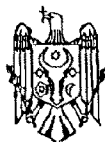




MD 4655 B1 2019.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4655** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *A61K 39/17* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2015 0100 (22) Data depozit: 2014.03.04 (31) Nr.: 61/782994 (32) Data: 2013.03.14 (33) Țara: US (41) Data publicării cererii: 2016.02.29, BOPI nr. 2/2016	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.11.30, BOPI nr. 11/2019 (85) 2015.10.12 (86) PCT/US2014/020299, 2014.03.04 (87) WO 2014/158811 A1, 2014.10.02
(71) Solicitant: ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI, US; MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER, US (72) Inventatori: PALESE Peter, US; GARCIA-SASTRE Adolfo, US; ZAMARIN Dmitriy, US; ALLISON James, US; WOLCHOK Jedd D., US (73) Titular: ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI, US; MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER, US (74) Mandatar autorizat: ANDRIEȘ Ludmila	

(54) Virusurile bolii de Newcastle și utilizarea acestora

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la metode de tratament al cancerului, care includ administrarea virusurilor bolii de Newcastle (NDV) în combinație cu un antagonist al proteinei morții celulare programate 1 (PD1), care reprezintă un anticorp și se leagă specific la PD1 și blochează legarea PD1 cu liganzii săi nativi. De asemenea, invenția include administrarea unui NDV hibrid în combinație cu un

2
antagonist al PD1, în care NDV hibrid conține un genom ambalat cu conținut de o secvență de nucleotide, care codifică o citokină, în care citokina este exprimată de virus și antagonistul PD1 reprezintă un anticorp, care se leagă specific la PD1 și blochează legarea PD1 cu liganzii săi nativi.

Revendicări: 42

Figuri: 47

MD 4655 B1 2019.11.30

(54) Newcastle disease viruses and uses thereof**(57) Abstract:**

1
The invention relates to methods for treating cancer comprising administering Newcastle disease viruses (NDV) in combination with an antagonist of a programmed cell death protein 1 (PD1), which is an antibody and specifically binds to PD1 and blocks binding of PD1 to its native ligands. The invention also comprises administering a chimeric NDV in combination

2
with an antagonist of PD1, wherein the chimeric NDV comprises a packaged genome comprising a nucleotide sequence encoding a cytokine, wherein the cytokine is expressed by the virus and the antagonist of PD1 is an antibody that specifically binds to PD1 and blocks binding of PD1 to its native ligands.

Claims: 42

Fig.: 47

(54) Вирусы болезни Ньюкасла и их использование**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к методам лечения рака, включающих введение вирусов болезни Ньюкасла (NDV) в комбинации с антагонистом запрограммированного белка клеточной гибели 1 (PD1), который является антителом и специфически связывается с PD1 и блокирует связывание PD1 с его нативными лигандами. Также, изобретение включает введение гибридного NDV в комбинации с антагонистом PD1, где гибридный NDV

2
содержит упакованный геном, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую цитокин, где цитокин экспрессируется вирусом и антагонист PD1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с PD1 и блокирует связывание PD1 с его нативными лигандами.

П. формулы: 42

Фиг.: 47

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

Prezenta invenție se referă la virusurile himerice ale bolii de Newcastle, proiectate pentru a exprima un agonist al semnalului costimulator al unei celule imune și la compoziții cuprinzând aceste virusuri. Sunt descrise, de asemenea, virusuri himerice ale bolii de Newcastle, proiectate pentru a exprima un antagonist al semnalului inhibitor al unei celule imune și compoziții cuprinzând aceste virusuri. Virusurile himerice ale bolii de Newcastle și compozițiile sunt utile în tratamentul cancerului. În plus, prezenta invenție se mai referă la metode pentru tratarea cancerului, care prevăd administrarea virusurilor bolii de Newcastle în combinație cu un agonist al unui semnal co-stimulator al unei celule imune și/sau cu un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune.

Virusul bolii de Newcastle (NDV) este un membru al genului Avulavirus din familia Paramyxoviridae, care s-a demonstrat că infectează numeroase specii aviare (Alexander D.J. Newcastle disease, Newcastle disease virus - an avian paramyxovirus. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1988, p. 1-22). NDV are un genom de ARN monofilar în sens negativ și nu este supus recombinării cu genomul gazdă sau cu alte virusuri (Alexander D.J. Newcastle disease, Newcastle disease virus - an avian paramyxovirus. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1988, p. 1-22). ARN genomic conține gene în ordinea 3'-NP-PMF-HN-L-5', descrise mai detaliat în continuare. Doua proteine suplimentare, V și W, sunt produse de NDV din gena P cu mARNs alternativi, generați de redactarea ARN. ARN genomic, de asemenea, conține o secvență lider la capătul 3'.

Elementele structurale ale virionului includ învelișul virusului, care este un strat dublu de lipide, derivate din membrana celulelor plasmatice. Glicoproteina hemaglutinina-neuraminidaza (HN) iese din înveliș, ceea ce permite virusului să conțină atât activități de hemaglutinină (de exemplu, de cuplare a receptorului/fusogenice), cât și activități de neuraminidază. Glicoproteina de fuziune (F), care, de asemenea, interacționează cu membrana virală, se sintetizează inițial ca un precursor inactiv, apoi scindată post-tranlațional produce două polipeptide disulfurice cuplate. Proteina activă F este implicată în penetrarea NDV în celulele gazdă prin facilitarea fuziunii învelișului viral cu membrana plasmatică a celulei gazdă. Proteina matrice (M) este implicată în asamblarea virală și interacționează cu atât cu membrana virală, precum și cu proteinele nucleocapsidei.

Principala subunitate proteică a nucleocapsidei este proteina nucleocapsidei (NP), care conferă capsidei simetrie elicoidală. În asociere cu nucleocapsida sunt proteinele P și L. Fosfoproteina (P), care este supusă fosforilării, se presupune ca joacă un rol de reglementare în transcripție, și, astfel, poate fi implicată în metilare, fosforilare și poliadenilare. Gena L, care codifică polimeraza ARN dependentă de ARN, este necesară pentru sinteza ARN viral împreună cu proteina P. Proteina L, care ocupă aproape jumătate din capacitatea de codificare a genomului viral, este cea mai mare dintre proteinele virale și are un rol important atât în transcriere, cât și în replicare. Proteina V a demonstrat că inhibă interferonul alfa și contribuie la virulența NDV (Huang et al. Newcastle disease virus v protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. Journal of virology, no 77, 2003, p. 8676-8685).

NDV natural a fost raportat ca fiind un agent oncolitic eficient într-o varietate de modele de tumori la animale [1], (Zamarin et al. Mol. Ther. no 17, 2009, p. 697; Elankumaran et al. J. Virol. no 84, 2010, p. 3835; Schirmacher et al. Methods Mol. Biol. no 542, 2009, p. 565; Bart et al. Nat. New Biol. no 245, 1973, p. 229). Tulpinile de NDV, întâlnite în natură, au fost utilizate în multiple studii clinice pentru tratamentul cancerelor umane avansate [2], (Sinkovics J.G. and Horvath J.C. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. J. Clin. Virol. no 16, 2000, p. 1-15; Hotte et al. An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. Clin. Cancer Res., no 13, 2007, p. 977-985; Freeman et al. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. Mol. Ther., no 13, 2006, p. 221-228; Pecora et al. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. J. Clin. Oncol., no 20, 2002, p. 2251-2266; Csatory et al. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. J. Neurooncol, no 67, 2004, p. 83-93). Cu toate acestea, succesul tulpinilor native de NDV în cercetările clinice privind cancere umane avansate, au fost doar nesemnificativ [3], (Freeman et al. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. Mol. Ther., no 13, 2006, p. 221-228; Pecora et al. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. J. Clin. Oncol., no 20, 2002, p. 2251-2266). Astfel, persistă

o necesitate de terapii bazate pe NDV, utile în tratamentul cancerului, în special, al cancerului avansat.

Intr-un aspect prezenta invenție se referă la virusuri himerice ale bolii de Newcastle (NDV) proiectate pentru a exprima un agonist al unui semnal co-stimulator al unei celule imune și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune. Intr-o variantă de realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat care codifică un agonist al unui semnal co-stimulator al unei celule imune, în care agonistul este exprimat. Intr-o variantă de realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat care codifică un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, în care antagonistul este exprimat.

Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat care codifică un agonist al unui semnal co-stimulator al unei celule imune și o proteină F mutantă care cauzează fusogenitatea înaltă a NDV, în care agonistul și proteina F mutantă sunt exprimate. Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care cuprind un genom ambalat, care codifică un agonist al unui semnal co-stimulator al unei celule imune și o proteină F mutantă cu un locus de clivaj mutant, în care agonistul și proteina F mutantă sunt exprimate. Intr-o variantă de realizare NDV himerice, care exprimă proteina F mutantă, au o activitate fusogenică mai înaltă, comparativ cu virusul corespunzător care exprimă omologul proteinei F fără mutațiile la locusul de clivaj. Într-o altă realizare specifică, proteina F modificată este încorporată în virion.

Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat, care codifică un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune și o proteină F mutantă care cauzează fusogenitatea înaltă a NDV, în care antagonistul și proteina F mutantă sunt exprimate. Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat, care codifică antagonistul unui semnal inhibitor al unei celule imune și o proteină F mutantă cu un locus de clivaj mutant, în care antagonistul și proteina F mutantă sunt exprimate. Intr-o variantă de realizare NDV himerice, care exprimă proteina F mutantă, au o activitate fusogenică mai înaltă, comparativ cu virusul corespunzător, care exprimă omologul proteinei F fără mutațiile la locusul de clivaj. Într-o altă variantă de realizare proteina F modificată este încorporată în virion.

Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat, care codifică un agonist al unui semnal co-stimulator al unei celule imune și o citokină (de exemplu, interleukina (IL-2)), în care agonistul și citokina sunt exprimate. Intr-o altă formă de realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat, care codifică un agonist al unui semnal co-stimulator al unei celule imune, o citokină (de exemplu, IL-2) și proteina F mutantă, care cauzează fusogenitatea extrem de înaltă a NDV, în care agonistul, citokina și proteina F mutantă sunt exprimate. Într-o altă realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat, care codifică un agonist al unui semnal co-stimulator al unei celule imune, o citokină (de exemplu, IL-2) și o proteină F mutantă cu un locus de clivaj mutant, în care agonistul, citokina și proteina F mutantă sunt exprimate. Într-o variantă de realizare NDV himerice, care exprimă proteina F mutantă cu locusul de clivaj mutant, sunt extrem de fusogenice. Intr-o altă realizare specifică proteina F mutantă este încorporată în virion.

Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat, care codifică un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune și o citokină (de exemplu, IL-2), în care antagonistul și citokina sunt exprimate. Într-o altă realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat, care codifică un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, o citokină (de exemplu, IL-2) și o proteină F mutantă, care cauzează fusogenitatea extrem de înaltă a NDV, în care antagonistul, citokina și proteina F mutantă sunt exprimate. Într-o altă realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat, care codifică un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, o citokină (de exemplu, IL-2) și o proteină F mutantă cu un locus de clivaj mutant, în care antagonistul, citokina și proteina F mutantă sunt exprimate. Într-o variantă de realizare NDV himerice, care exprimă proteina F mutantă cu locusul de clivaj mutant, sunt extrem de fusogenice. Intr-o altă realizare specifică proteina F mutantă este încorporată în virion.

Intr-o variantă de realizare agonistul semnalului co-stimulator al unei celule imune este un agonist al unui receptor co-stimulator, exprimat de o celulă imună. Exemplele specifice de receptori co-stimulatori includ: receptorul pentru factorul de necroză tumorală indus de glucocorticoizi (GITR), costimulatorul inductibil al celulelor T (ICOS sau CD278), OX40 (CD134), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), CD40, CD226, molecula celulei T citotoxice și reglatoare (CRTAM), receptorul morții 3 (DR3), receptorul pentru limfotoxină-beta (LTBR),

activatorul transmembranar și interactorul CAML (TACI), receptorul pentru factorul de activare al celulelor B (BAFFR) și proteina de maturare a celulelor B (BCMA). Într-o variantă de realizare agonistul unui receptor co-stimulator exprimat într-o celulă imună este un anticorp (sau un fragment de legare cu antigenul al acestuia) sau un ligand care se leagă specific cu receptorul costimulator. Într-o realizare anticorpul este un anticorp monoclonal. Într-o altă realizare anticorpul este un fragment sc-Fv. Într-o realizare concretă anticorpul este un anticorp bispecific, care se leagă la doi receptori pe o celulă imună. Într-o realizare anticorpul bispecific se leagă la un receptor pe o celulă imună și la un alt receptor pe o celulă canceroasă. În unele realizări concrete anticorpul este un anticorp uman sau umanizat. În anumite realizări ligandul sau anticorpul este o proteină himerică, care conține proteină F al NDV sau un fragment al acesteia, sau proteina HN a NDV sau un fragment al acesteia. Metode de generare ale unor astfel de proteine himerice sunt cunoscute în domeniu (US 2012-0122185; Murawski et al. J. Virol., no 84, 2010, p. 1110-1123). În anumite realizări ligandul sau anticorpul este exprimat ca o proteină himerică F sau proteină F de fuziune a NDV, în care proteina himerică F sau proteina F de fuziune a NDV conține domeniile sau fragmentele citoplasmice și transmembranare ale acestora ale glicoproteinei F a NDV și domeniul extracelular conține ligandul sau anticorpul. În unele realizări ligandul este exprimat ca o proteină HN himerică sau proteină HN de fuziune a NDV, în care proteina HN himerică sau proteina HN de fuziune a NDV conține domeniile transmembranare și extracelulare sau fragmente ale acestora ale glicoproteinei HN a NDV și domeniul extracelular conține ligandul sau anticorpul. Într-o realizare specifică, ligandul sau anticorpul este exprimat ca o proteină himerică, cum este descris în secțiunea 7, exemplul 2, prezentat în continuare.

Într-o variantă concretă de realizare antagonistul unui semnal inhibitor al unei celule imune este un antagonist al receptorului inhibitor exprimat de o celulă imună. Exemplele specifice de receptori inhibitori includ: antigenul 4 asociat cu limfocitele T citotoxice (CTLA 4 sau CD52), proteina 1 a morții celulare programate (PD1 sau CD279), atenuatorul limfocitelor B și T (BTLA), receptorul pentru analogul imunoglobulinei celulei killer (KIR), gena 3 de activare a limfocitelor (LAG3), proteina 3 a membranei celulelor T (TIM3), receptorul pentru adenzină A2a (A2aR), imunoreceptorul celulelor T cu imunoglobulină și domeniile ITIM (TIGIT), receptorul 1 pentru analogul imunoglobulinei asociat cu leucocite (LAIR1) și CD160. Într-o variantă concretă de realizare antagonistul unui receptor inhibitor exprimat de o celulă imună este un anticorp (sau un fragment de legare cu antigenul al acestuia) care se leagă specific la receptorul costimulator. Într-o realizare anticorpul este un anticorp monoclonal. Într-o altă formă de realizare, anticorpul este fragmentul sc-Fv. În realizările specifice anticorpul este un anticorp uman sau umanizat. Într-o altă variantă de realizare antagonistul unui receptor inhibitor este un receptor solubil sau un anticorp (sau un fragment de legare cu antigenul al acestuia), care se leagă specific la un ligand al receptorului inhibitor. În anumite realizări anticorpul este o proteină himerică care conține proteina F a NDV sau un fragment al acesteia, sau proteina HN a NDV sau un fragment al acesteia (US 2012-0122185; Park et al. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease. PNAS USA, no 103, 2006, p. 8203-2808; Murawski et al. J. Virol., no 84, 2010, p. 1110-1123). În anumite realizări anticorpul este exprimat ca o proteină himeră F sau o proteină F de fuziune a NDV, în care proteina himerică F sau proteina F de fuziune a NDV conține domeniile citoplasmice și transmembranare sau fragmente ale acestora ale glicoproteinei F a NDV și domeniul extracelular conține anticorpul. În unele variante anticorpul este exprimat ca o proteină HN himerică sau proteină HN de fuziune a NDV, în care proteina HN himerică sau proteina HN de fuziune a NDV conține domeniile transmembranare și intracelulare sau fragmente ale acestora ale glicoproteinei HN a NDV și domeniul extracelular conține anticorpul.

Într-un alt aspect prezenta invenție se referă la metode pentru propagarea NDV descrise aici (de exemplu, NDV himerice descrise aici). NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice, conform prezentei invenții) pot fi propagate în orice celulă, subiect, țesut sau organ susceptibil la o infecție cu NDV. Într-o realizare NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice, conform prezentei invenții) pot fi propagate într-o linie celulară. Într-o altă realizare NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, NDV himerice, conform prezentei invenții) pot fi propagate în celule canceroase. Într-o altă realizare NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, NDV, conform prezentei invenții) pot fi propagate într-un ou embrionat. În anumite realizări prezenta invenție se referă la celule, țesuturi sau organe izolate infectate cu NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, NDV himeric, conform prezentei invenții) (de exemplu, secțiunea 5.4 prezentată în continuare, pentru exemple de celule animale și de ouă infectate cu un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric, conform prezentei invenții)). În

unele variante de realizări prezenta invenție se referă la celule canceroase izolate infectate cu un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric, conform prezentei invenții). În anumite realizări prezenta invenție se referă la liniile celulare infectate cu un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric, conform prezentei invenții). În alte exemple de realizare prezenta invenție se referă la ouă embrionate infectate cu un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric, conform prezentei invenții).

5 Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la compoziții care conțin un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric, conform prezentei invenții). Într-o variantă concretă de realizare prezenta invenție se referă la compoziții farmaceutice cu conținut de un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric, conform prezentei invenții) și un purtător farmaceutic acceptabil. Într-o altă variantă de realizare prezenta invenție se referă la compoziții farmaceutice care conțin celulele canceroase infectate cu un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric, conform prezentei invenții) și un purtător farmaceutic acceptabil. În unele realizări concrete celulele canceroase au fost tratate cu radiații gamma înainte de incorporare în compoziția farmaceutică. În alte variante de realizare celulele canceroase au fost tratate cu radiații gamma înainte de infectare cu NDV (de exemplu, cu NDV himeric). În alte exemple de realizare celulele canceroase au fost tratate cu radiații gamma după infectare cu NDV (de exemplu, cu NDV himeric). Intr-o altă realizare sunt prezentate compoziții farmaceutice cu conținut de concentrat proteic din celulele canceroase lizate, infectate cu NDV (de exemplu, celulele canceroase infectate cu NDV himeric) și un purtător farmaceutic acceptabil.

20 Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la metode de producere a compozițiilor farmaceutice cu conținut de un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric, conform prezentei invenții). Într-o realizare o metodă pentru producerea unei compoziții farmaceutice prevede: (a) propagarea NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, NDV himeric, conform prezentei invenții) într-o linie celulară care este susceptibilă la o infecție cu NDV și (b) colectarea descendenților virusului, în care virusul este crescut în cantități suficiente și în condiții suficiente pentru ca virusul să nu fie contaminat, astfel încât descendenții virusului să fie potriviți pentru formularea într-o compoziție farmaceutică. Într-o altă variantă de realizare o metodă pentru producerea unei compoziții farmaceutice prevede: (a) propagarea NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, NDV himeric, conform prezentei invenții) într-un ou embrionat și (b) colectarea descendenților virusului, în care virusul este crescut în cantități suficiente și în condiții suficiente pentru ca virusul să nu fie contaminat, astfel încât descendenții virusului să fie potriviți pentru formularea într-o compoziție farmaceutică.

30 Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului utilizând un NDV himeric, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric descris în secțiunea 5.2 în continuare) sau o compoziție cu conținut de un astfel de NDV himeric. Într-o variantă concretă de realizare o metodă pentru tratarea cancerului prevede infectarea unei celule de cancer de la un subiect cu un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, cu un NDV himeric descris în secțiunea 5.2 în continuare) sau cu o compoziție a acestuia. Într-o altă variantă de realizare o metodă pentru tratarea cancerului constă în administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unui NDV himeric, conform prezentei invenții (de exemplu, a unui NDV himeric descris în secțiunea 5.2 în continuare) sau a unei compoziții a acestuia. În unele variante concrete de realizare o cantitate eficientă de un NDV himeric, conform prezentei invenții (de exemplu, de un NDV himeric, descris în secțiunea 5.2 în continuare) sau de o compoziție care cuprinde o cantitate eficientă de un NDV himeric, conform prezentei invenții, este administrată unui subiect pentru tratarea cancerului. În unele variante concrete de realizare NDV himeric conține un genom, genomul conține un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune (de exemplu, un agonist al receptorului costimulator al unei celule imune) și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune (de exemplu, un antagonist al unui receptor inhibitor al unei celule imune). În anumite realizări genomul NDV conține, de asemenea, o proteină F mutantă. În anumite realizări pentru tratarea cancerului la un subiect sunt administrate două sau mai multe NDV himerice.

50 Intr-o altă variantă de realizare a prezentei invenții o metodă pentru tratarea cancerului constă în administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a celulelor canceroase infectate cu un NDV himeric, conform prezentei invenții (de exemplu, cu un NDV himeric descris în secțiunea 5.2 în continuare) sau de compoziție a acestuia. În unele variante de realizare celulele canceroase au fost tratate cu radiații gamma înainte de administrare la un subiect sau de incorporare în compoziție. Într-o altă variantă de realizare o metodă pentru tratarea cancerului constă în administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unui concentrat proteic sau a

fragmentelor de membrană plasmatică de la celulele canceroase infectate cu un NDV himeric (de exemplu, cu un NDV himeric descris în secțiunea 5.2 în continuare) sau a unei compoziții ale acestora. În unele variante de realizare a prezentei invenții NDV himeric conține un genom, genomul conținând un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune (de exemplu, un

5 agonist al receptorului costimulator al unei celule imune) și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune (de exemplu, un antagonist al unui receptor inhibitor al unei celule imune). În anumite realizări genomul NDV conține, de asemenea, o proteină F mutantă.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului utilizând un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric cum este descris în secțiunea 10 5.2 în continuare) sau o compoziție care conține un asemenea NDV în combinație cu una sau mai multe alte terapii. Intr-o realizare prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului care prevăd administrarea la un subiect a unui NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric, cum este descris în secțiunea 5.2.1 în continuare) și una sau mai multe alte terapii. Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului, care prevăd 15 administrarea la un subiect a unei cantități eficiente de un NDV, conform prezentei invenții, sau de o compoziție cu conținut de o cantitate eficientă de un NDV, conform prezentei invenții, și una sau mai multe alte terapii. NDV și una sau mai multe alte terapii pot fi administrate subiectului concomitent sau succesiv. În anumite realizări NDV și una sau mai multe alte terapii sunt administrate în aceeași compoziție. În alte realizări NDV și una sau mai multe alte terapii sunt 20 administrate în diferite compoziții. NDV și una sau mai multe alte terapii pot fi administrate subiectului prin aceleași căi sau prin căi diferite de administrare.

Orice tip sau tulpină de NDV pot fi utilizate într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, incluzând, dar nefiind exhaustive, tulpini, variante sau mutanți nativi, virusuri mutagenizate, reasortante și/sau virusuri modificate genetic. Într-o realizare concretă NDV, utilizat 25 într-o combinație cu una sau mai multe alte terapii, este o tulpină nativă. Într-o altă variantă de realizare NDV, utilizat în combinație cu una sau mai multe alte terapii, este un NDV himeric. Într-o variantă de realizare a prezentei invenții NDV himeric conține un genom ambalat, genomul conținând o citokină (de exemplu, IL-2, IL-7, IL-15, IL-17, IL-21 sau). În realizările specifice citokina este exprimată în celule infectate cu NDV himeric. Într-o variantă de realizare NDV 30 himeric conține un genom ambalat, genomul conținând un antigen tumoral. În realizările specifice antigenul tumoral este exprimat în celulele infectate cu NDV himeric. Intr-o variantă de realizare NDV himeric conține un genom ambalat, genomul conținând o moleculă proapoptotică sau o moleculă antiapoptotică. În realizările specifice molecula proapoptotică sau antiapoptotică este exprimată în celulele infectate cu NDV himeric.

Intr-o altă variantă de realizare NDV himeric conține un genom ambalat, genomul conținând un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune (de exemplu, un agonist al receptorului costimulator al unei celule imune) și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune (de exemplu, un antagonist al unui receptor inhibitor al unei celule imune). În 40 variantele concrete de realizare agonistul și/sau antagonistul sunt exprimați în celulele infectate cu NDV himeric. În anumite realizări genomul NDV conține, de asemenea, o proteină F mutantă. În anumite realizări una sau mai multe terapii, folosite în combinație cu un NDV, conform prezentei invenții, este una sau mai multe alte terapii descrise în secțiunea 5.6.4 în continuare. În realizările particulare acea una sau mai multe terapii, folosite în combinație cu un NDV, conform prezentei invenții, este un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau un antagonist al 45 unui semnal inhibitor al unei celule imune (de exemplu, secțiunea 5.6.4.1 în continuare). Exemple de agoniști ai unui semnal costimulator al unei celule imune și de antagoniști ai unui semnal inhibitor al unei celule imune sunt prezentate, de exemplu, în secțiunea 5.2.1 în continuare. Într-o variantă de realizare antagonistul unui semnal inhibitor al unei celule imune este anticorpul anti-CTLA-4, descris în secțiunile 6 și 7 în continuare. Într-o altă realizare specifică antagonistul unui semnal inhibitor al unei celule imune este anticorpul anti-PD-1 sau un anticorp anti-PD-L1 descris 50 în secțiunea 7 în continuare. Într-o altă variantă concretă de realizare agonistul unui semnal costimulator al unei celule imune este ligandul ICOS, descris în secțiunile 6 și 7 în continuare.

Terminologia

Așa cum este utilizat aici, termenul "aproximativ" sau "circa", când este utilizat în 55 conjuncție cu un număr, se referă la orice număr constituind 1,5 sau 10% din numărul de referință.

Așa cum este utilizat aici, termenul "agonist (agoniști)" se referă la o moleculă (molecule) care se leagă la o altă moleculă și induce (induc) o reacție biologică. Într-o variantă de realizare un agonist este o moleculă care se leagă la un receptor de pe o celulă și declanșează unul sau mai multe căi de transducție a semnalului. De exemplu, un agonist include un anticorp sau un ligand,

care se leagă la un receptor de pe o celulă și induce una sau mai multe căi de transducție a semnalului. În anumite realizări anticorpul sau ligandul se leagă la un receptor de pe o celulă și induce una sau mai multe căi de transducție a semnalului. În alte exemple de realizare agonistul facilitează interacțiunea ligandului nativ cu receptorul nativ.

5 Așa cum este utilizat aici, termenul "antagonist (antagoniști)" se referă la o moleculă (molecule) care inhibă acțiunea unei alte molecule fără a provoca un răspuns biologic ca atare. Într-o variantă de realizare un antagonist este o moleculă care se leagă la un receptor de pe o celulă și blochează sau diminuează activitatea biologică a unui agonist. De exemplu, un antagonist include un anticorp sau un ligand care se leagă la un receptor de pe o celulă și blochează sau
10 diminuează legarea ligandului nativ la celula fără a induce una sau mai multe căi de transducție a semnalului. Un alt exemplu de un antagonist include un anticorp sau un receptor solubil, care concurează cu receptorul nativ pe celulele pentru legare la ligandul nativ, și, astfel, blocând sau atenuând una sau mai multe căi de transducție a semnalului, indus atunci când receptorul nativ se leagă la ligandul nativ.

15 Așa cum sunt utilizați aici, termenii "anticorp" și "anticorpi" se referă la molecule, care conțin un locus de legare a antigenului, de exemplu, imunoglobuline. Anticorpii includ, dar nefiind exhaustivi, anticorpi monoclonali, anticorpi bispecfici, anticorpi multispecfici, anticorpi umani, anticorpi umanizați, anticorpi sintetici, anticorpi himerici, anticorpi policlonali, anticorpi cu un singur domeniu, anticorpi camelizați, fragmente Fv dintr-un singur lanț (scFv), anticorpi dintr-un
20 lanț unic, fragmente Fab, fragmente F(ab'), fragmente Fv(sdFv) bispecifice legate prin disulfură, intracorpi și anticorpi antiidiotipici (anti-Id) (inclusiv, de exemplu, anticorpi anti-Id și anticorpi anti-anti-Id la anticorpi), precum și fragmente din oricare din anticorpii menționați legați prin epitop. În particular, anticorpii includ molecule de imunoglobulină și fragmente active imunologic de molecule de imunoglobulină. Molecule de imunoglobulină pot fi de orice tip (de exemplu, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA și IgY), clasă (de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 și IgA2) sau subclasă. Într-o variantă de realizare anticorpul este un anticorp uman sau umanizat. Într-o altă realizare concretă anticorpul este un anticorp monoclonal sau un fragment scFv. În anumite realizări anticorpul este un anticorp monoclonal uman sau umanizat sau un fragment scFv. În alte
30 exemple de realizare anticorpul este un anticorp bispecific. În anumite realizări anticorpul bispecific se leagă specific la un receptor costimulator al unei celule imune sau la un receptor inhibitor al sistemului imunitar și la un receptor pe o celulă canceroasă. În unele variante anticorpul bispecific se leagă în mod specific la doi receptori ai celulelor imune, de exemplu, la doi receptori costimulatori pe celulele imune, doi receptori inhibitori pe celulele imune sau la un receptor costimulator pe celulele imune și un receptor inhibitor pe celulele imune.

35 Așa cum este utilizat aici, termenul "derivat" în contextul proteinelor sau polipeptidelor se referă la: (a) o polipeptidă care este, cel puțin, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, sau 99% sau 40% până la 65%, 50% până la 90%, 65% până la 90%, 70% până la 90%, 75% la 95%, 80% până la 95%, sau 85% până la 99% identică cu o polipeptidă nativă; (b) o polipeptidă codificată cu o secvență de acid nucleic care este, cel puțin, 40%, 45%,
40 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, sau 99% sau de 40% până la 65%, 50% până la 90%, 65% până la 90%, 70% până la 90%, 75% până la 95%, 80% până la 95%, sau 85% până la 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o polipeptidă nativă; (c) o polipeptidă care conține 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sau mai mult, sau 2 la 5, 2 până la 10, 5 până la 10, 5 până la 15, 5 până la 20, 10 până la 15 sau 15 până la
45 20 mutații aminoacide (adică, adiții, deleții și/sau substituții), comparativ cu o polipeptidă nativă; (d) o polipeptidă codificată cu secvența de acid nucleic, care poate hibridiza în condiții de hibridizare de stringență înaltă, moderată sau tipică la o secvență de acid nucleic, care codifică o polipeptidă nativă; (e) o polipeptidă codificată cu o secvență de acid nucleic care poate hibridiza în condiții de hibridizare de stringență înaltă, moderată sau tipică cu o secvență de acid nucleic, care
50 codifică un fragment dintr-o polipeptidă nativă constând din cel puțin 10 aminoacizi adiacenți, cel puțin 12 aminoacizi adiacenți, cel puțin 15 aminoacizi adiacenți, cel puțin 20 de aminoacizi adiacenți, cel puțin 30 de aminoacizi adiacenți, cel puțin 40 de aminoacizi adiacenți, cel puțin 50 de aminoacizi adiacenți, cel puțin 75 de aminoacizi adiacenți, cel puțin 100 de aminoacizi adiacenți, cel puțin 125 de aminoacizi adiacenți, cel puțin 150 de aminoacizi adiacenți sau 10 până
55 la 20, 20 până la 50, 25 până la 75, 25 până la 100, 25 până la 150, 50 până la 75, 50 până la 100, 75 până la 100, 50 până la 150, 75 până la 150, 100 până la 150, sau 100 până la 200 aminoacizi adiacenți; sau (f) un fragment al unei polipeptide native. Derivații includ, de asemenea, o polipeptidă care conține secvența de aminoacid al unei forme mature native de o polipeptidă de mamifer și o secvență aminoacidă de peptidă de semnalizare heteroloagă. Adițional, derivații

includ polipeptide care au fost modificate chimic, de exemplu, prin glicosilare, acetilare, pegilare, fosforilare, amidare, de obținere a derivaților cu grupe de protecție/de blocare cunoscute, clivaj proteolitic, legătura la un ligand celular sau la un alt fragment proteic, etc. În continuare derivații includ polipeptide, care conțin unul sau mai mulți aminoacizi neclasici. Într-o realizare, un derivat este izolat. În variantele concrete de realizare derivatul păstrează una sau mai multe funcții ale polipeptidelor native din care a fost derivat.

Procentul de identitate poate fi determinat folosind orice metodă cunoscută de către specialiștii în domeniu. Într-o variantă de realizare procentul de identitate se determină utilizând programul "Best Fit" sau "Gap" din Sequence Analysis Software Package (Versiunea 10; Genetics Computer Group, Inc., Universitatea din Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wisconsin). Informațiile cu privire la condițiile de hibridizare (de exemplu, condiții de stringență moderată și tipică) au fost deja publicate (Park et al. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease. PNAS USA, no 103, 2006, p. 8203-2808) (de exemplu, paragrafele 72...73).

Așa cum este utilizat aici, termenul "fragment", reprezentând un fragment dintr-un agent proteic (de exemplu, o proteină), se referă la un fragment constituit din 8 sau mai mulți aminoacizi adiacenți, 10 sau mai mulți aminoacizi adiacenți, 15 sau mai mulți aminoacizi adiacenți, 20 sau mai mulți aminoacizi adiacenți, 25 sau mai mulți aminoacizi adiacenți, 50 sau mai mulți aminoacizi adiacenți, 75 sau mai mulți aminoacizi adiacenți, 100 sau mai mulți aminoacizi adiacenți, 150 sau mai mulți aminoacizi adiacenți, 200 sau mai mulți aminoacizi adiacenți sau conținând 10 până la 300 aminoacizi adiacenți, 10 până la 200 aminoacizi adiacenți, 10 până la 250 aminoacizi adiacenți, 10 până la 150 aminoacizi adiacenți, 10 până la 100 aminoacizi adiacenți, 10 până la 50 aminoacizi adiacenți, 50 până la 100 aminoacizi adiacenți, 50 până la 150 aminoacizi adiacenți, 50 până la 200 aminoacizi adiacenți, 50 până la 250 aminoacizi adiacenți, 50 până la 300 aminoacizi adiacenți, 25 până la 50 aminoacizi adiacenți, 25 până la 75 aminoacizi adiacenți, 25 până la 100 aminoacizi adiacenți sau 75 până la 100 aminoacizi adiacenți ai unui agent proteic. Într-o variantă de realizare un fragment dintr-un agent proteic păstrează una sau mai multe din funcțiile agentului proteic - cu alte cuvinte, acesta este un fragment funcțional. De exemplu, un fragment dintr-un agent proteic păstrează capacitatea de a interacționa cu o altă proteină și/sau de a induce, amplifica sau activa una sau mai multe căi de transducție a semnalului.

Așa cum este utilizat aici, termenul "fragment funcțional", în contextul unui agent proteic, se referă la o porțiune dintr-un agent proteic, care păstrează una sau mai multe activități sau funcții ale agentului proteic. De exemplu, un fragment funcțional al unui receptor inhibitor poate menține capacitatea de a se lega la unul sau mai mulți dintre liganzii săi. Un fragment funcțional dintr-un ligand al unui receptor costimulator poate păstra capacitatea de a se lega la receptor și/sau de a amplifica sau de a activa una sau mai multe căi de transducție a semnalului, mediate prin legarea ligandului la receptorul său costimulator.

Așa cum este utilizat aici, termenul "heterolog" se referă o entitate care în natură nu este întâlnită, ceea ce se leagă (de exemplu, se codifică și/sau se exprimă cu genomul) cu un NDV nativ.

Așa cum este utilizat aici, termenul "persoană umană în vârstă" se referă la o ființă umană de 65 ani sau mai în vârstă.

Așa cum este utilizat aici, termenul "persoană umană adultă" se referă la un om care este de 18 ani sau mai în vârstă.

Așa cum este utilizat aici, termenul "copil uman" se referă la o ființă umană cu vârstă de la 1 an până la 18 ani.

Așa cum este utilizat aici, termenul "copil mic" se referă la o ființă umană cu vârstă de la 1 an până la 3 ani.

Așa cum este utilizat aici, termenul "bebeluș" se referă la un nou-născuții până la 1 an.

În anumite realizări, termenii "extrem de fusogenic" și "creșterea activității fusogenice", etc., așa cum este utilizat aici, se referă la o creștere a abilității NDV de a forma sincițiu implicând un număr mare de celule. Într-o variantă de realizare celulele infectate cu un NDV, conform prezentei invenții, care este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă, au o capacitate crescută de a forma sincițiu, comparativ cu celulele infectate cu virusul parental din care virusul este derivat, virusul parental având proteina F fără mutații. Într-o altă realizare specifică, aproximativ 10% până la circa 25%, aproximativ 25% până la aproximativ 50%, aproximativ 25% până la aproximativ 75%, aproximativ 50% până la aproximativ 75%, aproximativ 50% până la circa 95% sau aproximativ 75% până la aproximativ 99%, sau aproximativ 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, sau 99% și mai

multe din celulele infectate cu un NDV, conform prezentei invenții, care este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă, formează sincițiu, comparativ cu numărul de celule care formează sincițiu și sunt infectate cu virusul parental de la care virusul himeric este derivat și care are o proteină F fără mutații. În anumite realizări sincițiul este cuantificat microscopic prin numărarea numărului de nuclee per sincițiu după o anumită perioadă de timp (de exemplu, de circa 8 ore până la aproximativ 12 ore, de aproximativ 12 ore până la aproximativ 24 ore, de aproximativ 24 ore până la circa 36 ore sau de aproximativ 36 ore până la aproximativ 48 ore).

Așa cum este utilizat aici, termenul "antagonist al interferonului" se referă la un agent care reduce sau inhibă răspunsul imun celular de interferon. Într-o realizare un antagonist de interferon este un agent proteic, care reduce sau inhibă răspunsul imun celular de interferon. Într-o variantă de realizare un antagonist de interferon este o proteină sau o polipeptidă virală, care reduce sau inhibă răspunsul celular de interferon.

Intr-o variantă concretă de realizare a prezentei invenții un antagonist de interferon este un agent care reduce sau inhibă expresia și/sau activitatea interferonului. Într-o realizare antagonistul de interferon reduce sau inhibă expresia și/sau activitatea IFN de tip I. Într-o altă realizare antagonistul de interferon reduce sau inhibă expresia și/sau activitatea IFN de tip II. Într-o altă realizare antagonistul de interferon reduce sau inhibă expresia și/sau activitatea IFN de tip III. Într-o variantă de realizare antagonistul de interferon reduce sau inhibă expresia și/sau activitatea fie a IFN- α , sau IFN- β , sau a ambelor. Intr-o altă realizare specifică antagonistul de interferon reduce sau inhibă expresia și/sau activitatea IFN- Γ . Intr-o altă realizare antagonistul de interferon reduce sau inhibă expresia și/sau activitatea unui, a doi sau a toți IFN- α , IFN- β și IFN- Γ .

În anumite variante de realizare expresia și/sau activitatea IFN- α , IFN- β și/sau IFN- Γ într-un ou embrionat sau în celule este redusă cu un antagonist de interferon aproximativ de 1 până la aproximativ 100 de ori, aproximativ de 5 până la aproximativ 80 de ori, aproximativ de 20 până la aproximativ 80 de ori, aproximativ de 1 până la aproximativ 10 de ori, aproximativ de 1 până la aproximativ 5 de ori, aproximativ de 40 până la aproximativ 80 de ori sau de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 sau 100 de ori, comparativ cu expresia și/sau activitatea IFN- α , IFN- β și/sau IFN- Γ într-un ou embrionat de control sau într-o celulă care nu exprimă sau nu contactează cu astfel de antagonist de interferon, măsurată prin metodele descrise aici sau cunoscute de specialiștii în domeniu. În alte exemple de realizare expresia și/sau activitatea IFN- α , IFN- β și/sau IFN- Γ într-un ou embrionat sau în celule la utilizarea unui antagonist al interferonului este redusă cel puțin cu 20% până la 25%, cel puțin cu 25% până la 30%, cel puțin cu 30% până la 35%, cel puțin cu 35% până la 40%, cel puțin cu 40% până la 45%, cel puțin cu 45% până la 50%, cel puțin cu 50% până la 55%, cel puțin cu 55% până la 60%, cel puțin cu 60% până la 65%, cel puțin cu 65% până la 70%, cel puțin cu 70% până la 75%, cel puțin cu 75% până la 80%, cel puțin cu 80% până la 85%, cel puțin cu 85% până la 90%, cel puțin cu 90% până la 95%, cel puțin cu 95% până la 99% sau cu 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau 99%, comparativ cu expresia și/sau activitatea IFN- α , IFN- β și/sau IFN- Γ într-o ou de control embrionat sau într-o celulă care nu exprimă sau nu contactează cu astfel de antagonist de interferon, măsurată prin metodele descrise aici sau cunoscute de specialiștii în domeniu.

Așa cum sunt utilizate aici expresiile "sisteme IFN deficitare" sau "substraturi deficiente de IFN" se referă la sisteme, de exemplu, celule, linii celulare și animale, cum ar fi șoareci, găini, curcani, iepuri, șobolani, cai, etc., care nu produc una, două sau mai multe tipuri de IFN, sau nu produc nici un fel de IFN, sau produc niveluri reduse de unul, două sau mai multe tipuri de IFN, sau produc niveluri reduse de orice tip de IFN (de exemplu, o reducere a expresiei de orice IFN cu 5...10%, 10...20%, 20...30%, 30...40%, 40...50%, 50...60%, 60...70%, 70...80%, 80...90% sau mai mult, în comparație cu sistemele competente de IFN în aceleași condiții), nu răspund sau răspund mai puțin eficient la unul, două sau mai multe tipuri de IFN, sau nu răspund la orice tip de IFN, au un răspuns întârziat la unul, două sau mai multe tipuri de IFN și/sau sunt deficitare în activitatea genelor antivirale indusă de unul, două sau mai multe tipuri de IFN, sau indusă cu orice tip de IFN.

Așa cum este utilizat aici, termenii "legături imunospecifice" "identificatori imunospecfici," "legături specifice" și "identificatori specifici" sunt termeni similari în contextul anticorpilor și se referă la molecule care se leagă specific la un antigen (de exemplu, epitop sau un complex imunitar), cum este înțeles de către un specialist în domeniu. O moleculă, care se leagă specific la un antigen se poate lega la alte peptide sau polipeptide cu afinitate mai redusă, determinată prin, de exemplu, imunoteste (de exemplu, ELISA), rezonanța suprafeței plasmonului (de exemplu, BIAcore®), testul KinEx (folosind, de exemplu, un instrument KinExA 3000

(Sapidyne Instruments, Boise, ID)), sau prin alte analize cunoscute în domeniu. Într-o variantă de realizare molecule care se leagă în mod specific la un antigen, se leagă la antigen cu o constantă de disociere (de exemplu, K_a), care este de cel puțin 2 log, 2,5 log, 3 log, 3,5 log, 4 log sau mai mare decât K_a , atunci când moleculele se leagă la alt antigen. Într-o altă variantă de realizare moleculele

care se leagă specific la un antigen nu reacționează încrucișat cu alte proteine.

Așa cum este utilizat aici, termenul "anticorp monoclonal" este un termen în domeniu și, în general, se referă la un anticorp obținut dintr-o populație de anticorpi omogeni sau substanțial omogeni și fiecare anticorp monoclonal va recunoaște în mod tipic un singur epitop (de exemplu, o singură conformație epitop) pe antigen.

Așa cum este utilizat aici, fraza "multiplicitatea infecției" sau "MOI" este numărul mediu de virus per celulă infectată. MOI se determină prin împărțirea numărului de virus adăugat (ml adăugate $\times$ Pfu) la numărul de celule adăugate (ml adăugate $\times$ celule/ml).

Așa cum este utilizat aici, termenul "ligand nativ" se referă la orice ligand natural care se leagă la un receptor natural. Într-o variantă de realizare ligandul este un ligand de mamifer. Într-o altă realizare specifică ligandul este un ligand uman.

Așa cum este utilizat aici, termenul "polipeptidă (polipeptide) nativă (native)" în contextul proteinelor sau polipeptidelor se referă la orice secvență aminoacidă naturală, inclusiv la forme imature sau precursori și mature ale unei proteine. Într-o variantă de realizare polipeptida nativă este o proteină sau polipeptidă umană.

Așa cum este utilizat aici, termenul "receptor nativ" se referă la orice receptor natural care se leagă la un ligand natural. Într-o variantă de realizare receptorul este un receptor de mamifer. Într-o altă realizare specifică receptorul este un receptor uman.

Așa cum sunt utilizați aici, termenii "subiect" sau "pacient" sunt utilizați interschimbabil. Așa cum sunt utilizați aici, termenii "subiect" și "subiecți" se referă la un animal. În unele variante de realizare subiectul este un mamifer, inclusiv care nu este primat (de exemplu, cămilă, măgar, zebra, bovină, cal, pisică, câine, șobolan și șoarece), precum și un primat (de exemplu, maimuță, cimpanzeu și om). În unele variante de realizare subiectul este un mamifer non-uman. În anumite realizări subiectul este un animal de companie (de exemplu, câine sau pisica) sau animale de fermă (de exemplu, cal, porc sau vacă). În alte exemple de realizare subiectul este o ființă umană. În anumite realizări mamiferul (de exemplu, uman) este de vârstă de 0 până la 6 luni, 6 până la 12 luni, 1 până la 5 ani, 5 până la 10 de ani, 10 până la 15 de ani, 15 până la 20 de ani, 20 până la 25 de ani, 25 până la 30 de ani, 30 până la 35 de ani, 35 până la 40 de ani, 40 până la 45 de ani, 45 până la 50 de ani, 50 până la 55 de ani, 55 până la 60 de ani, 60 până la 65 de ani, 65 până la 70 de ani, 70 până la 75 de ani, 75 până la 80 de ani, 80 până la 85 de ani, 85 până la 90 de ani, 90 până la 95 de ani sau 95 până la 100 de ani. În realizările specifice subiectul este un animal care nu este aviar.

Așa cum sunt utilizați aici termenii "a trata" și "tratare", în contextul administrării unui tratament, se referă la un tratament/terapie de la care un subiect primește un efect benefic, cum ar fi reducerea, descreșterea, atenuarea, diminuarea, stabilizarea, remisია, suprimarea, inhibarea sau stoparea dezvoltării sau progresiei cancerului, sau unui simptom al acestuia. În anumite realizări tratamentul/terapia rezultă la un subiect cu cel puțin unul sau mai multe dintre următoarele efecte: (i) reducerea sau ameliorarea severității cancerului și/sau a unui simptom asociat cu acesta; (ii) reducerea duratei unui simptom asociat cu cancerul; (iii) prevenirea reapariției unui simptom asociat cu cancerul; (iv) regresia cancerului și/sau a unui simptom asociat cu acesta; (v) reducerea spitalizării unui subiect; (vi) reducerea duratei de spitalizare; (vii) creșterea supraviețuirii unui subiect; (viii) inhibarea progresiei cancerului și/sau a unui simptom asociat cu acesta; (ix) consolidarea sau îmbunătățirea efectului terapeutic al altei terapii; (x) reducerea sau eliminarea cancerului în populația de celule; (xi) reducerea creșterii unei tumori sau a unui neoplasm; (xii) micșorarea dimensiunilor tumorii; (xiii) reducerea în formarea unei tumori; (xiv) eradicarea, eliminarea sau controlul cancerului primar, regional și/sau metastatic; (xv) reducerea numărului sau mărimii metastazelor; (xvi) reducerea mortalității; (xvii) creșterea ratei de supraviețuire a pacienților fără cancer; (xviii) creșterea supraviețuirii fără recidive; (xix) creșterea numărului de pacienți în remisie; (xx) reducerea ratei de spitalizare; (xxi) menținerea dimensiunilor tumorii și lipsa creșterii tumorii sau măririi în dimensiuni a tumorii cu cel puțin 5% sau 10% după administrarea unei terapii, măsurată prin metode uzuale disponibile pentru un specialist în domeniu, cum ar fi RMN, raze roentgen și CAT Scan; (xxii) prevenirea dezvoltării sau debutului cancerului și/sau unui simptom asociat cu acesta; (XXIII) prelungirea duratei de remisiuni la pacienți; (xxiv) reducerea numărului de simptome asociate cu cancerul; (XXV) creșterea supraviețuirii fără simptome a pacienților cu cancer și/sau (XXVI) limitarea sau reducerea

metastazelor. În unele realizări tratamentul/terapia administrată de un subiect nu vindecă cancerul, dar previne progresia sau agravarea bolii. În anumite realizări tratamentul/terapia administrată de un subiect nu împiedică instalarea/dezvoltarea cancerului, dar poate preveni instalarea simptomelor de cancer.

5 Așa cum este utilizat aici, termenul "în combinație", în contextul administrării terapiei (terapiilor) la un subiect, se referă la utilizarea a mai mult decât o terapie. folosirea termenului "în combinație" nu restricționează ordinea în care terapiile sunt administrate la un subiect. o primă
10 terapie poate fi administrată înainte (de exemplu, cu 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 oră, 2 ore, 4 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore, 96 ore, 1 săptămâni, 2 săptămâni, 3 săptămâni, 4 săptămâni, 5 săptămâni, 6 săptămâni, 8 săptămâni sau 12 săptămâni înainte de), concomitent cu, sau după (de exemplu, cu 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 oră, 2 ore, 4 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore, 96 ore, 1 săptămână, 2 săptămâni, 3 săptămâni, 4 săptămâni, 5 săptămâni, 6 săptămâni, 8 săptămâni sau 12 săptămâni după) administrarea unei a doua terapii la un subiect.

15 Așa cum sunt utilizați aici termenii "terapii" și "terapie" se pot referi la orice protocol (protocoale), metodă (metode) și/sau agent (agenți) care poate (pot) fi utilizat (utilizați) în tratamentul cancerului. În anumite realizări termenii "terapii" și "terapie" se referă la terapia biologică, terapia de susținere, terapia hormonală, chimioterapie, imunoterapie și/sau alte terapii utile în tratamentul cancerului. Într-o variantă de realizare terapia include terapia adjuvantă. De
20 exemplu, folosind o terapie în combinație cu o terapie medicamentoasă, terapie biologică, chirurgie și/sau o terapie de susținere. În anumite realizări termenul "terapie" se referă la un NDV himeric, conform prezentei invenții. În alte exemple de realizare termenul "terapie" se referă la un agent care nu este un NDV himeric.

Invenția se explică prin desenele din fig. 1-fig. 47, care reprezintă:

25 Fig. 1, infecția cu NDV amplifică expresia MHC I, MHC II și ICAM-1 *in vitro* pe suprafața celulelor B16-F10 infectate (24 ore după infectare).

Fig. 2A-2E, tratamentul intratumoral cu NDV conduce la infiltrarea cu macrofagi, celule NK, celule efectoare CD8 și CD4 și reduce frecvența Treg. A) schema de studiu generală. B) total CD45 + infiltrate. C) total de celule imune de infiltrate. D) Sectoarele punctiforme reprezentative ale citometriei în flux corespunzătoare subpopulațiilor CD4FoxP3+ și FoxP3-. E) Raporturile Teff/Treg și CD8/Treg.
30

Fig. 3A-3C, terapia cu NDV prezintă efecte benefice asupra micromediului tumorii în tumorile la distanță. A) CD4FoxP3 și FoxP3-. B) Numărul absolut de celule CD4 efectoare, Treg și CD8 per gram de tumoare. C) Raporturile Teff/Treg și CD8/Treg.

35 Fig. 4A-4C, limfocitele care infiltrază tumorile la distanță stimulează expresia markerilor de activare, liză și proliferare. Sectoarele de expresie reprezentative pe celulele efectoare CD4 (stânga) și procentele de conținut corespunzătoare în celulele efectoare CD4, CD8, Treg (dreapta) sunt afișate pentru A) CD44, B) Granzima B și C) Ki-67.

Fig. 5A-5D, monoterapia cu NDV reține creșterea tumorilor la distanță și oferă o anumită protecție împotriva relansării tumorii. Tumorile din flancurile bilaterale au fost stabilite, cum este arătat în fig. 2A, și animalele au fost tratate și s-a estimat supraviețuirea lor. A) Creșterea tumorilor (tratate) din flancul drept. B) Creșterea tumorilor (netratate) din flancul stâng. C) Supraviețuirea totală. Numerele din dreptunghiuri indică procentul animalelor fără tumori. D) Supraviețuirea la animalele vindecate de melanom B16-F10 tratate cu NDV, care în a 75 zi au fost reinfectate cu celule de melanom B16-F10. Rezultatele reprezentative din două experimente diferite cu câte 10
45 șoareci în grupă.

Fig. 6A-6B, limfocite care infiltrază tumoarea atât din tumoarea tratată, cât și cea netratată activează CTLA-4 ca răspuns la terapia cu NDV. A) Sectoarele punctiforme reprezentative ale expresiei CTLA-4 în CD8, CD4 efectoare și Treg în tumorile din dreapta (tratate). B) Sectoarele punctiforme reprezentative ale expresiei CTLA-4 în CD8, CD4 efectoare și Treg în tumorile din stanga (netratate).
50

Fig. 7A-7C, terapia asociată cu NDV și blocatori ai CTLA-4 îmbunătățește efectul anti-tumoral în tumorile injectate și în tumorile la distanță. Tumorile B16 bilaterale în flancuri au fost instalate și animalele au fost tratate așa cum s-a arătat în fig. 2A cu sau fără anticorpi 9H10 anti-CTLA-4. A) Creșterea tumorilor tratate. B) Creșterea tumorilor la distanță. Numerele în dreptunghiuri reprezintă procentul șoarecilor fără tumori. C) Supraviețuirea pe termen lung. Rezultatele reprezentative din 2 experimente diferite cu câte 10 șoareci în grupă.
55

Fig. 8, terapia asociată cu NDV și anticorpi anti-CTLA-4 este eficientă sistemic împotriva tumorilor de prostată non-virus-permisive TRAMP. Flancul drept (ziua a 12) și stâng (ziua a 3) tumorile TRAMP au fost instalate și animalele au fost tratate cu NDV așa cum este arătat în fig.

2A cu sau fără anticorpi anti-CTLA-4 sistemici. Este prezentă creșterea tumorilor pe stânga (netratate). Numerele din dreptunghiuri indică procentele de animale fără tumori.

Fig. 9A-9C, infecția cu NDV amplifică exprimarea PD-L1 în tumorile B16-F10. A) Exprimarea PD-L1 pe suprafața celulelor B16-F10 infectate cu NDV timp de 24 ore. B) Exprimarea PD-L1 pe suprafața celulelor B16-F10 tratate cu supernatant, inactivat cu UV, din celulele B16-F10 infectate. C) Activarea PD-L1 pe suprafața celulelor tumorale izolate din tumorile injectate și din tumorile îndepărtate de la animalele tratate ca în fig. 2A (2 imagini stângi – segmentele reprezentative de citometrie în flux, imaginea din dreapta – mediile calculate de la 5 șoareci din grupă).

Fig. 10A-10F, terapia combinată cu NDV și anticorpi anti-PD-1 este eficientă sistemic împotriva melanomului B16 și conduce la creșterea infiltrației cu celule T cu expresia crescută a markerilor de activare. A) Supraviețuirea totală. Animalele au fost tratate, așa cum s-a arătat în fig. 2A, cu sau fără anticorp anti-PD-1. B) Numărul absolut de celule efectoare CD45, CD3, CD8, CD4 în tumori. C) Conținutul procentual relativ de celule T reglatoare în limfocitele care infiltrază tumoarea. DE) Limfocitele care infiltrază tumoarea din tumorile îndepărtate care au fost izolate și colorate pentru expresia ICOS (D) și Granzimei B (E). F) Limfocitele care infiltrază tumoarea au fost restimulate cu celule dendritice încărcate cu lizate tumorale și evaluate pentru expresia gamma IFN prin colorarea citokinei intracelulare.

Fig. 11, terapia combinată cu NDV și CTLA-4 induce activarea celulelor efectoare ICOS și CD4 în tumorile îndepărtate și ganglionii limfatici care drenează tumoarea (TDLN).

Fig. 12A-12D, generarea și evaluarea *in vitro* a virusului NDV-ICOSL. A) Schema constructului genomic viral. B) Exprimarea ICOSL pe suprafața celulelor B16-F10 infectate timp de 24 de ore (histograma reprezentativă, la stânga și media din 3 probe pentru fiecare grupă, dreapta). C) Activitatea citolitică a NDV în celulele B16-F10 infectate determinate prin analiza LDH. D) Replicarea NDV recombinant în celulele B16-F10.

Fig. 13A-13C, terapia combinată cu NDV-mICOSL și anti-CTLA-4 protejează șoarecii de tumoarea provocată contralateral și rezultă cu supraviețuirea animalelor pe termen lung. Animalele au fost provocate cu o doză mai mare de tumoare și tratate cu NDV așa cum este arătat în fig. 2A cu sau fără anticorp anti-CTLA-4 sistemic. Este prezentată creșterea tumorii pe stânga (neinjectate). B) Supraviețuirea pe termen lung. Numerele în dreptunghi indică procentul de animale protejate de tumori. Datele colectate din 3 experimente diferite cu câte 5...10 șoareci din grupă. C) La șoarecii tratați cu terapie combinată, în locul tumorilor anterioare au dezvoltat vitiligo, dar nu sistemic.

Fig. 14A-14B, terapia combinată cu NDV-mICOSL și anticorpi anti-CTLA-4 protejează șoarecii de tumoarea provocată contralateral și rezultă cu supraviețuirea animalelor pe termen lung în modelul de carcinom de colon CT26. Animalele au fost provocate cu o doză mai mare de tumoare și tratate cu NDV așa cum este arătat în fig. 2A cu sau fără anticorp anti-CTLA-4 sistemic. Este prezentată creșterea tumorii pe stânga (neinjectată). Numerele în dreptunghiuri indică procentul de animale protejate de tumori. B) Supraviețuirea pe termen lung. Experimentul reprezentativ cu câte 5...10 șoareci în grupă (A) și date colectate din 2 experimente diferite cu câte 5...10 șoareci în grupă (B).

Fig. 15A-15C, tratamentul cu NDV conduce la infiltrarea tumorii B16 la distanță cu macrofagi, celule NK, celule efectoare CD8 și CD4 și reduce frecvența Treg. A) Totalul de infiltrate cu CD45+, CD3+, CD8+, CD4+ FoxP3-(Teff) și CD4+ FoxP3+ (Treg). B) Raporturile Teff/Treg și CD8/Treg. C) Totalul de celule macrofage, infiltrate cu celule NK și NKT.

Fig. 16A-16B, limfocitele care infiltrază tumorile B16 la distanță amplifică expresia markerilor de activare, liză și proliferare. Sectoarele reprezentative de expresie a Ki-67, Granzimei B (GRB) și ICOS (A) și conținutul procentual corespunzător de celule efectoare CD4 și celule CD8 (B).

Fig. 17, limfocitele care infiltrază tumora de la animalele tratate secretă gama IFN ca răspuns la stimularea cu DC încărcate cu lizate B16-F10. Sunt prezentate sectoarele punctiforme reprezentative.

Fig. 18A-18B, animalele, la care s-a administrat tratament combinat, sunt protejate de altă tumoare provocată. A) Melanomul B16-F10, ziua a 120 de provocare repetată cu 1×10^5 celule. B) Carcinomul de colon CT26, ziua a 90 de provocare repetată cu 1×10^6 celule. Rezultatele reprezentative din două experimente diferite cu câte 10 șoareci în grupă.

Fig. 19A-19B, proteina himerică recombinantă ICOSL-F este eficientă în expresia pe suprafață. A) Reprezentarea schematică a proteinei himerice. B) Expresia proteinei de fuziune himerică ICOSL-FTM pe suprafața celulelor transfectate.

Fig. 20A-20D, infecția cu NDV este limitată de tumoarea injectată. A) NDV-Fluc recombinant s-a fost administrat intratumoral (IT) sau intravenos (IV) la animalele de linia Balb/C purtând tumori CT26 și imaginile dobândite în următoarele 72 de ore. B) NDV-Fluc s-a administrat la șoarecii din linia C57BL/6 purtători de melanom B16-F10 bilateral și animalele au fost monitorizate timp de 120 de ore. Sunt prezentate imaginile luminescente reprezentative. C) Cuantificarea luminescenței de pe locul tumorii normalizate până după luminescența de fond. D) Aria sub curbă (AUC) calculată în baza datelor de pe grafice (C). Datele arată rezultate reprezentative în 1 din 3 experimente independente cu 3...5 șoareci/grup. *** $p < 0,001$.

Fig. 21A-21F, infecția cu NDV crește infiltrarea tumorii cu leucocite în tumorile injectate cu virus. Animalele au fost tratate conform schemei descrise în fig. 22A. Tumorile au fost excizate în a 15 zi și TIL au fost marcate și analizate prin citometrie în flux. A) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru conținutul procentual de celule CD45+ și CD3+ care infiltrază tumoarea. B) Numărul absolut de celule CD45+/g de tumoare. C) Numărul absolut de celule imune naturale/g de tumoare. D) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru conținutul procentual de celule CD4+FoxP3+(Treg) și CD4+FoxP3-(T conv). E) Numărul absolut de celule obișnuite și reglatorii CD4+ și celule CD8+/g de tumoare. F) Raporturile calculate Tconv/Treg și CD8+/Treg în tumori. Datele reprezintă rezultatele cumulate din 3 experimente independente cu 3...5 șoareci/grupă. Este prezentată valoarea medie +/-SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fig. 22A-22M, NDV amplifică infiltrarea limfocitelor în tumorile la distanță și încetinește creșterea tumorii. A) Schema de tratament. B) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru conținutul procentual al celule CD45+ și CD3+ care infiltrază tumoarea. C) Numărul absolut de celule CD45+/g de tumoare. D) Numărul absolut de celule imune naturale/g de tumoare. E) Secțiunile histologice de tumoare din tumorile la distanță au fost colorate cu H&E (imaginile superioare) sau marcate pentru vizualizare CD3 și FoxP3 (imaginile inferioare) și analizate microscopic. Zonele, notate cu săgeți, indică zone de necroză și de infiltrate inflamatorii. Liniile de scară sunt egale cu 200 μ m. F) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru conținutul procentual al celulelor CD4+FoxP3+(Treg) și CD4+FoxP3- (Tconv). G) Numărul absolut de celule obișnuite și reglatoare CD4+ și de celule CD8+/g de tumoare, calculat în baza citometriei în flux. H) Procentul relativ de Treg din celulele CD45+. I) Rapoartele calculate Tconv/Treg și CD8+/Treg. (J, K) Activarea ICOS, Granzimei B și Ki-67 pe celulele Tconv (J) și CD8+ (K) care infiltrază tumoarea. L) Creșterea tumorilor injectate cu NDV și tumorilor la distanță. M) Supraviețuirea generală a animalelor. Datele reprezintă rezultatele cumulate din 3 (B-K) sau 2 (L-M) experimente independente cu $n = 3...5$ per grupă. Este prezentată valoarea medie +/- SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fig. 23A-23E, terapia cu NDV amplifică infiltrarea limfocitelor în tumoare în modelul de melanom bilateral de lăbuță. Animalele cu melanom de lăbuță bilateral au fost tratate în conformitate cu programul descris în fig. 22A. Tumorile la distanță au fost excizate în ziua a 15 și TIL au fost marcate și analizate prin citometrie în flux. A) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru conținutul procentual de celule CD45+ și CD3+ care infiltrază tumoarea. B) Sectoarele reprezentative de citometrie în flux pentru conținutul procentual de celule CD4+FoxP3+ și CD4+FoxP3-. C) Numărul absolut de celule obișnuite și reglatoare CD4+ și celule CD8+/g de tumoare. D, E) Activarea ICOS, Granzimei B și Ki-67 pe limfocitele CD8+ (D) și Tconv (E) care infiltrază tumoarea. Datele arată rezultatele reprezentative pentru 1 din 2 experimente independente cu 5 șoareci/grup. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fig. 24A-24I, NDV induce infiltrarea limfocitelor adoptiv transferate specifice pentru tumoare și contribuie la inflamația tumorii. A) Schema de tratament. B) Imagini luminescente reprezentative de la animalele tratate cu NDV și limfocite adoptiv transferate TRP1-Fluc. C) Cuantificarea luminescenței medii din locurile tumorii. D) Aria de sub curbă (AUC) calculată din datele din grafice (C). E) Numărul absolut de limfocite Pmel din tumorile la distanță, calculat în baza citometriei în flux. F) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru conținutul procentual al celulelor CD45+ și CD3+ infiltrate în tumorile îndepărtate la animalele tratate, conform schemei de tratament din imaginea (A). G) Schema experimentului de transfer de ser de la animalele tratate intratumoral cu o singură injecție de NDV sau PBS. H) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru conținutul procentual de celule CD45+ și CD3+ în tumorile injectate infiltrate cu ser. I) Numărul absolut de subpopulații de celule indicate în tumorile injectate cu ser, calculat în baza citometriei în flux. Datele pentru imaginile B-E reprezintă 1 din 3 experimente cu $n = 4...5$ în grupă. Datele pentru imaginile G-I reprezintă datele

colectate din 2 experimente independente cu $n = 5$ în grupă. Este prezentată valoarea medie $\pm$ SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fig. 25, administrarea intratumoral a NDV oferă protecție de tumoare reprovocată. La animalele vindecate de melanom B16-F10 cu NDV în ziua a 75 au fost injectate 1×10^5 celule de melanom B16-F10, fiind monitorizate pentru creșterea tumorii și eutanaziate atunci când dimensiunea tumorilor a atins 1000 mm^3 . Este prezentată supraviețuirea generală a animalelor. Datele prezintă rezultatele cumulate în 1 din 2 experimente independente cu 10 șoareci/grupă. **** $p < 0,0001$.

Fig. 26A-26B, limfocitele CD8+, care infiltrază tumoarea, activează CTLA-4 ca răspuns la terapia cu NDV. Sectoarele punctiforme reprezentative (stânga) și rezultatele cumulate (dreapta) ale expresiei CTLA-4 în celulele CD8+ în tumorile tratate cu NDV (A) și în tumorile la distanță (B). Rezultatele reprezentative în 1 din 3 experimente cu 3 șoareci în grupă. * $p < 0,05$.

Fig. 27A-27K, NDV și blocatorii CTLA-4 sinergic amplifică respingerea tumorilor locale și la distanță. A) Schema de tratament. B) Creșterea (flancul drept) tumorilor B16-F10 tratate cu virus. C) Creșterea (flancul stâng) tumorilor B16-F10 la distanță. D) Supraviețuirea pe termen lung în modelul cu B16-F10. E) Animalelor, care au supraviețuit, în ziua a 90 le-au fost injectate 1×10^5 celule B16-F10 în flancul drept și a fost monitorizată supraviețuirea lor. Datele reprezintă rezultatele cumulate din 3 experimente cu $n = 6...11$ în grupă. F) Creșterea tumorilor TRAMP C2 tratate cu virus (flancul drept) și la distanță (flancul stâng). G) Supraviețuirea pe termen lung în modelul TRAMP C2. H) Sensibilitatea in vitro a celulelor B16-F10 și TRAMP C2 la liza mediată cu NDV la diferite multiplicități ale infecției (MOI). I-K) Activarea MHC I, MHC II, CD80 și CD86 în celulele B16-F10 și TRAMP C2 infectate cu NDV. Sunt prezentate sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru celulele B16-F10 (I) și semnificațiile medii calculate ale intensității fluorescenței medii (IFM) pentru celulele B16-F10 (J) și TRAMP C2 (K). Este prezentată valoarea medie $\pm$ SEM. Datele reprezintă rezultatele în 1 din 3 (BE) sau în 1 din 2 (F, G) experimente independente cu $n = 5...10$ în grupă. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fig. 28A-28E, efectul sistemic antitumoral este limitat de tipul tumorii injectate. A) Animalele au fost injectate în flancul drept cu melanom B16-F10, carcinom de colon MC38 sau PBS și în flancul stâng cu celule B16-F10 și tratate conform schemei. B, C) Creșterea tumorilor la distanță (B) și supraviețuirea generală (C) la animalele care au primit B16-F10 pe flancul drept sau fără tumori pe flancul drept. Datele prezintă rezultatele reprezentative în 1 din 2 experimente independente cu 5...10 șoareci/grupă. D, E) Creșterea tumorilor la distanță (D) și supraviețuirea generală (E) la animalele care au primit pe dreapta tumori B16-F10 sau MC38. Datele reprezintă rezultatele în 1 din 2 experimente independente cu $n = 10$ în grupă. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Fig. 29A-29E, terapia asociată cu NDV și anti-CTLA-4 îmbunătățește infiltrarea tumorii cu celule naturale și adaptive ale sistemului imun. Animalele au fost tratate cu terapie combinată cum este arătat în fig. 27A. Tumorile au fost prelevate în ziua a 15 și analizate pentru infiltrarea celulelor imune prin citometrie în flux. A) Numărul absolut de celule CD45+/g de tumoare. B) Numărul absolut de celule CD11b+ și NK 1.1+/g de tumoare. C) Numărul absolut de celule CD4+ și CD8+ obișnuite și reglatorii/g de tumoare. D) Procentul relativ de Treg în celulele CD45+. E) Rapoartele calculate Tconv/Treg și CD8+/Treg. Datele reprezintă rezultatele cumulate din 4 experimente independente cu 3...5 șoareci/grupă. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fig. 30A-30J, terapia asociată cu NDV și blocatori CTLA-4 induce schimbări inflamatorii în tumorile la distanță. Animalele au fost tratate, conform schemei din fig. 27A. Tumorile au fost prelevate în ziua a 15 și analizate pentru prezența infiltrării celulelor imune. A) Secțiunile histologice ale tumorii din tumorile la distanță au fost colorate cu H&E (imaginile superioare) sau pentru CD3 și FoxP3 (imaginile inferioare) și analizate prin microscopia cu lumină și fluorescență, respectiv. Zonele, notate cu săgeți, indică necroză și infiltrate inflamatorii. Liniile de scară sunt egale cu $200 \mu\text{m}$. B) Numărul absolut de celule CD45+ și CD3+ care infiltrază tumoarea/g de tumoare calculat în baza citometriei în flux. C) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru conținutul procentual de celule CD4+ și CD8+ care infiltrază tumoarea în populația de celule CD45+. D) Numărul absolut de Tconv, Treg și celule CD8+/g de tumoare. E) Procentul relativ de celule Treg care infiltrază tumoarea în celulele CD45+. F) Rapoartele calculate Tconv/Treg și CD8+/Treg. G-I) Activarea ICOS, Granzimei B și Ki-67 în limfocitele CD8+ și Tconv care infiltrază tumoarea. Sunt prezentate sectoarele reprezentative ale citometriei în flux (imaginile superioare) și rezultatele cumulate (imaginile inferioare). J) TIL au fost restimulate cu DC, cu lizate tumorale activate B16-F10 și sinteza IFN γ a fost determinată prin colorarea

intracelulară a citokinelor. Sunt prezentate sectoarele reprezentative ale citometriei în flux (imaginea din stânga) și rezultatele cumulate (imaginea din dreapta). Datele reprezintă rezultatele cumulate din 5 (A-I) sau 2 (J) experimente independente cu $n = 3...5$ în grupă. Este prezentată valoarea medie $\pm$ SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5 Fig. 31, anticorpii la CD8, CD4 și NK1.1 reduc numărul de celulele respective *in vivo*. Anticorpii de depleție au fost injectați cum se discută în materiale și metode în continuare. Probele de sange s-au colectat în ziua a 5 și examinate prin citometria în flux pentru celulele CD4+, CD8+ și NK cu anticorpi neîncrucișați. Colorarea pozitivă este reprezentată cu linii orizontale. Sunt prezentate sectoarele reprezentative în 1 din 2 experimente independente cu 5 șoareci/grupă.

10 Fig. 32A-32F, activitatea antitumorală a terapiei combinate cu NDV depinde de celulele CD8+ și NK și de interferonii de tip I și de tip II. A-C) Animalele au fost tratate cum s-a descris în fig. 27A cu sau fără folosirea anticorpilor pentru celulele CD4+, CD8+, NK sau IFN γ . A) Creșterea tumorilor injectate. B) Creșterea tumorilor la distanță. C) Supraviețuirea pe termen lung. D-F) Șase șoareci IFNAR-/- sau de aceeași vârstă C57BL au fost tratați cum s-a descris în fig. 3A și au fost monitorizați pentru creșterea tumorii. D) Creșterea tumorilor injectate. E) Creșterea tumorilor la distanță. F) Supraviețuirea pe termen lung. Datele pentru toate imaginile reprezintă rezultatele cumulate din 2 experimente independente cu $n = 3...10$ /grupă. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

20 Fig. 33A-33B, terapia cu NDV conduce la activarea PD-L1 în tumori și în leucocitele care infiltrază tumoarea. A). Expresia PD-L1 pe celulele B16-F10 infectate *in vitro* (imaginea stângă) și *in vivo*, în tumorile injectate cu virus și în tumorile la distanță. În stânga, histogramele reprezentative ale citometriei în flux; în dreapta, valorile medii ale intensității fluorescenței mediane (MFI) pentru expresia PD-L1 pe celulele B16-F10 din tumori. B) Expresia PD-L1 pe suprafața leucocitelor, care infiltrază tumoarea, izolate din tumorile la distanță. În stânga: 25 histograme reprezentative ale citometriei în flux, în dreapta: mediile calculate MFI pentru fiecare subpopulație de celule.

Fig. 34A-34D, terapia combinată cu NDV și anticorpi de blocare a PD-1 conduce la o mai bună eficacitate antitumorală pe modelul de melanom B16 bilateral în flancuri. A) Schema de tratament. B) Creșterea tumorii din flancul drept (injectate cu NDV). C) Creșterea tumorii din flancul stâng (la distanță). D) Supraviețuirea generală.

30 Fig. 35A-35D, terapia combinată cu NDV și anticorpi de blocare a PD-L1 conduce la o eficiență antitumorală mai înaltă pe modelul de melanom B16 bilateral în flancuri. A) Schema de tratament. B) Creșterea tumorii din flancul drept (injectate cu NDV). C) Creșterea tumorii din flancul stâng (la distanță). D) Supraviețuirea generală.

35 Fig. 36A-36E, terapia asociată cu NDV și anticorpi anti-PD-1 rezultă cu creșterea infiltrației tumorii la distanță cu celulele T efectoare, dar nu reglatoare. A) Sectoarele reprezentative ale de citometriei în flux pentru conținutul procentual al celulelor CD4+ și CD8+ în tumori. B) Sectoarele reprezentative ale de citometriei în flux pentru conținutul procentual al celulelor Tconv (CD4+FoxP3-) și Treg (CD4+FoxP3+). C) Numărul absolut de subpopulații de celule T/g de tumoare, calculat în baza citometriei în flux. D) Conținutul procentual relativ de Treg 40 din celulele T CD4+. E) Rapoartele calculate pentru Tconv/Treg și CD8/Treg.

Fig. 37A-37B, TIL din tumorile la distanță la animalele tratate cu combinație de NDV și anticorpi anti-PD-1 activează expresia markerilor de liză și de proliferare. A) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux pentru conținutul procentual de celule Tconv și CD8+, 45 pozitive pentru Granzima B și Ki67. B) Conținutul procentual de celule T Tconv și CD8+, pozitive pentru Granzima B și Ki67.

Fig. 38A-38C, NDV induce infiltrarea imună a tumorii și activarea ICOS pe celulele CD4 și CD8 în tumorile injectate cu virus și în tumorile la distanță. A) Schema de tratament. B) 50 Expresia ICOS pe celulele CD4+ FoxP3- și CD8+, care infiltrază tumoarea, izolate din tumorile injectate cu NDV (flancul drept). Sunt prezentate sectoarele reprezentative ale citometriei în flux (superior) și valorile intensității fluorescenței mediane (MFI) (inferior). C) Expresia ICOS pe celulele CD4+FoxP3- și CD8+, care infiltrază tumoarea, izolate din tumorile la distanță (flancul stâng). Sunt prezentate sectoarele reprezentative ale citometriei în flux (superior) și valorile intensității fluorescenței mediane (MFI) (inferior).

55 Fig. 39A-39D, generarea și evaluarea *in vitro* a virusului NDV-ICOSL. A) Schema constructului genomic viral. B) Expresia ICOSL pe suprafața celulelor B16-F10 infectate timp de 24 de ore (histograma reprezentativă, la stânga și valoarea medie din 3 probe pentru fiecare grupă, dreapta). C) Activitatea citolitică a NDV în celulele infectate B16-F10, determinată prin analiza LDH. D) Replicarea NDV recombinant în celulele B16-F10.

Fig. 40A-40F, NDV-ICOSL cauzează întârzierea creșterii tumorilor la distanță și induce infiltrarea cu limfocite a tumorii. Tumorile B16-F10 bilaterale pe flancuri, descrise mai sus, și animalele au fost tratate cu 4 injecții intratumorale de virus indicat în tumoarea dreaptă. A) Creșterea tumorilor injectate cu virus. B) Creșterea tumorilor la distanță. C) Supraviețuirea generală. D) Numărul absolut de leucocite, care infiltrează tumoarea din dreapta (injectate cu virus). E) Numărul absolut de leucocite, care infiltrează tumoarea din stânga (la distanță). F) Procentul relativ de Treg în tumorile la distanță.

Fig. 41A-41E, terapia combinată cu NDV-ICOSL și blocatori ai CTLA-4 rezultă cu rejecția tumorilor injectate și tumorilor la distanță în modelul B16-F10 și protejează împotriva reprovocării tumorii. A) Schema de tratament. B) Creșterea tumorilor injectate cu virus (dreapta). C) Creșterea tumorilor la distanță (stânga). D) Supraviețuirea generală. E) Animalele care au supraviețuit în ziua a 90 au fost reprovocate pe flancul drept cu 2×10^5 celule B16-F10.

Fig. 42a-42e, terapia combinată cu NDV-ICOSL și blocatori de CTLA-4 rezultă cu rejecția tumorilor injectate și tumorilor la distanță în modelul CT26. A) Schema de tratament. B) Creșterea tumorilor injectate cu virus (dreapta). C) Creșterea tumorilor la distanță (stânga). D) Supraviețuirea generală. E) Animalele care au supraviețuit în ziua a 90 au fost reprovocate pe flancul drept cu 2×10^5 celule CT26.

Fig. 43a-43j, terapia combinată cu NDV-ICOSL și anticorpi anti-CTLA-4 conduce la amplificarea infiltrării tumorii cu celule naturale și adaptive ale sistemului imun. Animalele cu tumori B16-F10 bilaterale pe flanc au fost tratate în conformitate cu schema descrisă în fig. 41a. În ziua a 15 animalele au fost sacrificate și tumorile la distanță au fost prelevate pentru analiza TIL. A) Sectoarele reprezentative ale citometriei în flux, care arată conținutul de celule CD45+ și CD3+ în toată populația de celule tumorale. Numărul absolut de celule Cd45+ (B), Cd11b+ (C) și Nk1.1+ (D)/gram de tumoare a fost calculat în baza datelor citometriei în flux. E) Numărul absolut de Cd3+, Cd8+, Cd4+ Foxp3- (Cd4eff) și Cd4+Foxp3+ (Treg)/gram de tumoare. F) Procentul relativ de Treg din totalul de celule CD45+. G) Rapoartele calculate efector/Treg. H, I, J) Procentul relativ de celule efectoare Cd8+ și Cd4+, care infiltrează tumoarea, pozitive pentru ICOS, Granzima B și Ki67, respectiv.

Fig. 44A-44C, diagrama schematică pentru virusurile NDV recombinante generate adițional, care exprimă proteine imunostimulatoare himerice și native. A) Diagrama proteinelor himerice ale superfamiliei receptorilor TNF (GITRL, OX40L, 4-1BBL, CD40L) fuzionate la HN NDV în regiunea intracelulară și transmembranară HN la capătul N terminal (imaginea superioară). Imaginea inferioară prezintă diagrama proteinelor himerice ale superfamiliei receptorilor pentru imunoglobulină cu domeniile extracelulare anti-CD28scfv și ICOSL, fuzionate la regiunea intracelulară și transmembranară a F la C terminal. B) Lungimea domeniului intracelular-transmembranar (HN și F) și domeniului extracelular al fiecărei dintre proteinele himerice descrise. C) Diagrama schematică a locusului de inserție al transgenei și lista cu toate NDV recombinante, care exprimă liganzi imunostimulatori, generați prin această strategie.

Fig. 45A-45C, confirmarea eliminării NDV recombinant. A) Testul de hemaglutinare demonstrează activitatea de hemaglutinare pozitivă în godeurile pentru NDV-HN-GITRL, NDV-aCD28scfv-F, NDV-HN-OX40L, NDV-HN-CD40L, NDV-IL15 și NDV-IL21. B) Locațiile primerului pentru confirmarea inserției genei în virusurile salvate cu RT-PCR. C) RT-PCR pe ARN izolat din virusurile salvate.

Fig. 46, celulele B16-F10 infectate cu NDV recombinante exprima liganzi pe suprafață. Celulele B16-F10 au fost infectate cu NDV recombinante indicate cu MOI, egal cu 2, și peste 18 ore au fost analizate pentru exprimarea ligandului de suprafață prin citometria în flux. Sunt prezentate sectoarele reprezentative ale citometriei în flux.

Fig. 47, NDV-HN-4-1BBL induce creșterea infiltrării cu celule imune a tumorii la distanță. Animalele cu melanoame B16 bilaterale pe flanc au fost tratate intratumoral pe un singur flanc cu virusul indicat anterior. După 3 tratamente animalele au fost eutanaziate și limfocitele, care infiltrează tumoarea, din tumorile la distanță au fost analizate prin citometria în flux. Este prezentat numărul total de celule CD3, CD4+FoxP3+ (Treg), CD4+FoxP3- (Tconv), CD8, NK și CD11b, care infiltrează tumoarea/gram de tumoare.

Intr-un aspect prezenta invenție se referă la virusuri himerice ale bolii de Newcastle (NDV), proiectate pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune. Intr-o variantă de realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat care codifică un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, în care agonistul este exprimat. Intr-o variantă de

realizare prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom ambalat care codifică un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, în care antagonistul este exprimat.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la metode de propagare a NDV descrise aici (de exemplu, NDV himerice descrise aici). NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice descrise aici) pot fi propagate în orice celulă, subiect, țesut, organ sau animal susceptibil de o infecție cu NDV.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la compoziții care conțin un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric descris aici). Într-o variantă de realizare prezenta invenție se referă la compoziții farmaceutice care conțin un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric descris aici) și un purtător farmaceutic acceptabil. Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la compoziții farmaceutice care conțin celulele canceroase infectate cu un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris aici) și un purtător farmaceutic acceptabil. Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la compoziții farmaceutice care conțin concentrat proteic din celulele canceroase lizate, infectate cu NDV (de exemplu, celulele canceroase infectate cu NDV himeric) și un purtător farmaceutic acceptabil.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la metode pentru producerea compozițiilor farmaceutice cu conținut de un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris aici). Intr-o realizare o metodă pentru producerea unei compoziții farmaceutice prevede: (a) propagarea NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, a unui NDV himeric descris aici) într-o linie celulară, care este susceptibilă la o infecție cu NDV și (b) colectarea progeniturii virusului, în care virusul este crescut în cantități suficiente și în condiții suficiente ca virus necontaminat, astfel încât progenitura virusului este potrivită pentru formularea într-o compoziție farmaceutică. Într-o altă realizare o metodă pentru producerea unei compoziții farmaceutice prevede: (a) propagarea NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, a unui NDV himeric descris aici) într-un ou embrionat și (b) colectarea progeniturii virusului, în care virusul este crescut în cantități suficiente și în condiții suficiente ca virus necontaminat, astfel încât progenitura virusului este potrivită pentru formularea într-o compoziție farmaceutică.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului folosind un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris în continuare) sau o compoziție conținând un astfel de NDV himeric. Într-o variantă de realizare o metodă pentru tratarea cancerului prevede infectarea celulelor de cancer la un subiect care necesită aceasta cu un NDV himeric, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric descris în continuare) sau cu o compoziție a acestuia. Într-o altă variantă de realizare o metodă pentru tratarea cancerului constă în administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unui NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris în continuare) sau a unei compoziții a acestuia. Intr-o variantă concretă de realizare o cantitate eficientă de un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, de un NDV himeric descris în continuare) sau de o compoziție cu conținut de o cantitate eficientă de un NDV himeric, conform prezentei invenții, este administrată unui subiect pentru tratarea cancerului. În realizările specifice NDV himeric conține un genom ambalat, genomul conținând un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune (de exemplu, un agonist al receptorului costimulator al unei celule imune) și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune (de exemplu, un antagonist al unui receptor inhibitor al unei celule imune), în care agonistul și/sau antagonistul sunt exprimate cu NDV. În anumite realizări genomul NDV conține, de asemenea, o proteină F mutantă. În anumite realizări pentru tratarea cancerului la un subiect se administrează două sau mai multe NDV himerice.

Intr-o altă variantă de realizare o metodă pentru tratarea cancerului constă în administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unor celule canceroase infectate cu un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris în continuare) sau a compoziției acestuia. În realizările specifice celulele canceroase au fost tratate cu radiații gamma înainte de administrare la un subiect sau de incorporare în compoziție. Într-o altă variantă de realizare o metodă pentru tratarea cancerului constă în administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unui concentrat proteic sau a fragmentelor de membrane de plasmă de la celulele canceroase infectate cu un NDV himeric (de exemplu, cu un NDV himeric descris în continuare) sau cu o compoziție a acestuia. În realizările specifice NDV himeric conține un genom ambalat, genomul conținând un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune (de exemplu, un agonist al receptorului costimulator al unei celule imune) și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune (de exemplu, un antagonist al unui receptor inhibitor al unei celule imune), în care agonistul și/sau antagonistul este exprimat cu NDV. În anumite realizări genomul NDV conține, de asemenea, o proteină F mutantă, care este exprimată cu NDV.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului folosind un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris în continuare) sau o compoziție care conține un astfel de NDV în combinație cu unul sau mai multe alte terapii. Într-o realizare prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului care prevăd administrarea la un subiect a unui NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, a unui NDV himeric descris în continuare) și a unei sau mai multe alte terapii. Într-o altă realizare prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului care prevăd administrarea la un subiect a unei cantități eficiente de un NDV, conform prezentei invenții, sau de o compoziție conținând o cantitate eficientă de un NDV, conform prezentei invenții și una sau mai multe alte terapii. NDV și una sau mai multe alte terapii pot fi administrate subiectului concomitent sau succesiv. În anumite realizări NDV și una sau mai multe alte terapii sunt administrate în aceeași compoziție. În alte realizări NDV și una sau mai multe alte terapii sunt administrate în diferite compoziții. NDV și una sau mai multe alte terapii pot fi administrate subiectului pe aceleași căi sau pe căi diferite.

Intr-o terapie combinată, conform prezentei invenții, poate fi utilizat orice tip sau tulpină de NDV inclusiv, dar nefiind exhaustive, tulpini native, variante sau mutante, virusuri mutagene, reasortate și/sau virusuri modificate genetic. Într-o variantă de realizare NDV utilizat într-o combinație cu una sau mai multe alte terapii este o tulpină nativă. Într-o altă formă de realizare NDV utilizat în combinație cu unul sau mai multe alte terapii este un NDV himeric. Într-o variantă de realizare NDV himeric conține un genom ambalat, genomul conținând citokine (de exemplu, IL-2, IL-7, IL-15, IL-17 sau IL-21). În realizările specifice NDV himeric conține un genom ambalat, genomul conținând un antigen tumoral. În realizările specifice antigenul tumoral este exprimat în celulele infectate cu NDV himeric. Într-o altă variantă concretă de realizare NDV himeric conține un genom ambalat, genomul conținând o moleculă proapoptotică (de exemplu, Bax, Bak, Bad, BID, Bcl-xS, Bim, Noxa, Puma, AIF, FasL și TRAIL) sau o moleculă antiapoptotică (de exemplu, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 și XIAP). În realizările specifice molecula proapoptotică sau molecula antiapoptotică este exprimată în celulele infectate cu NDV himeric. Într-o altă variantă de realizare NDV himeric conține un genom ambalat, genomul conținând un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune (de exemplu, un agonist al receptorului costimulator al unei celule imune) și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune (de exemplu, un antagonist al unui receptor inhibitor al unei celule imune). În realizările specifice agonistul și/sau antagonistul sunt exprimate în celulele infectate cu NDV himeric. În anumite realizări genomul NDV conține, de asemenea, o proteină F mutantă, un antigen tumoral, un antagonist heterolog de interferon, o moleculă proapoptotică și/sau o moleculă antiapoptotică. În anumite realizări una sau mai multe terapii, folosite în combinație cu un NDV, conform prezentei invenții, reprezintă una sau mai multe alte terapii descrise în continuare. În realizări particulare una sau mai multe terapii, folosite în combinație cu un NDV, conform prezentei invenții, reprezintă un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune. De exemplu, în continuare sunt prezentate exemple de agoniști ai unui semnal costimulator al unei celule imune și de antagoniști ai semnal inhibitor al unei celule imune. Într-o variantă de realizare antagonistul unui semnal inhibitor al unei celule imune este anticorpul anti-CTLA-4, descris în continuare. Într-o altă realizare specifică agonistul unui semnal costimulator al unei celule imune este ligandul ICOS, descris în continuare.

Virusul bolii de Newcastle

Intr-o terapie combinată, conform prezentei invenții, poate fi utilizat orice tip sau tulpină de NDV, inclusiv, dar nefiind exhaustive, tulpini native, variante sau mutante, virusuri mutagene, reasortate și/sau virusuri modificate genetic. Într-o variantă de realizare NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este o tulpină nativă. În anumite realizări NDV este o tulpină litică. În alte realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este o tulpină nelitică. În anumite realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este o tulpină lentogenică. În unele variante de realizare NDV este o tulpină mezogenică. În alte realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este o tulpină velogenică. Exemplele specifice de tulpini NDV includ, dar nefiind exhaustive, tulpina 73-T, tulpina NDV HUI, tulpina Ulster, tulpina MTH-68, tulpina Italien, tulpina Hickman, tulpina PV701, tulpina Hitchner B1 (de exemplu, Genbank nr. AF309418 sau NC_002617), tulpina La Sota (de exemplu, Genbank nr. AY845400), tulpina YG97, tulpina MET95, tulpina Roakin și tulpina F48E9. Într-o variantă de realizare NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este tulpina Hitchner B1. Într-o altă realizare specifică NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este o tulpină B1 identificată în Genbank cu nr. AF309418 sau NC_002617. Într-o altă realizare specifică NDV utilizat într-o terapie

combinată, conform prezentei invenții, este NDV identificat în colecția ATCC cu nr. VR2239. Într-o altă realizare specifică NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este tulpina La Sota.

5 Într-o altă variantă de realizare NDV, utilizate într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, nu sunt patogene aviare, fiind apreciate printr-o metodă cunoscută specialiștilor. În anumite realizări NDV, utilizat într-o terapie combinată, nu este patogen, fapt confirmat la evaluarea prin injecție intracraniană a virusului la puii de 1 zi, la care evoluția bolii și moartea se produce timp de 8 zile. În unele realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, are un indice de patogenitate intracraniană mai mic de 0,7; mai mic de 0,6; sub 0,5; mai
10 mic de 0,4; mai mic de 0,3; sub 0,2 sau mai mic de 0,1. În anumite realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, are un indice de patogenitate intracraniană zero.

În anumite realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este o tulpină mezogenică modificată genetic, astfel încât să nu fie patogenă la păsări, fiind evaluată prin tehnici cunoscute unui specialist în domeniu. În anumite realizări NDV utilizat într-o terapie
15 combinată, conform prezentei invenții, este o tulpină velogenică modificată genetic, astfel încât să nu fie patogenă la păsări, fiind evaluată prin tehnici cunoscute unui specialist în domeniu.

În anumite realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, exprimă o proteină F mutantă. Într-o variantă de realizare NDV utilizat într-o terapie combinată exprimă o proteină F mutantă extrem de fusogenică și capabilă să formeze sincițiu. Într-o altă
20 realizare specifică proteina F mutantă este încorporată în virion.

Într-o realizare un genom al unui NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă cu un locus de clivaj mutant. Într-o variantă de realizare NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă în care locusul de clivaj al proteinei F este
25 transferat pentru a produce o secvență aminoacidică polibazică, care permite proteinei să fie scindată de proteaze intracelulare, ceea ce face virusul mai eficient în intrarea în celule și formarea de sincițiu. Într-o altă realizare specifică NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă, în care locusul de clivaj al proteinei F este înlocuit cu unul care conține unul sau două reziduuri de arginină suplimentare, ceea ce
30 permite de a activa locul de clivaj mutant de proteaze exprimate ubicuitar din familia furina. Exemplele specifice de NDV, care exprimă această proteină F mutantă includ, dar nefiind exhaustive, rNDV/F2aa și rNDV/F3aa. O descriere a mutațiilor introduse într-o proteină F de NDV pentru a produce o proteină F mutantă cu un locus de clivaj mutant este prezentată în literatura de specialitate (Park et al. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity:
35 avian influenza and Newcastle disease. PNAS USA, no 103, 2006, p. 8203-2808). În unele realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă cu mutația aminoacidică L289A. În realizările specifice proteina F mutantă L289A posedă una, două sau trei reziduuri de arginină în locusul de clivaj. În anumite realizări proteina F mutantă este de la un alt tip sau tulpină de NDV, decât NDV de bază. În unele
40 variante proteina F mutantă este adițională la proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă înlocuiește proteina F a NDV de bază.

În anumite realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este atenuat astfel încât NDV rămâne, cel puțin parțial, infecțios și poate replica *in vivo*, dar nu generează decât titruri reduse la nivele subclinice de infecție, care sunt nepatogene (Khattar et al.
45 J. Virol., no 83, 2009, p. 7779-7782). Într-o realizare specifică, NDV este atenuat prin deleția proteinei V. Astfel de NDV atenuate pot fi adaptate special pentru realizări, în care virusul este administrat la un subiect în scopul de a acționa ca un imunogen, de exemplu, ca un vaccin viu. Virusurile pot fi atenuate prin orice metodă cunoscută în domeniu.

În anumite realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, nu conține o secvență care codifică proteina V a NDV. În alte realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, exprimă o proteină V mutantă (Elankumaran et al. J. Virol.,
50 no 84 (8), 2010, p. 3835-3844). În anumite realizări o tulpină mezogenică sau velogenică de NDV, utilizată într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, exprimă o proteină V mutantă (Elankumaran et al. J. Virol., no 84 (8), 2010, p. 3835-3844).

În anumite realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este un NDV descris în literatura de brevet (US 7442379 B2 2008.10.28; US 6451323 B1 2002.09.17; US 6146642 A 2000.11.14). În realizările specifice NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este construit genetic pentru a codifica și exprima o peptidă sau o proteină
55 heteroloagă. În anumite realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții,

este un NDV himeric cunoscut specialistului în domeniu sau un NDV, conform prezentei invenții (în continuare). În unele realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este un NDV himeric conținând un genom proiectat pentru a exprima un antigen tumoral (exemple de antigeni tumorali sunt prezentate în continuare). În anumite realizări NDV utilizat
5 într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este un NDV himeric conținând un genom proiectat pentru a exprima un antagonist heterolog de interferon (exemple de antagoniști heterologi de interferon sunt prezentate în continuare). În unele realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este un NDV himeric descris în literatura de brevet (US 2012-0122185). În unele realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei
10 invenții, este un NDV himeric conținând un genom proiectat pentru a exprima o citokină, cum ar fi, de exemplu, IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, IFN-gamma, GM-CSF și TNF-alfa. În unele realizări NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este un NDV himeric conținând un genom proiectat pentru a exprima IL-2, IL-15 sau IL-21. Într-o variantă de realizare NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este un NDV himeric
15 conținând un genom proiectat pentru a exprima o citokină cum este descris în exemplul 2 prezentat aici.

Virusul himeric al bolii de Newcastle

Intr-un aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal
20 inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele killer naturale (NK). În unele variante agonistul și/sau antagonistul este încorporat în virion. Într-o variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK. Într-o altă realizare specifică un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un antagonist al unui
25 semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK. Cu alte cuvinte, NDV servește drept "bază" proiectată pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele killer naturale (NK). Exemplele specifice de antagoniști ai semnalelor costimulatoare, precum și exemple specifice de antagoniști ai semnalelor inhibitoare
30 sunt prezentate în continuare.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o proteină F mutantă. Într-o realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un
35 agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o proteină F mutantă. Într-o altă variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele sau celulele NK, și o proteină F mutantă. Într-o variantă de realizare proteina F mutantă este foarte fusogenică și abilă să formeze sincițiu. Într-o altă realizare specifică proteina F mutantă este încorporată în virion. În anumite realizări genomul unui NDV este
40 proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, conținând o secvență care codifică proteina V a NDV.

Intr-o realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un agonist al unui
45 semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o proteină F mutantă cu un locus de clivaj mutant. Într-o variantă de realizare NDV este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă, în care locusul de clivaj al proteinei F este mutant pentru a produce o secvență de aminoacid polibazică, care permite proteinei să fie scindată de proteaze intracelulare, ceea ce face virusul mai eficient în
50 ceea ce privește intrarea în celule și formarea de sincițiu. Într-o altă realizare specifică NDV este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă în care locusul de clivaj al proteinei F este înlocuit cu unul care conține unul sau două reziduuri de arginină suplimentare, ceea ce permite activarea locusului de clivaj mutant de către proteaze exprimate ubicuitar din familia furinei. Exemplele specifice de NDV care exprimă această proteină F mutantă includ, dar nefiind exhaustive,
55 rNDV/F2aa și rNDV/F3aa. În literatura de specialitate sunt descrise mutațiile introduse într-o proteină F a NDV pentru a produce o proteină F mutantă cu un locus de clivaj mutant (Park et al. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease. PNAS USA, no 103, 2006, p. 8203-2808). În unele variante de realizare NDV himeric este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă cu mutația aminoacidă L289A. În anumite

realizări proteina F mutantă este de la un alt tip sau tulpină de NDV, decât NDV de bază. În realizările specifice proteina mutantă F L289A posedă în locus de clivaj una, două sau trei reziduuri de arginină. În unele variante proteina F mutantă este adițională la proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă înlocuiește proteina F a NDV de bază. În

5 realizările specifice proteina F mutantă este încorporată în virion.

În unele variante genomul unui NDV este proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, conținând o secvență care codifică proteina V a NDV mutant (Elankumaran et al. J. Virol., no 84 (8), 2010, p. 3835-3844). În alte realizări genomul unui

10 NDV proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK nu conțin o secvență care codifică proteina V a NDV. În anumite realizări baza parentală a NDV himeric este o tulpină de NDV mezogenică sau velogenică, care este proiectată pentru a exprima o proteină V mutantă (Elankumaran et al. J. Virol., no 84 (8), 2010, p. 3835-3844).

15 Într-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o citokină. Într-o variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un

20 agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o citokină. Într-o variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o citokină. Exemplele specifice de citokine includ, dar nefiind exhaustive, interleukina (IL) -2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, gamma interferon (IFN), GM-CSF și factorul de necroză tumorală (TNF) alfa.

25 Într-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, o proteină F mutantă și o citokină (de exemplu, IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, IFN-gamma, GM-CSF și TNF alfa). Într-o variantă de realizare proteina F mutantă sunt extrem de fusogenică. Într-o variantă de realizare proteina F mutantă are un locus de clivaj mutant (cum se descrie aici). În unele variante proteina F mutantă conține mutația aminoacidă L289A. În unele

30 variante de realizare NDV himeric este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă cu mutația aminoacidă L289A. În anumite realizări proteina F mutantă este de la un alt tip sau tulpină de NDV, decât NDV de bază. În realizările specifice, proteina F mutantă L289A posedă în locusul de clivaj una, două sau trei reziduuri de arginină. În unele variante proteina F mutantă este adițională la proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă înlocuiește proteina F a

35 NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă este încorporată în virion.

În anumite aspecte prezenta invenție se referă la NDV himeric, care conține un genom proiectat pentru a exprima o citokină, cum ar fi, de exemplu, IL-7, IL-15, IL-21 sau o altă citokină descrisă aici sau cunoscută de către specialiștii în domeniu. În continuare sunt prezentate exemple de NDV himerice modificate pentru a exprima citokine, precum și metode de producere a unor astfel de NDV himerice.

40 Într-un alt aspect sunt descrise NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima (i) un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune și (ii) un antigen tumoral. Într-o variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și un antigen tumoral. Într-o variantă de realizare un

45 genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și un antigen tumoral.

50 Antigenele tumorale includ antigene asociate tumorii și antigene specifice tumorale. Exemplele specifice de antigeni tumorali includ, dar nefiind exhaustive, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE 2, N-acetilglucozaminiltransferază-V, p-15, gp100, MART-1/MelanA, TRP -1 (gp75), tirozinază, kinaza 4 dependentă de ciclină, β -catenină, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, papilomavirus-E6 uman, papilomavirus E7 uman, CD20, antigen carcinoembrionar (CEA),

55 receptorul factorului de creștere epidermal, MUC-1, caspază-8, CD5, mucină-1, Lewisx, CA-125, p185HER2, IL-2R, FAP- α , tenascină, antigene asociate unei metaloproteinaze și CAMPATH-1. Alte exemple includ, dar nefiind exhaustive, antigenul pan-carcinomului KS 1/4, antigenul carcinoembrionar (CA125), fosfataza acidă prostatică, antigenul prostatic specific, antigenul p97 asociat cu melanomul, antigenul gp75 al melanomului, antigenul cu greutate moleculară mare

al melanomului (HMW-MAA), antigenul de membrană specific prostatic, CEA, antigenul epitelial polimorfic mucinic, antigenul globulei de grăsime a laptelui, antigenele asociate cu tumorile colorectale (cum ar fi: CEA, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, CTA-1 și LEA), antigenul-38.13 al limfomului Burkitt, CD19, antigenul-CD20 al limfomului B, CD33, antigenele specifice melanomului (cum ar fi gangliozida GD2, gangliozida GD3, gangliozida GM2, gangliozida GM3), antigenul de suprafață celulară de tip transplant specific tumoral (TSTA) (cum ar fi antigenele tumorale induse viral, inclusiv antigenul T al ADN al virusurilor tumorii și antigenele de înveliș ale ARN al virusurilor tumorii), antigenul oncofetal al fetoproteinei alfa, cum ar fi CEA de colon, antigenul oncofetal al tumorii de vezică urinară, antigenul de diferențiere (cum ar fi antigenul L6 și L20 al carcinomului pulmonar uman), antigenele de fibrosarcom, antigenul-Gp37 al leucemiei celulelor T, neoglicoproteină, sfingolipide, antigene de cancer mamar (cum ar fi EGFR (receptorul factorului de creștere epidermică), antigenul HER2 (p185.sup.HER2) și epitopul HER2 neu), mucină epitelială polimorfă (PEM), antigenul-APO-1 limfocitelor umane maligne, antigenul de diferențiere (cum ar fi am antigenul găsit în eritrocitele fetale, endodermul primar, antigenul I găsit în eritrocitele adulte, embrionii preimplantați, I (Ma) constatat în adenocarcinoamele gastrice, M18, M39 determinat în epiteliul glandei mamare, SSEA-1 depistat în celulele mieloide, VEP8, VEP9, MyL, VIM-D5,D.sub.156-22 depistate în cancerul colorectal, TRA-1-85 (grupa de sange H), C14 depistat în adenocarcinomul de colon, F3 depistat în adenocarcinomul pulmonar, AH6 depistat în cancerul gastric, Y haptenă, Le.sup.y depistat în celulele de carcinom embrional, TL5 (grupa de sange A), receptorul EGF determinat în celulele A431, seriile E1 (grupa de sange B) constatate în cancerul pancreatic, FC10.2 depistat în celulele de carcinom embrional, antigenul adenocarcinomului gastric, CO-514 (grupa de sange Le^a) constatat în adenocarcinom, NS-10 depistat în adenocarcinoame, CO-43 (grupa de sange Le^b), G49 găsit în receptorul EGF a celulelor A431, MH2 (grupa de sange AL^e/Le^e) constatat în adenocarcinom de colon, 19,9 depistat în mucinele cancerului de colon, cancerului gastric, T₅A₇ depistat în celulele mieloide, R₂₄ găsit în celulele de melanom, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2} și M1:22:25:8 depistate în celulele de carcinom embrional și SSEA-3 și SSEA-4 depistate în etapa embrională de la 4 până la 8 celule), peptida din receptorul celulelor T derivate dintr-o celulă de limfom al celulelor T cutanat, proteina C-reactivă (CRP), antigenul-50 al cancerului (CA-50), antigenul 15-3 (CA15-3) al cancerului asociat cu cancerul mamar, antigenul-19 (-CA 19) al cancerului și antigenul-242 al cancerului asociat cu cancere gastro-intestinale, antigenul asociat cu carcinomul (CAA), cromogranină A, antigenul mucinei epiteliale (MC5), antigenul specific epiteliului uman (E1A), antigenul Lea, antigenul melanomului, antigenele 100, 25 și 150 asociate cu melanomul, antigenul asociat cu carcinomul similar mucinei, proteina legată de rezistența multidrog (MRPm6), proteina legată de rezistența multidrog (MRP41), proteina oncogenă Neu (C-erbB-2), enolaza neuron-specifică (NSE), P-glicoproteina (produsul genei mdr1), antigenul legat de rezistență multidrog, P170, antigenul legat de rezistența multidrog, antigenului specific prostatic (PSA), CD56 și NCAM.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, o proteină F mutantă și un antigen tumoral. Într-o realizare concretă proteina F mutantă este extrem de fusogenică. Într-o variantă de realizare proteina F mutantă are un locus de clivaj mutant (cum este descris aici). În unele variante proteina F mutantă conține mutația aminoacidă L289A. În unele variante de realizare NDV himeric este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă cu mutația aminoacidă L289A. În anumite realizări proteina F mutant este de la un alt tip sau tulpină de NDV, decât NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă L289A posedă una, două sau trei reziduuri de arginină în locusul de clivaj. În unele variante proteina F mutantă este adițională la proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă înlocuiește proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă este încorporată în virion.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima (i) un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune și (ii) un antagonist heterolog de interferon. Într-o variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și un antagonist heterolog de interferon. Într-o variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și un antagonist heterolog de interferon (US 2012-0058141).

Antagoniștii interferonului pot fi identificați folosind orice metodă cunoscută de către specialiștii în domeniu (US 6635416 B2 2003.10.21; US 7060430 B2 2006.06.13; US 7442527 B2 2008.10.28). Într-o variantă de realizare antagonistul heterolog de interferon este o proteină virală. Astfel de proteine virale pot fi obținute sau derivate din orice virus și virusul poate infecta orice specie (de exemplu, virusul poate infecta oameni sau mamiferele neumane). Exemplele de antagoniști heterologi de interferon includ, dar nefiind exhaustive, proteina W a virusului Nipah, proteina V a Nipah, proteina VP35 a virusului Ebola, proteina E3L a virusului Vaccinia, proteina NS1 a virusului gripal, proteina NS2 a virusului sincițial respirator (RSV), proteină ICP34.5 a virusului herpes simplex (VHS) de tip 1, proteaza NS3-4 a virusului hepatitei C, proteinele celulare dominant-negative care blochează inducerea sau răspunsul imunității innăscute (de exemplu, STAT1, MyD88, IKK și TBK) și reglatori celulari ai răspunsului imun innăscut (de exemplu, proteinele SOCS, proteinele PIAS, proteinele CYLD, proteina IκB, proteina Atg5, proteina Pin1, proteina IRAK-M și UBP43) (US 2012-0058141).

Într-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, o proteină F mutantă și un antagonist heterolog de interferon. Într-o variantă de realizare proteina F mutantă este extrem de fusogenică. Într-o variantă de realizare proteina F mutantă are un locus de clivaj mutant (cum este descris aici). În unele variante proteina F mutantă conține mutația aminoacidă L289A. În unele variante de realizare NDV himeric este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă cu mutația aminoacidă L289A. În anumite realizări proteina F mutantă este de la un alt tip sau tulpină de NDV, decât NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă L289A posedă una, două sau trei reziduuri de arginină în locusul de clivaj. În unele variante proteina F mutantă este adițională la proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă înlocuiește proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă este încorporată în virion.

Într-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o moleculă proapoptotică. Într-o variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o moleculă proapoptotică. Într-o variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o moleculă proapoptotică. Exemplele specifice de molecule proapoptotice includ, dar nefiind exhaustive, Bax, Bak, Bad, BID, Bcl-xS, Bim, Noxa, Puma, AIF, FasL și TRAIL.

Într-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, o proteină F mutantă și o moleculă proapoptotică. Într-o variantă de realizare proteina F mutantă este extrem de fusogenică. Într-o variantă de realizare proteina F mutantă are un locus de clivaj mutant (cum este descris aici). În unele variante proteina F mutantă conține mutația aminoacidă L289A. În unele variante de realizare NDV himeric este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă cu mutația aminoacidă L289A. În anumite realizări proteina F mutantă este de la un alt tip sau tulpină de NDV, decât NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă L289A posedă una, două sau trei reziduuri de arginină în locusul de clivaj. În unele variante proteina F mutantă este adițională la proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă înlocuiește proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă este încorporată în virion.

Într-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și o moleculă antiapoptotică. Într-o variantă de realizare un genom al unei NDV este proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele sau celule NK, și o moleculă antiapoptotică. Într-o variantă de realizare un genom al unui NDV este proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele sau celulele NK, și o moleculă antiapoptotică. Exemplele specifice de molecule antiapoptotice includ, dar nefiind exhaustive, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 și XIAP.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, o proteină F mutantă și o moleculă antiapoptotică. Într-o variantă de realizare proteina F mutantă este extrem de fusogenică. Într-o variantă de realizare proteina F mutantă are un locus de clivaj mutant (cum este descris aici). În unele variante proteina F mutantă conține mutația aminoacidă L289A. În unele variante de realizare NDV himeric este proiectat pentru a exprima o proteină F mutantă cu mutație aminoacidă L289A. În anumite realizări proteina F mutantă este de la un alt tip sau tulpină de NDV, decât NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă L289A posedă una, două sau trei reziduuri de arginină în locul de clivaj. În unele variante proteina F mutantă este adițională la proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă înlocuiește proteina F a NDV de bază. În realizările specifice proteina F mutantă este încorporată în virion.

În anumite aspecte prezenta invenție se referă la NDV himerice, care conțin un genom proiectat pentru a exprima o moleculă proapoptotică. În anumite aspecte prezenta invenție se referă la NDV himerice care conțin un genom proiectat pentru a exprima o moleculă antiapoptotică. Exemplele de molecule proapoptotice și moleculele antiapoptotice sunt prezentate în continuare.

Orice tip sau tulpină de NDV poate fi folosită în calitate de bază, care este proiectată pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și în anumite realizări proiectată pentru a exprima o citokină, un antigen tumoral, un antagonist heterolog de interferon, o moleculă proapoptotică, moleculă antiapoptotică și/sau o proteină mutantă F, incluzând, dar nefiind exhaustive, tulpini native, variante sau mutante, virusuri mutagene, reasortate și/sau virusuri modificate genetic. Într-o variantă de realizare NDV utilizat într-o terapie combinată, conform prezentei invenții, este o tulpină nativă. În anumite realizări NDV, care servește drept bază pentru ingineria genetică, este o tulpină litică. În alte exemple de realizare NDV, care servește drept bază pentru ingineria genetică, este o tulpină nelitică. În anumite realizări NDV, care servește drept bază pentru ingineria genetică, este o tulpină mezogenică. În anumite realizări NDV, care servește drept bază pentru ingineria genetică, este o tulpină velogenică. Exemplele specifice de tulpini de NDV includ, dar nefiind exhaustive, tulpina 73-T, tulpina NDV HUIJ, tulpina Ulster, tulpina MTH-68, tulpina Italien, tulpina Hickman, tulpina PV701, tulpina Hitchner B1, tulpina La Sota (de exemplu, Genbank nr. AY845400), tulpina YG97, tulpina MET95, tulpina Roakin și tulpina F48E9. Într-o variantă de realizare NDV, care servește drept bază pentru ingineria genetică este tulpina Hitchner B1. Într-o altă realizare specifică NDV, care servește drept bază pentru ingineria genetică este tulpina B1 identificată prin Genbank nr. AF309418 sau NC_002617. Într-o altă realizare specifică, NDV, care servește drept bază pentru ingineria genetică este NDV identificat în colecția ATCC cu nr. VR2239. Într-o altă realizare specifică, NDV, care servește drept bază pentru ingineria genetică, este tulpina La Sota.

În anumite realizări este dezirabilă atenuarea sau atenuarea suplimentară a NDV himeric astfel, încât NDV himeric rămâne, cel puțin parțial, infecțios și poate replica *in vivo*, dar nu generează decât titruri reduse rezultând cu nivele subclinice de infecție, care nu sunt patogene (Khattar et al. J. Virol., no 83, 2009, p. 7779 -7782). Într-o variantă de realizare NDV este atenuat prin deleția proteinei V. Astfel de NDV himerice atenuate pot fi adaptate special pentru realizări, în care virusul este administrat la un subiect în scopul de a acționa ca un imunogen, de exemplu, ca vaccin viu. Virusurile pot fi atenuate prin orice metodă cunoscută în domeniu.

În anumite realizări un NDV himeric, conform prezentei invenții, exprimă aici una, două, trei sau mai multe sau toate dintre genele următoare și suicidale: (1) un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune; (2) un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune; (3) o citokină; (4) un antigen tumoral; (5) un antagonist heterolog al interferonului; (6) o moleculă proapoptotică; (7) o moleculă antiapoptotică și/sau (8) o proteină F mutantă. În realizările specifice, adițional la expresia unui agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau unui antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și în anumite realizări o proteină F mutantă și o citokină, un NDV himeric este proiectat pentru a exprima o genă de suicid (de exemplu, timidin kinaza) sau altă moleculă care inhibă replicarea sau funcția NDV (o genă care face NDV sensibil la un antibiotic sau la un agent antiviral). În unele variante, adițional la expresia unui agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau unui antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T sau celulele NK, și în anumite realizări, o proteină F mutantă și o citokină, un NDV himeric este proiectat pentru a codifica locurile țintă ale microARN țesutului specific

(miARN) (de exemplu, locurile țintă pentru miR-21, miR-184, miR-133a/133B, miR-137 și/sau miR-193a ai moleculelor de microARN).

În anumite realizări tropismul NDV himeric este alterat. Într-o variantă de realizare tropismul virusului este modificat prin modificarea locusului de clivaj al proteinei F pentru a fi recunoscută de către proteazele cu specificitate tisulară sau cu specificitate tumorală, cum ar fi metaloproteazele matriciale (MMP) și urokinaza. În alte exemple de realizare tropismul virusului este modificat prin introducerea de loci țintă pentru molecule de miARN cu specificitate tisulară. În anumite realizări proteina HN a NDV este modificată pentru ca să fie recunoscută de receptorul specific tumoral.

În anumite realizări NDV himeric exprimă una sau mai multe dintre genele următoare sub formă de o proteină de fuziune sau proteină himerică: (1) un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune; (2) un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune; (3) o citokină; (4) un antigen tumoral; (5) un antagonist heterolog al interferonului; (6) o moleculă proapoptotică; (7) o moleculă antiapoptotică și/sau (8) o proteină F mutantă. În realizările specifice proteina de fuziune sau proteina himerică conține domeniile transmembranare și citoplasmice sau fragmente ale acestora de proteină F sau proteină HN a NDV și un domeniu extracelular care conține una dintre moleculele la care se face referire anterior (US 2012-0122185; WO 2007/064802 A1 2007.06.07).

În aceste realizări agonistul unui semnal costimulator și/sau antagonistul unui semnal inhibitor al unei celule imune poate fi inserat în genomul NDV de bază între două unități de transcripție. Într-o variantă de realizare agonistul unui semnal costimulator și/sau antagonistul unui semnal inhibitor al unei celule imune este inserat în genomul NDV de bază între unitățile M și P de transcripție sau între unitățile HN și L de transcripție. În conformitate cu alte exemple de realizare prezentate, citokina, antigenul tumoral, antagonistul heterolog al interferonului, molecula proapoptotică, molecula antiapoptotică și/sau proteina F mutantă sunt inserate în genomul NDV de bază între două sau mai multe unități de transcripție (de exemplu, între unitățile M și P transcripție sau între unitățile HN și L de transcripție).

Agenții de stimulare a celulelor imune

NDV himerice, conform prezentei invenții, pot fi proiectate pentru a exprima orice agonist al unui semnal costimulator și/sau orice antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T, celulele NK sau celula prezentatoare de antigen (de exemplu, o celulă dendritică sau macrofag), cunoscute specialiștilor în domeniu. În realizările specifice agonistul și/ sau antagonistul este un agonist al unui semnal costimulator uman al unei celule imune și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor uman al unei celule imune. În anumite realizări agonistul unui semnal costimulator este un agonist al unei molecule costimulatoare (de exemplu, receptor costimulator) aflate pe celulele imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T (de exemplu, CD4+ sau CD8+ limfocitele T), celulele NK și/sau celulele prezentatoare de antigen (de exemplu, celulele dendritice sau macrofagele). Exemplele specifice de molecule costimulatoare includ: receptorul factorului de necroză tumorală indusă de glucocorticoid (GITR), costimulatorul inductibil al celulelor T (ICOS sau CD278), OX40 (CD134), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), CD40, alfa limfotoxina (alfa LT), LIGHT (omologul limfotoxinei, prezintă expresie inductibilă și concurează cu glicoproteina D a virusului herpes simplex pentru HVEM, un receptor exprimat de limfocitele T), CD226, molecula de celule T citotoxice și reglatoare (CRTAM), receptorul 3 al morții (DR3), receptorul pentru limfotoxină-beta (LTBR), activatorul transmembranar și interactorul CAML (TACI), receptorul pentru factorul de activare a celulelor B (BAFFR) și proteina de maturare a celulelor B (BCMA). În realizările specifice agonistul este un agonist al unui receptor costimulator uman al unei celule imune. În anumite realizări agonistul unui receptor costimulator nu este un agonist al ICOS. În unele variante antagonistul este un antagonist al unei molecule inhibitoare (de exemplu, receptor inhibitor) aflat pe celulele imune, cum ar fi, de exemplu, limfocitele T (de exemplu, CD4+ sau CD8+ T-limfocite), celulele NK și/sau celulele prezentatoare de antigen (de exemplu, celule dendritice sau macrofagele). Exemplele specifice de molecule inhibitoare includ: antigenul 4 citotoxic asociat cu limfocite T (CTLA 4 sau CD52), proteina 1 programată de moarte celulară (PD1 sau CD279), atenuatorul de limfocite B și T (BTLA), receptorul pentru celulele killer similar imunoglobulinei (KIR), gena 3 de activare a limfocitelor (LAG3), proteina 3 a membranei celulelor T (TIM3), CD160, receptorul pentru adenzină A2a (A2aR), imunoreceptorul pentru celulele T cu domeniile de imunoglobulina și ITIM (TIGIT), receptorul 1 similar imunoglobulinei asociat cu leucocitele (LAIR1) și CD160. În realizările specifice antagonistul este un antagonist al unui receptor inhibitor uman al unei celule imune.

Intr-o variantă de realizare agonistul unui receptor costimulator este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia, care se leagă specific la receptorul costimulator. Exemplele concrete de receptori costimulatori includ: GITR, ICOS, OX40, CD27, CD28, 4-1BB, CD40, LT alfa, LIGHT, CD226, CRTAM, DR3, LTBR, TACI, BAFFR și BCMA. În anumite
 5 exemple de realizare anticorpul este un anticorp monoclonal. În alte exemple de realizare anticorpul este un fragment sc-Fv. Intr-o variantă de realizare anticorpul este un anticorp bispecific, care se leagă la doi receptori pe o celulă imună. În alte variante anticorpul bispecific se leagă la un receptor pe o celulă imună și la alt receptor pe o celulă canceroasă. În realizările
 10 specifice anticorpul este un anticorp uman sau umanizat. În unele realizări anticorpul este exprimat ca o proteină himerică cu proteina F a NDV sau cu un fragment al acesteia, sau cu proteina HN a NDV sau cu un fragment al acesteia (US 2012-0122185). Intr-o variantă de realizare proteina himerică este proteina F himerică descrisă în continuare. Metodele, prezentate în continuare, pentru a genera proteina himerică ICOSL-F și proteina himerică CD28-F pot fi utilizate pentru a genera și alte proteine himerice F sau proteine HN himerice.

Intr-o altă formă de realizare agonistul unui receptor costimulator este un ligand al receptorului costimulator. În anumite realizări ligandul este un fragment dintr-un ligand nativ. Exemplele specifice de liganzi nativi includ: ICOSL, B7RP1, CD137L, OX40L, CD70, mediatorul de intrare a virusului herpesului (HVEM), CD80 și CD86. Secvențele nucleotidice, care codifică liganzii nativi, precum și secvențele de aminoacizi ai liganzilor nativi sunt cunoscute în domeniu.
 20 De exemplu, secvențele de nucleotide și aminoacizi ale liganzilor următori pot fi identificate în baza de date GenBank cu următoarele numere de înregistrare: B7RP1 (de asemenea, cunoscut ca ICOSL) - uman: NM_015259.4, NP_056074.1; murin: NM_015790.3, NP_056605.1; CD137L-uman: NM_003811.3, NP_003802.1; murin: NM_009404.3, NP_033430.1; OX40L- uman: NM_003326.3, NP_003317.1; murin: NM_009452.2, NP_033478.1; CD70 - uman: NM_001252.3, NP_001243.1; murin: NM_011617.2, AAD00274.1; CD80 - uman: NM_005191.3, NP_005182.1; murin: NM_009855.2, NP_033985.3 și CD86 - uman: NM_005191.3, CAG46642.1; murin: NM_019388.3, NP_062261.3. În alte realizări, ligandul este un derivat al unui ligand nativ. În unele realizări ligandul este o proteină de fuziune care conține cel puțin o porțiune din ligandul nativ sau un derivat al ligandului nativ, care se leagă specific la
 30 receptorul co-stimulator, și o secvență de aminoacid heteroloagă. În realizările specifice proteina de fuziune conține cel puțin o porțiune de ligand nativ sau un derivat al ligandului nativ care se leagă specific la receptorul costimulator și porțiunea Fc a unei imunoglobuline sau un fragment al acesteia. Un exemplu de o proteină fuziune ligand este ligandul 4-1BB fuzionat la fragmentul Fc al imunoglobulinei (Meseck M. et al. J. Immunother., no 34, 2011, p. 175-182). În unele realizări
 35 ligandul este exprimat ca o proteină himerică cu proteina F a NDV sau cu un fragment al acesteia, sau cu proteina HN a NDV sau cu un fragment al acesteia. Intr-o variantă de realizare proteina este proteina HN himerică descrisă în continuare.

Metodele, descrise în continuare, pentru a genera proteina himerică HN-GITRL, proteina himerică HN-OX40-L, proteina himerică HN-4-1BBL și/sau proteina himerică HN-CD40L pot fi
 40 utilizate pentru a genera alte proteine himerice F sau proteine himerice HN.

Intr-o altă variantă de realizare antagonistul unui receptor inhibitor este un anticorp (sau un fragment de legare a antigenului) sau un receptor solubil care se leagă specific la ligandul nativ pentru receptorul inhibitor și blochează legarea ligandului nativ la receptorul inhibitor și transducția unui semnal(e) inhibitor (inhibitoare). Exemplele specifice de liganzi nativi pentru
 45 receptorii inhibitori includ: PDL-1, PDL-2, B7-H3, H4-B7, HVEM, Gal9 și adenozină. Exemplele specifice de receptori inhibitori, care se leagă la un ligand nativ, includ: CTLA-4, PD-1, BTLA, KIR, LAG3, TIM3 și A2aR.

În realizările specifice antagonistul unui receptor inhibitor este un receptor solubil care se leagă specific la ligandul nativ pentru receptorul inhibitor și blochează legarea ligandului nativ la receptorul inhibitor și transducția unui semnal(e) inhibitor (inhibitoare). În anumite variante de
 50 realizare receptorul solubil este un fragment dintr-un receptor nativ inhibitor sau un fragment dintr-un derivat al unui receptor nativ inhibitor, care se leagă specific la ligandul nativ (de exemplu, domeniul extracelular al unui receptor nativ inhibitor sau un derivat al unui receptor inhibitor). În unele variante de realizare receptorul solubil este o proteină de fuziune, care conține cel puțin o porțiune a receptorului nativ inhibitor sau un derivat al receptorului nativ inhibitor (de
 55 exemplu, domeniul extracelular al receptorului nativ inhibitor sau un derivat al receptorului inhibitor nativ) și o secvență de aminoacid heteroloagă. În realizările specifice proteina de fuziune conține cel puțin o porțiune a receptorului nativ inhibitor sau un derivat al receptorului inhibitor nativ și fragmentul Fc al unei imunoglobuline sau un fragment al acesteia. Un exemplu de o

proteină de fuziune a receptorului solubil este proteina de fuziune LAG3-Ig (Huard B. et al. Eur. J. Immunol., no 25, 1995, p. 2718-2721).

În realizările specifice antagonistul unui receptor inhibitor este un anticorp (sau un fragment de legare a antigenului), care se leagă specific la ligandul nativ pentru receptorul inhibitor și blochează legarea ligandului nativ la receptorul inhibitor și transducția unui semnal(e) inhibitor (inhibitoare). În anumite exemple de realizare anticorpul este un anticorp monoclonal. În alte exemple de realizare anticorpul este un fragment scFv. În realizările particulare anticorpul este un anticorp uman sau umanizat. Un exemplu specific de un anticorp la ligandul inhibitor este anticorpul anti-PD-L1 (Iwai Y. et al. PNAS, no 99, 2002, p. 12293-12297).

Intr-o altă realizare antagonistul unui receptor inhibitor este un anticorp (sau un fragment de legare a antigenului) sau un ligand care se leagă la receptorul de inhibare, dar nu transduce un semnal(e) inhibitor (inhibitoare). Exemplele specifice de receptori inhibitori includ: CTLA-4, PD1, BTLA, KIR, LAG3, TIM3 și A2aR. În anumite exemple de realizare anticorpul este un anticorp monoclonal. În alte exemple de realizare anticorpul este un fragment scFv. În realizările particulare anticorpul este un anticorp uman sau umanizat. Un exemplu specific de un anticorp la receptorul inhibitor este anticorpul anti-CTLA-4 [30]. Un alt exemplu de un anticorp la receptorul inhibitor este anticorpul anti-PD-1 (Topalian S.L. NEJM, no 28, 2012, p. 3167-3175).

În anumite realizări NDV himeric, conform prezentei invenții, este proiectat ca să exprime antagonistul CTLA-4, cum ar fi, de exemplu, Ipilimumab sau Tremelimumab. În anumite realizări NDV, conform prezentei invenții, este proiectat ca să exprime un antagonist PD1, cum ar fi, de exemplu, MDX-1,106 (BMS-936558), MK3475, CT-011, AMP-224 sau MDX-1105. În anumite realizări un NDV himeric, conform prezentei invenții, este proiectat pentru a exprima un antagonist LAG3, cum ar fi, de exemplu, IMP321. În anumite realizări, un NDV himeric al prezentei invenții este proiectat pentru a exprima un anticorp (de exemplu, un anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, sau un fragment scFv) care se leagă la B7-H3, cum ar fi, de exemplu, MGA271. În realizările specifice un NDV himeric, conform prezentei invenții, este proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, descrise în continuare. În realizările specifice NDV, conform prezentei invenții, este proiectat pentru a exprima anti-CD28 scvFv, ICOSL, CD40L, OX40L, CD137L, GITRL și/sau CD70.

În anumite realizări un agonist al unui semnal costimulator al unei induce celule imune induce (de exemplu, în mod selectiv) una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse prin legarea unui receptor costimulator la ligandul său. În realizările concrete ale prezentei invenții un agonist al receptorului costimulator induce una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului costimulator la unul sau la mai mulți dintre liganzii săi cu cel puțin 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% sau 99% mai puternică, sau în intervalul de la 25% până la 50%, 25% până la 75%, 50% până la 75%, 50% până la 95%, 75% până la 95% sau 75% până la 100% mai puternică, comparativ cu una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului induse prin legarea receptorului costimulator la unul sau mai mulți dintre liganzii săi în absența agonistului. În variantele concrete de realizare a prezentei invenții un agonist al receptorului costimulator: (i) induce una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului costimulator la un anumit ligand cu cel puțin 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% sau 99% mai puternică, sau în intervalul de la 25% până la 50%, 25% până la 75%, 50% până la 75 %, 50% până la 95%, 75% până la 95% sau 75% până la 100% mai puternică, în raport cu una sau mai multe căi de transducție a semnalului, induse prin legarea receptorului costimulator la ligandul particular în absența agonistului; și (ii) nu induce sau induce una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului costimulator la unul sau mai mulți liganzi cu cel mult 20%, 15%, 10%, 5%, sau 2%, sau în intervalul de la 2% până la 5%, 2% până la 10%, 5% până la 10%, 5% până la 15%, 5% până la 20%, 10% până la 15%, sau 15% până la 20%, în raport cu unul sau mai multe căi de transducție a semnalului, induse prin legarea receptorului costimulator la unul sau mai mulți asemenea liganzi în absența agonistului.

În anumite realizări un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune activează sau amplifică (de exemplu, în mod selectiv activează sau amplifică) una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea unui receptor costimulator la ligandul său. În realizările specifice un agonist al receptorului costimulator activează sau amplifică una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului costimulator la unul sau mai mulți dintre liganzii săi, cu cel puțin 25%, 30%, 40 %, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% sau 99% mai puternic, sau în intervalul de la 25% până la 50%, 25% până la 75%, 50%

până la 75%, 50% până la 95%, 75% până la 95% sau 75% până la 100% mai puternic, în raport cu una sau mai multe căi de transducție a semnalului, induse prin legarea receptorului costimulator la unul sau mai mulți dintre liganzii săi în absența agonistului. În realizările specifice un agonist al receptorului costimulator: (i) un agonist al unui semnal costimulator activează sau amplifică una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului costimulator la un anumit ligand, cu cel puțin 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% sau 99% mai puternic, sau în intervalul de la 25% până la 50%, 25% până la 75%, 50% până la 75%, 50% până la 95%, 75% până la 95% sau 75% până la 100% mai puternic, în raport cu una sau mai multe căi de transducție a semnalului, induse prin legarea receptorului costimulator la un anumit ligand în absența agonistului și (ii) nu activează sau nu amplifică, sau activează sau amplifică una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului costimulator la un sau mai mulți alți liganzi, cu cel mult 20%, 15%, 10%, 5% sau 2%, sau în intervalul de la 2% până la 5%, 2% până la 10%, 5% până la 10%, 5% până la 15%, 5% până la 20%, 10% până la 15% sau 15% până la 20%, în raport cu una sau mai multe căi de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului costimulator la unul sau mai mulți de alți astfel de liganzi în absența agonistului.

În unele variante de realizare un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune inhibă sau reduce (de exemplu, în mod selectiv) una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea unui receptor inhibitor la ligandul său. În realizările specifice un antagonist al unui receptor inhibitor inhibă sau reduce una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului inhibitor la unul sau mai mulți liganzi, cu cel puțin 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% sau 99% mai puternic, sau în intervalul de la 25% până la 50%, 25% până la 75%, 50% până la 75%, 50% până la 95%, 75% până la 95% sau 75% până la 100% mai puternic, în raport cu una sau mai multe căi de transducție a semnalului, induse prin legarea receptorului inhibitor la unul sau mai mulți liganzi ai săi în absența antagonistului. În realizările specifice un antagonist al unui receptor inhibitor: (i) inhibă sau reduce una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului inhibitor la un anumit ligand, cu cel puțin 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% sau 99% mai puternic, sau în intervalul de la 25% până la 50%, 25% până la 75%, 50% până la 75%, 50% până la 95%, 75% până la 95% sau 75% până la 100% mai puternic, în raport cu una sau mai multe căi de transducție a semnalului, induse prin legarea receptorului inhibitor la un ligandul anumit în absența antagonistului și (ii) nu inhibă sau nu reduce, sau inhibă sau reduce una sau mai multe dintre căile de transducție a semnalului, induse de legarea receptorului inhibitor la unul sau mai mulți liganzi cu cel mult 20%, 15%, 10%, 5% sau 2%, sau în intervalul de la 2% până la 5%, 2% până la 10%, 5% până la 10%, 5% până la 15%, 5% până la 20%, 10% până la 15% sau 15% până la 20%, în raport cu una sau mai multe căi de transducție a semnalului indus prin legarea receptorului inhibitor la unul sau mai mulți de alți astfel de liganzi în absența antagonistului.

În variantele concrete de realizare a prezentei invenții un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune induce, activează și/sau amplifică una sau mai multe activități, funcții sau răspunsuri imune. Una sau mai multe activități, funcții sau răspunsuri pot fi sub formă, de exemplu, formarea de anticorpi (răspuns umoral) sau un răspuns imun celular, de exemplu, secreția de citokine (de exemplu, interferon gamma), activitatea celulelor-helper sau citotoxicitatea celulară. Într-o realizare exprimarea unui marker de activare pe celulele imune (de exemplu, CD44, Granzima sau Ki-67), expresia unui receptor costimulator pe celulele imune (de exemplu, ICOS, CD28, OX40 sau CD27), expresia unui ligand pentru un receptor costimulator (de exemplu, B7HRP1, CD80, CD86, OX40L sau CD70), secreția de citokine, infiltrarea tumorii cu celule imune (de exemplu, limfocite T, limfocite B și/sau celule NK), producerea anticorpilor, funcția efectoră, activarea celulelor T, diferențierea celulelor T, proliferarea celulelor T, diferențierea celulelor B, proliferarea celulelor B și/sau proliferarea celulelor NK este indusă, activată și/sau îmbunătățită în urma contactului cu un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau cu un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune. Într-o altă variantă de realizare infiltrarea și proliferarea tumorii cu celule supresoare derivate din mieloid (MDSC), infiltrarea, activarea și proliferarea în tumoare a Treg, numărul de MDSC și de Treg în sângele periferic sunt inhibitate în urma contactului cu un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau cu un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune.

Proiectarea NDV

NDV, conform prezentei invenții, pot fi generate folosind tehnica genetică inversă. Tehnologia genetică inversă implică prepararea ARN virali recombinanți sintetici, care conțin regiunile necodificatoare ale filamentului cu sens negativ al ARN viral, care este esențial pentru recunoașterea de polimerazele virale și pentru semnalele de ambalare, necesare pentru a genera un virion matur. ARN recombinanți sunt sintetizați dintr-o matrice de ADN recombinant și reconstituiți *in vitro* cu complex de polimerază virală purificată pentru a forma ribonucleoproteine recombinante (RNP), care pot fi utilizate pentru a transfecta celule. O transfecție mai eficientă se obține atunci când proteinele polimerazei virale sunt prezente în timpul transcripției ARN sintetice atât *in vitro*, cât și *in vivo*. RNP recombinante sintetice pot fi salvate în particule virale infecțioase. Metodele menționate sunt descrise în literatura de specialitate (US 5166057 A 1992.11.24; US 5854037 A 1998.12.29; US 6146642 A 2000.11.14; EP 0702085 A1 1996.02.20; US 09152845; WO 9712032 A1 1997.04.03; WO 96/34625 A1 1996. 11.07; EP 0780475 B2 2006.07.19; WO 99/02657 A1 1999.01.21; WO 98/53078 A1 1998.11.26; WO 98/02530 A1 1998.01.22; WO 99/15672 A1 1999. 04.01; WO 98/13501 A1 1998. 04.02; WO 97/06270 A1 1997. 02.20; EP 780475 A1 1997.06.25).

Tehnologia cu plasmidă fără helper poate fi, de asemenea, utilizată pentru a proiecta NDV, conform prezentei invenții. Succint, un ADNc complet al unui NDV (de exemplu, tulpina Hitchner B1) este construit, inserat într-un vector plasmidă și proiectat să conțină un locus unic de restricție între două unități de transcripție (de exemplu, genele P și M ale NDV sau genele HN și L ale NDV). O secvență de nucleotide care codifică o secvență aminoacidică heteroloagă (de exemplu, o secvență nucleotidică care codifică un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune) poate fi inserată în genomul viral la locusul de restricție unic. Alternativ, o secvență de nucleotide care codifică o secvență aminoacidică heteroloagă (de exemplu, o secvență de nucleotide care codifică un agonist al unui semnal costimulator și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune) poate fi proiectată într-o unitate de transcripție NDV atât timp, cât inserarea nu afectează capacitatea virusului de a infecta și reproduce. Unicul segment este poziționat între un promotor T7 și ribozima virusului hepatitei delta pentru a produce o transcriere cu sens negativ precisă de la polimeraza T7. Vectorul plasmidă și vectorii de expresie, conținând proteine virale necesare, sunt transfectați în celule, ceea ce conduce la producerea de particule virale recombinante (WO 0104333 A1 2001.01.18; US 7442379 B2 2008.10.28; US 6146642 A 2000.11.14; US 6649372 B1 2003.11.18; US 6544785 B1 2003.04.08; US 7384774 B2 2008.06.10; Swayne et al. Avian Dis., no 47, 2003, p.1047-1050; Swayne et al. J. Virol. 2001, p. 11868-11873).

Metodele pentru producerea unui NDV himeric, care exprimă un anticorp, sunt cunoscute în domeniu. De exemplu, tehnica pentru generarea unui NDV recombinant, care exprimă o IgG completă de la două transgene (Puhler et al. Gene Ther., no 15(5), 2008, p. 371-283).

Tehnologiile bicistronice de producere a mai multe proteine dintr-un singur ARNm sunt cunoscute specialiștilor în domeniu. Tehnicile bicistronice permit proiectarea secvențelor de codificare ale mai multor proteine într-un singur ARNm prin utilizarea secvențelor IRES. Secvențele IRES direcționează recrutarea internă a ribozomilor la molecula de ARN și permit translația în aval în cap într-un mod independent. Succint, o regiune de codificare a unei proteine este inserată în ORF a unei a doua proteine. Inserția este flancată de secvențele IRES și orice secvență de semnal netranslată, necesară pentru exprimarea corectă și/sau funcția corespunzătoare. Inserția nu trebuie să perturbeze cadrul de citire deschis, semnalele de poliadenilare sau promotorii transcripționali ai proteinei a doua (Garcia-Sastre et al. J. Virol., no 68, 994, p. 6254-6261; Garcia-Sastre et al. Dev. Biol. Stand., no 82, 1994, p. 237-246).

Propagarea NDV

NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) pot fi propagate în orice substrat, care permite virusului să crească la titruri care permit utilizarea virusurilor, conform prezentei invenții. Într-o realizare substratul permite NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) să crească la titruri comparabile cu cele determinate pentru virusurile de tip sălbatic corespunzătoare.

NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) pot fi cultivate în celule (de exemplu, celulele aviare, celule de pui, etc.), care sunt sensibile la infecția cu virusuri, ouă embrionate (de exemplu, ouă de pui sau oua de prepeliță) sau animale (de exemplu, păsări). Astfel de metode sunt bine cunoscute specialiștilor în domeniu. Într-o variantă de realizare NDV prezentei invenții (de exemplu, NDV himerice) pot fi propagate în celule canceroase, de exemplu, celule de carcinom (de exemplu, celule de cancer mamar și celule de cancer de prostată), celule de

sarcom, celule de leucemie, celule de limfom și celule de tumori germinogene (de exemplu, celulele de cancer testicular și celule de cancer ovarian). Într-o altă realizare specifică NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, NDV himerice), pot fi propagate în linii celulare, de exemplu, linii de celule canceroase, cum ar fi celulele HeLa, celulele MCF7, celulele THP-1, 5 celulele U87, celulele DU145, celulele Lncap și celulele T47D. În anumite realizări celulele sau liniile celulare (de exemplu, celulele canceroase sau liniile celulare de cancer) sunt obținute și/sau derivate de la o ființă (ființe) umană (umane). Într-o altă variantă de realizare NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) sunt propagate în celule de pui sau ouă embrionate. Celulele de pui reprezentative includ, dar nefiind exhaustive, fibroblaste de embrion 10 de pui și celule renale de embrion de pui. Într-o variantă de realizare NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) sunt propagate în celule Vero. Într-o altă realizare specifică NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) sunt propagate în celulele canceroase în conformitate cu metodele descrise în continuare. Într-o altă realizare specifică NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) sunt reproduse în ouă de găină sau ouă 15 de prepeliță. În anumite realizări un virus NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric) este propagat inițial în ouă embrionate și apoi propagat în celule (de exemplu, într-o linie celulară).

NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) pot fi cultivate în ouă embrionate, de exemplu, de 6 până la 14 de zile, de 6 până la 12 de zile, de 6 până la 10 zile, de 6 20 până la 9 zile, de 6 până la 8 zile sau de 10 până la 12 zile. Ouăle imature sau imature embrionate pot fi folosite pentru a propaga NDV prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice). Ouăle embrionate imature cuprind ouă, care au mai puțin de zece zile, de exemplu, ouă de 6 până la 9 zile sau de 6 până la 8 zile, care sunt deficiente de IFN. Ouăle embrionate imature cuprind, de asemenea, ouă cu imitare artificială a imaturității până la, dar mai puțin de zece zile, ca urmare a 25 modificării condițiilor de creștere, de exemplu, a schimbării temperaturilor de incubare; a tratării cu medicamente sau a oricărei alte modificări care are drept rezultat un ou cu o dezvoltare retardată, astfel încât sistemul IFN nu este dezvoltat complet, comparativ cu ouăle de zece până la douăsprezece zile. NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) pot fi propagate în diferite locații din oul embrionat, de exemplu, în cavitatea alantoidiană (US 6852522 B1 30 2005.02.08; US 7494808 B2 2009.02.24).

Pentru izolarea virusului, NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) pot fi îndepărtate din cultura de celule și separate de componentele celulare, de obicei prin metode bine cunoscute de purificare, de exemplu, cum ar fi centrifugarea cu gradient și cromatografia pe coloană, și pot fi purificate suplimentar, dacă este dezirabil, folosind metode bine cunoscute 35 specialiștilor în domeniu, de exemplu, analiza formării petelor.

Compoziții și căi de administrare

Prezenta invenție se referă la utilizarea NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) în compoziții. De asemenea, prezenta invenție se mai referă la utilizarea în 40 compoziții a fragmentelor de membrană plasmatică din celulele infectate cu NDV sau celulele canceroase întregi, infectate cu NDV. Într-o variantă de realizare compozițiile sunt compoziții farmaceutice, cum ar fi formulări imunogene (de exemplu, formulări de vaccin). Compozițiile pot fi utilizate în metodele de tratare a cancerului.

Într-o realizare a prezentei invenții o compoziție farmaceutică conține un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) în amestec cu un purtător farmaceutic acceptabil. 45 În unele realizări compoziția farmaceutică conține adițional unul sau mai mulți agenți profilactici sau terapeutici, cum ar fi agenții descriși în continuare. Într-o variantă de realizare o compoziție farmaceutică conține o cantitate eficientă dintr-un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, NDV himerice) și, opțional, unul sau mai mulți agenți profilactici și terapeutici adiționali într-un purtător farmaceutic acceptabil. În unele realizări NDV (de exemplu, un NDV himeric) este 50 singurul ingredient activ inclus în compoziția farmaceutică.

Într-o altă variantă de realizare o compoziție farmaceutică (de exemplu, un vaccin oncolizat) conține un concentrat proteic sau un preparat de fragmente de membrană plasmatică din celulele canceroase, infectate cu NDV, într-un amestec cu un purtător farmaceutic acceptabil. În 55 unele realizări compoziția farmaceutică conține adițional unul sau mai mulți agenți profilactici sau terapeutici, cum ar fi agenții descriși în continuare. Într-o altă formă de realizare o compoziție farmaceutică (de exemplu, un vaccin cu celule întregi) conține celulele canceroase, infectate cu NDV, într-un amestec cu un purtător farmaceutic acceptabil. În unele realizări compoziția farmaceutică conține adițional unul sau mai mulți agenți profilactici sau terapeutici, cum ar fi agenții descriși în continuare.

Compozițiile farmaceutice, conform prezentei invenții, pot fi sub orice formă care permite administrarea acestei compoziții la un subiect. Într-o variantă de realizare compozițiile farmaceutice sunt potrivite pentru administrare veterinară și/sau umană. Cum este utilizat în prezentul context, termenul "farmaceutic acceptabil" înseamnă aprobat de către o agenție de reglementare federală sau guvernamentală de stat sau înregistrat în Farmacopeea S.U.A. sau alte farmacopei în general recunoscute pentru utilizare la animale și în special la oameni. Termenul "purător" se referă la un diluant, adjuvant, excipient sau vehicul cu care se administrează compoziția farmaceutică. Soluțiile saline și soluțiile apoase de dextroză și de glicerol pot fi, de asemenea, folosite ca purtători lichizi, în particular, pentru soluții injectabile. Excipienții adecvați includ amidon, glucoză, lactoză, sucroză, gelatină, malț, orez, făină, cretă, silicagel, stearat de sodiu, glicerol monostearat, talc, clorură de sodiu, lapte praf degresat, glicerol, propilenă, glicol, apă, etanol, etc. Exemple de purtători farmaceutici adecvați sunt descrise în ("Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin). Formularea trebuie să se potrivească modului de administrare.

Într-o variantă de realizare compozițiile farmaceutice sunt formulate pentru a fi potrivite pentru calea de administrare la un subiect. De exemplu, compoziția farmaceutică poate fi formulată pentru a fi potrivită pentru administrare parenterală, intravenoasă, intraarterială, intrapleurală, inhalatoare, intraperitoneală, orală, intradermică, colorectală, intraperitoneală, intracraniană și administrare intratumorală. Într-o variantă de realizare compoziția farmaceutică poate fi formulată pentru administrare intravenoasă, intraarterială, orală, intraperitoneală, intranasală, intratraheală, intrapleurală, intracraniană, subcutanată, intramusculară, topică, pulmonară sau administrare intratumorală.

Utilizări anticancer și alte utilizări

Într-un aspect un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) poate fi utilizat în tratamentul cancerului. Într-o realizare prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului, care prevăd administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unui NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) sau o compoziție a acestuia. Într-o variantă de realizare prezenta invenție se referă o metodă pentru tratarea cancerului, care prevede administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente de NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) sau de o compoziție a acestuia.

În realizări specifice un NDV himeric, proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, sau o compoziție a acestuia este administrat unui subiect pentru tratarea cancerului. În alte variante specifice un NDV himeric, proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, sau o compoziție a acestuia este administrată unui subiect pentru tratarea cancerului. În anumite realizări un NDV himeric, proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, și o proteină F mutantă sau o compoziție a acestuia se administrează unui subiect pentru tratarea cancerului. În anumite realizări un NDV himeric, proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, și o proteină F mutantă sau o compoziție a acestuia se administrează unui subiect pentru tratarea cancerului.

Un NDV himeric (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus), conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin din celule de cancer integre, utilizat într-o metodă pentru tratarea cancerului, pot fi utilizate ca orice linie de terapie (de exemplu, ca prima, a doua, a treia, a patra sau a cincea linie de terapie).

În anumite realizări un NDV himeric al prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) este singurul ingredient activ administrat pentru a trata cancerul. În realizările specifice un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) este singurul ingredient activ într-o compoziție administrată pentru tratarea cancerului.

NDV himeric (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) sau o compoziție a acestuia pot fi administrate la un subiect local sau sistemic. De exemplu, NDV himeric (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) sau o compoziție a acestuia pot fi administrate la un subiect parenteral (de exemplu, intravenos, intraarterial sau subcutanat), intratumoral, intrapleural, intranasal, intraperitoneal, intracranian, oral, rectal, prin inhalare, intramuscular, topic sau intradermic. Într-o realizare specifică, NDV himeric este administrat prin artera hepatică, de exemplu, prin injectarea în artera hepatică, care poate fi efectuată prin radiologia intervențională sau prin plasarea unei pompe de perfuzie arterială. Într-o altă realizare specifică NDV himeric este administrat intraoperator, laparoscopic sau endoscopic. Într-o variantă de realizare administrarea

intraperitoneală a NDV himeric este realizată prin injectare directă, infuzie printr-un cateter sau injectare în timpul laparoscopiei.

În anumite realizări metodele, conform prezentei invenții, includ tratamentul cancerului, pentru care nici un tratament nu este disponibil. În unele realizări un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) sau o compoziție a acestuia se administrează unui subiect pentru tratarea cancerului ca o alternativă la alte terapii convenționale.

Intr-o realizare prezenta invenție se referă la o metodă pentru tratarea cancerului, care prevede administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unui NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) sau a unei compoziții a acestuia și una sau mai multe terapii, cum este descris în continuare. Într-o realizare particulară una sau mai multe terapii sunt administrate la un subiect în combinație cu un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) sau cu o compoziție a acestuia pentru tratarea cancerului. Intr-o variantă de realizare terapiile adiționale se utilizează în prezent, au fost utilizate sau sunt cunoscute ca fiind utile în tratarea cancerului. Intr-o altă variantă de realizare un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) sau o compoziție a acestuia se administrează unui subiect în combinație cu o terapie de susținere, o terapie de ameliorare a durerii sau o altă terapie care nu are un efect terapeutic asupra cancerului. Intr-o variantă de realizare una sau mai multe terapii administrate în combinație cu un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) este una sau mai multe dintre terapiile descrise în continuare. În anumite realizări un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) și una sau mai multe terapii adiționale sunt administrate în aceeași compoziție. În alte exemple de realizare un NDV himeric și una sau mai multe terapii adiționale se administrează în diferite compoziții.

În anumite realizări două, trei sau mai multe NDV (inclusiv unul, două sau mai multe NDV himerice, conform prezentei invenții, cum ar fi unul, două sau mai multe dintre NDV himerice descrise mai sus) sunt administrate la un subiect pentru tratarea cancerului. Două sau mai multe NDV himerice, utilizate în conformitate cu metodele descrise aici, care prevăd administrarea a două, trei sau mai multe NDV la un subiect pentru tratarea cancerului, pot fi NDV himerice native sau NDV himerice proiectate, care au fost proiectate pentru a exprima secvența aminoacidică heteroloagă (de exemplu, o citokină). Primul și al doilea NDV himeric poate fi parte a aceleiași compoziții farmaceutice sau a diferite compoziții farmaceutice. În anumite realizări primul NDV himeric și al doilea NDV himeric se administrează pe aceeași cale de administrare (de exemplu, ambele sunt administrate intratumoral sau intravenos). În alte exemple de realizare primul NDV himeric și al doilea NDV himeric se administrează pe căi diferite de administrare (de exemplu, unul este administrat intratumoral, iar celălalt se administrează intravenos).

În realizările specifice primul NDV himeric, proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, este administrat unui pacient pentru tratarea cancerului în combinație cu un al doilea NDV himeric, proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune. În alte exemple de realizare specifice primul NDV himeric, proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, este administrat în combinație cu un al doilea NDV himeric, proiectat pentru a exprima unul, două sau mai multe dintre următoarele: o citokină (de exemplu, IL-2), un antagonist heterolog de interferon, un antigen tumoral, o moleculă proapoptotică și/sau o moleculă antiapoptotică. Într-o variantă de realizare primul NDV himeric, al doilea NDV himeric sau ambele exprimă o proteină F mutantă, care amplifică activitatea fusogenică a NDV himeric. Într-o altă realizare specifică primul NDV himeric, al doilea NDV himeric sau ambele exprimă o proteină F mutantă cu o mutație în locusul de clivaj (cum este descris aici).

În realizările specifice o primă compoziție (de exemplu, o compoziție farmaceutică), conținând primul NDV himeric, proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune, este administrată unui pacient pentru tratarea cancerului în combinație cu o a doua compoziție (de exemplu, o compoziție farmaceutică), conținând al doilea NDV himeric, proiectat pentru a exprima un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune. În alte exemple de realizare specifice o primă compoziție (de exemplu, o compoziție farmaceutică), conținând primul NDV himeric, proiectat pentru a exprima un agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau un antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune, este administrată în combinație cu o a doua compoziție (de exemplu, o compoziție farmaceutică), conținând al doilea NDV himeric, proiectat pentru a exprima unul, două sau mai multe dintre următoarele: o citokină (de exemplu, IL-2), un antagonist heterolog de interferon, un antigen

tumoral, o moleculă proapoptotică și/sau o moleculă antiapoptotică. Într-o variantă de realizare primul NDV himeric, al doilea NDV himeric sau ambele exprima o proteina F mutant, care amplifică activitatea fusogenică a NDV himeric. Într-o altă realizare specifică primul NDV himeric, al doilea NDV himeric sau ambele exprima o proteină F mutantă cu o mutație în locusul

5 de clivaj (cum este descris aici).

Intr-un alt aspect un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) poate fi utilizat în combinație cu una sau mai multe terapii, cum ar fi cele descrise în continuare, în tratamentul cancerului. Într-o realizare prezenta invenție se referă la metode pentru

10 tratarea cancerului, care prevăd administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unui NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) sau a unei compoziții a acestuia și una sau mai multe terapii adiționale, cum ar fi cele descrise aici în continuare. Într-o realizare concretă a prezentei invenții se prevede o metodă pentru tratarea cancerului, care cuprinde administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente dintr-un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) sau de o compoziție a

15 acestuia și o cantitate eficientă de una sau mai multe terapii, cum ar fi cele descrise în continuare. În anumite realizări un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) și una sau mai multe terapii adiționale, cum este descris în continuare, se administrează în aceeași compoziție. În alte exemple de realizare un NDV (de exemplu, un NDV descris mai sus) și una sau mai multe terapii adiționale se administrează în diferite compoziții.

20 NDV, utilizat în combinație cu una sau mai multe terapii, poate fi administrat sistemic sau local. De exemplu, NDV sau o compoziție a acestuia se poate administra la un subiect parenteral (de exemplu, intravenos, intraarterial sau subcutanat), intratumoral, intrapleural, intranazal, intraperitoneal, intracranian, oral, rectal, prin inhalare, intramuscular, topic sau intradermic. Într-o variantă de realizare NDV este administrat prin artera hepatică, de exemplu, prin injectarea în

25 artera hepatică, care se poate realiza prin radiologia intervențională sau prin plasarea unei pompe de perfuzie arterială. Într-o altă realizare specifică NDV este administrat intraoperator, laparoscopic, sau endoscopic. Într-o variantă de realizare administrarea intraperitoneală a NDV este realizată prin injectarea directă, printr-un cateter de perfuzie sau prin injectare în timpul laparoscopiei.

30 Un NDV (de exemplu, un NDV descris mai sus), conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule canceroase întregi în combinație cu una sau mai multe terapii, cum ar fi cele descrise aici în continuare, se pot utiliza ca orice linie de terapie (de exemplu, prima, a doua, a treia, a patra sau a cincea linie de terapie) pentru tratarea cancerului, în conformitate cu o metodă a prezentei invenții.

35 Intr-un alt aspect celule canceroase întregi, infectate cu un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) pot fi utilizate pentru a trata cancerul. Într-o variantă de realizare un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) poate fi pus în contact cu o celulă canceroasă sau cu o populație de celule canceroase și cu celulele canceroase infectate sau cu populație de celule canceroase și poate

40 fi administrat la un subiect pentru tratarea cancerului. Într-o realizare celulele canceroase sunt supuse radiației gamma înainte de infectare cu un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus). Într-o altă formă de realizare celulele canceroase sunt supuse la radiații gamma după infectare cu un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus). Într-o variantă particulară celulele canceroase sunt

45 tratate înainte de a fi administrate la un subiect, astfel încât celulele canceroase nu se pot multiplica în subiect. Într-o variantă de realizare celulele canceroase nu se pot multiplica în subiect și virusul nu poate infecta subiectul. Într-o realizare, celulele canceroase sunt supuse radiației gamma înainte de a fi administrate subiectului. Într-o altă formă de realizare celulele canceroase sunt tratate cu ultrasunet înainte de administrarea la un subiect. Într-o altă formă de realizare celulele canceroase sunt tratate cu mitomicină C înainte de administrare la un subiect. Într-o altă formă de realizare celulele canceroase sunt tratate prin congelare și decongelare înainte de administrare la un subiect. Într-o altă formă de realizare celulele canceroase sunt tratate cu un tratament termic înainte de administrare la un subiect. Celulele canceroase pot fi administrate local sau sistemic la un subiect. De exemplu, celulele canceroase pot fi administrate la un subiect

50 parenteral (de exemplu, intravenos sau subcutanat), intratumoral, intranazal, oral, prin inhalare, intrapleural, topic sau intradermic. Într-o variantă de realizare celulele canceroase sunt administrate la un subiect intratumoral sau în piele (de exemplu, intradermic). Celulele canceroase utilizate pot fi autologe sau alogene. Într-o variantă de realizare baza unui NDV himeric este o tulpină nelitică. Celulele canceroase pot fi administrate la un subiect în monoterapie sau în

55

combinație cu un tratament adițional. Celulele canceroase sunt, de preferință, într-o compoziție farmaceutică. În anumite realizări celulele canceroase sunt administrate în combinație cu una sau mai multe terapii, cum ar fi cele descrise în continuare. În anumite realizări celulele canceroase și una sau mai multe terapii adiționale sunt administrate în aceeași compoziție. În alte exemple de realizare celulele canceroase și una sau mai multe terapii adiționale sunt administrate în diferite compoziții.

Intr-un alt aspect celule canceroase integre, infectate cu un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) pot fi utilizate în combinație cu una sau mai multe terapii, descrise aici în continuare, în tratamentul cancerului. Intr-o realizare prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului, care prevăd administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a celulelor canceroase integre, infectate cu un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) în combinație cu una sau mai multe terapii adiționale descrise aici în continuare. Intr-o variantă de realizare prezenta invenție se referă la o metodă pentru tratarea cancerului, care prevede administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente de celule canceroase integre, infectate cu un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV descris mai sus) în combinație cu o cantitate eficientă de una sau mai multe terapii adiționale descrise în continuare. În anumite realizări celulele canceroase integre, infectate cu un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) și una sau mai multe terapii adiționale, descrise în continuare, se administrează în aceeași compoziție. În alte exemple de realizare celulele canceroase integre, infectate cu un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) și una sau mai multe terapii adiționale se administrează în diferite compoziții.

Intr-un alt aspect un concentrat de proteină sau un preparat de membrană plasmatică de la celule canceroase lizate, infectate cu un NDV himeric (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) se pot utiliza în tratamentul cancerului. Intr-o realizare un preparat de membrană plasmatică, cuprinzând fragmente de celulele canceroase infectate cu un NDV himeric, conform prezentei invenții, poate fi utilizat pentru a trata cancerul. Intr-o altă variantă de realizare un concentrat de o proteină din celulele canceroase, infectate cu un NDV himeric, conform prezentei invenții, poate fi utilizat pentru a trata cancerul. Pentru a produce concentratul de proteină sau preparatul de membrană plasmatică se pot utiliza metode bine cunoscute unui specialist în domeniu. Într-o variantă de realizare un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) poate fi pus în contact cu o celulă canceroasă sau cu o populație de celule canceroase și cu celulele canceroase infectate sau cu o populație de celule canceroase lizate, utilizând metode cunoscute unui specialist în domeniu, pentru a obține concentrat proteic sau fragmente de membrana plasmatică a celulelor canceroase, infectate cu NDV, și concentratul proteic sau fragmentele de membrană plasmatică a celulelor canceroase, infectate cu NDV, pot fi administrate la un subiect pentru tratarea cancerului. Concentratul proteic sau fragmentele de membrană plasmatică pot fi administrate la un subiect local sau sistemic. De exemplu, concentratul proteic sau fragmentele de membrană plasmatică pot fi administrate la un subiect parenteral, intratumoral, intranazal, intrapleural, oral, prin inhalare, topic sau intradermic. Intr-o variantă de realizare un astfel de concentrat proteic sau de preparat de membrană plasmatică se administrează la un subiect intratumoral sau în piele (de exemplu, intradermic). Celulele canceroase, utilizate pentru a produce concentratul de proteină sau preparatul de membrană plasmatică, pot fi autologe sau alogene. Într-o variantă de realizare baza NDV himeric este o tulpină litică. Concentratul proteic sau preparatul de membrană plasmatică poate fi administrat în monoterapie sau în combinație cu o terapie adițională. Concentratul proteic sau preparatul de membrană plasmatică este, de preferință, într-o compoziție farmaceutică. În anumite realizări concentratul proteic sau preparatul de membrană plasmatică se administrează în combinație cu una sau mai multe terapii, cum ar fi cele descrise în continuare. În anumite realizări concentratul proteic sau preparatul de membrană plasmatică și una sau mai multe terapii adiționale se administrează în aceeași compoziție. În alte realizări concentratul proteic sau preparatul de membrană plasmatică și una sau mai multe terapii adiționale se administrează în diferite compoziții.

Intr-un alt aspect concentratul proteic sau preparatul de membrană plasmatică din celule canceroase lizate infectate cu un NDV (de exemplu, un NDV descris mai sus) poate fi utilizat în combinație cu una sau mai multe terapii adiționale, cum ar fi cele descrise în continuare, în tratamentul cancerului. Intr-o realizare prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea cancerului, care prevăd administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unui concentrat proteic sau a unui preparat de membrană plasmatică din celule canceroase lizate, infectate cu un NDV (de exemplu, un NDV descris mai sus) în combinație cu una sau mai multe terapii adiționale,

cum ar fi cele descrise în continuare. Într-o variantă de realizare prezenta invenție se referă la o metodă pentru tratarea cancerului, care prevede administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente dintr-un concentrat de proteine sau de un preparat de membrană plasmatică din celule canceroase lizate, infectate cu un NDV (de exemplu, un NDV descris mai sus) în combinație cu o cantitate eficientă de una sau mai multe terapii adiționale, cum ar fi cele descrise în continuare. În anumite realizări concentratul proteic sau preparatul de membrană plasmatică și una sau mai multe terapii adiționale se administrează în aceeași compoziție. În alte realizări concentratul proteic sau preparatul de membrană plasmatică și una sau mai multe terapii adiționale se administrează în diferite compoziții.

Într-un alt aspect NDV himerice, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) pot fi utilizate pentru a produce anticorpi, care pot fi folosiți în analize imunologice diagnostice, imunoterapia pasivă și în generarea anticorpilor antiidiotipici. De exemplu, un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus) poate fi administrat la un subiect (de exemplu, la un șoarece, șobolan, porc, cal, măgar, pasăre sau la o ființă umană) pentru a genera anticorpi, care pot fi apoi izolați și utilizați, de exemplu, în teste de diagnostic, imunoterapie pasivă și pentru generarea de anticorpi antiidiotipici. În anumite realizări un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) este administrat la un subiect (de exemplu, un șoarece, șobolan, porc, cal, măgar, pasăre sau la o ființă umană) în combinație cu una sau mai multe terapii suplimentare, cum ar fi cele descrise în continuare, pentru a genera anticorpi, care pot fi apoi izolați și folosiți, de exemplu, în analize diagnostice, imunoterapie pasivă și pentru generarea de anticorpi antiidiotipici. Anticorpii generați pot fi izolați prin metode standard cunoscute în domeniu (de exemplu, cromatografia de imunoafinitate, centrifugarea, precipitarea, etc.) și utilizați în analize imunologice de diagnostic, imunoterapia pasivă și generarea de anticorpi antiidiotipici.

În anumite realizări anticorpii izolați de la subiecții, care au administrat un NDV himeric, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric descris mai sus), sau izolați de la subiecții, care au administrat un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV descris mai sus) în combinație cu una sau mai multe terapii, cum ar fi cele descrise în continuare, sunt utilizați pentru a evalua exprimarea proteinelor NDV, unei peptide sau proteine heterologe exprimate cu un NDV himeric, sau ambelor. Orice sistem de imunotestare cunoscut în domeniu poate fi utilizat în acest scop, inclusiv, dar nefiind exhaustive, sistemele competitive și necompetitive de testare folosind așa metode, cum ar fi testul de radioimunitate, ELISA (enzyme linked immunosorbent assays), imunotestul "sandwich", reacțiile de precipitare, reacțiile de precipitare difuză în gel, testele de imunodifuzie, testele de aglutinare, testele de fixare a complementului, analizele imunoradiometrice, metodele imunologice prin fluorescență, testele imunologice pentru proteina A și testele de imuno-electroforeză, enumerând doar câteva.

Pacienții

În unele variante de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric), conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un subiect care suferă de cancer. În alte exemple de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric), conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un subiect predispus sau susceptibil la cancer. În unele variante de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un subiect diagnosticat cu cancer. Exemplele specifice de tipuri de cancer sunt descrise în continuare. Într-o realizare subiectul are cancer metastatic. Într-un alt exemplu de realizare subiectul are stadiul 1, stadiul 2, stadiul 3 sau stadiul 4 de cancer. Într-o altă formă de realizare subiectul este în remisie. Într-o altă formă de realizare subiectul are o recurență a cancerului.

În anumite realizări un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un om în vârstă de 0 până la 6 luni, în vârstă de 6 până la 12 luni, în vârstă de 6 până la 18 luni, în vârstă de 18 la 36 de luni, de 1 până la 5 ani, de 5 până la 10 ani, de 10 până la 15 ani, de 15 până la 20 de ani, de 20 până la 25 de ani, de 25 până la 30 de ani, de 30 până la 35 de ani, de 35 până la 40 de ani, de 40 până la 45 de ani, de 45 până la 50 de ani, de 50 până la 55 de ani, de 55 până la 60 de ani, de 60 până la 65 de ani, de 65 până la 70 de ani, de 70 până la 75 de ani, de 75 până la 80 de ani, de 80 până la 85 de ani, de 85 până la 90 de ani, de 90 până la 95 de ani sau de 95 până la 100 de ani. În unele variante de realizare un NDV (de exemplu,

un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un copil mic. În alte exemple de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un copil de vârstă precocă. În alte exemple de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un copil. În alte exemple de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la o persoană adultă. În alte realizări un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la o persoană în vârstă.

În anumite realizări un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un subiect într-o stare de imunodeficiență sau într-o stare imunosupresivă sau cu un risc de a deveni imunodeficient sau imunosupresiv. În anumite realizări un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un subiect care a primit sau se recuperează după un tratament imunosupresiv. În anumite realizări un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un subiect care are sau prezintă risc de dezvoltare a unui cancer. În anumite realizări subiectul este, va fi sau a suportat o intervenție chirurgicală, chimioterapie și/sau radioterapie. În anumite realizări pacientul a suportat o intervenție chirurgicală pentru a elimina tumoarea sau neoplasmul. În realizările specifice pacientul administrează un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, după o intervenție chirurgicală pentru a elimina o tumoare sau un neoplasm. În altă variantă pacientul administrează un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, înainte de a fi supus rezecției unei tumori sau unui neoplasm. În anumite realizări un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un subiect care are, va avea sau au avut un transplant de țesut, un organ transplantat sau o transfuzie.

În unele variante de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un pacient care s-a dovedit a fi refractar la alte terapii, decât NDV himeric sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, dar nu mai administrează aceste terapii. Într-o variantă de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un pacient care s-a dovedit a fi refractar la chimioterapie. Într-o realizare cancerul refractar la o terapie înseamnă, că cel puțin o parte semnificativă din celulele canceroase nu sunt ucise și/sau diviziunea celulară nu este stopată. Pentru a determina dacă celulele canceroase sunt refractare se poate utiliza orice metodă cunoscută în domeniu fie *in vivo*, sau *in vitro*, apreciind efectul unei terapii asupra celulelor canceroase, folosind semnificațiile de "refractar", acceptate în domeniu, în acest context. Într-o anumită variantă pacientul refractar este un pacient refractar la o terapie standard. În anumite realizări un pacient cu cancer este refractar la o terapie în cazul, în care tumoarea sau neoplasmul nu a fost semnificativ eradicat și/sau simptomele nu au fost ameliorate semnificativ. Pentru a determina dacă un pacient este refractar se poate utiliza orice metodă cunoscută în domeniu fie *in vivo*, sau *in vitro*, estimând, astfel, eficiența unui tratament de cancer, folosind semnificațiile de "refractar", acceptate în domeniu, în acest context.

În anumite realizări pacientul care urmează a fi tratat, conform metodelor prezentei invenții, este un pacient deja tratat cu antibiotice, antivirale, antifungice sau altă terapie biologică/imunoterapie sau terapie anticanceroasă. Printre acești pacienți sunt pacienți refractari și pacienți de vârstă prea fragedă pentru terapiile convenționale. În unele realizări subiectul care administrează un NDV (de exemplu, un NDV himeric), un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, anterior nu a administrat NDV

himeric sau o compoziție, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi sau o terapie combinată.

În unele variante de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un pacient pentru a preveni debutul cancerului la un pacient cu risc de a dezvolta cancer. În unele variante compoziții sunt administrați la un pacient cu reacții adverse la terapiile convenționale.

În unele realizări subiectul care administrează un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, anterior nu a primit tratament. În alte exemple de realizare un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, se administrează la un subiect care a administrat un tratament, anterior administrării NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau compoziției, sau vaccinului oncolizat, sau vaccinului cu celule întregi sau terapiei combinate. În unele variante de realizare subiectul administrează un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, având experiența unor efecte secundare adverse la tratamentul anterior sau având un tratament anterior întrerupt din cauza nivelurilor inacceptabile de toxicitate pentru subiect.

20 **Doze și frecvența administrării**

Cantitatea de NDV sau de o compoziție a acestuia, de un vaccin oncolizat, sau de un vaccin cu celule întregi, eficiență în tratamentul cancerului, va depinde de originea cancerului, calea de administrare, starea generală de sănătate a subiectului, etc. și urmează a fi stabilită de medical curant. Metodele clinice standard, cum ar fi testele in vitro, pot fi folosite opțional pentru a identifica intervalele optime de dozare. Cu toate acestea, intervalele de dozare adecvate de un NDV pentru administrare sunt, în general, de aproximativ 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} or 10^{12} pfu și cel mai preferabile de aproximativ 10^4 până la aproximativ 10^{12} , 10^6 până la 10^{12} , 10^8 până la 10^{12} , 10^9 până la 10^{12} sau 10^9 până la 10^{11} și pot fi administrate la un subiect o dată, de două ori, de trei, de patru sau mai multe ori cu intervale de câte ori este necesar. Dozele de vaccinuri oncolizate pentru administrare constituie: 0,001 mg, 0,005 mg, 0,01 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 1,0 mg, 2,0 mg, 3,0 mg, 4,0 mg, 5,0 mg, 10,0 mg, 0,001 mg până la 10,0 mg, 0,01 mg până la 1,0 mg, 0,1 mg până la 1 mg și 0,1 mg până la 5,0 mg și pot fi administrate la un subiect o dată, de două ori, de trei sau mai multe ori cu intervale de câte ori este necesar. Dozele de vaccinuri cu celule întregi pentru administrare constituie 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} sau 10^{12} celule și pot fi administrate la un subiect o dată, de două ori, de trei sau de mai multe ori cu intervale de câte ori este necesar. În anumite realizări subiectului se administrează doze, similare cu cele, care în prezent sunt utilizate în studiile clinice ale NDV, vaccinurilor oncolizate sau vaccinurilor celulare întregi. Dozele eficiente pot fi extrapolate din curbele doză-răspuns derivate din sistemele de testare in vitro sau cu model de animale.

În anumite variante de realizare a prezentei invenții un NDV (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia se administrează unui subiect într-o singură doză, urmată de o a doua doză la 1 până la 6 săptămâni, 1 până la 5 săptămâni, 1 până la 4 săptămâni, 1 până la 3 săptămâni, 1 până la 2 săptămâni mai târziu. În conformitate cu aceste realizări, rapelurile pot fi realizate la un interval de 6 până la 12 luni după a doua inoculare. În anumite realizări un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect într-o singură doză, urmată de o a doua doză la 1 până la 6 săptămâni, 1 până la 5 săptămâni, 1 până la 4 săptămâni, 1 până la 3 săptămâni, 1 până la 2 săptămâni mai târziu.

În anumite realizări administrarea aceluiași NDV (de exemplu, himeric NDV) sau a unei compoziții a acestuia, a vaccinului oncolizat sau a vaccinului cu celule întregi poate fi repetată și administrarea pot fi realizată cel puțin peste 1 zi, 2 zile, 3 zile, 5 zile, 6 zile, 7 zile, 10 zile, 14 zile, 15 zile, 21 zile, 28 zile, 30 zile, 45 zile, 2 luni, 75 zile, 3 luni, sau cel puțin peste 6 luni. În alte variante administrarea aceluiași NDV (de exemplu, himeric NDV) sau a unei compoziții a acestuia, a vaccinului oncolizat sau a vaccinului cu celule întregi poate fi repetată și administrarea pot fi realizată cel puțin peste 1 până la 14 zile, 1 până la 7 zile, 7 până la 14 zi, 1 până la 30 zile, 15 până la 30 zile, 15 până la 45 zile, 15 până la 75 zile, 15 până la 90 zile, 1 până la 3 luni, 3 până la 6 luni, 3 până la 12 luni sau 6 până la 12 luni. În unele variante primul NDV (de exemplu, primul NDV himeric) sau o compoziție a acestuia se administrează unui subiect urmat de

administrarea unui al doilea NDV (de exemplu, al doilea NDV himeric) sau unei compoziții a acestuia. În anumite realizări primul și al doilea NDV (de exemplu, primul și al doilea NDV himeric) sau compozițiile acestora se pot administra la interval de cel puțin 1 zi, 2 zile, 3 zile, 5 zile, 6 zile, 7 zile, 10 zile, 14 zile, 15 zile, 21 zile, 28 zile, 30 zile, 45 zile, 2 luni, 75 zile, 3 luni, sau de cel puțin 6 luni. În alte exemple de realizare primul și al doilea NDV (de exemplu, primul și al doilea NDV himeric) sau compozițiile acestora se pot administra la interval de 1 până la 14 zile, de 1 până la 7 zile, 7 până la 14 zile, de 1 până la 30 zile, 15 până la 30 de zile, 15 până la 45 zile, 15 până la 75 zile, 15 până la 90 de zile, 1 până la 3 luni, 3 până la 6 luni, 3 până la 12 luni sau 6 până la 12 luni.

În anumite realizări un NDV sau o compoziție a acestuia, sau un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect în combinație cu una sau mai multe terapii adiționale, cum ar fi o terapie descrisă în continuare. Dozele de alte una sau mai multe terapii adiționale va depinde de diferiți factori, inclusiv, de exemplu, de terapie, de originea cancerului, calea de administrare, starea generală de sănătate a subiectului, etc. și trebuie luată în funcție de hotărârea unui medic. În realizările specifice doza de cealaltă terapie constituie doza și/sau frecvența de administrare a terapiei recomandate pentru tratament la utilizare ca agent unic și se utilizează în conformitate cu metodele prezentei invenții. În alte realizări doza de cealaltă terapie este o doză mai mică și/sau se administrează mai puțin frecvent, decât cele recomandate pentru terapia la utilizare ca agent unic și se utilizează în conformitate cu metodele prezentei invenții. Dozele recomandate pentru terapiile aprobate pot fi găsite în Physician's Desk Reference.

În anumite realizări un NDV sau o compoziție a acestuia, sau un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect simultan cu administrarea unei sau mai multor terapii adiționale. În alte exemple de realizare un NDV sau o compoziție a acestuia, sau un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect la fiecare 3 până la 7 zile, 1 până la 6 săptămâni, 1 până la 5 săptămâni, 1 până la 4 săptămâni, 2 până la 4 săptămâni, 1 până la 3 săptămâni sau 1 până la 2 săptămâni și una sau mai multe terapii adiționale (cum ar fi cele descrise în continuare) se administrează la fiecare 3 până la 7 zile, 1 până la 6 săptămâni, 1 până la 5 săptămâni, 1 până la 4 săptămâni, 1 până la 3 săptămâni sau 1 până la 2 săptămâni. În anumite realizări un NDV sau o compoziție a acestuia, sau un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect la fiecare 1 până la 2 săptămâni și una sau mai multe terapii adiționale (cum ar fi cele descrise în continuare) se administrează la fiecare 2 până la 4 săptămâni. În unele variante de realizare un NDV sau o compoziție a acestuia, sau un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect în fiecare săptămână și una sau mai multe terapii adiționale (cum ar fi cele descrise în continuare) se administrează o dată la 2 săptămâni.

Tipurile de cancer

Exemplele specifice de cancer, care pot fi tratate în conformitate cu metodele prezentei invenții includ, dar nefiind exhaustive: leucemiile, cum ar fi, dar nefiind exhaustive, leucemia acută, leucemia limfocitară acută, leucemia mielocitară, cum ar fi, leucemia mieloblastică, promielocitică, mielomonocitică, monocitară și eritroleucemia și sindromul mielodisplazic; leucemiile cronice, cum ar fi, dar nefiind exhaustive, leucemia mielocitică cronică (granulocitară), leucemia limfocitară cronică, leucemia cu celule păroase; policitemia vera; limfoamele, cum ar fi, dar nefiind exhaustive, boala Hodgkin, boala non-Hodgkin; mieloamele multiple, cum ar fi, dar nefiind exhaustive, mielomul multiplu inactiv (numit, de asemenea, mielom multiplu mocnit), mielomul nesecretor, mielomul osteosclerotic, leucemia cu celule placancer, placancercitomul solitar și placancercitomul extramedular; macroglobulinemia Waldenstrom; gamapatia monoclonală de genă nedeterminată; gamapatia monoclonală benignă; boala lanțului greu; sarcoamele osoase și ale țesutului conjunctiv, cum ar fi, dar nefiind exhaustive, sarcomul osos, osteosarcomul, condrosarcomul, sarcomul Ewing, tumoarea cu celule gigante maligne, fibrosarcomul osos, hordomul, sarcomul periostal, sarcoamele țesuturilor moi, angiosarcomul (hemangiosarcomul), fibrosarcomul, sarcomul Kaposi, leiomiosarcomul, liposarcomul, limfangiosarcomul, neurilemumul, rabdomiosarcomul, sarcomul sinovial; tumorile cerebrale, cum ar fi, dar nefiind exhaustive, gliomul, astrocitomul, gliomul trunchiului cerebral, ependimomul, oligodendrogliomul, tumoarea nonglială, glioblastomul multiform, neurinomul acustic, craniofaringiomul, meduloblastomul, meningiomul, pineocitomul, pineoblastomul, limfomul cerebral primar; cancerul mamar incluzând, dar nefiind exhaustiv, carcinomul ductal, adenocarcinomul, carcinomul lobular (celule de cancer), carcinomul intraductal, cancerul mamar medular, cancer mamar mucinos, cancerul mamar tubular, cancerul mamar papilar, boala Paget și cancerul mamar inflamator; cancerul adrenal cum ar fi, dar nefiind exhaustive, feocromocitomul și

carcinomul adrenocortical; cancerul tiroidian, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, cancerul tiroidian papilar sau folicular, cancerul tiroidian medular și cancerul tiroidian anaplastic; cancerul pancreatic cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, insulinomul, gastrinomul, glucagonomul, vipomul, tumoarea secretoare de somatostatina și carcinoide sau tumoarea celulelor insulare; cancerul pituitar cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, boala Cushing, tumoare secretoare de prolactină, acromegalia și diabetul insipid; cancerul de ochi, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, melanomul ocular, cum ar fi, melanomul irisului, melanomul coroidian și melanomul corpului ciliar și retinoblastomul; cancerul vaginal, cum ar fi carcinomul cu celule scuamoase, adenocarcinomul și melanomul; cancerul vulvar, cum ar fi carcinomul cu celule scuamoase, melanomul, adenocarcinomul, carcinomul bazocelular, sarcomul și boala Paget; cancerul de col uterin, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, carcinomul cu celule scuamoase și adenocarcinomul; cancerul uterin, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, carcinomul endometrial și sarcomul uterin; cancerul ovarian, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, carcinomul ovarian epitelial, tumoarea borderline, tumoarea celulelor germinative și tumoarea stromală; cancerul esofagian, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, cancerul scuamos, adenocarcinomul, carcinomul adenoid chistic, carcinomul mucoepidermoid, carcinomul adenoscuamos, sarcomul, melanomul, placancercitomul, carcinomul verucos și carcinomul cu celule “în bob de ovăz” (celule canceroase); cancerul gastric, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, adenocarcinomul, cancer vegetant (polipoid), ulcerat, cu răspândire superficială, cu răspândire difuză, limfomul malign, liposarcomul, fibrosarcomul și carcinosarcomul; cancerul de colon; cancerul rectal; cancerul hepatic, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, carcinomul hepatocelular și hepatoblastomul; cancerul de vezică biliară, cum ar fi adenocarcinomul; colagiocarcinoamul, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, papilar, nodular și difuz; cancerul pulmonar, cum ar fi cancerul pulmonar cu celule necanceroase, carcinomul cu celule scuamoase (carcinomul epidermoid), adenocarcinomul, carcinomul cu celule mari și cancerul pulmonar cu celule canceroase; cancerul testicular, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, tumoarea germinală, seminomul anaplastic, clasic (tipic), spermatocitic, nonseminomul, carcinomul embrionar, carcinomul teratom, coriocarcinomul (tumora sacului vitelin), cancerul de prostată, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, neoplazia intraepitelială prostatică, adenocarcinomul, leiomiiosarcomul și rabdomiosarcomul; cancerul penile; cancerul oral, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, carcinomul cu celule scuamoase; cancerul bazal; cancerul glandelor salivare, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, adenocarcinomul, carcinomul mucoepidermoid și carcinomul adenoid cistic; cancerul faringelui cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, cancerul cu celule scuamoase și verucos; cancerul de piele, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, carcinomul bazocelular, carcinomul cu celule scuamoase și melanomul, melanomul cu răspândire superficială, melanomul nodular, melanomul malign lentigo, melanomul lentiginos al extremităților; cancerul renal, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, carcinomul cu celule renale, adenocarcinomul, hipernefromul, fibrosarcomul, cancerul cu celule de tranziție (ale pelvisului renal și/sau uterului); tumoarea Wilms; cancerul vezicii urinare cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, carcinomul cu celule de tranziție, cancerul cu celule scuamoase, adenocarcinomul, carcinosarcomul. Adicional, cancerul includ mixosarcomul, sarcomul osteogenic, endoteliomul, limfangioendoteliomul, mezoteliomul, sinoviomul, hemangioblastomul, carcinomul epitelial, cistadenocarcinomul, carcinomul bronhogenic, carcinomul glandelor sudoripare, carcinomul glandei sebacee, carcinomul papilar și adenocarcinoamele papilare (Fishman et al., Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1985; Murphy et al. Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America, 1997).

Intr-o variantă de realizare NDV himerice, conform prezentei invenții, sau compoziții ale acestora, un vaccin oncolizat, un vaccin cu celule întregi sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, sunt utile în tratamentul unei varietăți de cancer și boli proliferative anormale, inclusiv (dar nefiind exhaustiv) următoarele: carcinomul, incluzând cel al vezicii urinare, mamă, de colon, renal, hepatic, pulmonar, ovarian, pancreatic, gastric, de col uterin, tiroidian și de piele; incluzând carcinomul cu celule scuamoase; tumorile hematopoietice ale liniei limfoide, incluzând leucemia, leucemia limfocitară acută, leucemia limfoblastică acută, limfomul cu celule B, limfomul cu celule T, limfomul Burkitt; tumorile hematopoietice ale liniei mieloide, incluzând leucemiile mielocitare acute și cronice și leucemia promielocitară; tumorile de origine mezenchimală, incluzând fibrosarcomul și rabdomiosarcomul; alte tumori, incluzând melanomul, seminomul, teratocarcinomul, neuroblastomul și gliomul; tumorile sistemului nervos central și periferic, incluzând astrocitomul, neuroblastomul, gliomul și neurilemomi; tumorile de origine mezenchimală, incluzând fibrosarcomul, rabdomiosarcomul și osteosarcomul; și alte tumori,

incluzand melanomul, xeroderma pigmentosum, keratoactantomul, seminomul, cancerul folicular tiroidian și teratocarcinomul.

În unele variante cancerelor asociate cu aberații în apoptoză sunt tratate în conformitate cu metodele prezentei invenții. Astfel de cancere pot include, dar nefiind exhaustive, limfoamele foliculare, carcinoamele cu mutații p53, tumorile hormonodependente ale glandei mamare, prostatei și ovarelor și leziunile precanceroase, cum ar fi polipoza adenomatoasă familială și sindroamele mielodisplazice. În realizările specifice modificările malignizante și disproliferative (cum ar fi, metaplazia și displazia) sau tulburările hiperproliferative ale pielii, plămânilor, ficatului, oaselor, creierului, stomacului, colonului, glandei mamare, prostatei, vezicii urinare, rinichilor, pancreasului, ovarelor și/sau uterului sunt tratate în conformitate cu metodele prezentei invenții. În alte realizări specifice un sarcom sau un melanom este tratat în conformitate cu metodele prezentei invenții.

Intr-o variantă de realizare cancerul, tratat în conformitate cu metodele prezentei invenții, este leucemie, limfom sau mielom (de exemplu, mielom multiplu). Exemplele specifice de leucemii și de alte tipuri de cancer transmisibile prin sânge, care pot fi tratate în conformitate cu metodele prezentei invenții, includ, dar nefiind exhaustive, leucemia limfoblastică acută "LLA", leucemia acută limfoblastică cu celule B, leucemia acută limfoblastică cu celule T, leucemia acută mieloblastică "LAM", leucemia acută promielocitară "LAP", leucemia monoblastică acută, leucemia eritroleucemică acută, leucemia megacarioblastică acută, leucemia mielomonocitară acută, leucemia nelimfocitară acută, leucemia nediferențiată acută, leucemia mielocitară cronică "LMC", leucemia limfocitară cronică "LLC" și leucemia cu celule păroase.

Exemplele specifice de limfoame, care pot fi tratate în conformitate cu metodele prezentei invenții, includ, dar nefiind exhaustive, boala Hodgkin, limfomul non-Hodgkin, mielomul multiplu, macroglobulinemia Waldenstrom, boala lanțului greu și policitemia vera.

Intr-o altă realizare cancerul tratat în conformitate cu metodele prezentei invenții este o tumoră solidă. Exemplele de tumori solide, care pot fi tratate în conformitate cu metodele prezentei invenții, includ, dar nefiind exhaustive, fibrosarcomul, mixosarcomul, liposarcomul, condrosarcomul, sarcomul osteogenic, cordonul, angiosarcomul, endoteliosarcomul, limfangiosarcomul, limfangioendoteliosarcomul, sinoviomul, mezoteliomul, tumoră Ewing, leiomiomasarcomul, rabdomiosarcomul, cancerul de colon, cancerul colorectal, cancerul de rinichi, cancerul pancreatic, cancerul osos, cancer mamar, cancerul ovarian, cancerul de prostată, cancerul esofagian, cancerul de stomac, cancerul oral, cancerul nazal, cancerul la gat, carcinomul cu celule scuamoase, carcinomul bazocelular, adenocarcinomul, carcinomul glandei sudoripare, carcinomul glandei sebacee, carcinomul papilar, adenocarcinoame papilare, cistadenocarcinomul, carcinomul medular, carcinomul bronhogenic, carcinomul cu celule renale, hepatomul, carcinomul de duct biliar, coriocarcinomul, seminomul, carcinomul embrionar, tumoră Wilms, cancerul de col uterin, cancerul uterin, cancerul testicular, cancerul pulmonar cu celule canceroase, carcinomul de vezică urinară, cancerul pulmonar, carcinomul epitelial, gliomul, glioblastomul multiform, astrocitomul, meduloblastomul, craniofaringiomul, ependimomul, pinealomul, hemangioblastomul, neuromul acustic, oligodendrogliomul, meningiomul, cancerul de piele, melanomul, neuroblastomul și retinoblastomul. Într-o altă formă de realizare cancerul tratat în conformitate cu metodele prezentei invenții este un cancer metastatic. Într-o altă formă de realizare cancerul, tratat în conformitate cu metodele prezentei invenții, este malign.

Intr-o variantă de realizare cancerul tratat, în conformitate cu metodele prezentei invenții, este un cancer care are un prognostic nefavorabil și/sau are un răspuns inefficient la terapiile convenționale, cum ar fi chimioterapie și radiații. Într-o altă realizare specifică cancerul tratat, în conformitate cu metodele prezentei invenții, este melanomul malign, gliomul malign, carcinomul cu celule renale, adenocarcinomul pancreatic, mezoteliom pleural malign, adenocarcinomul pulmonar, carcinomul pulmonar cu celule mici, carcinomul pulmonar cu celule scuamoase, cancerul tiroidian anaplastic și carcinomul cu celule scuamoase al capului și gâtului. Într-o altă realizare specifică cancerul, tratat în conformitate cu metodele prezentei invenții, este un tip de cancer descris în continuare.

Terapii adiționale

Terapiile adiționale, care pot fi utilizate într-o combinație cu un NDV, conform prezentei invenții, sau cu o compoziție a acestuia, cu un vaccin oncolizat, sau cu un vaccin cu celule integre pentru tratamentul cancerului, includ, dar nefiind exhaustive, molecule mici, medicamente sintetice, peptide (inclusiv peptide ciclice), polipeptide, proteine, acizi nucleici (de exemplu, nucleotide ale ADN și ARN incluzând, dar nefiind exhaustive, secvențe de nucleotide antisens, helix triplu, ARNi și secvențe de nucleotide care codifică proteine, polipeptide sau peptide

biologic active), anticorpi, molecule anorganice naturale sau sintetice, agenți mimetici și molecule organice naturale sau sintetice. Într-o variantă de realizare terapie adițională reprezintă un agent chimioterapeutic.

În unele variante de realizare un NDV, conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi se utilizează în asociere cu radioterapia, care prevede utilizarea razelor roentgen, razelor gamma și altor surse de radiații pentru a distruge celulele canceroase. În realizările specifice radioterapia se administrează ca radioterapie externă sau teleterapie, în care radiația este direcționată spre o sursă îndepărtată. În alte realizări radioterapia se administrează ca tratament intern sau brahiterapie, în care o sursă radioactivă este plasată în interiorul corpului aproape de celule canceroase și/sau de o masă tumorală.

În anumite realizări un NDV, conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule întregi se utilizează în asociere cu terapia cu celule T adoptive. Într-o variantă de realizare celulele T, utilizate în terapia cu celule T adoptive, reprezintă limfocite care infiltrază tumoarea, izolate de la un subiect, și celula T concretă sau clona au fost înmulțite pentru utilizare. În unele variante celulele T, utilizate în terapia cu celule T adoptive, reprezintă celulele T prelevate din sângele pacientului după administrarea unui vaccin împotriva cancerului și înmulțite *in vitro* înainte de utilizare. Într-o altă realizare specifică celulele T, utilizate în terapia cu celule T adoptive, reprezintă celulele T care au fost influențate să recunoască și să atace puternic tumoarea. Într-o altă realizare specifică celulele T, utilizate în terapia cu celule T adoptive, au fost modificate genetic pentru a exprima receptorul celulelor T, specific pentru antigenul tumoral, sau un receptor de antigen himeric (CAR). Într-o variantă de realizare terapie cu celule T adoptive utilizate este similară celei descrise în continuare.

În anumite realizări un NDV, conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule canceroase întregi sunt utilizate în combinație cu o citokină. Într-o variantă de realizare un NDV, conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, sau un vaccin cu celule canceroase întregi se utilizează în asociere cu interferon (de exemplu, cu IFN- γ).

Terapiile anticancer disponibile în prezent și dozele acestora, căile de administrare și de utilizare recomandate sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise în literatura de specialitate (Physician's Desk Reference, 67th ed., 2013).

Exemplele specifice de agenți anticancer, care pot fi utilizați în combinație cu un NDV, conform prezentei invenții, sau cu o compoziție a acestuia includ: agenți hormonal (de exemplu, un inhibitor de aromatază, un modulator selectiv al receptorului de estrogen (SERM) și un antagonist al receptorului estrogenic), agenți chimioterapeutici (de exemplu, un blocant de dezasamblare a microtubulilor, antimetabolit, inhibitor de topoizomerază și agent de reticulare sau agent de deteriorare a ADN), agenți antiangiogenici (de exemplu, antagonist VEGF, antagonist al receptorilor, antagonist al integrității, agent de țintire vasculară (VTA)/agent de perturbare vasculară (VDA)), terapie cu radiații (radioterapia) și chirurgia obișnuită.

Exemplele nelimitative de agenți hormonal, care pot fi utilizați în combinație cu un NDV, conform prezentei invenții, sau cu o compoziție a acestuia includ: inhibitori de aromatază, SERM și antagoniști ai receptorilor de estrogen. Agenții hormonal, care sunt inhibitori de aromatază, pot fi steroidieni sau nesteroidieni. Exemplele nelimitative de agenți hormonal nesteroidieni includ: letrozol, anastrozol, aminoglutetimidă, fadrozol și vorozol. Exemplele nelimitative de agenți hormonal steroidieni includ: aromasină (exemestan), formestan și testolactonă. Exemplele nelimitative de agenți hormonal, care sunt SERM, includ tamoxifen (marcă/comercializat ca Nolvadex®), afimoxifen, arzoxifen, bazedoxifen, clomifen, femarel, lasofoxifen, ormeloxifen, raloxifen și toremifen. Exemplele nelimitative de agenți hormonal, care sunt antagoniști ai receptorilor de estrogen, includ: fulvestrant. Alți agenți hormonal includ, dar nefiind exhaustive, abirateron și lonaprisan.

Exemplele nelimitative de agenți chimioterapeutici, care pot fi utilizați în combinație cu un NDV, conform prezentei invenții, sau cu o compoziție a acestuia, cu un vaccin oncolizat sau cu un vaccin cu celule întregi includ: blocant de dezasamblare a microtubulilor, antimetabolit, inhibitor de topoizomerază și agent de reticulare sau agent de deteriorare a ADN. Agenții chimioterapeutici, care sunt blocanți de dezasamblare a microtubulilor includ, dar nefiind exhaustivi, taxene (de exemplu, paclitaxel (marcă/comercializat ca TAXOL®), docetaxel, abraxan, larotaxel, ortataxel și tesetaxel); epotilone (de exemplu, ixabepilone) și alcaloizi de vinca (de exemplu, vinorelbina, vinblastină, vindesină și vincristină (marcă/comercializate ca ONCOVIN®)).

Agenții chimioterapeutice, care sunt antimetaboliți includ, dar nefiind exhaustivi, antimetaboliți de folat (de exemplu, metotrexat, aminopterina, pemetrexed, raltitrexed); antimetaboliți purinici (de exemplu, cladribină, clofarabină, fludarabină, mercaptopurină, pentostatin, tioguanină); antimetaboliți pirimidinici (de exemplu, 5-fluorouracil, capecitabină, gemcitabină (GEMZAR®), citarabină, decitabină, floxuridină, tegafur) și antimetaboliți dezoxiribonucleotidici (de exemplu, hidroxiuree).

Agenții chimioterapeutice, care sunt inhibitori ai topoizomerazei includ, dar nefiind exhaustivi, inhibitori ai topoizomerazei din clasa I (camptoteca) (de exemplu, topotecan (marcă/comercializat ca HYCAMTIN®) irinotecan, rubitecan și belotecan); inhibitori ai topoizomerazei din clasa II (podophyllum) (de exemplu, etoposid sau VP-16 și teniposid); antraciclina (de exemplu, doxorubicină, epirubicină, Doxil, aclarubicină, amrubicină, daunorubicină, idarubicină, pirarubicină, valrubicină și zorubicină) și antracendione (de exemplu, mitoxantron și pixantron).

Agenții chimioterapeutice, care sunt agenți de reticulare a ADN (sau agenți de deteriorare a ADN) includ, dar nefiind exhaustivi, agenți de alchilare (de exemplu, ciclofosfamidă, mecloretamină, ifosfamidă (marcă/comercializat ca IFEX®), trofosfamida, clorambucil, melfalan, prednimustin, bendamustin, uramustin, estramustin, carmustină (marcă/comercializat ca BiCNU®), lomustin, semustin, fotemustin, nimustin, ranimustin, streptozocin, busulfan, manosulfan, treosulfan, carbocuană, N,N'-trietilentiofosforamidă, triazicuană, trietilenmelamină); agenți similari agenților de alchilare (de exemplu, carboplatină (marcă/comercializată ca PARAPLATIN®), cisplatină, oxaliplatină, nedaplatină, tetranitrat de triplatină, satraplatină, picoplatină); agenți de reticulare a ADN neclasici (de exemplu, procarbazine, dacarbazine, temozolomidă (marca/comercializată ca TEMODAR®), altretamină, mitobronitol) și agenți de intercalare (de exemplu, actinomycină, bleomicina, mitomicină și plicamicină).

Modulatori imuni

În realizările specifice un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect în combinație cu unul sau mai mulți dintre următorii imunomodulatori: orice agonist al unui semnal costimulator al unei celule imune (cum ar fi, de exemplu, limfocitele T, celulele NK sau o celulă prezentatoare de antigen (de exemplu, o celulă dendritică sau macrofage) și/sau orice antagonist al unui semnal inhibitor al unei celule imune (cum ar fi, de exemplu, limfocitele T, celulele NK sau o celulă prezentatoare de antigen (de exemplu, o celulă dendritică sau macrofage), cunoscute specialiștilor în domeniu. În unele realizări particulare un NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect în combinație cu unul sau mai mulți dintre agoniștii unui semnal costimulator al unei celule imune, descriși mai sus. În unele realizări un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect în combinație cu unul sau mai mulți dintre antagoniștii unui semnal inhibitor al unei celule imune, descriși mai sus. În anumite realizări un NDV, conform prezentei invenții, (de exemplu, un NDV himeric) sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat sau un vaccin cu celule întregi se administrează la un subiect în combinație cu unul sau mai mulți dintre agoniștii unui semnal costimulator al unei celule imune și/sau cu unul sau mai mulți dintre antagoniștii unui semnal inhibitor al unei celule imune, descriși în continuare (de exemplu, un anticorp anti-CTLA-4, un anticorp ICOS-L, un anticorp anti PD-1 sau un anticorp anti-PD-L1).

Metode de analiză biologică

Analiza virusului *in vitro*

Analizele virusului includ acele, care măsoară replicarea virală alterată (cum este determinat, de exemplu, prin formarea plăcilor) sau producerea de proteine virale (cum este determinat, de exemplu, prin analiza Western blot) sau ARN virali (cum este determinat, de exemplu, prin RT-PCR sau analiza Northern Blot) în celulele de cultură *in vitro*, folosind metode bine cunoscute în domeniu.

Creșterea NDV, conform prezentei invenții, poate fi evaluată prin orice metodă cunoscută în domeniu sau descrisă aici (de exemplu, în cultura celulară (de exemplu, culturile de celule renale embrionare de pui sau culturile de fibroblaste embrionare de pui (CEF)). Titrul viral poate fi determinat prin inocularea diluțiilor în serie de un NDV, conform prezentei invenții, în culturi de celule (de exemplu, CEF, MDCK, celule EFK-2, celule Vero, celule endoteliale din vena ombilicală primară umană (HUVEC), linia de celule epiteliale umane H292 sau de celule HeLa), embrioni de pui sau animale vii (de exemplu, păsări). După incubarea virusului pentru un timp

specificat, virusul este izolat, folosind metode standard. Cuantificarea fizică a titrului virusului poate fi realizată folosind PCR aplicată la supernatante virale (Quinn & Trevor, 1997; Morgan et al., 1990), teste de hemaglutinare, doze infecțioase de cultură tisulară (TCID50) sau doze infecțioase pentru embrionii de păsări (EID50). O metodă tipică de evaluare a titrului viral este

5 descrisă în continuare.

Incorporarea secvențelor nucleotidice, care codifică o peptidă sau proteină heteroloagă (de exemplu, o citokină, o proteină F mutantă, o proteină V mutantă sau locusul țintă pentru miARN) în genomul unui NDV himeric, conform prezentei invenții, poate fi evaluată prin orice metodă cunoscută în domeniu sau descrisă aici (de exemplu, în cultură celulară, pe un model animal sau în

10 cultură virală în oua embrionate). De exemplu, particulele virale din culturile celulare de lichid alantoidian de ouă embrionate pot fi purificate prin centrifugare într-un gradient de zaharoză și ulterior analizate pentru expresia proteinelor de fuziune prin metode de Western blot bine cunoscute în domeniu.

Abordările, bazate pe imunofluorescență pot fi, de asemenea, folosite pentru a detecta virusul și a evalua creșterea virală. Astfel de abordări sunt bine cunoscute specialiștilor în

15 domeniu, de exemplu, microscopia de fluorescență și citometria în flux.

Analiza anticorpilor

Anticorpilor, generați de NDV, conform prezentei invenții, pot fi caracterizați printr-o varietate de moduri bine cunoscute de către specialiștii în domeniu (de exemplu, ELISA, metoda

20 de rezonanță a plasmonului de suprafață (BIAcore), Western blot, imunofluorescență, colorare cu utilizarea unui marker imun și/sau teste de microneutralizare). În special, anticorpilor, generați de NDV himerice, conform prezentei invenții, pot fi testați pentru abilitatea de a se lega specific la un antigen de virus sau la o peptidă sau proteină heteroloagă. Un astfel de test poate fi efectuat în soluție (Houghten, Bio/Techniques, no 13, 1992, p. 412-421), pe granule (Lam. Nature, no 354,

25 1991, p. 82-84), pe cipuri (Fodor. Nature, no 364, 1993, p. 555-556), pe bacterii (US 5223409 A 1993.06.29), pe spori (US 5571698 A 1996.11.05; US 5403484 A 1995.04.04; US 5223409 A 1993.06.29), pe plasmide (Cull et al. Proc. Natl. Acad. Sci., no 89, USA, 1992, p. 1865-1869) sau pe fag (Scott and Smith. Science, no 249, 1990, p. 386-390; Cwirla et al. Proc. Natl. Acad. Sci., no 87, USA, 1990, p. 6378-6382; Felici. J. Mol. Biol., no 222, 1991, p. 301-310).

Anticorpilor, generați de NDV himerice, conform prezentei invenții, identificați pentru a se lega specific la un antigen de virus sau la o peptidă sau proteină heteroloagă, pot fi testați pentru specificitatea lor la respectivul antigen al virusului sau peptidă sau proteină heteroloagă. Anticorpilor pot fi testați pentru legarea specifică la un antigen de virus sau la o peptidă sau proteină heteroloagă și pentru reactivitatea lor încrucișată cu alte antigene prin orice metodă cunoscută în

30 domeniu. Testele imunologice, care pot fi utilizate pentru a analiza reactivitatea lor încrucișată și legarea specifică includ, dar nefiind exhaustive, sisteme de testare competitive și necompetitive, utilizând metode, cum ar fi Western blot, analiza radioimună, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), imunotestele "sandwich", teste de imunoprecipitare, reacții de precipitare, reacțiile de precipitare difuză în gel, analize de imunodifuzie, teste de aglutinare, reacția de fixare

35 a complementului, analize imunoradiometrice, imunoanaliza fluorescență, imunoanaliza proteinei A (Ausubel et al, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994).

Afinitatea de legare a unui anticorp la un antigen și rata de disociere la interacțiunea anticorpului cu antigenul poate fi determinată prin analize de legare competitivă. Alternativ, o

40 metodă de rezonanță a plasmonului de suprafață (de exemplu, analiza cinetică BIAcore) sau testul KinExA (Blake, et al. Analytical Biochem., no. 272, 1999, p. 123-134) pot fi utilizate pentru a determina ratele de legare a anticorpilor și de disociere a anticorpilor cu antigenele NDV himerice, conform prezentei invenții.

Analiza IFN

Inducerea și eliberarea IFN ca răspuns la NDV, conform prezentei invenții, pot fi determinate folosind metode cunoscute unui specialist în domeniu sau descrise aici. De exemplu,

50 cantitatea de IFN, indusă în celulele după infecția cu un NDV, conform prezentei invenții, poate fi determinată utilizând un test imunologic (de exemplu, ELISA sau Western blot) pentru a măsura exprimarea IFN sau pentru a măsura expresia unei proteine, a cărei expresie este indusă prin IFN.

55 Alternativ, cantitatea de IFN indusă poate fi măsurată la nivelul ARN prin așa metode, cum ar fi Northern blot și RT-PCR cantitativă, cunoscute specialiștilor în domeniu. În variantele concrete de realizare a prezentei invenții cantitatea eliberată de IFN poate fi măsurată utilizând un test ELISPOT (de exemplu, metodele descrise în continuare). Mai mult decât atât, inducerea și eliberarea de citokine poate fi determinată, de exemplu, printr-o analiză imunologică sau

ELISPOT la nivel de proteine și/sau RT-PCR cantitativă sau Northern blot la nivel de ARN. Descrierea analizei în scopul măsurării inducției și eliberării citokinelor este prezentată în continuare.

Analiza markerilor de activare

- 5 Metodele de apreciere a nivelului de expresie al markerilor de activare, moleculei costimulatoare, ligandului sau moleculei inhibitoare de celulele imune sunt cunoscute specialiștilor în domeniu. De exemplu, expresia unei marker de activare, moleculei costimulatoare, ligandului sau moleculei inhibitoare de celulele imune (de exemplu, T limfocitele sau celulele NK) poate fi evaluată prin citometria în flux. Într-o variantă de realizare a prezentei invenții metodele, descrise
10 în continuare, sunt utilizate pentru a evalua exprimarea unui marker de activare, moleculei costimulatoare, ligandului sau moleculei inhibitoare de celulele imune.

Analiza infiltrării celulelor imune

- Metodele de evaluare a infiltrării celulelor imune sunt cunoscute specialiștilor în domeniu. Într-o variantă de realizare a prezentei invenții metodele, descrise în continuare, sunt utilizate
15 pentru a evalua infiltrarea celulelor imune.

Studierea toxicității

- În unele variante de realizare NDV, conform prezentei invenții, sau compozițiile acestora, vaccinurile oncolizate, vaccinuri cu celule întregi sau terapiile combinate, conform prezentei invenții sunt testate pentru citotoxicitate pe linii celulare de mamifere, de preferință umane (de
20 exemplu, testul de citotoxicitate descris în continuare). În anumite realizări citotoxicitate este evaluată în una sau mai multe dintre următoarele exemple nelimitative de linii celulare: o linie celulară de monocite umane U937; celule primare mononucleare din sângele periferic (PBMC); o linie de celule de hepatoblastom uman Huh7; celule HL60, celule HT1080, celule HEK 293T și 293H, MLPC, linii de celule de mezonefros uman; liniile de celule de melanom uman, cum ar fi SkMel2, SKMEL-119 și SKMEL-197; monocite umane THP-1; linia de celule HeLa; linii de celule de neuroblastom, cum ar fi MC-IXC, SK-N-MC, SK-N-MC, SK-N-DZ, SH-SY5Y și BE (2)-C. În anumite realizări ale invenției citotoxicitatea este evaluată în diferite celule canceroase. În unele variante de realizare pentru evaluarea toxicității se folosește analiza ToxLite.

- Multe teste, cunoscute în domeniu, pot fi utilizate pentru a evalua viabilitatea celulelor sau
30 liniilor celulare după infectarea cu un NDV, conform prezentei invenții, sau cu o compoziție a acestuia, sau după un tratament cu un vaccin oncolizat, conform prezentei invenții, cu un vaccin cu celule întregi, conform prezentei invenții, sau o terapie combinată, conform prezentei invenții, și, astfel, se determină citotoxicitatea NDV sau a compoziției acestuia, a vaccinului oncolizat, a vaccinului cu celule întregi sau a terapiei combinate. De exemplu, proliferarea celulelor poate fi apreciată prin măsurarea încorporării bromdeoxiuridinei (BrdU), încorporării (³H) timidinei prin
35 numărarea directă a celulelor sau prin detectarea schimbărilor în transcripția, translația sau activitatea genelor cunoscute, cum ar fi proto-oncogenele (de exemplu, fos, myc) sau markerilor ciclului celular (Rb, Cdc2, ciclină A, D1, D2, D3, E, etc). Nivelurile de astfel de proteine și ARNm și activitatea pot fi determinate prin orice metodă bine cunoscută în domeniu. De exemplu, proteina poate fi cuantificată prin metode cunoscute de imunodiagnostic, cum ar fi ELISA, Western blot sau imunoprecipitare, folosind anticorpi, inclusiv anticorpi comercial disponibili. ARNm poate fi determinat cantitativ utilizând metode bine cunoscute și de rutină în domeniu, de exemplu, folosind Northern blot, protecția de ARNză sau reacția polimerazei în lanț asociată cu transcripție inversă. Viabilitatea celulelor poate fi evaluată prin colorare cu tripan albastru sau alți
45 markeri de moarte celulară sau de viabilitate, cunoscuți în domeniu. Într-o variantă de realizare pentru determinarea viabilității celulare este măsurat nivelul de ATP celular. În realizări preferate NDV, conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, un vaccin cu celulă integră sau o terapie combinată distruge celulele canceroase, dar nu ucide celulele sănătoase (adică, necanceroase). Într-o variantă de realizare NDV, conform prezentei invenții, sau o compoziție a acestuia, un vaccin oncolizat, un vaccin cu celulă integră sau o terapie combinată distruge preponderant celulele canceroase, dar nu ucide celulele sănătoase (adică, necanceroase).

- În variantele concrete de realizare a prezentei invenții viabilitatea celulară este măsurată în
50 perioade de trei zile și de șapte zile, folosind un test standard în domeniu, cum ar fi setul de reagenți CellTiter-Glo (Promega), cu care se măsoară nivelurile de ATP intracelular. O reducere a ATP celular este un indicator al unui efect citotoxic. Într-o altă variantă de realizare viabilitatea celulară poate fi măsurată cu testul de absorbție a roșului neutru. În alte exemple de realizare a invenției observarea vizuală a modificărilor morfologice poate include extinderea, granulara, celule cu margini neregulate, un aspect voalat, rotunjire, detașare de la suprafața godeului sau alte modificări.

NDV, conform prezentei invenții, sau compozițiile acestora, vaccinurile oncolizate, vaccinurile cu celule întregi sau terapiile combinate pot fi testate pentru toxicitate *in vivo* pe modele de animale (de exemplu, modelele de animale descrise în continuare). De exemplu, modelele de animale, descrise aici și/sau alte modele de animale cunoscute în domeniu, utilizate pentru a testa efectele compușilor chimici asupra cancerului, de asemenea, pot fi utilizate pentru a determina toxicitatea *in vivo* a NDV, conform prezentei invenții, sau a compozițiilor acestora, a vaccinurilor oncolizate, a vaccinurilor cu celule întregi sau a terapiilor combinate. De exemplu, la animale se administrează cantități diferite de pfu de NDV, conform prezentei invenții (de exemplu, un NDV himeric descris în continuare). Ulterior animalele sunt monitorizate în timp pentru evidențierea unor așa indicatori, cum este moartea, pierderea în greutate sau incapacitatea de a crește în greutate și/sau se măsoară în serul sangvin nivelul de marker, care pot indica leziunea țesuturilor (de exemplu, nivelul creatinfosfokinază ca un indicator de leziuni tisulare generale, nivelul de transaminaze ale acidului glutamic-oxalic sau de transaminază a acidului piruvic, ca indicatori ai deteriorării posibile a ficatului). Adicional la evaluarea toxicității diferitor doze, aceste analize *in vivo* pot fi, de asemenea, adaptate pentru a testa toxicitatea diferitor metode și/sau scheme de administrare.

Toxicitatea și/sau eficiența unui NDV, conform prezentei invenții, sau a compoziției acestuia, unui vaccin oncolizat, conform prezentei invenții, unui vaccin cu celule întregi, conform prezentei invenții, sau unei terapii combinate, conform prezentei invenții, poate fi determinată prin proceduri farmaceutice standard în culturi celulare sau pe animale experimentale, de exemplu, prin determinarea LD50 (doza letală pentru 50% din populație) și ED50 (doza terapeutic eficientă pentru 50% din populație). Raportul dozelor în efectele toxice și terapeutice reprezintă un indice terapeutic și acesta poate fi exprimat ca raportul LD50/ED50. Terapiile, care prezintă indici terapeutici mari, sunt preferate. Totodată, terapiile care prezintă efecte secundare toxice pot fi utilizate, dar trebuie respectate toate măsurile de precauție, care constau în elaborarea unor așa sisteme de livrare, care direcționează astfel de terapii nemijlocit la țesutul afectat, în scopul de a reduce la minimum potențialul de deteriorare a celulelor necanceroase și, prin urmare, de a reduce efectele secundare.

Datele, obținute din analiza culturi celulare și cercetările pe animale, pot fi utilizate în identificarea unui interval de dozare la administrarea terapiilor la subiecți. Dozele de astfel de agenți se află, de preferință, într-un interval de concentrații circulante, care includ ED50 cu toxicitate redusă sau absentă. Doza poate varia în acest interval în funcție de forma de dozare utilizată și calea de administrare utilizată. Pentru orice terapie, conform prezentei invenții, doza terapeutic eficientă poate fi estimată inițial în baza analizei culturii celulare. O doză poate fi determinată pe modele de animale pentru a obține un interval de concentrații plasmatică, circulante în plasma sanguină, care include IC50 (adică, concentrația de NDV himeric care realizează o jumătate din inhibarea maximă a simptomelor), determinată în cultura celulară. Astfel de informații pot fi utilizate pentru a determina mai precis dozele utile pentru administrare la subiecți. Nivelurile de concentrații din plasmă pot fi măsurate, de exemplu, prin cromatografie de lichide de înaltă performanță.

Cercetările anticancer

În unele realizări NDV, conform prezentei invenții, sau compozițiile acestora, vaccinurile oncolizate, conform prezentei invenții, vaccinurile cu celule întregi, conform prezentei invenții, sau terapiile combinate, conform prezentei invenții, sunt testate pentru prezența la ele a activității biologice, folosind modele de cancer la animale. Asemenea sisteme de modele de animale includ, nefiind exhaustive, șobolani, șoareci, păsări, vaci, maimuțe, porci, câini, iepuri, etc. Într-o variantă concretă de realizare a prezentei invenții NDV sau terapia combinată se apreciază pe modele murine. Asemenea sisteme de modele se utilizează pe larg și sunt bine cunoscute specialiștilor în domeniu, de exemplu, sistemul murin SCID sau șoareci transgenici.

Activitatea anti-cancer a NDV, conform prezentei invenții, sau a unei compoziții a acestuia, a vaccinului oncolizat, conform prezentei invenții, a vaccinului cu celule întregi, conform prezentei invenții, sau a terapiilor combinate, conform prezentei invenții, poate fi determinată prin administrarea a NDV, conform prezentei invenții, sau a unei compoziții a acestuia, a vaccinului oncolizat, conform prezentei invenții, a vaccinului cu celule întregi, conform prezentei invenții, sau a terapiilor combinate, conform prezentei invenții, pe un model de animal și verificarea faptului, că NDV sau compoziția acestuia, vaccinul oncolizat, vaccinul cu celule întregi sau terapia combinată este eficientă în reducerea severității cancerului, reducerea simptomelor cancerului, reducerea metastazelor cancerului și/sau reducerea dimensiunii unei tumori la modelul de animal menționat (de exemplu, descrierea în continuare). Exemplele de

modele animale pentru cancer includ în general, dar nefiind exhaustive, tumorile care apar spontan la animalele de companie (Vail & MacEwen. *Cancer Invest*, no 18 (8), 2000, p. 781-792). Exemplele de modele animale pentru cancerul pulmonar includ, dar nefiind exhaustive, modele de animale cu cancer pulmonar (Zhang & Roth. *In-vivo*, no 8(5), 1994, p. 755-769) și modele de
 5 șoarece transgenic cu alterarea funcției genei p53 (Morris et al. *J. La State Med Soc.*, no 150(4), 1998, p. 179-185). Un exemplu de model animal pentru cancerul mamar includ, dar nefiind exhaustiv, șoarecele transgenic cu supraexpresia ciclului D1 (Hosokawa et al. *Transgenic Res.*, no 10(5), 2001, p. 471-478). Un exemplu de model animal pentru cancerul de colon include, dar nefiind exhaustiv, un șoarece knock-out dublu al genei TCR b și p53 (Kado et al. *Cancer Res.*, no
 10 61 (6), 2001, p. 2395-2398). Exemplele de modele animale pentru cancer pancreatic includ, dar nefiind exhaustive, un model metastatic de adenocarcinom pancreatic murin PancO2 (Wang et al. *Int J. Pancreatol*, no 29 (1), 2001, p. 37-46) și șoarecii-nuzi cu tumori pancreatice subcutanate (Ghaneh et al. *Gene Ther.*, no 8 (3), 2001, p. 199-208). Exemplele de modele animale pentru limfom non-Hodgkin includ, dar nefiind exhaustive, șoarecii cu o imunodeficiență combinată severă ("SCID") (Bryant et al. *Lab. Invest.*, no 80 (4), 2000, p. 553-573) și șoarecii transgenici IgHmu-HOX11 (Hough et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, no 95 (23), 1998, 13853-13858). Un
 15 exemplu de model animal pentru cancer esofagian include, dar nefiind exhaustiv, un șoarece transgenic pentru oncogenul E7 a virusului papilomei umane de tip 16 (Herber et al. *J. Virol.*, no 70 (3), 1996, p. 1873-1881). Exemplele de modele animale pentru carcinoamele colorectale includ, dar nefiind exhaustive, modele murine Apc (Fodde & Smits. *Trends. Mol. Med.*, no 7 (8), 2001, p. 369-373). În variante concrete de realizare a prezentei invenții modelele de animale pentru cancer descrise în continuare, sunt utilizate pentru a evalua eficacitatea unui NDV sau a compoziției acestuia, a unui vaccine oncolizat, a unui vaccin cu celule întregi sau a unei terapii combinate.

Exemplul 1

25 Acest exemplu demonstrează eficacitatea terapeutică a terapiei cu NDV în combinație cu modulatori ai imunității punctelor de control, care sunt imunostimulatori în tratamentul cancerului.

Materiale și metode

Șoareci

30 Șoarecii din linia BALB/c (în vârstă de 6...8 săptămâni) și șoarecii din linia WT C57BL/6 au fost achiziționați de la Jackson Laboratory. Toți șoarecii au fost menținuți în cuști Micro-Isolator® și tratați în conformitate cu cerințele normative ale Institutului Național de Ocrotire a Sănătății al SUA și Asociației Americane de îngrijire a animalelor de laborator. Toate procedurile și experimentele cu șoareci, realizate în acest studiu, au fost aprobate de către Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Institutional Animal Care și Use Committee.

Liniile celulare

35 Liniile celulare murine de melanom (B16-F10) și carcinom de colon (CT26 și MC38) au fost menținute în mediu RPMI suplimentat cu 10% ser fetal de vițel și penicilină cu streptomycină. Linia celulară murine de cancer de prostată TRAMP-C2 a fost menținută în mediu DMEM suplimentat cu 5% ser fetal de vițel (FCS; Mediatech, Inc.), 5% Nu Serum IV (BD Biosciences)
 40 HEPES, 2-ME, penicilină/streptomycină, L-glutamină, 5 μg/ml insulină (Sigma) și 10 mmol/l DHT (Sigma).

Anticorpi

45 Anticorpii monoclonali terapeutici anti-CTLA-4 (clona 9H10), anti-PD-1 (clona RMP1-14) și anti-PD-L1 au fost produși de BioXcell. Anticorpii, utilizați pentru citometrie în flux, au fost achiziționați de la eBioscience, Biolegend, Invitrogen și BD Pharmingen.

Virusurile și clonarea

50 Tulpina lentogenică recombinantă NDV LaSota a fost utilizată în toate experimentele. Pentru a genera virusul NDV, care exprimă ICOSL murin, un fragment de AND, care codifică ICOSL murin, flancat cu semnalele transcripționale NDV-specifice ale ARN, a fost inserat în locusul de recunoaștere a restricției SacII, creat între genele P și M ale constructului pT7NDV/LS. Virusurile erau salvate din ADNc, folosind metodele descrise anterior și ordonate cu PCR cu transcripție inversă pentru identificarea corectitudinii inserției. Titrurile de virus au fost determinate prin diluții în serie și imunofluorescență în celulele Vero. Constructul de fuziune recombinant ICOSL-F a fost generat prin amplificare PCR a ADN ICOSL, care codifică domeniul
 55 extracelular (aminoacizii 1-277) cu locii de flancare a restricției EcoRI și MluI, și ADN F NDV, care codifică domeniile transmembranar și intracelular ale proteinei F (aminoacizii 501 -554) cu loci de restricție care flanchează MluI și XhoI. Fragmentele de ADN rezultate au fost inserate împreună în vectorul pCAGGS utilizând ligarea a trei părți.

Experimente de infectare *in vitro*

Pentru evaluarea activării expresiei MHC-I, MHC-II și ICAM-1 pe suprafața celulelor NDV, cât și pentru evaluarea expresiei de suprafață a transgenei ICOSL din virusul NDV-ICOSL, celulele B16-F10 au fost infectate în trei repetări pe plăci cu 6 godeuri la MOI egal cu 2. Peste 5 douăzeci și patru de ore, celulele au fost recoltate prin răzuire mecanică și prelucrate pentru marcarea suprafeței și cuantificarea prin citometrie în flux. Pentru experimentele cu determinarea curbei de dezvoltare a virusului, celulele B16-F10 au fost incubate la temperatura camerei cu virusul pe plăci de cultură cu 6 godeuri la MOI indicat într-un volum total de 100 μ l. Peste o oră 10 după incubare mediul de infectare a fost aspirat și celulele au fost incubate la 37°C în 1 ml de mediu DMEM cu 10% lichid alantoidian aviar. După 24, 48 și 72 de ore supernatantele au fost colectate și titrurile de virus au fost determinate, cum este descris mai sus. Pentru experimentele de citotoxicitate *in vitro*, infectarea s-a efectuat într-o manieră similară. Peste 24, 48, 72 și 96 de ore după infectare celulele au fost spălate și incubate cu 1% Triton X-100 la 37°C pentru 30 de min. Activitatea LDH în lizate s-a determinat folosind setul de reagenți CytoTox 96 (Promega), în 15 conformitate cu instrucțiunile producătorului.

Experimentele de supraviețuire la infectarea cu tumoare

Modelele cu tumori bilaterale pe flancuri au fost obținute pentru a monitoriza eficacitatea terapeutică în ambele tumori, atât cea injectată, cât și sistemică. Au fost stabilite scheme de 20 tratament și dozele de celule pentru fiecare model de tumoare astfel, pentru a atinge 10...20% de curățare a tumorii prin NDV sau anticorpii anti-CTLA-4/anti-PD-1 în calitate de agenți solitari. Pentru experimentele de evaluare a eficienței terapiei combinate NDV de tip sălbatic (NDV-WT) cu blocatori ai punctelor de control imune, tumorile B16F10s-au implantat prin injectarea a 2×10^5 celule B16F10 în flancul drept în ziua 0 și 5×10^4 celule în flancul stâng în ziua 4. În zilele a 7, 10, 13 și a 16 șoarecilor se administră 4 injecții intratumorale cu 2×10^7 pfu de NDV în PBS într-un volum total de 100 μ l. Totodată, în zilele a 7, 10, 13 și a 16 șoarecilor li s-au efectuat 4 injecții 25 intraperitoneale de anticorpi anti-CTLA-4 (100 μ g) sau de anticorpi anti-PD-1 (250 μ g). Grupurile de control au primit o doză corespunzătoare de anticorp izotip și o injecție intratumorală de PBS. Mărimea tumorii și răspândirea ei au fost monitorizate prin măsurare cu un șubler.

Pentru modelul TRAMP-C2, 5×10^5 de celule au fost implantate în flancul drept în ziua 0 și 30 5×10^5 celule au fost implantate în flancul stâng în ziua 8. Tratamentul cu injecții a fost efectuat în zilele a 11, 14, 17 și a 20 analogic metodei descrise mai sus.

Pentru experimentele de evaluare a eficienței NDV recombinant, care exprimă ICOSL (NDV-ICOSL), tumorile B16F10 s-au implantat prin injectarea 2×10^5 celule B16F10 în flancul drept intracutanat în ziua 0 și 1×10^5 celule în flancul stâng în ziua 4. Tratamentul a fost efectuat 35 cum este descris mai sus.

Pentru modelul CT26, tumorile s-au implantat prin injectarea 1×10^6 celule CT26 în flancul drept intracutanat în ziua 0 și 1×10^6 celulele în flancul stâng în ziua 2. Tratamentul a fost efectuat cum este descris mai sus în zilele a 6, 9 și a 12.

Izolarea limfocitelor care infiltrează tumoarea

Tumorile B16F10 au fost implantate prin injectare intracutanat a 2×10^5 celule B16F10 în 40 flancul drept în ziua 0 și 2×10^5 celule în flancul stâng în ziua 4. În zilele a 7, 10 și a 13 șoarecilor s-au introdus cu 3 injecții intratumorale 2×10^7 pfu de NDV și intraperitoneal 100 μ g de anticorpi anti-CTLA-4 sau 250 μ g de anticorpi anti-PD-1, în cazul în care se specifică. În ziua a 15 șoarecii au fost sacrificați prin inhalare de CO₂. Tumorile și tumorile de drenare ale ganglionilor limfatici 45 au fost îndepărtate cu ajutorul forcepsului și foarfecelor chirurgicale și cântărite. Tumorile din fiecare grup au fost mărunțite cu foarfeca înainte de incubare cu 1,67 unități de Wünsch/ml de Liberase și 0,2 mg/ml de ADNază timp de 30 min la 37°C. Tumorile au fost omogenizate prin pipetare repetată și filtrate printr-un filtru de nailon cu dimensiunea porilor de 70 μ m. Suspensiile de celule au fost spălate o dată cu mediu RPMI complet și purificate într-un gradient Ficoll pentru 50 a elimina celulele moarte. Celulele din ganglionii limfatici de drenaj ai tumorii au fost izolate prin măcinarea ganglionii limfatici printr-un filtru de nailon cu dimensiunea porilor de 70 μ m.

Citometria în flux

Celulele, izolate din tumori sau din ganglionii limfatici care drenează tumorile, au fost prelucrate pentru marcarea suprafeței cu mai multe seturi pentru colorare din câțiva anticorpi 55 pentru CD45, CD3, CD4, CD8, CD44, PD-1, ICOS, CD11c, CD19, NK1.1, CD11b, F4/80, Ly6C și Ly6G. Colorantul de fixare pentru celulele viabile eFluor780 (eBioscience) a fost folosit pentru a distinge celulele vii. Apoi celulele au fost permeabilizate folosind FoxP3 de fixare și kitul de permeabilizare (eBioscience) și colorate pentru detectarea Ki-67, FoxP3, Granzimei B, CTLA-4 și

IFN gamma. Datele au fost obținute folosind citometrul de flux LSRII (BD Biosciences) și analizate cu software Flow Jo (Treestar).

Purificarea și încărcarea DC

Splinele de la șoareci netratați anterior au fost izolate și tratate cu 1,67 unități Wünsch/ml de liberază și 0,2 mg/ml de ADNază timp de 30 min la 37°C. Suspensiile de celule rezultate au fost filtrate printr-un filtru de nailon cu dimensiunea porilor de 70 μm și spălate o dată cu mediu RPMI complet. Celulele dendritice CD11c+ au fost purificate prin selecție pozitivă utilizând particule magnetice Miltenyi. Celulele dendritice izolate au fost cultivate peste noapte cu GM-CSF recombinant și lizate tumorale B16-F10 și au fost purificate în gradient de ficol.

Analiza sintezei citokinelor

Suspensiile de celule din tumori și din ganglionii limfatici, care drenează tumorile, au fost comasate și îmbogățite pentru creșterea conținutului de celulele T, utilizând un kit de purificare a celulelor T Miltenyi. Celulele T izolate au fost numărate și cocultivate timp de 8 ore cu celule dendritice, încărcate cu lizate celulare tumorale B16-F10 în prezența a 20 U/ml de IL-2 (R&D), plus Brefeldin A (BD Bioscience). După restimulare, limfocitele au fost prelucrate pentru citometrie în flux, cum s-a descris mai sus.

Statistică

Datele au fost analizate prin criteriul bilateral Student și $P < 0,05$ a fost considerat a fi statistic semnificativ.

Rezultate

Pentru a caracteriza răspunsul imun anti-tumoral, indus de virusul bolii de Newcastle (NDV), s-a evaluat expresia moleculelor MHC I și MHC II, precum și ICAM-1 pe suprafața celulelor infectate *in vitro*. Așa cum se arată în fig. 1, infecția cu NDV a celulelor de melanom B16 activează expresia moleculelor MHC de clasa I și moleculelor MHC de clasa II, precum și a moleculelor de adeziune ICAM-1, acestea fiind considerate a fi importante pentru recrutarea limfocitelor specifice tumorii și activarea răspunsului imun antitumoral. Apoi răspunsul imun antitumoral, indus de infecția cu NDV *in vivo*, a fost evaluat într-un model murin de melanom și crearea un model bilateral de flanc, care a permis monitorizarea răspunsurilor atât în tumorile injectate cu virus, cât și în tumorile la distanță, în care nu s-a injectat virusul. Așa cum se arată în fig. 2, în tumorile infectate cu virus se constată o infiltrare semnificativă cu celule imune, cum ar fi celulele NK, macrofage și celule CD8 și CD4, dar nu cu celulele T reglatoare. Deoarece o parte a acestui răspuns imun poate fi un răspuns la virus, decât la tumoare, s-a evaluat răspunsul imun în raport cu tumoarea colaterală (fig. 3). Urmează de remarcat, că aceste tumori au demonstrat un grad similar de creștere a infiltrației cu celule CD8 și CD4 efectoare, dar nu cu celule T reglatoare. Analiza acestor celule a arătat, că ele stimulează activarea, proliferarea și expresia markerilor de liză (fig. 4). Monoterapia cu NDV a fost eficientă în controlul tumorilor tratate (fig. 5A), dar numai nesemnificativ încetinește creșterea tumorilor contralaterale (fig. 5B). Șoarecii, care s-au vindecat de tumori, însă, au demonstrat un anumit grad de protecție împotriva altei provocări cu tumoare (fig. 5D), ceea ce atestă că terapia cu NDV poate induce o imunitate de lungă durată.

În continuare a fost evaluată posibilitatea direcționării mecanismelor suplimentare pentru a amplifica efectul antitumoral, generat de NDV. Caracterizarea limfocitelor, care infiltrază tumoarea, atât din cele injectate cu NDV, cât și din tumorile neinjectate, a relevat activarea receptorului inhibitor CTLA-4 asupra limfocitelor (fig. 6). Apoi s-a evaluat dacă inhibarea receptorului CTLA-4 poate avea ca rezultat o eficacitate terapeutică mai bună a NDV. În mod surprinzător, terapia combinată a condus la respingerea tumorilor bilaterale la majoritatea animalelor, un efect care nu a fost observat la administrarea fiecărui dintre aceste tratamente în monoterapie (fig. 7). Acest efect a fost prezent chiar și atunci când a fost utilizat modelul de adenocarcinom de prostată TRAMP, care nu este susceptibilă la infecția virală (fig. 8). Aceste rezultate atestă, că replicarea virală minimă și răspunsul inflamator rezultat s-au dovedit a fi suficiente pentru generarea unei imunități antitumorale de protecție.

Pentru a determina dacă acțiunea asupra alte puncte de control imune în asociere cu terapia cu NDV ar putea fi benefică, a fost evaluat efectul asupra căii PD-1 - PD-L1, după infecția cu NDV. Așa cum este prezentat în fig. 9, celulele tumorale infectate cu NDV, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, au avut activarea expresia ligandului inhibitor PD-L1 la suprafața celulelor. Acest efect nu a fost doar un rezultat al unei injecții directe de virus, deoarece a fost observat, de asemenea, când celulele neinfectate au fost tratate cu supernatante inactivare cu UV din celulele infectate cu virus (fig. 9b), precum și tumorile contralaterale neinfectate (fig. 9c). Aceasta a determinat realizarea unui studiu al terapiei combinate cu ndv și anticorpi anti-PD-1. Similar cu blocatorul CTLA-4, terapia cu NDV în combinație cu anticorpi anti-PD-1 într-un model de melanom B16 agresiv a

condus la vindecarea majorității animalelor, un efect care a fost asociat cu creșterea infiltrației tumorii cu limfocite efectoare activate (fig. 10).

De-a lungul studiilor efectuate, eficacitatea terapeutică a unei terapii combinate se reducea atunci, când provocarea cu tumori se făcea într-un număr mai mare. Apoi s-a realizat evaluarea markerilor de activare, care ar putea asigura un răspuns mai bun și ar putea fi deveni o țintă pentru îmbunătățirea în continuare a eficacității terapeutice. Analiza limfocitelor, izolate din tumori și din ganglionii limfatici care drenează tumorile, a identificat expresia moleculei costimulatoare ICOS, ca unul dintre markerii de activare la animalele tratate (fig. 11). Anterior s-a arătat, că activarea expresiei ICOS se asociază cu răspunsuri terapeutice mai îndelungate și creșterea supraviețuirii la pacienții tratați cu terapie cu anticorpi anti-CTLA-4 pentru melanom malign. S-a evaluat dacă expresia intratumorală a ligandului ICOS (ICOSL) ar putea amplifica suplimentar răspunsul terapeutic într-o terapie combinată. Utilizarea abordării “geneticii inverse” pentru NDV, au fost generate NDV care exprimă ICOSL murin (NDV-ICOSL). Caracterizarea *in vitro* a acestui virus a arătat, că acesta posedă proprietăți replicative și litice similare cu proprietățile tulpinii parentale NDV (fig. 12). La testarea *in vivo*, însă, cu o provocare cu tumoarea B16 într-un număr mai mare, NDV-ICOSL demonstrat un avantaj semnificativ față de virusul parental NDV atunci, când este utilizat în asociere cu blocatorul CTLA-4, cu supraviețuirea pe termen lung la majoritatea animalelor tratate (fig. 13). Acest efect nu s-a limitat la melanomului B16 și a fost demonstrat pentru carcinomul de colon CT26 la șoarecii din linia Balb/C, sugerând că această strategie terapeutică ar putea fi traductibilă la diferite tipuri de tumori (fig. 14). Analiza tumorilor B16 de la animalele tratate a demonstrat infiltrarea lor semnificativă cu diferite subtipuri de celule imune, care exprimă markerii de activare (fig. 15 și 16). Aceste limfocite au fost specifice tumorale și a demonstrat secreția IFN gamma ca răspuns la stimularea cu celule dendritice, încărcate cu lizate tumorale (fig. 17). În cele din urmă, animalele care au fost vindecate de tumorile lor B16 sau CT26 au fost reprovocate cu celule tumorale și a fost demonstrată protecția completă împotriva reprovocării tumorii (fig. 18).

Pentru ameliorarea ulterioară a expresiei ICOSL în tumoare și incorporarea ligandului în virion, a fost proiectată o proteină himerică care constă din domeniul extracelular al ICOSL (aminoacizii 1...277) și domeniile transmembranare și intracelulare ale proteinei F a NDV (aminoacizii 501...554) (fig. 19A). Transfecția constructului rezultat în celulele B16-F10 a condus la exprimare crescută a ligandului himeric ICOSL-F pe suprafața celulelor transfectate, în comparație cu celulele transfectate cu ICOSL nativ, sugerând că mecanismele de reglementare, care administrează transportul de proteină F a NDV pe suprafață, pot fi utilizate pentru a crește expresia de suprafață a liganzilor imunostimulatori (fig. 19B).

În general, aceste studii demonstrează, că 1) combinația NDV cu anticorpi, care reglează cu punctele de control imune, poate fi folosită ca o strategie pentru a evita limitările atât ale terapiei cu virusul oncolitic, cât și terapiei cu anticorpi și 2) expresia liganzilor imunostimulatori ai NDV poate îmbunătăți suplimentar eficacitatea terapeutică a acestui virus, în special la utilizare în combinație cu anticorpi imunoregulatori. Aceste concluzii au aplicare clinică.

Exemplul 2

Acest exemplu demonstrează răspunsurile imune antitumorale, induse de NDV oncolitic, și răspunsurile imune antitumorale, induse de NDV în combinație cu blocatori ai CTLA-4.

Materiale și metode

Șoareci

Șoarecii din linia Balb/C și șoarecii din linia C57BL/6J au fost achiziționați de la Jackson Laboratory. Șoarecii IFNAR-/- în baza liniei C57BL/6J au fost oferiți de Dr. Eric Pamer. Șoarecii transgenici Pmel-1 și Trp-1 TCR au fost descriși (Overwijk et al. J. Exp. Med., no 198, 2003, p. 568; Muransky et al. Blood, no 112, 2008, p. 362) și au fost furnizați de N. Restifo (National Cancer Institute, Bethesda, MD). Șoarecii TRP1 au fost încrucișați cu șoarecii CD2:luciferază, oferiți de Patrick Hwu de la MD Anderson Cancer Center (Houston, TX) pentru a obține șoareci TRP1 Luciferasa⁺ (TRP1-Fluc). Toți șoarecii au fost menținuți în cuști Micro-Isolator® și tratați în conformitate cu cerințele normative ale Institutului Național de Ocrotire a Sănătății al SUA și Asociației Americane de îngrijire a animalelor de laborator. Toate procedurile și experimentele cu șoareci, realizate în acest studiu, au fost aprobate de către Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Institutional Animal Care și Use Committee.

Liniile celulare

Liniile celulare murine de melanom (B16-F10) și carcinom de colon (CT26 și MC38) au fost menținute în mediu RPMI suplimentat cu 10% ser fetal de vițel și penicilină cu streptomycină. Linia celulară murină de cancer de prostată TRAMP-C2 a fost menținută în mediu DMEM

suplimentat cu 5% ser fetal de vițel (FCS; Mediatech, Inc.), 5% Nu Serum IV (BD Biosciences) HEPES, 2-ME, penicilină/streptomycină, L-glutamină, 5 µg/ml insulină (Sigma) și 10 mmol/l DHT (Sigma).

Anticorpi

Anticorpii monoclonali terapeutici anti-CTLA-4 (clona 9H10), anti-PD-1 (clona RMP1-14) și anti-PD-L1 (clona 9G2), anti-CD8 (clona 2,43), anti-CD4 (clona GK1.5), anti-IFN-gamma (clona XMGI.2) și anti-NK1.1 (clona PK136) au fost produși de BioXcell. Anticorpii, utilizați pentru citometrie în flux, au fost achiziționați de la eBioscience, Biolegend, Invitrogen și BD Pharmingen.

Virusurile și clonarea

Tulpina lentogenică recombinantă NDV LaSota a fost utilizată în toate experimentele. Pentru a genera virusul NDV, care exprimă ICOSL murin, un fragment de AND, care codifică ICOSL murin, flancat cu semnalele transcripționale NDV-specifice ale ARN, a fost inserat în locusul de recunoaștere a restricției SacII, creat între genele P și M ale constructului pT7NDV/LS. Virusurile erau salvate din ADNc, folosind metodele descrise anterior și ordonate cu PCR cu transcripție inversă pentru identificarea corectitudinii inserției. Titrurile de virus au fost determinate prin diluții în serie și imunofluorescență în celulele Vero. Constructul de fuziune recombinant ICOSL-F a fost generat prin amplificare PCR a ADN ICOSL, care codifică domeniul extracelular (aminoacizii 1...277) cu locii de flancare a restricției EcoRI și MluI, și ADN F NDV, care codifică domeniile transmembranar și intracelular ale proteinei F (aminoacizii 501...554) cu loci de restricție care flanchează MluI și XhoI. Fragmentele de ADN rezultate au fost inserate împreună în vectorul pCAGGS utilizând ligaturarea a trei părți. Constructul fuzionat recombinant CD28scfv-F antimurine a fost generat prin amplificare PCR a cADN, care codifică anti-CD28scfv de hamster cu locii de flancare de restricție EcoRI și MluI, și ADN F NDV, care codifică domeniile transmembranare și intracelulare ale proteinei F (aminoacizii 501...554) cu locii de restricție de flancare MluI și XhoI. Fragmentele de ADN rezultate au fost inserate în vectorul pCAGGS utilizând ligaturarea a 3 părți și apoi subclonarea în vectorul pNDV între genele P și M. Pentru a genera virusuri recombinante, care exprimă alte proteine himerice (HN-GITRL, HN-4-1BBL, HN-CD40L, HN-OX40L), ADNc, care codifică domeniul extracelular al fiecărei gene (fig. 44), a fost amplificat cu primeri specifici de genă cu loci de restricție de flancare EcoRI și MluI, și domeniul transmembranar și intracelular al proteinei HN a fost amplificat cu primeri specifici cu loci de restricție de flancare MluI și XhoI. Genele himerice complete împreună au fost inserate în vectorul pCAGGS utilizând ligaturarea a 3 părți și apoi subclonate în vectorul pNDV între genele P și M. Informația detaliată despre fiecare construct himeric este prezentată în fig. 44. Pentru a genera un NDV recombinant, care codifică IL-2, IL-15 și IL-21, ADNc pentru fiecare genă a fost amplificat cu primeri specifici de genă cu loci de restricție de flancare SacII și apoi clonat în vectorul pNDV între genele P și M. Virusii au fost salvați din ADNc, folosind metodele descrise anterior, și ordonate cu PCR de transcripție inversă pentru determinarea corectitudinii inserției. Titrurile de virusuri au fost determinate prin diluție în serie și imunofluorescență în celule Vero.

Experimentele cu infectare *in vitro*

Pentru marcarea suprafeței celulele au fost infectate în trei repetări pe plăci cu 6 godeuri la MOI egal cu 2 (B16-F10) sau MOI egal cu 5 (TRAMP C2). Peste douăzeci și patru de ore celulele au fost colectate prin răzuire mecanică și prelucrate pentru marcarea suprafeței și cuantificarea prin citometrie în flux. Pentru experimentele de citotoxicitate *in vitro* celulele au fost infectate la MOI indicat și incubate la 37°C într-un mediu fără ser în prezența a 250 ng/ml de TPCK tripsină. Peste 24, 48, 72 și 96 de ore după infectare celulele au fost spălate și incubate cu 1% Triton X-100 la 37°C pentru 30 de min. Activitatea LDH în lizate s-a determinat folosind kitul de analiză Cytotox 96 (Promega), în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

Experimentele de supraviețuire la infectarea cu tumoare

Modelele cu tumori bilaterale pe flancuri au fost obținute pentru a monitoriza eficacitatea terapeutică în ambele tumori, atât cea injectată, cât și sistemică. Au fost stabilite scheme de tratament și dozele de celule pentru fiecare model de tumoare astfel, pentru a atinge 10-20% de curățare a tumorii prin NDV sau anticorpii anti-CTLA-4/anti-PD-1 în calitate de agenți solitari. Pentru experimentele de evaluare a eficienței terapiei combinate NDV anticorpi anti-CTLA-4, tumorile B16F10 s-au implantat prin injectarea intracutanată a 2×10^5 celule B16F10 în flancul drept în ziua 0 și 5×10^4 celule în flancul stâng în ziua 4. În zilele a 7, 9, 11 și a 13 șoarecilor se administră injecții intratumorale cu 2×10^7 pfu de NDV în PBS într-un volum total de 100 µl. Totodată, în zilele a 7, 9, 11 și a 13 șoarecilor s-au efectuat 4 injecții intraperitoneale de anticorpi anti-CTLA-4 (100 µg), de anticorpi anti-PD-1 (250 µg) sau de anticorpi anti-PD-L1 (250 µg).

Grupurile de control au primit intraperitoneal o doză corespunzătoare de anticorp izotip și o injecție intratumorală de PBS. Animalele erau sacrificate după semnele de inanție sau când mărimea tumorii atingea 1000 mm³. Pentru eliminarea celulelor imune șoarecilor li s-a administrat intraperitoneal 500 μg de anticorpi monoclonali anti-CD8+, CD4+, NK.1.1 sau IFNγ cu o zi până

5 la și peste două zile după provocare cu tumoare cu injectarea ulterioară a 250 μg la fiecare 5 zile pe parcursul experimentului.

Pentru modelul TRAMP-C2, 1x10⁶ de celule au fost implantate în flancul drept în ziua 0 și 5x10⁵ celule au fost implantate în flancul stâng în ziua a 4. Tratamentul cu injecții a fost efectuat în zilele a 7, 10, 13 și a 16 analogic metodei descrise mai sus.

10 Pentru modelul CT26, tumorile s-au implantat prin injectarea 1x10⁶ celule CT26 în flancul drept intracutanat în ziua 0 și 1x10⁶ celulele în flancul stâng în ziua a 2. Tratamentul a fost efectuat cum este descris mai sus în zilele a 6, 9 și a 12.

Pentru experimentele de evaluare a eficienței NDV recombinant, care exprimă ICOSL, 4-1BBL, OX40L, CD40L, GITRL, anti-CD28scfv, IL-2, IL-15 și IL-21 (NDV-trangenic), tumorile 15 B16F10 s-au implantat prin injectarea 2x 0⁵ celule B16F10 în flancul drept intracutanat în ziua 0 și 1x10⁵ celule în flancul stâng în ziua a 4. Concomitent, în zilele a 7, 9, 11 și a 13 șoarecilor li s-a administrat intraperitoneal anticorpi anti-CTLA-4 (100 μg), anticorpi anti-PD-1 (250 μg) sau anticorpi anti-PD-L1 (250 μg).

Izolarea limfocitelor Trp1 și Pmel și transferul adoptiv

20 Splinele și ganglioni limfatici de la șoarecii transgenici au fost izolate și fărâmițate prin filtre de nailon cu dimensiunea porilor de 70 μm. Celulele CD4+ și CD8+ au fost purificate prin selecție pozitivă utilizând particule magnetice Miltenyi.

Celulele Trp1 sau Pmel izolate au fost injectate la animale recipient prin vena caudal, conform schemei menționate în cantitate de 2,5x10⁴ celule per șoarece și 1x10⁶ celule per șoarece, 25 respectiv.

Experimente cu transfer de ser

Grupurile de șoareci purtători de tumori au fost tratate intratumoral cu o injecție unică de NDV în PBS. În ziua a patra sângele a fost colectat prin sângerare terminală și serul a fost izolat prin centrifugare. Serurile au fost colectate de la fiecare grup și tratate cu UV în dispozitivul 30 Stratalinker 1800 cu șase impulsuri de raze UV cu o energie de 300 mJ/cm² pentru a inactiva orice virus, care ar putea fi prezent. 100 μl de ser nediluat a fost injectat intratumoral șoarecilor purtători de tumori B16-F10, anterior netratați, un total de 3 injecții odată la două zile. Tumorile au fost îndepărtate peste 3 zile după ultima injecție și prelucrate pentru izolarea limfocitelor, care infiltrează tumoarea, cum este descris în continuare.

Vizualizarea bioluminescentă

Vizualizarea șoarecilor s-a efectuat la fiecare 2...3 zile începând cu ziua 6. Șoarecilor s-a injectat retroorbital 50 μl de soluție de D-luciferină (Caliper Life Sciences) în PBS cu concentrație de 40 mg/ml și imediat se realiza vizualizarea cu sistemul de vizualizare IVIS (Caliper Life Sciences). Imaginile fotografice alb-negre și imaginile color bioluminescente au fost suprapuse, 40 folosind programul de suprapunere The Living Image, versiunea 4.0 (Caliper Life Sciences). Regiune de interes (ROI) a fost selectată manual deasupra tumorii, menținând zona ROI constantă.

Izolarea limfocitelor, care infiltrează tumorile

Tumorile B16-F10 au fost implantate prin injectarea intracutanat a 2x10⁵ celule B16-F10 în flancul drept în ziua 0 și 2x10⁵ celule în flancul stâng în ziua 4. În zilele a 7, 9 și a 11 șoarecii au 45 fost tratați cu injecții intratumorale de 2x10⁷ pfu de NDV și intraperitoneal anticorpi anti-CTLA-4 sau anti-PD-1, unde se specifică. Un număr mic de animale, care au murit din cauza încărcăturii tumorale (întotdeauna grupurile martor netratate) sau de animale care complet s-au vindecat de tumori (întotdeauna în grupurile de tratament) nu a fost utilizat pentru analiză. În ziua a 15 șoarecii au fost sacrificați și tumorile și ganglionii limfatici care drenează tumorile au fost îndepărtați 50 utilizând un forceps și foarfece chirurgicale și apoi cântărite. Tumorile din fiecare grupă au fost mărunțite cu foarfece înainte incubării cu 1,67 U Wünsch/ml Liberază și 0,2 mg/ml ADNază pentru 30 de min la 37°C. Tumorile s-au omogenizat prin pipetare repetată și s-au filtrat printr-un filtru de nailon cu dimensiunea porilor de 70 μm. Suspensiile de celule au fost spălate o dată cu mediu RPMI complet și purificate cu un gradient Ficoll pentru eliminarea celulelor moarte. 55 Celulele din ganglionii limfatici de drenaj ai tumorii au fost izolate prin mărunțirea ganglionii limfatici printr-un filtru de nailon cu dimensiunea porilor de 70 μm.

Citometria în flux

Celulele, izolate din tumori sau din ganglionii limfatici care drenează tumorile, au fost prelucrate pentru marcarea suprafeței cu mai multe seturi pentru colorare din câțiva anticorpi

pentru CD45, CD3, CD4, CD8, CD44, PD-1, ICOS, CD11C, CD19, NK1.1, CD11B, F4/80, Ly6C și Ly6G. Colorantul de fixare pentru celulele viabile eFluor780 (eBioscience) a fost folosit pentru a distinge celulele vii. Apoi celulele au fost permeabilizate folosind Foxp3 de fixare și kitul de permeabilizare (eBioscience) și colorate pentru detectarea Ki-67, Foxp3, Granzimei b, CTLA-4 și IFN gamma. Datele au fost obținute folosind citometrul de flux LSRII (BD Biosciences) și analizate cu software Flow Jo (Treestar).

Purificarea și încărcarea DC

Splinele de la șoareci netratați anterior au fost izolate și tratate cu 1,67 unități Wünsch/ml de liberază și 0,2 mg/ml de ADNază timp de 30 min la 37°C. Suspensiile de celule rezultate au fost filtrate printr-un filtru de nailon cu dimensiunea porilor de 70 μm și spălate o dată cu mediu RPMI complet. Celulele dendritice CD11c+ au fost purificate prin selecție pozitivă utilizând particule magnetice Miltenyi. Celulele dendritice izolate au fost cultivate peste noapte cu GM-CSF recombinant și lizate tumorale B16-F10 și au fost purificate în gradient de ficol.

Analiza sintezei citokinelor

Suspensiile de celule din tumori și din ganglionii limfatici, care drenează tumorile, au fost comasate și îmbogățite pentru creșterea conținutului de celulele T, utilizând un kit de purificare a celulelor T Miltenyi. Celulele T izolate au fost numărate și cocultivate timp de 8 ore cu celule dendritice, încărcate cu lizate celulare tumorale B16-F10 în prezența a 20 u/ml de IL-2 (R&D), plus brefeldin A (BD Bioscience). După restimulare, limfocitele au fost prelucrate pentru citometrie în flux, cum s-a descris mai sus.

Imunofluorescența și microscopia

Tumorile au fost disecate de la șoareci, spălate cu PBS, fixate în 4% paraformaldehidă și tratate pentru parafinare, în conformitate cu protocoalele descrise anterior. Secțiunile au fost tăiate utilizând un microtom, aranjat pe plăcuțe, și prelucrate pentru colorare cu hematoxilină și eozină (H & E) sau cu anticorpi anti-CD3 și anti-FoxP3. Secțiunile au fost analizate cu microscop pe Zeiss Axio 2 cu camp larg, folosind obiective 10x și 20x.

Statistică

Datele au fost analizate prin criteriul bilateral Student (pentru compararea a 2 grupuri) și ANOVA, după caz. Datele pentru supraviețuire au fost analizate prin criteriul de rang logaritmic (Mantel-Cox). P față-verso <0,05 a fost considerat statistic semnificativ ($P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***), $P \leq 0,0001$ (****)).

Rezultate

Replicarea NDV limitată de tumoarea injectată

A fost caracterizată cinetica de distribuție virală la administrarea intratumorală și sistemică a NDV. Injecție intratumorală de NDV recombinant, care exprimă construcția reporter cu luciferază (NDV-Fluc), a condus la un semnal mai stabil de luciferază în tumoarea de flank injectată, în timp ce administrarea sistemică a virusului nu a condus la nici un semnal de luciferază detectabil în tumoare (fig. 20A). Deoarece sistemul limitat de livrare sistemică de virus a fost puțin probabil abil să inducă o liză tumorală și un răspuns imun suficient, injecția intratumorală de NDV a fost studiată ca un mijloc de a declanșa un răspuns imun anti-tumoral, care ar putea depăși limitările potențialului terapiei sistemice intravenoase. Astfel, pentru continuarea studiilor modelul cu boală metastatică a fost modelat cu utilizarea modelului de tumoare bilaterală pe flank B16-F10. (fig. 22A). Administrarea NDV-Fluc în tumoarea laterală dreaptă conducea la replicarea virusului în limitele tumorii injectate cu semnalul luciferazei, detectabil timp de până la 96 de ore (fig. 20B-D). Nici un virus nu a fost detectat în tumoarea contralaterală (laterală stângă) la analiza cu vizualizare luminiscentă (fig. 20B-D), prin trecere în ouă embrionate sau prin RT-PCR. Astfel, acest sistem a permis de a caracteriza răspunsurile imune atât în tumoarea injectată cu virus, cât în tumorile la distanță, care nu au fost direct afectate de acțiunea NDV.

Terapia cu NDV crește infiltrarea locală și la distanță a tumorilor cu limfocite și reține creșterea tumorii

Analiza tumorile injectate cu virus a relevat un răspuns inflamator, fapt confirmat prin infiltrarea crescută cu celule, care exprimă antigen comun leucocitar CD45 (fig. 21A-B). Infiltratele imune au fost caracterizate printr-un conținut sporit de celule din compartimentul imune înăscute, inclusiv celulele mieloide, celule NK și celule NKT (fig. 21c) și de celule imune adaptive, inclusiv CD8+ și celule convenționale CD4+FoxP3- T celule (Tconv), ceea ce conducea la o creștere semnificativă a raporturilor între CD8 și Tconv, pe de o parte, și celulele T reglatorii (Treg), pe de altă parte ($p = 0,0131$ și $p = 0,0006$, respectiv) (fig. 21D-21f). Remarcabil, că analiza tumorilor contralaterale a relevat o creștere similară în infiltratele inflamatorii (fig. 22B, C), caracterizate printr-o creștere a numărului de celule atât imune înăscute (fig. 22D), cât și de

celule T efectoare (fig. 22E, G). Este necesar de menționat, că în pofida faptului, că nu au existat schimbări majore ale numărului absolut de Treg (fig. 22G), a existat o reducere substanțială conținutului lor procentual relativ (fig. 22 E, F, H), cu o creștere marcantă a raporturilor între CD8 și Tconv, pe de o parte, și Treg, pe de altă parte ($p = 0,002$ și $p = 0,0021$, respectiv) (fig. 22I).

5 Celulele T efectoare, izolate din tumorile la distanță, aveau o expresie sporită a markerilor de activare, proliferare și liză ICOS, Ki-67 și Granzima B, respectiv (figura 22J, K). Ca și anterior, virus sau ARN viral a putut fi izolat din tumorile la distanță, sugerând faptul că modificările observate în micromediul tumorii la distanță nu s-au datorat nemijlocit infecției virale. În scopul de a exclude în continuare posibilitatea de propagarea virală locală nedetectabilă, tumorile au fost

10 implantate în alte locuri îndepărtate, cum ar fi tumorile bilaterale pe lăbuțele posterioare, obținând, însă, rezultate similare (fig. 23).

În concordanță cu efectul inflamator observat, administrarea intratumorală a NDV a condus la reținerea creșterii nu numai a tumorilor injectate, dar și a tumorilor contralaterale, rezultând cu supraviețuire mai îndelungată a animalelor (fig. 22L, M). Pentru a determina dacă acest efect nu a

15 fost trecător și dacă este posibilă o protecție antitumorală de lungă durată, șoarecilor cu o singură tumoare de flanc unilaterală B16-F10 s-a administrat intratumoral NDV și la supraviețuitorii pe termen lung au fost injectate celule B16-F10 pe flancul opus. Majoritatea animalelor au demonstrat întârzierea creșterii tumorii, iar 30% dintre animale au respins complet celulele administrate, sugerând că terapia intratumorală cu NDV poate induce într-adevăr un răspuns

20 anamnestic antitumoral de protecție (fig. 25).

NDV induce infiltrația și înmulțirea limfocitelor specifice tumorii

Pentru a determina dacă răspunsul imun antitumoral a fost dependent de tipul de tumoare injectată cu NDV sau este un rezultat al inflamației nespecifice, generate de infecția cu NDV, experimentul a fost efectuat cu tumori heterologe (carcinom de colon MC38 și melanom B16-F10)

25 implantate în flancuri opuse (fig. 24A). Pentru a urmări limfocitele tumorale specifice, celulele transgenice CD8+, care exprimă în calitate de marcaj receptorul celular T congen (Pmel) sau celulele CD4+ marcate cu luciferază (Trp1), care recunosc antigenele de diferențiere a melanomului gp100 (Pmel) și Trp1 (Trp1) au fost transferate adoptiv (Muransky et al. Blood, no 112, 2008, p. 362; Overwijk et al. J Exp Med, no 198, 2003, p. 569). Pentru a măsura cinetica distribuirii și extinderii celulelor Trp1 adoptiv transferate s-a utilizat vizualizarea bioluminescentă. Transferul de celule Trp1 la animale purtătoare de tumori tratate cu PBS nu a produs acumularea de Trp1 în tumori, evidențiind natura foarte imunosupresoare a micromediului tumorii în acest model (fig. 24B-D). Injecție de NDV în tumorile B16-F10 a condus la o creștere semnificativă a

30 semnalului luciferazei în tumorile injectate (fig. 24B-D), indicând expansiunea celulelor T Trp1 (aria de sub curbă (AUC) $p = 0,0084$). Remarcabil, că o expansiune similară a fost observată în tumoarea contralaterală, deși cu întârziere ($p = 0,0009$) (fig. 24B-D). Spre deosebire de aceasta, injectarea NDV în tumorile MC38 nu a reușit să inducă o infiltrare substanțială Trp1 în tumorile MC38 injectate sau în tumorile B16-F10 la distanță (fig. 24B-D), sugerând că infiltrarea limfocitelor specifice tumorilor a tumorilor la distanță este, probabil, dependentă de identitatea

40 antigenică a tumorii injectate. În mod similar, injecția intratumorală de NDV a condus la o infiltrare sporită de celule Pmel în tumorile la distanță, care a fost mai pronunțată la injectare în cazul tumorii B16-F10, decât la injectare în cazul tumorii MC38 (fig. 24E).

Este necesar de menționat, că deși infiltrarea tumorii B16-F10 la distanță cu limfocite adoptive transferate a fost dependentă de identitatea tumorii injectate, tumorile la distanță a

45 demonstrat o infiltrație imună sporită chiar și atunci când tumoarea primar injectată era MC38 (fig. 24F), sugerând că o componentă a răspunsului inflamator nespecific poate, de asemenea, juca rolul său. În plus, serul de la animalele tratate cu NDV, prelucrat cu iradiere UV pentru a inactiva orice virus potențial, induce infiltrarea tumorii cu leucocite atunci când era injectat intratumoral la șoarecii netratați purtători de tumori B16-F10 (fig. 24G, H), totodată, creșterea de bază s-a

50 remarcat pentru celulele NK și CD8+ ($p = 0,0089$ și $p = 0,0443$, respectiv) (fig. 24I).

NDV și blocatorii CTLA-4 exercită acțiune sinergică pentru a respinge tumorile locale și la distanță

În pofida unui răspuns inflamator marcant și reținerea creșterii în tumorile la distanță, respingere completă a tumorilor contralaterale, legată cu o supraviețuire îndelungată, a fost

55 observată doar la aproximativ 10% din animale (fig. 22M), ceea ce sugerează existența unor mecanisme imunosupresoare active în micromediul tumorii. Studiarea tumorii injectate cu NDV și tumorilor la distanță a relevat activarea CTLA-4 pe celulele T care infiltrează tumoarea (fig. 26), ceea ce atestă, că inflamația indusă de NDV în tumoare poate face tumoarea sensibilă la terapia sistemică cu blocatori CTLA-4. Remarcabil, că terapia combinată NDV cu anticorpi anti-CTLA-4

(fig. 27A) a condus la respingerea tumorilor bilaterale și supraviețuirea pe termen lung la majoritatea animalelor - efect care nu a fost observat la utilizarea fiecărei din aceste terapii pentru tratament în monoterapie (fig. 27B-D). Pentru a determina durata protecției observate, animalele care au supraviețuit au fost injectate în flancul drept în ziua a 90 cu celule B16-F10 fără vreo
 5 terapie suplimentară. Animalele, tratate cu terapie combinată cu NDV și anticorpi anti-CTLA-4 au demonstrat o protecție de 80% de tumorile reprovocate, comparativ cu protecția de 40% la animalele tratate doar cu anticorpi anti-CTLA-4 (fig. 27E).

Terapia combinată NDV și blocatori CTLA-4 este eficientă împotriva tumorilor nepermissive pentru virus

10 Pentru a determina dacă această strategie de tratament ar putea fi extinsă la alte tipuri de tumori, strategia a fost evaluată pe un model adenocarcinom de prostată cu imunogenitate redusă TRAMP C2. Similar cu modelul B16-F10, terapia combinată a provocat regresia tumorilor injectate (fig. 27F) și fie reținea extinderea tumorilor la distanță, sau conducea la regresia completă a tumorilor la distanță cu prelungirea supraviețuirii pe termen lung (fig. 27F, G). Este necesar de
 15 menționat, că în timp ce celulele B16-F10 au fost sensibile la liza NDV mediată *in vitro*, celulele TRAMP C2 au manifestat un grad înalt de rezistență cu o citotoxicitate redusă, observată la o multiplicare a infecției (MOI) de până la 10 (fig. 27H). În ambele linii celulare, infecția cu NDV *in vitro* conducea la activarea de suprafață a MHC și moleculelor costimulatoare (fig. 27I-K). Moleculele de MHC de clasa I în mod egal erau activate în toate celulele, chiar dacă nu toate
 20 celulele se infectează cu NDV la MAI egal cu 1. Cercetările anterioare au demonstrat, că NDV induce expresia IFN de tip 1 în celulele B16-F10 (Zamarin et al. Mol. Ther., no 17, 2009, p. 697). Se știe, că ambele tipuri de IFN (Dezfouli et al. Immunol. Cell. Biol., no 81, 2003, p. 459; Seliger et al. Cancer Res., no 61, 2001, p. 1095) activează expresia moleculelor MHC de clasa I pe suprafața celulelor B16-F10, sugerând că în cazul tumorilor infectate aceste mecanisme pot juca
 25 un rol suplimentar în intensificarea imunogenității tumorii. Astfel, aceste rezultate atestă, că sensibilitatea *in vitro* a lizei mediate de virus nu este necesară pentru sensibilitatea la terapia cu NDV *in vivo* și suplimentar indică asupra importanței preponderente a răspunsului inflamator generat de virus, comparativ cu oncoliza directă în eficacitatea antitumorală observată.

Efectul antitumoral sistemic este antigen-limitat de tipul de tumoare injectată

30 Pentru a determina dacă efectul antitumoral, observat în tumoarea la distanță, a fost specific în raport cu tipul de tumoare injectat, s-a evaluat terapia combinată la animalele cu tumori B16-F10 la distanță bilaterale și la animalele cu tipuri de tumori heterologe (carcinom de colon MC38 și melanom B16-F10) implantate pe flancuri opuse (fig. 28A). Deși administrarea intracutanată a virusului în flancul drept fără tumori rezulta cu reținerea creșterii tumorii din flancul stâng, dar
 35 asigură o protecție de lungă durată și respingerea tumorii, observate la animalele care poartă tumori bilaterale B16-F10 (fig. 28B, C). În mod similar, injectarea NDV în tumorile MC38 din flancul drept la animalele cu tumori B16-F10 în flancul stâng, s-a dovedit a fi incapabilă de respingerea tumorii B16-F10 (fig. 28D, E), ceea ce atestă, că răspunsul imun antitumoral indus cu NDV este probabil, antigen-limitat de tumoarea injectată.

40 **Terapia combinată NDV și anticorpi anti-CTLA-4 induce infiltrație tumorii cu limfocite activate**

Pentru a studia micromediul tumorii B16-F10 la animalele tratate, tumorile bilaterale au fost colectate și prelucrate pentru analiza celulelor infiltrate. Analiza tumorile injectate și tumorilor la distanță de la animalele tratate a relevat infiltrate inflamatorii proeminente și zone mari de
 45 necroză tumorală la animalele tratate cu terapie combinată (fig. 30A, fig. 29). Aceasta corelează cu creșterea numărului de celule CD45 + și de celule T în grupul care a administrat tratament combinat (fig. 29A-C, fig. 30A-C). Ca și anterior, creșterea observată a cantității de TIL s-a datorat, în primul rând, infiltrației CD8+ și Tconv, dar nu Treg, ceea ce conducea la creșterea raporturilor între celulele efectoare și Treg (fig. 30D-F, fig. 29C-F). Caracteristica fenotipică a
 50 CD4+ și CD8+ TIL de la animalele care au primit tratament combinat, a demonstrat activarea ICOS, Granzimei B și Ki-67, comparativ cu animalele netratate și tratate cu anticorpi anti-CTLA-4 (fig. 30G-I), și un procent mai mare de celule CD8+, care exprimă IFN-gamma drept răspuns la restimularea cu celule dendritice (DC), activate cu lizate tumorale B16-F10 (fig. 30J).

55 **Activitatea antitumorală a terapiei combinate NDV depinde de celulele CD8+, celulele NK și de interferonii de tip I și II**

Pentru a determina care componente ale imunității celulare au fost responsabile pentru efectul terapeutic observat, tratamentul a fost repetat în prezența anticorpilor care epuizează pentru celulele CD4+, CD8+ sau NK. Depleția celulelor necesară fiecărei subset de celule a fost confirmată prin citometrie în flux a sângelui periferic (fig. 31). Eliminarea sau epuizarea celulelor

CD8+ sau NK a condus la dispariția efectului terapeutic atât în tumori cu virus injectat, cât și în tumorile la distanță (fig. 32A, B) cu reducerea semnificativă a supraviețuirii pe termen lung ($p < 0,0001$ pentru CD8 și $p < 0,0011$ pentru epuizarea NK) (fig. 32C). În concordanță cu aceste constatări, tratamentul animalelor cu un anticorp de neutralizare anti-IFN γ , de asemenea, a redus eficacitatea terapeutică. În schimb, epuizarea celulelor CD4+ nu a exercitat vre-o schimbare semnificativă a efectului antitumoral, deși aceste rezultate trebuie interpretate cu precauție, deoarece epuizarea anti-CD4+, de asemenea, conduce la epuizarea concomitentă a Treg.

Anterior a fost demonstrat, că IFN de tipul I are un rol important în amorsarea celulelor CD8+ pentru răspunsul imun antitumoral (Fuentes et al. J. Exp. Med., no 208, 2011, p. 2005; Diamond et al. J. Exp. Med., no 208, 2011, p. 1989). Pentru a investiga rolul IFN de tip I în respingerea tumorii cu participarea NDV, experimentele au fost repetate cu șoarecii cu knockout al receptorului IFN de tip I (IFNAR-/-). Șoarecii IFNAR-/- au demonstrat o evoluție rapidă a tumorilor injectate, cât și a celor contralaterale, și o rezistență completă la terapia combinată (fig. 32D-F). În general, aceste constatări subliniază rolul important al ambelor răspunsuri imune, atât a celui înăscut, cât și adaptive, pentru eficacitatea terapeutică sistemică a virusului, observată în acest studiu.

Terapia cu NDV conduce la activarea PD-L1 pe celulele tumorale și pe leucocitele, care infiltrează tumoarea

Pentru a determina dacă influența asupra altor puncte de control imun în asociere cu terapia cu NDV ar putea fi benefică, a fost apreciat efectul exercitat asupra căii PD-1 - PD-L1 după infecția cu NDV. Așa cum se arată în fig. 33, celulele tumorale infectate cu NDV, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, aveau activarea expresiei ligandului inhibitor PD-L1 pe suprafața celulelor (fig. 33A), care a fost, de asemenea, observată în tumorile la distanță neinfectate. Activarea PD-L1 nu a fost doar limitată la celulele tumorale, dar a fost, de asemenea, observată în leucocitele, care infiltrează tumoarea atât de origine înăscută, cât și adoptivă (fig. 33B).

Terapia combinată NDV cu anticorpi care blochează PD-1 și PD-L1 conduce la îmbunătățirea imunității antitumorale și supraviețuirii pe termen lung a animalelor

Combinăția de NDV cu anticorpi, care blochează PD-1 și combinăția de NDV cu anticorpi, care blochează PD-L1 au fost evaluate în modelul de melanom bilateral de flanc, descris mai sus. Remarcabil, că, în mod similar cu blocatorii CTLA-4, terapia NDV în combinație fie cu anticorpi anti-PD-1 sau cu anticorpi anti-PD-L1 a condus la creșterea supraviețuirii animalelor (fig. 34 și 35). Au fost caracterizate tumorile la distanță de la animalele tratate cu combinație de NDV și anticorpi anti-PD-1. După cum se poate observa din fig. 36, combinația de NDV intratumoral cu administrarea sistemică a blocatorului PD-1 a condus la o infiltrare semnificativă cu celule imune a tumorii la distanță, totodată, cel mai important rezultat s-a dovedit a fi creșterea cantității de celule CD8, care infiltrează tumoarea. Celulele care infiltrează exprimau marker de proliferare și liză Ki67 și Granzimă B, respectiv (fig. 37).

NDV induce activarea expresiei ICOS asupra celulelor imune CD4 și CD8, care infiltrează tumoarea în tumorile injectate cu virus și în tumorile la distanță și în ganglionii limfatici care drenează tumoarea (TDLN)

Rezultatele anterioare atestă, că combinația de NDV introdus intratumoral și administrarea sistemică a blocatorului punctelor de control imune conduce la un efect sinergic puternic al acestor două abordări terapeutice. În baza acestor rezultate, s-a studiat în continuare dacă consolidarea funcției efectoare a celulelor T în micromediul umorii printr-o cale costimulatorie relevantă poate conduce la amplificarea răspunsului imun antitumoral. Investigațiile anterioare au relevat, că activarea stabilă a expresiei costimulatorului inductibil ICOS pe suprafața celulelor T este un indicator distinct al răspunsului la blocatorul CTLA-4 la pacienți (Carthon et al. Clin. Cane. Res., no 16, 2010, p. 2861). ICOS este un omolog al CD28, exprimat pe suprafața celulelor T activate, care s-a dovedit a fi critic pentru formarea răspunsului B limfocitar, mediat de celulele T și dezvoltarea subpopulației de T helper (Simpson et al. Curr. Opin. Immunol., no 22, 2010, p. 326). Rolul ICOS în eficiența antitumorală a blocatorilor CTLA-4 a fost confirmat recent în studii pe șoareci, în care șoarecii cu deficit de ICOS au fost grav compromiși în dezvoltarea unui răspuns antitumoral la utilizarea blocatorilor CTLA-4 (Fu et al. Cancer Res., no 71, 2011, p. 5445).

Expresia ICOS în modele de tumori bilaterale de flanc, tratate cu NDV, a fost caracterizată pentru a determina dacă receptorul ar putea servi ca o țintă în aceasta abordare terapeutică. Pentru a caracteriza efectele locale și absopale ale terapiei intratumorale cu NDV, s-a utilizat modelul de melanom B16-F10 bilateral de flanc cu administrarea virusului într-o tumoare unilaterală (fig. 38A). S-a evaluat activarea markerilor, care ar putea prognoza un răspuns mai bun și ar putea fi ținte pentru îmbunătățirea ulterioară a eficacității terapeutice. Cu titlul de exemplu a fost selectat

ICOS, deoarece anterior s-a demonstrat, că activarea ICOS este asociată cu răspunsuri terapeutice mai marcante și o creștere a supraviețuirii la pacienții melanom malign, tratați cu anticorpi anti-CTLA-4. Analiza limfocitelor, izolate din tumori și din ganglionii limfatici care drenează tumoarea, a relevat activarea molecule co-stimulatoare ICOS în calitate de unul dintre markerii de

5 activare la animalele tratate (fig. 38B, C).

Generarea și evaluarea *in vitro* a virusului NDV-ICOSL

Utilizând abordările sistemului de “genetică inversă” pentru NDV, s-au obținut NDV care exprimă ICOSL murin (NDV-ICOSL) (fig. 39a). Expresia ICOSL pe suprafața celulelor infectate B16-F10 a fost confirmată prin citometrie în flux după 24 de ore după infectare (fig. 39B). *In vitro*

10 caracteristica acestui virus a arătat, că posedă proprietăți replicative (fig. 39D) și litice (fig. 39C), similare proprietăților tulpinii parentale de NDV.

NDV-ICOSL reține creșterea tumorilor la distanță și induce intensificarea infiltrării tumorii cu limfocite

Pentru a evalua eficacitatea terapeutică a NDV-ICOSL în tumorile injectate cu virus și în

15 tumorile la distanță, animalele cu tumori bilaterale B16-F10 au fost tratate cu 4 injecții intratumorale de acest virus în tumorile de flanc unilaterale. Atât NDV-ICOSL, cât și NDV de tip sălbatic au fost comparabile în capacitatea lor de a provoca regresii ale tumorilor la injectarea directă a acestui virus în tumoare (fig. 40A). Cu toate acestea, în comparație cu NDV de tip sălbatic, NDV-ICOSL conduce la o întârziere mai semnificativă a creșterii tumorii în tumorile la

20 distanță, totodată la câteva animale tumorile au lipsit un timp îndelungat (fig. 40B-C). Analiza tumorilor infectate cu virus a evidențiat creșterea infiltrației tumorale cu celule efectoare CD4 și CD8 la animalele tratate cu NDV de tip sălbatic și NDV-ICOSL, deși diferențele dintre cele două virusuri nu au fost statistic semnificative, reflectând activitatea similară a celor două virusuri împotriva tumorilor din flancul drept (fig. 40A și 40D). În contrast, analiza tumorilor de flanc

25 stang a relevat o creștere mai proeminentă a cantității de celule CD8 și Tconv care infiltrază tumoarea în grupul tratat cu NDV-ICOSL (fig. 40E). Este remarcabil, că exista, de asemenea, o creștere a numărului absolut de celule T reglatoare, cu cea mai mare creștere observată în grupul tratat cu NDV-ICOSL (fig. 40E), deși procentul relativ de celule T reglatoare a fost semnificativ mai redus la animalele tratate cu NDV (fig. 40F).

Terapia combinată NDV-ICOSL și blocatori ai CTLA-4 conduce la respingerea tumorilor injectate și tumorilor la distanță

În general, rezultatele prezentate mai sus au demonstrate, că, în pofida unei reacții inflamatorii semnificative, observată în tumorile la distanță la administrarea intratumorală a NDV-ICOSL, majoritatea animalelor, însă, murit de la tumori, sugerând că mecanismele de inhibare

35 active din micromediul tumorii previn respingerea tumorii prin infiltrarea celule imune. De aceea, s-a evaluat eficacitatea terapiei combinate administrate local cu NDV-ICOSL și blocator sistemic al CTLA-4. Pentru aceste experimente dozele provocare tumorale au fost majorate până la nivelurile la care nu a fost observată nici o eficiență terapeutică semnificativă cu NDV sau anticorpi anti-CTLA-4 la administrarea lor solitară. Ca și anterior, animalele au fost tratate cu 4

40 doze de NDV administrate în tumoare pe un flanc unilateral, concomitent cu administrarea sistemică a anticorpilor anti-CTLA-4 (fig. 41A). În modelul B16-F10 terapia combinată cu NDV-ICOSL și anticorpi anti-CTLA-4 a condus la regresia majorității tumorilor injectate și tumorilor la distanță cu supraviețuirea animalelor pe termen lung, care a fost semnificativ superioară cu indicatorii în combinația NDV-WT și anticorpi anti-CTLA-4 (fig. 41B-D). Pentru a determina

45 dacă aceste rezultate ar putea fi extinse și la alte modele de tumori, același experiment a fost efectuat pe modelul bilateral carcinom de colon CT26 în flanc. În pofida sensibilității reduse a celulelor CT26 la liza mediată de NDV *in vitro*, s-a observat o eficacitate terapeutică semnificativă a terapiei combinate cu NDV și anticorpi anti-CTLA-4 atât în tumorile injectate cu virus, cât și în tumorile la distanță, și iarăși cu o eficacitate mai înaltă în grupul, în care s-a administrat

50 combinație de NDV-ICOSL cu anticorpi anti-CTLA-4 (fig. 42A-D). În ambele modele de tumori animalele, care complet s-au vindecat de tumori, au fost reprovocate cu o doză letală de celule tumorale în ziua a 90 fără o terapie ulterioară și majoritatea animalelor au demonstrat protecție împotriva reprovocării (fig. 41E și 42E). Este de remarcă, că în timp ce în modelul CT26 toate animalele vindecate s-au dovedit a fi protejate de reprovocare, în modelul B16-F10 animalele

55 tratate cu terapie combinată au demonstrat o protecție net superioară, comparativ cu animalele care au fost tratate doar cu anticorpi anti-CTLA-4 (fig. 41E), ceea ce atestă, că abordarea combinată conduce la un răspuns anamnestic de protecție mai eficient.

Terapia combinată conduce la o infiltrare semnificativă a tumorii cu celule imune înnăscute și adaptive

Analiza tumorilor B16 la distanță la animalele tratate cu combinație de NDV și anticorpi anti-CTLA-4 a demonstrat o infiltrare tumorală semnificativă cu diferite subtipuri de celule imune (fig. 43A, B). O infiltrarea sporită a fost evidentă atât pentru celulele imune înăscute (fig. 43B, D), cât și pentru cele adaptive (fig. 43E), cu cea mai mare creștere vizibilă în grupul tratat cu combinația de NDV-ICOSL și anticorpi anti-CTLA-4. Remarcabil este, că în timp ce acest grup a demonstrat cel mai mare număr de limfocite CD8+ de infiltrare, în acest grup, de asemenea, s-a relevat o creștere statistic semnificativă de celulele T reglatoare (fig. 43E), deși procentul total de Treg a fost semnificativ mai redus, comparativ cu animalele netratate sau cu animalele tratate doar cu anticorpi anti-CTLA-4 (fig. 43F), cu creșterea rezultată a raportului dintre celulele efectoare și Treg (fig. 43g). O analiză detaliată TIL a demonstrat, că TIL izolat de la animalele tratate cu combinație de NDV-ICOSL și anticorpi anti-CTLA-4 au exprimat cele mai cantități de marker de activare, liză și de proliferare ICOS, granzimă B și Ki67 respectiv (fig. 43H-J).

Generarea NDV recombinant, care exprimă alte molecule costimulatoare

Acest exemplu demonstrează, că exprimarea unui ligand costimulator de NDV poate conduce la activarea unui răspuns imun mai puternic, care poate crea o imunitate anti-tumorală mai eficientă, în special în condițiile unei terapii combinate cu blocatorul punctelor de control imune. Pentru a evalua molecule suplimentare costimulatoare, au fost studiați liganzii, ținta cărora este superfamilia receptorilor de imunoglobuline de (ICOS și CD28) și superfamilia receptorilor TNF (GITR, 4-1BB, OX40 și CD40). Pentru legarea cu CD28 a fost proiectat un ligand artificial, constând dintr-o proteină himerică cu domeniile citoplasmatică și transmembranară ale glicoproteinei F de NDV și domeniul extracelular, constând dintr-un anticorp cu un singur lanț împotriva CD28 (aCD28-scFv) (fig. 44A, B). Pentru liganzii, specifici pentru superfamilia de receptori TNF, domeniul extracelular al fiecărui ligand a fost fuzionat cu domeniile transmembranare și intracelulare ale glicoproteinei HN NDV, în scopul de a asigura exprimarea crescută a liganzilor pe suprafața celulelor infectate (fig. 44a, B). În plus, erau generate virusuri recombinante care exprimă citokine din familia receptorilor cu lanț comun gamma (IL-2, IL-15 și IL-21). Constructele rezultate sunt ilustrate în diagrama din fig. 44c. Virusurile recombinante au fost generate prin metode de "genetică inversă" și prezența virusurilor a fost confirmată prin analize de hemaglutinare (fig. 45A). Pentru a confirma corectitudinea inserției genelor, din fiecare virus a fost izolat ARN și RT-PCR a fost efectuată cu primeri de recoacere în afara regiunii genei clonate (fig. 45B, C). Secvență de fiecare genă a fost confirmată ulterior prin secvențierea Sanger. Pentru a confirma exprimarea liganzilor costimulatori pe suprafața celulelor infectate, celule cultivate B16-F10 au fost infectate la MOI, egală cu 2, și, peste 24 ore, analizate prin citometrie în flux cu anticorpi specifici pentru fiecare genă (fig. 46).

NDV-4-1BBL induce infiltrarea tumorii cu limfocite în tumorile la distanță

Abilitatea virusurilor proiectate pentru a manifesta orice semne ale unui răspuns imun sporit a fost evaluată, folosind în calitate de exemplu NDV-4-1BBL. Șoarecii cu melanoame B16-F10 bilaterale de flancuri au fost tratați în tumoarea dreaptă cu injecție intratumorală de NDV de control sau NDV-4-1BBL, așa cum a fost descris anterior, și tumorile la distanță au fost prelevate în ziua a 15. După cum se poate observa din fig. 47, terapia cu NDV-4-1BBL cauza infiltrarea sporită atât cu celule imune înăscute, cât și cu cele adaptive în tumorile contralaterale, ceea ce este în concordanță cu concluziile anterioare, care demonstrează rezultate similare cu NDV, care exprimă ICOSL (fig. 40). În general, aceste rezultate atestă, ca expresia moleculelor imunostimulatoare de NDV în contextul micromediului tumorii poate conduce la creșterea imunității antitumorale.

Virusurile generate NDV-4-1BBL, NDV-GITRL, NDV-OX40L, NDV-CD40L, NDV-IL-2, IL-NDV-15, NDV-IL-21 au fost evaluate după abilitatea lor de a induce infiltrarea tumorii cu celule imune, folosind pentru aceasta metodele similare de analiză descrise aici. În plus, evaluarea terapeutică fiecărui dintre virusuri s-a realizat pe modelele de tumori bilaterale de flancuri, virusul fiind administrat în tumoare într-un singur flanc, în combinație cu administrarea sistemică a anticorpilor, care reglează punctele de control imune PD-1, PD-L1 și/sau CTLA-4.

Concluzie

Pentru a declanșa moartea imunogenă a celulelor tumorale și un răspuns inflamator, s-a folosit NDV nepatogene, care, în pofida activității sale litice relativ reduse, s-a dovedit a fi un inductor puternic al IFN de tip 1 și de maturare a DC (Wilden et al. Int. J. Oncol., no 34, 2009, p. 971; Kato et al. Immunity, no 23, 2005, p. 19). A fost utilizat un model de melanom bilateral de flanc cu implantarea eşalonată a tumorilor conform unei scheme, pentru care a fost demonstrat anterior, că ea nu acordă rezistență la o infectare repetată (Turk et al., J. Exp. Med., no 200, 2004, p. 771). Acest exemplu demonstrează, că injectarea intratumorală a NDV conduce la infiltrarea

tumorii la distanță cu celule imune în lipsa răspândirii virusului la distanță. Este necesar de menționat, că acest efect a fost asociat cu reducerea relativă a numărului de Treg și o creștere marcată a raportului dintre celulele efectoare CD4 și CD8 și celulele Treg, și s-a demonstrat anterior, că acesta este un marker al unui răspuns imunologic favorabil la imunoterapie (Quezada et al. J. Clin. Invest. no 116, 1, 2006, p. 935; Curran et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, no 107, 2010, p. 4275).

Datele din acest exemplu demonstrează, că NDV amplifică infiltrarea tumorală cu limfocite cu specificitate tumorală, și acest efect a fost dependent de identitatea tumorii injectate cu virus. Infiltrarea sporită a tumorii și extinderea limfocitelor adoptive transferate atestă suplimentar despre interacțiunea reciproc amplificată dintre terapia cu virus oncolitic și abordările terapeutice, care utilizează transferul de celule T adoptive. Este absolut posibil, că limfocitele cu specificitate tumorală sunt supuse activării și expansiunii în locul infecției virale inițiale, urmate de migrarea lor spre alte locusuri cu tumori, ceea ce, probabil, depinde de receptori pentru chemokine și receptori homingului limfocitelor (Franciszkiwicz et al. Cancer Res., no 72, 2012, p. 6325). Datele din acest exemplu demonstrează, de asemenea, că infiltrarea cu celule imune a tumorii la distanță parțial era nespecifică și poate era indusă de infecția cu NDV a tumorii heteroloage sau de transferul de ser de la animalele tratate la șoarecii cu tumori, care nu erau tratați. Permeabilitatea vasculară crescută, indusă de citokinele inflamatorii, cum ar fi IL-6, poate contribui semnificativ în activarea vascularizării tumorii și recrutarea limfocitelor în tumori (Fisher et al. Journal of Clinical Investigation, no 121, 2011, p. 3846).

În pofida creșterii semnificative a numărului de TIL, efectul terapeutic în tumorile la distanță în monoterapie cu NDV a fost destul de modest, subliniind natura imunosupresivă a micromediului acestor tumori (Spranger et al. Sci. Transl. Med., no 5, 2013). Remarcabil este că combinația administrării sistemice a anticorpilor anti-CTLA-4 cu administrarea intratumorală a NDV a condus la respingerea tumorilor B16-F10 la distanță cu supraviețuirea animalelor pe termen lung. Animalele au fost, de asemenea, protejate împotriva reinfectării cu tumoare, ceea ce atestă despre formarea memoriei imunologice pe termen lung. Remarcabil este, că eficacitatea terapeutică a fost, de asemenea, constatată în cazul modelelor de tumori TRAMP C2 și CT26, care prezintă o sensibilitate redusă la liza celulară mediată de NDV *in vitro*. Aceste rezultate atestă importanța răspunsului antitumoral imun/inflamator, indus de NDV, dar nu de liza directă, în calitate de mecanism primar, care determină eficacitatea antitumorală în acest model. În plus, analiza tumorilor injectate cu NDV și tumorilor la distanță după terapia combinată a relevat o infiltrare semnificativă cu celule imune înăscute și celule efectoare activate CD8+ și CD4+, în timp ce epuizarea celulelor CD8+ și celulelor NK conducea la dispariția completă a eficacității terapeutice. Mai mult decât atât, strategia de combinație s-a dovedit a fi complet ineficientă la șoarecii IFNAR-/-, ceea ce susține rolul căii cu implicarea IFN de tip 1 în inducerea imunității antitumorale în acest sistem (Fuentes et al. J. Exp. Med., no 208, 2011, p. 2005; Diamond et al. J. Exp. Med., no 208, 2011, p. 1989; Spranger et al. Sci. Transl. Med., no 5, 2013; Swann et al. J. Immunol., no 178, 2007, p. 7540).

Astfel, acest exemplu demonstrează, că terapie locală intratumorală a melanomului B16 cu NDV induce o reacție inflamatoare, care conduce la infiltrate limfocitară și la efect antitumoral în tumorile la distanță (care nu au fost injectate cu virus) fără răspândirea virusului la distanță. Acest efect inflamator coincide cu infiltrația tumorilor la distanță cu celule CD4+ și CD8+ cu specificitate tumorală, care era dependentă de identitatea tumorii injectate cu virus. Terapia combinată cu NDV local și administrarea sistemică a blocatorului CTLA-4 conducea la respingerea tumorilor la distanță prestabilite și instalarea protecției împotriva reprovocării cu tumoare în modele de tumori slab imunogenice, indiferent de sensibilitatea liniei de celule tumorale la liza mediată de NDV. Efectul terapeutic a fost asociat cu infiltrarea semnificativă a tumorilor la distanță cu celule efectoare CD8+ și CD4+ activate, dar nu cu celule T reglatoare, și el era dependent de celulele CD8+, celulele NK de interferon de tip 1. Acest exemplu atestă, că terapia locală cu NDV oncolitic induce infiltrarea inflamatoare a tumorilor la distanță cu celule imune, ceea ce le face susceptibile la terapia sistemică cu anticorpi imunomodulatori.

Volumul prezentei invenții nu se limitează la realizările concrete descrise aici. În plus, diferite modificări ale prezentei invenții, adițional la cele descrise, vor deveni evidente specialiștilor în domeniu din descriere și figurile anexate. Se consideră, că astfel de modificări se include în volumul revendicărilor anexate.

Toate documentele, menționate în prezenta invenție, sunt incluse în descriere prin referință integral și pentru toate scopurile în aceeași măsură, în care fiecare publicație individuală sau cerere

de brevet sau brevet au fost indicate în mod specific și individual ca fiind incorporate prin referință integral pentru toate scopurile.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Sinkovics J.G., Horvath J.C. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. J.Clin. Virol., no 16, 2000, p. 1-15
2. Lorence et al. Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. Curr. Cancer Drug targets, no 7, 2007, p. 157-167
3. Hotte et al. An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. Clin. Cancer Res., no 13, 2007, p. 977-985

(57) Revendicări:

1. Metodă de tratament al cancerului, care prevede administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unei compoziții care conține virusul bolii Newcastle (NDV) și a unei compoziții ce conține un antagonist al proteinei morții celulare programate 1 (PD1), în care antagonistul PD1 reprezintă un anticorp, care se leagă specific la PD1 și blochează legarea cu liganzii săi nativi.

2. Metodă de tratament al cancerului, care prevede administrarea la un subiect, care are nevoie de aceasta, a unei compoziții care conține un NDV hibrid și un antagonist conținând antagonistul PD1, în care NDV hibrid conține un genom ambalat cu conținut de o secvență de nucleotide, care codifică o citokină, în care această citokină este exprimată de virus, și în care antagonistul PD1 reprezintă un anticorp care se leagă specific la PD1 și blochează legarea cu liganzii săi nativi.

3. Metodă, conform revendicării 2, în care citokina reprezintă interieukina-2 (IL-2).

4. Metodă, conform revendicării 2, în care citokina reprezintă un factor granulocitar-macrofagal stimulator de colonii (GM-CSF).

5. Metodă, conform revendicării 2, în care citokina reprezintă interleukina-21 (IL-21).

6. Metodă, conform revendicării 2, în care citokina reprezintă interleukina-15 (IL-15).

7. Metodă, conform revendicării 2, în care citokina reprezintă interleukina - 7 (IL-7), interleukina - 9 (IL-9), interleukina - 17 (IL-17), interleukina - 22 (IL-22), gama-interferon (IFN) sau factorul de necroză tumoral (TNF)-alfa.

8. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 2-7, în care NDV reprezintă o tulpină LaSota și genomul ambalat conține o secvență de nucleotide, care codifică proteina mutantă F cu mutația aminoacidă L289A, în care proteina mutantă este exprimată de NDV.

9. Metodă, conform revendicării 1, în care NDV reprezintă o tulpină LaSota și conține genomul ambalat cu conținut de o secvență de nucleotide, care codifică proteina mutantă F cu mutația aminoacidă L289A, în care proteina mutantă este exprimată de NDV.

10. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-7, în care NDV reprezintă o tulpină LaSota.

11. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-10, în care anticorpul reprezintă un anticorp monoclonal.

12. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-11, în care anticorpul reprezintă MK3475.

13. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-12, în care cancerul reprezintă melanom, cancer de colon, cancer mamar, carcinom cu celule scuamoase al capului și gâtului, cancer ovarian, cancer pancreatic, cancer hepatic sau cancer cu celule renale.

14. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-12, în care cancerul reprezintă melanom, cancer de creier, cancer de vezică urinară, cancer mamar, cancer de col uterin, limfom Hodgkin, cancer colorectal, carcinom endometrial, cancer esofagian, glioblastom multiform, carcinom hepatocelular, cancer de rinichi, cancer hepatic, carcinom cu celule renale,

adenocarcinom pancreatic, mezoteliom, cancer pulmonar, limfom non-Hodgkin, cancer ovarian, cancer pancreatic, cancer de prostată, cancer al glandelor salivare, sarcom, cancer tiroidian sau cancer uterin.

15. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-14, în care cancerul este metastatic.

16. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-15, în care cancerul este refractar sau recurent.

17. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-16, în care compoziția cu conținut de NDV se administrează intratumoral.

18. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-17, în care compoziția cu conținut de antagonist se administrează intravenos.

19. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-17, în care compoziția cu conținut de antagonist se administrează subcutanat.

20. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-17, în care compoziția cu conținut de antagonist se administrează sistemic.

21. Metodă, conform oricăreia dintre revendicările 1-20, în care subiectul este un om.

22. Compoziție cu conținut de virus al bolii Newcastle (NDV) în combinație cu antagonistul proteinei 1 a morții celulare (PD1) pentru utilizare în tratamentul cancerului la un subiect care are nevoie de aceasta, în care antagonistul PD1 reprezintă un anticorp, care se leagă specific cu PD1 și blochează legarea cu liganzii săi nativi.

23. Compoziție cu conținut de NDV hibrid în combinație cu antagonistul proteinei 1 a morții celulare (PD1) pentru utilizare în tratamentul cancerului la un subiect care are nevoie de aceasta, în care NDV hibrid conține un genom ambalat cu conținut de o secvență de nucleotidă, care codifică o citokină, în care această citokină este exprimată de virus, și în care antagonistul PD1 reprezintă un anticorp care se leagă specific cu PD1 și blochează legarea cu liganzii săi nativi.

24. Compoziție, conform revendicării 23, în care citokina reprezintă interleucina -2 (IL-2).

25. Compoziție, conform revendicării 23, în care citokina reprezintă un factor granulocitar-macrophagal stimulator de colonii (GM-CSF)

26. Compoziție, conform revendicării 23, în care citokina reprezintă interleukina - 21 (IL-21).

27. Compoziție, conform revendicării 23, în care citokina reprezintă interleukina - 15 (IL-15).

28. Compoziție, conform revendicării 23, în care citokina reprezintă interleukina - 7 (IL-7), interleukina - 9 (IL-9), interleukina - 17 (IL-17), interleukina - 22 (IL-22), gama-interferon (IFN) și factorul de necroză tumoral (TNF)-alfa.

29. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 23-28, în care NDV reprezintă o tulpină LaSota și genomul ambalat conține o secvență de nucleotidă, care codifică proteina mutantă F cu mutația aminoacidă L289A, în care proteina mutantă este exprimată de NDV.

30. Compoziție, conform revendicării 22, în care NDV reprezintă o tulpină LaSota și conține genomul ambalat cu conținut de o secvență de nucleotidă, care codifică proteina mutantă F cu mutația aminoacidă L289A, în care proteina mutantă este exprimată de NDV.

31. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-28, în care NDV reprezintă o tulpină LaSota.

32. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-31, în care anticorpul reprezintă un anticorp monoclonal.

33. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-32, în care, în care anticorpul reprezintă MK3475.

34. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-33, în care cancerul reprezintă melanom, cancer de colon, cancer mamar, carcinom cu celule scuamoase al capului și gâtului, cancer ovarian, cancer pancreatic, cancer hepatic sau cancer cu celule renale.

35. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-33, în care cancerul reprezintă melanom, cancer de creier, cancer de vezică urinară, cancer mamar, cancer de col uterin, limfom Hodgkin, cancer colorectal, carcinom endometrial, cancer esofagian, glioblastom multiform, carcinom hepatocelular, cancer de rinichi, cancer hepatic, carcinom cu celule renale, adenocarcinom pancreatic, mezoteliom, cancer pulmonar, limfom non-Hodgkin, cancer ovarian, cancer pancreatic, cancer de prostată, cancer al glandelor salivare, sarcom, cancer tiroidian sau cancer uterin.

36. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-35, în care cancerul este metastatic.

37. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-36, în care cancerul este refractar sau recurent.

38. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-37, în care NDV este prevăzut pentru administrare intratumorală.

- 39. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-38, în care antagonistul este prevăzut pentru administrare intravenoasă.
- 40. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-38, în care antagonistul este prevăzut pentru administrare subcutanată.
- 41. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-38, în care antagonistul este prevăzut pentru administrare sistemică.
- 42. Compoziție, conform oricăreia din revendicările 22-41, în care subiectul este un om.

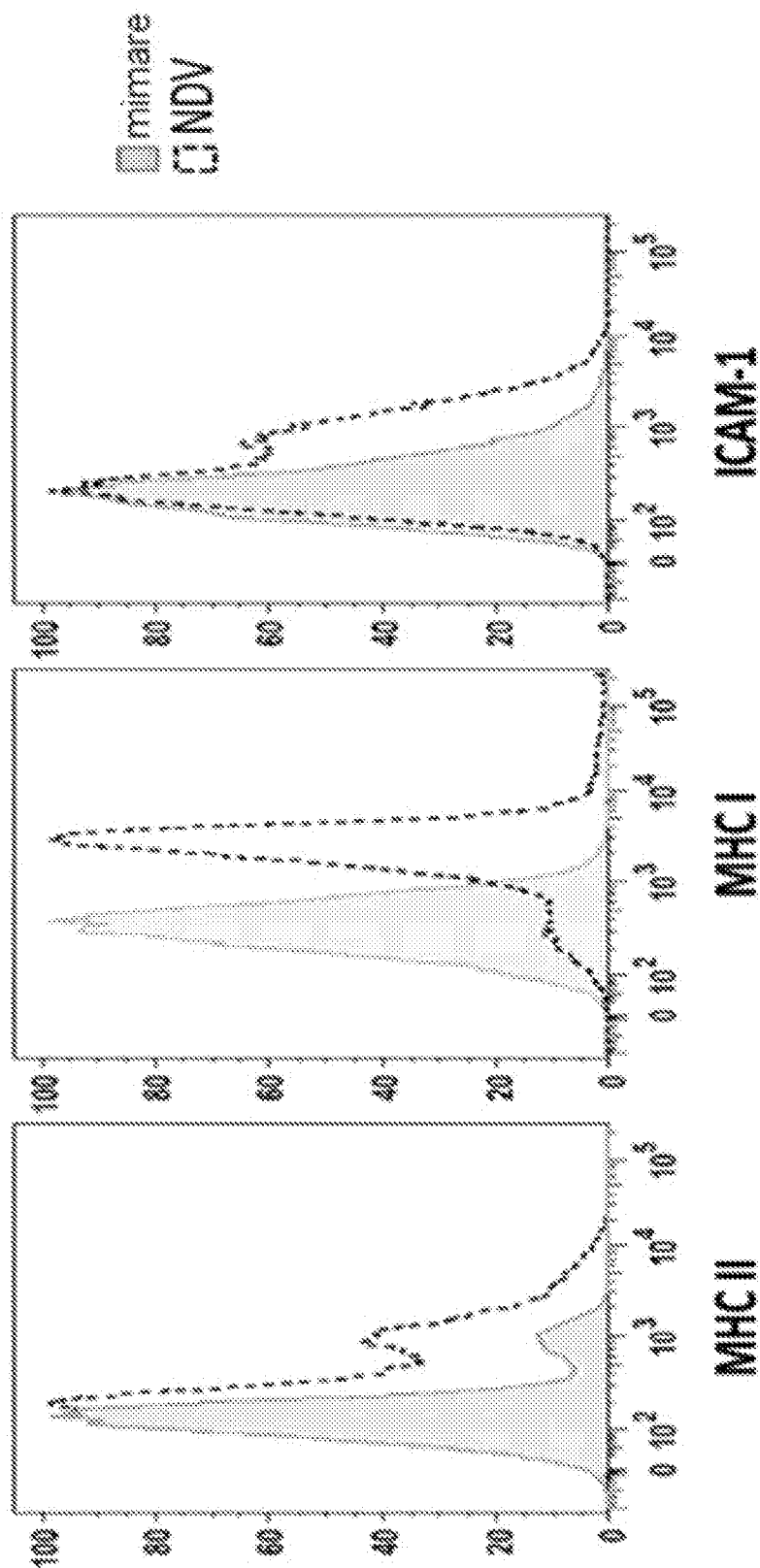


fig. 1

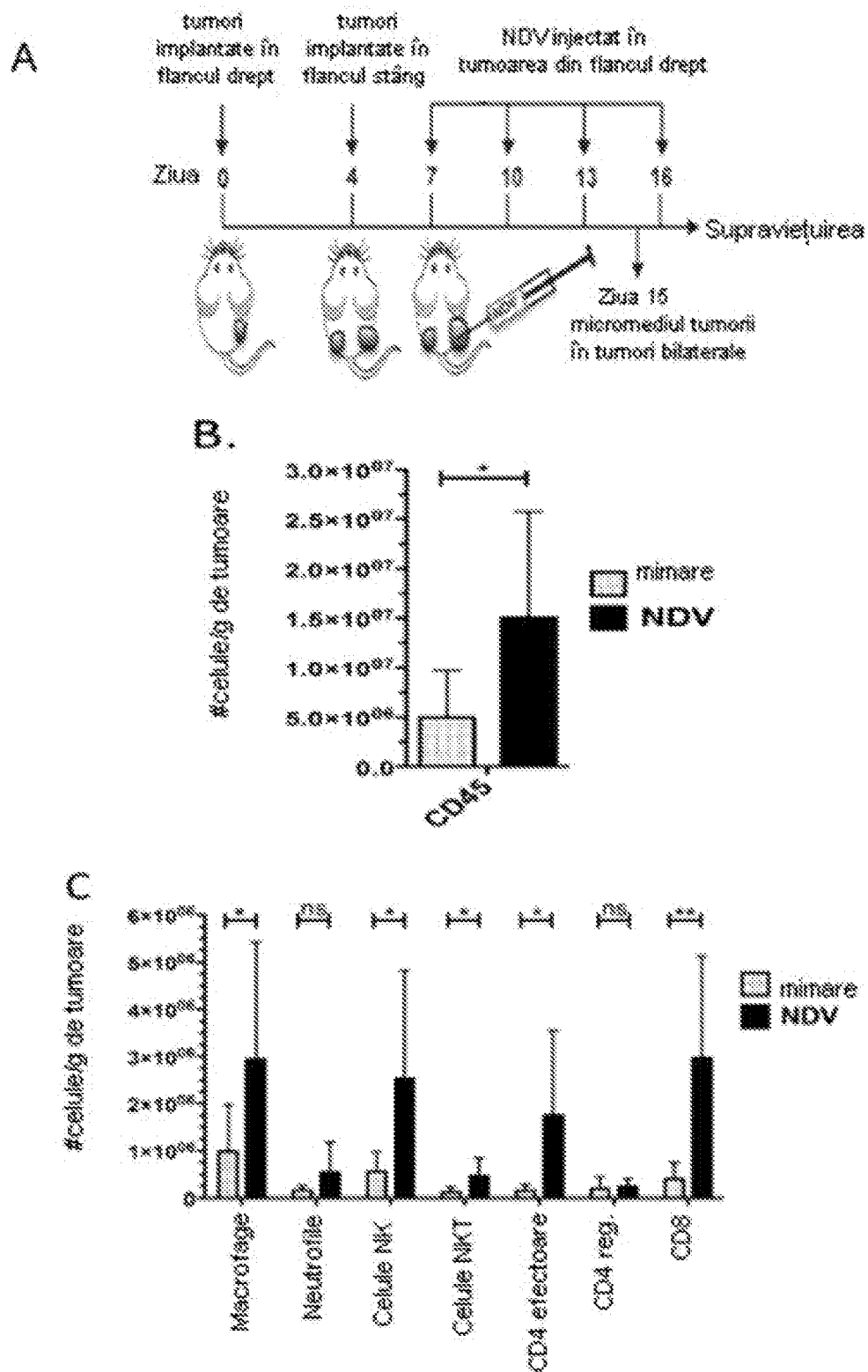


fig. 2A-2C

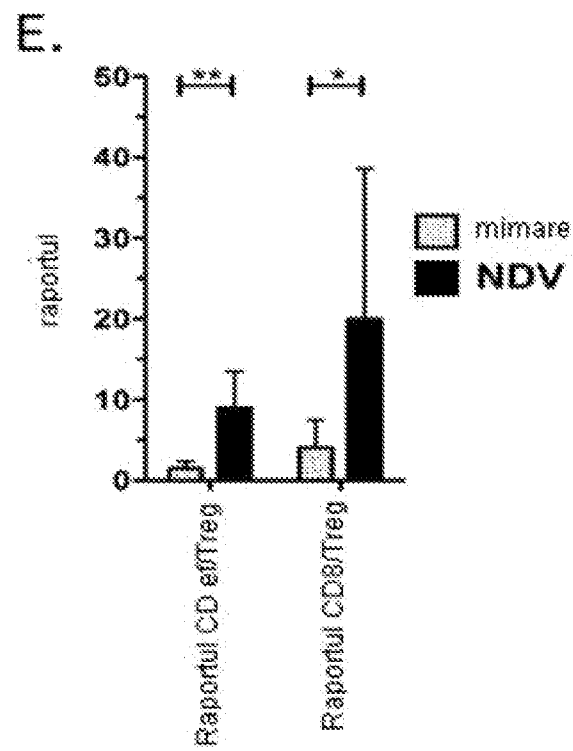
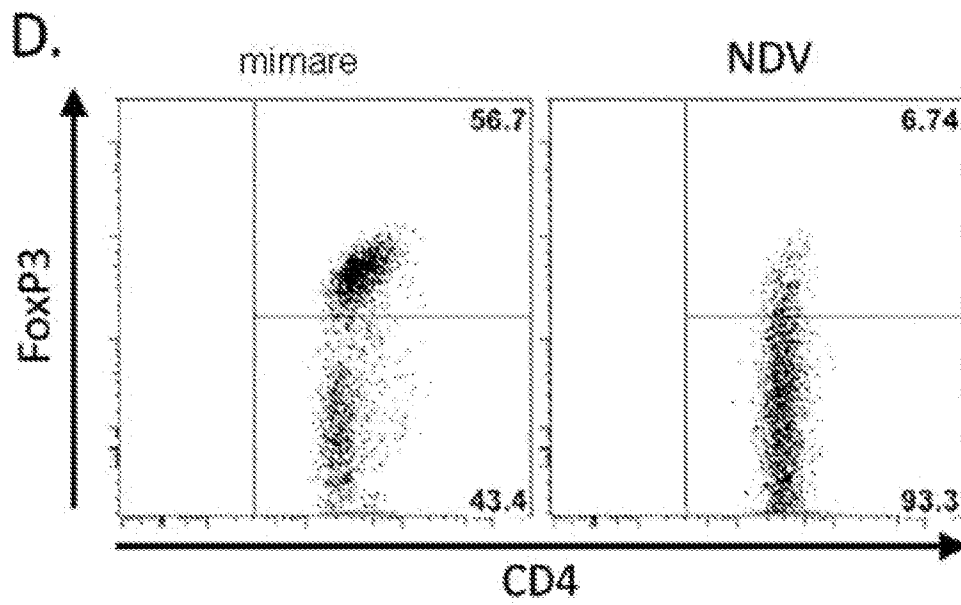


fig. 2D-2E

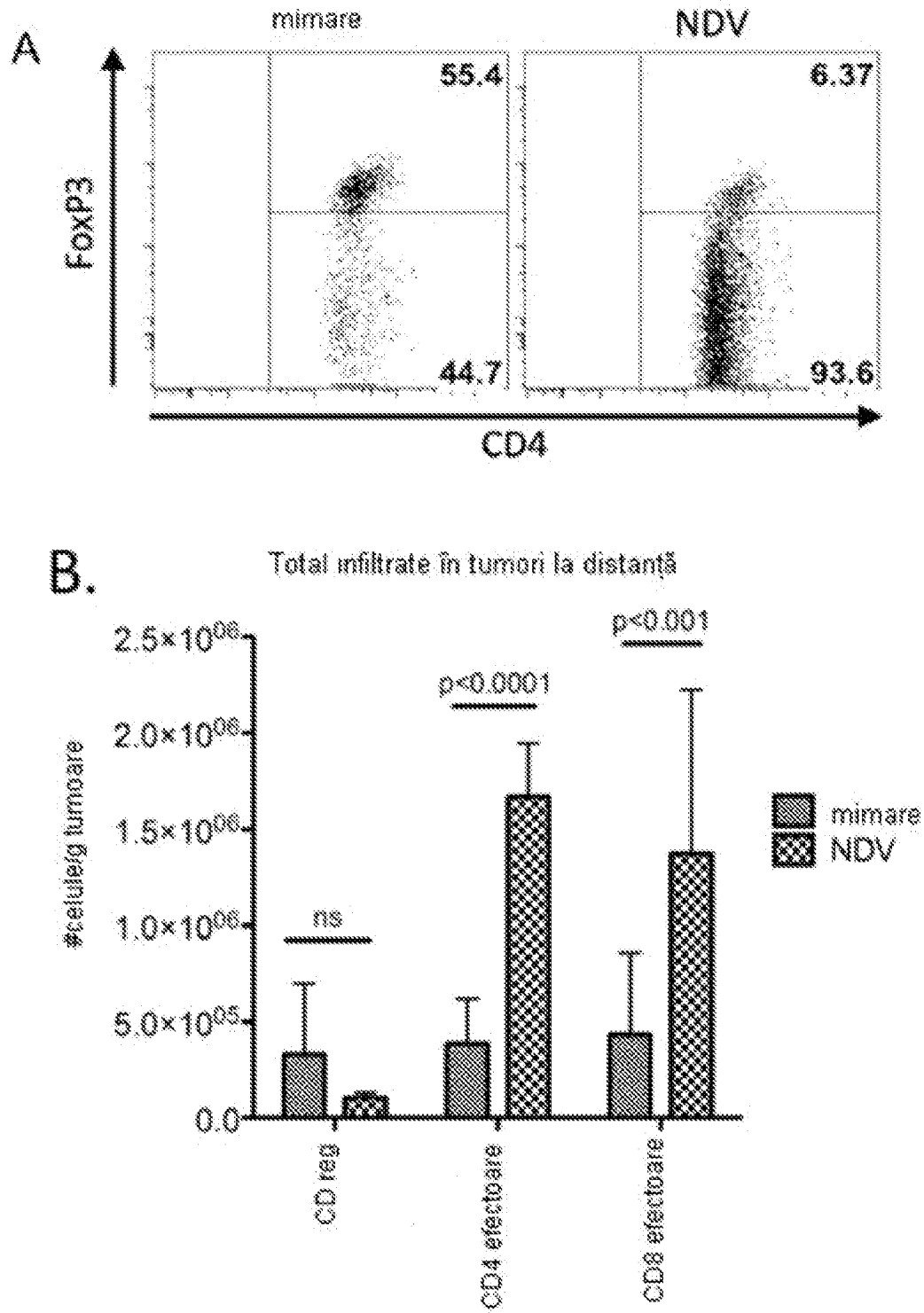


fig. 3A-3B

C.

Raporturile T efectoare/Treg în tumorile la distanță

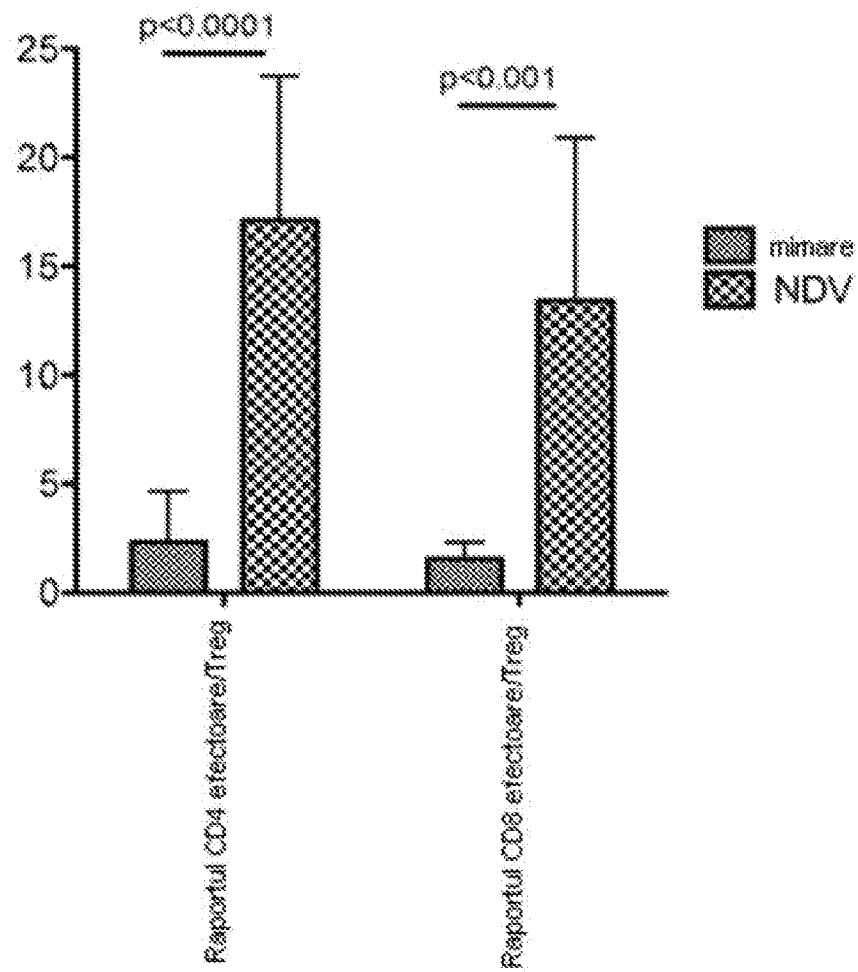


fig. 3C

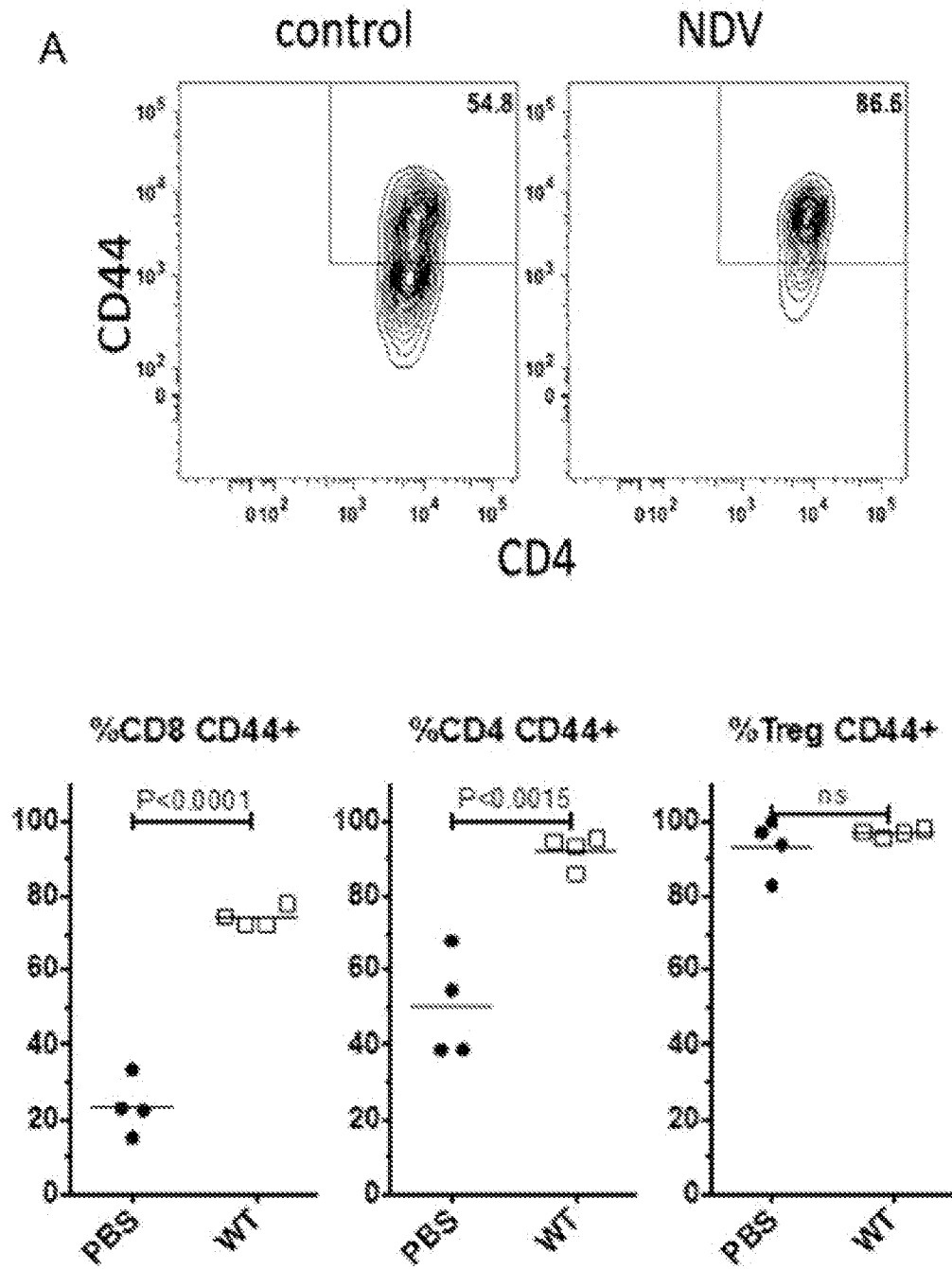


fig. 4A

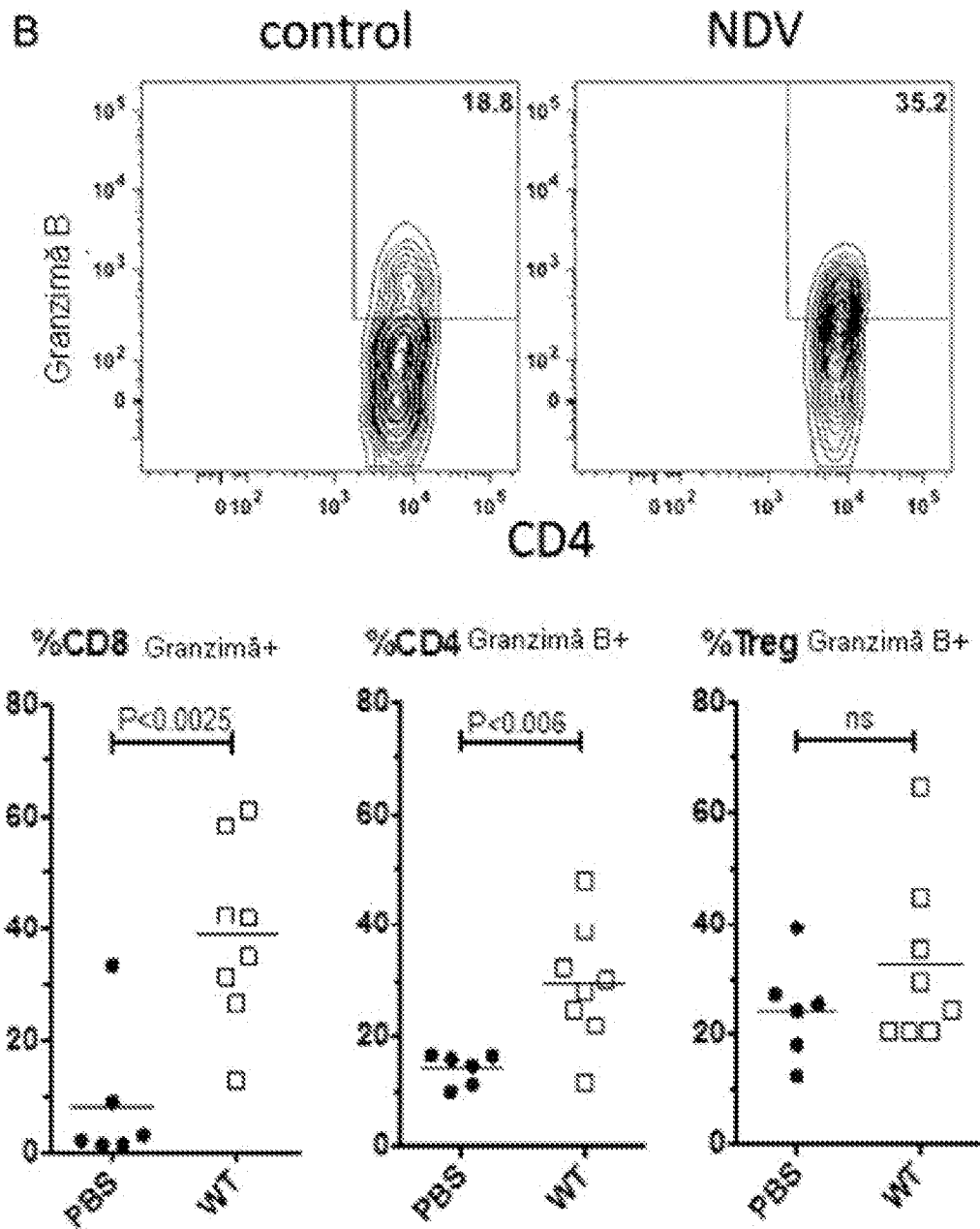


fig. 4B

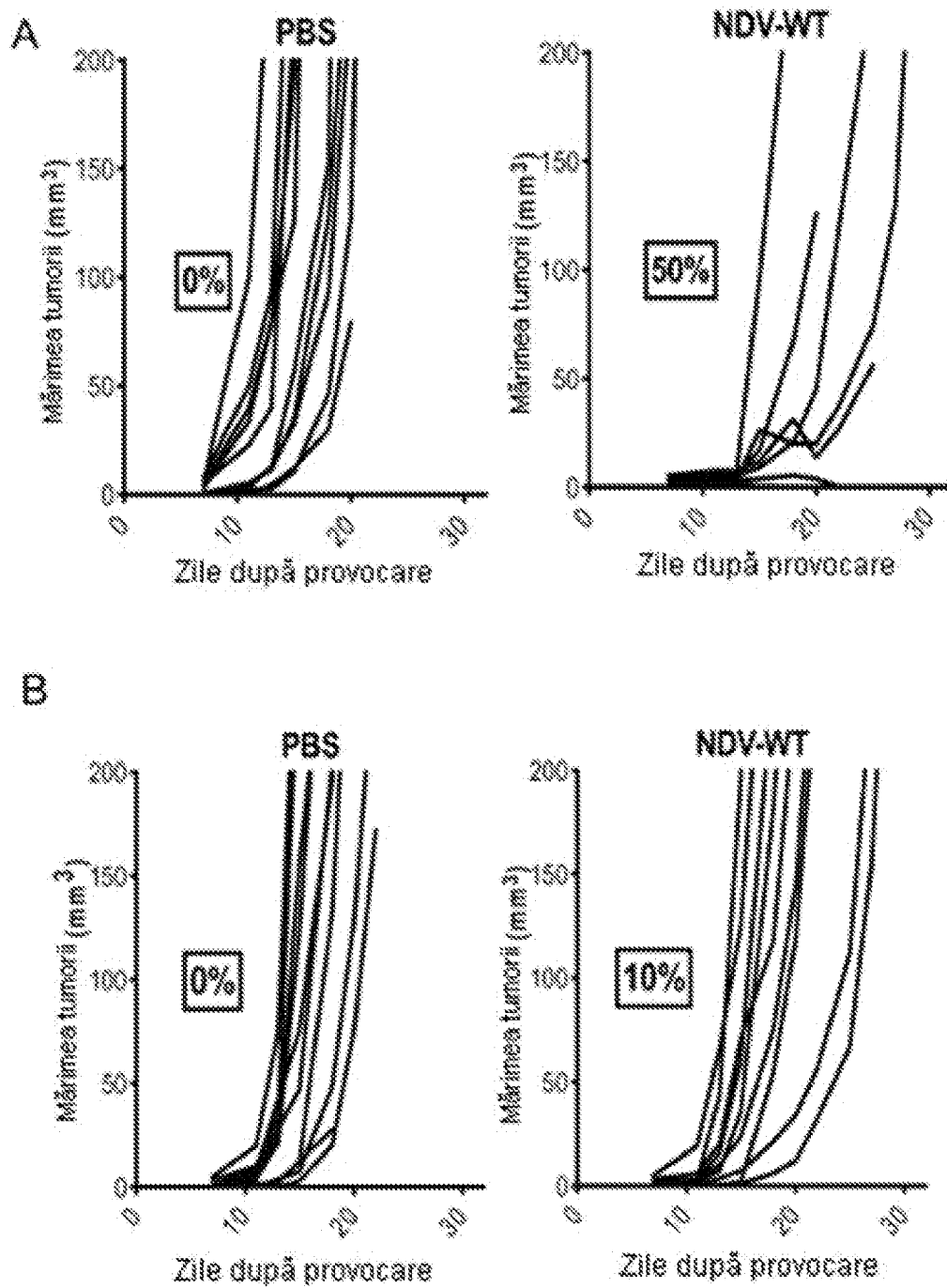


fig. 5A-5B

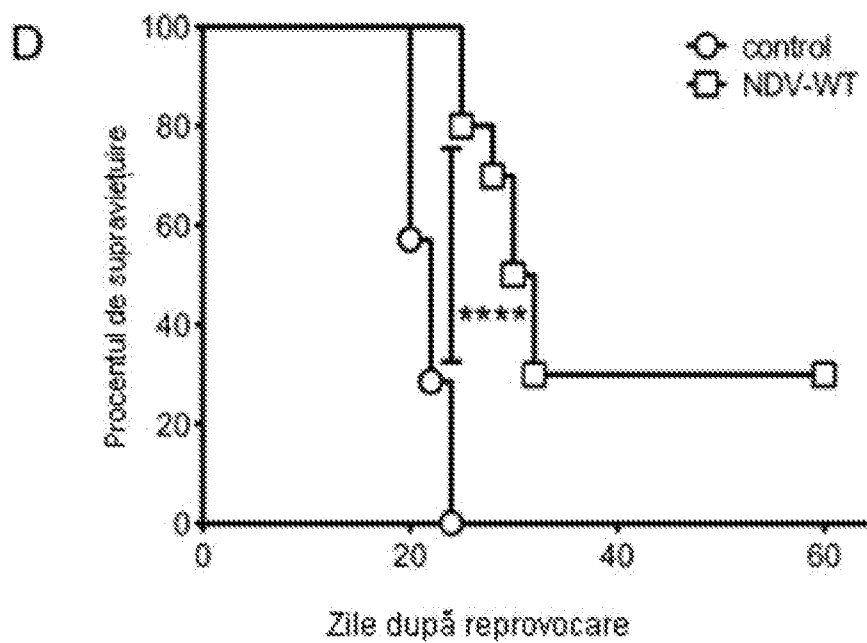
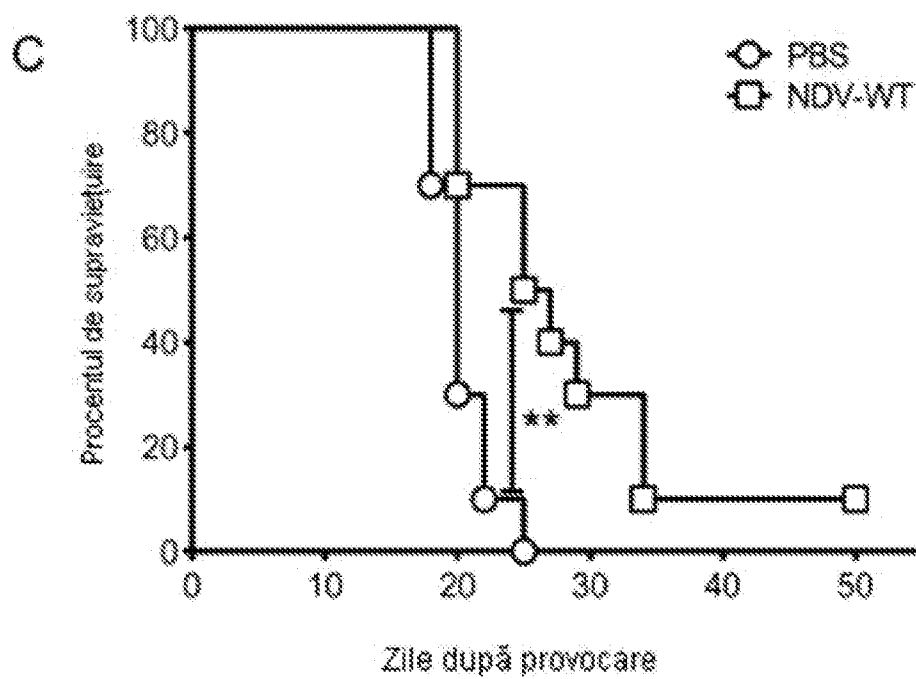


fig. 5C-5D

A

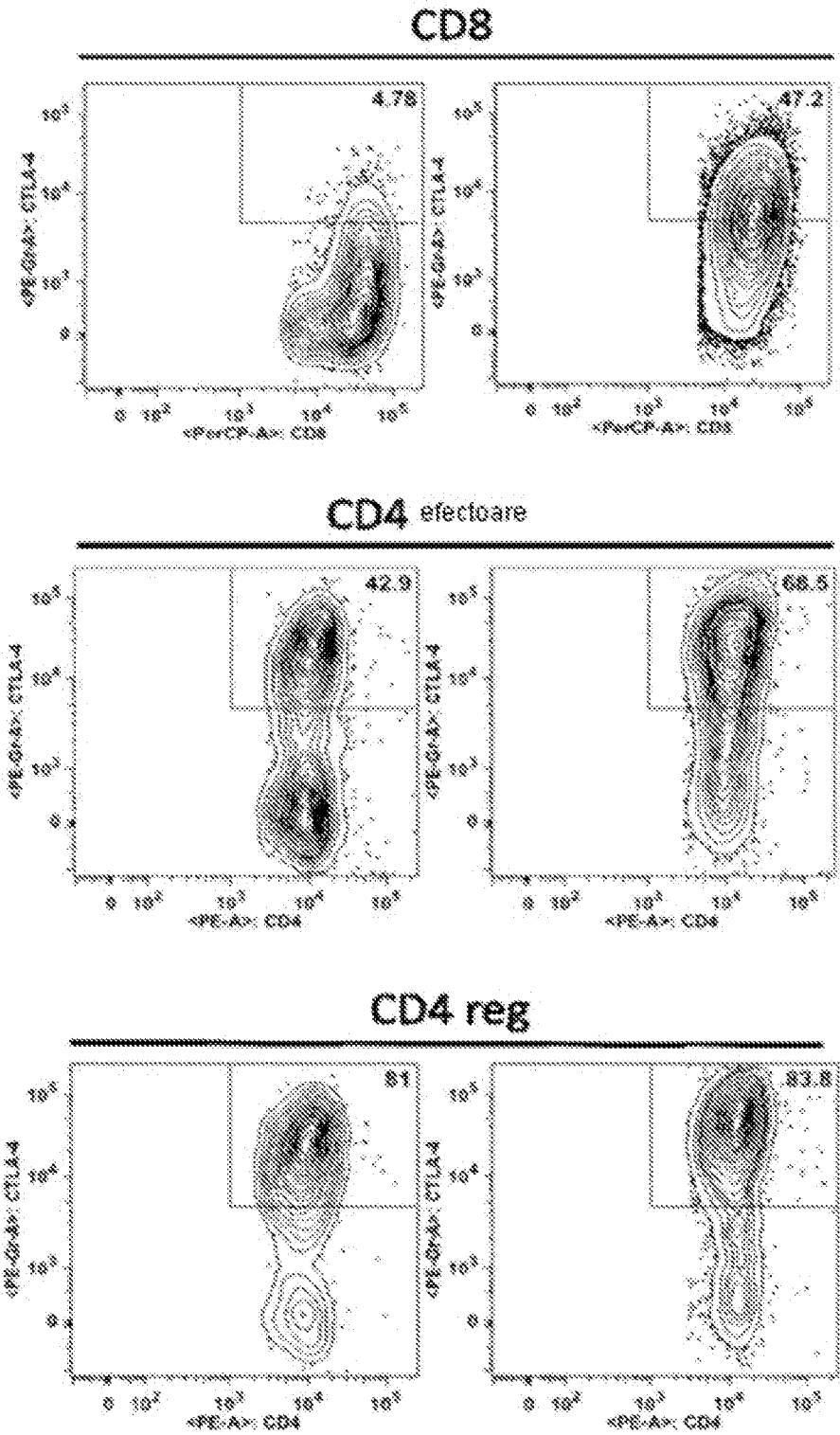


fig. 8A

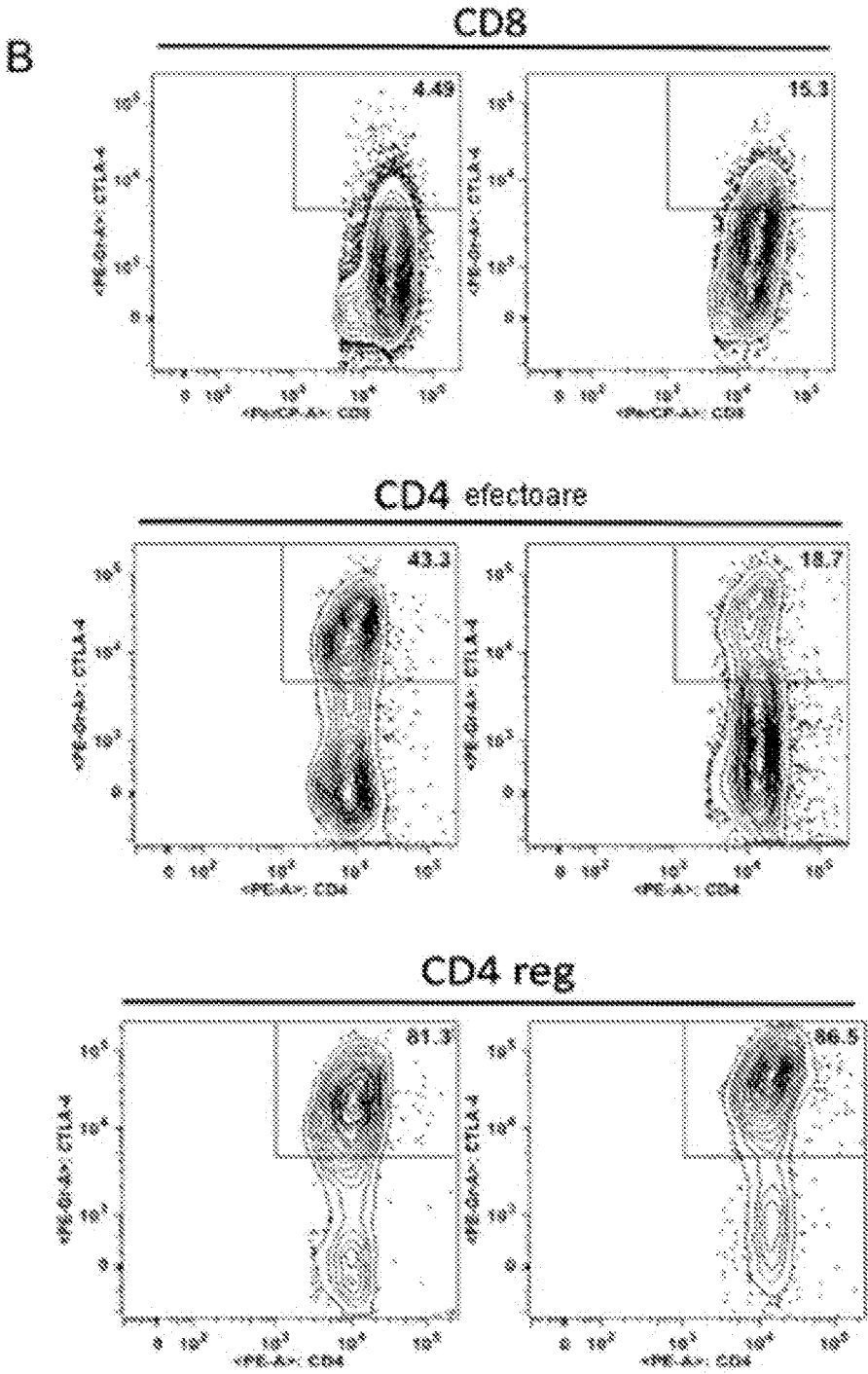


fig. 6B

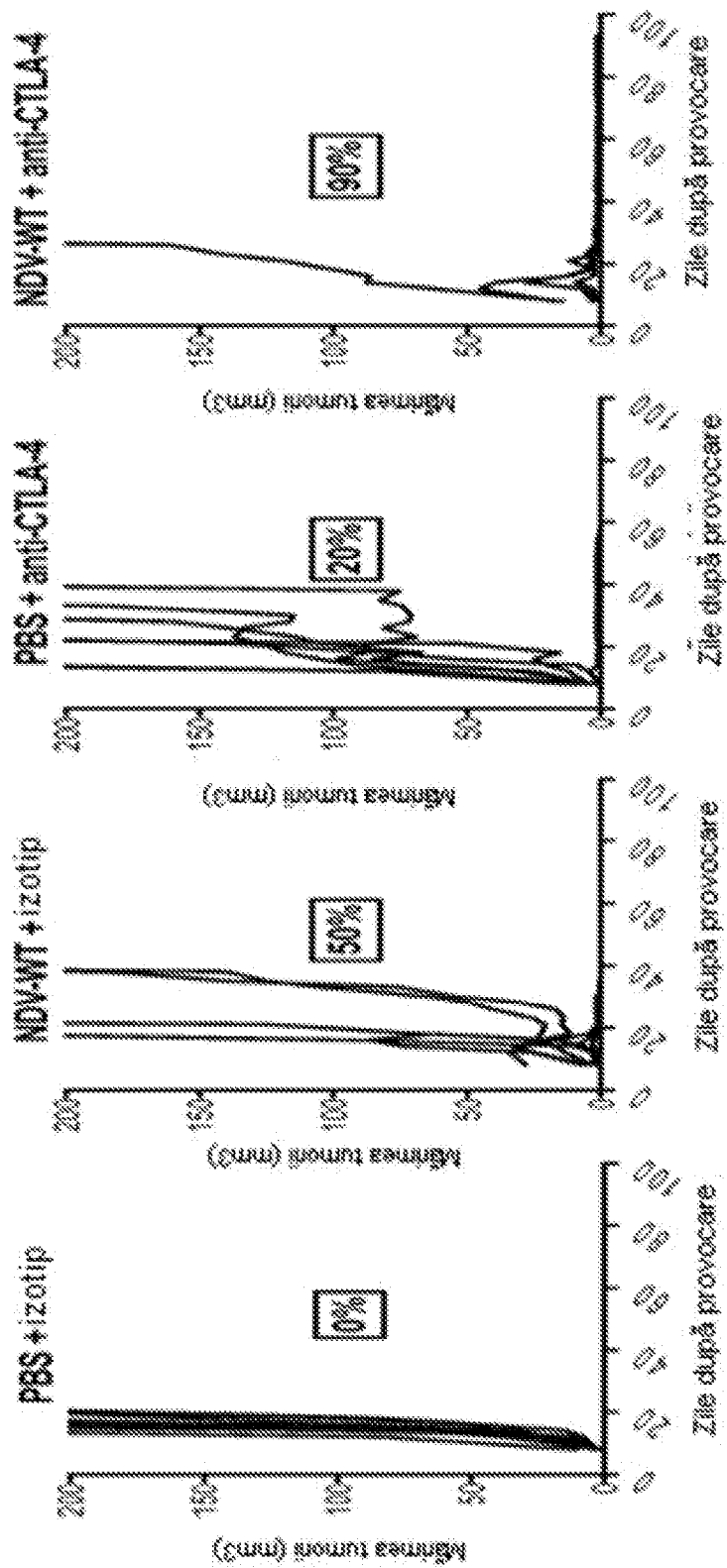


fig. 7A

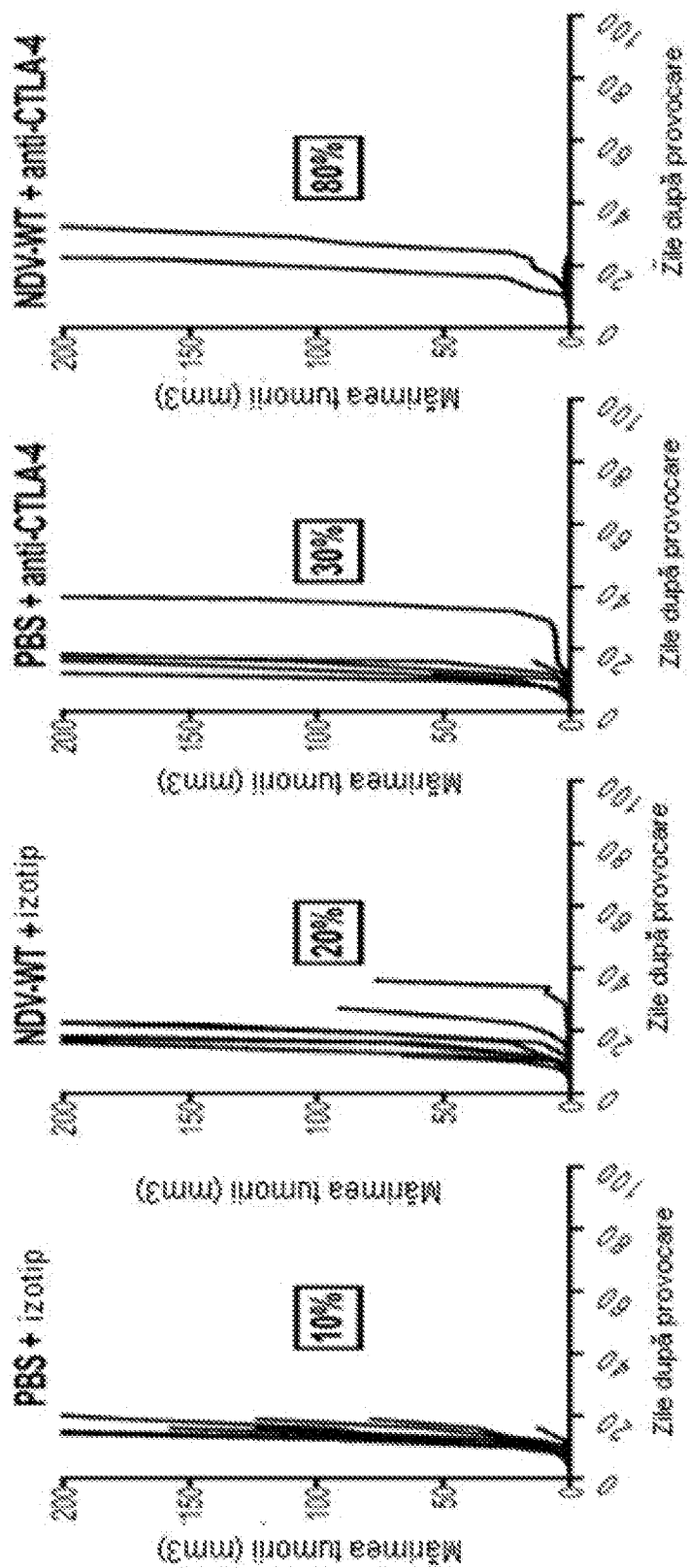


fig. 7B

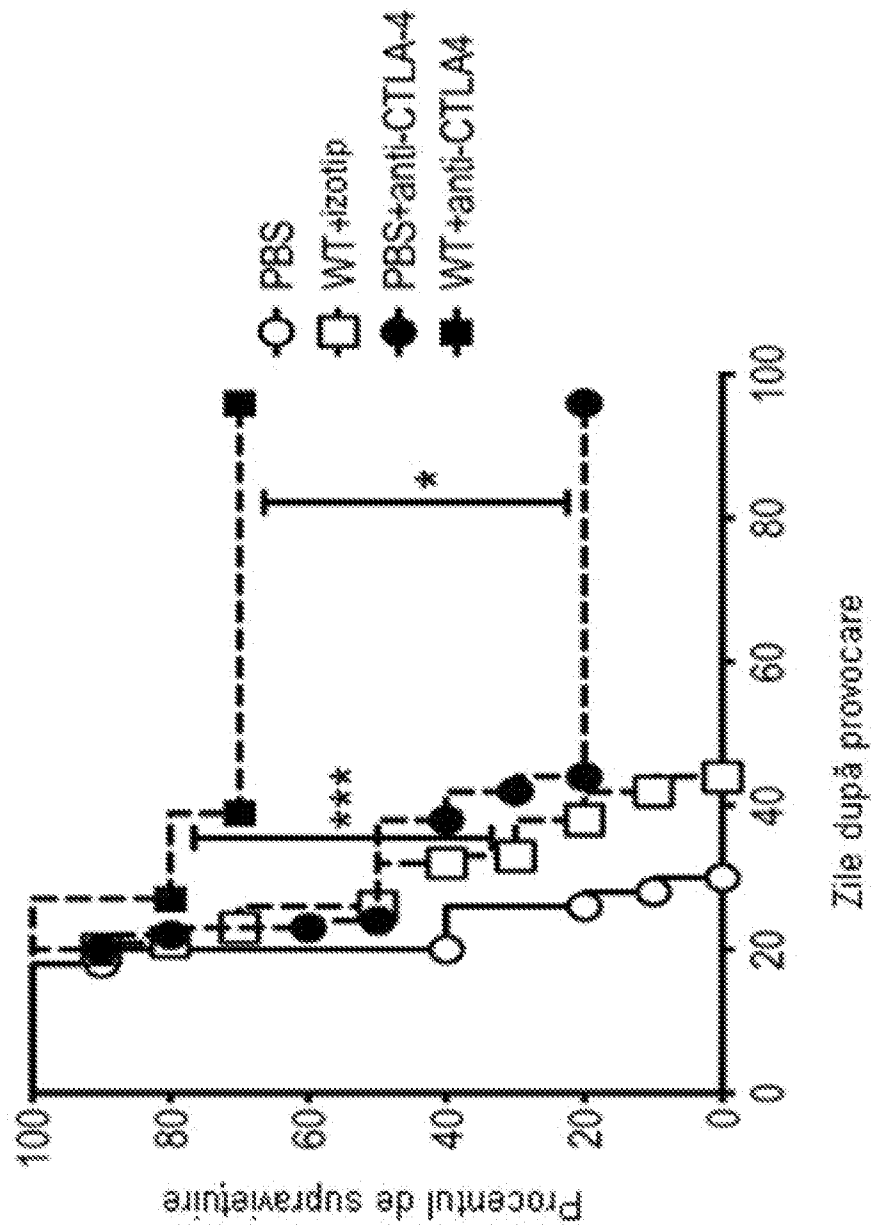


fig. 7C

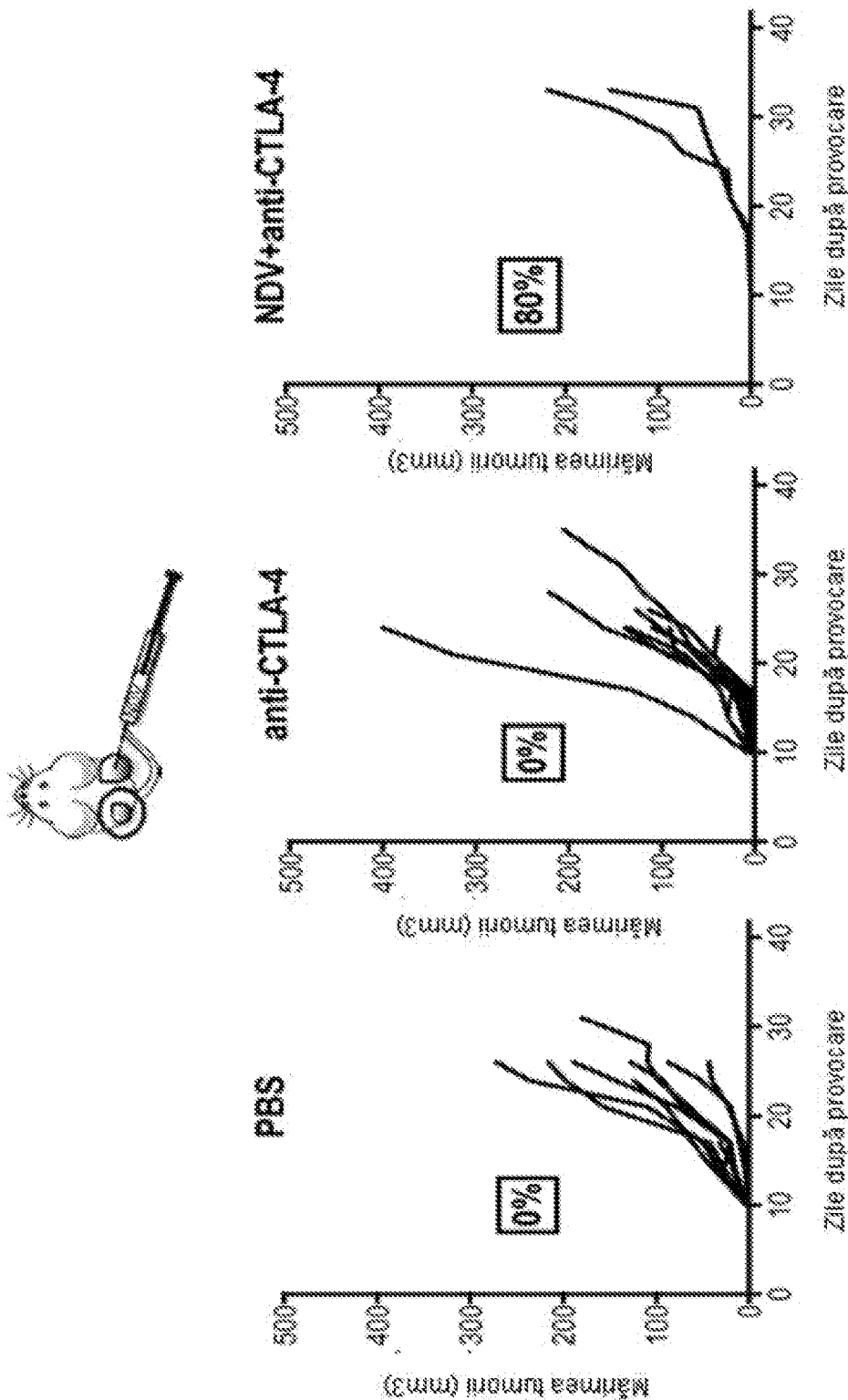


fig. 8

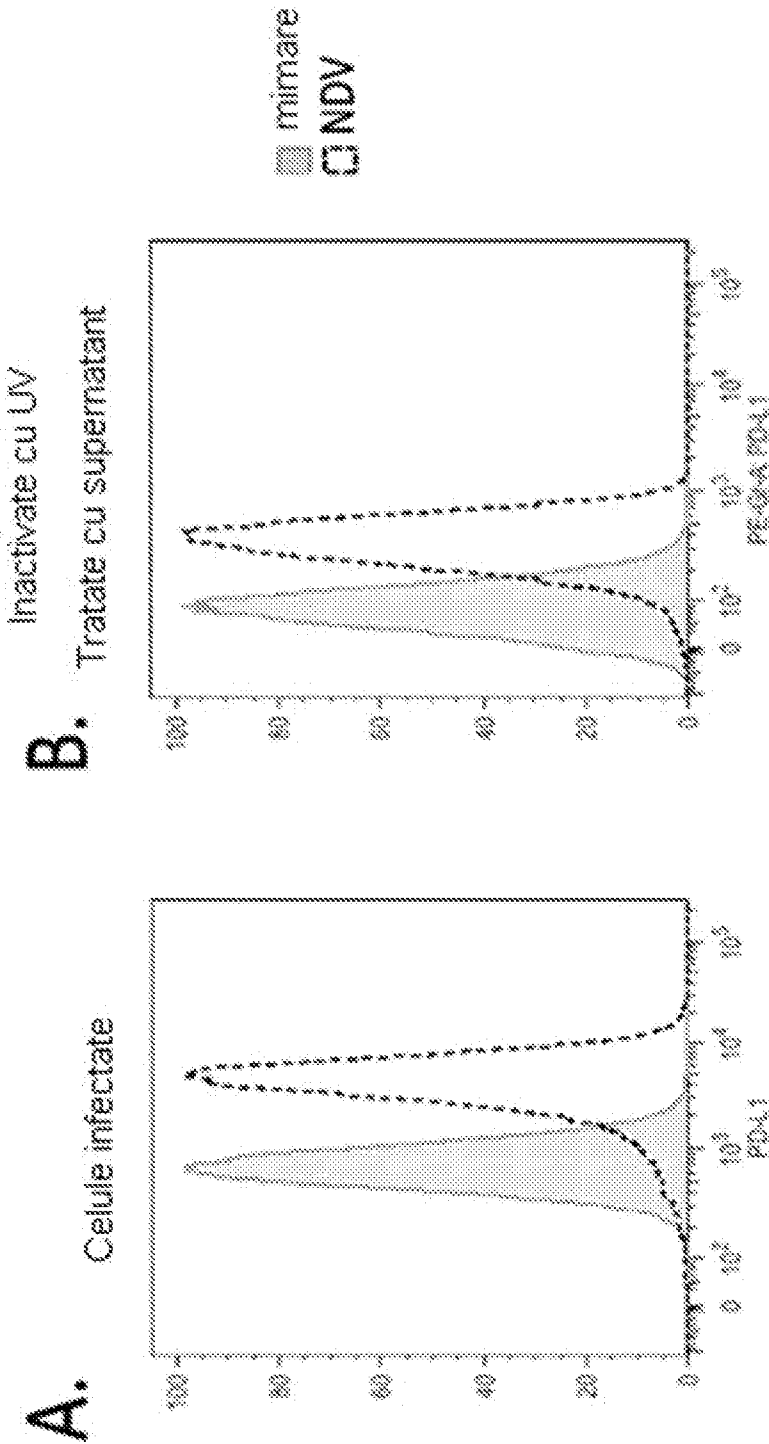
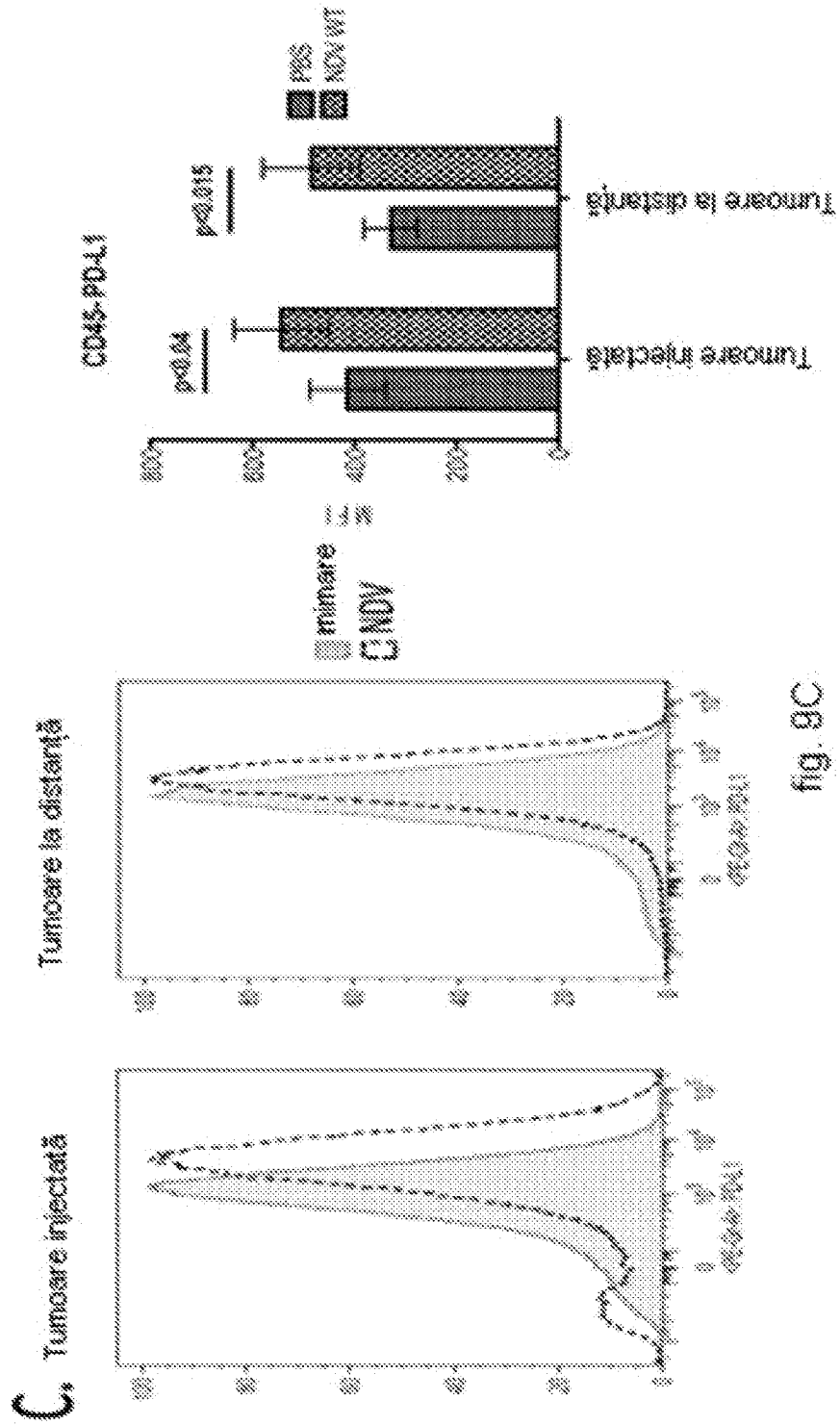


fig. 9A-9B



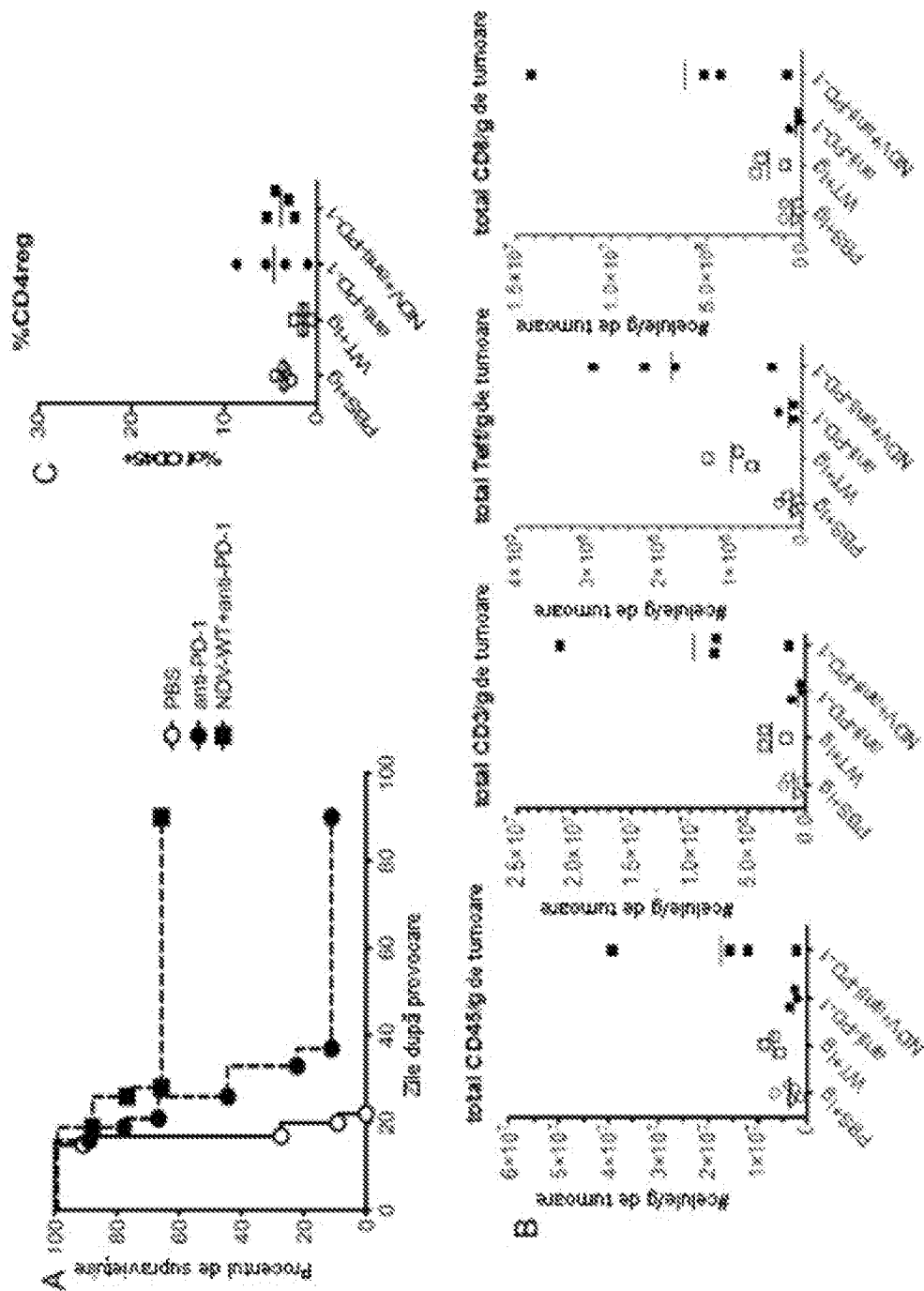


fig. 10A-10C

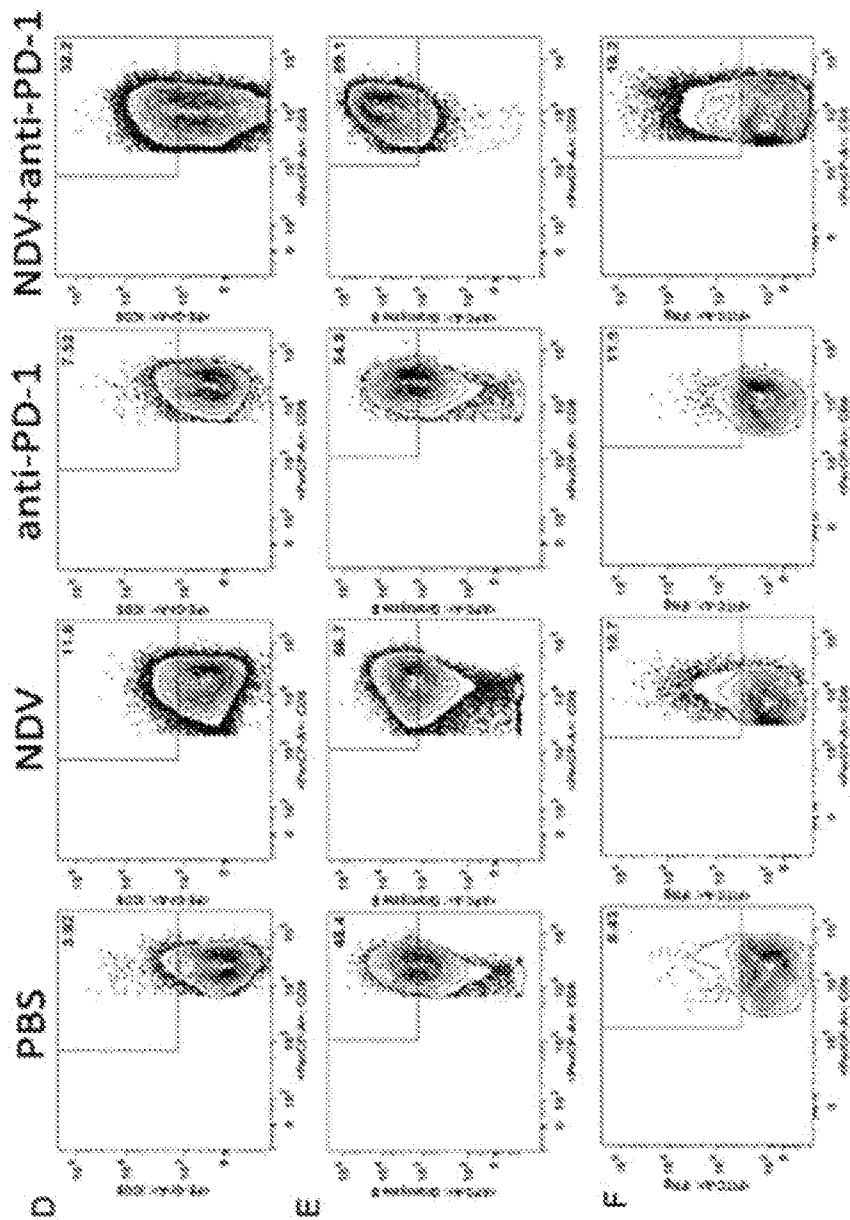


fig. 10D-10F

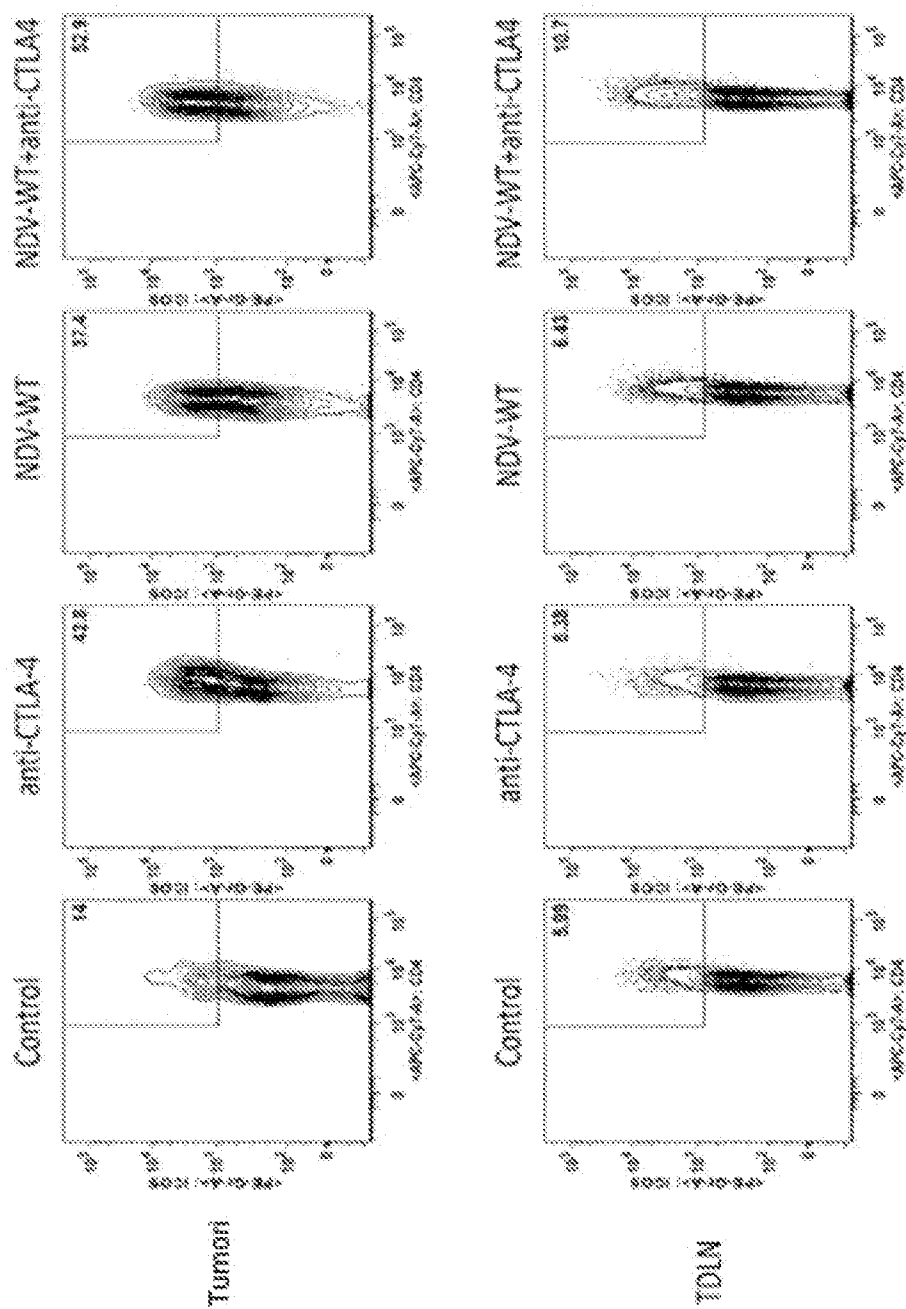
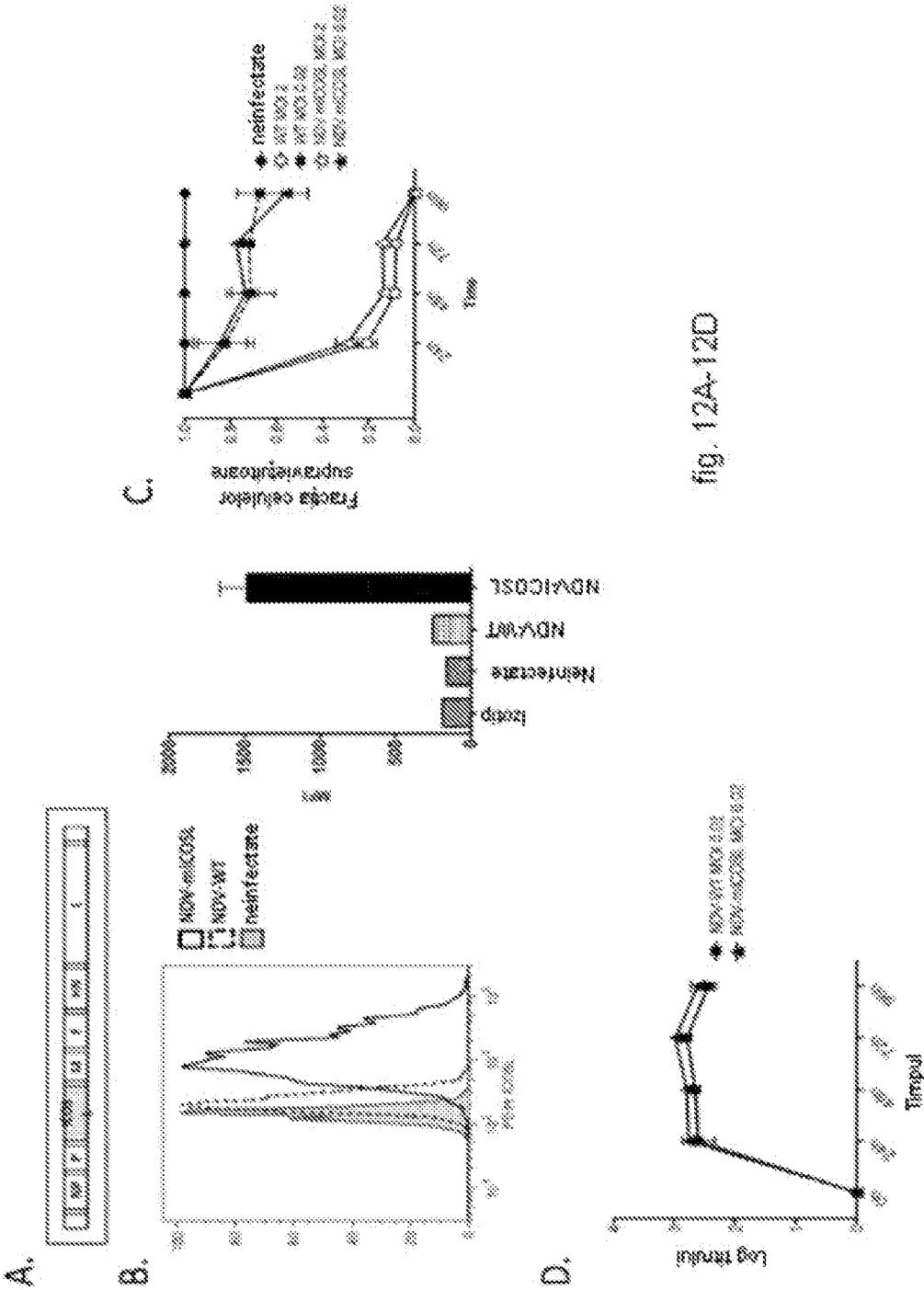


fig. 11



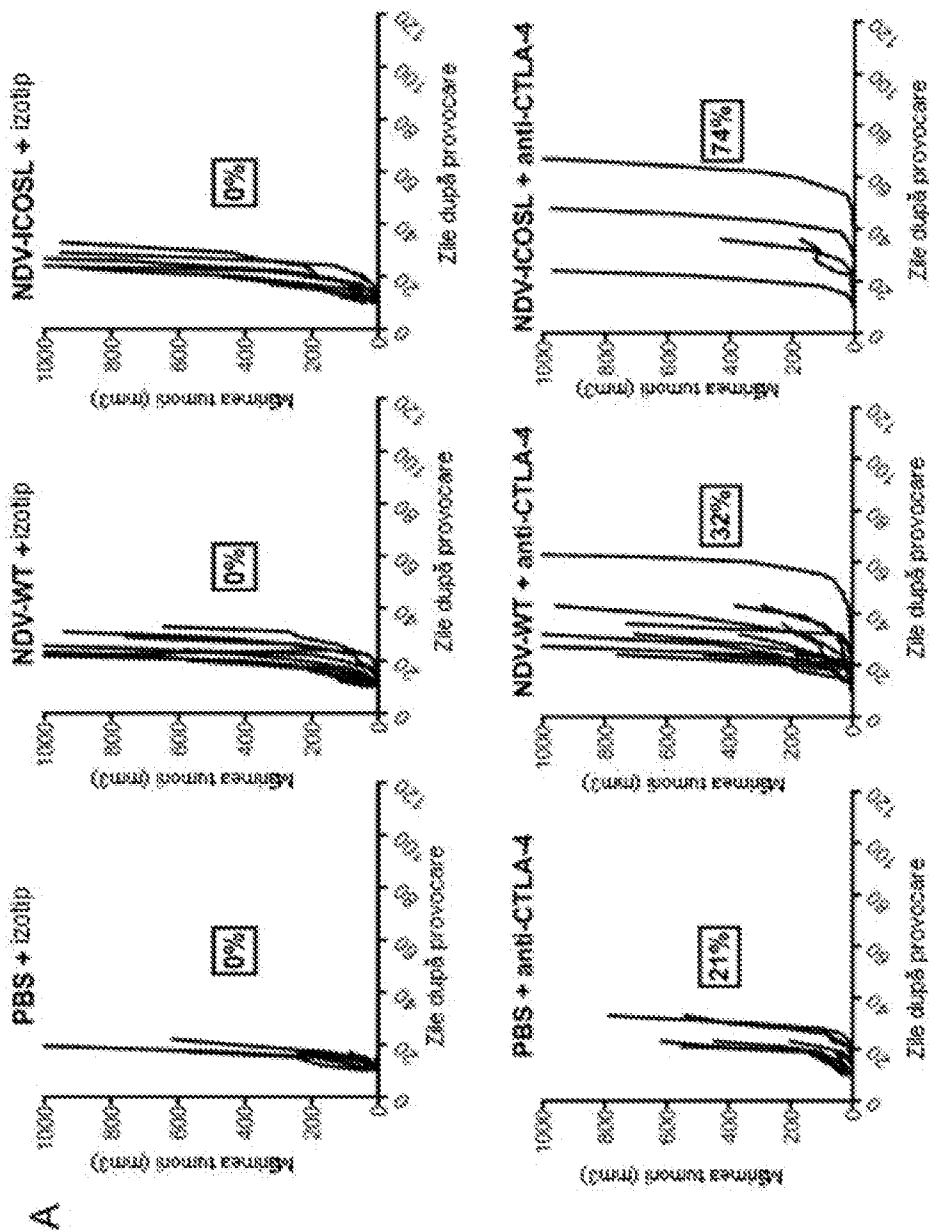
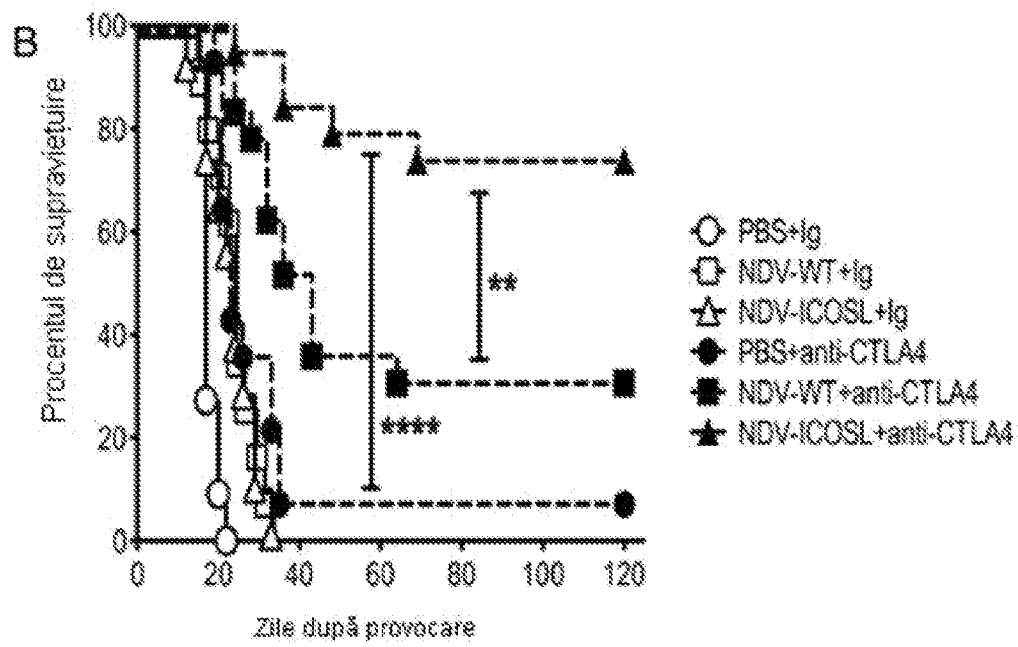


fig. 13A



C

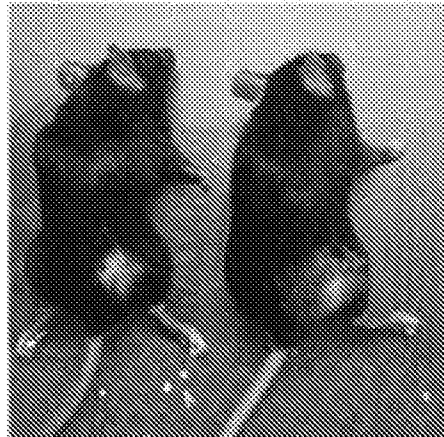


fig. 13B-13C

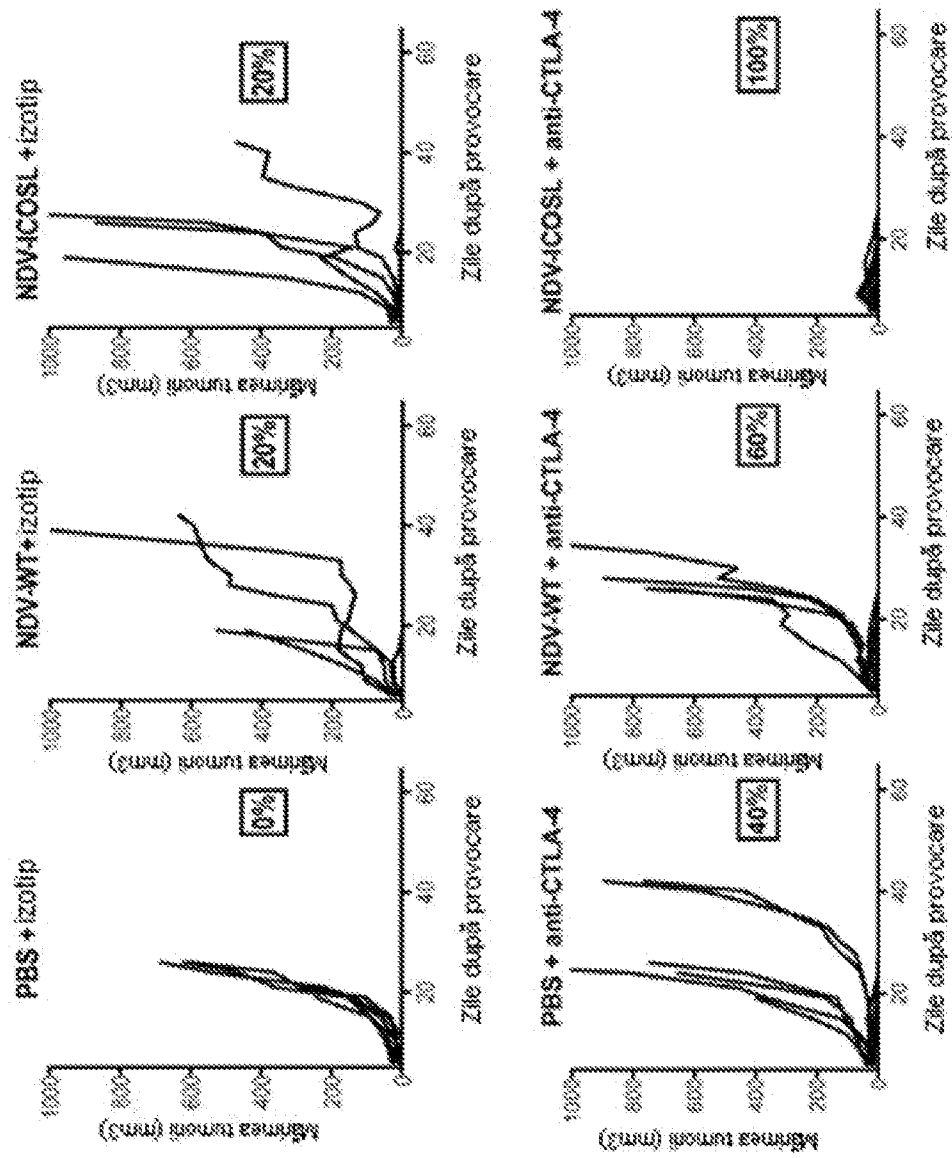


fig. 14A

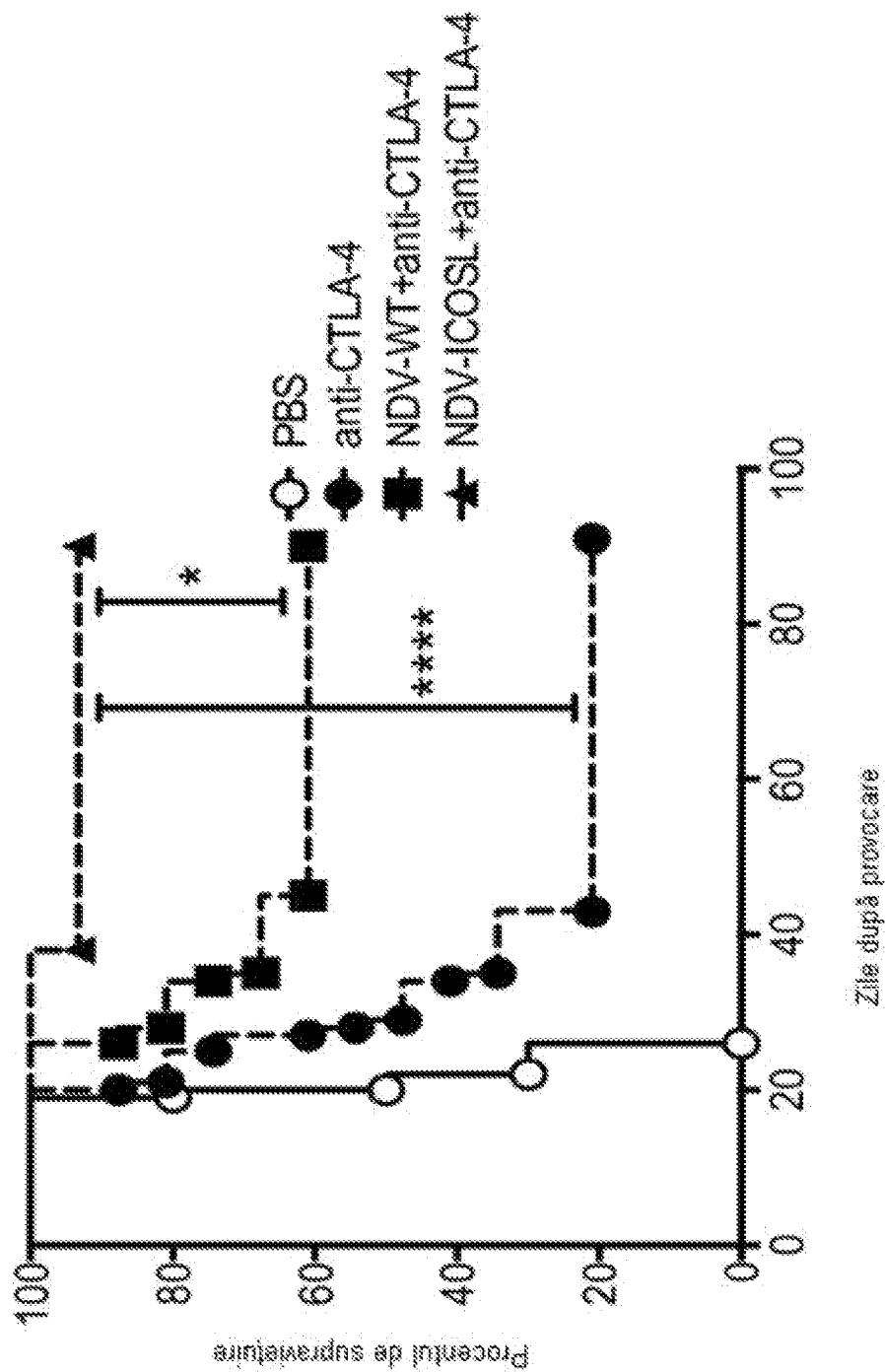


fig. 14B

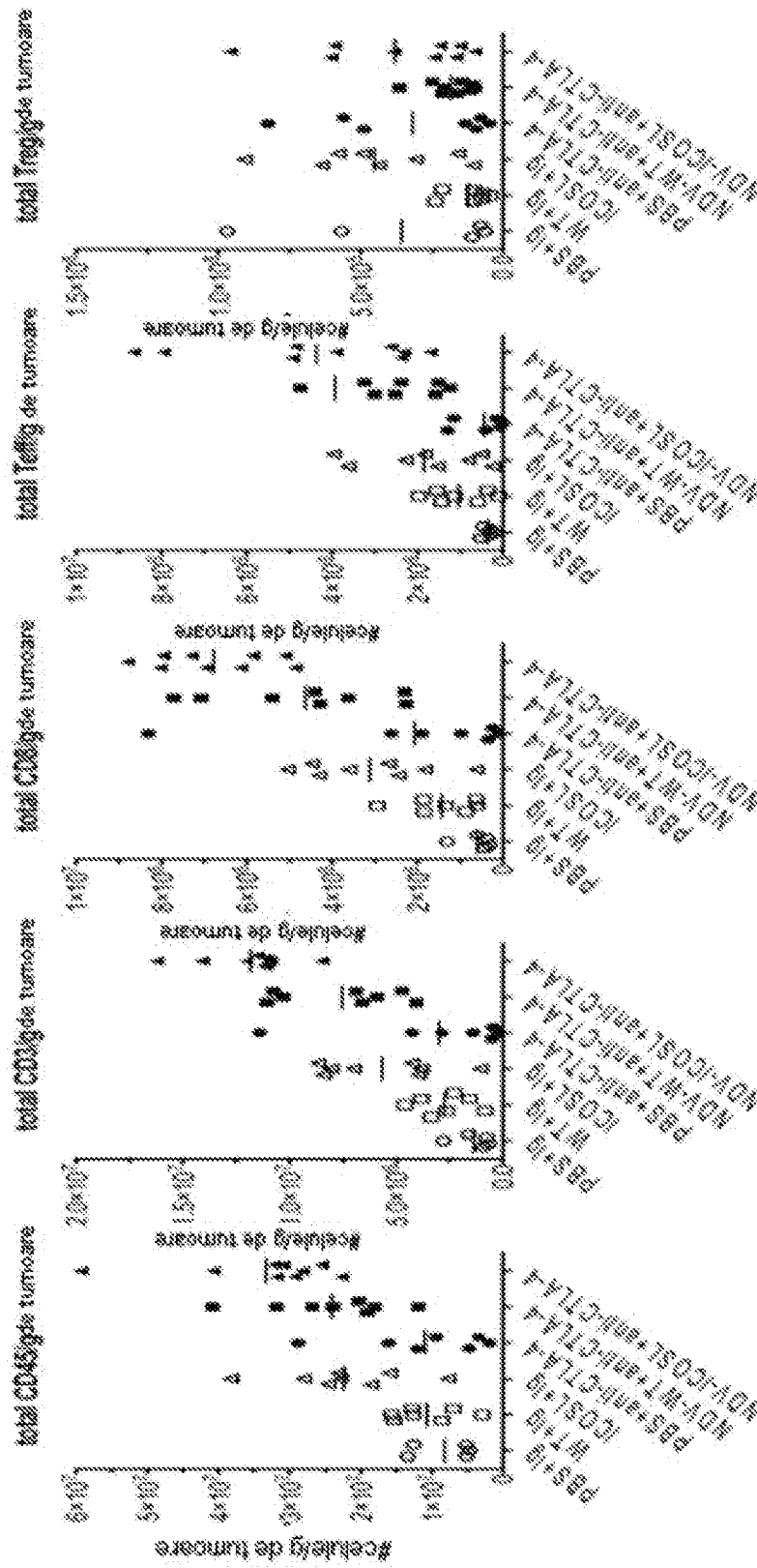


fig. 15A

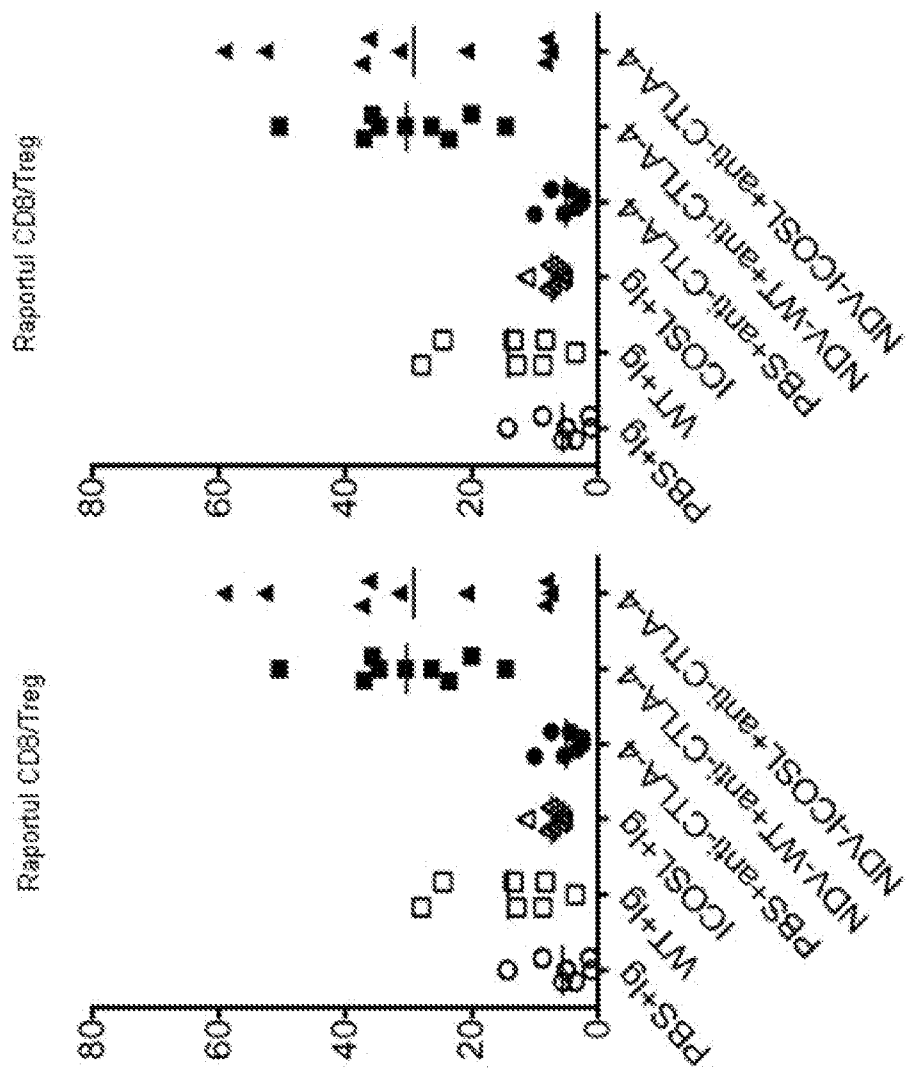


fig. 15B

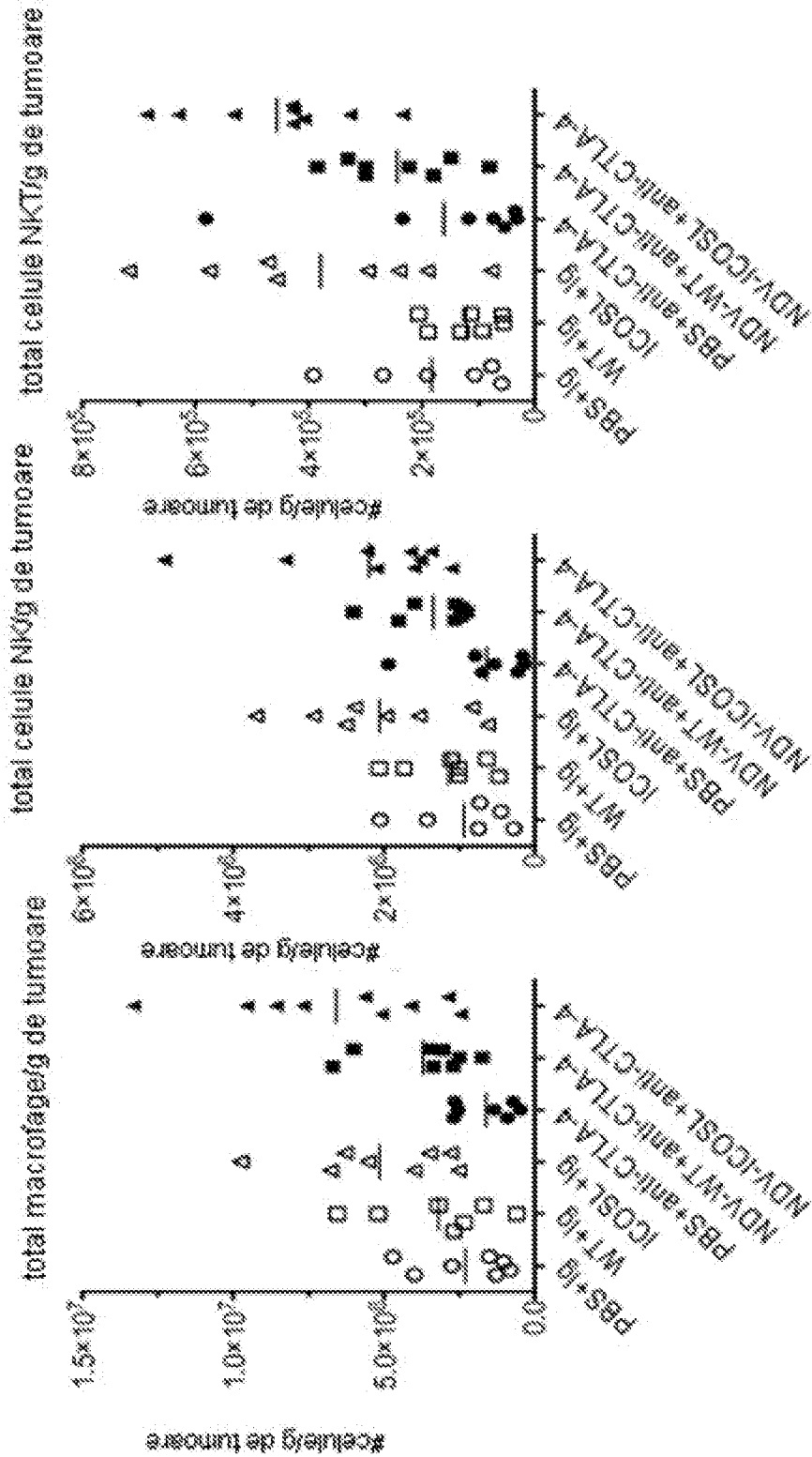


fig. 15C

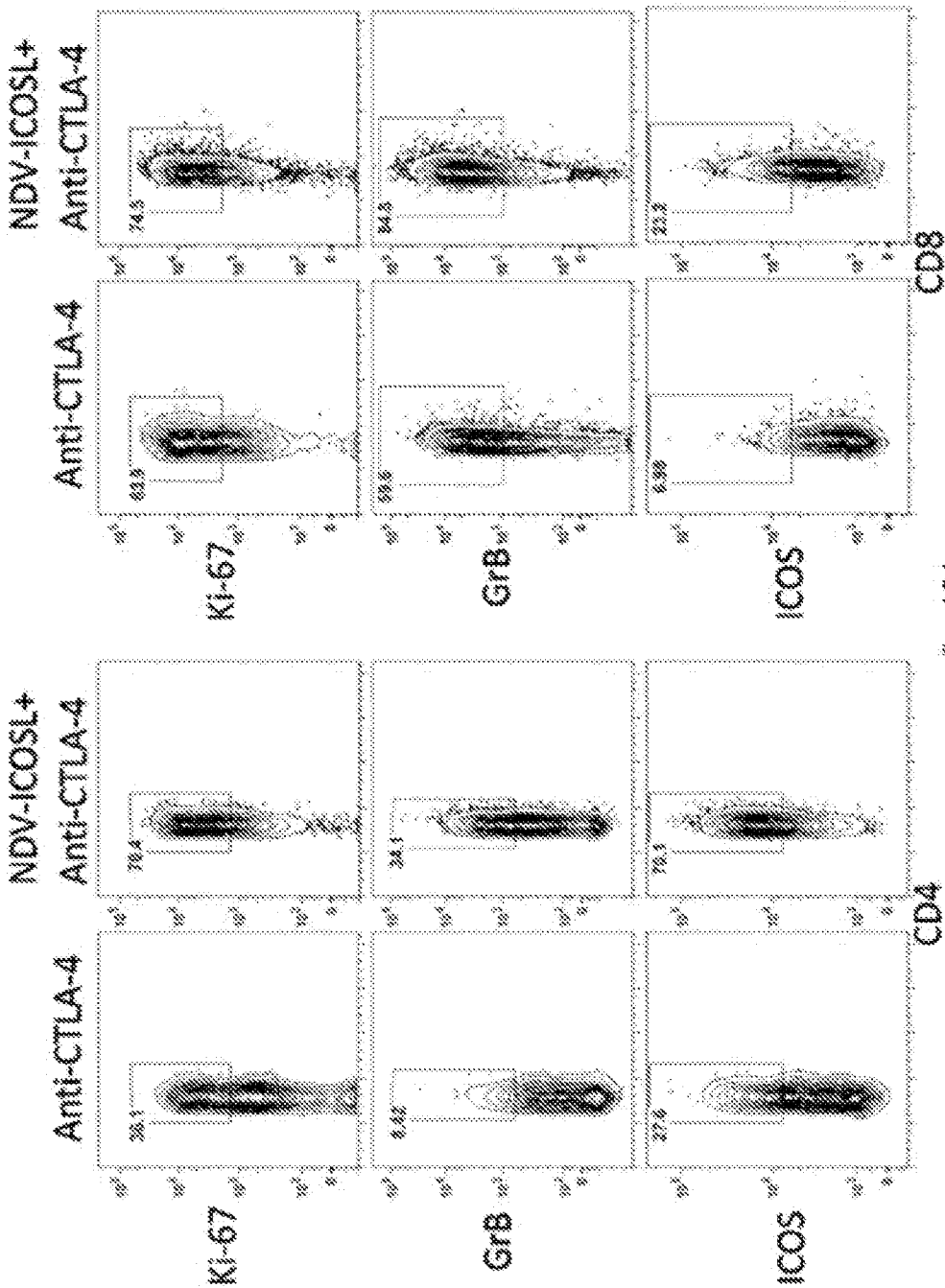


fig. 16A

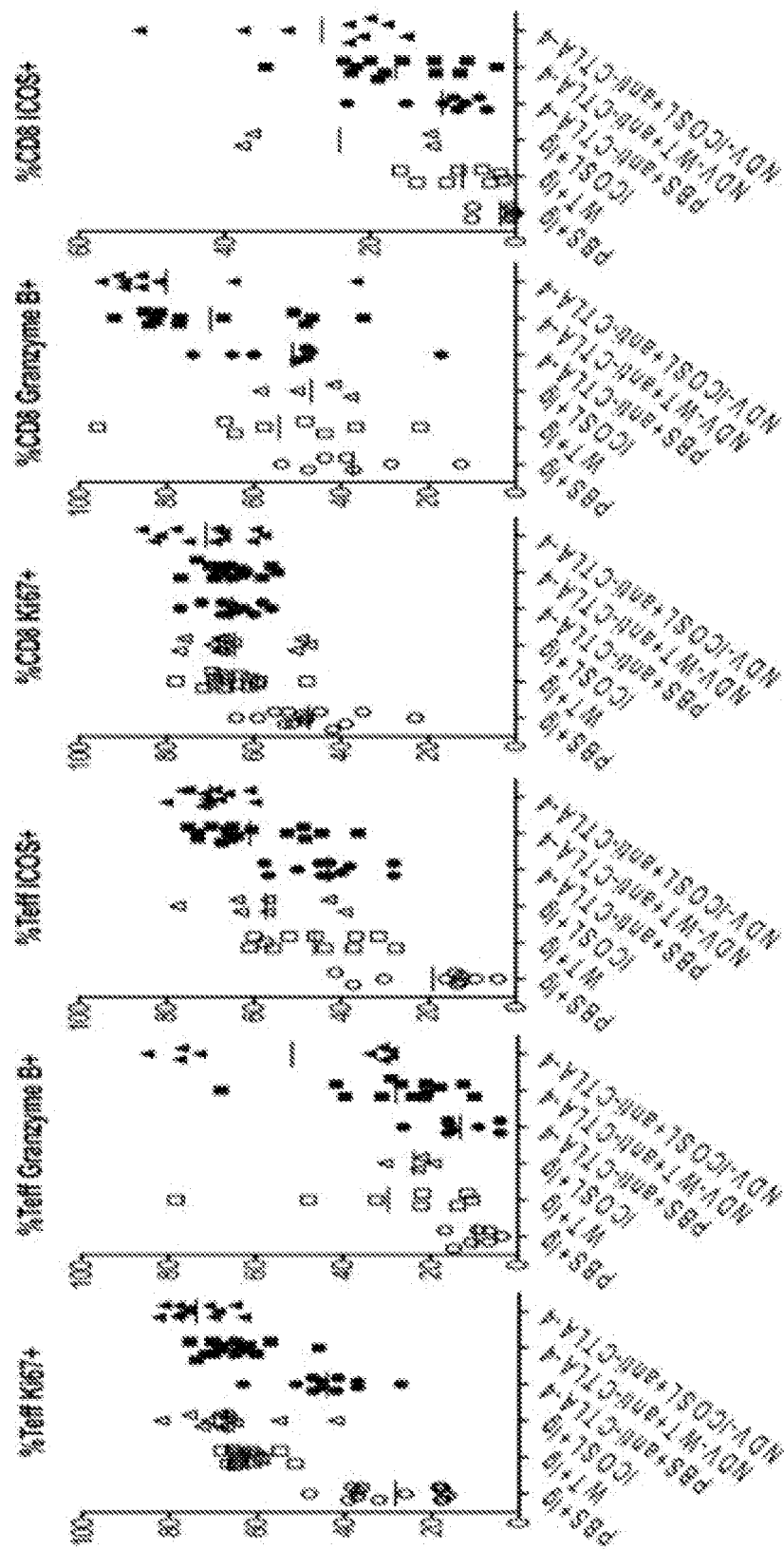


fig. 16B

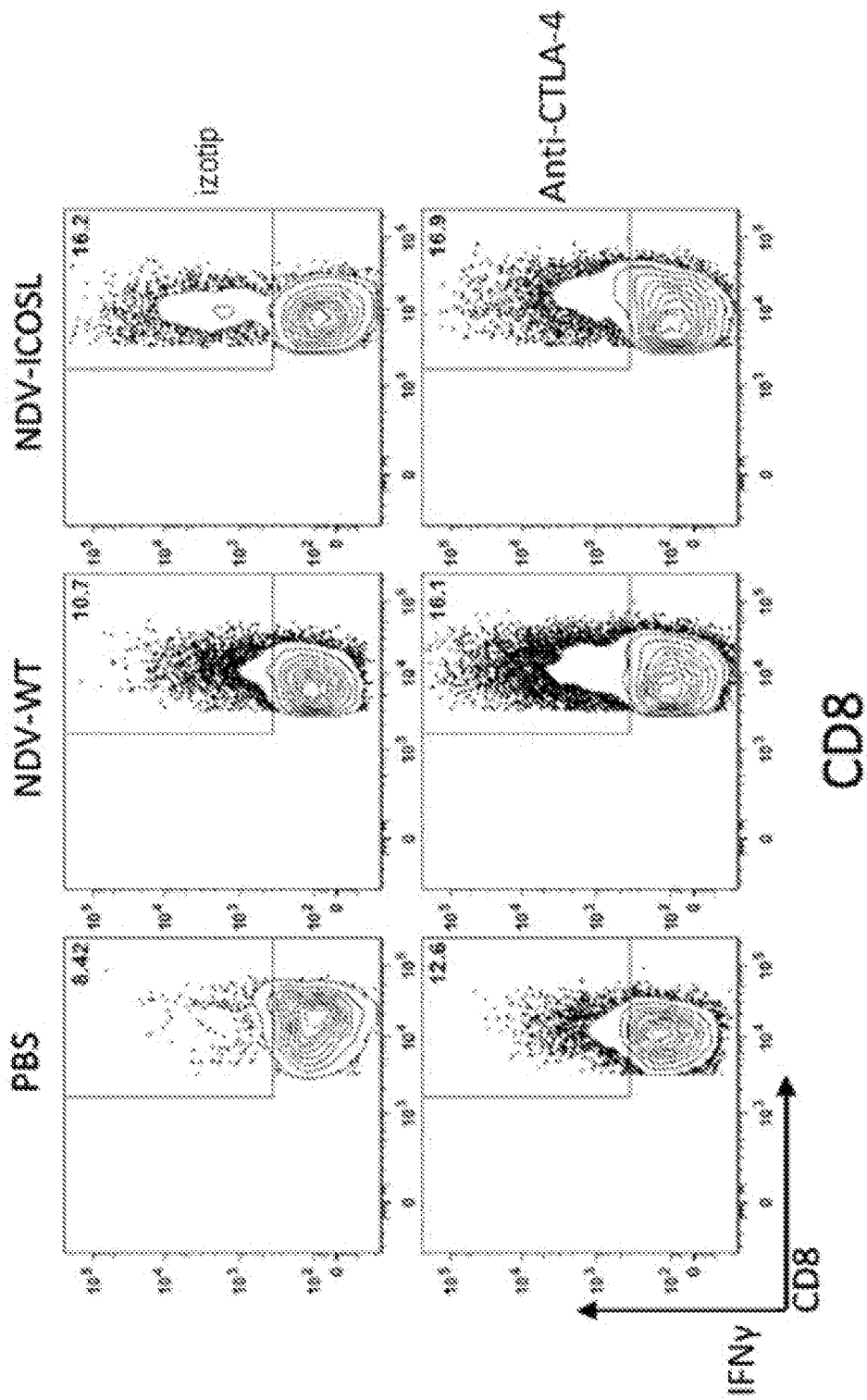


fig. 17

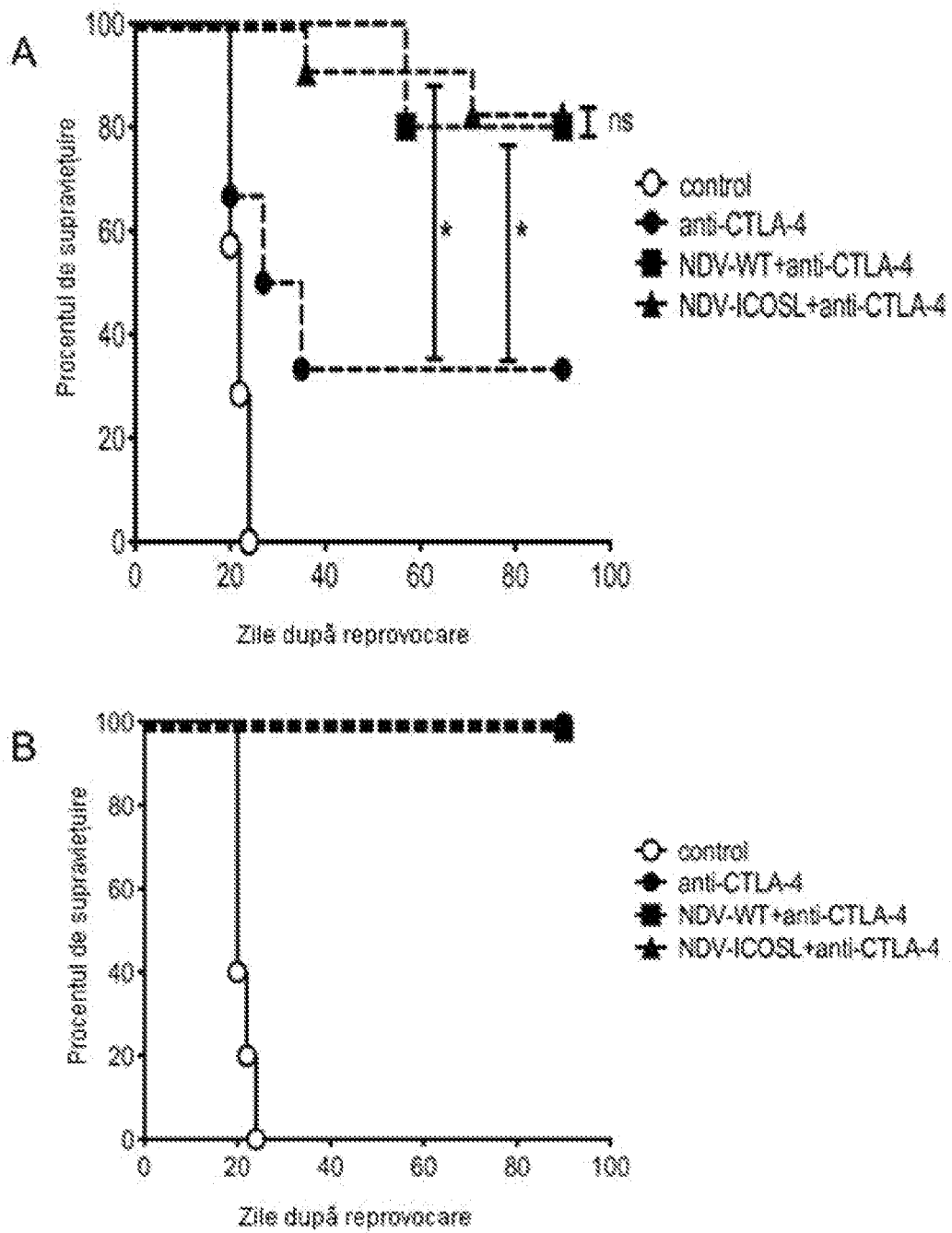


fig. 18A-18B

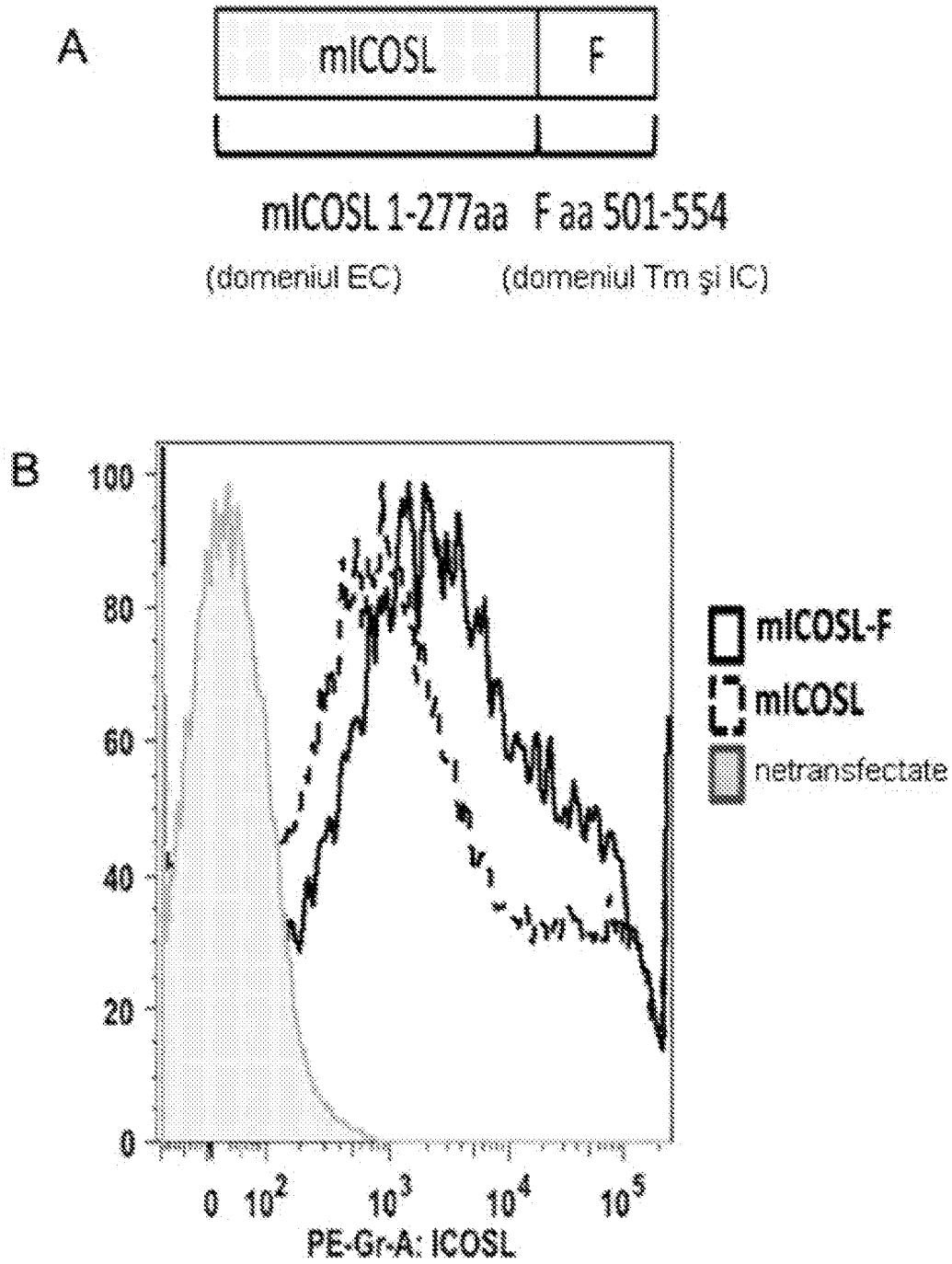
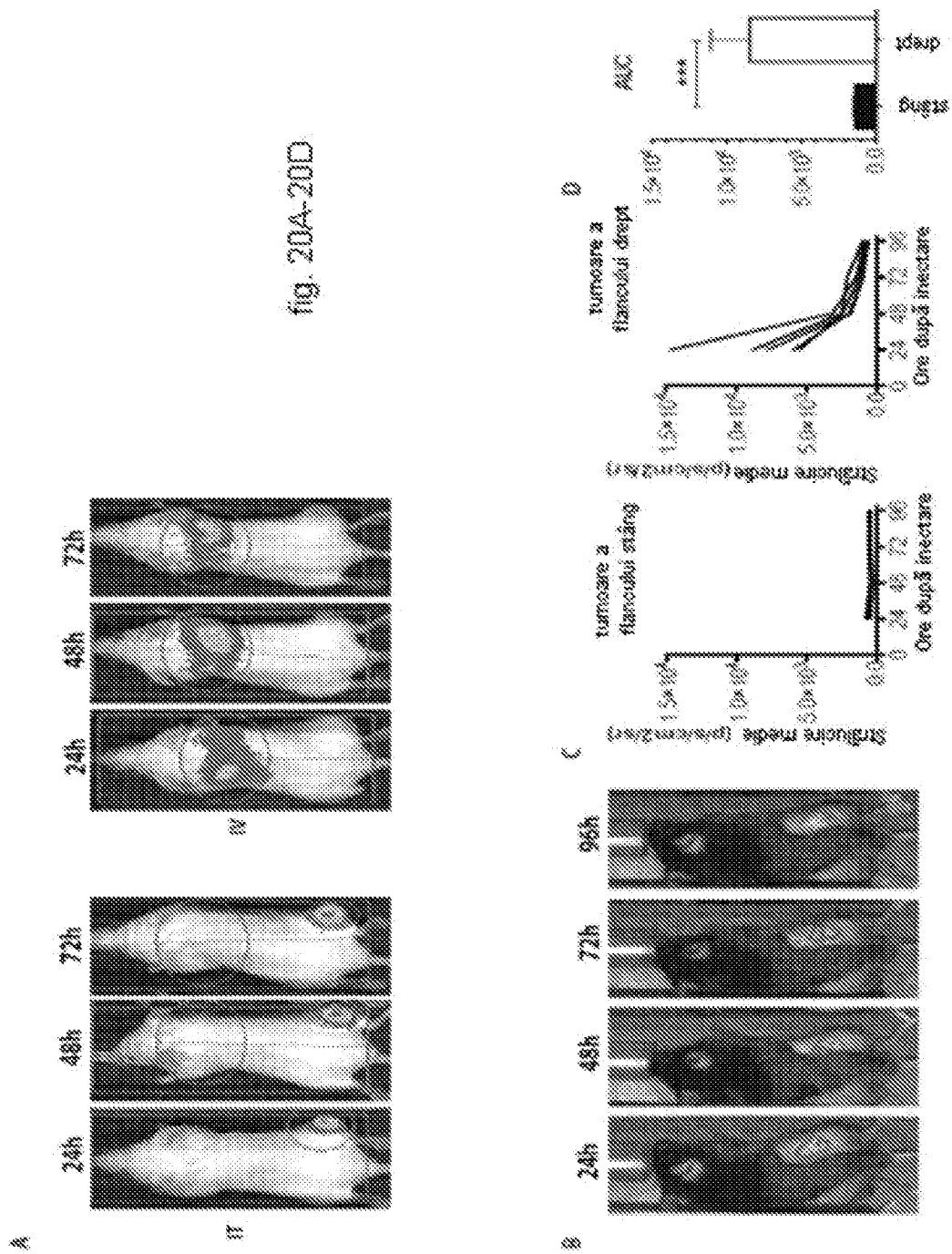


fig. 19A-19B

fig. 204-200



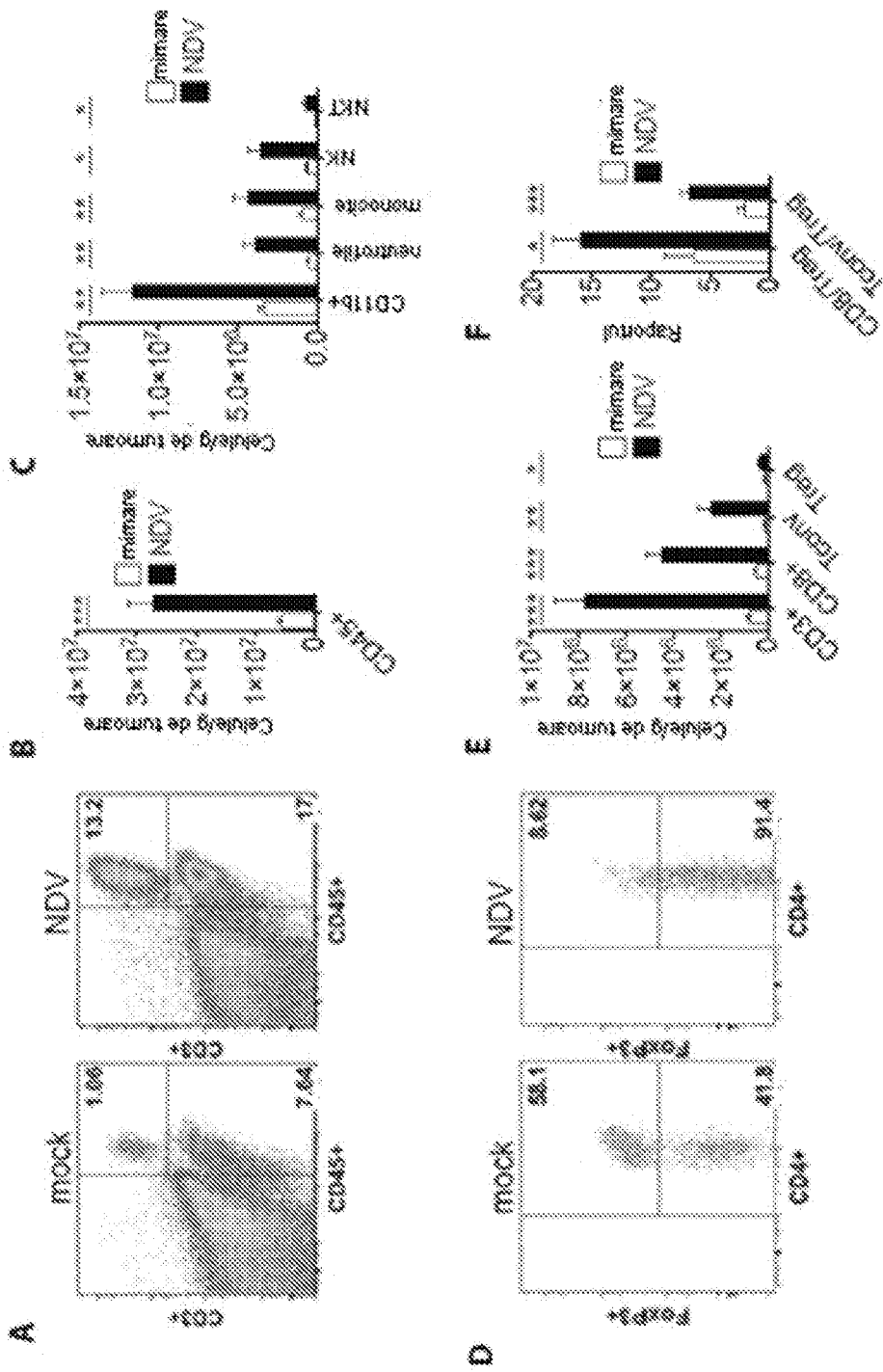
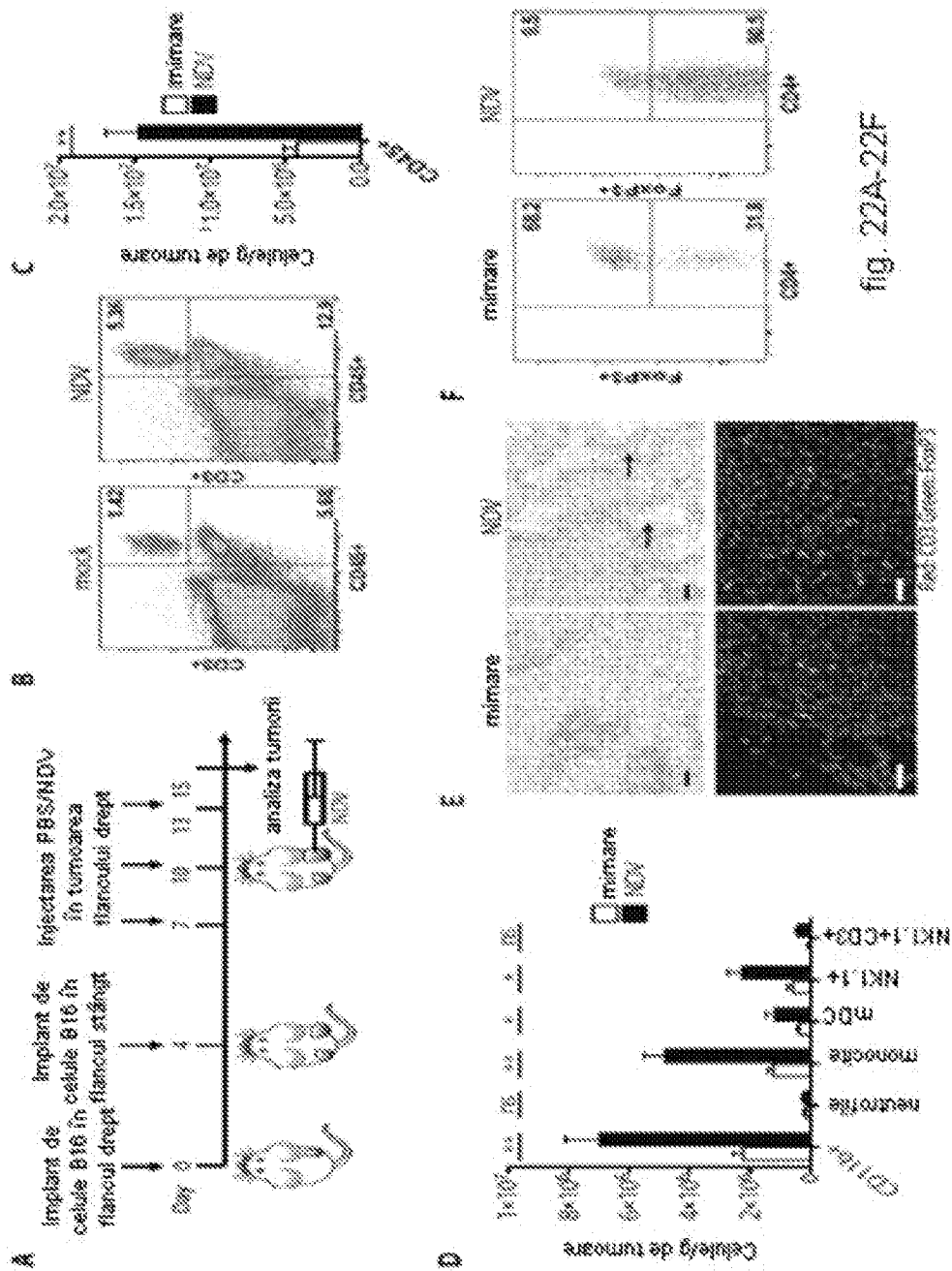


fig. 21A-21F



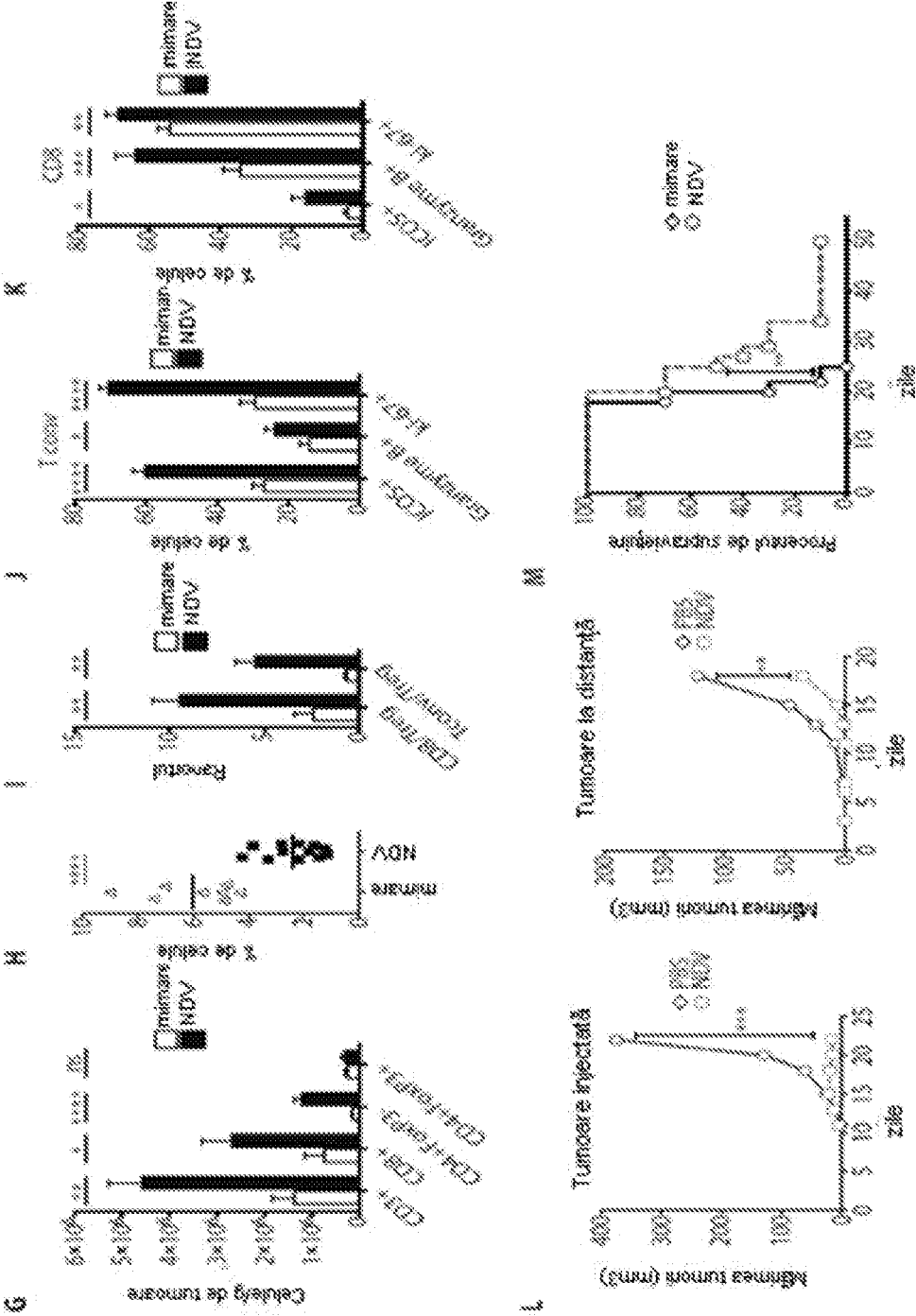
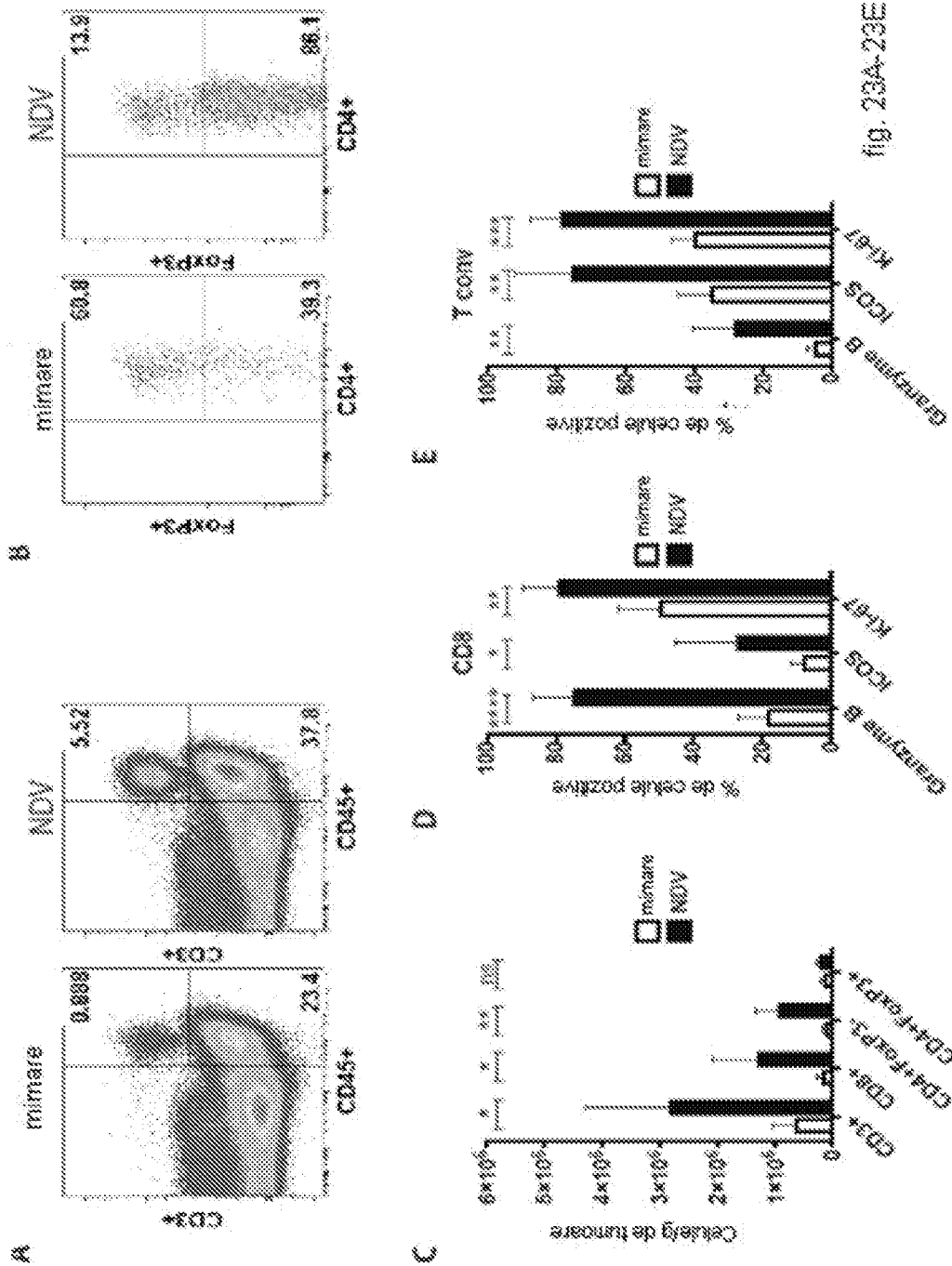


fig. 22G-22M



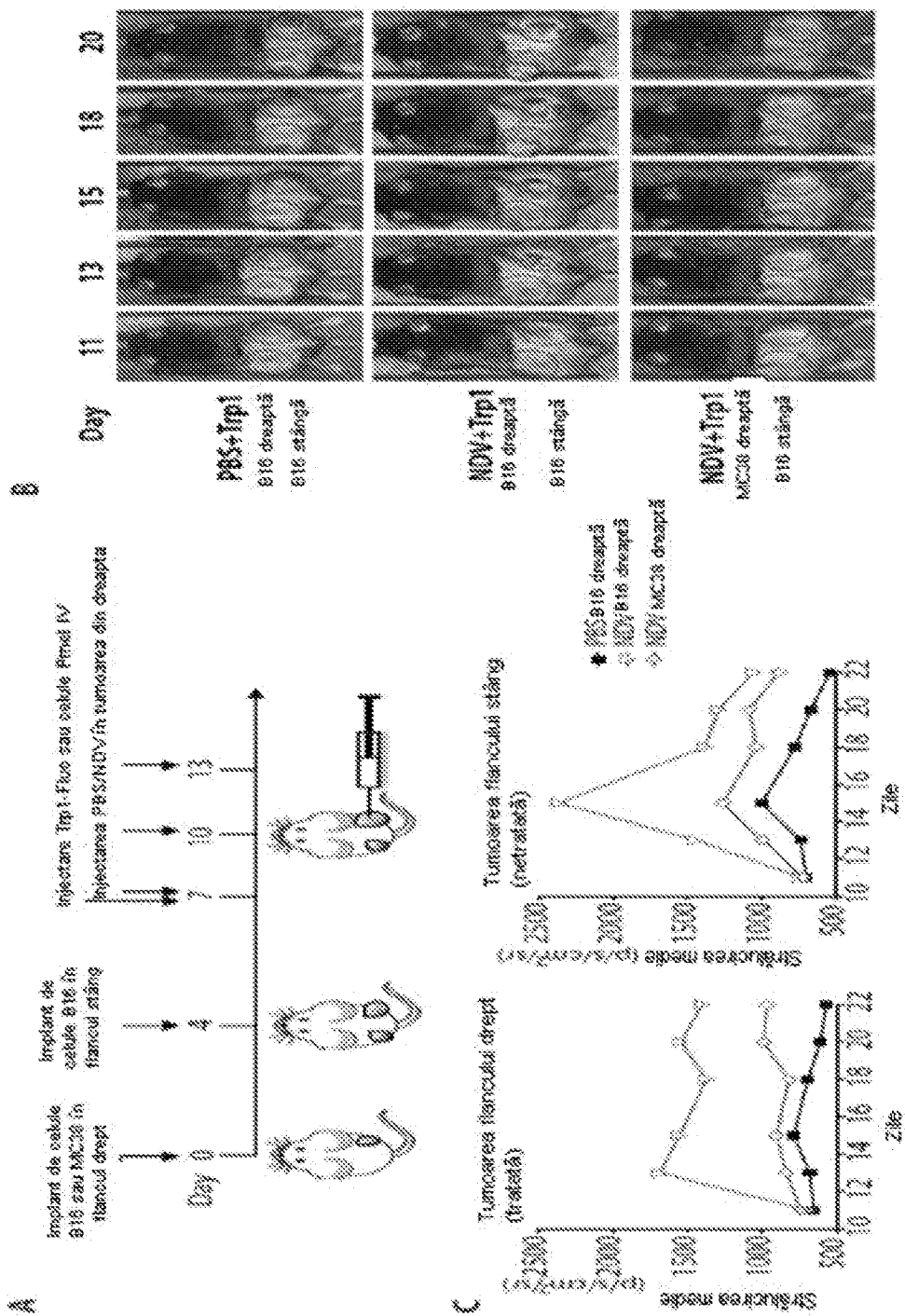


fig. 24A-24C

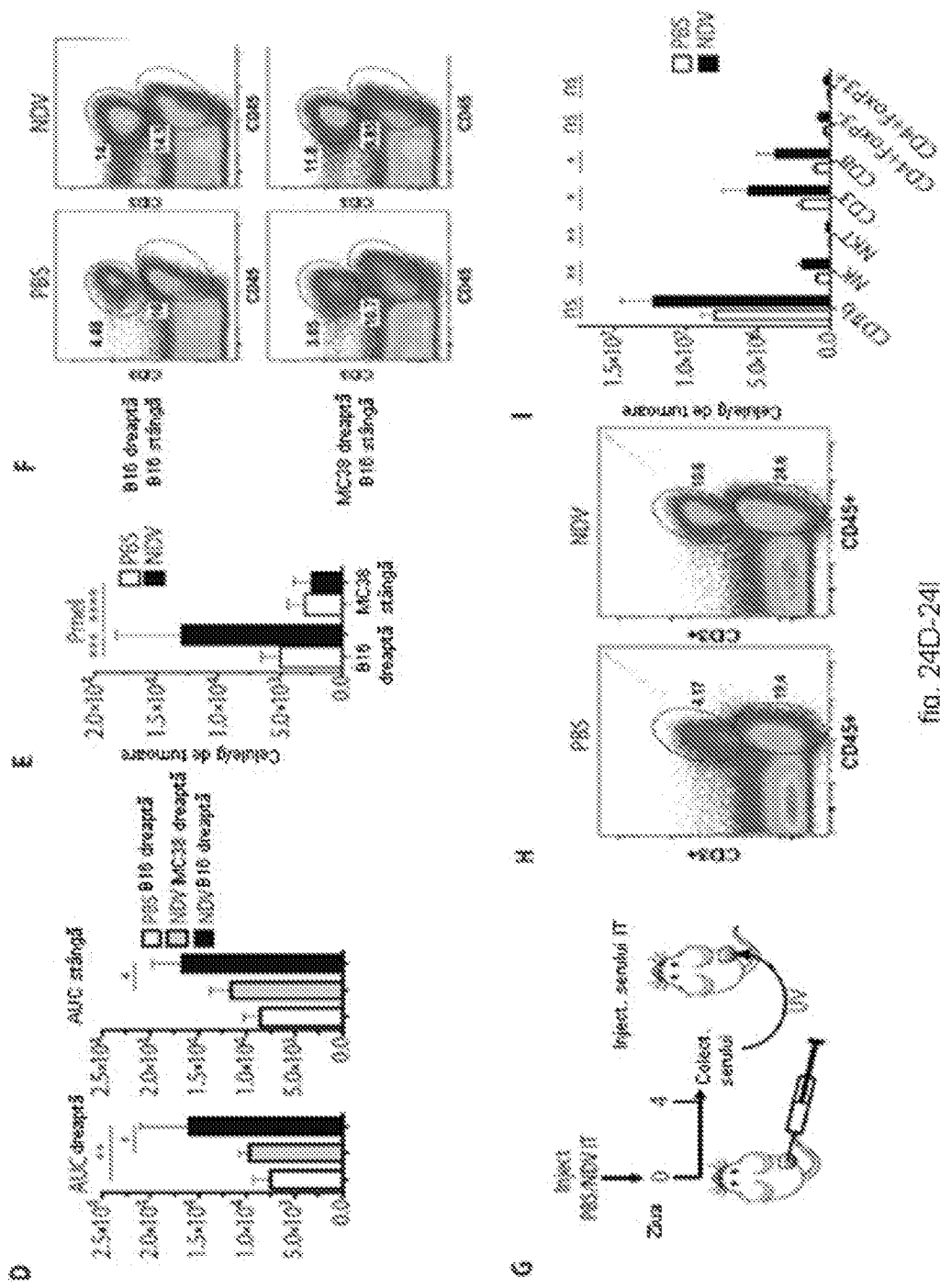


fig. 24D-24I

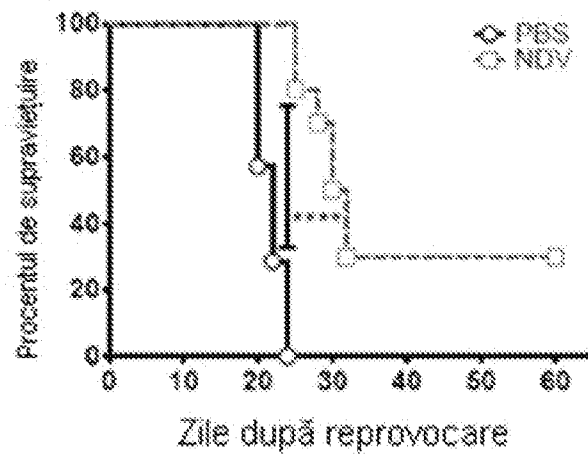
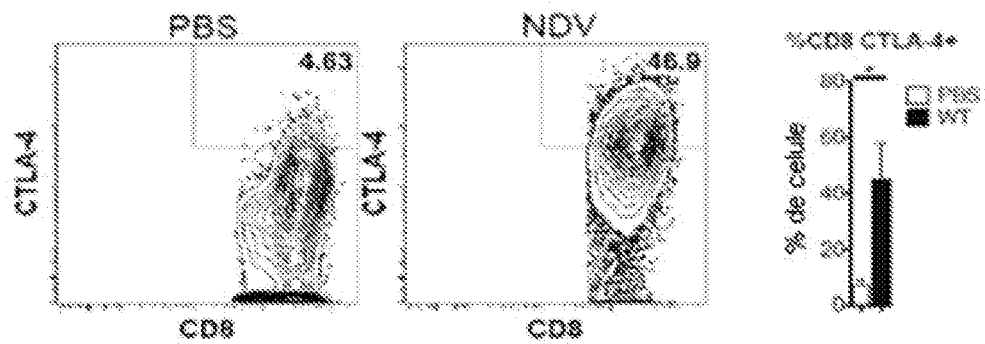


fig. 25

A



B

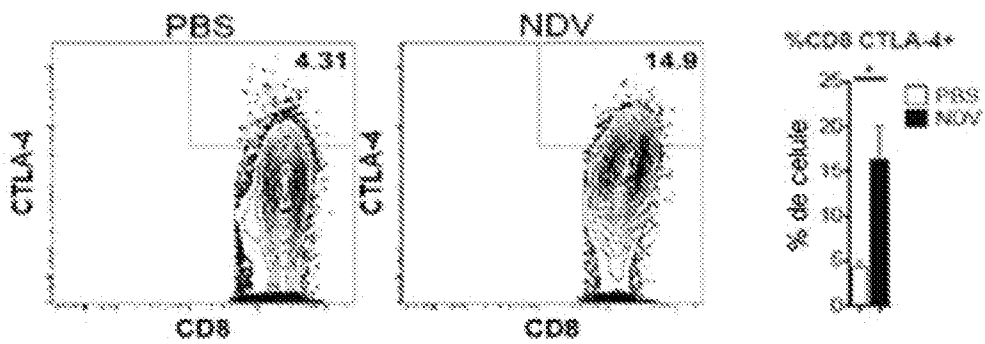


fig. 26

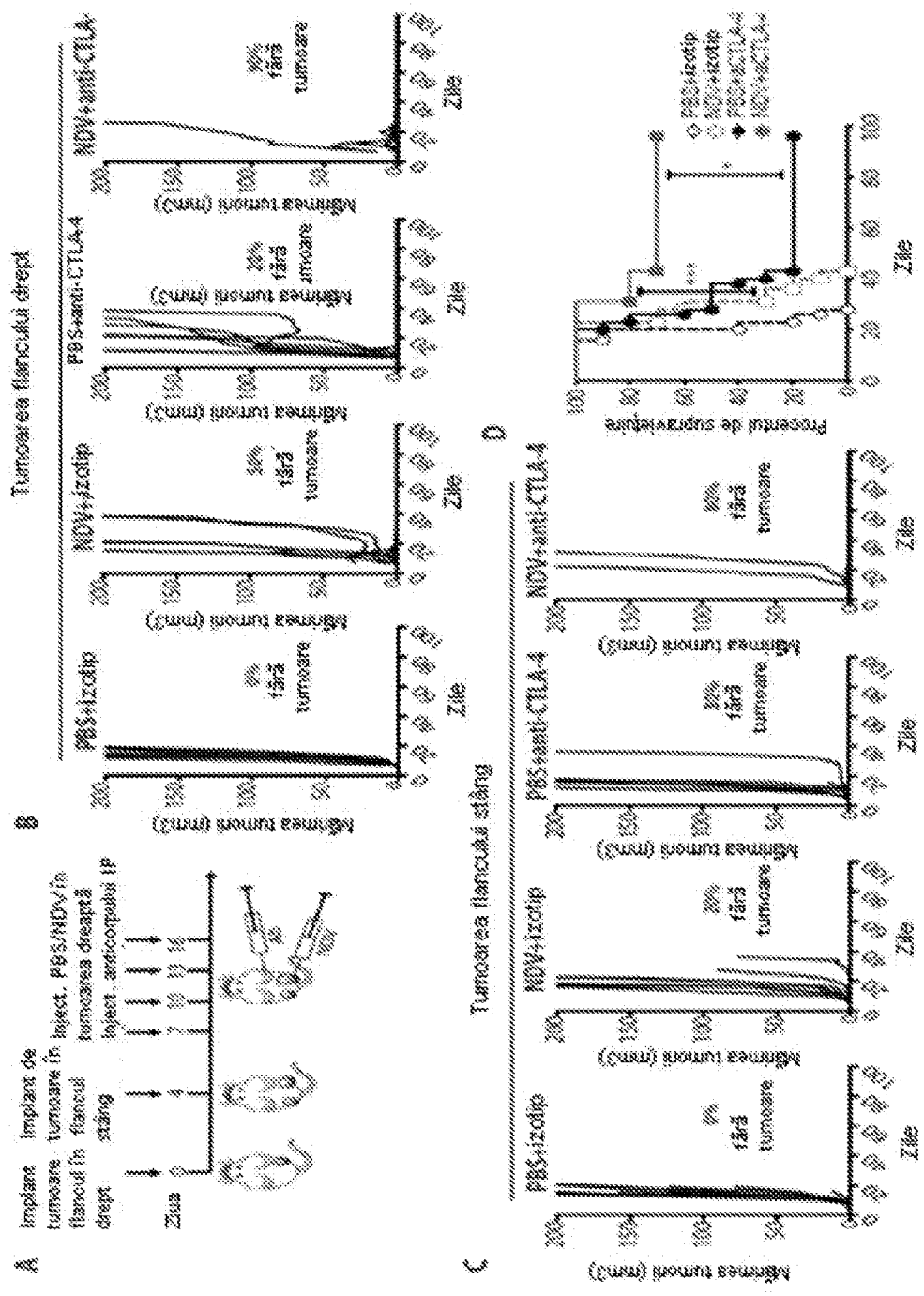


fig. 27A-27D

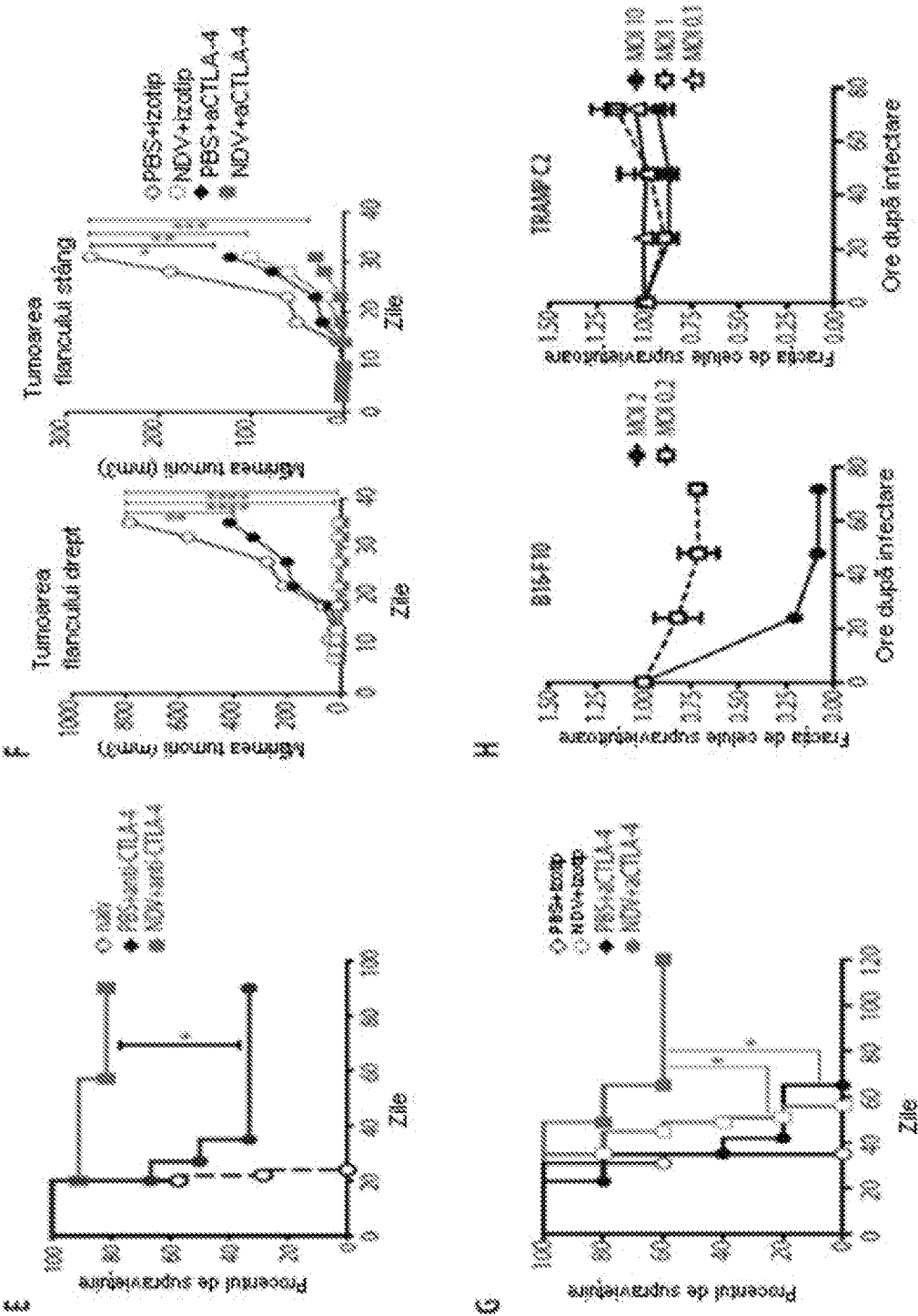


fig. 27E-27H

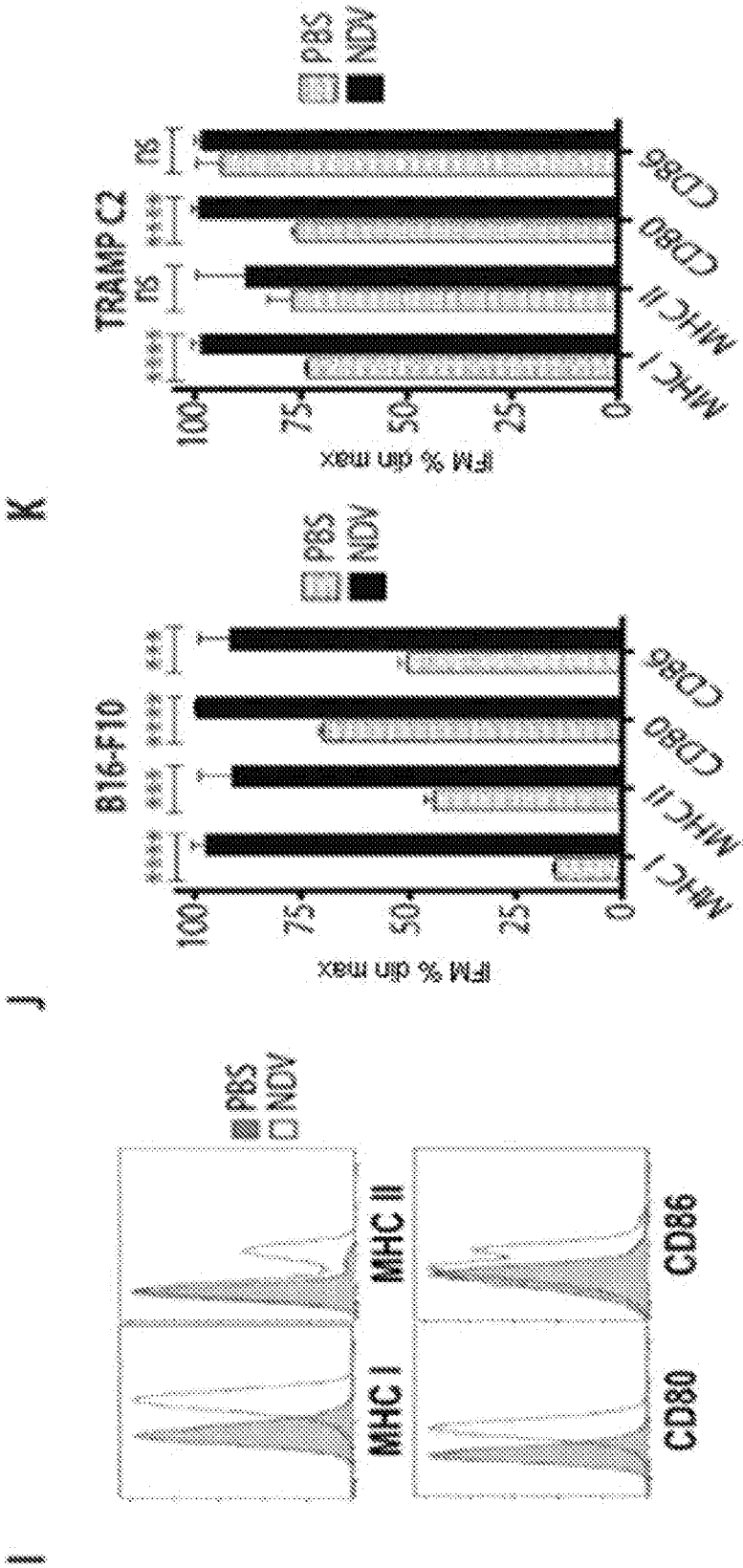
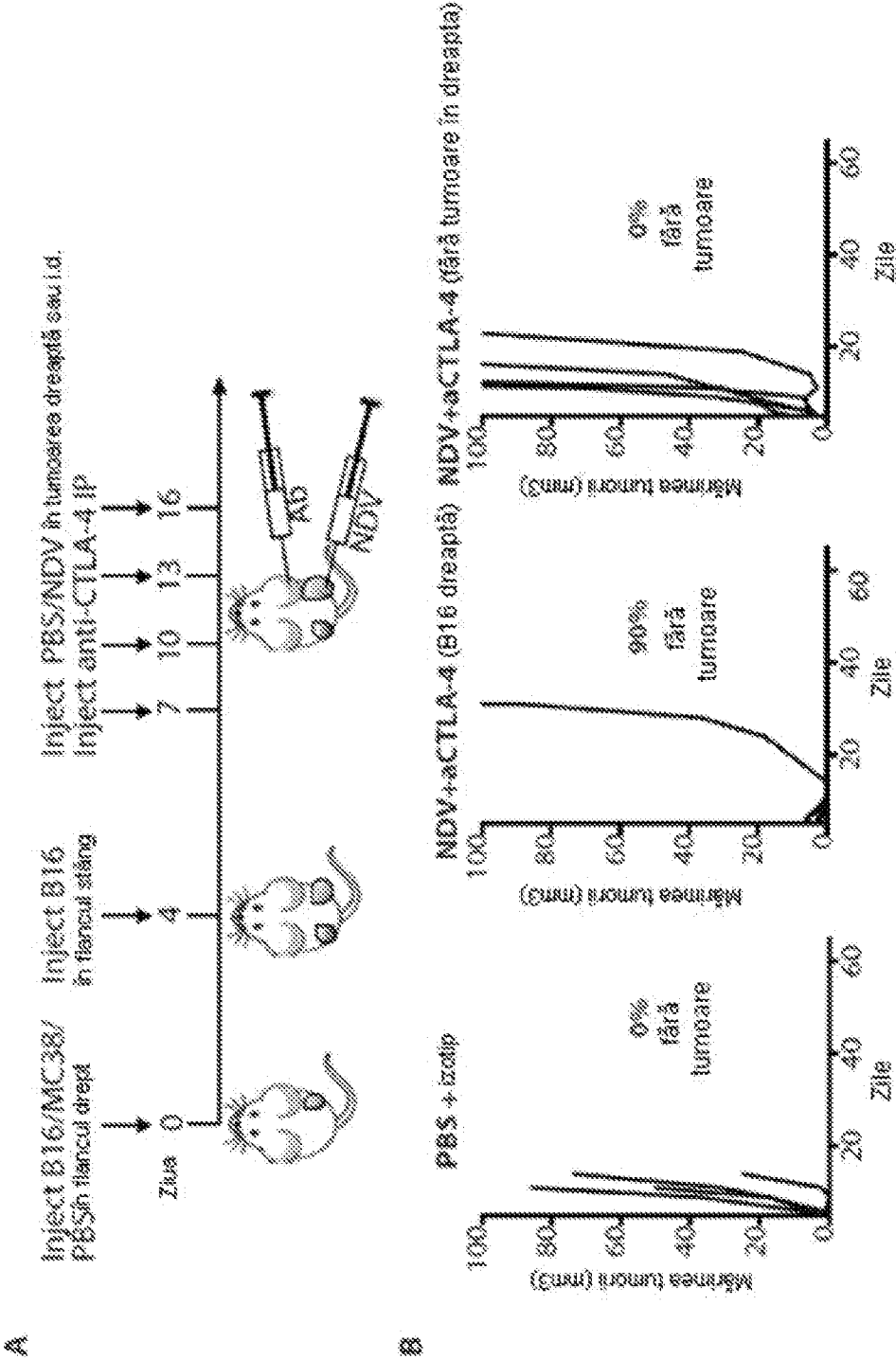


fig. 27I-27K



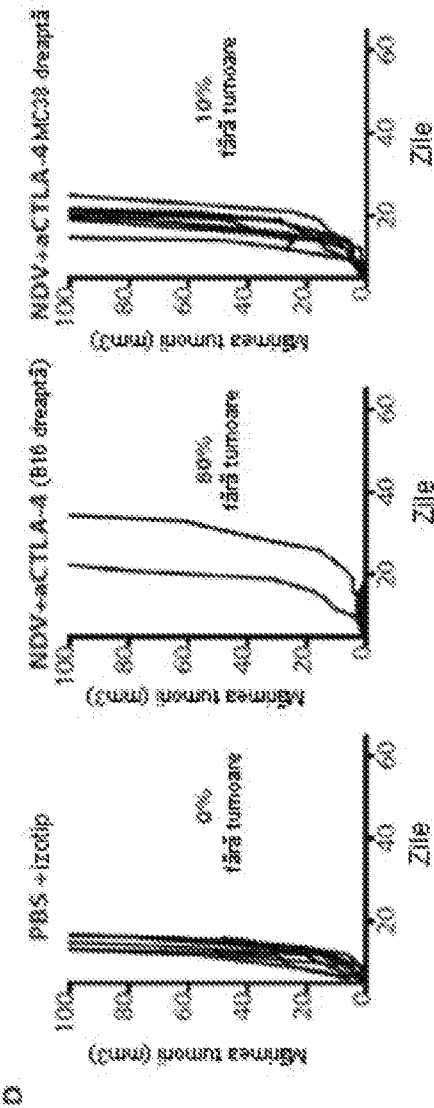
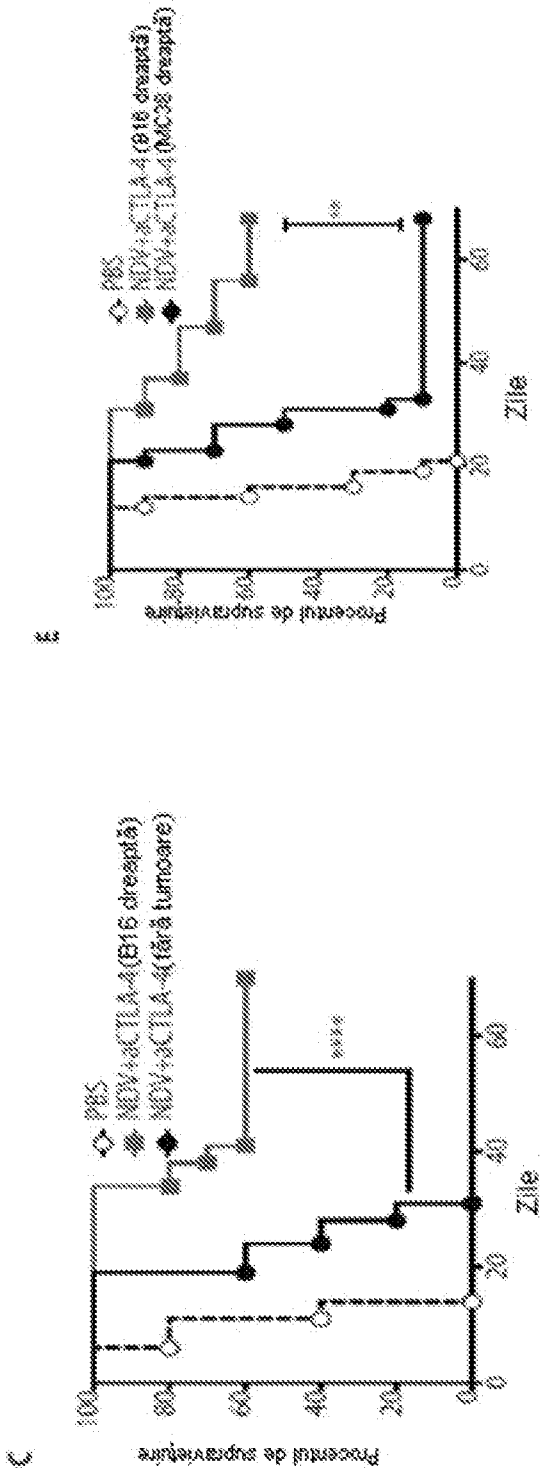


fig. 28C-28E

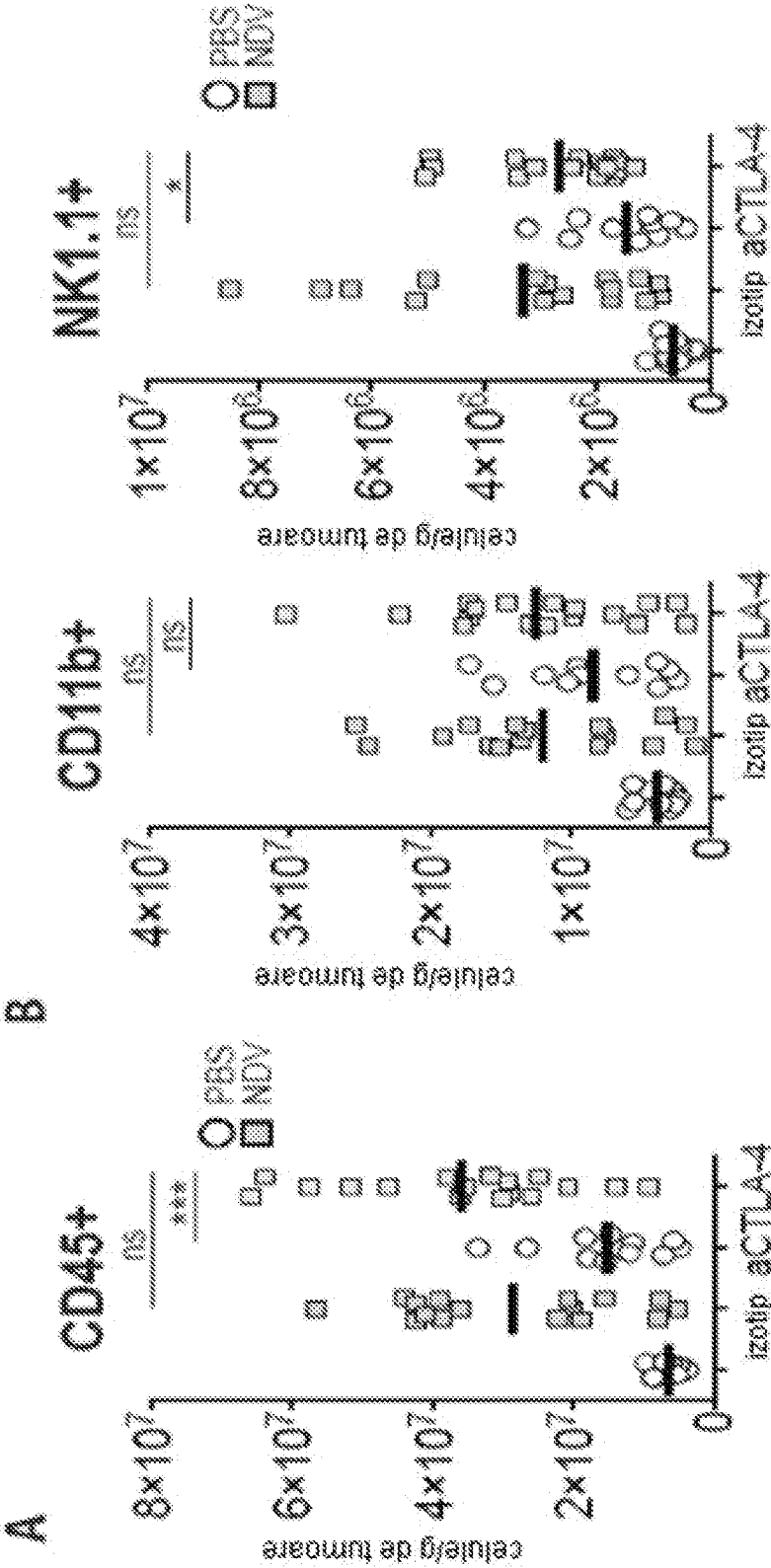


fig. 29A-29B

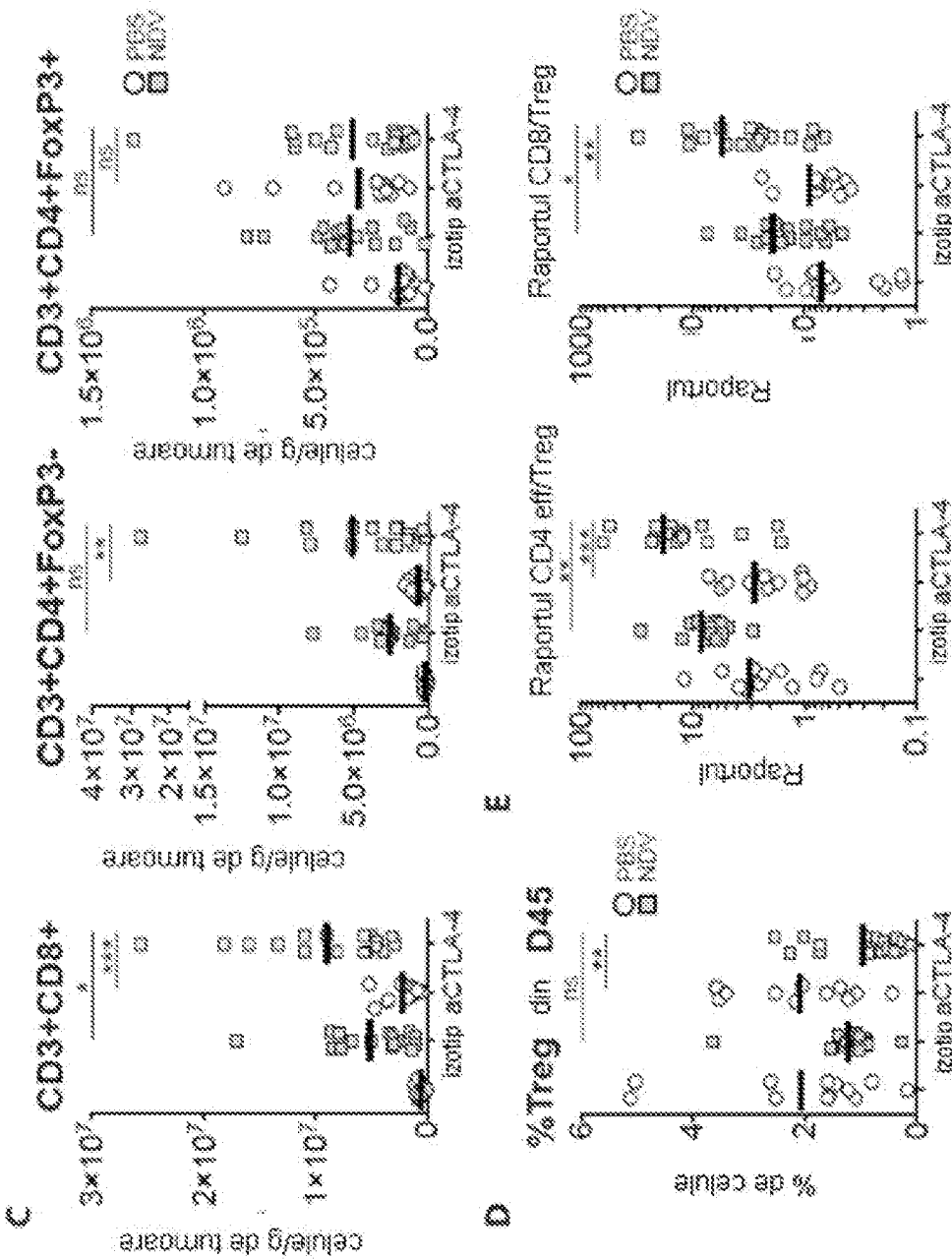
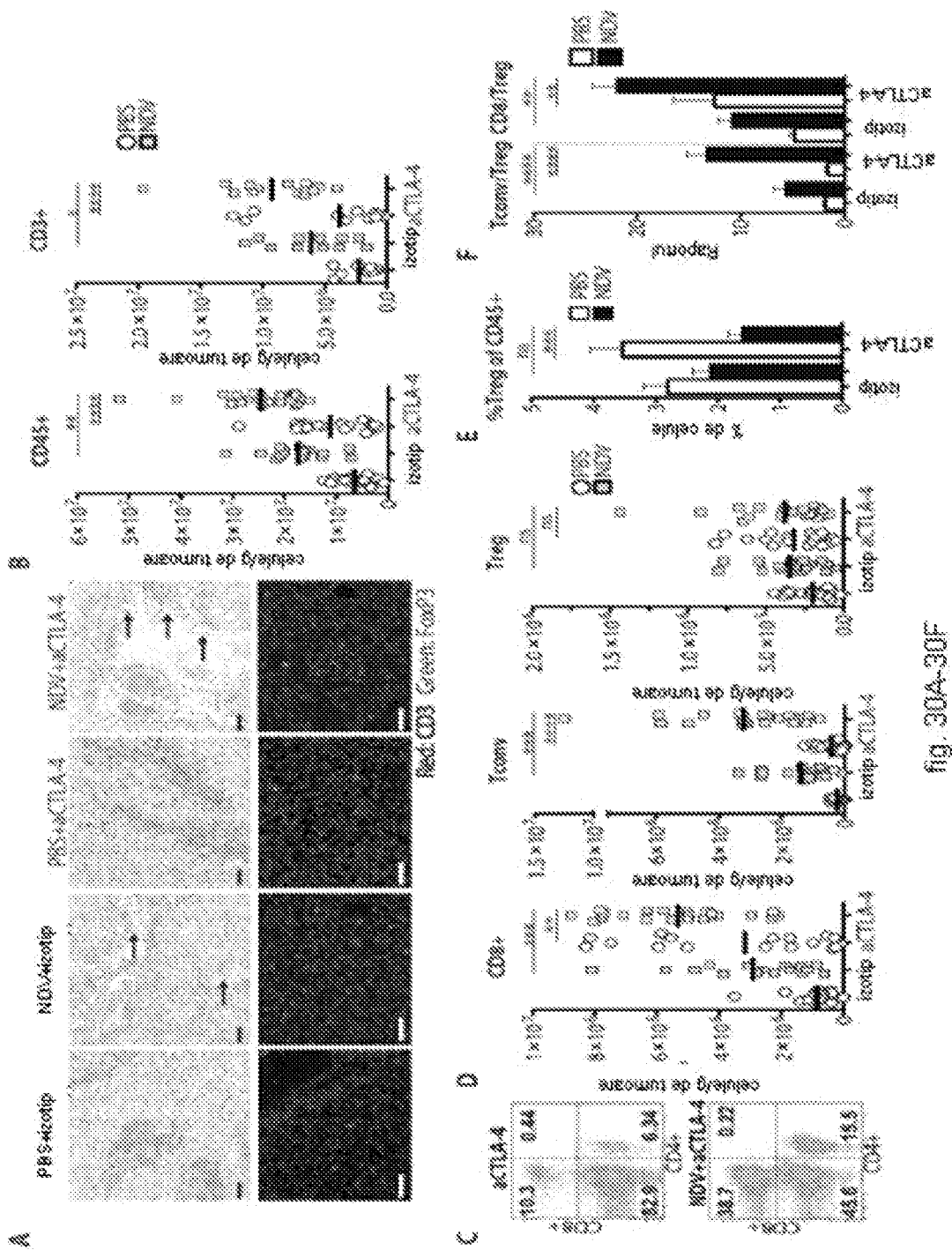


fig. 28C-28E



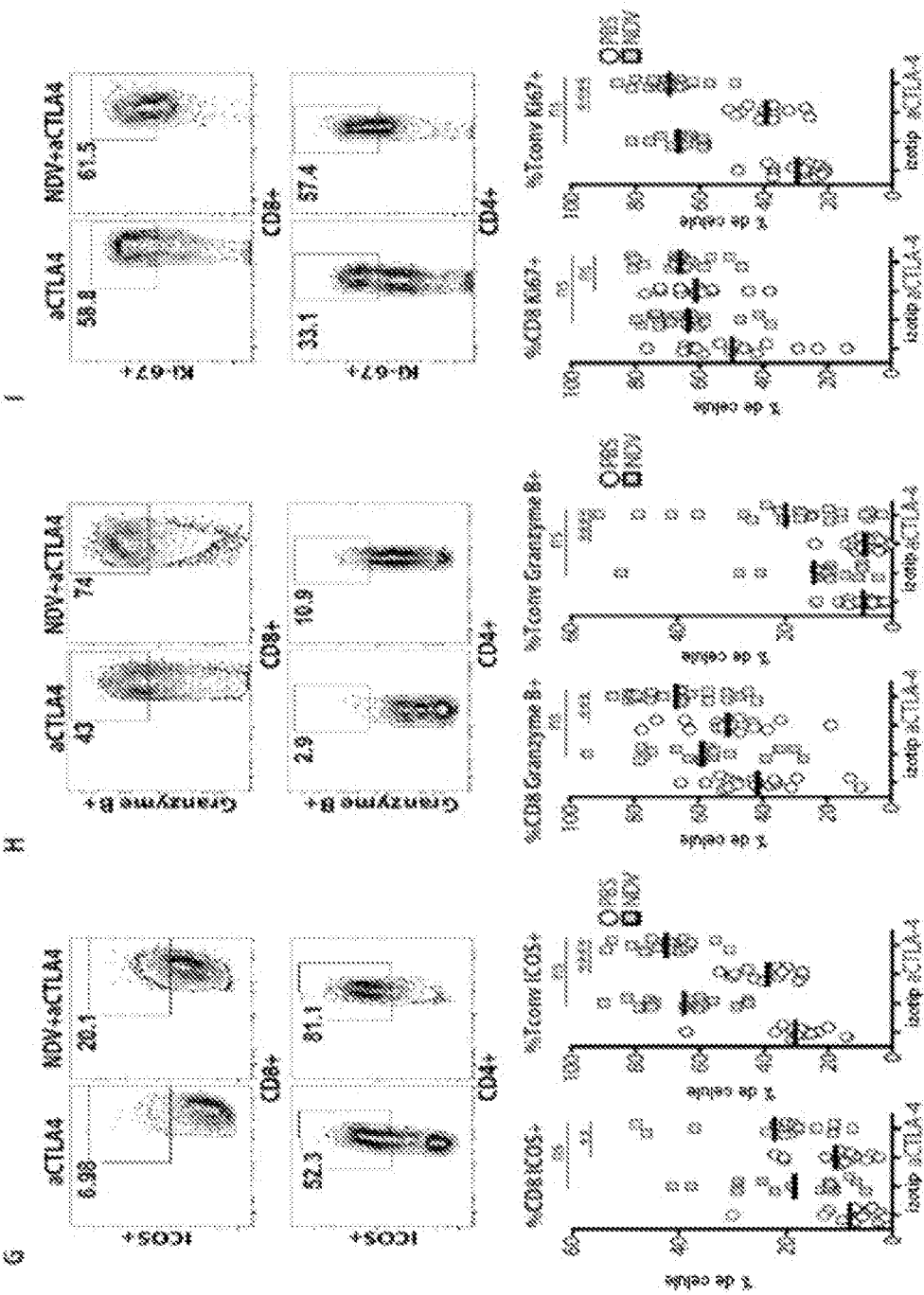
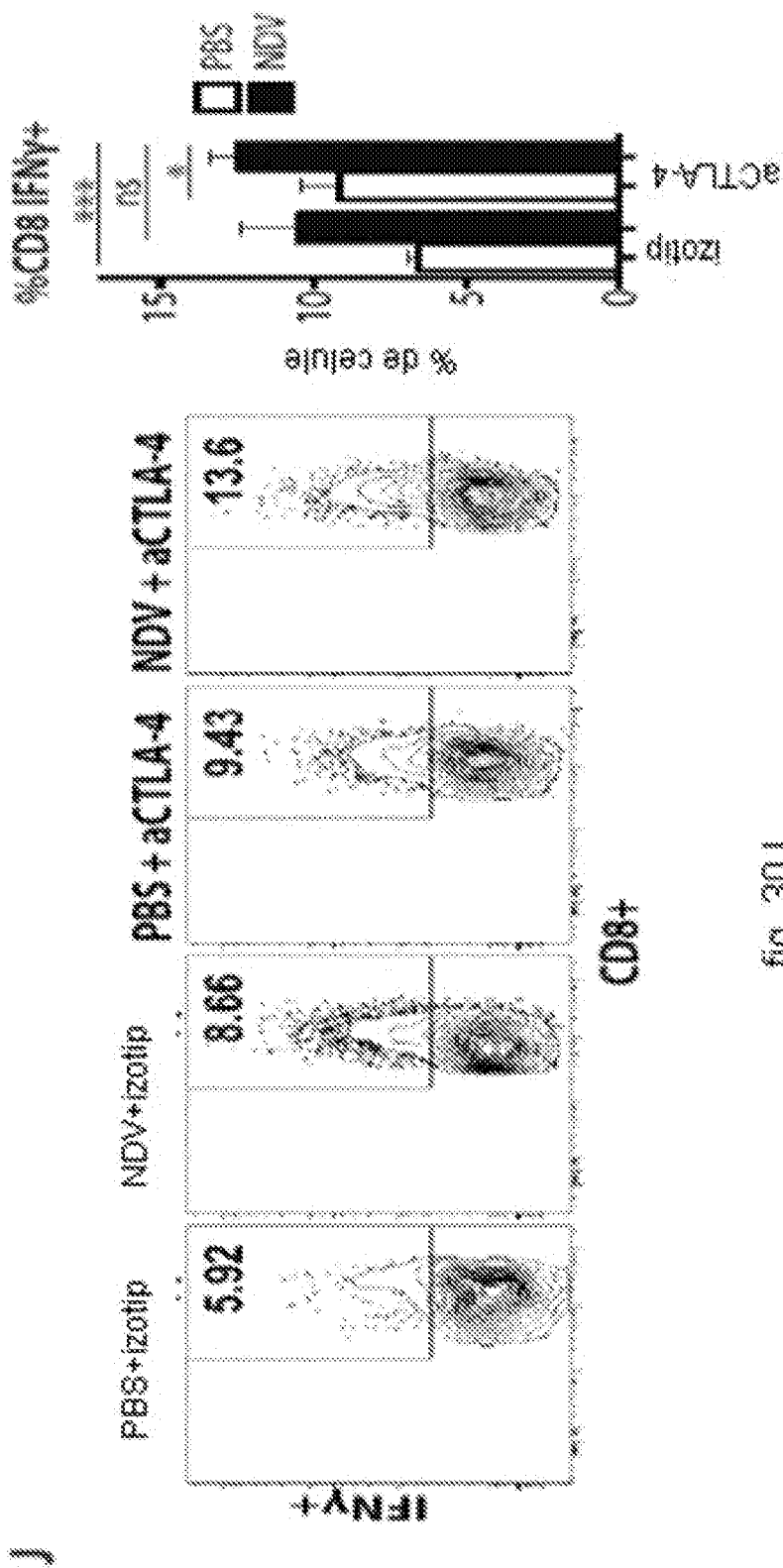


fig. 30G-30I



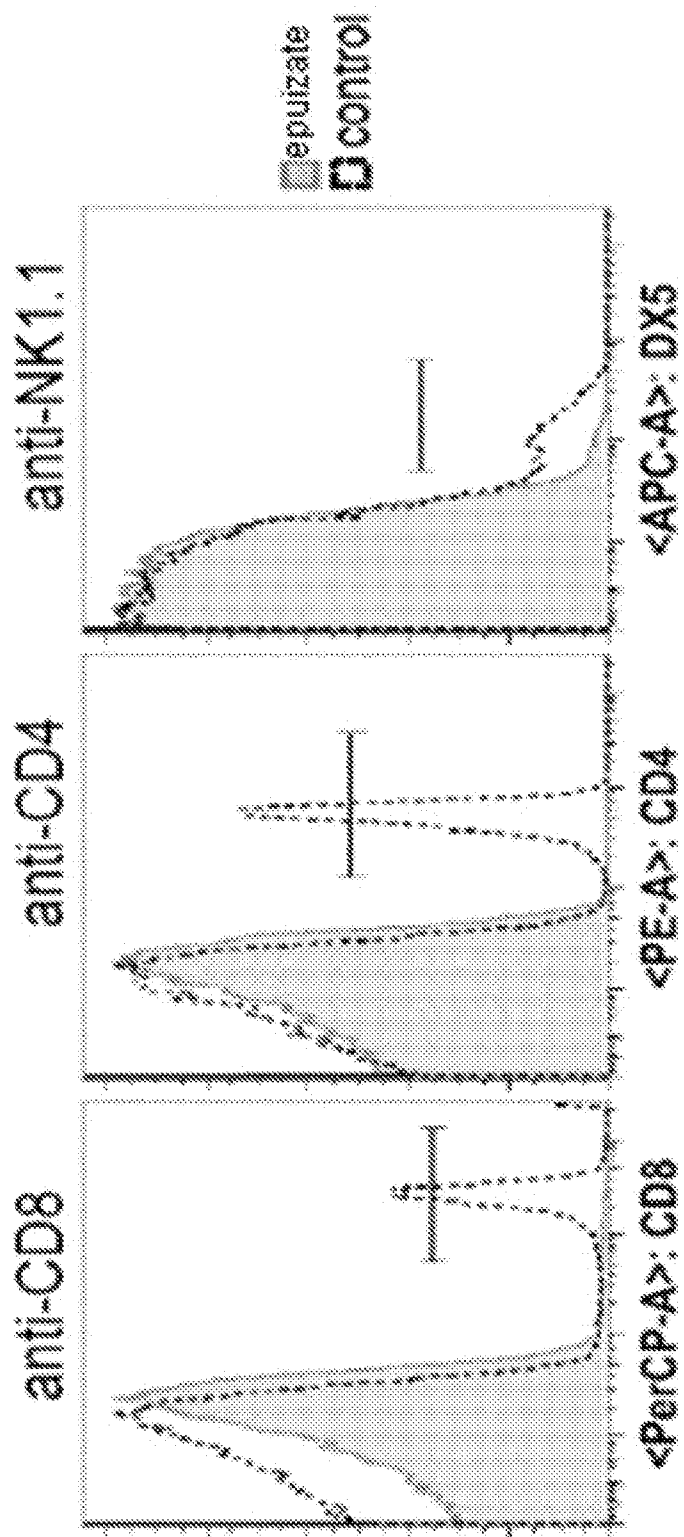
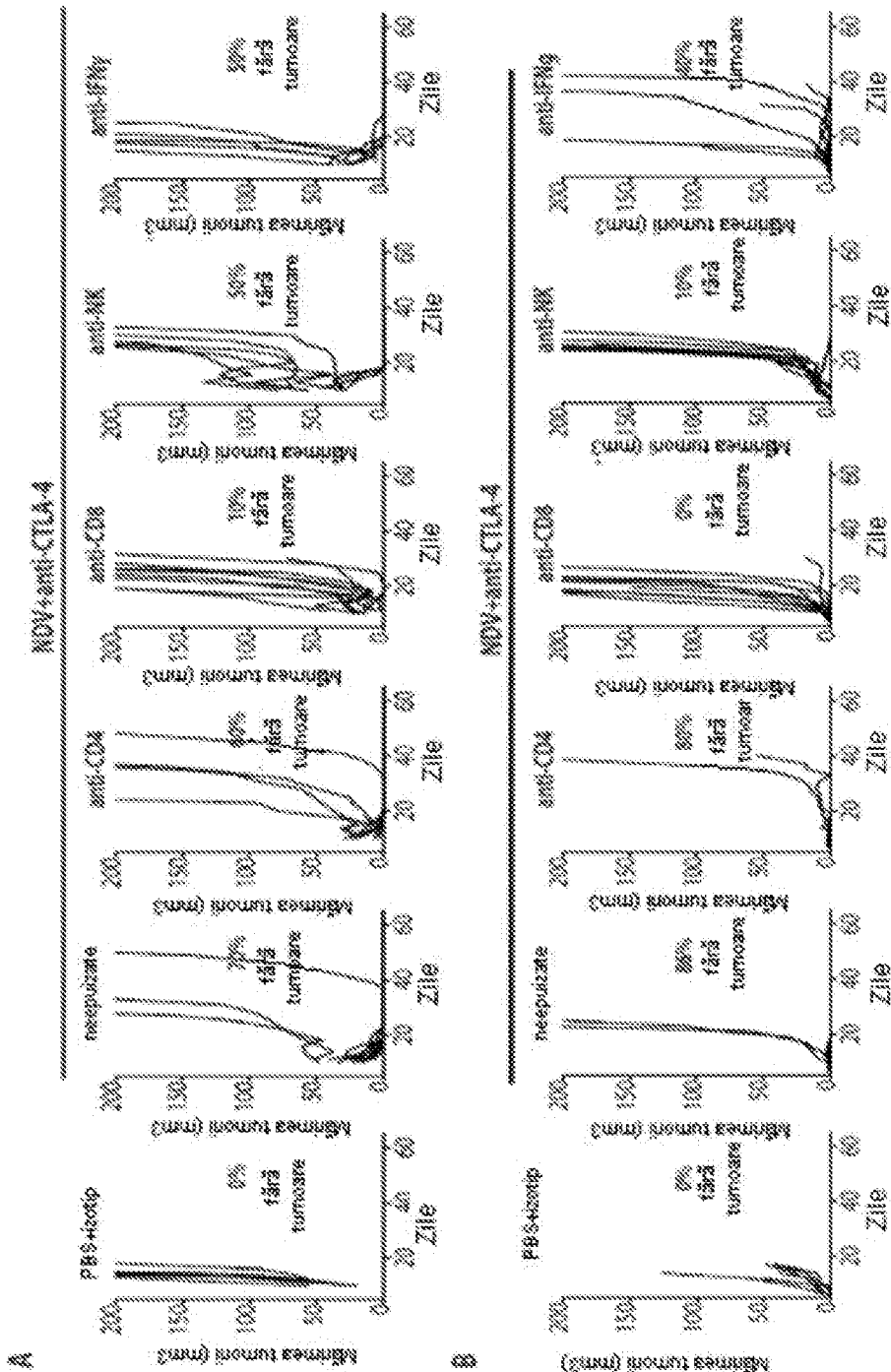


fig. 31



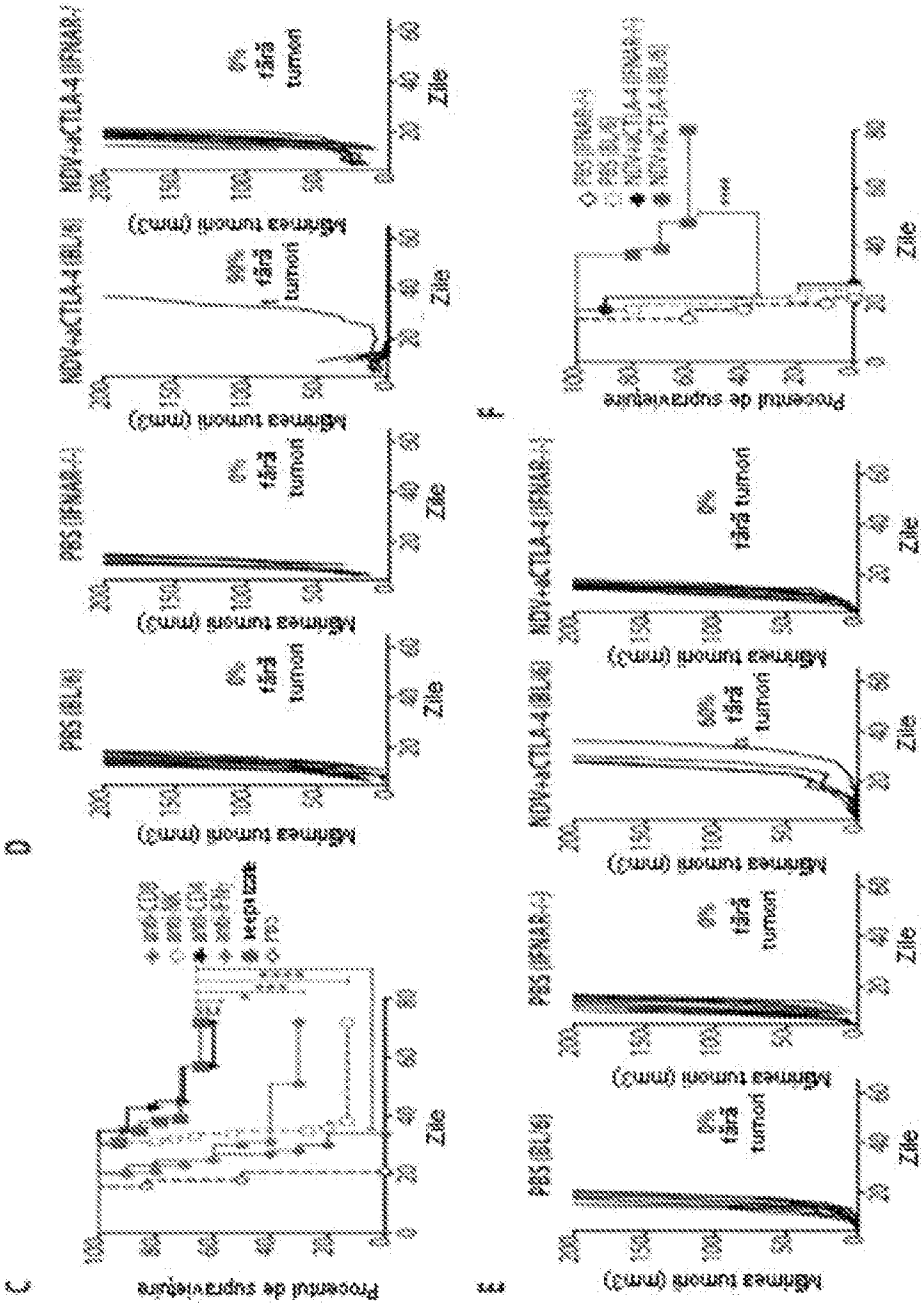


fig. 32C-32F

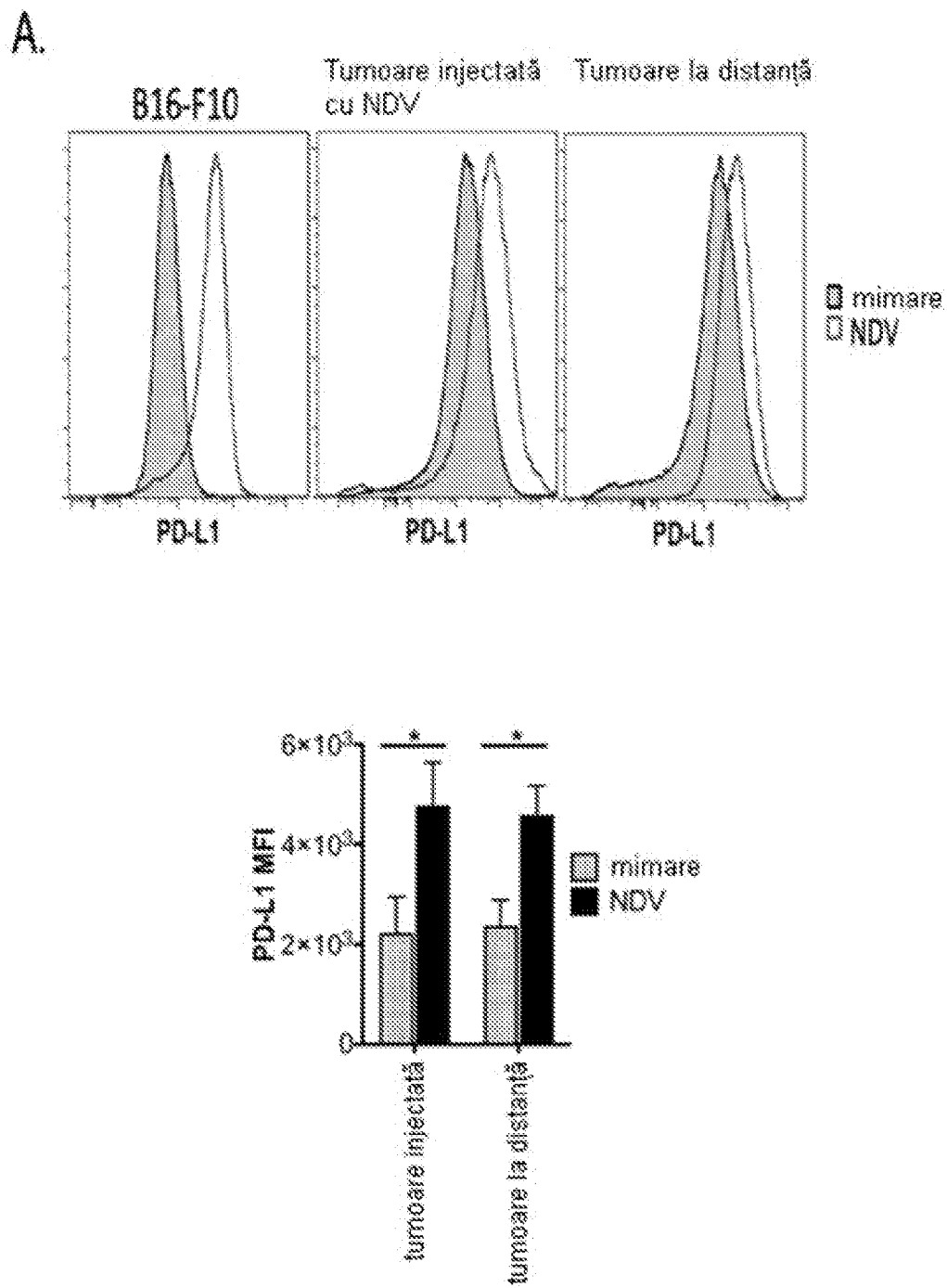


fig. 33A

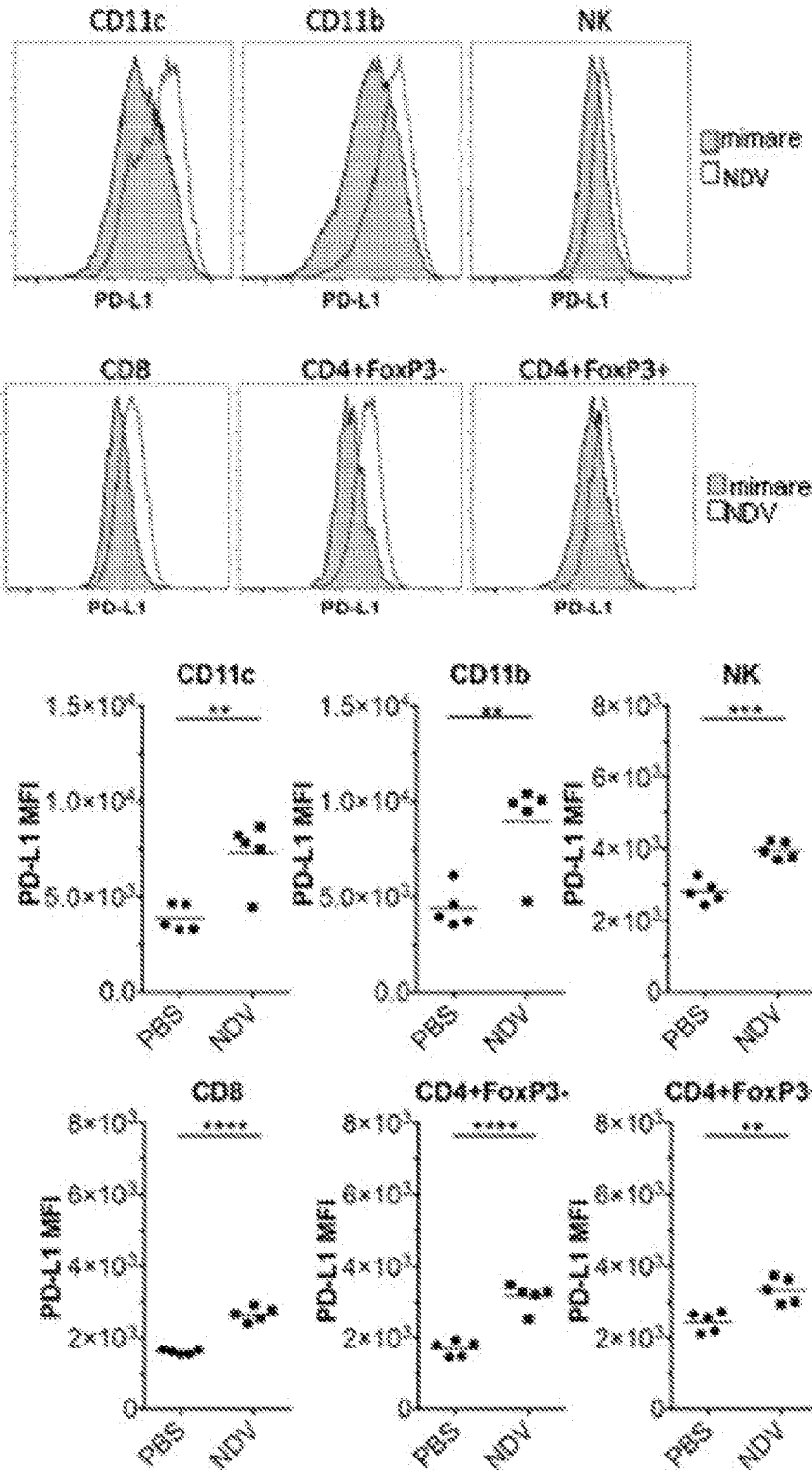


fig. 33B

A.

Tumoare implant. Tumoare implant. Inject. PBS/NDV
în flancul drept în flancul stâng IT

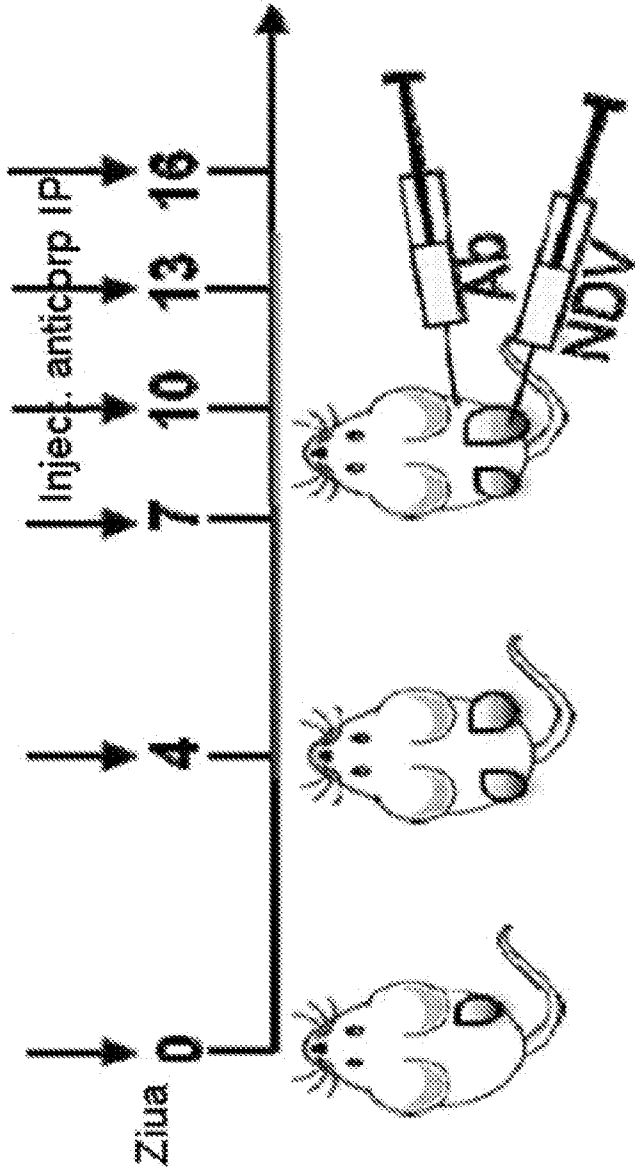


fig. 34A

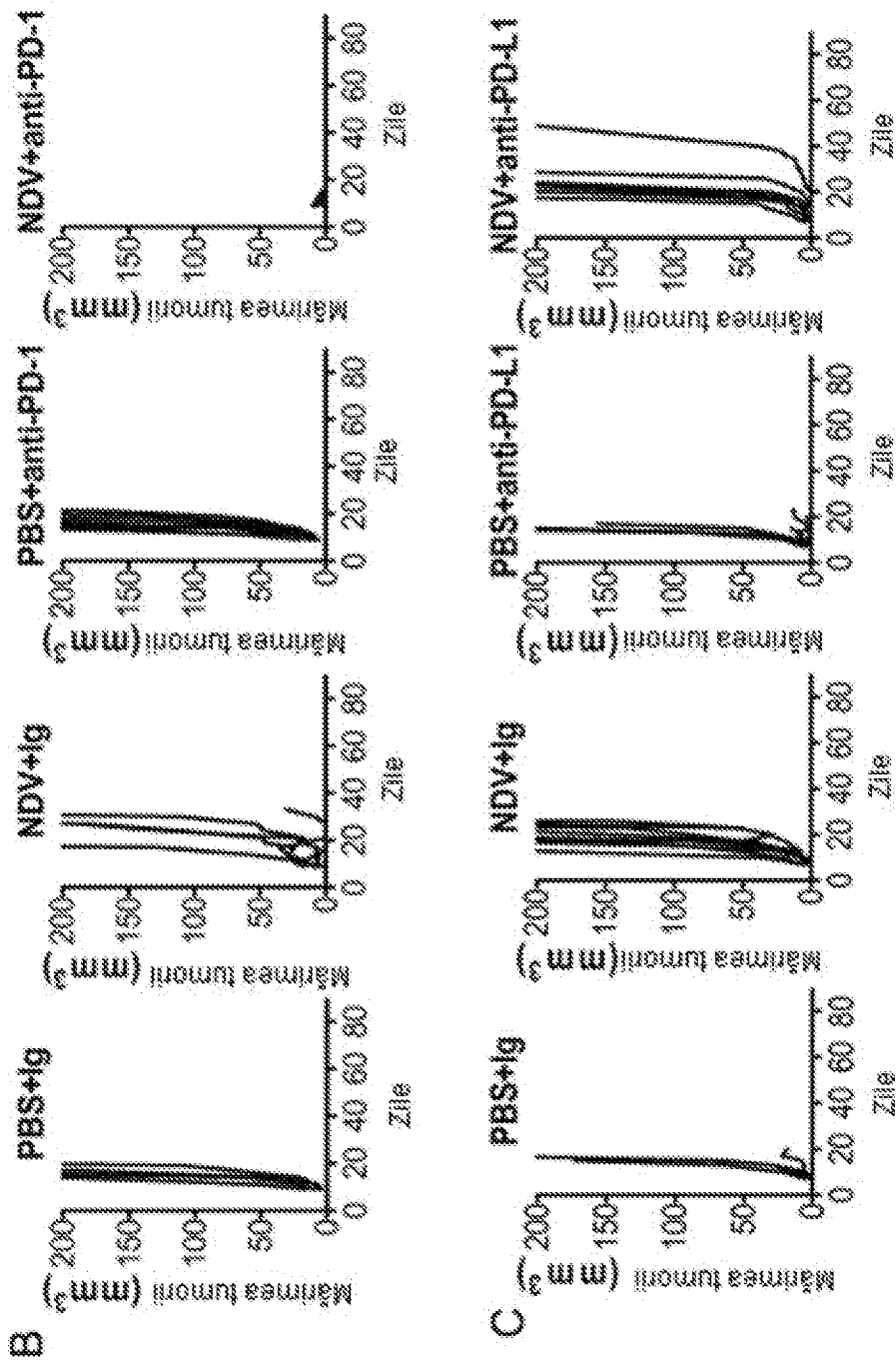


fig. 34B-34C

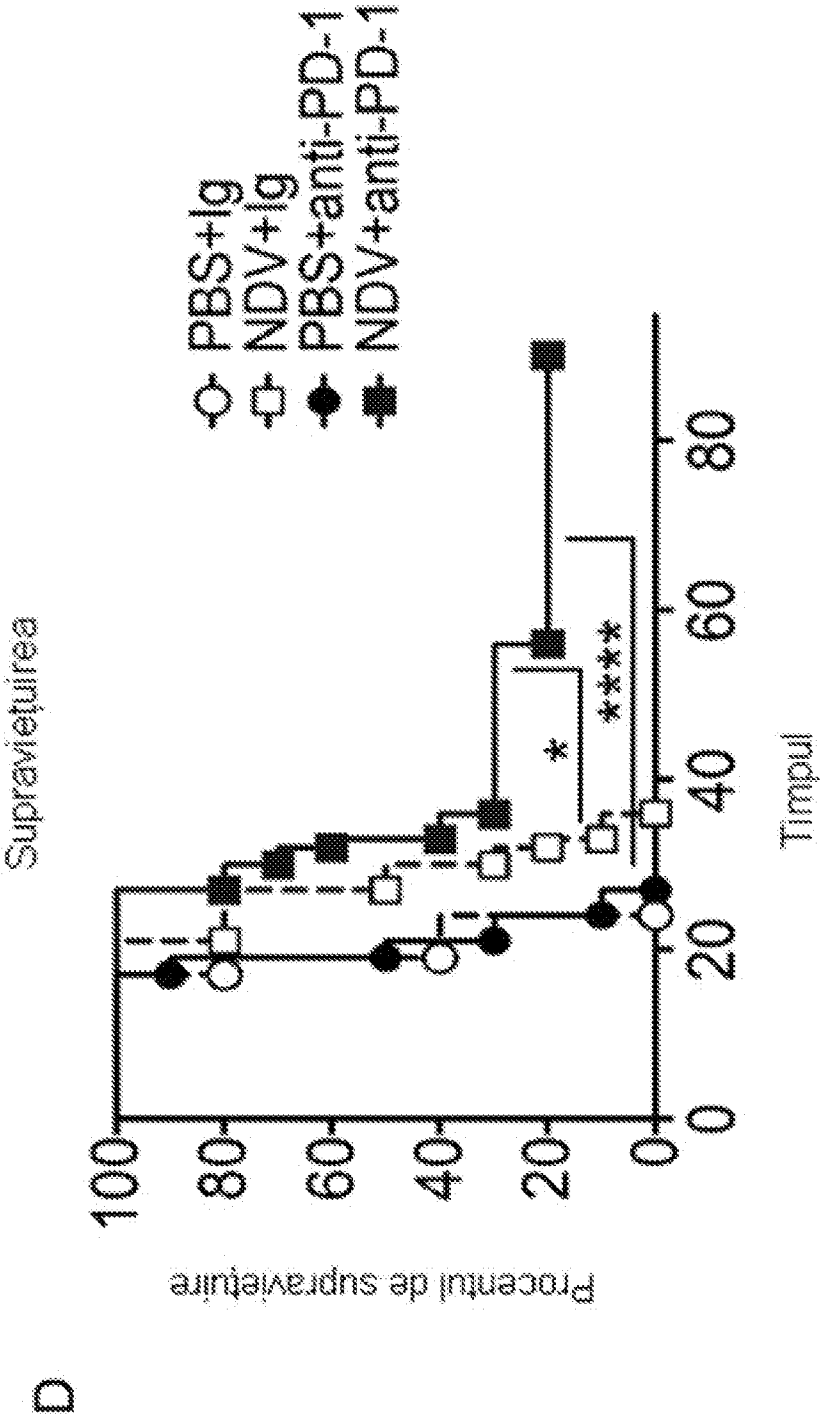


fig. 34D

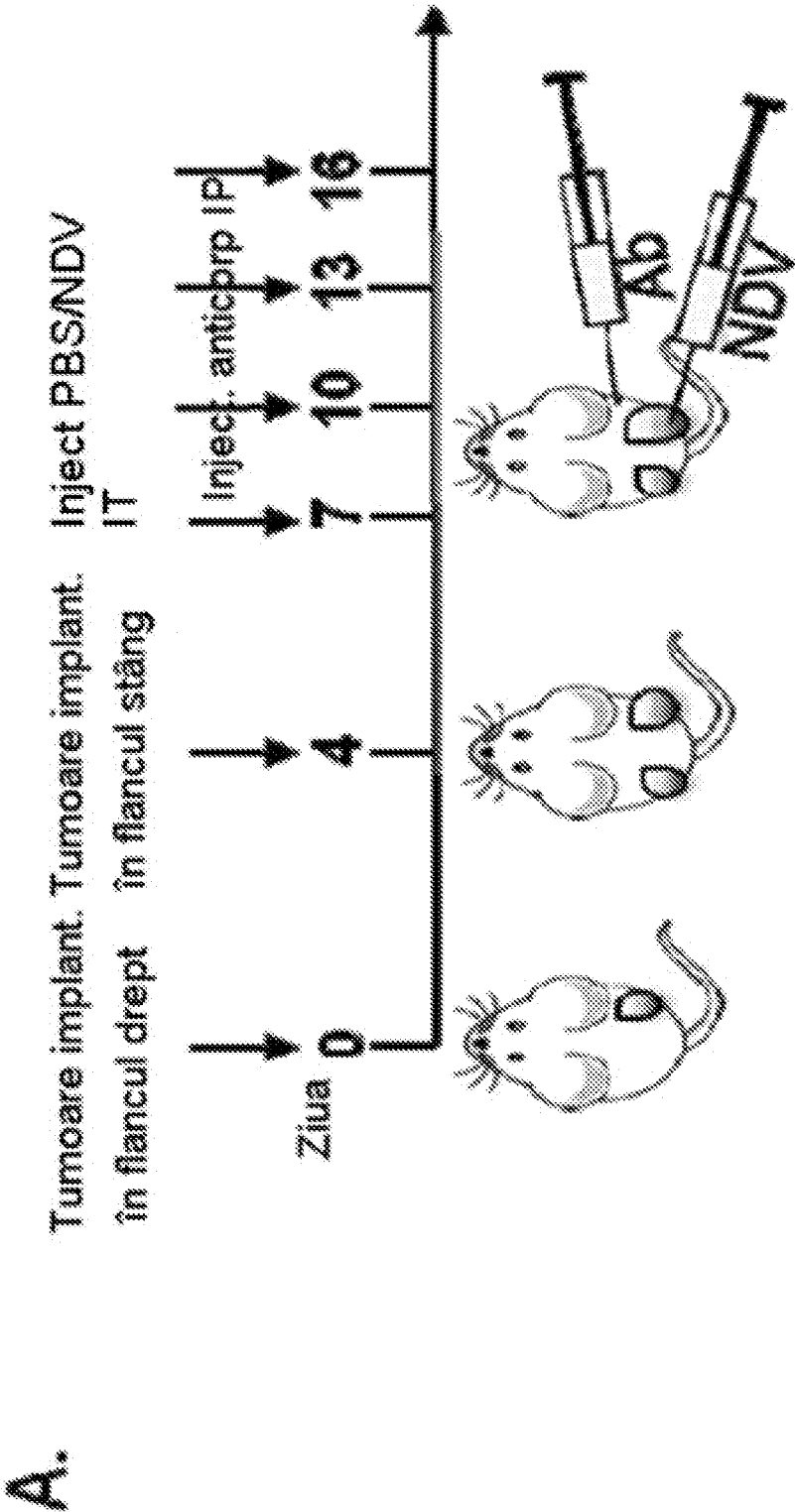


fig. 35A

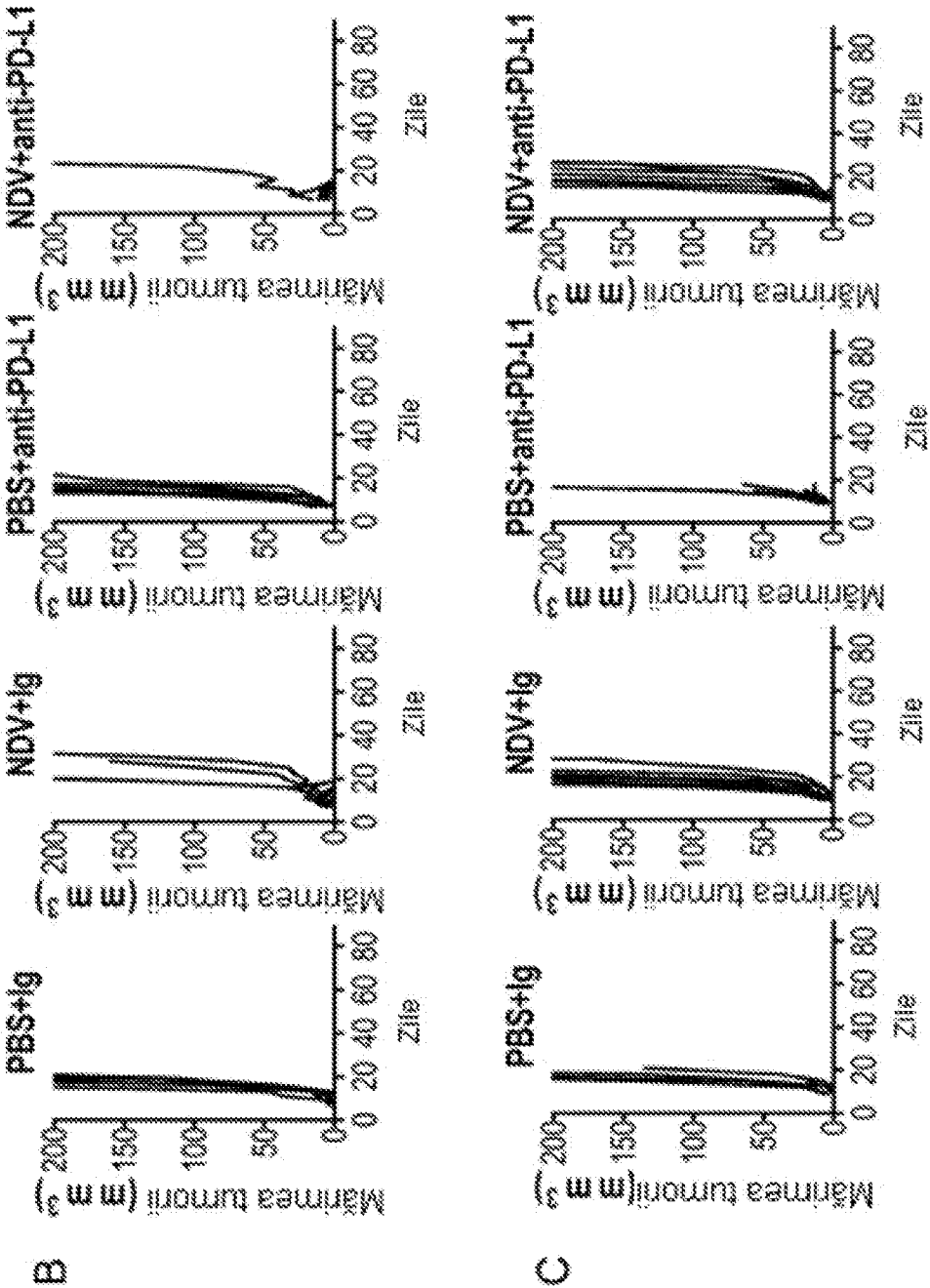


fig. 35B-35C

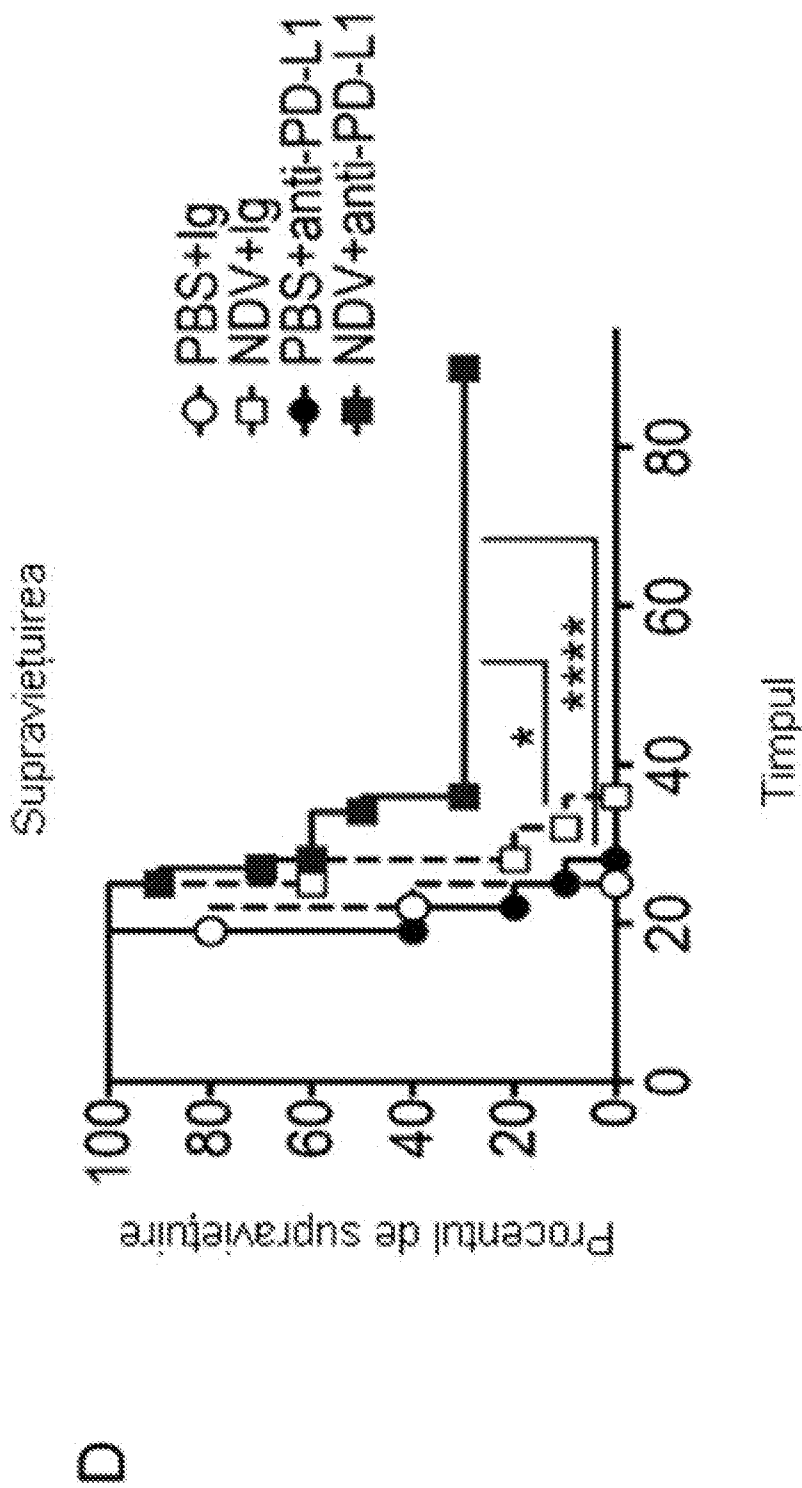


fig. 35D

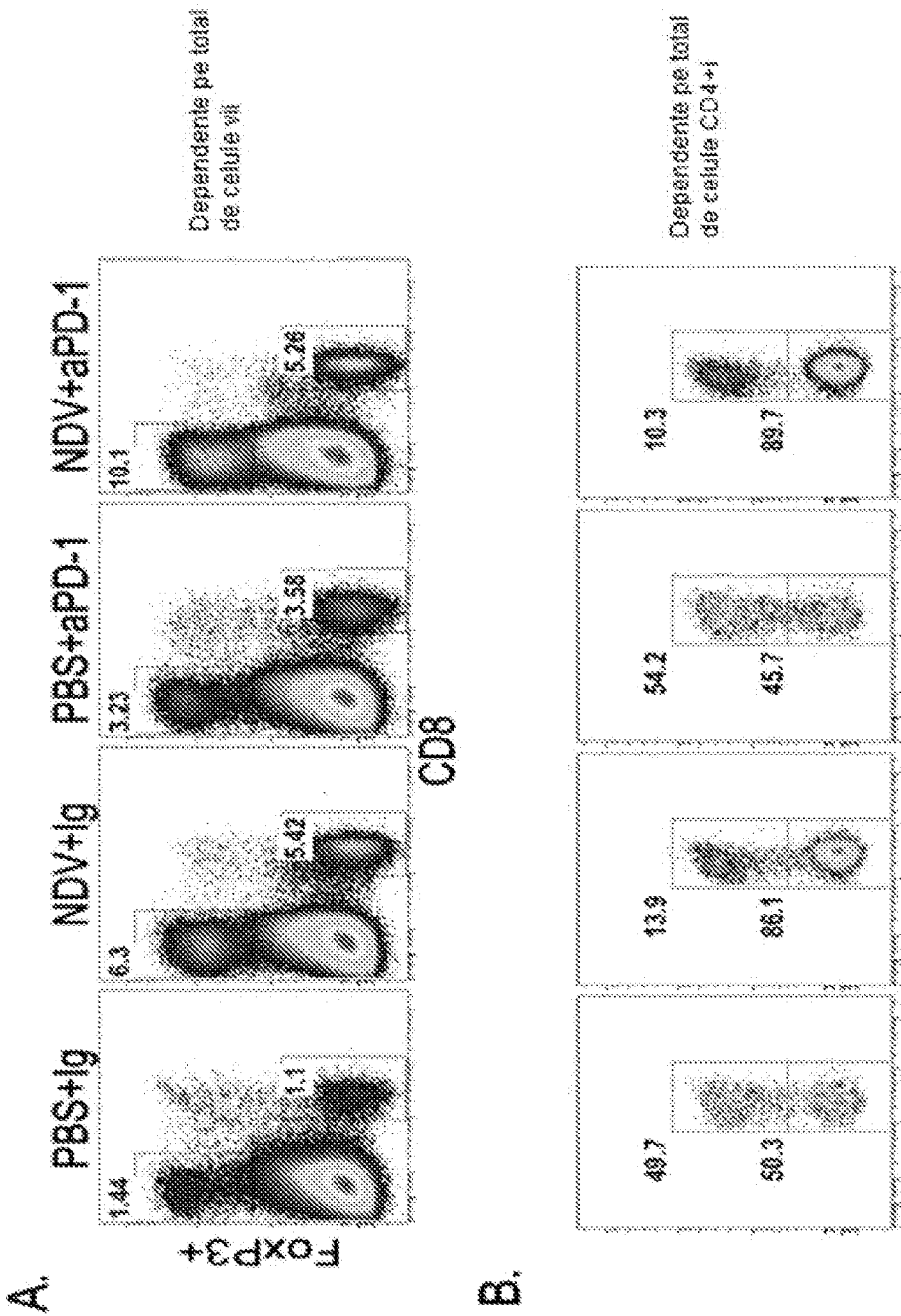


fig. 36A-36B

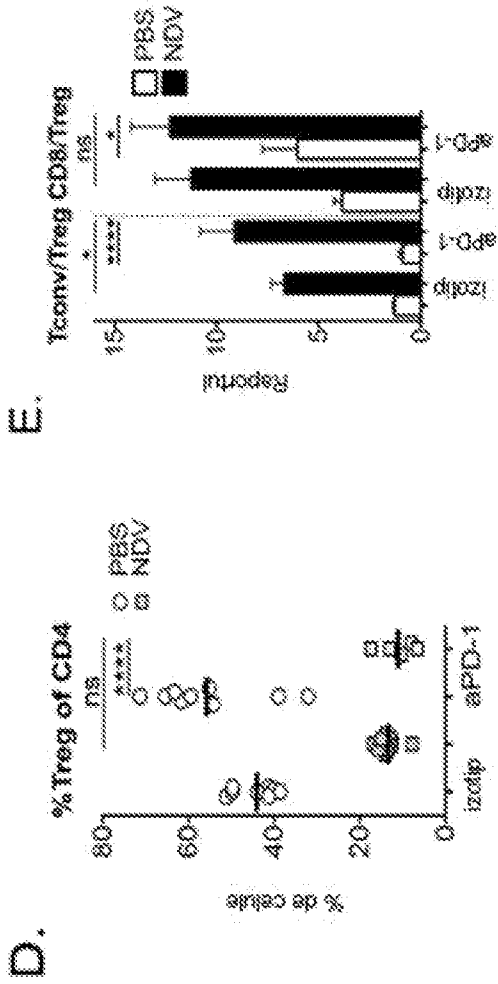
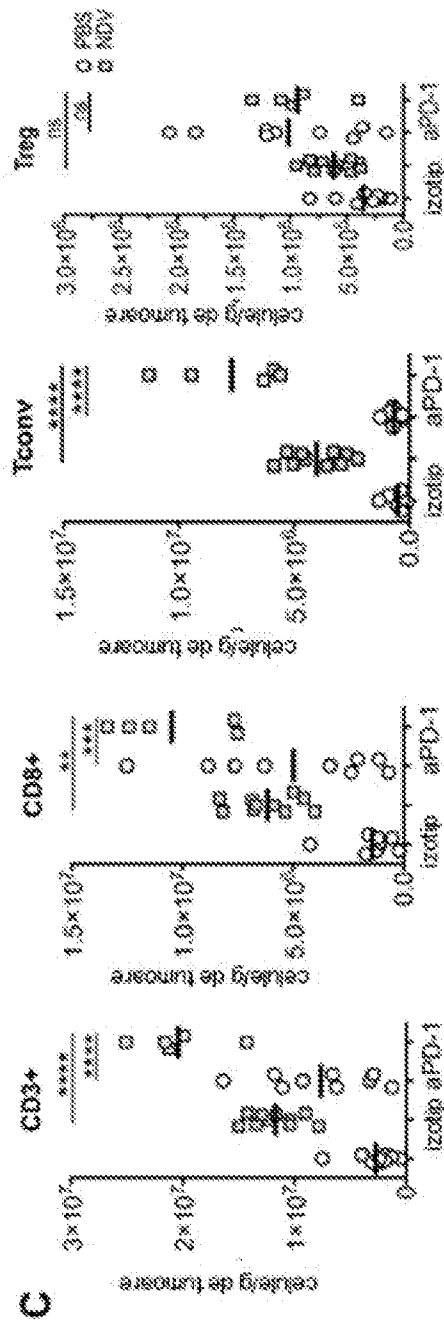


fig. 36C-36E

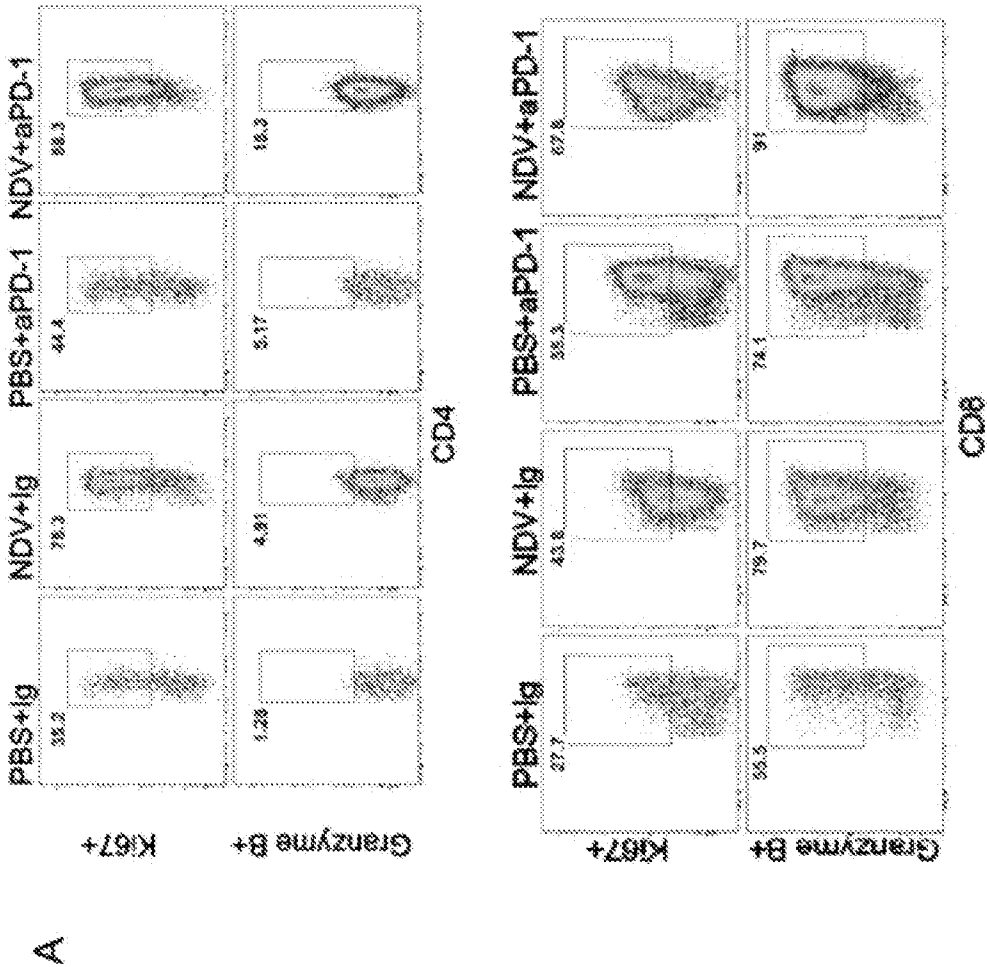


fig. 37A

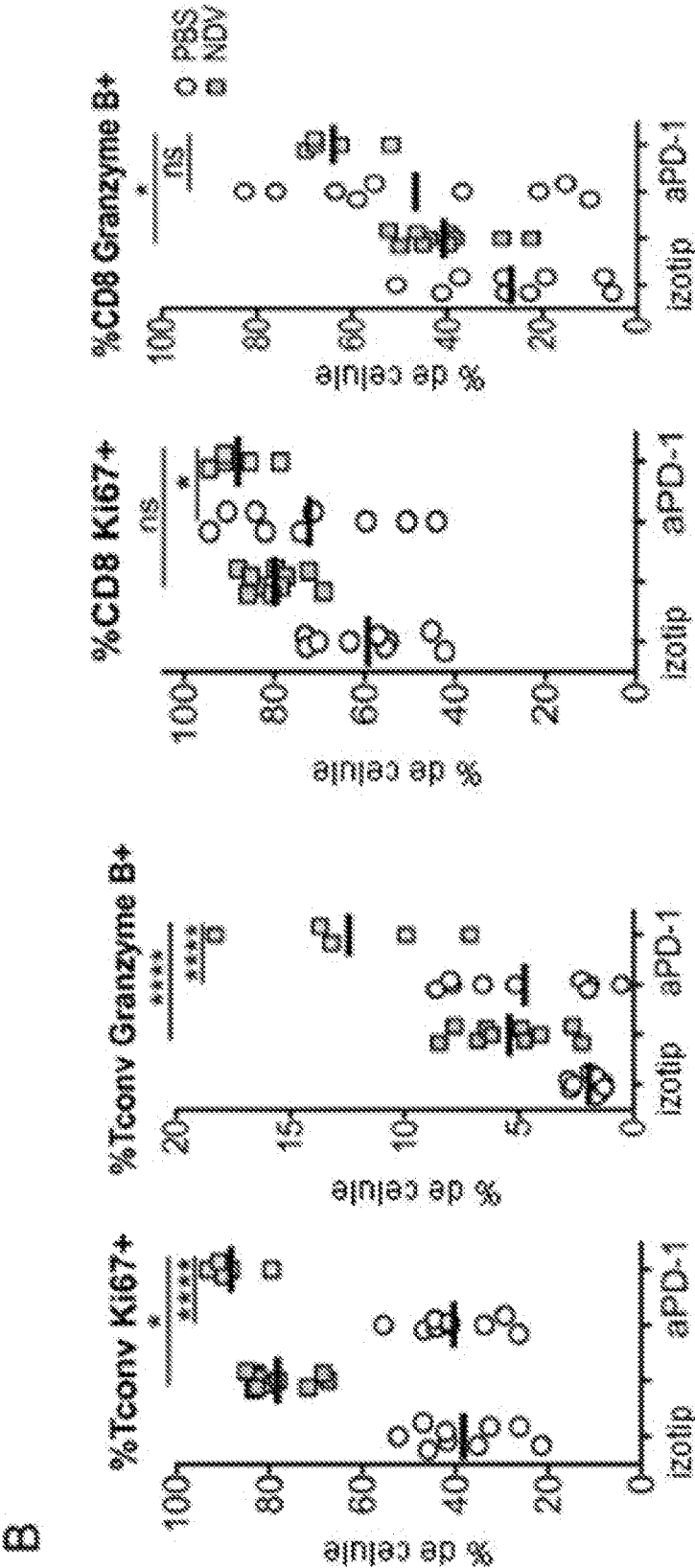


fig. 37B

A.

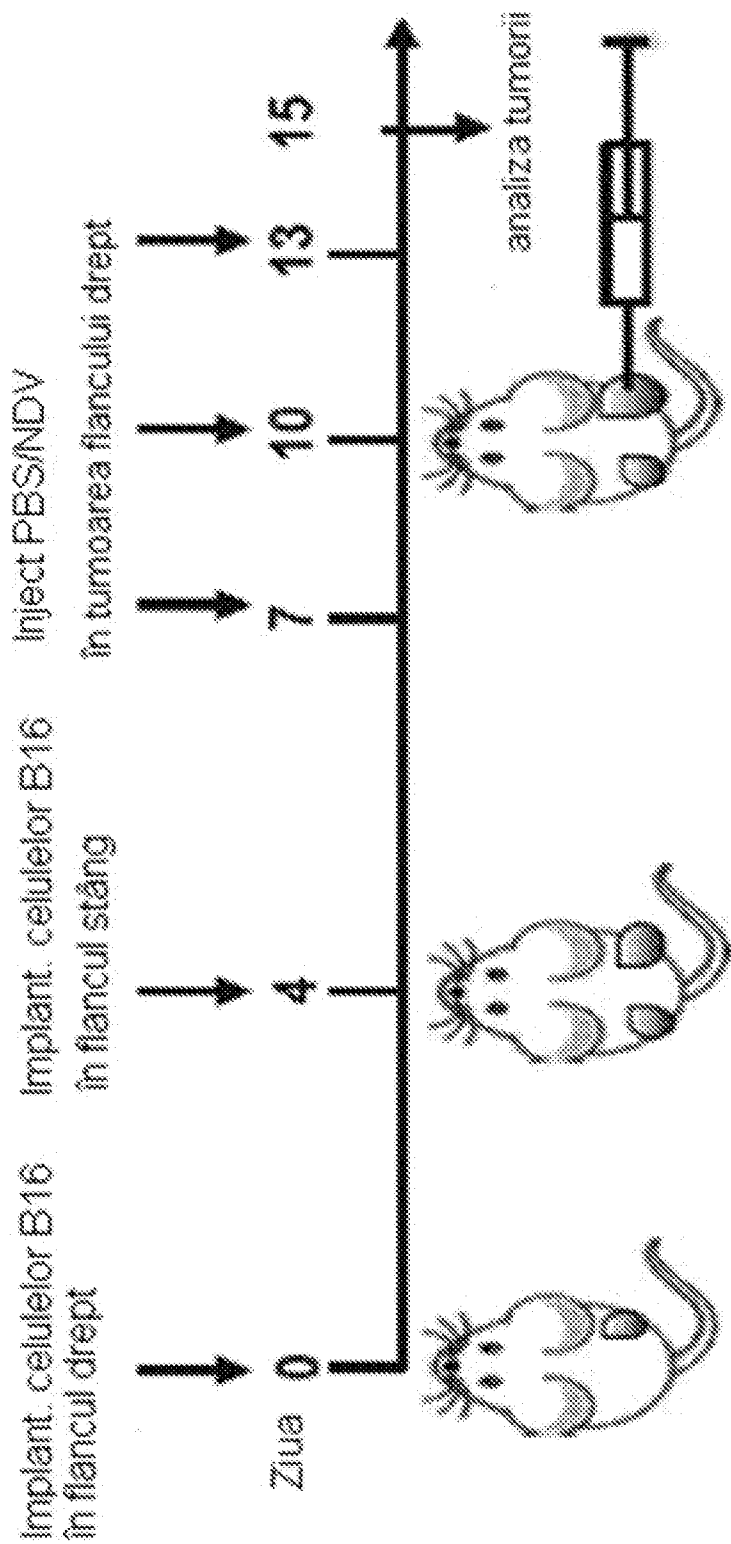


fig. 38A

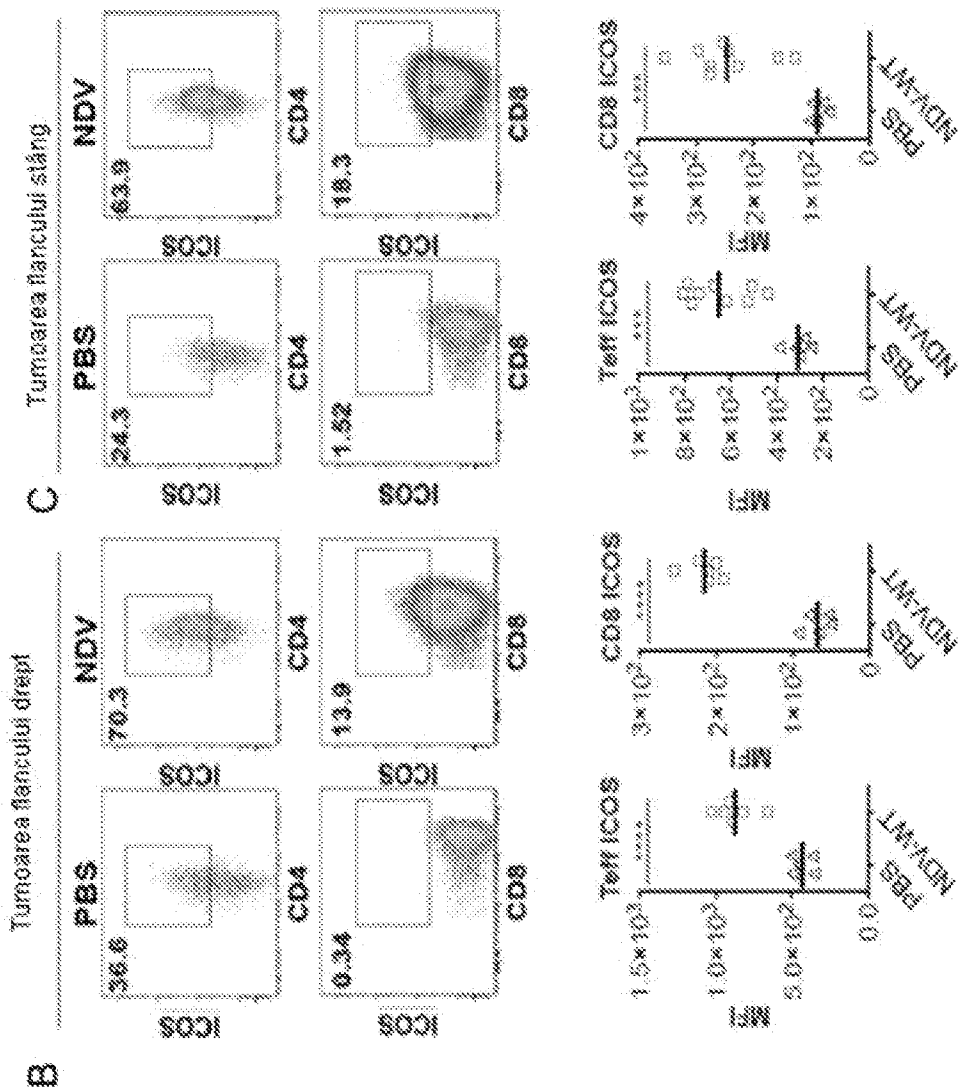
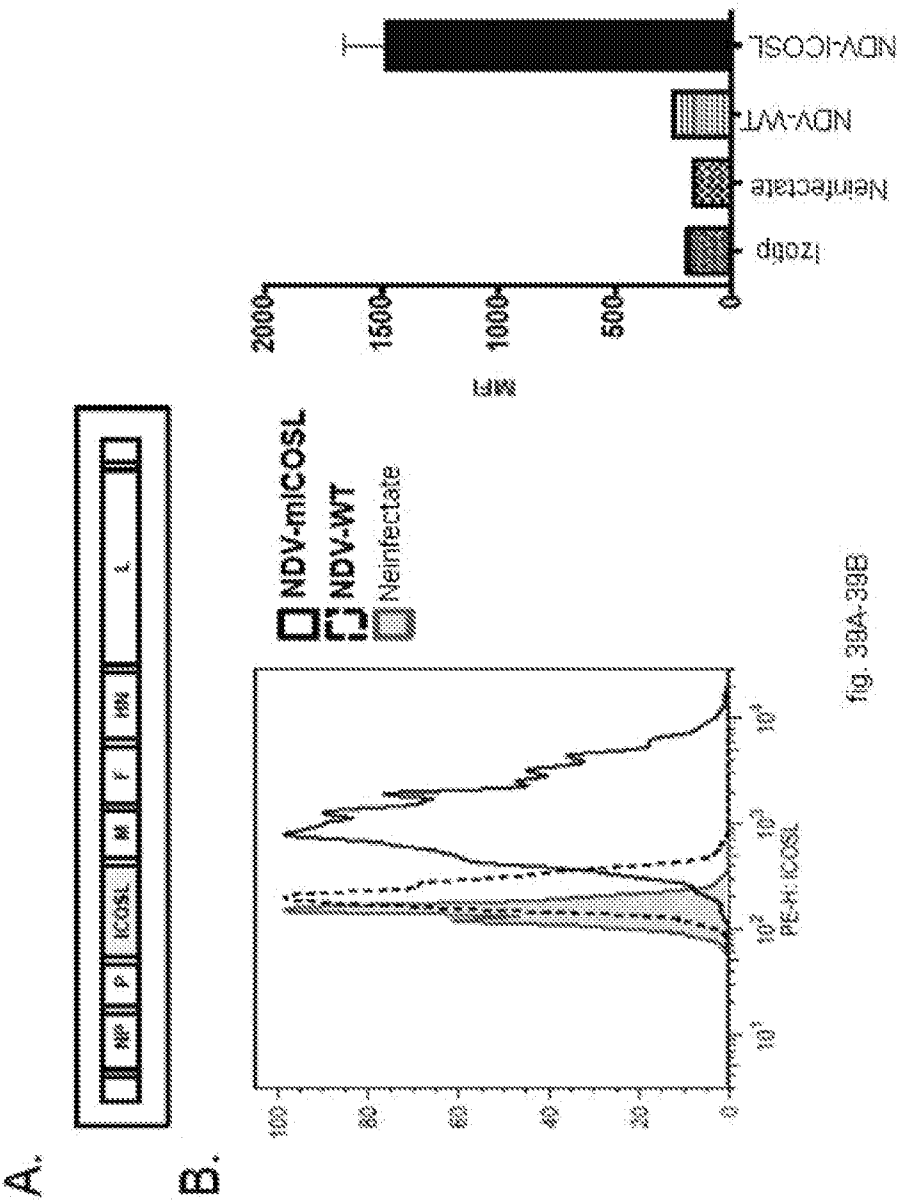


fig. 38B-38C



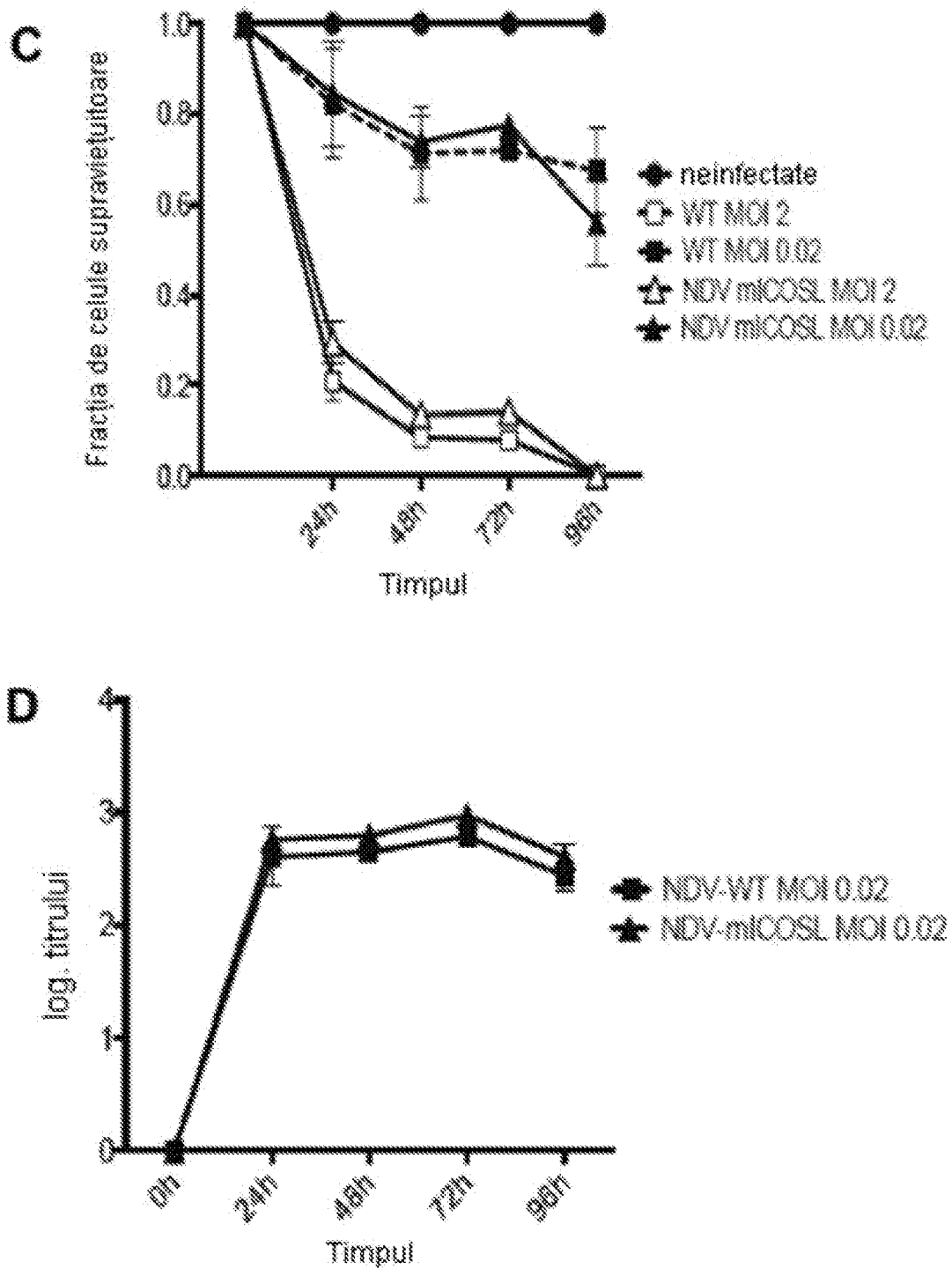


fig. 39C-39D

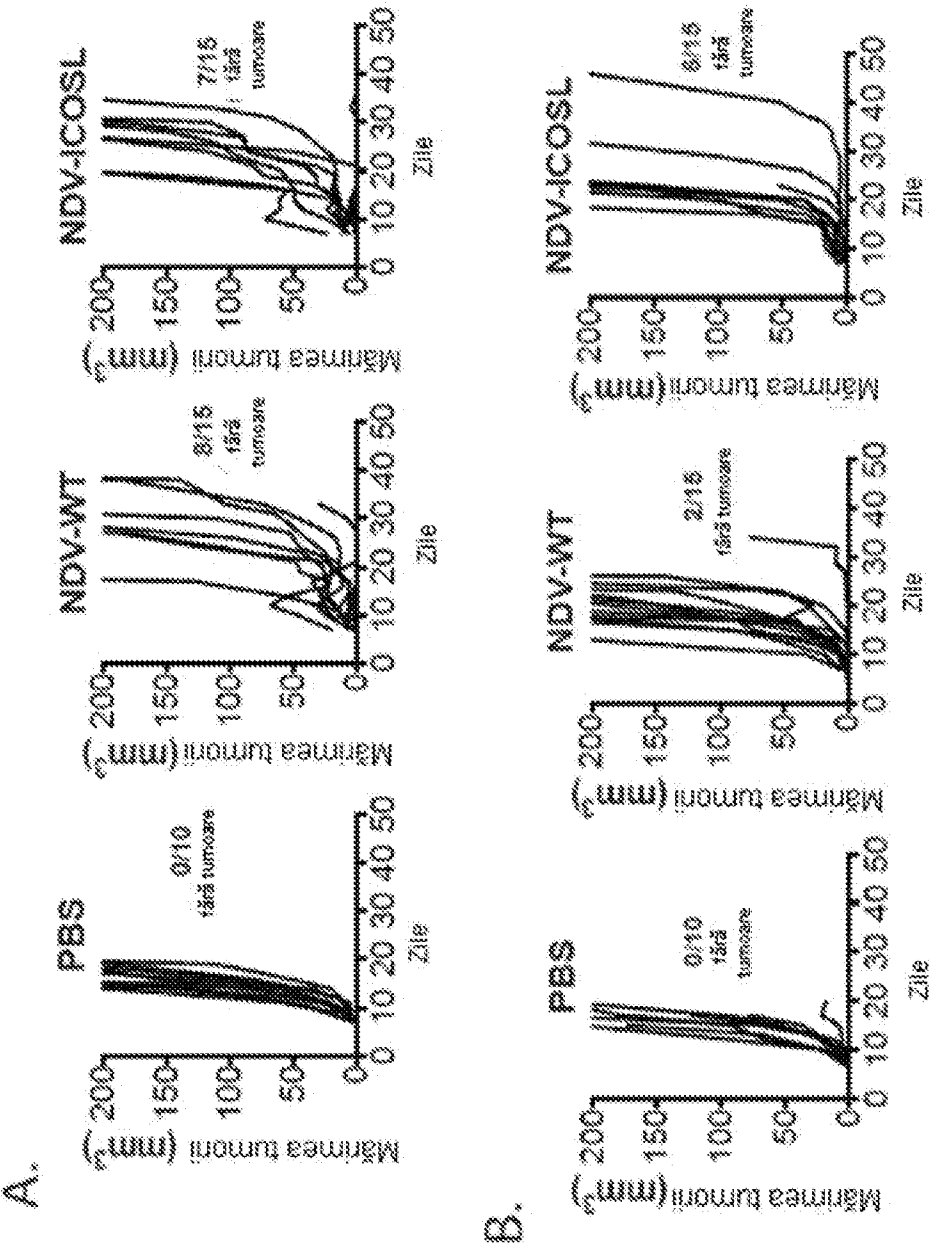
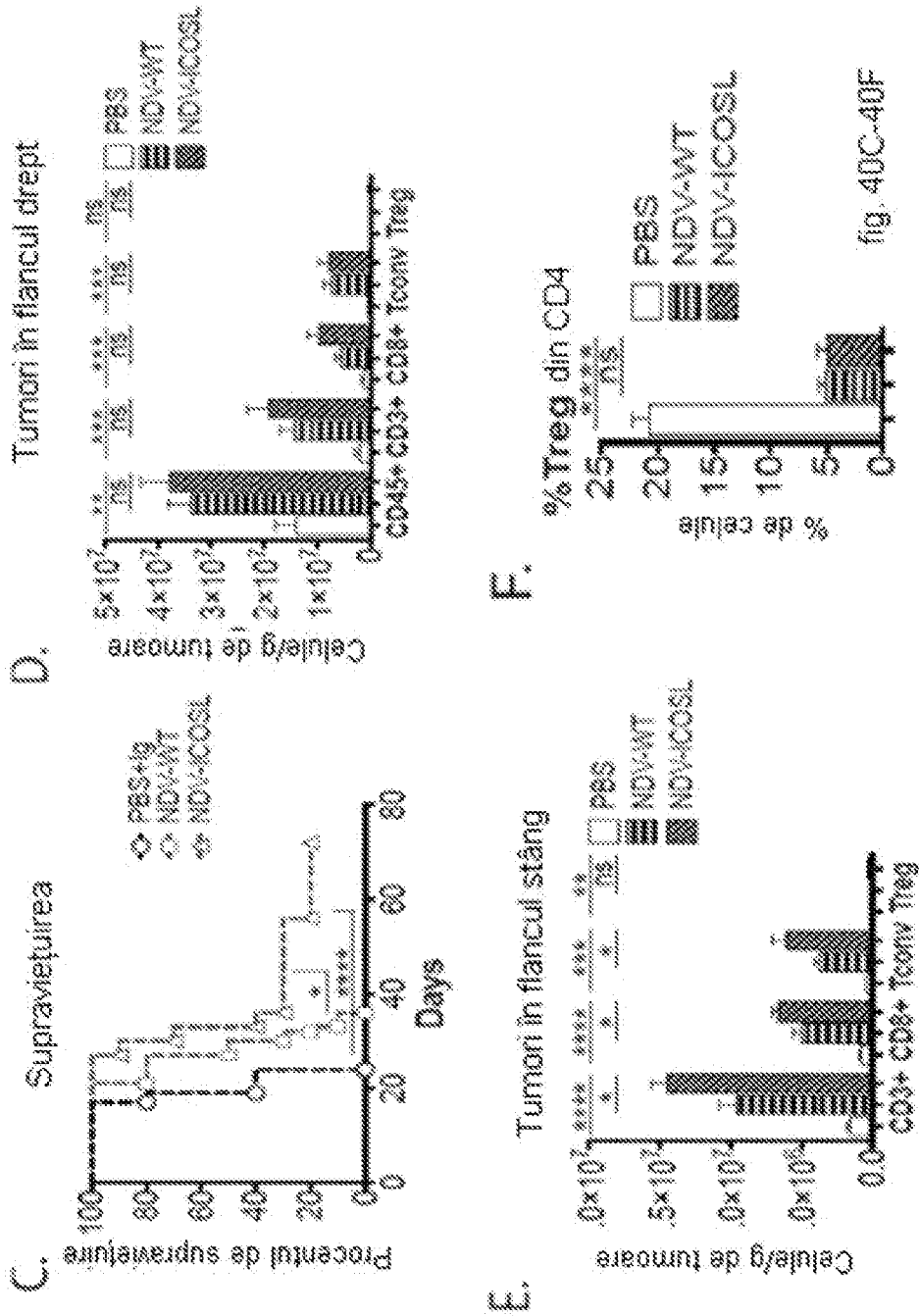


fig. 40A-40B



A.

Tumoare implant. Tumoare implant. Inject PBS/NDV în tumoarea din dreapta
în flancul drept în flancul stâng Inject anticorpului IP

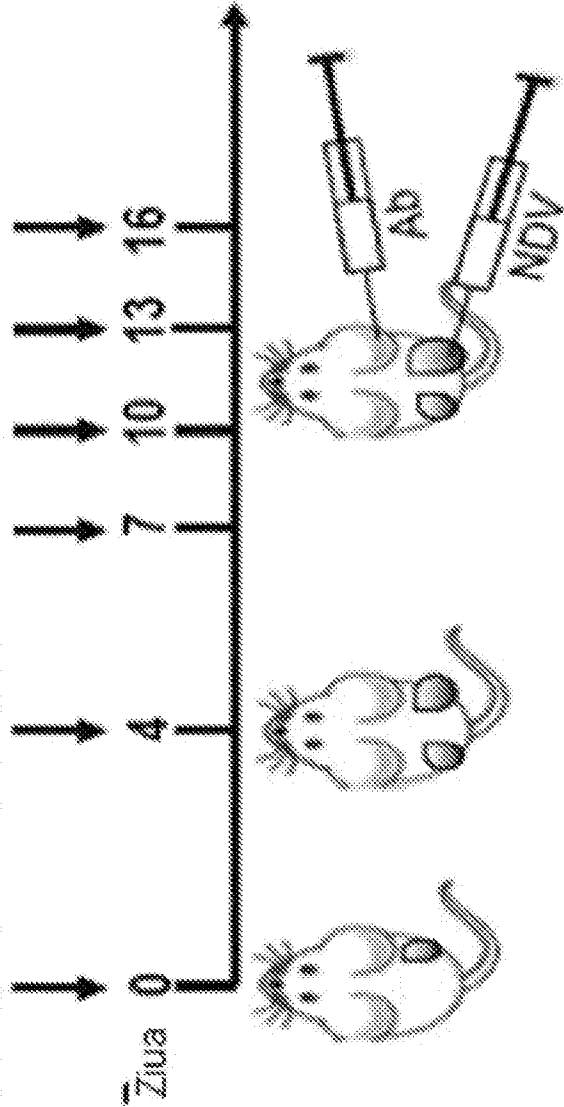


fig. 41A

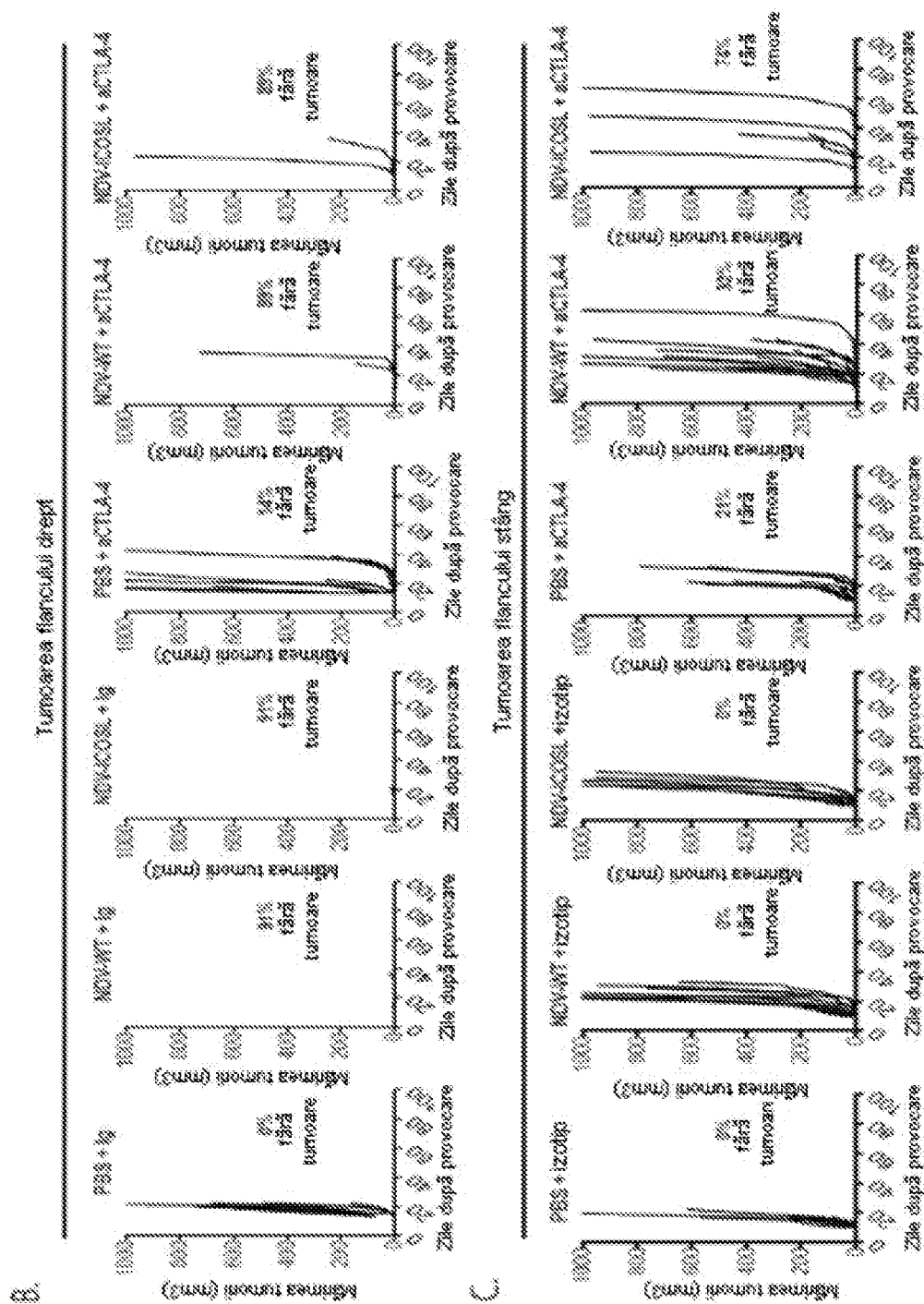


fig. 41B-41C

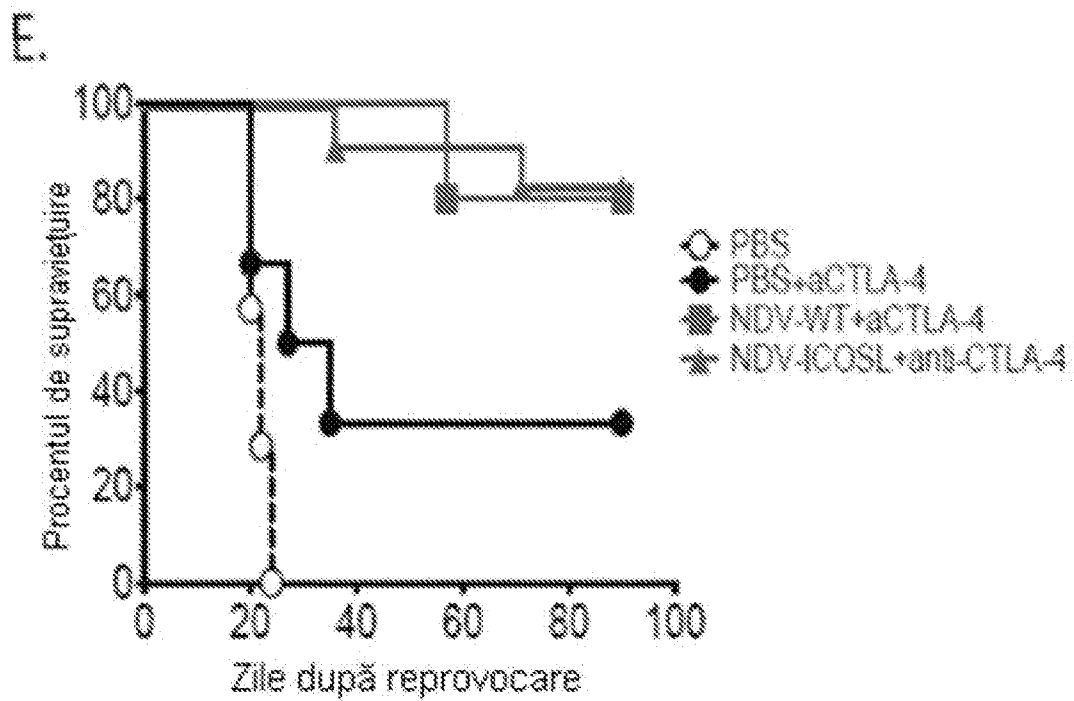
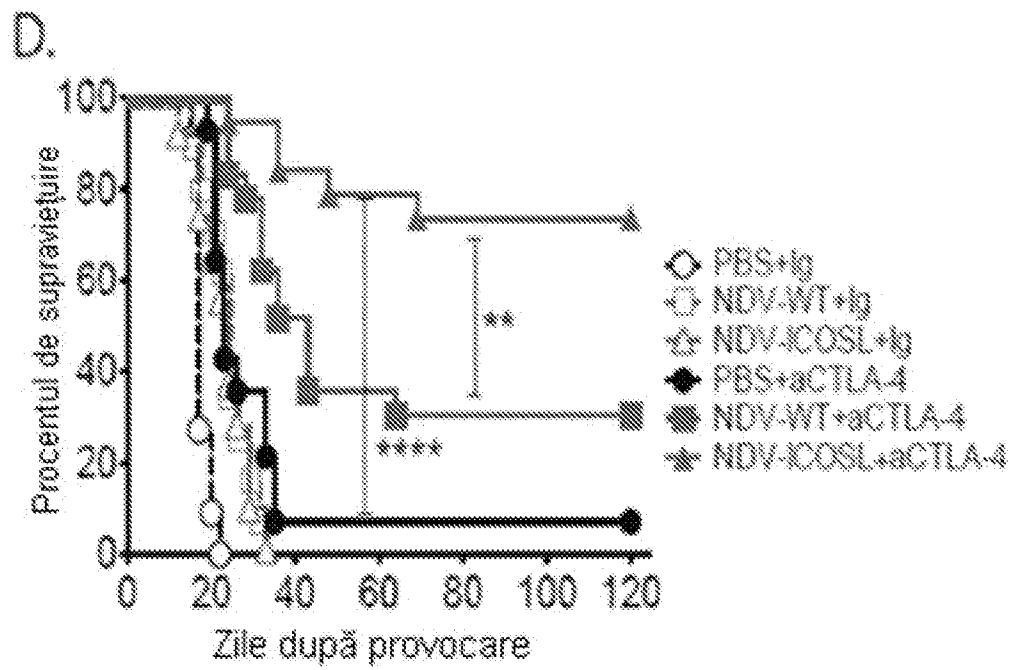


fig. 41D-41E

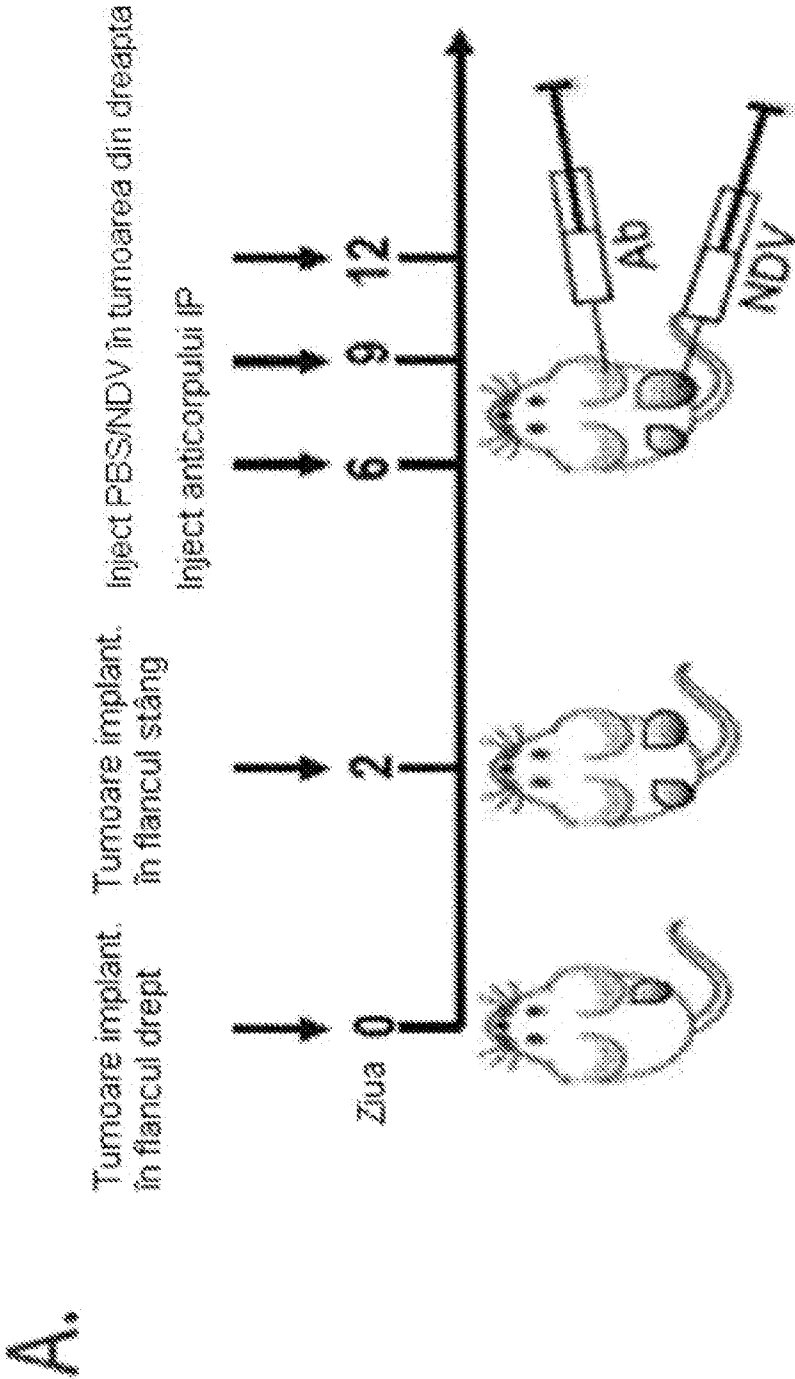


fig. 42A

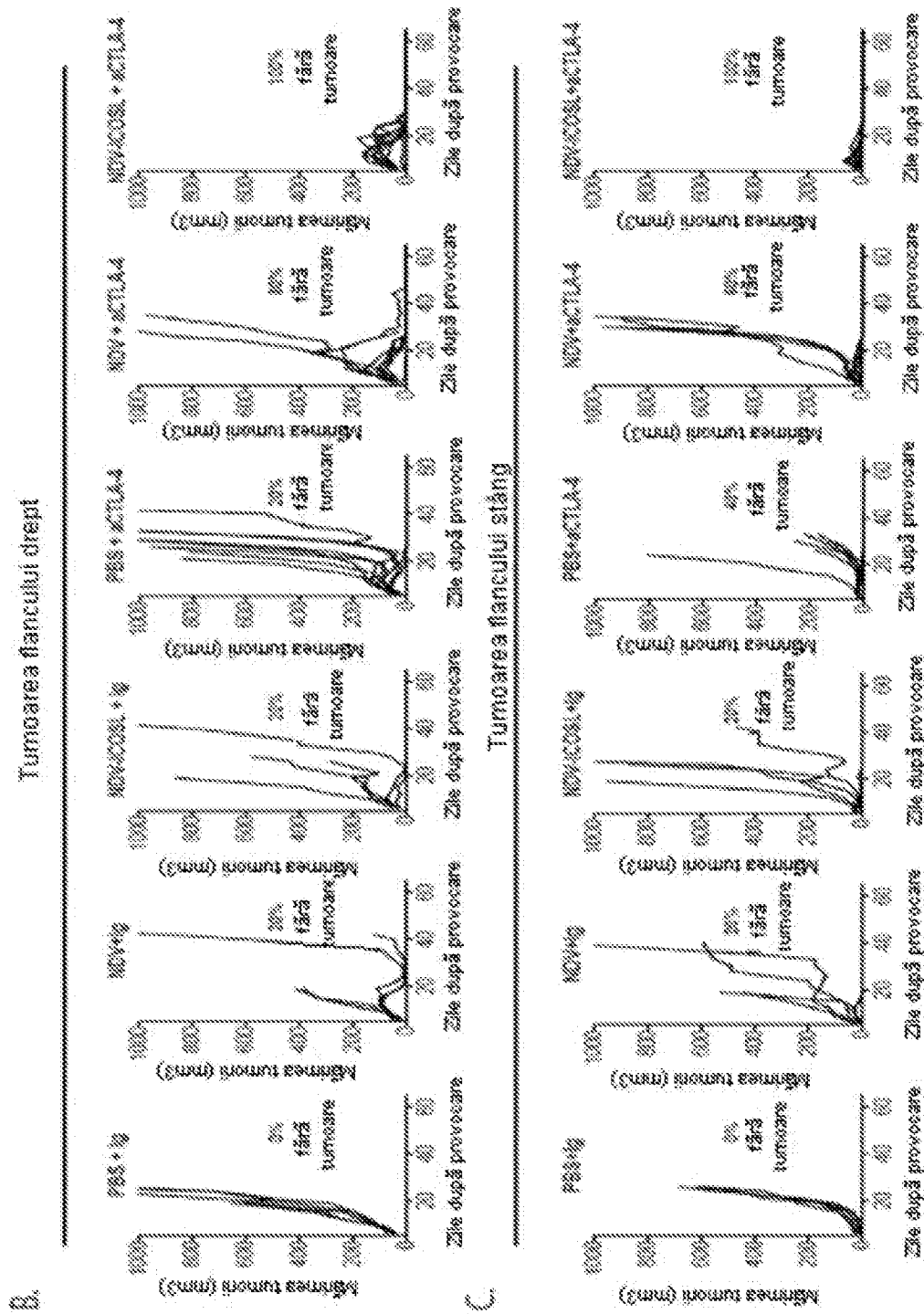


fig. 42B-42C

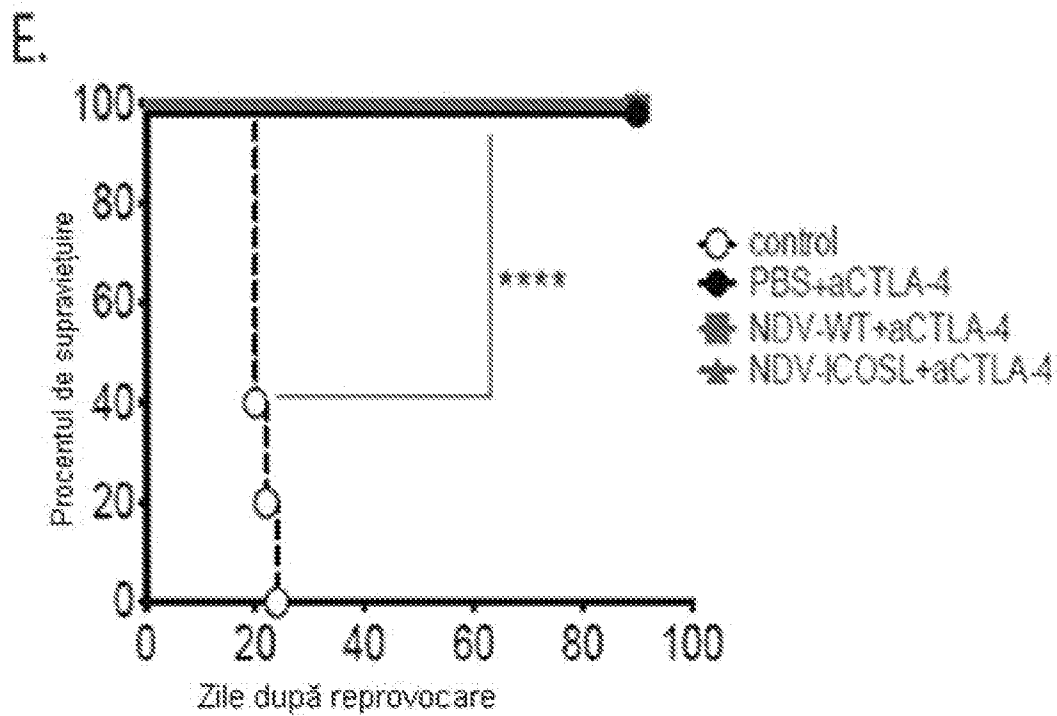
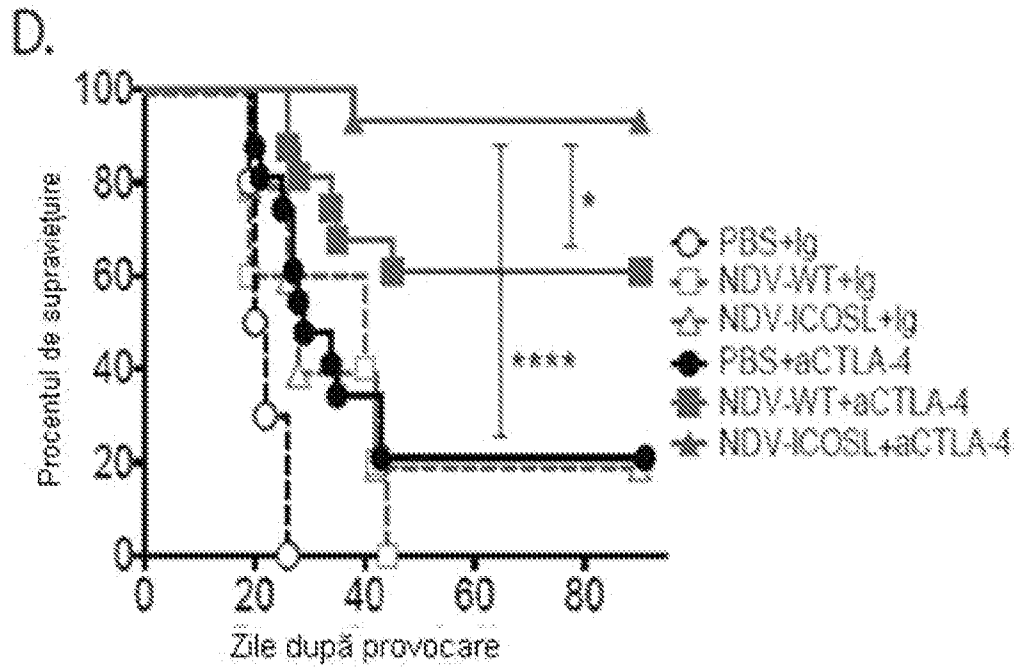


fig. 42D-42E

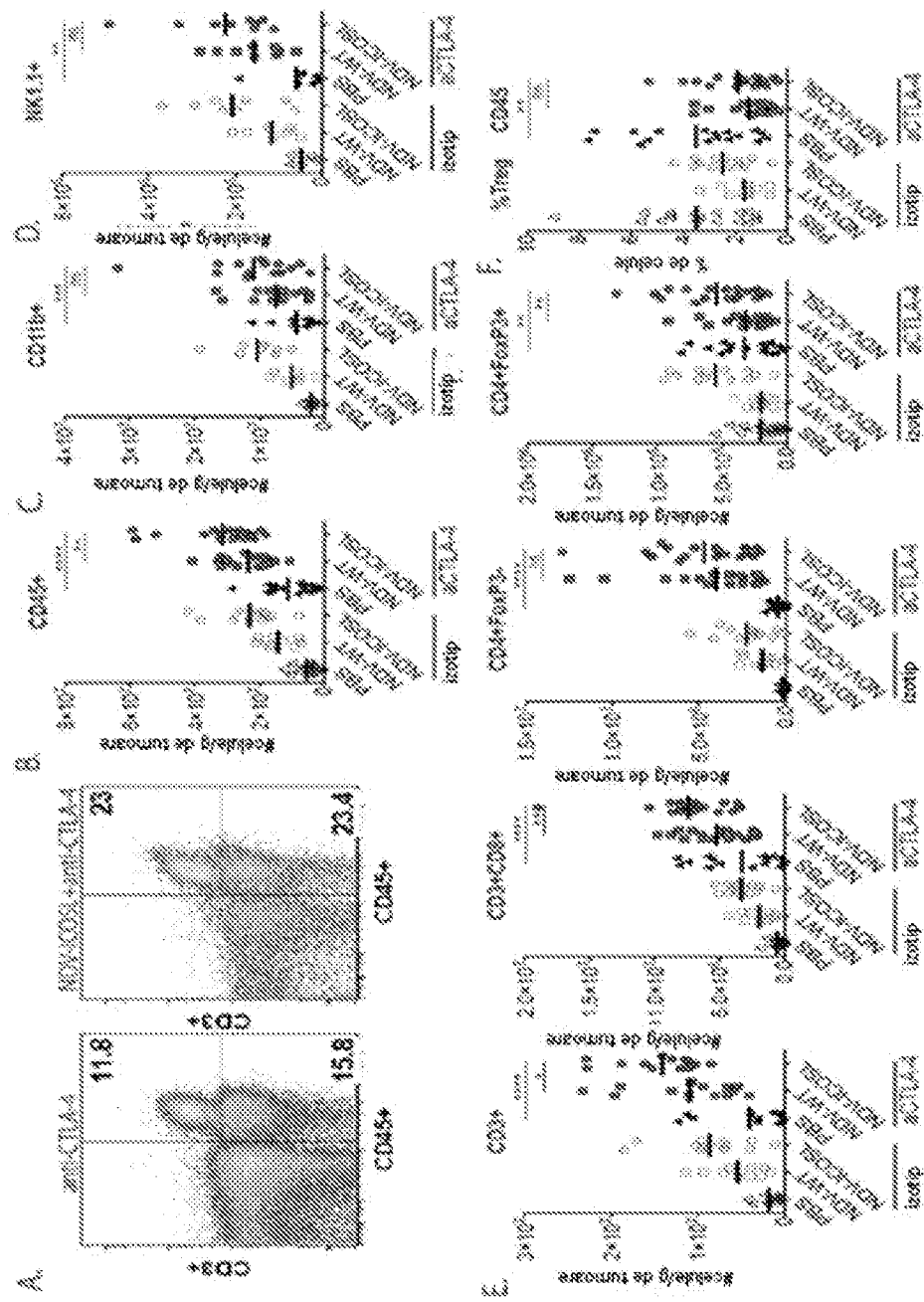


fig. 43A-43F

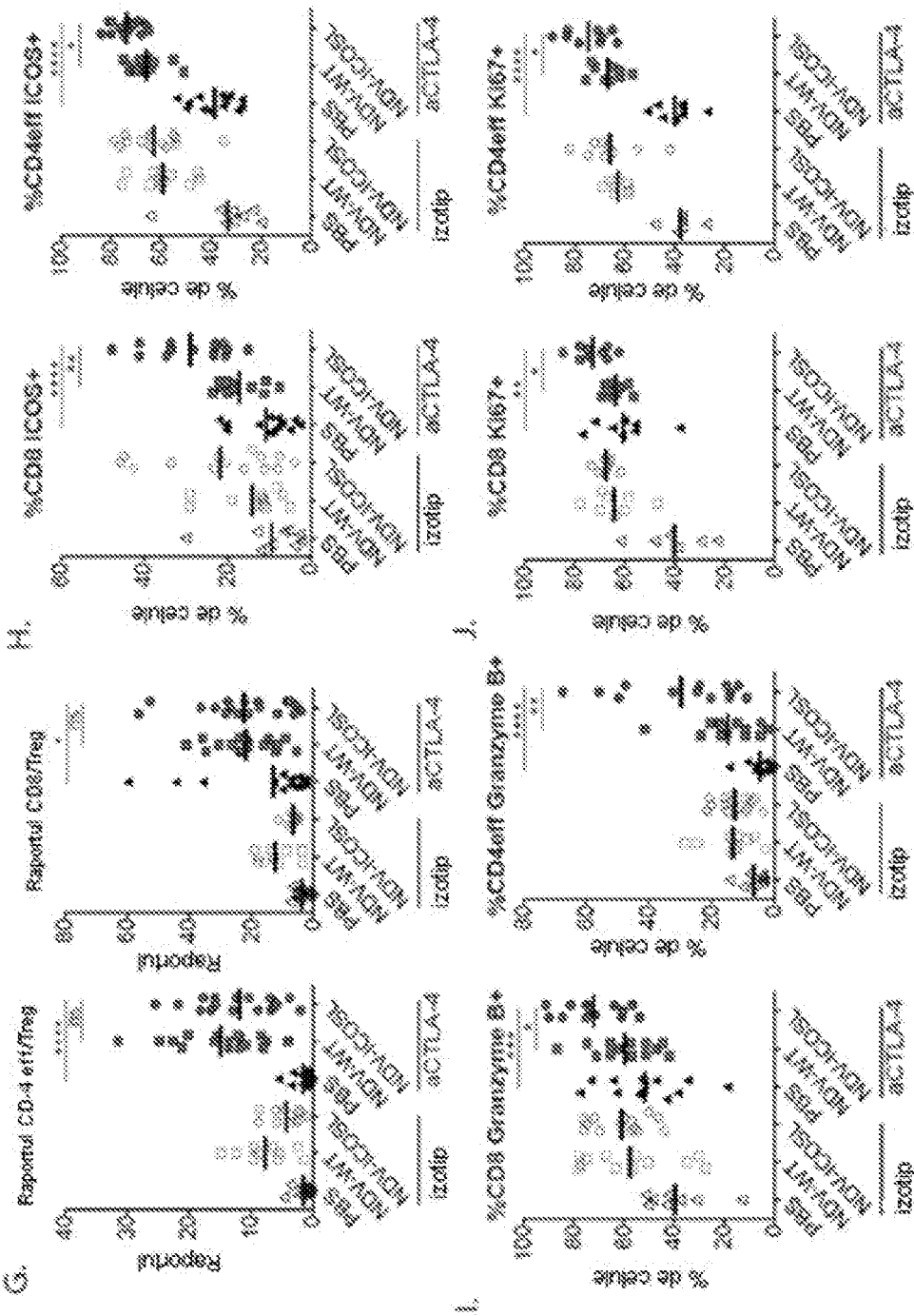


fig. 43G-43J

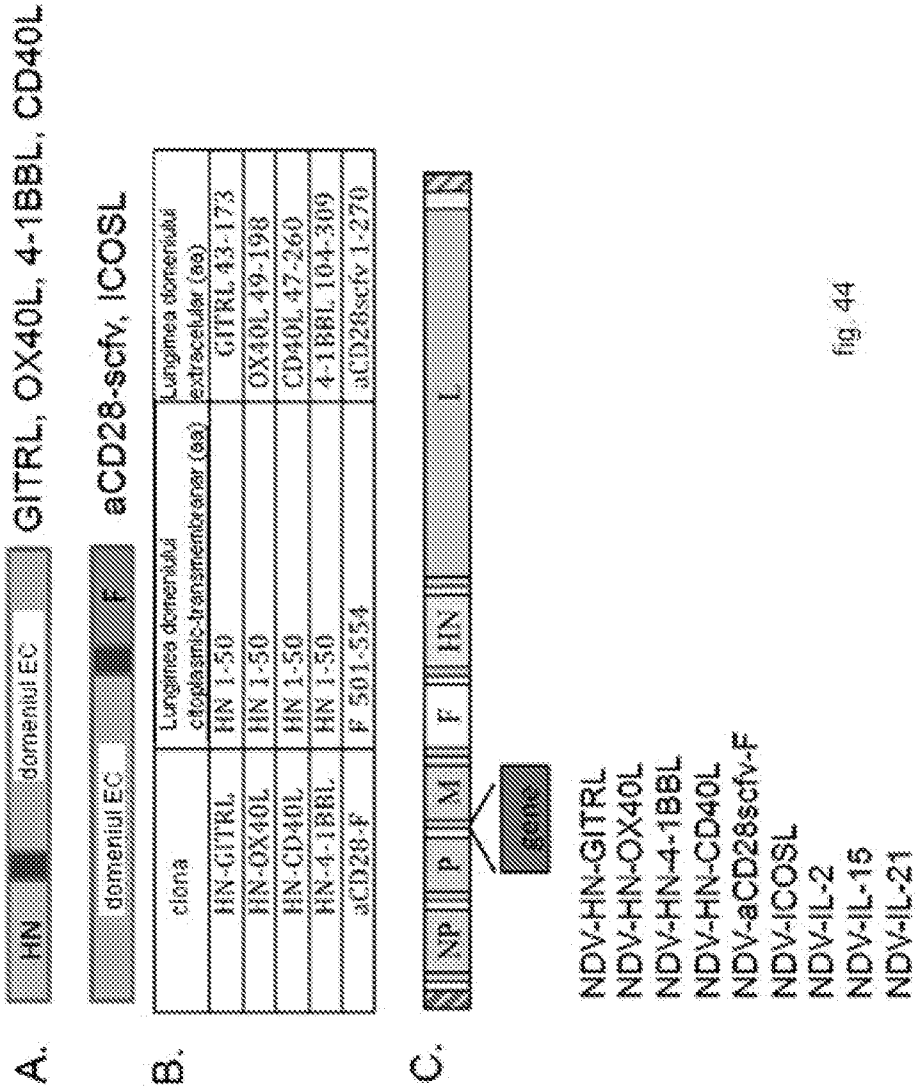


fig. 44

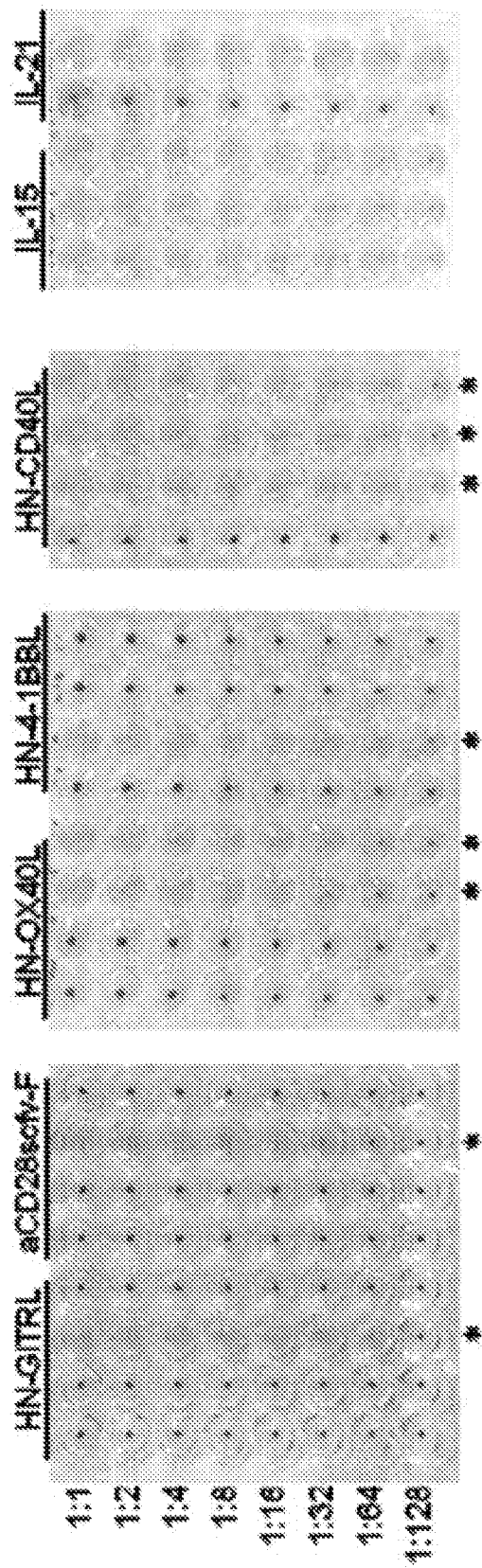
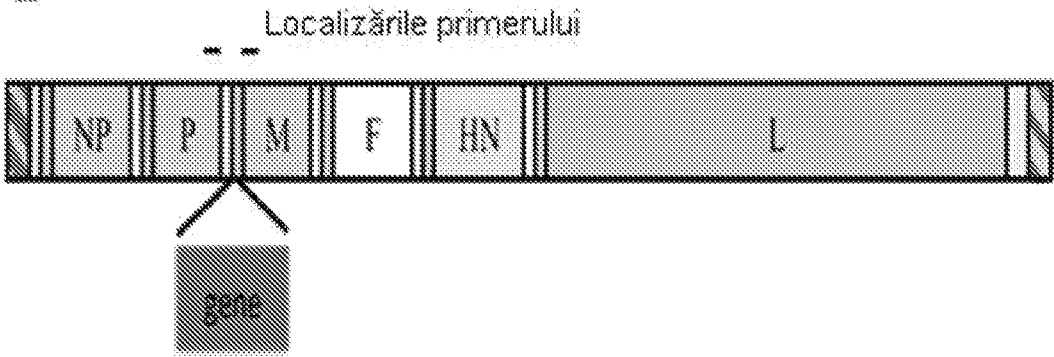


fig. 45A

B



C

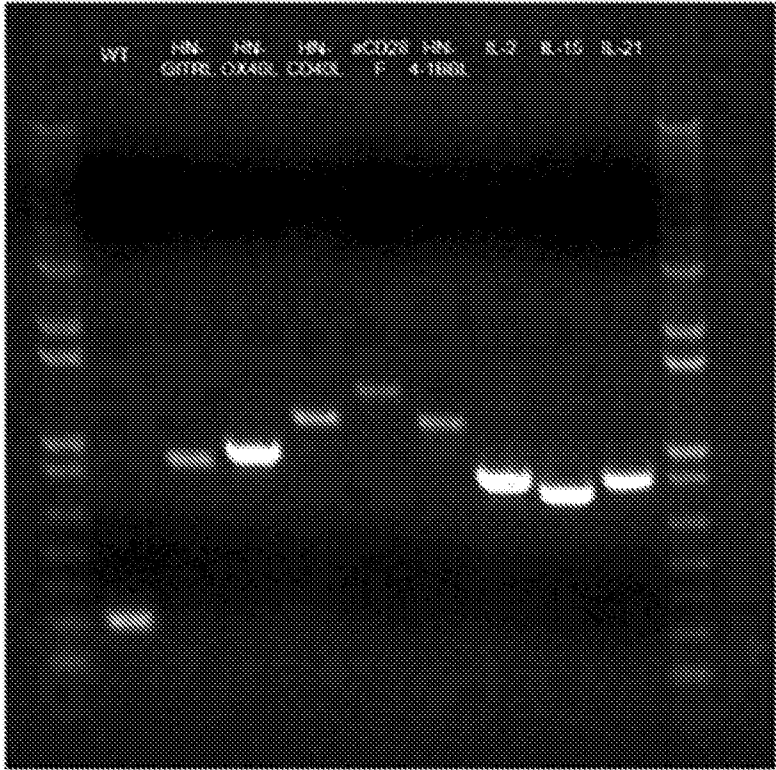


fig. 45B-45C

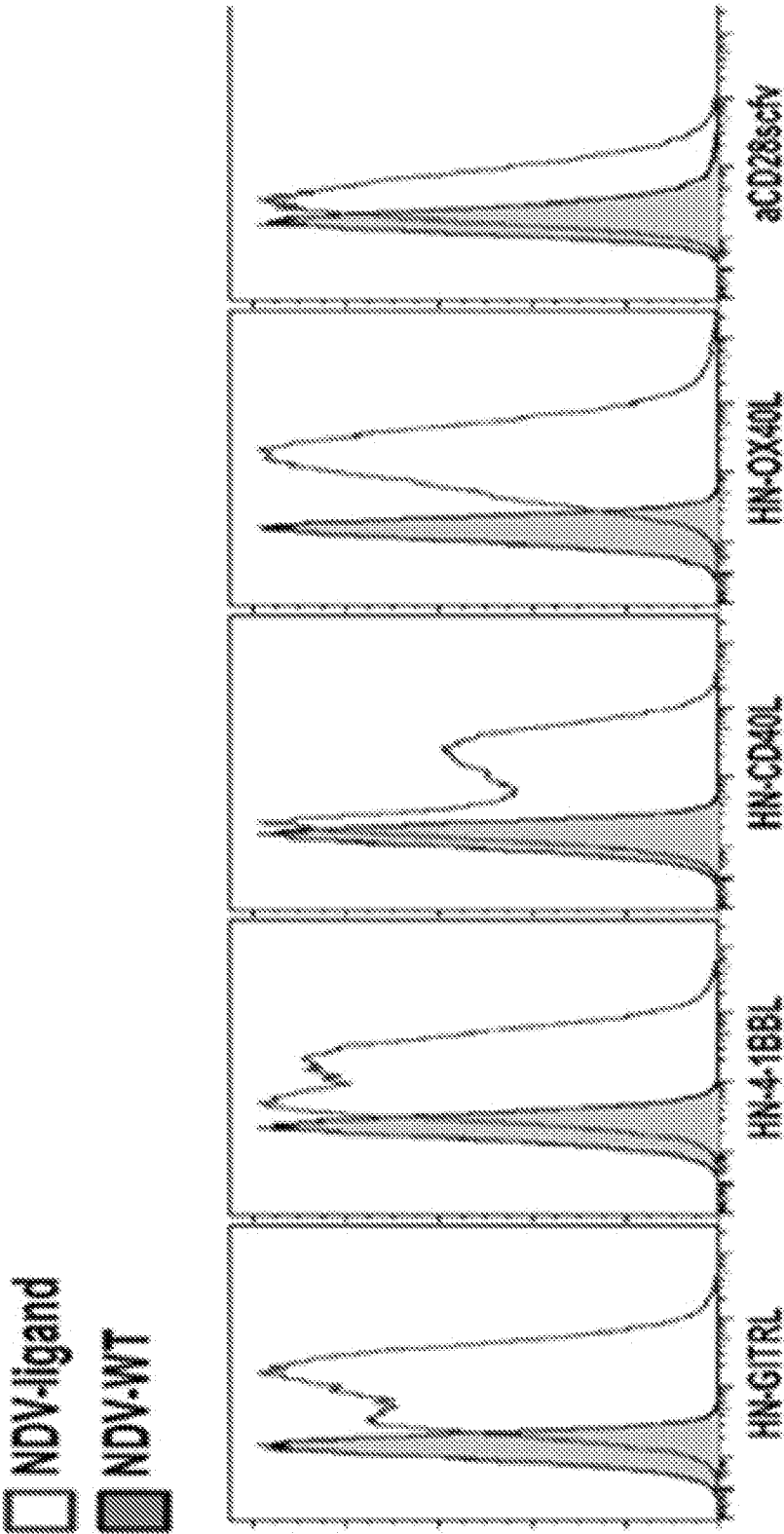


fig. 46

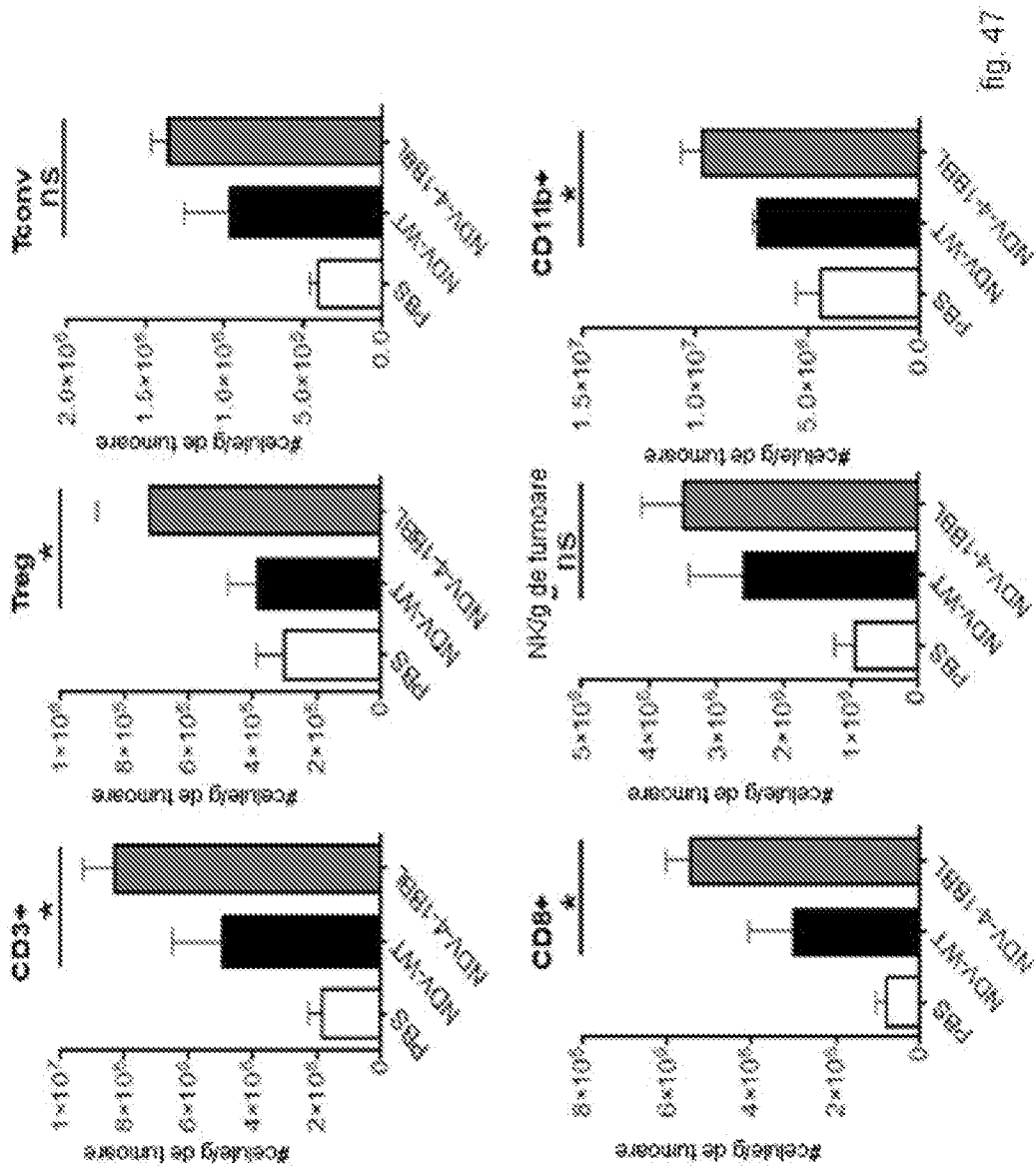


fig. 47

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2015 0100 (32) Data de prioritate recunoscută: 2013.03.14
 (22) Data depozit: 2014.03.04 Raport de documentare internațională: ☒ da
 (85) Data deschiderii fazei naționale: 2015.10.12
 (86) Cerere internațională: PCT/US2014/020299, 2014.03.04
 (87) Publicarea cererii internaționale: WO 2014/158811 A1, 2014.10.02
 (71) Solicitant: **ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI, US; MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER, US**
 (54) Titlul: **Virusurile bolii de Newcastle și utilizarea acestora**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** **A61K 39/17** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): **Int.Cl:** **A61K 39/17** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
 Virus bolii Newcastle, NDV, proteina morții celulare programate 1 (PD1), cancer
"Worldwide" (Espacenet): **Int.Cl:** **A61K 39/17** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
 Newcastle disease virus, NDV, programmed cell death protein 1(PD1), cancer
EA, CIS (Eapatis): **Int.Cl:** **A61K 39/17** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
 Вирус болезни Ньюкасла, NDV, запрограммированный белок клеточной гибели 1(PD1)?
 пак
SU (certificate de autor): **Int.Cl:** **A61K 39/17** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
 Вирус болезни Ньюкасла, NDV, запрограммированный белок клеточной гибели 1(PD1)?
 пак
Patsearch: Newcastle disease virus, NDV, programmed cell death protein 1(PD1), cancer

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	Sinkovics J.G., Horvath J.C. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. J.Clin. Virol., no 16, 2000, p. 1-15	1-62
A, D	Lorence et al. Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. Curr. Cancer Drug targets, no 7, 2007, p. 157-167	1-62
A, D, C	Hotte et al. An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. Clin. Cancer Res., no 13, 2007, p. 977-985	1-62
Y	US 2009/0280144 A1 2009.11.12	1-62
Y	US 2011/0189189 A1 2011.08.04	1-62
Y	US 2012/0058141 A1 2012.03.08	1-62
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general		T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur		E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie		D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare		C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
		& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate		L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2018.10.04		
Examinator GROSU Petru		