



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011142612/15, 23.03.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.03.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.03.2009 EP 09305256.1

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2013 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 20.02.2015 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EP 0958826 A1, 24.11.1999 . US 20050164168 A1, 28.06.2005. MARAVEYAS A. et al. Possible improved survival of patients with stage IV AJCC melanoma receiving SRL 172 immunotherapy: Correlation with induction of increased levels of intracellular interleukin-2 in peripheral blood lymphocytes., Annals of Oncology, 1999 Jul;10(7):817-24. Найдено в Интернет (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 24.10.2011

(86) Заявка РСТ:
EP 2010/053755 (23.03.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/108908 (30.09.2010)

Адрес для переписки:
105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

Брюс АКРЕ (FR),
Беранжера МАРИ-БАСТЬЕН (FR)

(73) Патентообладатель(и):

ТРАНСЖЕНЕ СА (FR)

(54) БИОМАРКЕР ДЛЯ МОНИТОРИНГА ПАЦИЕНТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунотерапии, и может быть использовано для оценки эффективности лечения у пациента с раком. Для этого пациенту вводят иммуногенную композицию, которая содержит рекомбинантный вирусный вектор, экспрессирующий in vivo весь или часть MUC-1 антигена. При этом способ анализа включает получение биологического

образца от пациента после введения указанной иммуногенной композиции и измерение уровней интерферона γ в образце. Уровни интерферона γ выше приблизительно 4 пг/мл свидетельствуют о том, что пациент демонстрирует успешный клинический выход для лечения. Изобретение позволяет оценить клинический результат лечения рака у пациента. 14 з.п. ф-лы., 3 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

[он-лайн], 20.03. 2014 на сайте <http://annonc.oxfordjournals.org/content/10/7/817.full.pdf>. SEITZ M. et al. Induction of antinuclear antibodies in patients with rheumatoid arthritis receiving treatment with human recombinant interferon gamma, Ann Rheum Dis. Aug 1988; 47(8): 642-644. PMCID: PMC1006714. Найдено из Интернета [он-лайн] 25.03.2014 на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1006714>

R U
2 5 4 2 4 3 5
C 2

R U
2 5 4 2 4 3 5
C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)*G01N 33/574* (2006.01)*G01N 33/50* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011142612/15, 23.03.2010**(24) Effective date for property rights:
23.03.2010

Priority:

(30) Convention priority:
24.03.2009 EP 09305256.1(43) Application published: **27.04.2013** Bull. № 23(45) Date of publication: **20.02.2015** Bull. № 5(85) Commencement of national phase: **24.10.2011**(86) PCT application:
EP 2010/053755 (23.03.2010)(87) PCT publication:
WO 2010/108908 (30.09.2010)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
seksija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**Brjus AKRE (FR),
Beranzhera MARI-BAST'EN (FR)**

(73) Proprietor(s):

TRANSZhENE SA (FR)(54) **BIOMARKER FOR PATIENT'S MONITORING**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to immune therapy, and can be used to assess the efficacy of treating the patients suffering cancer. That is ensured by administering an immunogenic composition, which contains a recombinant viral vector expressing in vivo the whole MUC-1 antigen or a portion thereof. A method for analysing preparing a

biological sample from a patient after the above immunogenic composition has been introduced, and measuring interferon γ in the sample. If interferon γ is more than approximately 4 pg/ml the patient is suggested to show the favourable clinical outcome.

EFFECT: invention assessing the clinical response to the cancer treatment in the patient.

15 cl, 3 dwg, 1 ex

Настоящее изобретение принадлежит к области иммунотерапии и относится к способам определения эффективности известных иммунотерапевтических способов лечения. Способы в соответствии с изобретением включают измерение специального биомаркера через некоторое время после инициации иммунотерапевтического лечения для оценки клинического результата указанного лечения. Изобретение, таким образом, имеет применения в области медицины.

Традиционные методики вакцинации, вовлекающие введение в систему животного антигена (например, пептидов, белков), который может индуцировать иммунный ответ и, таким образом, защищать указанное животное, например, от инфекции, являются известными в течение многих лет. Такие методики дополнительно включают разработку как живых, так и инактивированных вакцин. Живые вакцины типично представляют собой аттенуированные непатогенные варианты инфекционного агента, которые являются способными стимулировать иммунный ответ, направленный против патогенного варианта инфекционного агента.

В последние годы были достигнуты успехи в разработке рекомбинантных вакцин, в частности, рекомбинантных живых вакцин, в которых чужеродные антигены, представляющие интерес, кодируются и экспрессируются из вектора. Среди них векторы на основе рекомбинантных вирусов были продемонстрированы как многообещающие и такие, которые играют важную роль в разработке вакцин. Многие вирусы были исследованы на их способность экспрессировать белки из чужеродных патогенов или опухолевой ткани, а также индуцировать специфические иммунологические ответы против этих антигенов *in vivo*. В общем случае, такие основанные на генах вакцины могут стимулировать мощные гуморальный и клеточный иммунные ответы, вирусные векторы могут также представлять собой эффективную стратегию как для доставки генов, кодирующих антиген, так и для того, чтобы способствовать и усиливать презентацию антигена. Для того чтобы использоваться в качестве носителя вакцины, идеальный вирусный вектор должен быть безопасным и позволять осуществлять эффективную презентацию необходимых специфических для патогена антигенов иммунной системе. Кроме того, векторная система должна соответствовать критерию, который позволяет осуществлять ее воспроизведение на промышленной основе. Таким образом, на сегодняшний день было получено несколько вирусных вакцинных векторов, все они обладают относительными преимуществами и ограничениями в зависимости от предложенного применения (для обзора рекомбинантных вирусных вакцин смотри, например, Harrop и Carroll, 2006, *Front Biosci.*, 11, 804-817; Yokoyama и др., 1997, *J Vet Med Sci.*, 59, 311-322). Применение указанных рекомбинантных вакцин обычно называется нацеленной иммунотерапией или специфической для антигена и активной иммунотерапией.

После наблюдения, сделанного в ранние 1990-ые, что векторы на основе плазмидной ДНК могут непосредственно трансфицировать клетки животных *in vivo*, значительные усилия исследователей были предприняты для разработки методик иммунотерапии, которые основываются на применении ДНК плазмид для индукции иммунного ответа, путем непосредственного введения в животных ДНК, которая кодирует антигены. Такие методики, которые также упоминаются как ДНК вакцинация или ДНК иммунотерапия, сейчас используются для того, чтобы вызвать протективный иммунный ответ в большом количестве моделей болезней. Для обзора ДНК вакцин смотри Reyes-Sandoval и Ertl, 2001 (*Current Molecular Medicine*, 1, 217-243).

Однако общая проблема в области иммунотерапии представляла собой идентификацию средств для индукции достаточно сильного иммунного ответа у

подвергнутых лечению индивидуумов для защиты их от инфекции и заболевания.

Таким образом, например, основное усилие в последние годы было направлено на открытие новых лекарственных соединений, которые действуют путем стимуляции определенных ключевых аспектов иммунной системы и которые будут служить для повышения иммунного ответа, индуцированного вакцинами. Большинство из этих соединений, называемых модификаторами иммунного ответа (IRM) или адьювантами, как выяснилось, оказывают воздействие посредством основных механизмов иммунной системы с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR) для индукции биосинтеза различных важных цитокинов (например, интерферонов, интерлейкинов, фактора некроза опухоли, и т.д., смотри, например, Schiller и др., 2006, *Exp Dermatol.*, 15, 331-341). Эти соединения были продемонстрированы как такие, которые стимулируют быстрое высвобождение определенных цитокинов, имеющих происхождение от дендритных клеток, моноцитов/макрофагов, а также являются способными стимулировать В-клетки для секреции антител, которые играют важную роль в антивирусной и противоопухолевой активности IRM соединений.

Альтернативно, были предложены стратегии вакцинации, большинство из которых являются основанными на режиме вакцинации примирования - повторной иммунизации. В соответствии с этими прописями вакцинации "примирования - повторной иммунизации" иммунная система сначала подвергается индукции путем введения пациенту примирующей композиции, а потом подвергается стимуляции путем введения второй композиции для повторной вакцинации (смотри, например, EP 1411974 или US 20030191076).

Кроме того, было продемонстрировано, что в контексте здравоохранения одна обработка может быть эффективной только в специфической группе пациентов. Таким образом, является желательным обеспечить врачей средствами и способами, которые будут позволять им сократить оптимальные персонализированные способы терапии пациента, то есть назначать правильную терапию правильному пациенту в правильное время для обеспечения более высокого успеха лечения, для мониторинга ответа на такое лечение, для повышения эффективности лекарственного средства и безопасности, для устранения лечения, не являющегося необходимым для пациентов, для которых терапия не является приемлемой, для того, чтобы уберечь пациента от токсичности, не являющейся необходимой, а также побочных эффектов, для снижения затрат пациентов и страховых агентств на не являющееся необходимым или опасное неэффективное лечение, а также для повышения качества жизни пациентов, в конечном счете, сделав рак контролируемым заболеванием, путем последовательного осуществления анализов в зависимости от конкретного случая.

В это связи в литературе предлагаются различные средства и способы, такие, как например:

- Фармакогенетика, которая заключается в исследовании индивидуального ответа на лекарственные средства в качестве функции генетических различий. Эти ответы относятся к тому, как лекарственное средство функционирует у какого-либо данного индивидуума, как оно метаболизируется, его токсичность и необходимые дозировки. С исследованиями в области генома человека фармакогенетика развилась в фармакогеномику. Фармакогеномика выходит за рамки фармакогенетик, и имеет потенциал для обнаружения применений от открытия лекарственного средства, разработки, выявления цели и апробации до клинических испытаний;

- Метаболомика может также применяться в области предсказательной медицины. В отличие от фармакогенетики, которая является ограниченной генетическими

факторами, фармакометаболизма является способной предсказать ответ индивидуума на лекарственное средство, основываясь не только на генетических факторах, но также и на негенетических факторах, таких, как другие лекарственные средства в организме пациента, состояние здоровья пациента в данный момент времени и т.д.;

5 - Роль биомаркеров становится все более важной в клинической разработке терапевтических средств. Биомаркер может представлять собой индикатор нормальных биологических процессов, процессов заболевания или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство. Их роль колеблется от разделения популяции пациентов в отношении оказания помощи для идентификации пациентов, которые отвечают на
10 лечение, против пациентов, не отвечающих на лечение, для определения эффективности терапевтического средства. Биомаркеры могут быть ценным средством в принятии лучших решений, которые будут снижать затраты на разработку лекарственного средства и позволят терапевтическим методам достичь правильной популяции пациентов быстрее.

15 Изобретение обеспечивает материалы и способы для оценки эффективности лечения, вовлекающего введение иммуногенной композиции пациенту (то есть, терапевтическое лечение) при использовании биологических маркеров (биомаркеров), которые были определены как существенно надежная характеристика, которая коррелирует с
20 желаемым иммунным ответом. Биомаркеры являются присутствующими в биологических образцах, полученных от пациента. Способность предсказания клинического выхода лечения вскоре после его начала позволит клиническим врачам и пациентам идентифицировать неэффективную терапию, принимать основанные на достоверной информации решения, относящиеся к курсу лечения, включая стоит ли
25 отказаться от или позволить осуществить альтернативное терапевтическое вмешательство.

Как используется в данном случае по всей заявке, термины "любой" или "какой-либо" используются в смысле того, что они означают "по крайней мере, один", "по крайней мере, первый", "один или более" или "множество" из указанных соединений или этапов, если в контексте не указывается иное. Например, термин "любая клетка" включает
30 множество клеток, включая их смеси. В частности, "по крайней мере, один" и "один или более" означает количество, которое составляет один или более одного, с особым предпочтением для одного, двух или трех.

Термин "и/или" при использовании где-либо в данной заявке включает значение "и", "или" и "все или какая-либо другая комбинация элементов, связанных с указанным
35 термином".

Термин "приблизительно" или "около", как используется в данной заявке, имеет значение в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5%.

40 Термины "пациент", "субъект" относятся к позвоночному животному, в частности, представителю видов млекопитающих, и включают, но без ограничения, домашних животных, спортивных животных, приматов, включая людей.

Как используется в данной заявке, термин "лечение" или "процесс лечения" охватывает профилактику и/или терапию. В соответствии с этим иммуногенные комбинации или
45 способы настоящего изобретения не являются ограниченными терапевтическими применениями и могут использоваться для профилактики. Это охватывается в данной заявке термином "для развития профилактического или терапевтического ответа, предпочтительно иммунного ответа". "Профилактика" не является ограниченной предотвращением немедленного заболевания (например, инфекционного заболевания),

этот термин дополнительно охватывает предотвращение долгосрочных последствий этих инфекций, таких как цирроз или рак.

"Эффективное количество" или "достаточное количество" активного соединения представляет собой количество, достаточное для достижения выгодных или желательных результатов, включая клинические результаты. Эффективное количество может вводиться в один или более приемов. "Терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для достижения выгодных клинических результатов, включая, но без ограничения, ослабление одного или более симптомов, ассоциированных с развитием опухоли, вирусной инфекцией, а также предотвращение заболевания (например, предотвращение одного или более симптомов инфекции).

В соответствии с первым воплощением настоящее изобретение относится к материалам и способам для мониторинга, модификации или корректировки лечения, вовлекающего введение иммуногенной композиции пациенту. Эти материалы и способы основываются на уровнях, по крайней мере, одного биомаркера у пациента, и включают этапы измерения в биологическом образце пациента (например, сыворотке или плазме) уровней, по крайней мере, одного биомаркера, по крайней мере, один раз после начала лечения. В соответствии с предпочтительным воплощением указанный биомаркер представляет собой гамма интерферон (интерферон γ или INF γ).

Изобретение обеспечивает ex-vivo способ для оценки эффективности лечения, вовлекающего введение иммуногенной композиции пациенту (то есть, иммунотерапевтического лечения).

В соответствии с изобретением термин "оценка" будет пониматься как "мониторинг, модификация или корректировка" лечения, вовлекающего введение иммуногенной композиции пациенту.

В некоторых аспектах способ включает оценку эффективности иммунотерапевтического лечения на основе уровней интерферона γ у пациента после иммунотерапевтического лечения.

В некоторых воплощениях способ включает измерение уровней интерферона γ у пациента после иммунотерапевтического лечения; и оценку эффективности иммунотерапевтического лечения на основе уровней интерферона γ .

В некоторых воплощениях способ включает измерение уровней интерферона γ пациента, по крайней мере, один раз через несколько недель осуществления иммунотерапевтического лечения; и оценку эффективности иммунотерапевтического лечения на основе уровней интерферона γ .

В некоторых воплощениях способ может дополнительно включать измерение уровней интерферона γ у пациента перед осуществлением иммунотерапевтического лечения.

Время от начала иммунотерапевтического лечения до измерения уровней интерферона γ может составлять от 1 дня до приблизительно 48 недель или более (например, от приблизительно 1 дня до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 недели до приблизительно 2 недель, от приблизительно 2 недель до приблизительно 4 недель, от приблизительно 4 недель до приблизительно 8 недель, от приблизительно 8 недель до приблизительно 12 недель, от приблизительно 12 недель до приблизительно 16 недель, от приблизительно 16 недель до приблизительно 24 недель, от приблизительно 24 недель до приблизительно 48 недель, или более). В предпочтительном воплощении изобретения временной интервал составляет 5 недель. Подобно этому, могут быть проведены дополнительные измерения (то есть, третье, четвертое, пятое и т.д. измерения) с подобными временными интервалами после второго измерения.

В соответствии со специальным воплощением изобретения "иммунотерапевтическое

лечение" состоит из, по крайней мере, одного введения иммуногенной композиции пациенту. В соответствии со специальным воплощением "иммунотерапевтическое лечение" состоит из последовательных введений иммуногенной композиции пациенту, при этом оно включает еженедельные введения в течение, по крайней мере, 2 недель, предпочтительно в течение, по крайней мере, 6 недель.

В близких аспектах способ включает определение уровней интерферона γ у пациента после введения иммуногенной композиции пациенту; сравнение указанных уровней с пороговым значением; и оценку эффективности иммунотерапевтического лечения на основе уровней интерферона γ по сравнению с пороговым значением.

В соответствии со специальным воплощением изобретения "уровень интерферона γ " означают способный к определению уровень интерферона γ , "способный к определению" определяется как такой, который является $\geq$ границы определения, более предпочтительно, границы определения используемого анализа/метода для измерения уровня интерферона γ (Luminex, Elisa и т.д.). Эта граница определения для одного из указанных анализа/способа легко определяется традиционным способом.

В соответствии со специальным воплощением пороговое значение и/или предел определения составляет приблизительно 4 пг/мл (например, 4,6 пг/мл в плазме крови), предпочтительно измеренное с помощью профиля для измерения белка плазмы крови Multi-analyte при использовании Luminex® системы (смотри Пример 1). Для квалифицированного специалиста при использовании другого анализа/способа (например, Elisa) не будет составлять сложности определить для специфического анализа эквивалент указанного порогового значения и/или границы определения, составляющей приблизительно 4 пг/мл при измерении с помощью профиля для измерения белка плазмы крови Multi-analyte при использовании Luminex® системы. В соответствии со специальными воплощениями указанное пороговое значение в соответствии с изобретением может быть определено как пороговое значение, эквивалентное пороговому значению, измеренному с помощью профиля для измерения белка плазмы крови Multi-analyte при использовании Luminex® системы. Под "пороговым значением, эквивалентным пороговому значению, измеренному с помощью профиля для измерения белка плазмы крови Multi-analyte при использовании Luminex® системы" понимают пороговое значение, которое идентифицирует тех же пациентов, как было идентифицировано с помощью порогового значения, измеренного с помощью профиля для измерения белка плазмы крови Multi-analyte при использовании Luminex® системы.

В соответствии со специальным воплощением изобретение относится к способу оценки эффективности лечения, вовлекающему введение иммуногенной композиции пациенту, который включает:

(i) введение одной или более доз указанной иммуногенной композиции указанному субъекту;

(ii) измерение уровня интерферона γ в организме указанного субъекта, по крайней мере, после одного из указанных введений.

В соответствии со специальным воплощением изобретение касается способа оценки эффективности лечения, вовлекающего введение иммуногенной композиции пациенту, который включает:

(i) введение одной или более доз указанной иммуногенной композиции указанному субъекту;

(ii) измерение уровня интерферона γ в организме указанного субъекта, по крайней мере, после одного из указанного(ых) введения(ий);

(iii) где уровни интерферона γ выше приблизительно 4 пг/мл (например, 4,6 пг/мл),

измеренные с помощью профиля для измерения белка плазмы крови Multi-analyte при использовании Luminex® системы, свидетельствуют о том, что субъект является таким, который демонстрирует успешный клинический выход для лечения, то есть повышение коэффициента выживания.

5 В соответствии с альтернативным воплощением изобретения способ в соответствии с изобретением дополнительно включает начальный этап, состоящий из измерения уровней интерферона γ уровни в организме пациента перед введением иммуногенной композиции.

10 В соответствии с настоящим изобретением уровень интерферона γ измеряется в биологическом образце, полученном от пациента. Биологические образцы включают, но не являются ограниченными таковыми, кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, твердые образцы тканей, такие, как кусочки биопсии. В предпочтительном воплощении биологический образец представляет собой кровь, плазму или сыворотку, в случае которых получение образца от пациента представляет 15 собой относительно простую и неинвазивную процедуру. Способы получения крови или сыворотки являются хорошо известными в области техники и не являются частью изобретения.

Кроме того, являются известными многочисленные способы для определения и количественной оценки полипептидов, включая биомаркеры в соответствии с настоящим 20 изобретением. Такие способы включают, но без ограничения, способы при использовании антител, в частности способы на основе моноклональных антител. Частные способы для определения и количественной оценки биомаркеров не являются важными для данного изобретения. Например, материалы и способы настоящего изобретения могут использоваться с методикой Luminex (Luminex Corporation, Austin, 25 Тех.) или иммуносорбентным ферментным анализом (ELISA, многочисленные наборы ELISA являются коммерчески доступными, например, от CliniScience, Diaclone, Biosource).

Как используется в данной заявке, термины "иммуногенная композиция" "вакцинная композиция", "вакцина" или подобные термины могут использоваться попеременно и означают агент, приемлемый для стимуляции/индукции/усиления иммунной системы 30 субъекта для облегчения существующего состояния или для защиты от, или для снижения настоящего или будущего вреда или инфекций (включая вирусные, бактериальные, паразитарные инфекции), например, сниженную пролиферацию опухолевых клеток или выживание, сниженную репликацию патогена или распространение в организме субъекта или способное к определению снижение нежелательного(ых) симптома(ов), 35 ассоциированного(ых) с состоянием, продление выживания пациента. Указанная иммуногенная композиция может содержать (i) весь или часть, по крайней мере, одного целевого антигена и/или (ii) по крайней мере, один рекомбинантный вектор экспрессирующий *in vivo* всю или часть, по крайней мере, одной гетерологичной нуклеотидной последовательности, в частности, гетерологичной нуклеотидной 40 последовательности, кодирующей весь или часть, по крайней мере, одного целевого антигена. В соответствии с альтернативным воплощением иммуногенная композиция в соответствии с изобретением включает (iii) по крайней мере, один модификатор иммунного ответа, самостоятельно или в комбинации с (i) и/или (ii). Примеры таких модификаторов иммунного ответа (IRM), включают CpG олигонуклеотиды (смотри 45 US 6,194,388; US 2006094683; WO 2004039829, например), липополисахариды, комплексы полиинозиновой : полицитидиловой кислоты (Kadowaki, и др., 2001, J. Immunol. 166, 2291-2295), полипептиды и белки, известные для индукции продукции цитокинов из дендритных клеток и/или моноцитов/макрофагов. Другие примеры таких модификаторов

иммунного ответа (IRM) представляют собой малые органические молекулы, такие, как имидазохинолинамины, имидазопиридинамины, 6,7-слитые циклоалкилимидазопиридинамины, имидазонафтиридинамины, оксазолхинолинамины, тиазолхинолинамины и 1,2-соединенные мостиковой связью имидазолхинолинамины (смотри, например, US 4,689,338; US 5,389,640; US 6,110,929 и US 6,331,539).

Как используется в данной заявке, термин "антиген" относится к любому веществу, включая комплексные антигены (например, опухолевых клеток, инфицированных вирусом клеток и т.д.), которые являются способными быть мишенью иммунного ответа. Антиген может быть мишенью, например, для клеточного и/или гуморального иммунного ответа, возникающего у пациента. Термин "антиген" охватывает, например, все или часть вирусных антигенов, специфические для опухоли или связанные с опухолью антигены, бактериальные антигены, паразитарные антигены, аллергены и подобные им:

- Вирусные антигены включают, например, антигены из вирусов гепатита А, В, С, D и Е, ВИЧ, вирусов герпеса, цитомегаловируса, вируса ветряной оспы, папилломавирусов, вируса Эпштейна-Барра, вирусов гриппа, вирусов парагриппа, аденовирусов, вирусов коксаки, пикорнавирусов, ротавирусов, респираторно-синцитиальных вирусов, вирусов оспы, риновирусов, вируса краснухи, паповавируса, вируса эпидемического паротита, вируса кори; некоторые неограничивающие примеры известных вирусных антигенов включают следующие: антигены, имеющие происхождение от ВИЧ-1, такие, как tat, nef, gp120 или gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpi, rev или их часть и/или комбинации; антигены, имеющие происхождение от вирусов герпеса человека, такие, как gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE или gD или их часть и/или комбинации или предранний белок, такой, как asICP27, ICP47, ICP4, ICP36 из HSV1 или HSV2; антигены, имеющие происхождение от цитомегаловируса, в частности цитомегаловируса человека, такие, как gB или его производные; антигены, имеющие происхождение от вируса Эпштейна-Барра, такие, как gp350 или его производные; антигены, имеющие происхождение от вируса ветряной оспы, такие, как gp1, 11, 111 и IE63; антигены, имеющие происхождение от вируса гепатита, такие, как антиген вируса гепатита В, гепатита С или гепатита Е (например, env белок Е1 или Е2, сердцевинный белок, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7, или их части и/или комбинации HCV); антигены, имеющие происхождение от папилломавирусов человека (например, HPV6, 11, 16, 18, например, L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, или их части и/или комбинации); антигены, имеющие происхождение от других вирусных патогенов, таких, как респираторно-синцитиальный вирус (например, F и G белки или их производные), вируса парагриппа, вируса кори, вируса эпидемического паротита, флавивирусов (например, вируса желтой лихорадки, вируса Денге, вируса клещевого энцефалита, вируса японского энцефалита) или вируса гриппа (например, HA, NP, NA, или М белки, или их части и/или комбинации);

- Специфические для опухоли или родственные антигены включают, но без ограничения, такие карциномы, лимфомы, бластомы, саркомы и лейкемии. В частности, примеры видов рака включают рак молочной железы, рак предстательной железы, рак толстого кишечника, рак чешуйчатых клеток, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, желудочно-кишечный рак, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак желчного пузыря, гепатому, колоректальный рак, эндометриальную карциному, карциному слюнных желез, рак почки, рак печени, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, печеночную карциному и различные типы рака головы и шеи, ренальный рак,

злокачественную меланому, ларингеальный рак, рак предстательной железы. Раковые антигены представляют собой антигены, которые могут потенциально стимулировать очевидные специфические для опухоли иммунные ответы. Некоторые из этих антигенов кодируются, несмотря на то что с необходимостью не экспрессируются, нормальными клетками. Эти антигены могут характеризоваться как такие, которые в норме являются молчащими (то есть, не экспрессируются) в нормальных клетках, такими, которые экспрессируются только на низких уровнях или на определенных стадиях дифференциации, и те, которые экспрессируются временно, такие, как эмбрионные и фетальные антигены. Другие раковые антигены кодируются мутантными клеточными генами, такими как онкогены (например, активированный *ras* онкоген), супрессорные гены (например, мутант *p53*), слитые белки, возникающие в результате внутренних делеций или хромосомных транслокаций. Другие раковые антигены могут кодироваться вирусными генами, например, такие, как те, которые имеют происхождение от РНК и ДНК опухолевых вирусов. Некоторые неограничивающие примеры специфических для опухоли или связанных с опухолью антигенов включают MART-1/Melan-A, gp100, дипептидилпептидазу IV (DPPIV), белок, связывающий аденозиндезаминазу (ADAbp), циклофилин b, колоректальный ассоциированный антиген (CRC)-C017-1A/GA733, карциноэмбриональный антиген (CEA) и его иммуногенные эпитопы CAP-1 и CAP-2, *etv6*, *ami1*, специфический антиген простаты (PSA) и его иммуногенные эпитопы PSA-1, PSA-2, и PSA-3, специфический мембранный антиген простаты (PSMA), Т-клеточный рецептор/СЭЗ-дзета цепь, MAGE-семейство опухолевых антигенов (например, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-AH, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), GAGE-семейство опухолевых антигенов (например, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, тирозиназа, *p53*, MUC семейство (например, MUC-1), HER2/neu, *p21ras*, RCAS1, альфа-фетобелок, Е-кадгерин, альфа-катенин, бета-катенин и гамма-катенин, *p120ctn*, gp100.sup.Pmel117, FRAME, NY-ESO-1, *cdc27*, белок, характерный для аденоматозного полипоза толстой кишки (APC), фодрин, коннексин 37, Ig-идиотип, *p15*, gp75, GM2 и GD2 ганглиозиды, вирусные продукты, такие, как белки вируса папилломы человека, Smad семейство опухолевых антигенов, Imp-1, PI A, кодируемый EBV ядерный антиген (EBNA)-1, гликогенфосфорилаза мозга, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 и CT-7 и *c-erbB-2*;

- бактериальные антигены включают, например, антигены, имеющие происхождение от *Mycobacteria*, которые вызывают ТБ и проказу, пневмококков, аэробных грам-негативных бацилл, микоплазм, стафилококковых инфекций, стрептококковых инфекций, сальмонеллы, хламидий, нейссерии;

- другие антигены включают, например, антигены, имеющие происхождение от возбудителей малярии, лейшманиоза, трипаносомоза, токсоплазмоза, шистосомоза, филяриоза;

В соответствии со специальным воплощением указанный антиген кодируется гетерологичной нуклеотидной последовательностью и экспрессируется *in vivo* с помощью рекомбинантного вектора.

В особенно предпочтительном воплощении гетерологичная нуклеотидная последовательность в соответствии с настоящим изобретением кодирует один или более из всего или части следующих антигенов HBV-PreSI PreS2 и поверхностных *env* белков, сердцевинного и polHIV-gp120 gp40, gp160, p24, gag, pol, env, vif, vpr, vpu, tat, rev, nef;

HPV-E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, L1, L2 (смотри, например, WO 90/10459, WO 98/04705, WO 99/03885); HCV env белка E1 или E2, сердцевинного белка, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7 (смотри, например, WO 2004111082, WO 2005051420); Muc-1 (смотри, например, US 5,861,381; US6,054,438; WO 98/04727; WO 98/37095).

- 5 В соответствии с вариантами данного изобретения иммуногенная композиция содержит, по крайней мере, два антигена или гетерологичную нуклеотидную последовательность, которая кодирует, по крайней мере, два антигена, или, по крайней мере, гетерологичные нуклеотидные последовательности, которые кодируют, по крайней мере, два антигена, или любую их комбинацию.
- 10 В соответствии с другим специальным воплощением указанная гетерологичная нуклеотидная последовательность в соответствии с настоящим изобретением кодирует все или часть HPV антигены(ов), выбранных из группы, состоящей из E6 раннего кодирующего участка HPV, E7 раннего кодирующего участка HPV, их производных и комбинаций.
- 15 HPV антиген, кодируемый рекомбинантным вектором в соответствии с изобретением, является выбранным из группы, состоящей из E6 полипептида HPV, E7 полипептида HPV или как E6 полипептида HPV, так и E7 полипептида HPV. Настоящее изобретение охватывает применение любого E6 полипептида HPV, связывание которого с p53 изменяется или, по крайней мере, значительно снижается, и/или применение любого E7
- 20 полипептида HPV, связывание которого с Rb изменяется или, по крайней мере, значительно снижается (Munger и др., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105; Crook и др., 1991, Cell 67, 547-556; Heck и др., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446; Phelps и др., 1992, J. Virol. 66, 2148-2427). Неонкогенный E6 вариант HPV-16, который является приемлемым для цели настоящего изобретения, имеет делецию одного или более аминокислотных
- 25 остатков, которые размещаются от приблизительно положения 118 до приблизительно положения 122 (+1, который представляет собой первый остаток метионина нативного E6 полипептида HPV-16), с особым предпочтением для полной делеции остатков от 118 до 122 (CPPEEK). Неонкогенный E7 HPV-16 вариант, который является приемлемым для цели настоящего изобретения, имеет делецию одного или более аминокислотных
- 30 остатков, которые размещаются от приблизительно положения 21 до приблизительно положения 26 (+1 который представляет собой первый остаток метионина нативного E7 полипептида HPV-16), с особым предпочтением для полной делеции остатков от 21 до 26 (DLYCYE). В соответствии с предпочтительным воплощением один или более ранний(их) полипептид(ов) HPV-16, которые используются в изобретении, является
- 35 (являются) дополнительно модифицированным(и) так, что улучшают презентацию МНС класса I и/или МНС класса II, и/или стимулируют анти-HPV иммунитет. E6 и E7 полипептиды HPV представляют собой ядерные белки, и ранее было продемонстрировано, что мембранная презентация позволяет улучшить их терапевтическую эффективность (смотри, например, WO 99/03885). Таким образом,
- 40 может быть желательным модифицировать, по крайней мере, один из ранних полипептидов HPV так, чтобы прикрепить его к клеточной мембране. Прикрепление к мембране может быть легко достигнуто путем встраивания в ранний полипептид HPV последовательности прикрепления к мембране, и если в нативном полипептиде она отсутствует, то и последовательности секреции (то есть, сигнального пептида).
- 45 Последовательности прикрепления к мембране и секреторные последовательности являются известными в области техники. Кратко, секреторные последовательности присутствуют на N-терминальном конце презентуемых на мембране или секретируемых полипептидов и инициируют их поступление в эндоплазматический

ретикулум (ER). Они обычно включают от 15 до 35 существенно гидрофобных аминокислот, которые потом удаляются с помощью специфической размещенной на ER эндопептидазы с получением зрелого полипептида. Последовательности прикрепления к мембране обычно являются высоко гидрофобными по своей природе и служат для прикрепления полипептидов к клеточной мембране (смотри, например Branden и Tooze, 1991, в Introduction to Protein Structure стр.202-214, NY Garland).

Выбор последовательностей прикрепления к мембране и секреторных последовательностей, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, является обширным. Они могут быть получены из любого прикрепленного к мембране и/или секретируемого полипептида, включающего их (например, клеточных или вирусных полипептидов), таких, как гликопротеин вируса бешенства, гликопротеин оболочки ВИЧ или F белок вируса кори, или могут быть синтетическими.

Последовательности прикрепления к мембране и/или секреторные последовательности, встроенные в каждый из ранних полипептидов HPV-16, используемых в соответствии с изобретением, могут иметь общее или отличное происхождение. Предпочтительный сайт встраивания секреторной последовательности представляет собой N-терминальный конец ниже от кодона инициации трансляции, а таковой для последовательности прикрепления к мембране представляет собой C-терминальный конец, например, непосредственно выше от стоп-кодона.

HPV Е6 полипептид для применения в настоящем изобретении предпочтительно является модифицированным путем встраивания секреторных сигналов и сигналов связывания с мембраной F белка вируса кори. Необязательно или в комбинации, HPV Е7 полипептид для применения в настоящем изобретении предпочтительно является модифицированным путем встраивания секреторных сигналов и сигналов связывания с мембраной гликопротеина вируса бешенства.

Терапевтическая эффективность рекомбинантных векторов может также быть улучшена путем использования одной или более нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуностимуляторный(ые) полипептид(ы). Например, может быть предпочтительным связывать ранний(е) полипептид(ы) HPV с полипептидом, таким, как кальретикулин (Cheng и др., 2001, J. Clin. Invest. 108, 669-678), белок теплового шока 70 Mycobacterium tuberculosis (HSP70) (Chen и др., 2000, Cancer Res. 60, 1035-1042), убиквитин (Rodriguez и др., 1997, J. Virol. 71, 8497-8503) или транслокационный домен бактериального токсина, такой, как экзотоксин A Pseudomonas aeruginosa (ETA(dIII)) (Hung и др., 2001 Cancer Res. 61, 3698-3703).

В соответствии с другим воплощением рекомбинантный вектор в соответствии с изобретением включает нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более ранний (их) полипептид(ов), как определено выше, и в частности, ранние полипептиды Е6 и/или Е7 HPV-16 и/или HPV-18.

В соответствии с другим специальным и предпочтительным воплощением указанная гетерологичная нуклеотидная последовательность в соответствии с настоящим изобретением кодирует весь или часть MUC 1 антигена или его производной.

В соответствии с другим специальным воплощением указанная гетерологичная нуклеотидная последовательность в соответствии с настоящим изобретением кодирует один или более из всех или части из приведенных ниже: белок оболочки Е1 или Е2 HCV, сердцевинный белок, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7 или их производные, В соответствии с другим специальным воплощением указанная гетерологичная нуклеотидная последовательность в соответствии с настоящим изобретением кодирует один или более слитых белков, в которых конфигурация не является нативной в смысле

того, что, по крайней мере, один из NS полипептидов оказывается расположенным в таком порядке, который отличается от такого для нативной конфигурации. Таким образом, если слитый белок включает NS3 полипептид, NS4A полипептид и NS5B полипептид, то нативная конфигурация будет представлять собой NS3-NS4A-NS5B с NS3 на N-терминальном конце и NS5B на C-терминальном конце. В противовес этому, ненативная конфигурация может представлять собой NS5B-NS3-NS4A, NS5B-NS4A-NS3, NS4A-NS3-NS5B, NS4A-NS5B-NS3 или NS3-NS5B-NS4A. В частности, слитый белок в соответствии с изобретением включает, по крайней мере, один из следующих:

- NS4A полипептид, слитый непосредственно или через линкер с N-терминальным концом NS3 полипептида;
- NS3 полипептид, слитый непосредственно или через линкер с N-терминальным концом NS5B полипептида;
- NS4B полипептид, слитый непосредственно или через линкер с N-терминальным концом NS5B полипептида;
- NS4A полипептид, слитый непосредственно или через линкер с N-терминальным концом NS3 полипептида, который сливается непосредственно или с помощью линкера с N-терминальным концом NS4B полипептида; и/или
- NS3 полипептид, слитый непосредственно или через линкер с N-терминальным концом NS4B полипептида, который сливается непосредственно или с помощью линкера с N-терминальным концом NS5B полипептида.

В таких специфических частях слитого белка в соответствии с изобретением каждый из NS полипептидов может быть независимо нативным или модифицированным. Например, NS4A полипептид, содержащийся в NS4A-NS3 части, может быть нативным, в то время как NS3 полипептид включает, по крайней мере, одну модификацию, описанную ниже.

В случае необходимости, молекула нуклеиновой кислоты, которая используется в изобретении, может быть оптимизирована для обеспечения высокого уровня экспрессии нацеленного антигена (например, раннего(их) полипептида(ов)) HPV в частной хозяйской клетке или организме, например, в хозяйской клетке или организме человека. Типично, оптимизацию по кодонам осуществляют путем замены одного или более "нативного (ых)" (например, HPV) кодона(ов), соответствующего(их) кодоном, нечасто используемым в хозяйской клетке млекопитающих, одним или более кодоном(ами), который(ые) кодирует(ют) ту же аминокислоту, которая является более часто используемой. Этого можно достичь с помощью традиционного мутагенеза или с помощью методик химического синтеза (например, приводящих к получению синтетической нуклеиновой кислоты). Не является необходимым заменять все нативные кодоны, соответствующие редко используемым кодоном, поскольку повышенная экспрессия может быть достигнута даже при частичной замене. Кроме того, некоторые отклонения от строгого прикрепления для оптимизированного использования кодонов могут быть сделаны для согласования введения рестрикционного(ых) сайта(ов).

Как используется в данной заявке, термин "рекомбинантный вектор" относится к вирусным, а также невирусным векторам, включая экстрахромосомные (например, эписомные), мультикопийные и интегрирующие векторы (то есть, для встраивания в хозяйские хромосомы). Особенно важным в контексте изобретения являются векторы для применения в генной терапии (то есть те, которые являются способными к доставке нуклеиновой кислоты в хозяйский организм), а также экспрессионные векторы для применения в различных экспрессионных системах. Приемлемые невирусные векторы включают плазмиды, такие, как pREP4, pCEP4 (Invitrogene), pCI (Promega), pCDM8 (Seed,

1987, Nature 329, 840), pVAX и pgWiz (Gene Therapy System Inc; Himoudi и др., 2002, J. Virol. 76, 12735-12746). Приемлемые вирусные векторы могут представлять собой такие, которые имеют происхождение от разнообразных вирусов (например, ретровирусов, аденовирусов, AAV, вируса оспы, вируса герпеса, вируса кори, пенистого вируса и подобных им). Как используется в данной заявке, термин "вирусный вектор" охватывает ДНК/РНК вектор, а также полученные из него вирусные частицы. Вирусные векторы могут быть репликационно компетентными, или могут быть генетически поврежденными для того, чтобы представлять собой такие с нарушенной репликацией. Термин "репликационно компетентные", как используется в данной заявке, охватывает селективные по репликации и условно репликативные вирусные векторы, которые являются сконструированными для лучшей или селективной репликации в специфических хозяйских клетках (например, опухолевых клетках).

В одном аспекте рекомбинантный вектор, который используется в изобретении, представляет собой рекомбинантный аденовирусный вектор (для обзора, смотри "Аденовирусные векторы для генной терапии", 2002, ред. D.Curiel и J.Douglas, Academic Press). Они могут быть получены из разнообразных человеческих и животных источников, при этом может использоваться любой серотип из серотипов аденовируса от 1 до 51. Особенно предпочтительными являются аденовирусы 2 (Ad2), 5 (Ad5), 6 (Ad6), 11 (Ad11), 24 (Ad24) и 35 (Ad35). Такие аденовирусы являются доступными из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Rockville, Md.), и были представлены многочисленными публикациями, описывающими их последовательность, организацию и способы получения, что позволяет специалисту в данной области техники применять их (смотри, например, US 6,133,028; US 6,110,735; WO 02/40665; WO 00/50573; EP 1016711; Vogels и др., 2003, J. Virol. 77, 8263-8271).

Аденовирусный вектор, используемый в настоящем изобретении, может быть компетентным по репликации. Многочисленные примеры репликативно компетентных аденовирусных векторов являются легко доступными для квалифицированного специалиста в данной области техники (смотри, например, Hernandez-Alcoceba и др., 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024; Nemunaitis и др., 2001, Gene Ther. 8, 746-759; Alemany и др., 2000, Nature Biotechnology 18, 723-727). Например, они могут быть сконструированы из генома аденовируса дикого типа путем делеции в E1A CR2 домене (смотри, например WO 00/24408) и/или путем замены нативных E1 и/или E4 промоторов специфическими для ткани, опухоли или состояния клетки промоторами (смотри, например US 5,998,205, WO 99/25860, US 5,698,443, WO 00/46355, WO 00/15820 и WO 01/36650).

Альтернативно, аденовирусный вектор, используемый в изобретении, является дефектным по репликации (смотри, например WO 94/28152; Lusky и др., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032). Предпочтительные дефектные по репликации аденовирусные векторы представляют собой E1-дефектный (смотри, например, US 6,136,594 и US 6,013,638), с E1 делецией, которая размещается приблизительно от положения 459 до положения 3328 или приблизительно от положения 459 до положения 3510 (со ссылкой на последовательность аденовируса человека типа 5, раскрытого в GeneBank под депозитным номером M 73260 и у Chroboczek и др., 1992, Virol. 186, 280-285). Клонированная способность может быть дополнительно улучшена путем делегирования дополнительной(ых) части(ей) аденовирусного генома (всего или части неэссенциального участка E3 или других эссенциальных участков E2, E4). Инсерция нуклеиновой кислоты в любом положении аденовирусного вектора может осуществляться посредством гомологичной рекомбинации, как описано у Chartier и др. (1996, J. Virol. 70, 4805-4810). Например, нуклеиновая кислота, кодирующая E6 полипептид HPV-16, может быть

встроена в замещение E1 участка, а нуклеиновая кислота, кодирующая E7 полипептид HPV-16, может быть встроена в замещение E3 участка или наоборот.

В другом предпочтительном аспекте вектор, используемый в изобретении, представляет собой вектор на основе вируса поксвируса (смотри, например Cox и др. в "Вирусы в генной терапии человека" ред. J.M.Hos, Carolina Academic Press). В соответствии с другим предпочтительным воплощением он является выбранным из группы, состоящей из вируса осповакцины, приемлемые вирусы осповакцины включают без ограничения штамм Copengagen (Goebel и др., 1990, Virol. 179, 247-266 и 517-563; Johnson и др., 1993, Virol. 196, 381-401), штамм Уайета и высоко аттенуированный вирус, который получен из него, включая MVA (для обзора смотри Mayr, A., и др., 1975, Infection 3, 6-14) и их производные (такие, как MVA вакцинный штамм 575 (ECACC V00120707 - US 6,913,752), NYVAC (смотри WO 92/15672 - Tartaglia и др., 1992, Virology, 188, 217-232). Определение полной последовательности генома MVA и сравнение ее с геномом Copenhagen VV позволило осуществить точную идентификацию семи делеций (I-VII), которые возникают в геноме MVA (Antoine и др., 1998, Virology 244, 365-396), любая из которых может использоваться для встраивания кодирующей антиген нуклеиновой кислоты. Вектор может также быть получен из любого другого члена семейства поксвирусов, в частности, вируса оспы кур (например, TROVAC, смотри Paoletti и др., 1995, Dev Biol Stand., 84, 159-163); оспы канареек (например, ALVAC, WO 95/27780, Paoletti и др., 1995, Dev Biol Stand., 84, 159-163); оспы поросят; оспы свиней и подобных им. В качестве примера, специалист в данной области техники может обратиться к WO 92 15672 (является введенным в качестве ссылки), которая описывает получение экспрессионных векторов на основе поксвирусов, способных к экспрессии такой гетерологичной нуклеотидной последовательности, в частности, нуклеотидной последовательности, кодирующей антиген.

Основная методика для встраивания нуклеиновой кислоты и ассоциированных регуляторных элементов, необходимых для экспрессии в геноме вирусов оспы, описывается в многочисленных документах, доступных квалифицированному специалисту в данной области техники (Paul и др., 2002, Cancer gene Ther. 9, 470-477; Piccini и др., 1987, Methods of Enzymology 153, 545-563; US 4,769,330; US 4,772,848; US 4,603,112; US 5,100,587 и US 5,179,993). Обычно, это осуществляется путем гомологичной рекомбинации между перекрывающимися последовательностями (то есть, желаемого сайта инсерции), присутствующих в обоих вирусных геноме, и плазмиды, несущей нуклеиновую кислоту, которая подлежит встраиванию.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген в соответствии с изобретением, предпочтительно встраивают в неэссенциальном локусе генома поксвируса, для того, чтобы рекомбинантный поксвирус оставался жизнеспособным и инфекционным. Неэссенциальные участки представляют собой некодирующие межгенные участки или любой ген, для которого инактивация или делеция в значительной степени не нарушает роста вируса, репликации или инфекции. Любой может также предусматривать инсерцию в эссенциальный локус вируса при условии, что дефектная функция предоставляется *in trans* в процессе получения вирусных частиц, например, при использовании хелперной линии клеток, которая несет комплементирующие последовательности, соответствующие таким, которые были делегированы из генома вируса оспы.

При использовании вируса осповакцины Copenhagen нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген, предпочтительно встраивают в ген тимидинкиназы (tk) (Hruby и др., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 3411-3415; Weir и др., 1983, J. Virol. 46, 530-537). Однако другие сайты инсерции также являются приемлемыми, например, в ген

гемагглютинирина (Guo и др., 1989, J. Virol. 63, 4189-4198), в локус K1L, в u ген (Zhou и др., 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185-2190) или на левом конце вируса осповакцины, где в литературе было описано множество спонтанных или сконструированных делеций (Altenburger и др., 1989, Archives Virol. 105, 15-27; Moss и др. 1981, J. Virol. 40, 387-395; 5 Panicali и др., 1981, J. Virol. 37, 1000-1010; Perkus и др., 1989, J. Virol. 63, 3829-3836; Perkus и др., 1990, Virol. 179, 276-286; Perkus и др., 1991, Virol. 180, 406-410).

При использовании MVA, нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, может быть встроена в место какой-либо одной из идентифицированных делеций I-VII, а также в D4R локусе, но инсерция в делеций II или III является предпочтительной (Meyer и др., 10 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038; Sutler и др., 1994, Vaccine 12, 1032-1040).

При использовании вируса оспы кур, несмотря на то что инсерция в пределах гена тимидинкиназы может рассматриваться, нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген, предпочтительно вводят в межгенный участок, который размещается между ORF 7 и 9 (смотри, например, EP 314 569 и US 5,180,675).

15 В соответствии с одним специальным воплощением указанный рекомбинантный вектор представляет собой рекомбинантную плазмидную ДНК или рекомбинантный вирусный вектор.

В соответствии с другим специальным воплощением указанный рекомбинантный вирусный вектор представляет собой рекомбинантный аденовирусный вектор.

20 В соответствии с другим специальным воплощением указанный рекомбинантный вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор на основе вируса осповакцины.

В соответствии с одним предпочтительным воплощением указанный рекомбинантный вектор на основе осповакцины представляет собой рекомбинантный MVA вектор.

25 Предпочтительно, когда нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, используемый в изобретении, находится в форме, приемлемой для ее экспрессии в хозяйской клетке или организме, что означает, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, помещают под контролем одной или более регуляторных последовательностей, необходимых для ее экспрессии в хозяйской клетке или организме.

30 Как используется в данной заявке, термин "регуляторная последовательность" относится к любой последовательности, которая позволяет осуществлять, способствовать или модулировать экспрессию нуклеиновой кислоты в данной хозяйской клетке, включая репликацию, дупликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию, стабильность и/или транспорт нуклеиновой кислоты или одной из ее производных (то есть, мРНК) в

35 хозяйской клетке. Специалист в данной области техники сможет оценить, что выбор регуляторных последовательностей может зависеть от факторов, таких, как хозяйская клетка, вектор и желаемый уровень экспрессии. Нуклеиновая кислота, кодирующая антиген, оперативно связывается с последовательностью экспрессии гена, которая направляет экспрессию нуклеиновой кислоты антигена в эукариотической клетке.

40 Последовательность экспрессии гена представляет собой регуляторную нуклеотидную последовательность, такую, как последовательность промотора или комбинацию промотор-энхансер, которая способствует эффективной транскрипции и трансляции нуклеиновой кислоты антигена, с которой она является оперативно связанной.

Последовательность экспрессии гена может, например, представлять собой промотор 45 млекопитающих или вируса, такой, как конститутивный или индуцибельный промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают, но без ограничения таковыми, промоторы для следующих генов: гипоксантинфосфорибозил трансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, промотор b-актина и другие конститутивные

промоторы. Примеры вирусных промоторов, которые функционируют конститутивно в эукариотических клетках, включают, например, промоторы из цитомегаловируса (CMV), вакуолизирующего обезьяньего вируса (например, SV40), папилломавируса, аденовируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса саркомы Рауса, цитомегаловируса, длинных концевых повторов (LTR) вируса лейкемии Молоуни и других ретровирусов, а также промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса. Другие конститутивные промоторы являются известными среднему специалисту в данной области техники. Промоторы, полезные в качестве последовательностей генной экспрессии в соответствии с изобретением, также включают индуцибельные промоторы. Индуцибельные промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего агента. Например, промотор металлотионеина индуцируется для промотирования транскрипции и трансляции в присутствии ионов определенных металлов. Другие индуцибельные промоторы являются известными среднему специалисту в данной области техники. В общем случае, последовательность экспрессии гена будет включать, при необходимости, 5' нетранскрибируемые и 5' нетранслируемые последовательности, вовлеченные в инициацию транскрипции и трансляции, соответственно, такие, как ТАТА бокс, кэппирующую последовательность, СААТ последовательность и тому подобное. В частности, такие 5' нетранскрибируемые последовательности будут включать промоторный участок, который содержит промоторную последовательность для транскрипционного контроля оперативно присоединенной нуклеиновой кислоты антигена. Последовательности экспрессии гена необязательно включают энхансерные последовательности или вышерасположенные последовательности активатора, если это является желательным. Предпочтительные промоторы для применения в векторах на основе поксвируса (смотри ниже) включают без ограничения промоторы осповакцины 75K, H5R, ТК, p28, p11 и K1L, химерные промоторы между ранними и поздними поксвирусными промоторами, а также синтетические промоторы, такие, как те, что описаны у Chakrabarti и др. (1997, *Biotechniques* 23, 1094-1097), Hammond и др. (1997, *J. Virological Methods* 66, 135-138) и Kumar и Boyle (1990, *Virology* 179, 151-158).

Промотор представляет особую важность, и настоящее изобретение охватывает применение конститутивных промоторов, которые направляют экспрессию нуклеиновой кислоты во многих типах хозяйских клеток, и те, которые направляют экспрессию только в определенных хозяйских клетках или в ответ на специфические события или экзогенные факторы (например, на температуру, пищевые добавки, гормон или другой лиганд). Приемлемые промоторы широко описываются в литературе и можно упомянуть, в частности, вирусные промоторы, такие, как RSV, SV40, CMV и MLP промоторы. Предпочтительные промоторы для применения в поксвирусном векторе включают без ограничения промоторы осповакцины 7.5K, H5R, ТК, p28, p11 и K1L, химерные промоторы между ранними и поздними поксвирусными промоторами, а также синтетические промоторы, такие, как те, что описаны у Chakrabarti и др. (1997, *Biotechniques* 23, 1094-1097), Hammond и др. (1997, *J. Virological Methods* 66, 135-138) и Kumar и Boyle (1990, *Virology* 179, 151-158).

Специалист в данной области техники сможет оценить, что регуляторные элементы, контролирующие экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, могут дополнительно включать дополнительные элементы для собственной инициации, регуляции и/или терминации транскрипции (например, polyA последовательности терминации транскрипции), транспорта мРНК (например, сигнальные последовательности ядерной локализации), процессинга (например, сигналы сплайсинга) и стабильности (например, интроны и некодирующие 5' и 3')

последовательности), трансляции (например, пептидный сигнал, пропептид, тройные лидерные последовательности, сайты связывания рибосомы, последовательности Шайна-Дальгарно и т.д.) в хозяйской клетке или организме.

Альтернативно, рекомбинантный вектор для применения в настоящем изобретении может дополнительно включать, по крайней мере, одну нуклеиновую кислоту, кодирующую, по крайней мере, один цитокин. Приемлемые цитокины включают без ограничения интерлейкины (например, IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21) и интерфероны (например, IFN γ , INF α), с особым предпочтением для интерлейкина IL-2. Когда рекомбинантная вакцина в соответствии с изобретением включает нуклеиновую кислоту для экспрессии цитокина, то указанная нуклеиновая кислота может обеспечиваться рекомбинантным вектором, кодирующим один или более антиген(ов), или независимым рекомбинантным вектором, который может иметь то же самое или отличное происхождение.

В соответствии с одним предпочтительным воплощением рекомбинант для применения в настоящем изобретении кодирует весь или часть MUC1 антигена и, по крайней мере, один из цитокинов, приведенных выше, и предпочтительно интерлейкин, в частности, IL2.

Инфекционные вирусные частицы, включающие описанный выше рекомбинантный вирусный вектор, могут быть получены с помощью обычного процесса. Типичный процесс включает следующие этапы:

- a. введение вирусного вектора в приемлемую линию клеток,
- b. культивирование указанной линии клеток при приемлемых условиях так, чтобы позволить осуществлять продукцию указанной инфекционной вирусной частицы,
- c. извлечение полученной вирусной частицы из культуры указанной линии клеток,
- и
- d. необязательная очистка указанной извлеченной инфекционной вирусной частицы.

Клетки, приемлемые для размножения аденовирусных векторов, представляют собой, например 293 клетки, PERC6 клетки, HER96 клетки или клетки, как раскрыто в WO 94/28152, WO 97/00326, US 6,127,175.

Клетки, приемлемые для размножения поксвирусных векторов, представляют собой клетки птиц, и наиболее предпочтительно первичные фибробласты эмбрионов курей (CEF), приготовленные из куриных эмбрионов, полученных из оплодотворенных яиц.

Инфекционные вирусные частицы могут быть извлечены из супернатантов культуры или из клеток после их лизиса (например, с помощью химических средств, замораживания/оттаивания, осмотического шока, механического шока, обработки ультразвуком и подобных им). Вирусные частицы могут быть изолированы с помощью последовательных циклов очистки бляшек и последующей очистки при использовании методик, известных в области техники (хроматографические способы, ультрацентрифугирование в градиенте хлорида цезия или сахарозы).

В соответствии с другим воплощением способы в соответствии с изобретением могут сочетаться с другими способами для прогнозирования эффективности лечения, в частности для прогнозирования эффективности способов иммунотерапевтического лечения. Например, уровни биомаркеров, такие, как уровни активированных NK клеток (смотри патентную заявку, которая заявляет приоритет EP 08305876.8) или уровни sICAM-1 (смотри патентную заявку, которая заявляет приоритет EP 09305032.6).

Если это является желательным, то способ или применение для лечения пациента от заболевания человека в соответствии с изобретением (то есть, путем введения иммуногенной композиции, включающей, по крайней мере, один антиген) может

осуществляться у выбранных пациентов в сочетании с одним или более традиционным терапевтическим воздействием (например, облучением, химиотерапией и/или хирургией). Применение многочисленных терапевтических подходов обеспечивает выбранного пациента более широким вмешательством. В одном воплощении способ или применение для лечения пациента от заболевания человека в соответствии с изобретением может 5 предвшаться или продолжаться хирургическим вмешательством. В другом воплощении он может предвшаться или продолжаться лучевой терапией (например, гамма облучением). Специалист в данной области техники может легко составить приемлемые прописи лучевой терапии и параметры, которые могут использоваться (смотри, например, Perez и Brady, 1992, Принципы и практика радиационной онкологии, 2-ое 10 изд. JB Lippincott Co; при использовании приемлемых адаптации и модификаций, что будет легко понятным для специалиста в данной области техники). Еще в одном воплощении способ или применение в соответствии с изобретением ассоциируется с химиотерапией с помощью одного или более лекарственных средств (например, 15 лекарственных средств, которые традиционно используются для лечения или предотвращения вирусных инфекций, ассоциированных с вирусом патологических состояний, рака и подобных им).

Настоящее изобретение, таким образом, относится к способу для улучшения лечения ракового пациента, который подвергается химиотерапевтическому лечению с помощью 20 химиотерапевтического агента, где указанный способ включает следующие этапы:

- введение пациенту одной или более доз иммуногенной композиции в соответствии с изобретением и одной или более доз химиотерапевтического агента,
- измерение уровня интерферона γ в организме указанного субъекта после, по крайней мере, одного из указанных введений иммуногенной композиции;
- 25 - где уровни интерферона γ выше приблизительно 4 пг/мл (например, 4,6 пг/мл) свидетельствуют о том, что субъект является таким, который демонстрирует успешный клинический выход для лечения, то есть повышение коэффициента выживания.

В соответствии с одним воплощением введение указанного химиотерапевтического агента осуществляют перед введением указанной иммуногенной композиции.

30 В соответствии с другим воплощением введение указанного химиотерапевтического агента осуществляют после введения указанной иммуногенной композиции.

В соответствии с другим воплощением указанное введение указанного химиотерапевтического агента осуществляют одновременно с введением указанной иммуногенной композиции.

35 В другом воплощении способ или применение в соответствии с изобретением осуществляют в соответствии с терапевтическим воздействием примирования - бустинга (повторной вакцинации), которое включает последовательное введение одной или более примиряющей(их) композиции(ий) и одной или более композиции(ий) для повторной вакцинации. Обычно, примиряющая композиция и композиция для повторной 40 иммунизации используют различные носители, которые включают или кодируют, по крайней мере, антигенный домен в целом. Примиряющая композиция изначально вводится в хозяйский организм, а композиция для повторной иммунизации последовательно вводится в тот же хозяйский организм спустя период времени, который варьирует от одного дня до двенадцати месяцев. Способ в соответствии с изобретением 45 может включать от одного до десяти последовательных введений примиряющей композиции, после чего осуществляют от одного до десяти последовательных введений композиции для бустер-иммунизации. Является желательным, когда интервалы инъекции составляют приблизительно от одной недели до шести месяцев. Кроме того,

примирующая композиция и композиция для повторной иммунизации могут вводиться в тот же сайт или в альтернативные сайты одним и тем же путем или с помощью различных путей введения.

В соответствии с одним специальным воплощением изобретение относится к способу, как описано выше, где указанное заболевание человека представляет собой рак.

В соответствии со специальным воплощением указанный рак представляет собой, например, рак молочной железы, рак толстого кишечника, почечный рак, ректальный рак, рак легкого, рак головы и шеи, ренальный рак, злокачественную меланому, ларингеальный рак, рак яичника, цервикальный рак, простатический рак, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), гематологические виды рака, различные виды желудочного рака, миелому.

В соответствии с предпочтительным воплощением указанный рак представляет собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC).

В соответствии с одним специальным воплощением изобретение относится к способу, как описано выше, где указанное заболевание человека представляет собой инфекционное заболевание.

В соответствии с предпочтительным воплощением указанное инфекционное заболевание представляет собой индуцированное вирусом заболевание, такое, как например, заболевание, которое индуцируется ВИЧ, HCV, HBV, HPV и подобными им.

В соответствии с одним специальным воплощением иммунный ответ, который наблюдается в подвергнутой лечению популяции пациентов, является направленным на специфические для опухоли или связанные с опухолью антигены и/или вирусные антигены. В соответствии с одним воплощением указанный "иммунный ответ" в указанной популяции пациентов является направленным на различные антигены. В соответствии с другим специальным воплощением указанный "иммунный ответ" в указанной популяции пациентов является направленным на MUC1 антиген. В соответствии с другим специальным воплощением указанный "иммунный ответ" в указанной популяции пациентов представляет собой Т-клеточный иммунный ответ, и предпочтительно CD8+(цитотоксические Т-лимфоциты) иммунный ответ. В соответствии с другим специальным воплощением указанный "иммунный ответ" в указанной популяции пациентов представляет собой неспецифический иммунный ответ. В соответствии с другим специальным воплощением указанный "иммунный ответ" в указанной популяции пациентов представляет собой стимуляцию врожденного иммунного ответа.

Способность к индукции или стимуляции иммунного ответа при введении в животный или человеческий организм может быть оценена либо *in vitro*, либо *in vivo* при использовании разнообразных анализов, которые являются стандартными в области техники. Для общего описания методик, доступных для оценки начала и активации иммунного ответа, смотри, например Coligan и др. (1992 и 1994, Current Protocols in Immunology; ред. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). Измерение клеточного иммунитета может осуществляться путем измерения профилей цитокинов, которые секретируются активированными эффекторными клетками, включая те, которые имеют происхождение от CD4+ и CD8+ Т-клеток (например, качественная оценка клеток, продуцирующих IL-10 или IFN гамма с помощью ELISpot), путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, анализов пролиферации Т-клеток с помощью классического поглощения [³H] тимидина), путем анализа на специфические для антигена Т-лимфоциты у сенсибилизированного субъекта (например, специфический для пептида лизис в цитотоксическом анализе) или путем определения специфических

для антигена Т-клеток с помощью флуоресцентных МНС и/или пептидных мультимеров (например, тетрамеров). Способность к стимуляции гуморального ответа может быть определена путем связывания антитела и/или конкуренции в связывании (смотри, например, Harlow, 1989, Antibody, Cold Spring Harbor Press). Способ в соответствии с изобретением может также проверяться в животных моделях, сенсibilизированных с помощью приемлемого агента, индуцирующего опухоль (например, TC1 клеток, экспрессирующих MUC1) для определения противоопухолевой активности, что отражает индукцию или повышение иммунного ответа, направленного против антигена.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу для продления выживания пациента, подвергнутого лечению от заболевания человека, путем введения иммуногенной композиции, при этом указанный способ включает следующие этапы:

- введение пациентам одной или более доз иммуногенной композиции в соответствии с изобретением;

- измерение уровня интерферона γ в организме указанного субъекта после, по крайней мере, одного из указанных введений иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением (смотри выше).

В соответствии с другим воплощением настоящее изобретение относится к применению интерферона γ в качестве биомаркера для прогнозирования, будет ли субъект, подвергнутый лечению с помощью введения иммуногенной композиции, чувствительным к развитию профилактического или терапевтического ответа, предпочтительно профилактического или терапевтического иммунного ответа, в результате указанного введения иммуногенной композиции.

В соответствии с другим воплощением настоящее изобретение относится к применению интерферона γ в качестве биомаркера для мониторинга, модификации или корректировки лечения, вовлекающего введение иммуногенной композиции пациенту.

В частности, настоящее изобретение относится к применению уровня интерферона γ в качестве биомаркера для мониторинга, модификации или корректировки лечения, вовлекающего введение иммуногенной композиции пациенту, где уровни интерферона γ , измеренные после указанного введения и составляющие приблизительно выше 4 пг/мл (например, 4,6 пг/мл), свидетельствуют о том, что субъект является таким, который демонстрирует успешный клинический выход для лечения, то есть, повышение коэффициента выживания.

Изобретение также обеспечивает наборы, которые включают части для осуществления способов, описанных в данной заявке, и которые будут понятными из примеров, обеспечиваемых в данной заявке. Набор частей или наборы могут включать реагенты для сбора и/или измерения уровней интерферона гамма в сыворотке крови. Такие реагенты могут включать антитела. Такие наборы могут дополнительно включать оборудование для сбора и/или обработки биологических образцов. Наборы также дополнительно приемлемым образом содержат инструкции для применения, пороговые значения и/или инструкции по их определению, а также инструкции по интерпретации данных, полученных в результате применения наборов.

Изобретение дополнительно обеспечивает компьютерные программы и/или алгоритмы для мониторинга клинического исследования и уровней интерферона гамма, определения являются ли эти уровни выше или ниже порогового уровня, и/или рекомендуемые модификации к режиму лечения для улучшения ответа пациента на иммунотерапевтическое лечение. Компьютерные программы или алгоритмы могут обеспечиваться вместе с необходимым оборудованием, например, в форме набора или

устройства, которое может также принимать биологические образцы и измерять относительные уровни интерферона гамма, которые присутствуют в них. Описанные выше компьютерные программы и/или оборудование типично обеспечивается для лечащих врачей или клинических лабораторий с приемлемыми инструкциями и реагентами, включая антитела.

Изобретение было описано иллюстративным образом, и является понятным, что терминология, которая была использована, является предназначенной для того, чтобы больше соответствовать описанию, а не ограничению. Очевидно, что являются возможными множество модификаций и вариаций настоящего изобретения в свете приведенных выше идей. Таким образом, является понятным, что в пределах объема приложенных пунктов формулы изобретение может реализовываться путем, отличным от того, который является описанным в данной заявке.

Все приведенные выше раскрытия патентов, публикаций и номеров доступа к базам данных, являются специфически введенными в данную заявку в своей целостности в такой степени, как если бы такой индивидуальный патент, публикация или доступ были специфически и индивидуально указаны для введения в качестве ссылки.

ПРИМЕРЫ

Фигуры:

Фигура 1: Кривые выживания, описывающие вакцинную иммунотерапию при раке легких: пациенты с или без определяемым уровнем интерферона γ в день 43

- Группа 1: Терапевтическая вакцина (то есть, иммуногенная композиция) + химиотерапия у пациентов со способным к определению уровнем интерферона γ в день 43. Способный к определению определяется как такой, который $\geq$ границы определения, которая составляет 4,6 пг/мл. 22 пациента. Среднее выживание 25,4 месяца.

- Группа 2: Терапевтическая вакцина (то есть, иммуногенная композиция) + химиотерапия у пациентов с неспособным к определению уровнем интерферона γ . Неспособный к определению уровень определяется как такой, который является $<4,6$ пг/мл IFNg в периферической крови. 29 пациентов. Среднее выживание 10,14 месяца.

Достоверное отклонение, по степени логарифма: $p=0,019$

О Полное + Цензурированное

Фигура 2: Кривые выживания, описывающие химиотерапию при раке легких: пациенты с или без определяемых уровней интерферона γ ($\geq 4,6$ пг/мл)

- Группа 1: Только химиотерапия (без терапевтической вакцины) у пациентов со способным к определению уровнем интерферона γ в день 43. Способный к определению уровень определяется как такой, который является $\geq$ границы определения, которая составляет 4,6 пг/мл. 25 пациентов. Среднее выживание 8,5 месяцев.

- Группа 2: Только химиотерапия (без терапевтической вакцины) у пациентов с неспособным к определению уровней интерферона γ в день 43. Неспособный к определению уровень определяется как такой, который $<4,6$ пг/мл IFNg в периферической крови. 34 пациента. Среднее выживание 12,8 месяцев.

Достоверное отклонение, по степени логарифма: $p=0,047$

О Полное + Цензурированное

Фигура 3: Кривые выживания, описывающие химиотерапию при раке легких: пациенты с уровнем интерферона $\gamma \geq 4,6$ пг/мл

- Группа 1: Терапевтическая вакцина (то есть, иммуногенная композиция) + химиотерапия у пациентов со способными к определению уровнями интерферона γ . Способные к определению уровни определяются как такие, которые являются $\geq 4,6$ пг/мл в периферической крови. 22 пациента. Среднее выживание 25,4 месяца.

- Группа 2: Только химиотерапия (без TG4010 вакцины) у пациентов со способными к определению уровнями интерферона γ . Способные к определению уровни определяются как $\geq 4,6$ пг/мл в периферической крови. 25 пациентов. Среднее выживание 8,5 месяцев.

5 Достоверное отклонение, по степени логарифма: $p=0,002$

О Полное + Цензурированное

Пример 1:

Иммуногенную композицию, обозначенную как вакцина TG4010, использовали для лечения пациентов с немелкоклеточным раком легких (NSCLC) в комбинации со
10 стандартной химиотерапией.

TG4010 представляет собой рекомбинантный модифицированный вирус Анкара (MVA), экспрессирующий как IL2, так и ассоциированный с опухолью антиген MUC1.

Сто сорок восемь пациентов произвольным образом распределяли по группам для получения:

15 - химиотерапии (Цисплатин 75 мг/м^2 в день 1 и Гемцитабин 1250 мг/м^2 в день 1 и день 8 каждые 3 недели в течение вплоть до 6 циклов), взятой отдельно (ветвь исследования 2) или

- химиотерапии вместе с TG4010 (ветвь исследования 1).

Опухоли оценивали (критерии ВОЗ) каждые 6 недель. Критические точки представляли
20 собой выживаемость без прогрессирования заболевания (PFS) через 6 месяцев и общее выживание с целью анализа лечения.

Образцы крови брали на 43 день (через одну неделю после периода шестинедельных инъекций) и немедленно отправляли в центральную иммунологическую лабораторию, где образцы плазмы разделяли на аликвоты и замораживали. Замороженные аликвоты
25 плазмы помещали в баню на сухой лед и отправляли во вторую центральную лабораторию, где оценивали уровни гамма-интерферона.

Образцы плазмы крови оценивали на содержание гамма интерферона (интерферона γ) с помощью профиля Multi-analyte белка плазмы крови при использовании системы Luminex®. Предел определения устанавливали на уровне 4,6 пг/мл.

30 Фигура 1 показывает, что пациенты [Ветвь 1 (TG4010+ химиотерапии)] с определяемым уровнем интерферона гамма в день 43 имели более длительное выживание (среднее значение выживания = 25,4 месяцев), чем пациенты с неопределяемым уровнем интерферона гамма (среднее значение выживания = 10,14 месяцев) при лечении как с помощью TG4010 вакцины, так и химиотерапии.

35 Данные на Фигуре 2 демонстрируют, что позитивная ассоциацию между определяемым уровнем интерферона γ и средним выживанием является ограниченной пациентами, получающими терапевтическую вакцину. Пациенты в ветке 2 исследования, получающие только химиотерапию, которые имели определяемые уровни интерферона γ в плазме крови в день 43, имели более низкое значение выживания (8,5 месяцев), чем
40 пациенты без определяемых уровней интерферона γ в день 43 (12,8 месяцев).

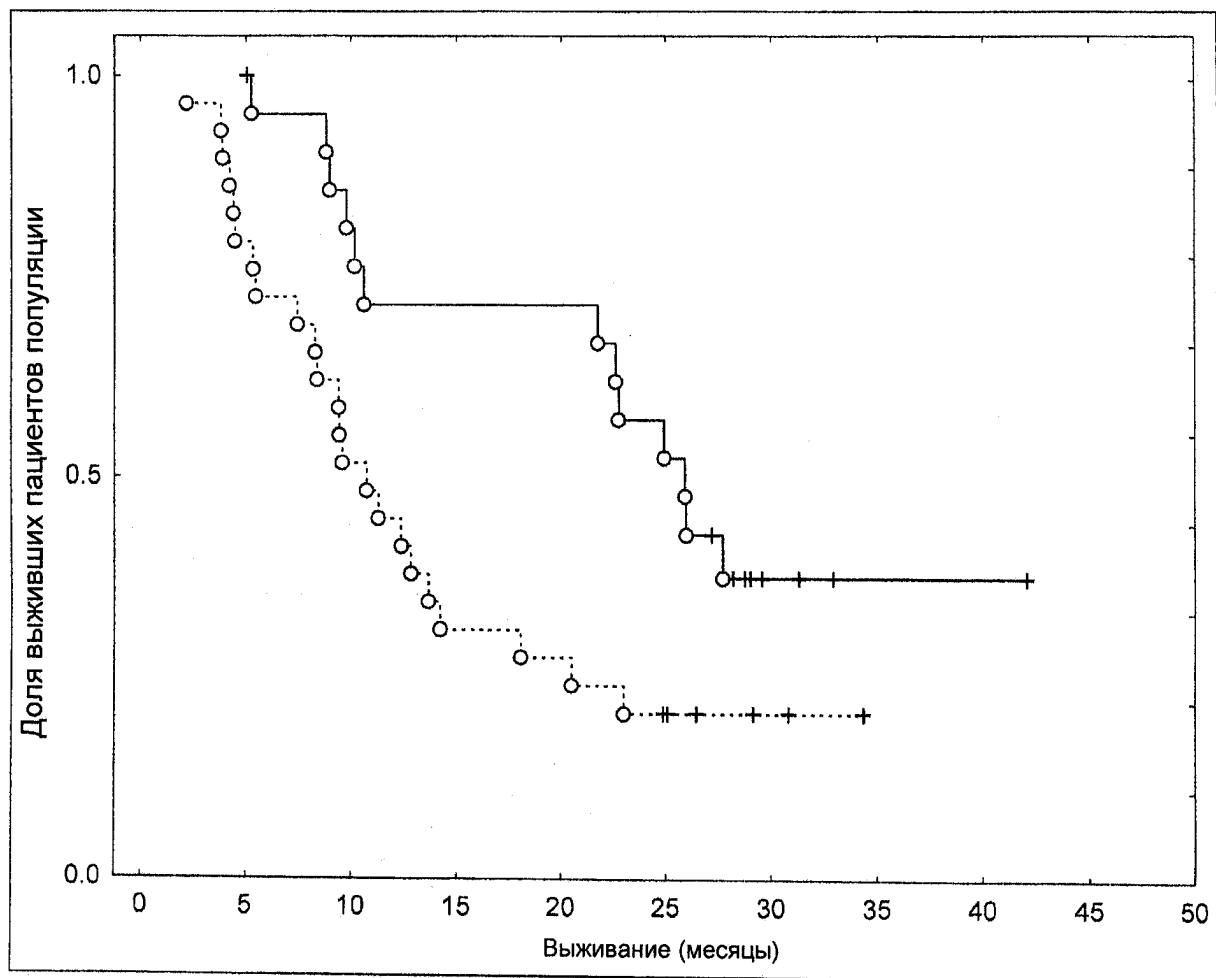
Данные на Фигуре 3 демонстрируют, что эффект отбора пациентов на основе определения уровня интерферон γ в плазме крови в день 43, является ограниченным пациентами, которые получали терапевтическую вакцину. Фигура 3 показывает, что
45 пациенты с определяемым уровнем интерферона γ в день 43 имели наилучший прогноз выживания только в том случае, если они получали терапевтическую вакцину.

Формула изобретения

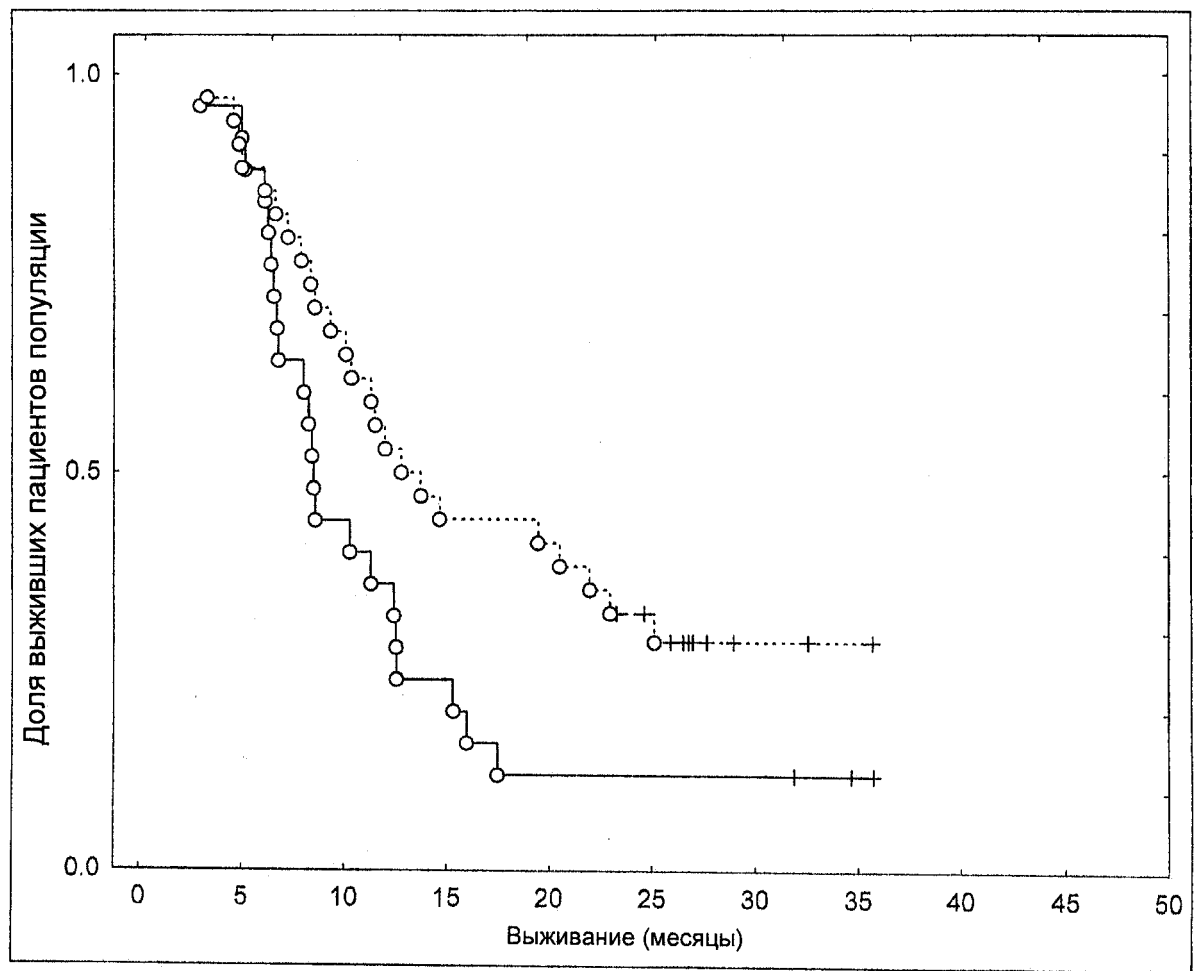
1. Ex-vivo способ для оценки эффективности лечения у пациента с раком, при этом

указанное лечение включает введение пациенту иммуногенной композиции, которая содержит рекомбинантный вирусный вектор, экспрессирующий *in vivo* весь или часть MUC-1 антигена, где способ анализа включает этапы:

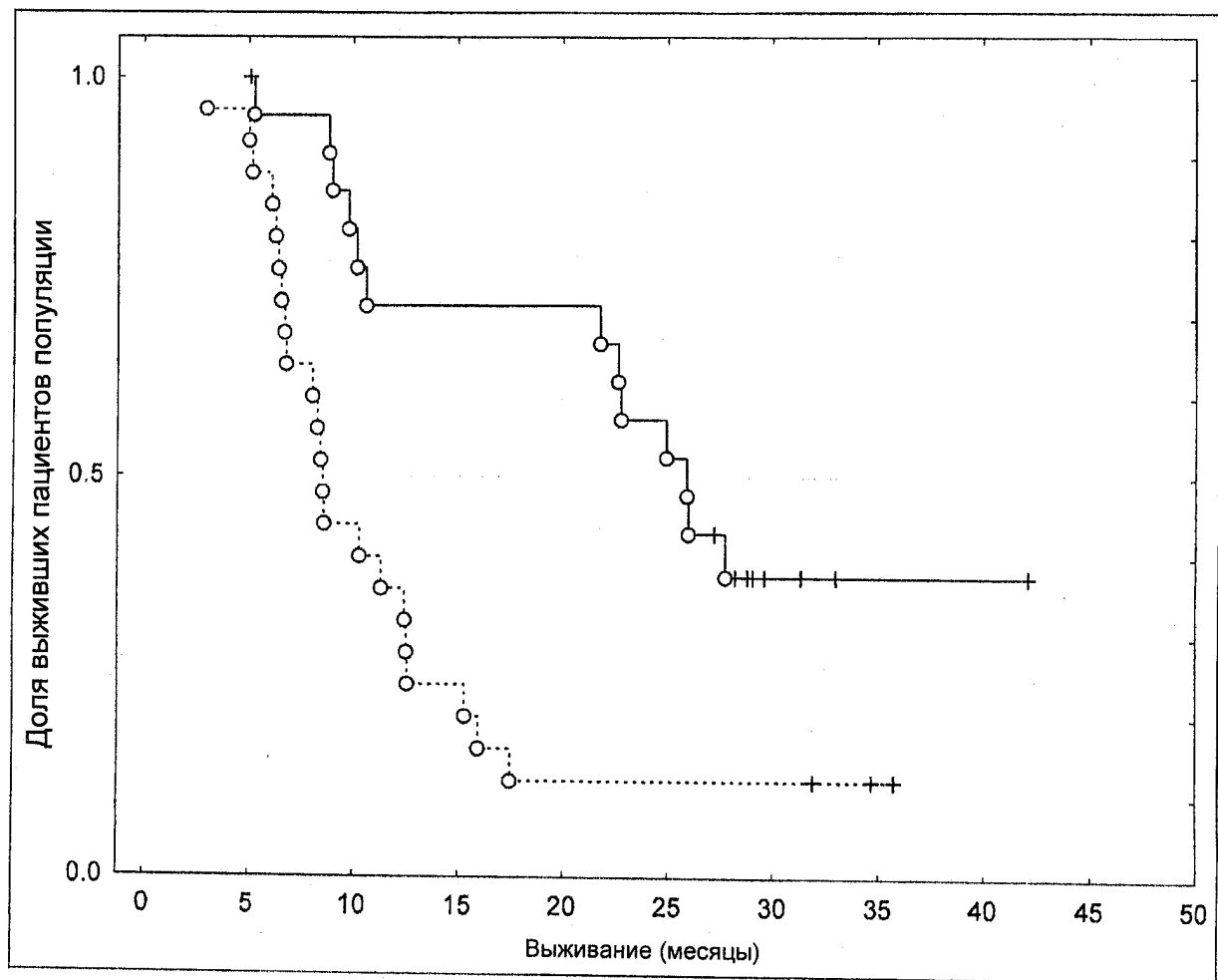
- (a) получения биологического образца от пациента после введения указанной иммуногенной композиции указанному пациенту;
- (b) измерение уровней интерферона γ в указанном биологическом образце; где уровни интерферона γ свыше приблизительно 4 пг/мл свидетельствуют о том, что пациент является таким, который демонстрирует успешный клинический выход для лечения.
2. Способ в соответствии с п.1, в котором уровни интерферона γ свыше 4,6 пг/мл.
3. Способ в соответствии с п.1, в котором время между началом указанного лечения, включающего введение иммуногенной композиции, и измерениями уровня интерферона γ составляет от приблизительно 4 до приблизительно 8 недель.
4. Способ в соответствии с п.1 или 2, в котором время между началом указанного лечения, включающего введение иммуногенной композиции, и измерениями уровня интерферона γ составляет приблизительно 5 недель.
5. Способ в соответствии с п.1 или 2, где указанный способ лечения представляет собой способ лечения рака.
6. Способ в соответствии с п.1, где указанный рак представляет собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC).
7. Способ в соответствии с п.1 или 2, где указанные уровни интерферона γ измеряются с помощью профиля для измерения белка плазмы крови Multi-analyte при использовании Luminex® системы.
8. Способ в соответствии с п.1 или 2, где указанный биологический образец является выбранным из группы, состоящей из образца крови, плазмы крови или сыворотки.
9. Способ в соответствии с п.1, где указанный вирусный вектор является компетентным по репликации.
10. Способ в соответствии с п.1, где указанный вирусный вектор является дефектным по репликации.
11. Способ в соответствии с п.1, где указанный рекомбинантный вирусный вектор представляет собой рекомбинантный аденовирусный вектор.
12. Способ в соответствии с п.1, где указанный рекомбинантный вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор на основе осповакцины.
13. Способ в соответствии с п.1, где указанный рекомбинантный вектор на основе осповакцины представляет собой рекомбинантный MVA вектор.
14. Способ в соответствии с п.1, где указанный пациент представляет собой пациента, который подвергается лечению с помощью химиотерапевтического агента.
15. Способ в соответствии с п.14, где введение указанного химиотерапевтического агента осуществляют одновременно с введением указанной иммуногенной композиции.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3