпитопов уменьшает потребность в очень большом числе разных эпитопов CTL в той же самой вакцине. Типичные случайные эпитопы Т-клеток включают, но не ограничиваются, эпитопами из столбнячного токсина, включая, но не ограничиваясь, эпитопами P2 и P30 (Panina-Bordignon et al., 1989), дифтерийного токсина, гемагглютинаина (HA) вируса гриппа и антигена CS P.falciparum.

Дополнительные случайные эпитопы Т-клеток включают пептиды, способные к связыванию большей доли молекул HLA-DR, кодируемых разными HLA-DR. Смотрите, например, WO 98/23635 (Frazer IH et al., assigned to The University of Queensland); Southwood S et al., J. Immunol. 160:3363-3373 (1998); Sinigaglia F et al., Nature 336:778 780 (1988); Rammensee HG et al., Immunogenetics 41(4):178-228 (1995); Chicz RM et al., J. Exp. Med 178:27-47 (1993); Hammer J et al., Cell 74:197-203 (1993); и Falk K et al., Immunogenetics 39:230-242 (1994). Последняя ссылка также касается лигандов HLA-DQ и -DP. Все эпитопы, перечисленные в этих ссылках, являются релевантными в качестве природных эпитопов-кандидатов, как здесь описано, как и эпитопы, которые имеют общие с ними мотивы.

В некоторых других воплощениях случайный эпитоп Т-клетки представляет собой искусственный эпитоп Т-клетки, который способен связываться с большей долей гаплотипов. В некоторых таких воплощениях искусственный эпитоп Т-клетки представляет собой общий эпитоп DR пептида ("PADRE"), как описано в WO 95/07707 и в соответствующей статье Alexander J et al., Immunity 1:751-761 (1994).

Рекомбинантный MVA

Данное изобретение охватывает рекомбинантный вирус MVA, экспрессирующий полипептид, содержащий антиген PAP. Предпочтительно вирус MVA экспрессирует человеческий антиген PAP. В одном воплощении вирус MVA экспрессирует крысиный или мышинный - антиген PAP. В одном воплощении вирус MVA кодирует

полноразмерный антиген PAP. В предпочтительном воплощении данный MVA содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

В другом воплощении MVA кодирует фрагмент PAP. Фрагменты PAP можно анализировать на сохранение эпитопов, используя хорошо известные в данной области анализы. Смотрите, например, Klyushnenkova et al., Prostate 67(10):1019-28 (2007); Matsueda et al., Clin Cancer Res. 11(19 Pt 1):6933-43 (2005); Machlenkin et al., Cancer Res. 65(14):6435-6442 (2005), которые тем самым являются включенными посредством ссылки. В определенном воплощении фрагмент PAP содержит 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 или 375 последовательных аминокислот человеческого PAP.

В предпочтительных воплощениях MVA кодирует полипептид, содержащий аминокислоты 81-95, 112-120, 133-152, 155-163, 173-192, 199-213, 228-242, 248-257, 299-307 или 308-322 человеческого PAP. Смотрите Waeckerle-Men et al., Cancer Immunol. Immunother. 55:1524-1533 (2006); Klyushnenkova et al., Prostate 67(10): 1019-28 (2007); Matsueda et al., Clin Cancer Res. 11(19 Pt 1): 6933-43 (2005); Harada et al., Oncol Rep.12(3): 601-7 (2004); Machlenkin et al., Cancer Res. 65(14): 6435-6442 (2005); и McNeel et al., Cancer Res. 61(13): 5161-7 (2001), которые тем самым являются включенными посредством ссылки. В одном воплощении данный полипептид содержит один из этих эпитопов. В других воплощениях данный полипептид содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 из этих эпитопов. Конкретно рассматривается каждая из возможных комбинаций этих эпитопов.

Данное изобретение охватывает рекомбинантный вирус MVA, экспрессирующий полипептид, содержащий антиген PSA, рекомбинантный вирус MVA, экспрессирующий полипептид, содержащий антиген PSA, и полипептид, содержащий антиген PAP. Предпочтительно вирус MVA экспрессирует человеческий антиген PSA. В одном воплощении вирус MVA экспрессирует крысиный или мышинный антиген PSA. В другом воплощении вирус MVA кодирует полноразмерный антиген PSA. В предпочтительном воплощении MVA содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1.

В другом воплощении MVA кодирует фрагмент PSA. Фрагменты PSA можно анализировать на сохранение эпитопов с использованием хорошо известных в данной области анализов. В определенном воплощении фрагмент PSA содержит 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 или 250 последовательных аминокислот человеческого PSA.

В предпочтительных воплощениях MVA кодирует полипептид, содержащий аминокислоты 16-24 или 154-163 человеческого PSA. Смотрите Waeckerle-Men et al., Cancer Immunol. Immunother. 55:1524-1533 (2006); Matsueda et al., Clin Cancer Res. 11(19 Pt 1):6933-43 (2005), которые тем самым являются включенными посредством ссылки. В одном воплощении данный полипептид содержит один из этих эпитопов. В других воплощениях данный полипептид содержит оба из этих эпитопов.

Рекомбинантный вирус MVA можно использовать в иммуногенной композиции для индукции В-клеточных и Т-клеточных иммунных ответов против PAP и/или PSA при введении хозяину. В предпочтительном воплощении данная иммуногенная композиция индуцирует антитела против PAP и/или PSA при введении хозяину. Иммуногенная композиция может содержать адъюванты, разбавители и/или стабилизаторы. Такие добавки, например, включают, но не ограничиваются ими, воду, физиологический раствор, глицерин, этанол, увлажнители или эмульгаторы и вещества, забуферивающие pH.

В одном воплощении MVA представляет собой MVA-BN®.

В неограничивающем воплощении рекомбинантный MVA, содержащий антиген, ассоциированный с опухолью, например, MVA-BN-PRO, кодирующий оба антигена PSA и PAP, сконструирован следующим образом. Исходный маточный раствор вируса генерируют рекомбинацией в культуре клеток с использованием типа 5 клеток, перmissive для репликации, например, клеток CEF. Клетки инокулируют ослабленным вирусом коровьей оспы, например MVA-BN®, и трансфицируют плазмидой для рекомбинации (например pBN217), которая кодирует антиген, ассоциированный с опухолью, например PSA или PAP, последовательность и 10 фланкирующие области вирусного генома. В одном неограничивающем воплощении плазида pBN217 содержит последовательности, которые также присутствуют в MVA-BN® (открытые рамки считывания 014L и 015L). Последовательности кДНК PSA и PAP вставляют между последовательностями MVA-BN® для обеспечения рекомбинации в вирусный геном MVA-BN®. В определенных воплощениях данная 15 плазида также содержит кассету для селекции, содержащую один или более чем один ген селекции для обеспечения селекции рекомбинантных конструкций в клетках CEF.

Одновременная инфекция и трансфекция культур обеспечивает осуществление гомологичной рекомбинации между вирусным геномом и плазмидой для 20 рекомбинации. Вирус, несущий вставку, затем выделяют, характеризуют и готовят маточный раствор вируса. В определенных воплощениях вирус пассируют в культурах клеток CEF в отсутствие селекции для обеспечения потери участков, кодирующих гены селекции, например *gpt* и гена красного флуоресцентного белка (RFP).

Способы лечения

25 Пациентов с раком, опосредованным клетками, сверхэкспрессирующими антигены, ассоциированные с опухолью, такие как PSA и/или PAP, можно лечить рекомбинантным MVA, кодирующим один или более чем один такой антиген. В предпочтительном воплощении MVA представляет собой MVA-BN®. В особо 30 предпочтительном воплощении MVA кодирует полипептид, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1, и второй полипептид, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

Рак предпочтительно представляет собой рак простаты. В одном воплощении рак представляет собой метастатический рак простаты. Раковый пациент может быть 35 любым млекопитающим, включая мышь или крысу. Предпочтительно раковый пациент является приматом, наиболее предпочтительно человеком.

Рекомбинантный MVA, кодирующий один или более чем один антиген, ассоциированный с опухолью (например PSA или PAP), можно вводить либо 40 системно, либо местно, т.е. парентеральным, подкожным, внутривенным, внутримышечным, интраназальным, внутрикожным или любым другим путем введения, известным квалифицированному практику.

В одном воплощении пациенту вводят 10^5 - 10^{10} TCID₅₀ рекомбинантного MVA. Предпочтительно пациенту вводят 10^7 - 10^{10} TCID₅₀ рекомбинантного MVA. Более 45 предпочтительно пациенту вводят 10^8 - 10^{10} TCID₅₀ рекомбинантного MVA. Наиболее предпочтительно пациенту вводят 10^8 - 10^9 или 10^9 - 10^{10} TCID₅₀ рекомбинантного MVA. Предпочтительно рекомбинантный MVA вводят пациенту в дозе 1×10^8 , 2×10^8 или 50 4×10^8 TCID₅₀.

Рекомбинантный MVA можно вводить один раз или многократно. В определенных воплощениях рекомбинантный MVA вводят два, три, четыре или пять раз. Предпочтительно рекомбинантный MVA дают три раза. Наиболее предпочтительно

дают три раза с четырехнедельными интервалами. Интервал между введениями предпочтительно составляет 1-4 недели, 1-8 недель, 1-16 недель и 1-52 недели. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят в сутки 0 и вновь в сутки 8 и 15. В предпочтительном воплощении дозировку увеличивают для последующих введений.

5 В особенно предпочтительном воплощении 1×10^8 , 2×10^8 и 4×10^8 TCID₅₀ дают три раза с четырехнедельными интервалами. Объяснение многократного введения рекомбинантного MVA основано на доклинических данных по иммуногенности у мышей, показывающих, что бустерные обработки значительно увеличивали
10 иммунные ответы против PSA и против PAP.

Принимая во внимание огромный иммунологический полиморфизм у людей, введение трех или более доз может обеспечить достижение максимального иммунного ответа каждым индивидуумом.

15 В одном воплощении обработка рекомбинантным MVA индуцирует антительные ответы против PSA и/или против PAP. В одном воплощении обработка рекомбинантным MVA индуцирует анти-PSA и/или анти-PAP Т-клеточные иммунные ответы. В одном воплощении обработка рекомбинантным MVA индуцирует анти-PSA и/или анти-PAP антительные и Т-клеточные иммунные ответы.

20 В одном воплощении обработка рекомбинантным MVA индуцирует распространение Т-клеточных ответов на другие опухолевые антигены.

В одном воплощении обработка рекомбинантным MVA ингибирует рост PSA (+) опухолей в профилактической и/или терапевтической постановке. В одном
25 воплощении обработка рекомбинантным MVA ингибирует рост PAP (+) опухолей в профилактической и/или терапевтической постановке. В одном воплощении обработка рекомбинантным MVA ингибирует рост PSA (+) и PAP (+) опухолей в профилактической и/или терапевтической постановке.

Комбинированная терапия с цитотоксическими агентами

30 Пациентов с раком, опосредованным клетками, сверхэкспрессирующими антигены, ассоциированные с опухолью, такие как PSA и/или PAP, можно лечить комбинацией рекомбинантного MVA, кодирующего один или более чем один такой антиген, с таксаном. Цитотоксические агенты демонстрируют иммуномодулирующие
35 активности в дозах, близких к дозам, уничтожающим раковые клетки, которые могли бы быть полезными для эффективности вакцины. В дозах, уничтожающих раковые клетки (в высоких дозах), применение этих агентов одновременно, до или после обработки рекомбинантным MVA может иметь преимущества относительно любой обработки по отдельности.

40 В одном воплощении таксаном является доцетаксел. В другом воплощении таксаном является паклитаксел. Таксан предпочтительно вводят в дозе, уничтожающей раковые клетки. Доза доцетаксела, «уничтожающая раковые клетки», составляет по меньшей мере 50 мг/м^2 . Предпочтительно доза доцетаксела,
45 уничтожающая раковые клетки, составляет $75\text{-}100 \text{ мг/м}^2$, что соответствует дозировке приблизительно $25\text{-}33 \text{ мг/кг}$. Доза паклитаксела, «уничтожающая раковые клетки», составляет по меньшей мере 90 мг/м^2 . Предпочтительно доза паклитаксела, уничтожающая раковые клетки, составляет $135\text{-}175 \text{ мг/м}^2$. «Доза таксана, близкая к дозе, уничтожающей раковые клетки», представляет собой дозировку, меньшую, чем
50 дозировка, уничтожающая раковые клетки. Таксан можно вводить любыми способами, известными квалифицированному специалисту, например, внутривенно.

В одном воплощении таксан и MVA, кодирующий полипептид, содержащий

антиген, специфичный для опухоли простаты, вводят в одно и то же самое время.

В одном воплощении таксан вводят до введения рекомбинантного MVA. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят в пределах 6 месяцев относительно введения таксана. В определенных воплощениях рекомбинантный MVA вводят в пределах 3 месяцев, в пределах 2 месяцев или в пределах 1 месяца после введения таксана. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят в пределах 21 суток после введения таксана. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят в пределах 14 суток после введения таксана. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят в пределах 7 суток после введения таксана. Обычно рекомбинантный MVA вводят по меньшей мере через 2 суток после лечения таксаном.

В одном воплощении таксан вводят после рекомбинантного MVA. Обычно рекомбинантный MVA вводят по меньшей мере за 1 неделю до лечения таксаном. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят менее чем за 2 года до таксана. В определенных воплощениях рекомбинантный MVA вводят менее чем за 1 год, менее чем за 6 месяцев или менее чем за 3 месяца до введения таксана. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят за 1-26 недель до введения таксана. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят за 1-9 недель до введения таксана. В одном воплощении рекомбинантный MVA вводят за 1-3 недели до введения таксана.

В определенных воплощениях таксан вводят как до, так и после введения рекомбинантного MVA. В других воплощениях рекомбинантный MVA вводят как до, так и после введения таксана. Введение рекомбинантного MVA и таксана может быть однократным введением или многократными введениями. Например, данные введения могут следовать с интервалами времени 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель.

Наборы

Данное изобретение охватывает наборы, содержащие рекомбинантный MVA. Рекомбинантный MVA может содержаться в сосуде или в контейнере. В одном воплощении рекомбинантный MVA кодирует антиген PAP. В одном воплощении рекомбинантный MVA кодирует полипептид, содержащий антиген PSA. В одном воплощении рекомбинантный MVA кодирует полипептид, содержащий антиген PSA и полипептид, содержащий антиген PAP. В разных воплощениях наборы для вакцинации содержат рекомбинантный MVA для первой вакцинации («примирования») в первом сосуде или контейнере и для второй или третьей вакцинации («бустер-иммунизации») - во втором или в третьем сосуде или контейнере.

В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA для профилактики рака простаты. В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA для профилактики рака простаты после определения увеличения уровня одного или более чем одного маркера, ассоциированного с опухолью простаты. В предпочтительном воплощении данные инструкции могут уведомлять о том, что MVA подлежит введению для профилактики рака простаты после определения увеличения уровней циркулирующего PSA. В одном воплощении данные инструкции могут уведомлять о том, что MVA подлежит введению для профилактики рака простаты пациенту-мужчине в возрасте старше 30 лет. В одном воплощении данные инструкции могут уведомлять о том, что MVA подлежит введению для профилактики рака простаты пациенту-мужчине в возрасте старше 30 лет и младше 40 лет. В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA для профилактики рака простаты в возрасте старше 40 лет.

В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA для профилактики метастазов рака простаты. В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA для профилактики метастазов рака простаты после определения увеличения уровня маркера, ассоциированного с клетками опухоли простаты. В предпочтительном воплощении данные инструкции могут предписывать, что MVA подлежит введению для профилактики метастазов рака простаты после определения того, что возросли уровни циркулирующего PSA, и несмотря на отсутствие определяемой первичной опухоли. В одном воплощении данные инструкции могут предписывать, что MVA подлежит введению для профилактики метастазов рака простаты пациенту-мужчине в возрасте старше 30 лет. В одном воплощении данные инструкции могут уведомлять о том, что MVA подлежит введению для профилактики метастазов рака простаты пациенту-мужчине в возрасте старше 30 лет и младше 40 лет. В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA для профилактики метастазов рака простаты в возрасте старше 40 лет.

В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA для лечения рака простаты. В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA для лечения рака простаты после определения увеличения уровня одного или более чем одного маркера, ассоциированного с опухолью простаты. В предпочтительном воплощении данные инструкции могут предписывать, что MVA подлежит введению для лечения рака простаты после определения того, что возросли уровни циркулирующего PSA. В одном воплощении данные инструкции могут предписывать, что MVA подлежит введению для лечения рака простаты пациенту-мужчине в возрасте старше 30 лет. В одном воплощении данные инструкции могут уведомлять о том, что MVA подлежит введению для лечения рака простаты пациенту-мужчине в возрасте старше 30 лет и младше 40 лет. В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA для лечения рака простаты в возрасте старше 40 лет.

В одном воплощении данный набор может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA перед введением дозы таксана, уничтожающей опухолевые клетки. Данные инструкции могут предписывать, что MVA подлежит введению в любой момент времени от 6 месяцев до 1 недели перед введением таксана. В предпочтительных воплощениях данные инструкции предписывают, что MVA подлежит введению в любой момент времени от 3 месяцев до 1 недели, от шести недель до 1 недели, от 1 месяца до 1 недели, от 3 недель до 1 недели и от 2 недель до 1 недели до введения таксана. В одном воплощении данные инструкции могут предписывать то, что MVA подлежит введению в любой момент времени от 1 недели до 0 суток до введения таксана.

Данный набор также может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA в то же самое время, что и введение дозы таксана, уничтожающей опухолевые клетки.

Данный набор также может содержать рекомбинантный MVA и инструкции для введения рекомбинантного MVA после введения дозы таксана, уничтожающей опухолевые клетки. Данные инструкции могут предписывать, что MVA подлежит введению в любой момент времени от 1 суток до 6 месяцев после введения таксана. В

предпочтительных воплощениях данные инструкции предписывают, что MVA подлежит введению в любой момент времени от 2 суток до 1 недели, от 2 суток до 2 недель, от 2 суток до 3 недель, от 2 суток до 1 месяца, от 2 суток до 2 месяцев, и от 2 суток до 3 месяцев, и от 2 суток до 6 месяцев после введения таксана. В одном
5 воплощении данные инструкции могут предписывать, что MVA подлежит введению в любой момент времени от 0 суток до 2 суток после введения таксана.

Ниже приведены примеры и ссылки для иллюстрации настоящего изобретения с дополнительными подробностями, но объем настоящего изобретения не
10 ограничивается этими примерами. Подразумевается, что любые изменения в деталях, приведенных в качестве примеров, которые приходят в голову квалифицированному специалисту, попадают в пределы объема настоящего изобретения. Кроме того, данное описание изобретения лучше всего понятно в свете процитированных ссылок, которые все тем самым включены посредством ссылки во всей их полноте.

15 ПРИМЕРЫ

Пример 1

Конструкция MVA-BN-PRO и анализ экспрессии белка в инфицированных клетках
Для разработки вакцины против рака простаты генерировали рекомбинантный

20 вектор на основе вируса коровьей оспы, MVA-BN-PRO, который кодирует человеческий простато-специфический антиген (PSA) и простатическую кислую фосфатазу (PAP). Рекомбинантный вектор на основе вируса коровьей оспы MVA-BN-PRO был получен из высокоослабленного штамма вируса коровьей оспы MVA-BN® (модифицированный вирус коровьей оспы Анкара - Северо-Баварский). MVA-BN®
25 высокоадаптирован для клеток первичных фибробластов куриных эмбрионов (CEF) и не подвергается репродуктивной репликации в человеческих клетках. В человеческих клетках вирусные гены экспрессируются, но не продуцируется инфекционный вирус.

Происхождение генов

30 кДНК генов PSA и PAP транскрибировали (обратная транскрипция) из общей РНК человеческой простаты, приобретенной у Clontech (каталожный №6410801), с использованием традиционных методик молекулярной биологии. PSA представляет собой простато-специфический антиген, продуцируемый простатой, и он обнаруживается в повышенном количестве в крови мужчин, которые имеют рак
35 простаты, доброкачественную гиперплазию простаты либо инфекцию или воспаление простаты. PSA был идентифицирован как мишень для подходов клеточно-опосредованной иммунотерапии. PAP (простатическая кислая фосфатаза) является ферментом, измеряемым в крови, уровни которого могут быть повышенными у
40 пациентов с раком простаты, который распространился или метастазировал еще где-либо. PAP не увеличивается, если опухоль не распространилась вовне анатомической капсулы простаты. Следовательно, этот простатический опухолевый антиген в настоящее время исследуется как антиген-мишень в нескольких испытаниях
45 человеческой вакцины, причем некоторые из них имеют доказательство клинической пользы.

Подтвердили, что последовательности образующихся амплифицированных кДНК PSA и PAP соответствуют опубликованным последовательностям. Таким образом, кДНК PSA (например среди прочих GenBank M26663.1 GL618463; синонимы:
50 калликреин 3; KLK3; 786 п.о.) и последовательность кДНК гена PAP (GenBank M34840.1 GI:189620; синонимы: PAP; ACP3; ACP-3; ACP3P; 1161 п.о.) показаны ниже.

Человеческая последовательность кДНК PSA (99% идентичности с последовательностью GenBank M26663.1; жирный шрифт: три молчание замены

AGTTCCTCTTTCTGAAGATCAGTTGCTATACCTGCCTTTCAGGAACTGCCCTCGTTTTC
 AAG
 AACTTGAGAGTGAGACTTTGAAATCAGAGGAATTCCAGAAGAGGCTGCACCCTTATA
 AGGAT
 5 TTTATAGCTACCTTGGGAAAACCTTTCAGGATTACATGGCCAGGACCTTTTTGGAATTT
 GGAG
 TAAAGTCTACGACCCTTTATATTGTGAGAGTGTTACAATTTCACTTTACCCTCCTGGG
 CCA
 10 CTGAGGACACCATGACTAAGTTGAGAGAATTGTCAGAATTGTCCCTCCTGTCCCTCTA
 TGGA
 ATTCACAAGCAGAAAGAGAAATCTAGGCTCCAAGGGGGTGTCCCTGGTCAATGAAATC
 CTCAA
 15 TCACATGAAGAGAGCAACTCAGATACCAAGCTACAAAAAATTATCATGTATTCTGC
 GCATG
 AСACTACTGTGAGTGGCCTACAGATGGCGCTAGATGTTTACAACGGACTCCTTCCTCC
 STAT
 GCTTCTTGCCACTTGACGGAATTGTACTTTGAGAAGGGGGAGTACTTTGTGGAGATGT
 20 ACTA
 TCGGAATGAGACGCAGCACGAGCCGTATCCCCTCATGCTACCTGGCTGCAGCCCTAG
 CTGTC
 CTCTGGAGAGGTTTGCTGAGCTGGTTGGCCCTGTGATCCCTCAAGACTGGTCCACGGA
 GTGT ATGACCACAAACAGCCATCAAGGTAСTГAGGACAGTACAGATTAG (SEQ ID
 25 NO:2)

Аминокислотная последовательность человеческой PAP является следующей:
 MRAAPLLLARAASLSLGLFLLFFWLDRSVLAKELKFVTLVFRH
 GDRSPIDTFPTDPIKESSWPQGFGQLQLGMEQHYELGEYIRKRYRKFLNESYKHEQV
 30 YIRSTDVDRTLMSAMTNLAALFPPEGVSIWNPILLWQPIPVHTVPLSEDQLLYLPFRN
 CPRFQELESETLKSEEFQKRLHPYKDFIATLGKLSGLHGQDLFGIWSKVYDPLYCESV
 HNFTLPSWATEDTMTKLRELSELSLLSLYGIHKQKEKSRLQGGVLVNEILNHMKRATQ
 IPSYKKLIMYSAHDTTVSGLQMALDVYNGLPPYASCHLTEL YFEKGEYFVEMYRNE
 TQHЕPYPLMLPGCSPSCPLERFAELVGPVIPQDWSTECMTTNSHQGTEDSTD (SEQ ID NO:
 35 4).

Происхождение промотора

Промотор включения А-типа вируса коровьей оспы (АТI), поздний промотор
 (показан ниже), генерировали синтетически в плазмиде pBluescript KS+ (Stratagene),
 40 вырезали и вставляли как перед последовательностью PAP, так и перед
 последовательностью PSA. Соответственно, белки PSA и PAP должны
 экспрессироваться с другими поздними генами после репликации ДНК.

Последовательность промотора АТI:

5'-GTTTTGAATAAAATTTTTTATAATAAATC (SEQ ID NO:5)

45 Конструкция плазмиды для рекомбинации PSA/PAP-MVA-BN

Для вставки чужеродных генов в геном MVA-BN® можно использовать
 промежуточную плазмиду для рекомбинации, которая имеет в качестве мишени
 специфическую область генома MVA-BN®, а именно сайт делеции или межгенную
 50 (некодирующую область).

Промежуточная плазида pBNX128 содержит последовательности ДНК MVA из
 областей, которые фланкируют межгенную (некодирующую) область (IGR) между
 открытыми рамками считывания (ORF) 014L и 015L. Последовательности, например

кДНК PSA и PAP, можно вставить между этими фланкирующими последовательностями. Затем, когда и плаزمиды, и MVA-BN® присутствуют в той же самой клетке CEF, фланкирующие последовательности 014L/015L опосредуют гомологичную рекомбинацию, опосредующую вставку данных плазмидных последовательностей в межгенную область 014L/015L генома MVA-BN® (Фиг.1А-Б). Присутствие кассеты селекции во вставленных последовательностях обеспечивает позитивную селекцию рекомбинантных вирусов MVA-BN®.

Генерация MVA-BN-PRO

Одновременная инфекция и трансфекция культур обеспечивала прохождение гомологичной рекомбинации между вирусным геномом и плазмидой для рекомбинации. Образующийся рекомбинантный вектор на основе вируса коровьей оспы, обозначенный MVA-mBN106A, содержащий кодирующую область PSA и PAP и кассету селекции, получали после многократных очисток бляшек при селективных условиях. После амплификации и дополнительной очистки бляшек при неселективных условиях выделяли рекомбинантный вирус коровьей оспы MVA-BN-PRO, лишенный кассеты селекции.

Получали очищенный из бляшек вирус MVA-BN-PRO, лишенный кассеты селекции. Такое получение включало двенадцать (12) пассажей, включая четыре (4) очистки бляшек.

Присутствие последовательности промотор-PSA-промотор-PAP и отсутствие родительского вируса MVA-BN® в маточных растворах MVA-BN-PRO подтверждали секвенированием ДНК и ПЦР анализом, вложенную ПЦР использовали для подтверждения отсутствия кассеты селекции (гены gpt и RFP). Упрощенная схема генома MVA-BN-PRO показана на Фиг.2.

Пример 2

Созэкспрессия PSA и PAP в клетках, обработанных MVA-BN-PRO Одновременную экспрессию двух простато-специфичных антигенов, кодируемых MVA-BN-PRO, а именно человеческого PSA и человеческой PAP, продемонстрировали в клетках, инкубируемых с MVA-BN-PRO *in vitro*. Культуры СТ26, химически индуцированной колоректальной карциномы мышей BALB/c (Brattain et al., Cancer Research 40, 2142-2146 (1980)), инкубировали с MVA-BN-PRO, и супернатанты анализировали на присутствие рекомбинантных PSA и PAP. PSA измеряли с использованием диагностического набора для PSA на основе ELISA, который обычно используется для скрининга образцов человеческой сыворотки (Human PSA ELISA Kit, Anogen, Ontario, Канада; диапазон детекции PSA: 2-80 нг/мл). PAP измеряли косвенно через ее ферментативные свойства, используя колориметрический анализ фосфатных активностей (анализ кислой фосфатазы; диапазон детекции PAP: 4-40 нг/мл). PSA и PAP анализировали в аликвотах тех же самых супернатантов культуры, собранных через 24 ч после добавления MVA-BN-PRO при множественности инфекции (MOI), варьирующей от 1 до 100.

Как показано на Фиг.3, оба антигена могли быть детектированы в супернатантах клеток, инкубируемых с MVA-BN-PRO. Количество рекомбинантных PSA и PAP, продуцируемых в культуре, зависело от количества MVA-BN-PRO (MOI) и числа клеток, используемых в данном эксперименте. Напротив, ни PSA, ни фосфатазная активность, указывающая на PAP, не могли быть детектированы в супернатантах контрольных культур, инкубируемых либо в одной среде, либо с соответствующей MOI MVA-BN®.

Титрование PSA и PAP при расчете с использованием графиков с эталонными

стандартами выявило для каждого анализа, что клетками, инкубируемыми с MVA-BN-PRO, продуцировались сходные количества обоих антигенов. В самом деле, в культуральных супернатантах измерили 1043 нг/мл PSA и 209 нг/мл PAP при посеве 1×10^5 клеток СТ26 на лунку и инкубации с MVA-BN-PRO при MOI 10 в течение 48 ч. Последовательности PSA и PAP вставляли в одну и ту же область генома MVA-BN®, и их экспрессия независимо контролировалась промотором АТI, расположенным выше по течению от каждой последовательности. Эта конфигурация вставки, по-видимому, создает правильное окружение для оптимальной экспрессии обоих рекомбинантных антигенов. В целом, эти данные показывают, что MVA-BN® представляет собой адекватный носитель для хорошо сбалансированной и сопутствующей экспрессии многих трансгенных антигенов, подобных PSA и PAP.

Пример 3

Индукция иммунного ответа против PAP и против PSA у мышей, обработанных MVA-BN-PRO

Индукцию иммунных ответов против PSA и против PAP при обработке MVA-BN-PRO оценивали у мышей BALB/c. В этих исследованиях оценивали разные дозы MVA-BN-PRO, варьирующие от 2×10^6 до 5×10^7 TCID50. Образцы крови отбирали за одни сутки до каждой обработки и через две недели после конечной обработки и гуморальные ответы анализировали посредством ELISA. Спленоциты отбирали после конечной обработки и клеточные ответы анализировали посредством ELISpot (иммуноферментный спот-анализ).

Индукция антительных ответов против PSA и против PAP

Мышей BALB/c (5 животных в каждой группе) подкожно обрабатывали 5×10^7 TCID50 MVA-BN-PRO в сутки 1, 15 и 29 (обработки с интервалов 2 недели \times 3). Контрольных животных обрабатывали MVA-BN® или буфером для препарата (TBS). Образцы крови забирали до обработки и в сутки 14, 28 и 42. Сыворотку от мышей из каждой тестируемой группы затем объединяли и анализировали посредством ELISA. Индукцию антительных ответов против PSA и против PAP оценивали с использованием имеющихся в продаже очищенных белков (Meridian Life Sciences, Inc., Saco, ME) в качестве антигенов-мишеней, которыми были покрыты лунки планшета для микротитрования. Как показано на Фиг.4А и 4В, антительные ответы против PSA и против PAP детектировали у мышей, обработанных MVA-BN-PRO. Определение титров антитела против PSA требовало по меньшей мере двух введений, и титры возрастали после третьей обработки MVA-BN-PRO. В общем, антительный ответ против PAP был более умеренным, так как титры всегда были ниже, чем титры, индуцированные против PSA. Слабый антительный ответ, наблюдающийся против PAP, вероятно обусловлен слабыми антигенными свойствами этого белка для В-клеток.

Индукция Т-клеточных ответов против PSA и против PAP

Мышей BALB/c (5 животных в каждой группе) подкожно обрабатывали контролем (TBS), 2×10^6 или 5×10^7 TCID50 MVA-BN-PRO в сутки 1, 15, 31 (обработки с интервалом 2 недели \times 3). Селезенки отбирали через 5 суток после последней иммунизации и суспензии клеток из каждой тестируемой группы объединяли для анализа. Индукцию Т-клеточных ответов оценивали посредством ELISpot, который измерял продукцию IFN γ после повторной антигенспецифичной стимуляции *in vitro*. Для повторной стимуляции использовали отдельно библиотеки 15-мерных пептидов с 11-мерными перекрытиями (OPL) и аминокислотные последовательности, покрывающие полноразмерное PSA или PAP. Как показано на Фиг.5, антигенспецифичные Т-клеточные ответы детектировали в клетках селезенки из

группы, обработанной MVA-BN-PRO, при повторной стимуляции OPL как PAP, так и PSA, тогда как контрольная OPL, происходящая из человеческой последовательности HER-2 esd, не имела эффекта (Фиг.5А). Т-клеточные ответы не детектировали у мышей в группах, обработанных MVA-BN® (данные не показаны) или TBS (Фиг.5), когда клетки повторно стимулировали OPL PSA, PAP или HER-2. Эти данные показывают, что MVA-BN-PRO является мощным индуктором Т-клеток, поскольку большие количества антигенспецифичных Т-клеток могли быть детектированы непосредственно в спленocyтах без роста *ex vivo*.

Содействие CD4 хелперных и CD8 цитотоксических Т-клеток Т-клеточным ответам против PAP и PSA, индуцированным у мышей при обработке MVA-BN-PRO, исследовали после обеднения подклассов популяций Т-клеток до повторной стимуляции клеток селезенки *in vitro*. Как показано на Фиг.6, ответы Т-клеток детектировали в подклассах Т-клеток, обедненных как CD4, так и CD8 при повторной стимуляции каждой из OPL PSA или PAP.

В целом эти исследования показывают, что неоднократная обработка мышей MVA-BN-PRO индуцирует широкий антигенспецифичный адаптивный иммунный ответ на два ТАА, который включает антитело и оба подтипа клеток-эффекторов, CD4 и CD8. Как и ожидалось, антительный ответ был направлен главным образом на PSA, тогда как PAP, известный слабый иммуноген В-клеток, запускал только умеренный антительный ответ. Поскольку PSA и PAP по существу представлены на поверхности опухолевых клеток как мишени Т-клеток в форме комплексов антигенпрезентирующая молекула/пептид, активация клеточных компонентов иммунной системы является критическим требованием для мощности MVA-BN-PRO. Сильные ответы Т-клеток CD4 и CD8 были индуцированы против обоих ТАА у животных, обработанных всеми протестированными дозами MVA-BN-PRO. Следовательно, MVA-BN-PRO имеет потенциал опосредовать устранение опухолевых клеток, презентующих на их поверхности пептиды PSA и/или PAP.

Пример 4

Противоопухолевая активность у мышей, обработанных MVA-BN-PRO

Способность MVA-BN-PRO влиять на рост PSA-позитивных опухолевых клеток у мышей оценивали в профилактической, а также в терапевтической модели раковой опухоли. Данные показывают, что MVA-BN-PRO может ингибировать рост опухоли в обеих постановках. Также MVA-BN-PRO был способен ингибировать рост PAP-позитивных опухолевых клеток у мышей в терапевтической модели раковой опухоли.

Индукция защитного антигенспецифичного адаптивного иммунитета при обработке MVA-BN-PRO (профилактическая постановка)

Способность MVA-BN-PRO предупреждать рост опухоли оценивали с использованием трансплантированных клеток E5 в качестве модели рака простаты. E5 представляет собой субклон RM11, мышшиной линии клеток опухоли простаты (Elzey et al., *Int. J Cancer* 15;94(6):842-9 (2001)), полученный после трансфекции RM11 рекомбинантной ДНК, кодирующей ген человеческого PSA. В этом исследовании эффективности мышей иммунизировали MVA-BN-PRO, как описано выше, т.е. три раза с 3-недельными интервалами TBS, MVA-BN® (5×10^7 TCID₅₀) или MVA-BN-PRO (2×10^6 , 1×10^7 или 5×10^7 TCID₅₀). Затем мышшей заражали опухолями путем внутрикожного инъектирования 1×10^5 клеток E5 через шесть недель после последней обработки. Затем рост опухоли наблюдали дважды в неделю, и измеряли размер растущих солидных опухолей.

Как показано на Фиг.7В-7Д, у животных, предварительно обработанных всеми

дозами MVA-BN-PRO, опухоли росли медленнее, чем опухоли в контрольной группе, обработанной TBS (Фиг.7А), и более 50% мышей оставались лишенными опухолей для всех протестированных доз в конце исследования (Сутки 29). Напротив, измеримые опухоли детектировали у 100% мышей в контрольных группах, обработанных TBS, уже в Сутки 12 после заражения опухолью. В эти сутки измеримые опухоли детектировали только у 20% мышей из всех групп, обработанных MVA-BN-PRO. Различие средних размеров опухолей было статистически значимым между всеми группами, обработанными MVA-BN-PRO, и контрольной группой, обработанной TBS, во все моменты времени с суток 12 и на всем протяжении данного исследования (Фиг.7Е).

Аналогично контрольной группе, обработанной TBS, измеримые опухоли детектировали почти у каждой мыши, обработанной MVA-BN® (90%) уже в Сутки 12 после заражения опухолью (Фиг.7Б). Однако 2 мыши в группе, обработанной MVA-BN® (20%), не имели опухоли в конце исследования (Сутки 29; одна мышь оставалась лишенной опухоли на всем протяжении данного исследования, и у другой мыши происходила регрессия опухоли). Также опухоли в группе, обработанной MVA-BN®, росли медленнее, чем опухоли в контрольной группе, обработанной TBS, до Сутки 22, и в два момента времени достигались статистически значимые различия средних размеров опухолей между двумя этими группами (Сутки 19, $p=0,034$ и Сутки 22, $p=0,019$). Задержка роста опухоли у мышей, обработанных MVA-BN®, была лишь кратковременной, так как аналогичные средние размеры опухолей наблюдали у мышей, обработанных TBS и MVA-BN®, во все другие моменты времени (Фиг.7Е).

MVA-BN-PRO-опосредованную противоопухолевую активность, описанную выше, подтверждали в повторном эксперименте, где мышей обрабатывали 2×10^6 TCID₅₀ MVA-BN-PRO с двухнедельными интервалами, затем заражали опухолевыми клетками через две недели после обработки. Данные в Сутки 29 после имплантации опухоли показаны на Фиг.8, наряду с соответствующими данными из Фиг.7 для тех же самых суток после имплантации. В обоих экспериментах наблюдали сопоставимую задержку роста опухоли у мышей, обработанных MVA-BN-PRO. Кроме того, статистически значимые различия средних размеров опухолей достигались между группами, обработанными MVA-BN-PRO и TBS, а также между группами, обработанными MVA-BN-PRO и MVA-BN® ($p=0,03$ и $p=0,021$, соответственно). Кратковременный эффект MVA-BN®, наблюдаемый в ранние моменты времени на Фиг.7, не детектировали в повторном эксперименте (данные не показаны). Эти данные показывают, что обработка мышей MVA-BN-PRO индуцирует антигенспецифичный адаптивный иммунный ответ и установление иммунной памяти. Когда мышей впоследствии заражали опухолевыми клетками через две-шесть недель, иммунная память активировалась и ингибировала рост опухолевых клеток.

Подавление опухолей при обработке MVA-BN-PRO (терапевтическая постановка) Способность MVA-BN-PRO подавлять сформировавшиеся опухоли оценивали с использованием трансплантированных клеток Е6 в качестве модели рака простаты. Е6 представляет собой субклон RM11, мышинной линии клеток опухоли простаты (Elzey et al., 2001), полученный после трансфекции RM11 рекомбинантной ДНК, кодирующей человеческий ген PSA. Е6 является более слабым продуцентом PSA, чем Е5, который использовали в профилактической постановке, описанной выше. Мышей заражали опухолями путем внутрикожного инъекционного введения 1×10^5 клеток Е6 и обрабатывали в те же самые сутки, затем в сутки 8 и 15 TBS, MVA-BN® или MVA-BN-PRO (5×10^6 или 5×10^7 TCID₅₀). Затем рост опухоли наблюдали дважды в неделю, и

измеряли размер солидных опухолей под кожей.

Как показано на Фиг.9, опухоли у животных, обработанных MVA-BN-PRO (Фиг.9В и 9Г), росли значительно медленнее, чем опухоли у животных, обработанных MVA-BN® - (Фиг.9А и 9Б) или TBS (Фиг.9Д). В обеих группах, обработанных MVA-BN-PRO, наблюдали стабилизацию размера или регрессию опухоли у 50% животных. Фиг.9Е показывает различие среднего размера опухоли между группами. Средний объем опухоли статистически значимо различался между животными, обработанными 5×10^6 TCID₅₀ MVA-BN-PRO и контрольными группами, обработанными TBS или MVA-BN® ($p=0,014$ и $p=0,032$, соответственно), тогда как статистическая значимость не достигалась между группой, обработанной 5×10^7 TCID₅₀ MVA-BN-PRO, и контрольной группой, обработанной TBS ($p=0,07$). Эти данные показывают, что обработка мышей MVA-BN-PRO ингибирует рост опухолей простаты у мышей в терапевтической постановке.

Способность MVA-BN-PRO также, подавлять сформировавшиеся опухоли, экспрессирующие PAP, оценивали в экспериментальной модели метастазов в легком, используя клетки СТ26, стабильно экспрессирующие человеческую PAP. СТ26 представляют собой клетки химически индуцированной колоректальной карциномы мышей BALB/c (Brattain et al., 1980). В этой модели клетки СТ26-PAP внутривенно инъецируют мышам BALB/c и опухолевую массу оценивают в легких, где растут узелки опухоли. Мышей заражали клетками СТ26-PAP (5×10^5), внутривенно инъецированными в Сутки 1, и внутрибрюшинно обрабатывали в Сутки 4 одной инъекцией TBS, MVA-BN (5×10^7 TCID₅₀) или MVA-BN-PRO (2×10^6 или 5×10^7 TCID₅₀). Мышей затем умерщвляли в Сутки 14, и их легкие взвешивали. Как показано на Фиг.10, опухолевая масса у мышей, обработанных 5×10^7 TCID₅₀ MVA-BN-PRO, была значительно меньше, чем у контрольных мышей ($p < 0,024$). Эта противоопухолевая активность зависела от дозы, так как меньшая доза MVA-BN-PRO не имела эффекта. Кроме того, эта противоопухолевая активность с наибольшей вероятностью была опосредована PAP-специфичным иммунным ответом, так как опухолевая масса у мышей контрольной и обработанной MVA-BN групп была неизменной.

Эти данные демонстрируют, что обработка мышей MVA-BN-PRO ингибирует рост сформировавшихся PAP-позитивных опухолей у мышей. Таким образом, как антигены простаты PSA, так и PAP, кодируемые MVA-BN-PRO, способствуют индукции защитного иммунного ответа, способного подавлять рост как PSA-, так и PAP-позитивных опухолей.

Пример 5

Иммуногенность MVA-BN-PRO при ограничении гаплотипа

Иммунные ответы происходят в результате взаимодействия эпитопов, происходящих из антигена, с полиморфными антигенпрезентирующими молекулами на иммунокомпетентных клетках. Польза двух опухолевых антигенов в MVA-BN-PRO состоит в том, что они потенциально увеличивают число эпитопов, происходящих из опухолевого антигена, которые взаимодействуют с антигенпрезентирующими молекулами разных гаплотипов. Следовательно, предполагается, что MVA-BN-PRO будет иммуногенным у индивидуумов с более широким диапазоном гаплотипов, чем вакцины, содержащие один антиген. Эту возможность оценили в доклинических моделях с использованием животных с разными гаплотипами. В этом примере вектор, описанный в Примере 1, модифицировали с заменой промотора АТІ ранним/поздним синтетическим промотором (Ps; Chakrabarti S, Sisler JR, and Moss B, BioTechniques 23:

1094-1097 (December 1997)). Соответственно, белки PSA и PAP должны экспрессироваться с другими ранними и поздними генами на всем протяжении полной инфекционной фазы MVA.

Последовательность промотора Ps:

5'-AAAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGGAATATAAATAAT (SEQ ID NO:6).

Самцов мышей BALB/c и C57BL/6 (5 животных в каждой группе) иммунизировали в сутки 1, 15 и 29 5×10^7 TCID₅₀ MVA-BN-PRO. Пробы крови брали в сутки 42, и последовательные разведения объединенных сывороток анализировали на присутствие IgG против PSA или против PAP посредством ELISA, как описано в Примере 3. Как показано на Фиг.11, высокие титры антител против PSA детектировали только в сыворотке от мышей BALB/c. Напротив, несмотря на то, что титры антител против PAP измеряли в сыворотках от обеих мышинных линиях, более высокие титры антител против PAP детектировали в сыворотке от мышей C57BL/6. Эти данные подчеркивают связь с гаплотипом иммунного ответа в отношении конкретных антигенов и поддерживают идею о том, что множество опухолевых антигенов в MVA-BN-PRO должно обеспечивать эффективный иммунитет у большего числа индивидов с разными гаплотипами.

Пример 6 Безопасность и иммуногенность MVA-BN-PRO у людей

MVA-BN-PRO в настоящее время исследуется для лечения пациентов с раком простаты. Ко времени подачи этой заявки 4 пациента получили от 1 до 3 обработок 1×10^8 TCID₅₀ MVA-BN-PRO без сообщения о вредных эффектах.

Иммуногенность MVA-BN-PRO у одного из этих пациентов оценивали сравнением ответов Т-клеток на PSA и PAP до и после обработки. Присутствие антигенспецифичных Т-клеток, секретирующих гамма-интерферон (IFN- γ), в одноядерных клетках периферической крови (PBMC) пациента определяли с использованием анализа ELISpot. Ответы определяли до обработки (базовый уровень) и через 2 недели после третьей подкожной вакцинации 10^8 TCID₅₀ MVA-BN-PRO (TC3). PBMC пациента (2×10^5) в 10% средах MATIS (RPMI, среда Клика, 10% человеческая АВ сыворотка, 0,5 М 2- β -меркаптоэтанол и 2% пенициллин/стрептомицин) переносили в гидратированные лунки 96-луночных PVDF планшетов Multiscreen (Millipore, Кат. № MSIPS4510), предварительно покрытые захватывающим антителом против человеческого IFN- γ (Mabtech, клон MAб 1D1K, Кат. №3420-3) в концентрации 10 мкг/мл. Затем PBMC стимулировали PSA в концентрации 5 мкг/мл (Biodesign Кат. № A86878H), 11-мерной перекрывающейся библиотекой из 63 15-мерных пептидов (OPL), происходящих из полноразмерной последовательности PSA, в концентрации 63 мкМ (1 мкМ на пептид), PAP в концентрации 1 мкг/мл (Biodesign Кат. № A81277H), 11-мерной OPL из 94 15-мерных пептидов, происходящих из полноразмерной последовательности PAP, в концентрации 94 мкМ (1 мкМ на пептид), пулом из 44 пептидов ГКГ класса I, происходящих из 10 антигенов, ассоциированных с опухолью рака простаты (ТАА), в концентрации 44 мкМ (1 мкМ на пептид), пулом из 15 пептидов ГКГ класса II, происходящих из 5 ТАА рака простаты, в концентрации 15 мкМ (1 мкМ на пептид) или MVA (Баварский Северный, MVA-BN-PROD05A06-C) при множественности инфекции (MOI) 10.

Последовательности 63 пептидов OPL PSA:

MWVPVVFLTLSVTWI (а.к. 1-15 SEQ ID NO:3)

VVFLTLSVTWIGAAP (а.к. 5-19 SEQ ID NO:3)

TLSVTWIGAAPLILS (а.к. 9-23 SEQ ID NO:3)

TWIGAAPLILSRIVG (а.к. 13-27 SEQ ID NO:3)

AAPLILSRIVGGWEC (a.к. 17-31 SEQ ID NO:3)
ILSRIVGGWECEKHS (a.к. 21-35 SEQ ID NO:3)
IVGGWECEKHSQPWQ (a.к. 25-39 SEQ ID NO:3)
WECEKHSQPWQVLVA (a.к. 29-43 SEQ ID NO:3)
5 KHSQPWQVLVASRGR (a.к. 33-47 SEQ ID NO:3)
PWQVLVASRGRAVCG (a.к. 37-51 SEQ ID NO:3)
LVASRGRAVCGGVLV (a.к. 41-55 SEQ ID NO:3)
RGRAVCGGVLVHPQW (a.к. 45-59 SEQ ID NO:3)
10 VCGGVLHPOWVLTA (a.к. 49-63 SEQ ID NO:3)
VLVHPQWVLTAAHCI (a.к. 53-67 SEQ ID NO:3)
PQWVLTAAHCIRNKS (a.к. 57-71 SEQ ID NO:3)
LTAAHCIRNKS VILL (a.к. 61-75 SEQ ID NO:3)
HCIRNKS VILLGRHS (a.к. 65-79 SEQ ID NO:3)
15 NKS VILLGRHSLFHP (a.к. 69-83 SEQ ID NO:3)
ILLGRHSLFHPEDTG (a.к. 73-87 SEQ ID NO:3)
RHSLFHPEDTGQVFQ (a.к. 77-91 SEQ ID NO:3)
FHPEDTGQVFQVSHS (a.к. 81-95 SEQ ID NO:3)
20 DTGQVFQVSHSFPH (a.к. 85-99 SEQ ID NO:3)
VFQVSHSFPHPLYDM (a.к. 89-103 SEQ ID NO:3)
SHSFPHPLYDMSLLK (a.к. 93-107 SEQ ID NO:3)
PHPLYDMSLLKNRFL (a.к. 97-111 SEQ ID NO:3)
YDMSLLKNRFLRPGD (a.к. 101-115 SEQ ID NO:3)
25 LLKNRFLRPGDDSSH (a.к. 105-119 SEQ ID NO:3)
RFLRPGDDSSHDML (a.к. 109-123 SEQ ID NO:3)
PGDDSSHDMLLRLS (a.к. 113-127 SEQ ID NO:3)
SSHDMLLRLSEPAE (a.к. 117-131 SEQ ID NO:3)
30 LMLLRLSEPAELTDA (a.к. 121-135 SEQ ID NO:3)
RLSEPAELTDAVKVM (a.к. 125-139 SEQ ID NO:3)
PAELTDAVKVMDLPT (a.к. 129-143 SEQ ID NO:3)
TDAVKVMDLPTQEPA (a.к. 133-147 SEQ ID NO:3)
KVMDLPTQEPALGTT (a.к. 137-151 SEQ ID NO:3)
35 LPTQEPALGTTTCYAS (a.к. 141-155 SEQ ID NO:3)
EPALGTTTCYASGWGS (a.к. 145-159 SEQ ID NO:3)
GTTTCYASGWGSIEPE (a.к. 149-163 SEQ ID NO:3)
YASGWGSIEPEEFLT (a.к. 153-167 SEQ ID NO:3)
40 WGSIEPEEFLTPKKL (a.к. 157-171 SEQ ID NO:3)
EPEEFLTPKKLQCVD (a.к. 161-175 SEQ ID NO:3)
FLTPKKLQCVDLHVI (a.к. 165-179 SEQ ID NO:3)
KKLQCVDLHVISNDV (a.к. 169-183 SEQ ID NO:3)
CVDLHVISNDVCAQV (a.к. 173-187 SEQ ID NO:3)
45 HVISNDVCAQVHPQK (a.к. 177-191 SEQ ID NO:3)
NDVCAQVHPQKVTKF (a.к. 181-195 SEQ ID NO:3)
AQVHPQKVTKFMLCA (a.к. 185-199 SEQ ID NO:3)
PQKVTKFMLCAGRWT (a.к. 189-203 SEQ ID NO:3)
50 TKFMLCAGRWTGGKS (a.к. 193-207 SEQ ID NO:3)
LCAGRWTGGKSTCSG (a.к. 197-211 SEQ ID NO:3)
RWTGGKSTCSGDSGG (a.к. 201-215 SEQ ID NO:3)
GKSTCSGDSGGPLVC (a.к. 205-219 SEQ ID NO:3)

CSGDSGGPLVCNGVL (а.к. 209-223 SEQ ID NO:3)
 SGGPLVCNGVLQGIT (а.к. 213-227 SEQ ID NO:3)
 LVCNGVLQGTTSWGS (а.к. 217-231 SEQ ID NO:3)
 5 GVLQGITSWGSEPCA (а.к. 211-235 SEQ ID NO:3)
 GITSWGSEPCALPER (а.к. 225-239 SEQ ID NO:3)
 WGSEPCALPERPSLY (а.к. 229-243 SEQ ID NO:3)
 PCALPERPSLYTKW (а.к. 233-247 SEQ ID NO:3)
 PERPSLYTKWHYRK (а.к. 237-251 SEQ ID NO:3)
 10 SLYTKVVHYRKWIKD (а.к. 241-255 SEQ ID NO:3)
 KVVHYRKWIKDTIVA (а.к. 245-259 SEQ ID NO:3)
 YRKWIKDTIVANP (а.к. 249-261 SEQ ID NO:3)
 Последовательность из 94 пептидов OPL PAP:
 MRAAPLLLARAASLS (а.к. 1-15 SEQ ID NO:4)
 15 PLLARAASLSLGFL (а.к. 5-19 SEQ ID NO:4)
 ARAASLSLGFLFLF (а.к. 9-23 SEQ ID NO:4)
 SLSLGFLFLFFWLD (а.к. 13-27 SEQ ID NO:4)
 GFLFLFFWLDRSVL (а.к. 17-31 SEQ ID NO:4)
 20 LFFWLDRSVLAKEL (а.к. 21-35 SEQ ID NO:4)
 WLDRSVLAKELKFVT (а.к. 25-39 SEQ ID NO:4)
 SVLAKELKFVTLVFR (а.к. 29-43 SEQ ID NO:4)
 KELKFVTLVFRHGDR (а.к. 33-47 SEQ ID NO:4)
 FVTLVFRHGDRSPID (а.к. 37-51 SEQ ID NO:4)
 25 VFRHGDRSPIDTFPT (а.к. 41-55 SEQ ID NO:4)
 GDRSPIDTFPTDPIK (а.к. 45-59 SEQ ID NO:4)
 PIDTFPTDPIKESSW (а.к. 49-63 SEQ ID NO:4)
 FPTDPIKESSWPQGF (а.к. 53-67 SEQ ID NO:4)
 30 PIKESSWPQGFQGLT (а.к. 57-71 SEQ ID NO:4)
 SSWPQGFQGLTQLGM (а.к. 61-75 SEQ ID NO:4)
 QGFGQLTQLGMEQHY (а.к. 65-79 SEQ ID NO:4)
 QLTQLGMEQHYELGE (а.к. 69-83 SEQ ID NO:4)
 LGMEQHYELGEYIRK (а.к. 74-87 SEQ ID NO:4)
 35 QHYELGEYIRKRYRK (а.к. 77-91 SEQ ID NO:4)
 LGEYIRKRYRKFLNE (а.к. 81-95 SEQ ID NO:4)
 IRKRYRKFLNESYKH (а.к. 85-99 SEQ ID NO:4)
 YRKFLNESYKHEQVY (а.к. 89-103 SEQ ID NO:4)
 40 LNESYKHEQVYIRST (а.к. 93-107 SEQ ID NO:4)
 YKRHEQWTRSTOVDR (а.к. 97-111 SEQ ID NO:4)
 QVYIRSTDVDRTLMS (а.к. 101-115 SEQ ID NO:4)
 RSTDVDRTLMSAMTN (а.к. 105-119 SEQ ID NO:4)
 VDRTLMSAMTNLAAL (а.к. 109-123 SEQ ID NO:4)
 45 LMSAMTNLAALFPPE (а.к. 113-127 SEQ ID NO:4)
 MTNLAALFPPEGVSI (а.к. 117-131 SEQ ID NO:4)
 AALFPPEGVSIWNPI (а.к. 121-135 SEQ ID NO:4)
 PPEGVSIWNPILLWQ (а.к. 125-139 SEQ ID NO:4)
 50 VSIWNPILLWQPIPV (а.к. 129-143 SEQ ID NO:4)
 NPILLWQPIPVHTVP (а.к. 133-147 SEQ ID NO:4)
 LWQPIPVHTVPLSED (а.к. 137-151 SEQ ID NO:4)
 IPVHTVPLSEDQLLY (а.к. 141-155 SEQ ID NO:4)

TVPLSEDQLLYLPFR (a.к. 145-159 SEQ ID NO:4)
SEDQLLYLPFRNCPR (a.к. 149-163 SEQ ID NO:4)
LLYLPFRNCPRFQEL (a.к. 153-167 SEQ ID NO:4)
PFRNCPRFQELESET (a.к. 157-171 SEQ ID NO:4)
5 CPRFQELESETLKSE (a.к. 161-175 SEQ ID NO:4)
QELESETLKSEEFQK (a.к. 165-179 SEQ ID NO:4)
SETLKSEEFQKRLHP (a.к. 169-183 SEQ ID NO:4)
KSEEFQKRLHPYKDF (a.к. 173-187 SEQ ID NO:4)
10 FQKRLHPYKDFIATL (a.к. 177-191 SEQ ID NO:4)
LHPYKDFIATLGKLS (a.к. 181-195 SEQ ID NO:4)
KDFIATLGKLSGLHG (a.к. 185-199 SEQ ID NO:4)
ATLGKLSGLHGQDLF (a.к. 189-203 SEQ ID NO:4)
KLSGLHGQDLFGIWS (a.к. 193-207 SEQ ID NO:4)
15 LHGQDLFGIWSKVYD (a.к. 197-211 SEQ ID NO:4)
DLFGIWSKVYDPLYC (a.к. 201-215 SEQ ID NO:4)
IWSKVYDPLYCESVH (a.к. 205-219 SEQ ID NO:4)
VYDPLYCESVHNFTL (a.к. 209-223 SEQ ID NO:4)
20 LYCESVHNFTLPSWA (a.к. 213-227 SEQ ID NO:4)
SVHNFTLPSWATEDT (a.к. 217-231 SEQ ID NO:4)
FTLPSWATEDTMTKL (a.к. 221-235 SEQ ID NO:4)
SWATEDTMTKLRELS (a.к. 225-239 SEQ ID NO:4)
EDTMTKLRELSLSL (a.к. 229-243 SEQ ID NO:4)
25 TKLRELSLSLSLY. (a.к. 234-247 SEQ ID NO:4)
ELSELSLSLSLYGIHK (a.к. 237-251 SEQ ID NO:4)
LSLSLSLYGIHKQKEK (a.к. 241-255 SEQ ID NO:4)
SLYGIHKQKEKSRLQ (a.к. 245-259 SEQ ID NO:4)
30 IHKQKEKSRLQGGVL (a.к. 249-263 SEQ ID NO:4)
KEKSRLQGGVLVNEI (a.к. 253-267 SEQ ID NO:4)
RLQGGVLVNEILNHM (a.к. 257-271 SEQ ID NO:4)
GVLVNEILNHMKRAT (a.к. 261-275 SEQ ID NO:4)
NEILNHMKRATQIPS (a.к. 265-279 SEQ ID NO:4)
35 NHMKRATQIPSYKKL (a.к. 269-283 SEQ ID NO:4)
RATQIPSYKKLIMYS (a.к. 274-287 SEQ ID NO:4)
IPSYKKLIMYSAHDT (a.к. 277-291 SEQ ID NO:4)
KKLIMYSAHDTTVSG (a.к. 281-295 SEQ ID NO:4)
40 MYSAHDTTVSGLQMA (a.к. 285-299 SEQ ID NO:4)
HDTTVSGLQMALDVY (a.к. 289-303 SEQ ID NO:4)
VSGLQMALDVYNGLL (a.к. 293-307 SEQ ID NO:4)
QMALDVYNGLLPPYA (a.к. 297-311 SEQ ID NO:4)
DVYNGLLPPYASCHL (a.к. 301-315 SEQ ID NO:4)
45 GLLPPYASCHLTELY (a.к. 305-319 SEQ ID NO:4)
PYASCHLTELYFEKG (a.к. 309-323 SEQ ID NO:4)
CHLTELYFEKGEYFV (a.к. 313-327 SEQ ID NO:4)
ELYFEKGEYFVEMY (a.к. 317-331 SEQ ID NO:4)
50 EKGEYFVEMYRNET (a.к. 321-335 SEQ ID NO:4)
YFVEMYRNETQHEP (a.к. 325-339 SEQ ID NO:4)
MYRNETQHEPYPLM (a.к. 329-343 SEQ ID NO:4)
NETQHEPYPLMLPGC (a.к. 333-347 SEQ ID NO:4)

HEPYPLMLPGCSPSC (а.к. 337-351 SEQ ID NO:4)
 PLMLPGCSPSCPLER (а.к. 341-355 SEQ ID NO:4)
 PGCSPSCPLERFAEL (а.к. 345-359 SEQ ID NO:4)
 PSCPLERFAELVGPV (а.к. 349-363 SEQ ID NO:4)
 5 LERFAELVGPVIPQD (а.к. 353-367 SEQ ID NO:4)
 AELVGPVIPQDWSTE (а.к. 357-371 SEQ ID NO:4)
 GPVIPQDWSTECMTT (а.к. 361-375 SEQ ID NO:4)
 PQDWSTECMTTNSHQ (а.к. 365-379 SEQ ID NO:4)
 10 STECMTTNSHQGTED (а.к. 369-383 SEQ ID NO:4)
 MTTNSHQGTEDSTD (а.к. 373-386 SEQ ID NO:4)

Последовательность 44 пептидов ТАА МНС класса I с соответствующими ТАА и положением в последовательности ТАА:

Пептиды: Последовательность

15 PSMA

4-12 LLHETDSAV (а.к. 4-12 SEQ ID NO:7)
 109-117 ELAHYDVLL (а.к. 109-117 SEQ ID NO:7)
 168-176 PSLYTKVVHY (а.к. 168-176 SEQ ID NO:7)
 20 173-181 DLVYVNYAR (а.к. 173-181 SEQ ID NO:7)
 178-186 NYARTEDFF (а.к. 178-186 SEQ ID NO:7)
 199-207 KIVIARYGK (а.к. 199-207 SEQ ID NO:7)
 207-215 KVFRGNKVK (а.к. 207-215 SEQ ID NO:7)
 227-235 LYSDPADYF (а.к. 227-235 SEQ ID NO:7)
 25 260-268 NLNGAGDPL (а.к. 260-268 SEQ ID NO:7)
 347-356 HSTNGVTRIY (а.к. 347-356 SEQ ID NO:7)
 354-363 RIYNVIGTLR (а.к. 354-363 SEQ ID NO:7)
 403-411 GTLKKEGWR (а.к. 403-411 SEQ ID NO:7)
 30 431-440 STEWAEENSR (а.к. 431-440 SEQ ID NO:7)
 441-450 LLQERGVAYI (а.к. 441-450 SEQ ID NO:7)
 461-469 TLRVDCTPL (а.к. 461-469 SEQ ID NO:7)
 557-566 ETYELVEKFY (а.к. 557-566 SEQ ID NO:7)
 641-649 EIASKFSER (а.к. 641-649 SEQ ID NO:7)
 35 663-671 MMNDQLMFL (а.к. 663-671 SEQ ID NO:7)
 680-688 GLPDRPFYR (а.к. 680-688 SEQ ID NO:7)
 711-719 ALFDIESKV (а.к. 711-719 SEQ ID NO:7)

PSCA

40 7-15 ALLMAGLAL (а.к. 7-15 SEQ ID NO:8)
 14-22 ALQPGTALL (а.к. 14-22 SEQ ID NO:8)
 21-30 LLCYSCKAQV (а.к. 21-30 SEQ ID NO:8)
 76-84 DYYVGKKNI (а.к. 76-84 SEQ ID NO:8)
 108-116 ALLPALGLL (а.к. 108-116 SEQ ID NO:8)
 45 109-117 LLPALGLLL (а.к. 109-117 SEQ ID NO:8)
 115-123 LLLWGPGQ (а.к.:115-123 SEQ ID NO:8)

STEAP 1

86-94 FLYTLLREV (а.к. 86-94 SEQ ID NO:9)
 50 HQQYFYKIPILVINK (а.к. 102-116 SEQ ID 102-116 NO:9)
 262-270 LLLGTIHAL (а.к. 262-270 SEQ ID NO:9)
 292-300 MIAVFLPIV (а.к. 292-300 SEQ ID NO:9)

PTHrp

42-51 QLLHDKGKS (а.к. 42-51 SEQ ID NO:10)
 59-68 FLHHLIAEIH (а.к. 59-68 SEQ ID NO:10)
 59-65 FLHHLIA (а.к. 59-65 SEQ ID NO:10)
 165-173 TSTTSLELD (а.к. 165-173 SEQ ID NO:10)

5

TARP
 4-13 FPPSPLFFFL (а.к. 4-13 SEQ ID NO:11)
 27-35 FVFLRNFSL (а.к. 27-35 SEQ ID NO:11)
 29-37 FLRNFSML (а.к. 29-37 SEQ ID NO:11)

10

Простеин
 31-39 CLAAGITYV (SEQ ID NO:12)
 Eph
 58-66 IMNDMPIYM (SEQ ID NO:13)
 550-558 VLAGVGFFI (SEQ ID NO:14)

15

Сурвивин
 96-104 LTLGEFLKL (SEQ ID NO:15)
 hTERT
 973-981 KLFGVLRK (SEQ ID NO:16)

20

HER2
 665-673 WLGWFGT- (SEQ ID NO:17)

Последовательность 15 пептидов ТАА МНС класса II с соответствующими ТАА и положением в последовательности ТАА.

Калликреин 4

25

125-139 SVSESDTIRSIAS (SEQ ID NO:18)
 155-169 LLANGRMPTVLQCVN (SEQ ID NO:19)
 160-174 RMPTVLQCVNVSWS (SEQ ID NO:20)

Гистон H4

30

GAKRHRKVLDRDNIQG (а.к. 14-28 SEQ ID 14-28 NO:21)
 KRHRKVLDRDNIQGITKPAIRRLAR (а.к. 16-39 16-39 SEQ ID NO:21)
 TKPAIRRLARRGGVK (а.к. 31-45 SEQ ID 31-45 NO:21)
 LIYEETRGVLKVFLE (а.к. 49-63 SEQ ID 49-63 NO:21)
 TYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQG (а.к. 71-94 71-94 SEQ ID NO:21)

35

TARP
 1-14 MQMFPPSPLFFFLQ (SEQ ID NO:11) 14-27 QLLKQSSRRLEHTF (SEQ ID NO:11)
 ENAH (hMena)

40

502-510 TMNGSKSPV (SEQ ID NO:22) PSMA
 TGNFSTQKVKMHIHS (а.к. 334-348 SEQ ID
 334-348 NO:7)
 NYTLRVDCTPLMYSL (а.к. 459-473 SEQ ID
 459-473 NO:7)

45

YRHVIYAPSSHNKYA (а.к. 687-701 SEQ ID
 687-701 NO:7)
 RQIYVAAFTVQAAAE (а.к. 730-744 SEQ ID
 730-744 NO:7)

После 40 часов инкубации при 37°C, 5% CO₂, секрецию IFN-γ детектировали с 1 мкг/мл биотинилированного антитела против человеческого IFN-γ (Mabtech, клон МАb 7-B6-1, Кат. №3420-6) с последующим добавлением комплекса стрептавидин-щелочная фосфатаза (BD Pharmingen, Кат. №554065), разведенного 1/5000. Планшеты ELISpot проявляли с Vector Blue Substrate (Vector Lab Inc., Кат. № SK-5300) и пятна

50

подсчитывали автоматическим ридером пятен (Cellular Technology Ltd. ImmunoSpot S3B Analyzer и профессиональное программное обеспечение CTL ImmunoSpot 4.0). Как показано на Фиг.12, предсуществующий ответ Т-клеток на PSA детектировали до обработки MVA-BN-PRO у пациента J-D-1001. (Число) Т-клеток против PSA
 5 значительно возрастало после обработки, тогда как Т-клетки против PAP определялись только после обработки. Эти данные показывают, что MVA-BN-PRO является иммуногенным у людей, и что может достигаться одновременная индукция как ответов против PSA, так и против PAP. Обработка MVA-BN-PRO также
 10 приводила к сильному Т-клеточному ответу на вектор MVA-BN. Важнее всего то, что обработка MVA-BN-PRO также приводила к распространению Т-клеточных ответов на другие опухолевые антигены, что иллюстрируется продукцией IFN- γ Т-клетками, стимулированными пулами пептидов ТАА ГКГ 1 и II. Это указывает на то, что MVA-BN-PRO-индуцированные иммунные ответы приводили к умерщвлению опухолевых
 15 клеток с последующим усилением противоопухолевых ответов на другие опухолевые антигены. Распространение антигенов является важным событием в индукции противоопухолевого защитного иммунитета, так как оно предупреждает выход опухоли из под удара ответов, индуцированных вакциной. Следовательно, способность MVA-BN-PRO опосредовать иммунные ответы на два опухолевых
 20 антигена у людей является свойством, которое обеспечивает эффективную иммунотерапию.

Формула изобретения

- 25 1. Способ лечения ракового пациента-человека, включающий введение данному пациенту рекомбинантного модифицированного вируса коровьей оспы Анкара (MVA), кодирующего полипептид, содержащий человеческий простато-специфический антиген (PSA), и полипептид, содержащий антиген человеческой простатической
 30 кислой фосфатазы (PAP).
2. Способ по п.1, где MVA представляет собой MVA-BN (модифицированный вирус коровьей оспы Анкара - баварский северный (Bavarian Nordic)).
3. Способ по п.1, где вирус MVA содержит нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2.
- 35 4. Способ по п.1, где антиген PSA и антиген PAP вставлены в межгенную область 014L/015L MVA.
5. Способ по п.1, где рак представляет собой рак простаты.
6. Способ по п.1, где рак представляет собой метастатический рак простаты.
- 40 7. Способ по п.1, где рекомбинантный MVA вводят перед введением дозы таксана, уничтожающей опухолевые клетки.
8. Способ по п.1, где рекомбинантный MVA вводят в то же самое время, что и дозу таксана, уничтожающую опухолевые клетки.
9. Способ по п.1, где рекомбинантный MVA вводят после введения дозы таксана,
 45 уничтожающей опухолевые клетки.
10. Способ по п.7, где таксан представляет собой доцетаксел или паклитаксел.
11. Способ по п.9, где таксан представляет собой доцетаксел или паклитаксел.
12. Набор для профилактики рака простаты, содержащий:
 50 (а) рекомбинантный MVA, кодирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PSA, и полипептид, содержащий человеческий антиген PAP; и
 (б) инструкции для введения данного рекомбинантного MVA до обнаружения рака простаты.

13. Набор для лечения рака простаты, содержащий:

(а) рекомбинантный MVA, кодирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PSA, и полипептид, содержащий человеческий антиген PAP; и

5 (б) инструкции для введения данного рекомбинантного MVA пациенту с раком простаты.

14. Набор по п.13, дополнительно содержащий инструкции для введения данного рекомбинантного MVA до, в то же самое время или после лечения дозой таксана, уничтожающей опухолевые клетки.

10 15. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный вирус MVA, кодирующий полипептид, содержащий человеческий антиген PAP, и полипептид, содержащий человеческий антиген PSA, где данная иммуногенная композиция индуцирует В-клеточные и Т-клеточные иммунные ответы против PSA и PAP при введении хозяину-человеку.

15 16. Иммуногенная композиция по п.15, индуцирующая антитела против PSA и PAP при введении хозяину-человеку.

17. Иммуногенная композиция по п.16, где данный рекомбинантный вирус MVA содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1.

20 18. Иммуногенная композиция по п.16, где данный рекомбинантный вирус MVA содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

19. Иммуногенная композиция по п.16, где данный рекомбинантный вирус MVA содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 и нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

25 20. Иммуногенная композиция по п.16, где вирус MVA представляет собой MVA-BN, депонированный в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) под регистрационным номером V00083008.

30 21. Способ индукции В-клеточных и Т-клеточных иммунных ответов против PAP и PSA, включающий введение пациенту-человеку примирующей дозы рекомбинантного MVA, кодирующего полипептид, содержащий человеческий антиген PAP, и полипептид, содержащий человеческий антиген PSA, и введение одной или более бустер-дозы рекомбинантного MVA, кодирующего полипептид, содержащий антиген PAP, и полипептид, содержащий человеческий антиген PSA.

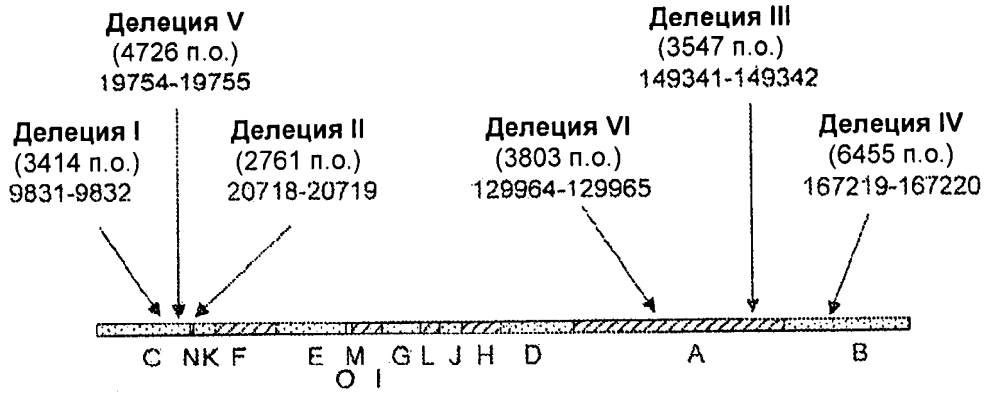
35 22. Способ по п.21, где пациенту вводят примирующую дозу $1 \cdot 10^8$ TCID₅₀ (средняя цитопатогенная доза) и две бустер-дозы $2 \cdot 10^8$ и $4 \cdot 10^8$ TCID₅₀.

40 23. Способ по п.22, где бустер-дозы дают через четыре и восемь недель после примирующей дозы.

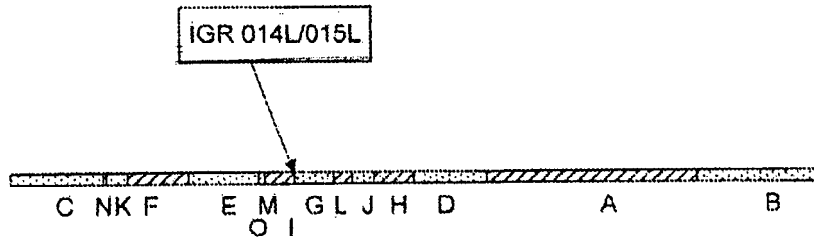
45

50

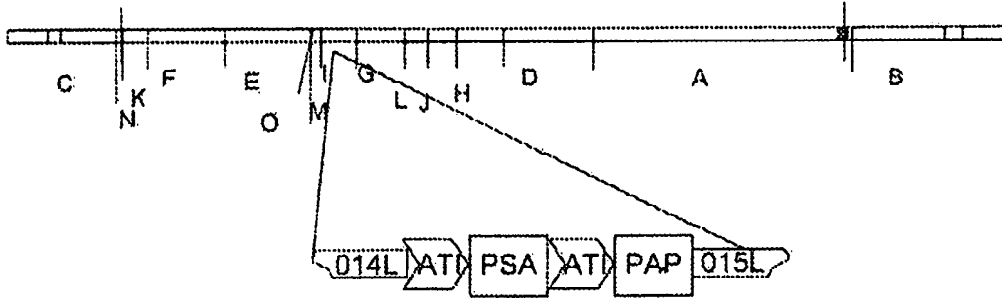
A



Б

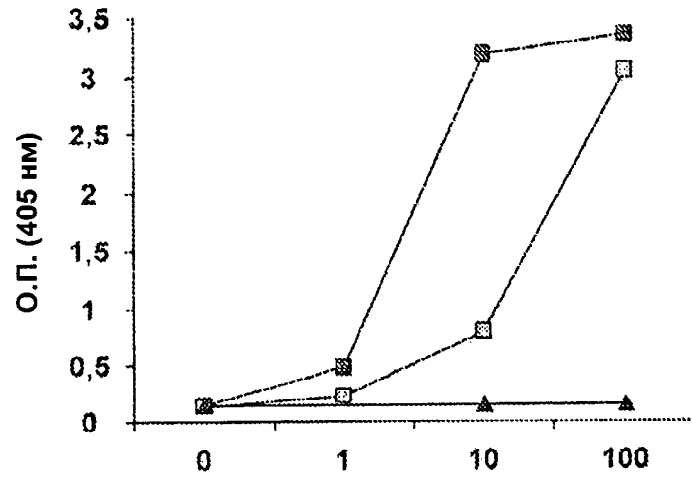


Фиг. 1

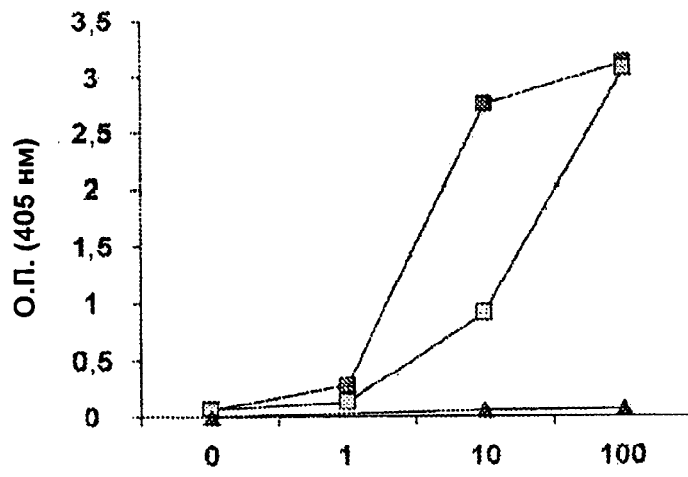


Фиг. 2

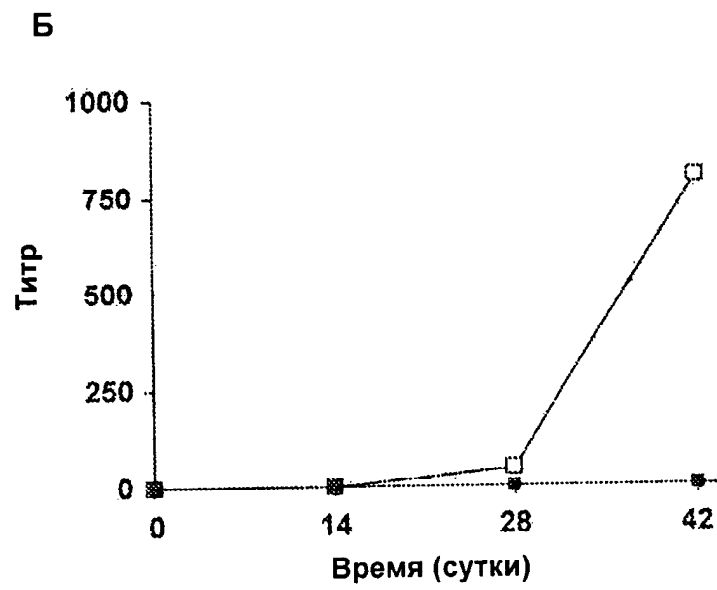
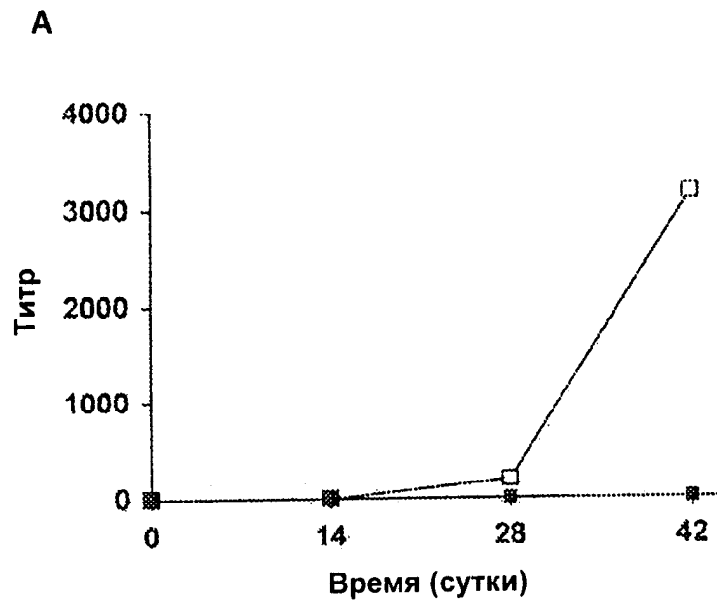
А



Б

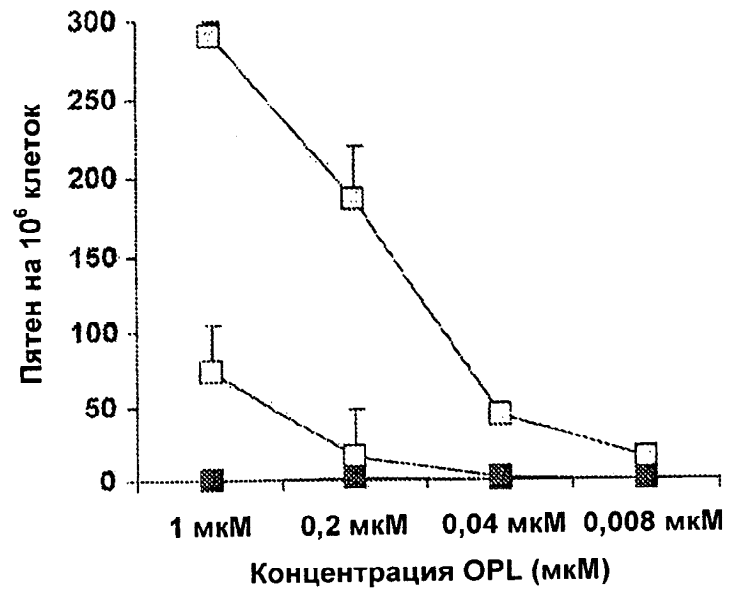


Фиг. 3

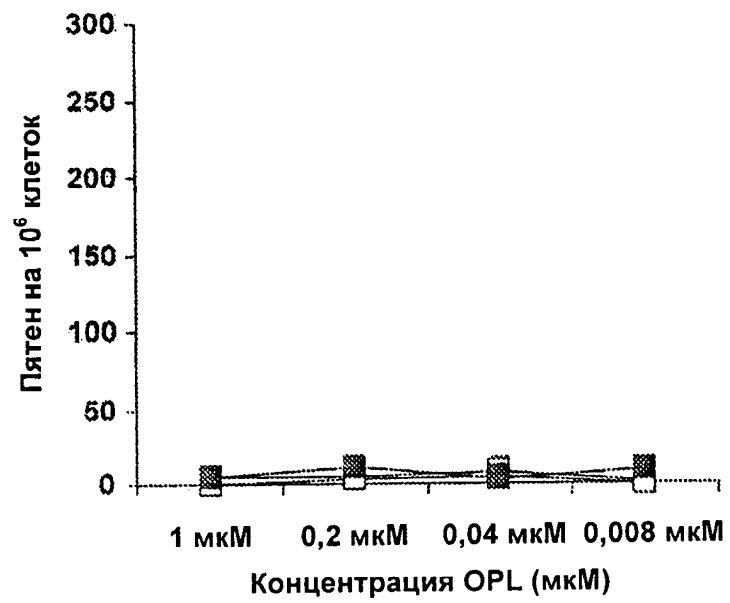


Фиг. 4

А

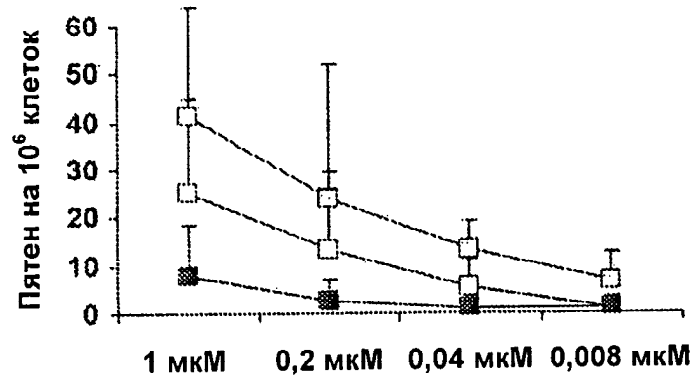


Б

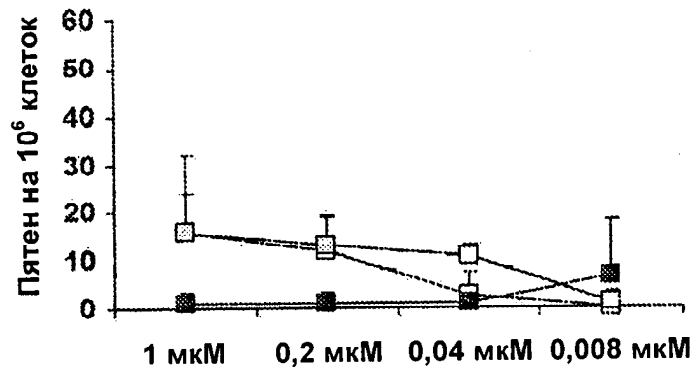


Фиг. 5

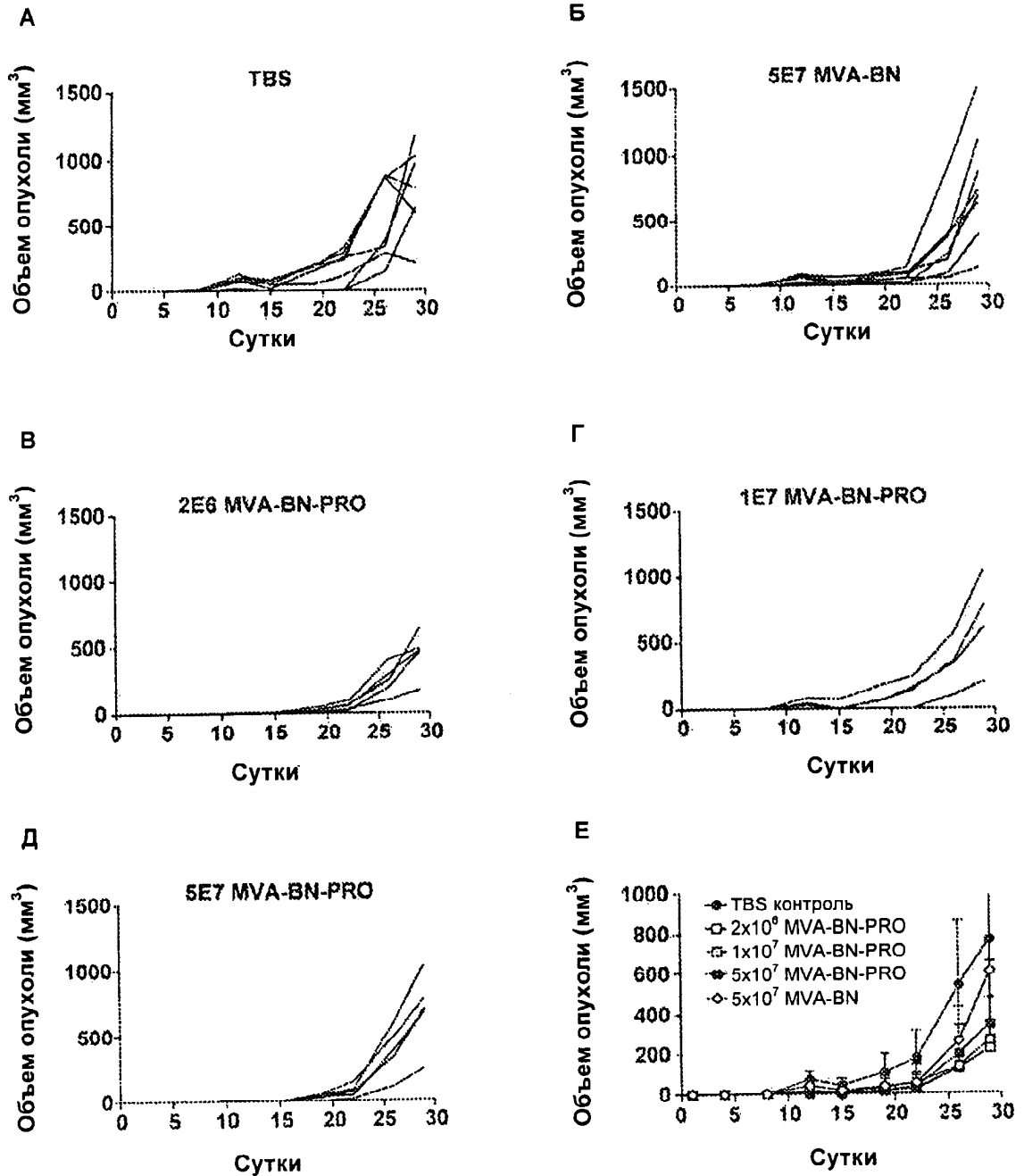
А



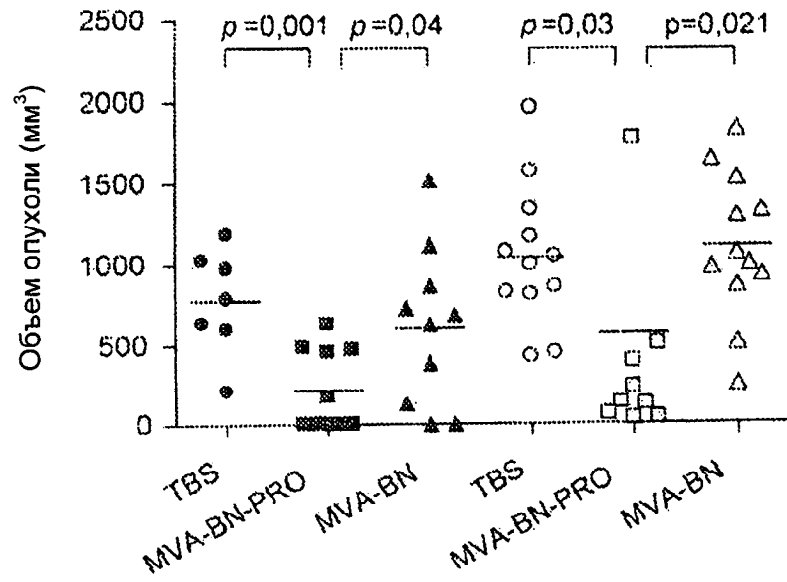
Б



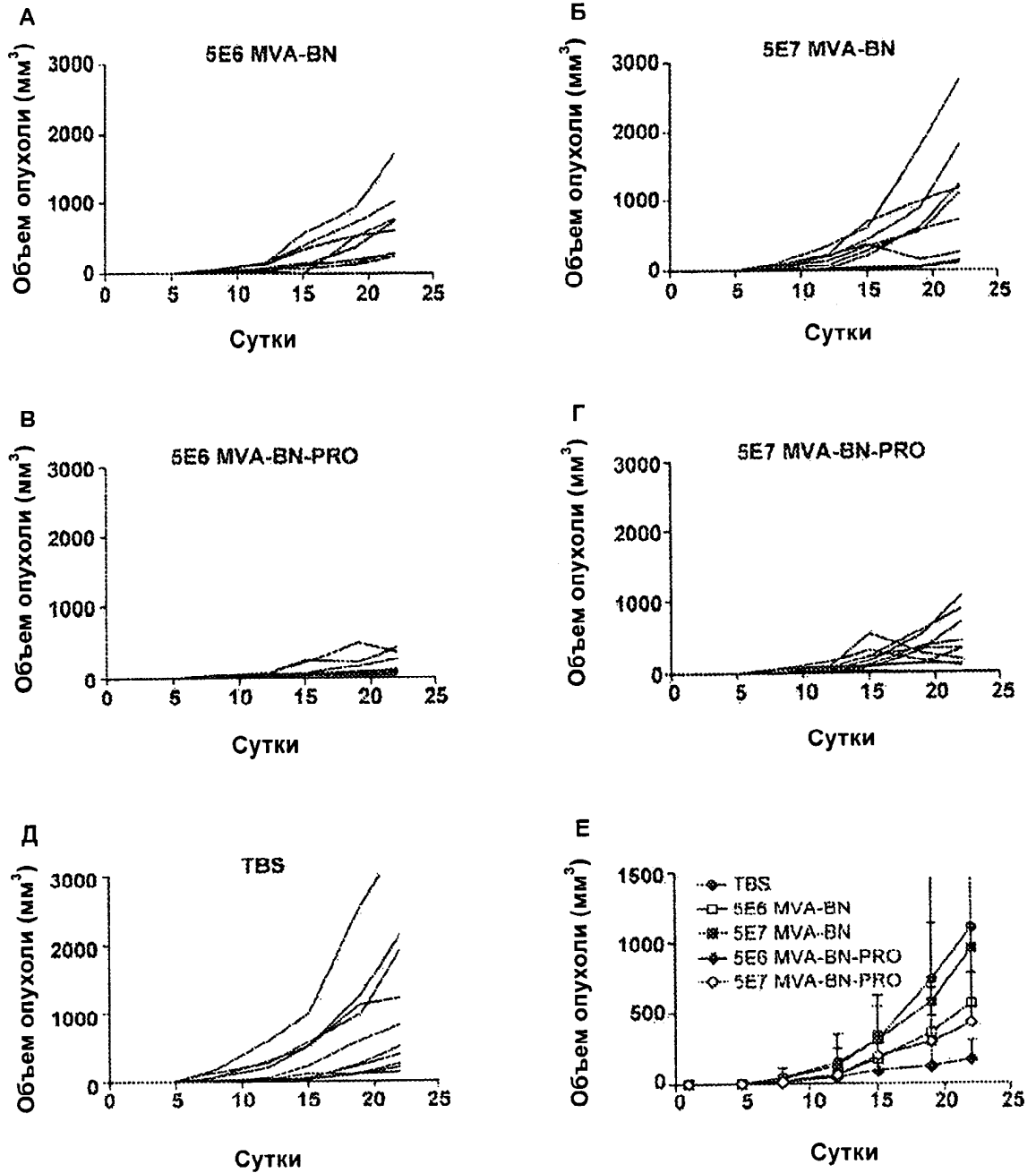
Фиг. 6



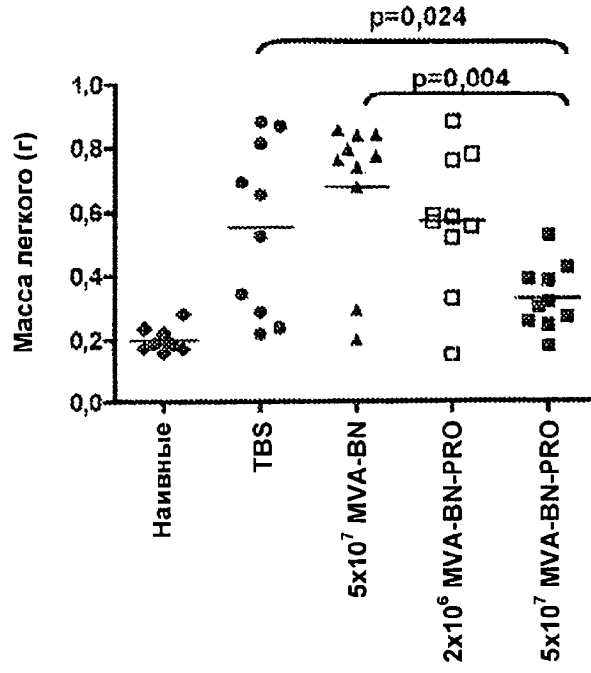
Фиг. 7



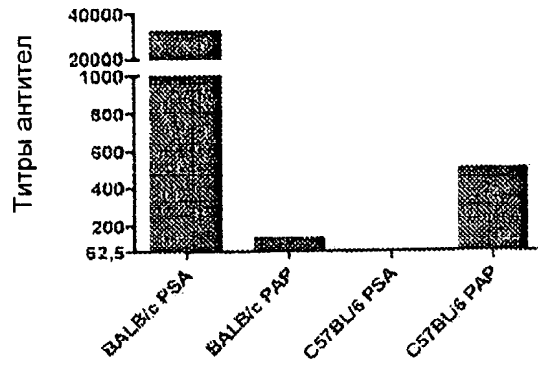
Фиг. 8



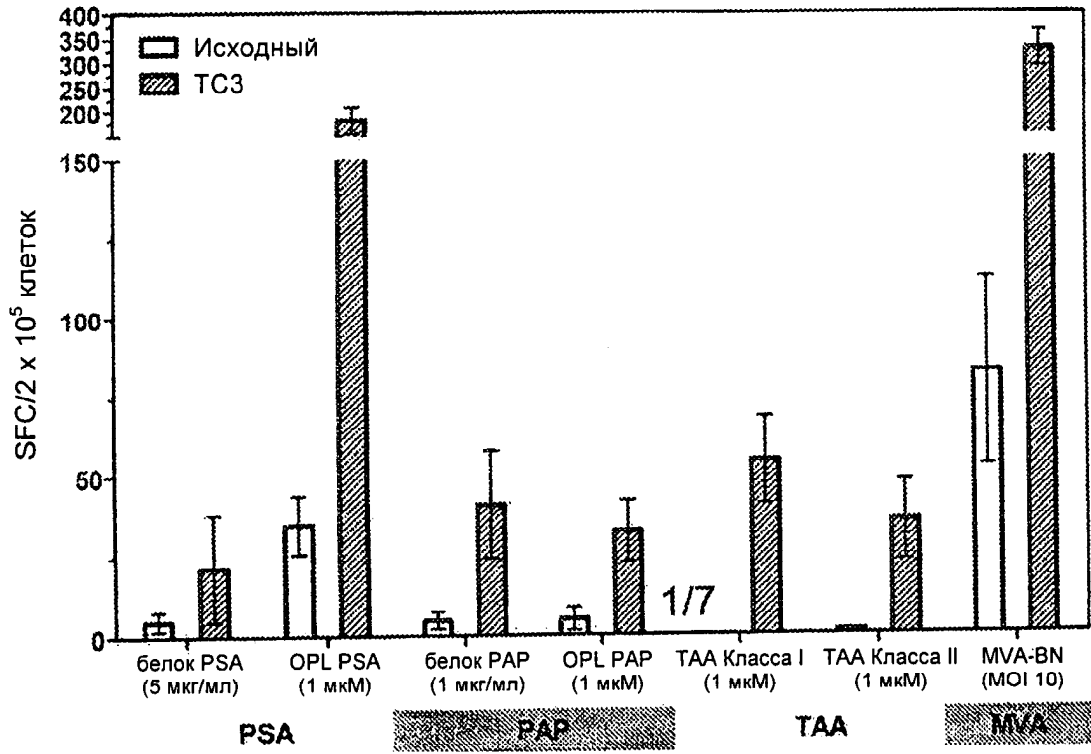
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12