



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.21

(21) Номер заявки
201791971

(22) Дата подачи заявки
2016.04.29

(51) Int. Cl. *A61K 35/761* (2015.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(54) ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ АДЕНОВИРУС, КОДИРУЮЩИЙ БЕЛОК В7

(31) 1507419.8; 1516936.0; 1522013.0
(32) 2015.04.30; 2015.09.24; 2015.12.14
(33) GB
(43) 2018.04.30
(86) PCT/EP2016/059609
(87) WO 2016/174200 2016.11.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПСАЙОКСУС ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Чемпион Брайан Роберт, Бромли Элис
Клэр Ноэль (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) CHOI K-J ET AL.: "Concurrent delivery of GM-CSF and B7-1 using an oncolytic adenovirus elicits potent antitumor effect", GENE THERAPY, vol. 13, no. 13, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 1010-1020, XP002571567, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/SJ.GT.3302759 [retrieved on 2006-03-09] abstract figures 1-8 page 1017, left-hand column, paragraph 2 - page 1018, left-hand column, paragraph 1

JIANG W. ET AL.: "The Controlled Transgen Expression in Oncolytic Adenoviral Vectors with Major Late Promoter for Therapy of Cancer",

MOLECULAR THERAPY, vol. 13, 1 January 2006 (2006-01-01), page S251, XP005675760, ISSN: 1525-0016 abstract

WO-A2-2005118825

WO-A1-0015823

PÜTZER B. M. ET AL.: "Improved treatment of pancreatic cancer by IL-12 and B7.1 costimulation: antitumor efficacy and immunoregulation in a nonimmunogenic tumor model", MOLECULAR THERAPY, vol. 5, no. 4, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 405-412, XP002421571 ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1006/MTHE.2002.0570 the whole document

WO-A1-2015059303

WO-A2-0153506

HERMISTON TERRY W. ET AL.: "Armed therapeutic viruses: Strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes", CANCER GENE THERAPY, vol. 9, no. 12, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 1022-1035, XP002380640, ISSN: 0929-1903, DOI: 10.1038/SJ.CGT.7700542 abstract page 1028, right-hand column, paragraph 2 - page 1029, left-hand column, paragraph 3 page 1030, left-hand column, paragraph 2

Z-B HU ET AL.: "A simplified system for generating oncolytic adenovirus vector carrying one or two transgenes", CANCER GENE THERAPY, vol. 15, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 173-182, XP055017566, ISSN: 0929-1903, DOI: 10.1038/sj.cgt.7701105 abstract figure 1 page 180, right-hand column, line 29 - line 38

(57) В документе предложен репликационно-компетентный онколитический аденовирус с селективностью к раковым клеткам, при этом указанный аденовирус содержит трансген под контролем промотора, эндогенного для данного вируса, и при этом указанный трансген содержит последовательность ДНК, кодирующую белок В7 или его активный фрагмент, композиции, содержащие указанный аденовирус, способы получения вирусов и применение указанных вирусов и композиций в лечении, в частности в лечении рака.

В настоящем описании предложен онколитический аденовирус, содержащий трансген, кодирующий по меньшей мере белок B7, такой как CD80, или его активный фрагмент, композиции, содержащие указанный аденовирус, и применение указанных вируса и композиций в лечении, в частности, в лечении рака.

Уровень техники

Рак все еще представляет собой огромную социальную нагрузку на общество с точки зрения тяжести и страданий пациентов и их близких, и также с точки зрения высоких финансовых расходов на лечение, уход и поддержку пациентов. В настоящее время считают, что иммунная система здоровых индивидов регулярно удаляет раковые клетки. Тем не менее, у пациентов с раком один или более из механизмов защиты, вовлеченных в такой клиренс, подавлены или полностью исключены.

В настоящее время известно, что опухоли изменяют свое микроокружение, чтобы оно позволяло им расти. Это происходит в результате высвобождения опухолью внеклеточных сигналов, которые, например, стимулируют ангиогенез опухоли и/или вызывают локальное подавление иммунного ответа или иммунологическую толерантность.

По результатам многих различных доклинических и клинических исследований очевидно, что микроокружение опухоли может подавлять развитие и активность противоопухолевых иммунных ответов, при этом было показано потенциальное участие широкого ряда механизмов. В частности, подавляющие иммунную систему механизмы в конечном счете предотвращают опосредование Т-клетками уничтожения клеток опухоли. Подавляющие иммунную систему механизмы могут включать предотвращение проникновения Т-клеток в ткани опухоли, ингибирование активации Т-клеток, которые все же проникли в опухоль, и модуляцию белков клетки опухоли, которая снижает способность Т-клеток распознавать их или отвечать на них. Важность таких подавляющих иммунную систему путей для поддержания прогрессирования опухоли, в частности, продемонстрировала клиническая эффективность, которую проявили антитела к рецепторам из двух таких подавляющих путей - CTLA4 и PD-1/PDL1, - что привело к разрешению их продажи для лечения меланомы и других видов рака.

B7 представляет собой тип периферического мембранного белка, находящегося на активированных антиген-представляющих клетках (АПК), который при соединении с поверхностным белком CD28 либо CD152 (CTLA-4) на поверхности Т-клетки может продуцировать костимулирующий сигнал или коингибирующий сигнал, чтобы повысить или снизить активность сигнала МНС-TCR между антиген-представляющей клеткой (АПК) и Т-клеткой, соответственно. Помимо того, что B7 присутствует на активированных АПК, его также можно обнаружить и на самих Т-клетках.

Существует несколько этапов активации иммунной системы против антигена. Т-клеточный рецептор должен сначала взаимодействовать с комплексом специфического пептидного антигена (АГ), связанного с поверхностным белком главного комплекса гистосовместимости (МНС). Белки CD4 или CD8 на поверхности Т-клетки взаимодействуют с МНС для лучшего стабилизирования взаимодействия МНС/АГ с комплексом Т-клеточного рецептора, который содержит как димеры антиген-связывающих цепей (альфа/бета или гамма/дельта), так и сигнальный комплекс CD3 (содержащий цепи гамма, дельта, эпсилон и дзета). Его также называют "сигнал 1", и его главной целью является передача исходного сигнала и обеспечение антигенспецифичности активации Т-клеток.

Тем не менее, самого по себе связывания МНС недостаточно для полноценной стимуляции дифференцировки и активации эффекторных Т-клеток. В действительности, отсутствие дополнительных стимулирующих сигналов может привести к анергичности Т-клетки. Костимулирующие сигналы, необходимые для продолжения иммунного ответа, могут поступать от взаимодействий B7-CD28 и CD40-CD40L. Существуют другие сигналы активации, которые участвуют в иммунных ответах. Например, в семействе молекул TNF белок 4-1BB (CD137) на Т-клетке может связываться с 4-1BBL на АПК.

Белок B7 (CD80/B7-1 и/или CD86/B7-2) присутствует на поверхности АПК, и он взаимодействует с рецептором CD28 на поверхности Т-клетки. Он представляет собой один из источников "сигнала 2" (цитокины также могут способствовать активации Т-клеток, что можно назвать "сигналом 3"). В результате такого взаимодействия вырабатывается серия последующих сигналов, которые вызывают выживаемость, активацию и дифференцировку целевой Т-клетки в эффекторную клетку, которая может опосредовать такие аспекты иммунного ответа, как уничтожение клеток, инфицированных вирусом, или опухолевых клеток и привлечение воспалительных клеток.

Обычно для запуска Т-клеточного ответа антиген-представляющая клетка обеспечивает стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для стимуляции ответов как CD4, так и CD8 Т-клеток. Но эффекторные CD8 Т-клетки распознают свой АГ, связанный с молекулами МНС класса I, которые присутствуют на большинстве содержащих ядро клеток, включая опухолевые клетки. Тем не менее, авторы настоящего изобретения обоснованно полагают, что сигналы для активации Т-клеток не обязательно должны происходить от одной и той же клетки или типа клеток. Следовательно, предоставление одного или более данных сигналов (т.е., стимулирующий сигнал и/или костимулирующий сигнал) для иммунной системы, например, на поверхности раковой клетки, является целесообразным.

На сегодняшний день гораздо больший интерес представляет ингибирование активности PD-1 (белка 1 запрограммированной гибели клеток) и/или его лиганда PDL1 (также известного как B7-H1), так как

считают, что данный путь играет важную роль в подавлении иммунных ответов, например, при раковых заболеваниях.

Тем не менее, некоторая проделанная работа позволяет предположить, что CD80 (B7-1) не только действует как костимулятор Т-клеток путем связывания с CD28 на Т-клетке, но также может связываться с PDL1, например, при экспрессии в одной и той же мембране клетки, и блокировать взаимодействия PDL1-PD1, ингибирующие передачу сигнала. Таким образом, благодаря ее действию двумя различными путями, CD80 может представлять собой перспективную и потенциально более подходящую молекулу для восстановления или усиления активации Т-клеток человека. Растворимые формы CD80, похоже, также способны противодействовать опосредованному PDL1-PD1 ингибированию Т-клеток, см., например, Haile и др. Soluble CD80 Restores T Cell Activation and Overcomes Tumor Cell Programmed Death Ligand 1-Mediated Immune Suppression, *J Immunol* 2013; 191:2829-2836. Был получен слитый белок CD80-Fc, и исследована его безопасность и эффективность, см. *Journal of Immunology*, 2014, 193: 3835-3841.

Авторы настоящего изобретения полагают, что белки B7 или их активные фрагменты, доставленные и экспрессированные онколитическим вирусом, например, на поверхности раковой клетки, являются подходящими для активации собственной иммунной системы пациента для борьбы с раком.

Более того, белки B7, такие как CD80, просто при системном введении обладают способностью системно стимулировать иммунные ответы нежелательным путем. Авторы настоящего изобретения полагают, что необходима более сложная доставка данных белков для создания подходящего терапевтического окна, в котором осуществляется полезное терапевтическое действие, а побочное действие минимизируется.

Краткое описание изобретения

Таким образом, предложен онколитический аденовирус с селективностью к раковым клеткам, при этом указанный аденовирус содержит трансген под контролем промотора, эндогенного для вируса, и при этом указанный трансген содержит последовательность ДНК, кодирующую белок B7 или его активный фрагмент. Это дает преимущества, так как онколитические вирусы согласно настоящему описанию предпочтительно инфицируют раковые клетки и, таким образом, проникают в микроокружение, созданное раком. После проникновения в раковые клетки белки B7, кодируемые вирусом, могут экспрессироваться, например, на поверхности клетки (т.е. на поверхности раковой клетки). Это является преимуществом, так как белок B7 оказывается в желательном местоположении, где он может быть биологически активным.

В одном варианте реализации кодируемый белок B7 содержит последовательность, способную связывать указанный белок на поверхности клетки, например, последовательность трансмембранного домена, GPI-якорь или тому подобное.

Таким образом, в одном варианте реализации указанная раковая клетка инфицирована вирусом согласно настоящему описанию, который экспрессирует белок или молекулу B7, в частности на поверхности раковой клетки, при этом указанный белок B7 подходит для передачи по меньшей мере костимулирующего сигнала, т.е., сигнала 2 для активации Т-клетки, и/или может связывать PD-L1 и ингибировать активность PD-L1, экспрессированного на поверхности раковой клетки или других клеток в локальном микроокружении.

В одном варианте реализации последовательность B7 содержит трансмембранный элемент из белка B7, например, трансмембранный элемент, нативный для конкретного белка B7, или трансмембранный домен из белка B7, "отличного" от данного экспрессируемого белка.

Белки B7 представляют собой экспрессируемые на поверхности белки, и их также можно применять для транспортировки дополнительных белков на поверхность раковой клетки, например, если, по меньшей мере, трансмембранный домен белка B7 присоединен к дополнительному белку.

Таким образом, в одном аспекте предложен репликационно-компетентный онколитический аденовирус с селективностью к раковым клеткам, при этом указанный аденовирус содержит трансген под контролем промотора, эндогенного для вируса, и при этом указанный трансген содержит последовательность ДНК, кодирующую белок B7 или его активный фрагмент.

Также предложен репликационно-компетентный онколитический вирус по п.1, причем указанный белок B7 или его активный фрагмент независимо выбран из группы, включающей B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5 и B7-H6, в частности, при этом указанный белок B7 представляет собой B7-1 (CD80) или его активный фрагмент.

В одном варианте реализации репликационно-компетентный онколитический вирус представляет собой аденовирус группы В.

В одном варианте реализации репликационно-компетентный онколитический вирус представляет собой химерный вирус.

В одном варианте реализации репликационно-компетентный онколитический вирус содержит каркас энadenотуцирева (enadenotucirev) (также называемого EnAd).

В одном варианте реализации предложен репликационно-компетентный онколитический вирус формулы (I)

5'ITR-B1-BA-B2-BX-BB-BY-B3-3'ITR

(I)

B1 включает E1A, E1B или E1A-E1B;

BA представляет собой E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B2 представляет собой связь или включает E3 или трансген, например, под контролем эндогенного или экзогенного промотора; B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или и то, и другое; B_B включает L5;

BY включает трансген, кодирующий белок B7 или его активный фрагмент; и

B3 представляет собой связь или включает E4.

В одном варианте реализации предложен репликационно-компетентный онколитический вирус по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный белок B7 или его активный фрагмент содержит трансмембранную последовательность, например, трансмембранный домен из рецептора PDGF, или GPI-якорь, подходящий для закоривания белка или его фрагмента в мембрану клетки.

В одном варианте реализации репликационно-компетентный онколитический вирус дополнительно содержит второй трансген, например, кодирующий полипептид, выбранный из группы, включающей цитокин, хемокин, молекулу антагонистического антитела или ее фрагмент и молекулу агонистического антитела или ее фрагмент.

В одном варианте реализации указанные второй и третий трансгены, например, кодирующие два различных полипептида, выбраны из группы, включающей цитокин, хемокин, антитело, такое как молекула антагонистического антитела или ее фрагмент или молекула агонистического антитела или ее фрагмент.

В одном варианте реализации второй или третий трансген кодирует цитокин, выбранный из группы, включающей IL-2, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, лиганд Flt3, GM-CSF, IL-15 и IL-12.

В одном варианте реализации второй или третий трансген кодирует хемокин, выбранный из группы, включающей MIP1 α , IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19 и CCL21.

В одном варианте реализации комбинация цитокинов и хемокинов кодируется вирусом и выбрана из группы, включающей Mip1 α и лиганд Flt3, и MIP1 α и IFN α .

В одном варианте реализации указанный вирус кодирует молекулу антитела или ее фрагмент, например, содержащий трансмембранную последовательность или GPI-якорь, таким образом, что она представляет собой заякоренную в мембрану клетки форму, или транс мембранный домен, например, из рецептора PDGF.

В одном варианте реализации молекула антитела или ее связывающий фрагмент содержит домен, связывающий антиген CD3 человека.

В одном варианте реализации молекула антитела представляет собой ингибитор, например, выбранный из группы, включающей ингибитор фактора ангиогенеза, такой как молекула антитела к VEGF, и ингибитор факторов инактивирования Т-клеток, такой как молекула антитела к CTLA-4.

В одном варианте реализации молекула антитела представляет собой агонист, например, одной или более молекул, выбранных из группы, включающей CD40, GITR, OX40, CD27 и 4-1BB.

В одном варианте реализации экзогенный белок или белки, кодируемые указанным вирусом, представлены в форме, подходящей для экспрессии на поверхности раковой клетки.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - показаны некоторые из ключевых молекул, вовлеченных в распознавание Т-клетками антиген-представляющих клеток или опухолевых клеток, и некоторые из сигнальных событий, вызванных в реагирующей Т-клетке. Также проиллюстрирована структура PDL1 и взаимодействие с доменом IgV PD1.

Фиг. 2 - показаны некоторые из лигандов семейства B7 и их партнеры по связыванию из семейства рецепторов CD28.

Фиг. 3 - показано схематическое изображение касет трансгенов для вирусов, экспрессирующих CD80 человека (фиг. 3A), совместно экспрессирующих IFN α человека и CD80 человека (фиг. 3B), совместно экспрессирующих scFv OKT3 и CD80 человека (фиг. 3C), совместно экспрессирующих Flt3L человека, MIP1 α человека и IFN α человека (фиг. 3D), совместно экспрессирующих Flt3L человека, MIP1 α человека и CD80 человека (фиг. 3E), совместно экспрессирующих IFN α человека, MIP1 α человека и CD80 человека (фиг. 3F), и схематическое изображение открытой рамки считывания (ORF) или scFv OKT3 (фиг. 3G).

Фиг. 4 - показана репликация EnAd (ColoAd1) и вируса, кодирующего CD80 человека, - NG-330 - в опухолевых клетках HT-29 (фиг. 4A) и A549 (фиг. 4B).

Фиг. 5 - показана экспрессия CD80 в мембране опухолевых клеток A549 (фиг. 5A) или HT-29 (фиг. 5B) с помощью флуоресцентного иммуноокрашивания в различные моменты времени после инфицирования NG-330. Не наблюдали экспрессию CD80 на мембране клеток для EnAd или неинфицированных опухолевых клеток (НОК).

Фиг. 6 - показаны сравнительные онколитические эффективности EnAd и NG-330 в анализе цитотоксичности HT-29. Таким образом, NG-330 сохраняет свои онколитические свойства, при этом также несет трансген.

Фиг. 7 - показана сравнительная онколитическая эффективность EnAd и экспрессирующего CD80 + IFN α вируса NG-343 (фиг. 7A) и секреция IFN α инфицированными NG-343 опухолевыми клетками HT-29 и A549 в течение периода времени до 72 ч.

Фиг. 8 - показана экспрессия CD80 и уничтожение клеток опухоли через 48 или 72 часа после инфицирования с помощью анализа методом сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) с применением окрашивания мечеными антителами к CD8 наряду с окрашиванием клеток на жизнеспособность. CD80 можно обнаружить на поверхности как живых, так и мертвых клеток, обработанных NG-343, но не на поверхности инфицированных EnAd или неинфицированных контрольных опухолевых клеток (НОК) A549 (фиг. 8A-D). Сходную экспрессию CD80 наблюдали для обеих линий опухолевых клеток A549 и HT-29 (фиг. 8E).

Фиг. 9 - показана сравнительная репликация вируса для обоих вирусов EnAd и NG-343 в опухолевых (HT-29) и неопухолевых клетках (MRC5, WI38 и клетках эпителия бронхов), при этом в последних выявили гораздо более низкие уровни репликации (фиг. 9A), секреции IFN α (фиг. 9B) и экспрессии CD80 (фиг. 9C) после инфицирования NG-343, которые обнаруживали лишь в опухолевых клетках HT-29.

Фиг. 10 - показано, что опухолевые клетки A549, инфицированные NG-343, могут вызывать повышение уровней экспрессии как CD80, так и PD-L1 на поверхности дендритных клеток в совместных культурах с PBMC по сравнению с инфицированными EnAd или неинфицированными культурами клеток опухоли.

Фиг. 11 - показана экспрессия IFN α и CD80 опухолевыми клетками HT-29 (фиг. 11 A и C) и A549 (фиг. 11B и C), инфицированными вирусом NG-347.

Фиг. 12 Показана экспрессия MIP1 α (фиг. 12A), IFN α (фиг. 12B) и Flt3L (фиг. 12C) опухолевыми клетками A549, инфицированными вирусом NG-345.

Фиг. 13 - показана сравнительная онколитическая эффективность (фиг. 13A и B) и инфекционная способность (фиг. 13C) вирусов EnAd, NG-347 и NG-348 в анализе цитотоксичности HT-29.

Фиг. 14 - показан высокий уровень экспрессии CD80 к 48 часам на поверхности опухолевых клеток A549, инфицированных либо вирусом NG-347, либо вирусом NG-348, но незначительная экспрессия или отсутствие экспрессии CD80 после инфицирования EnAd.

Фиг. 15 - показан высокий уровень экспрессии CD80 к 48 часам на поверхности опухолевых клеток DLD-1, инфицированных либо вирусом NG-347, либо вирусом NG-348, но незначительная экспрессия или отсутствие экспрессии CD80 после инфицирования EnAd.

Фиг. 16 - показана экспрессия CD80 на EpCam⁺ клетках A549, инфицированных NG-348 и совместно культивированных с CD3⁺ Т-клетками человека, но не в случае инфицирования EnAd.

Фиг. 17 - показано, что экспрессия CD25 повышена на CD3⁺ Т-клетках человека после совместного культивирования с инфицированными NG-348 клетками A549, но не в случае инфицирования EnAd (фиг. 17A), при этом как процент CD25⁺ клеток (фиг. 17B), так и уровень экспрессии CD25 на клетку (фиг. 17C) был повышен.

Фиг. 18 - показано, что экспрессия CD25 повышена на обеих субпопуляциях CD4⁺ и CD4⁺ (преимущественно CD8) CD3⁺ Т-клеток человека после совместного культивирования с инфицированными NG-348 клетками A549, но не в случае инфицирования EnAd.

Фиг. 19 - показан низкий уровень экспрессии HLA-DR на CD3⁺ Т-клетках человека после совместного культивирования с клетками A549, инфицированными NG-348 или EnAd.

Фиг. 20 - показана индукция экспрессии CD107a на поверхности живых CD3⁺ Т-клеток после совместного культивирования с инфицированными NG-348 клетками A549, но не в случае инфицирования EnAd.

Фиг. 21 - показана индукция экспрессии CD107a на поверхности как CD4⁺, так и CD4⁺CD3⁺ субпопуляций Т-клеток после совместного культивирования с инфицированными NG-348 клетками A549, но не в случае инфицирования EnAd.

Фиг. 22 - показана индукция продукции IL-2 (фиг. 22A) и IFN γ (фиг. 22B) CD3⁺ Т-клетками после совместного культивирования с инфицированными NG-348 клетками A549, но отсутствие IL-2 и лишь низкие уровни IFN γ в случае инфицирования EnAd.

Фиг. 23 - показана индукция продукции IFN γ как CD4⁺, так и CD8⁺ (фиг. 22B) CD3⁺ Т-клетками после совместного культивирования с инфицированными NG-348 клетками A549, но отсутствие (CD4⁺ клетки) или низкие уровни (CD8⁺ клетки) IFN γ в случае инфицирования EnAd.

Фиг. 24 - показано, что экспрессия CD69 повышена на большем количестве CD3⁺ Т-клеток человека после совместного культивирования с инфицированными NG-347 клетками A549, чем в случае инфицирования EnAd.

Фиг. 25 - показана индукция продукции IFN γ CD3⁺ Т-клетками человека после совместного куль-

тивирования с инфицированными NG-347 клетками A549, но не в случае инфицирования EnAd.

Фиг. 26 - показано схематическое изображение кассет трансгенов NG-348A, NG-420 и NG-420A.

Фиг. 27 - показана репликация генома и экспрессия гена гексона (уровни мРНК) для EnAd, NG-347 и NG-348 в клетках фибробластов MRC-5 по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 28 - показана экспрессия трансгенной мРНК CD80 и scFv к CD3 и трансгенного белка CD80 (проточная цитометрия) для вируса NG-348 в клетках фибробластов MRC-5 по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 29 - показана трансгенная мРНК CD80 и трансгенный белок CD80 для вируса NG-347 в клетках фибробластов MRC-5 по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 30 - показаны уровни мРНК и секретированного белка MIP1 α и IFN α , продуцированных вирусом NG-347 в клетках фибробластов MRC-5 по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 31 - показана репликация генома и экспрессия гена гексона (уровни мРНК) для EnAd, NG-347 и NG-348 в очищенных культурах Т-клеток человека.

Фиг. 32 - показана экспрессия трансгенных мРНК и белка CD80 и scFv к CD3 (проточная цитометрия) для вируса NG-348 в Т-клетках человека по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 33 - показана трансгенная мРНК CD80 и трансгенный белок CD80 для вируса NG-347 в очищенных Т-клетках человека по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 34 - показана трансгенная мРНК IFN α и MIP1 α , созданная вирусом NG-347 в Т-клетках по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 35 - показана репликация генома NG-347 и NG-348 и экспрессия гена гексона клетками PBMC человека по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 36 - показана мРНК CD80 и scFv к CD3, созданная вирусом NG-348 в PBMC, по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 37 - показана мРНК CD80, IFN α и MIP1 α , созданная вирусом NG-347 в PBMC, по сравнению с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 38 - показана сходная активация дендритных клеток человека вирусными частицами EnAd, NG-347 и NG-348, которую измерили по пониженной экспрессии CD14 и повышенной экспрессии CD80 на поверхности клеток.

Фиг. 39 - показана сходная опосредованная частицами секрета белков MIP1 α и IFN α из PBMC, культивированных с NG-348 (А) или NG-347 (В) по сравнению с EnAd.

Фиг. 40 - показана репликация генома NG-347 или NG-348 в совместных культурах Т-клеток или PBMC с клетками фибробластов MRC-5 по сравнению с совместными культурами с опухолевыми клетками A549.

Фиг. 41 - показан INF γ , секретированный клетками PBMC или Т-клетками, совместно культивированными с клетками фибробластов MRC-5 по сравнению с опухолевыми клетками A549, и обработанными EnAd или вирусом NG-348. Фиг. 42 Показаны MIP1 α и IFN α , секретированные дендритными клетками человека, обработанными вирусными частицами EnAd, NG-347 или NG-348.

Фиг. 43 - показана активация посредством NF κ B и IFN репортерного гена в репортерных Т-клетках JurkatDual, совместно культивированных с инфицированными EnAd, NG-347 или NG-348 опухолевыми клетками A549.

Фиг. 44 - показана активность репортерной NF κ B-люциферазы, продуцируемой репортерными Т-клетками JurkatDual, совместно культивированными с обработанными EnAd, NG-347, NG-348 или NG-420 опухолевыми клетками A549 HCT-116, DLD и HT29.

Фиг. 45 - оказана активность репортерной NF κ B-люциферазы, продуцируемой клетками JurkatDual, совместно культивированными либо с опухолевыми клетками A549, либо с опухолевыми клетками HT29, инфицированными вирусом NG-348 и вирусом NG-420 в зависимости от количества добавленных вирусных частиц.

Фиг. 46 - показана фармакокинетика EnAd и вируса NG-348 в крови; уровни цитокинов в крови после воздействия EnAd или вируса NG-348; биораспределение по тканям вирусов EnAd или NG-348 через 6 или 24 ч после внутривенного (в/в) введения мышам CD1. Фиг. 47 Показана фармакокинетика в крови вирусов EnAd, NG-347 и NG-348 после в/в введения мышам CB17-SCID, несущим подкожный ксенотрансплантат опухоли HCT-116.

Фиг. 48 - показано распределение по тканям вирусов EnAd, NG-347 и NG-348 через 6 ч после внутривенного введения дозы несущим опухоль мышам CB17-SCID, и вирусных геномов в ксенотрансплантатах опухоли HCT-116 в день 7 и дни 14-21 после внутривенного или внутриопухолевого введения дозы EnAd, NG-347 и NG-348.

Фиг. 49 - показана мРНК гексона вируса, продуцированная в ксенотрансплантатах опухоли HCT-116 вирусами EnAd, NG-347 или NG-348 в день 7 или 14-21 после внутривенного или внутриопухолевого введения дозы.

Фиг. 50 - показаны уровни мРНК для гексона и трансгена CD80 в ксенотрансплантатах опухоли HCT-116 через 7 или 21 день после внутривенного введения дозы вируса NG-348.

Фиг. 51 - показаны уровни мРНК для трансгенов, кодирующих scFv к CD3 и CD80, в ксенотрансплантатах опухоли НСТ-116 через 7 или 14-21 день после в/в введения дозы вируса NG-348.

Фиг. 52 Показаны уровни мРНК трансгенов MIP1 α и IFN α в ксенотрансплантатах опухоли НСТ-116 через 7 или 14-21 день после внутривенного введения дозы вируса NG-347.

Фиг. 53 - показана экспрессия белка CD80 в ксенотрансплантатах опухоли НСТ-116 через 7 или 21 день после внутривенного введения дозы вируса NG-348; и показана экспрессия белков MIP1 α и CD80 в опухолях НСТ-116 после внутривенного введения дозы вируса NG-347.

Краткое описание перечня последовательностей

SEQ ID NO: 1 Показана последовательность ДНК В γ , соответствующая и включающая пары оснований (п.о.) 29345 - 29379 генома EnAd. SEQ ID NO: 2 Трансмембранный (TM) домен PDGF.

SEQ ID NO: 3 Последовательность акцептора сплайсинга.

SEQ ID NO: 4 Последовательность акцептора сплайсинга.

SEQ ID NO: 5 Последовательность полиаденилирования (поздняя последовательность поли(A) SV40).

SEQ ID NO: 6 Участок внутренней посадки рибосомы (IRES).

SEQ ID NO: 7 Последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида P2A

SEQ ID NO: 8 Последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида F2A

SEQ ID NO: 9 Последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида E2A

SEQ ID NO: 10 Последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида T2A

SEQ ID NO: 11 Последовательность аминокислот CD80 человека

SEQ ID NO: 12 Последовательность аминокислот интерферона человека

SEQ ID NO: 13 Последовательность аминокислот растворимого лиганда Flt3 человека

SEQ ID NO: 14 Последовательность аминокислот воспалительного белка 1 α макрофагов человека (изоформа LD78b)

SEQ ID NO: 15 Заякоренная в мембрану форма одноцепочечного Fv к CD3 человека

SEQ ID NO: 16 Последовательность генома вируса NG-330, содержащего геном EnAd с кассетой трансгенов, которая кодирует антиген, активирующий Т-лимфоциты - CD80, встроенные в участок В γ . Указанная кассета трансгенов содержит короткий акцептор сплайсинга (5'-SSA), последовательность кДНК CD80 человека и 3'-поли(A).

SEQ ID NO: 17 Последовательность генома вируса NG-343, содержащего геном EnAd с кассетой трансгенов, которая кодирует IFN α и CD80, встроенные в участок В γ . Указанная кассета трансгенов содержит 5'-SSA, последовательность кДНК IFN α , пептид P2A, последовательность кДНК CD80 и 3'-поли(A).

SEQ ID NO: 18 Последовательность генома вируса NG-345, содержащего геном EnAd с кассетой трансгенов, которая кодирует лиганд Flt3, MIP1 α и IFN α , встроенные в участок В γ . Указанная кассета трансгенов содержит 5'-SSA, кДНК лиганда Flt3, последовательность пептида P2A, последовательность кДНК MIP1 α .

SEQ ID NO: 19 Последовательность генома вируса NG-346, содержащего геном EnAd с кассетой трансгенов, которая кодирует лиганд Flt3, MIP1 α и CD80, встроенные в участок В γ . Указанная кассета трансгенов содержит 5'-SSA, последовательность кДНК лиганда Flt3, последовательность пептида P2A, кДНК MIP1 α .

SEQ ID NO: 20 Последовательность генома вируса NG-347, содержащего геном EnAd с кассетой трансгенов, которая кодирует IFN α , MIP1 α и CD80, встроенные в участок В γ . Указанная кассета трансгенов содержит 5'-SSA, последовательность кДНК IFN α , последовательность пептида P2A, последовательность кДНК MIP1 α , T2A SEQ ID NO: 21 Геном EnAd.

SEQ ID NO: 22 Участок E2B генома EnAd (BP 10355-5068) SEQ ID NO: 23 Участок E3 из EnAd.

SEQ ID NO: 24 Некодирующая последовательность для внедрения в В χ .

SEQ ID NO: 25 Некодирующая последовательность для внедрения в В γ .

SEQ ID NO: 26-34 Последовательности шарнирных линкеров.

SEQ ID NO: 35-74 Последовательности гибких линкеров.

SEQ ID NO: 75 и 76 Последовательности жестких линкеров.

SEQ ID NO: 77-90 Последовательность линкера.

SEQ ID NO: 91 Рецептор PDGFR A.

SEQ ID NO: 92 Рецептор PDGFR B.

SEQ ID NO: 93 Инсулин-подобный фактор роста 1.

SEQ ID NO: 94 IL6-R.

SEQ ID NO: 95 CD28.

SEQ ID NO: 96 Последовательность генома вируса NG-348, содержащего геном EnAd с кассетой трансгенов, которая кодирует заякоренную в мембрану химерную форму одноцепочечного Fv к CD3 ϵ человека и антиген, активирующий Т-лимфоциты - CD80, встроенные в участок В γ .

SEQ ID NO: 97 Нуклеиновая кислота, кодирующая связанный с мембраной OKT3-scFv.

SEQ ID NO: 98 Последовательность кассеты трансгенов для NG-348.

SEQ ID NO: 99 Заякоренная в мембрану форма scFv к CD3 человека с С-концевой меткой V5.

SEQ ID NO: 100 Метка V5 (вариант из 9 аминокислот).

SEQ ID NO: 101 Последовательность генома вируса NG-348A, содержащего геном EnAd с кассетой трансгенов, которая кодирует заякоренную в мембрану химерную форму одноцепочечного Fv к CD3ε человека с С-концевой меткой V5 и антиген, активирующий Т-лимфоциты - CD80, встроенные в участок В_γ.

SEQ ID NO: 102 Последовательность генома вируса NG-420, содержащего геном EnAd с кассетой трансгенов, которая кодирует заякоренную в мембрану химерную форму одноцепочечного Fv к CD3ε человека, встроенную в участок В_γ. Указанная кассета трансгенов содержит 5'-SSA.

SEQ ID NO: 103 Последовательность генома вируса NG-420A, содержащего геном EnAd с кассетой трансгенов, которая кодирует заякоренную в мембрану химерную форму одноцепочечного Fv к CD3ε человека и С-концевую метку V5, встроенные в участок В_γ. Указанная кассета трансгенов содержит: SEQ ID NO: 104 Линкер.

SEQ ID NO: 105 Последовательность, содержащая иницирующий кодон SEQ ID NO: 106 Метка с-тус.

SEQ ID NO: 107 Метка с-тус с аминокислотным спейсером на N- и С-конце SEQ ID NO: 108 Спейсер - метка с-тус - спейсер ТМ домен PDGF SEQ ID NO: 109 Полностью синтетический геном EnAd со встроенным сайтом клонирования для вставки кассеты трансгенов, как в плазмиде pEnAd2.4

Подробное описание изобретения

В7 представляет собой семейство белков.

Белок В7, кодируемый в онколитических вирусах согласно настоящему описанию, может быть подходящим, так как внеклеточный домен представителя данного семейства белков, как правило, модулирует биологическую функцию, например, внеклеточный домен В7-1 можно применять для примирования или стимулирования Т-клеток. Фактическая биологическая функция специфична для внеклеточного домена каждого из данных белков В7 (т.е., в целом различные белки - представители семейства В7 - осуществляют различные функции). Другие функции белков В7, таких как В7-1 и/или В7-2, могут включать способность связываться с CD28 и/или CTLA-4 и, в частности, передавать сигнал или активировать соответствующий сигнальный каскад или каскады.

В качестве дополнения или альтернативы, трансмембранный домен белков В7 можно применять, чтобы направлять белки, кодируемые вирусом согласно настоящему описанию, на поверхность раковой клетки, например, путем присоединения трансмембранного домена к С-концу соответствующего белка.

Белок В7, используемый в данной заявке, если в контексте не указано иначе, относится к полноразмерной последовательности белка из семейства В7 или к последовательности, по меньшей мере на 95% сходной или идентичной ей (например, на 96, 97, 98, 99 или 100% сходной или идентичной ей, по всей длине соответствующей последовательности). Семейство В7 включает В7-1, В7-2, В7-DC, В7-H1, В7-H2, В7-H3, В7-H4, В7-H5, В7-H6, В7-H7. Если используют полноразмерный белок, то, как правило, будет присутствовать по меньшей мере одна нормальная биологическая функция указанного белка.

Полноразмерный белок, по отношению к семейству В7, относится по меньшей мере к внеклеточному домену, включая химерные белки В7, при этом последовательность химеры обладает структурой и функцией белка В7 и при этом последовательности, которые составляют химеру, выбраны из белков семейства В7. Элементы во фрагменте или полноразмерном белке В7 могут быть из одного и того же или различных белков В7. Таким образом, в одном варианте реализации фрагмент или белок В7 является химерным.

Химерные белки В7, используемые в данной заявке, относятся к белкам, в которых по существу все последовательности, которые составляют химеру, получены из белка В7, например, по меньшей мере 98% последовательности химеры представляют собой фрагменты белков В7, соединенные в один белок. Таким образом, химерный фрагмент, используемый в данной заявке, относится к фрагменту, содержащему последовательность из двух или более различных белков В7.

В одном варианте реализации полноразмерный белок В7 содержит внеклеточный домен, например, из одного белка В7, такого как В7-1 и/или В7-2.

В одном варианте реализации полноразмерный белок В7 содержит внеклеточный домен и трансмембранный домен, например, из одного и того же белка В7 или, в качестве альтернативы, внеклеточный домен из белка В7 (такого как В7-1 и/или В7-2) и трансмембранный домен или его эквивалент, такой как липидный мембранный якорь, из совершенно другого белка.

В одном варианте реализации полноразмерный химерный белок В7 может содержать внеклеточный домен из одного белка В7 (такого как В7-1 и/или В7-2) и трансмембранный домен из отличного белка В7.

В одном варианте реализации полноразмерный белок В7 содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, например, из одного и того же белка В7 или из двух или более различных белков В7.

Активный фрагмент белка В7, используемого в данной заявке, относится к фрагменту, обладающе-

му по меньшей мере одной функцией белка В7, например, способствовать экспрессии на поверхности раковой клетки, или другой биологической функцией белка В7.

В одном варианте реализации указанный фрагмент обладает по меньшей мере 50% активности полноразмерного белка, например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% активности полноразмерного белка.

В одном варианте реализации активный фрагмент включает или состоит из внеклеточного домена В7 или последовательности, по меньшей мере на 95% сходной или идентичной ему, например, на 96, 97, 98, 99 или 100% сходной или идентичной ему.

В одном варианте реализации фрагмент В7 включает или состоит из трансмембранного домена из белка В7, в частности, из описанного в данной заявке белка В7, такого как В7-1. Считают, что применение последнего из упомянутых способствует экспрессии на поверхности клетки.

В одном варианте реализации активный фрагмент В7 может быть частью внеклеточного домена.

Активный фрагмент, например, трансмембранный фрагмент или более длинный фрагмент, содержащий больше доменов В7, можно применять для получения белка, слитого с дополнительным белком, например, чтобы способствовать экспрессии указанного дополнительного белка на поверхности раковой клетки.

Более длинный фрагмент, используемый в данной заявке, не относится к размеру или массе как таковым, а относится к большому репертуару содержащейся в последовательности информации (т.е. указанный фрагмент содержит последовательности из по меньшей мере двух доменов В7), что, в свою очередь, может привести к большим функциональным возможностям.

В одном варианте реализации более длинный фрагмент обладает некоторой биологической активностью соответствующего белка В7. В одном варианте реализации активный фрагмент В7 представляет собой фрагмент, который сохраняет важную биологическую активность полноразмерного белка, например, способность примировать или активировать Т-клетки.

Активность данного фрагмента белка можно проанализировать в соответствующем анализе *in vitro*, например, сравнивая с полноразмерным белком, например, используя анализ, описанный в Примерах в данной заявке. Если активный фрагмент представляет собой трансмембранный домен, то активность можно оценить путем анализа экспрессии на поверхности клеток соответствующего белка, к которому присоединен трансмембранный домен, например, применяя анализ, описанный в примерах в данной заявке.

Если полноразмерный белок В7 является частью слитого белка, то часть В7 может быть связана с дополнительным белком с помощью амидной связи между концом одной последовательности и началом следующей белковой последовательности или соединена посредством линкера. Примеры линкеров приведены ниже.

Полноразмерный белок В7, содержащий трансмембранный домен, можно использовать для представления внеклеточного домена белка В7 и белка или фрагмента, слитого или связанного с ним, на поверхности инфицированной раковой клетки. Как правило, в данном варианте реализации белок В7 будет присоединен к поверхности раковой клетки, а "другой" белок будет находиться на N-конце и на внеклеточной стороне поверхности раковой клетки.

При этом белки можно расположить любым желательным способом, например, внеклеточный домен В7 может находиться на N-конце и быть слит или связан своим С-концом со следующим белком или фрагментом, который, в свою очередь слит или связан своим С-концом с трансмембранным доменом, например, трансмембранным доменом из белка В7.

Как правило, если в слитом белке используют полноразмерный белок В7, то как белок В7, так и дополнительный белок будут осуществлять биологическую функцию.

Термин "слитый белок", используемый в данной заявке, относится к по меньшей мере двум белкам или фрагментам, или к комбинации по меньшей мере одного белка и по меньшей мере одного фрагмента, слитым напрямую или соединенным друг с другом, например, посредством линкера.

Термин "слитый", используемый в данной заявке, как правило относится к амидной связи между концом одного полипептида (или белка/фрагмента) и началом следующего полипептида (или белка/фрагмента).

Термин "связанный", если в контексте не указано иначе, относится к случаю, когда две структуры, такие как две полипептидные последовательности, соединены посредством линкера. Линкер представляет собой последовательность, которая в природе не присутствует в указанных полипептидах, или последовательность, которая не присутствует в данном конкретном положении обоих полипептидов.

В одном варианте реализации слитый белок включает белок В7 или его активный фрагмент. Слитые белки, содержащие белок В7 или его фрагменты и дополнительные белки, в данной заявке не называют химерными белками. Как правило, термин "слитый белок", используемый в данной заявке, относится к комбинации белка В7 или его фрагмента и другого не относящегося к В7 белка/фрагмента.

Только белки, содержащие фрагменты из различных белков В7, в данной заявке называют химерными, как описано выше.

В одном варианте реализации слитые белки согласно настоящему описанию не содержат белок В7 или его активный фрагмент и кодируются вирусом согласно настоящему описанию, дополнительно к

белку B7 или его фрагменту.

Таким образом, вирусы согласно настоящему описанию помимо белка B7 или его активного фрагмента могут кодировать дополнительные молекулы, такие молекулы включают дополнительные белки.

Семейство B7

В одном варианте реализации B7 независимо выбран из B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, B7-H7, активных фрагментов и комбинаций перечисленных белков. В одном варианте реализации белок B7 представляет собой B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) или активный фрагмент и комбинации любого из перечисленных белков, в частности, B7-1 или его активный фрагмент.

Белки B7 включают B7-1 (также известный как CD80, регистрационный номер в Uniprot P33681), B7-2 (также известный как CD86, регистрационный номер в Uniprot P42081). Данные белки связывают CD28 и CTLA-4.

В одном варианте реализации последовательность CD80 такая, как описано далее:

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEEL
AQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVV
LKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPSTISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGE
ELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFMTTNHSMCLIKYGHRLRVNQTFNWNTTKQEHF
PDNLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV SEQ ID NO: 11

Другие белки B7 включают B7-DC (также известный как PDCD1LG2 и PD-L2, регистрационный номер в Uniprot Q9BQ51), B7-H1 (также известный как PD-L1 и CD274, регистрационный номер в Uniprot Q9NZQ7). Оба данных белка связывают PD-1.

Лиганд программируемой гибели 1 (PD-L1) представляет собой трансмембранный белок 1 типа размером 40 кДа, который, как полагают, играет главную роль в подавлении иммунной системы. Похоже, что повышенная экспрессия PD-L1 может позволить раку обойти иммунную систему хозяина. В результате анализа 196 образцов опухоли от пациентов с почечноклеточной карциномой обнаружили, что высокая экспрессия PD-L1 в опухоли была связана с повышенной агрессивностью опухоли и в 4,5 раза большим риском смерти. У пациентов с раком яичников с повышенной экспрессией PD-L1 был значительно более неблагоприятный прогноз, чем у пациентов с более низкой его экспрессией. Экспрессия PD-L1 обратно пропорционально коррелировала с количеством внутриэпителиальных CD8+ Т-лимфоцитов, позволяя предположить, что PD-L1 на опухолевых клетках может подавлять противоопухолевые CD8+ Т-клетки. Данный эффект может зависеть от типа опухоли; исследование пациентов с немелкоклеточным раком легких показало, что больший уровень экспрессии белка и мРНК PD-L1 был связан с повышенной локальной инфильтрацией лимфоцитами и более длительной выживаемостью. Было показано, что множество антител к PDL1 представляет интерес для лечения некоторых раковых заболеваний в клинических испытаниях.

В одном варианте реализации белок B7-DC и/или B7-H1 или его фрагмент, используемый в вирусе согласно настоящему описанию, не стимулирует подавление иммунного ответа, например, был мутирован, чтобы удалить функцию подавления иммунного ответа.

В качестве альтернативы, вирус, кодирующий внеклеточный домен B7-H1 в немутированном виде, можно применять для лечения подходящих видов рака, в которых повышенная экспрессия PD-L1 связана с хорошим/улучшенным прогнозом, таких как рак легких.

В одном варианте реализации по меньшей мере цитоплазматический (внутриклеточный) домен B7-DC и/или B7-H1 удален или нефункционален. Без привязки к какой-либо конкретной теории есть основания полагать, что удаление внутриклеточного домена снижает устойчивость раковых клеток к лизису. Blood, 1 апреля 2008 г.; 111(7)3635-3643.

В одном варианте реализации используют только фрагмент трансмембранного домена B7-DC и/или B7-H1. В одном варианте реализации следующие белки не предусмотрены в виде полноразмерных белков B7-DC и B7-H1 с соответствующей биологической активностью.

Другие белки B7 включают B7-H2 (также известный как ICOSLG, B7RP1, CD275, регистрационный номер в Uniprot 075144), который связывает ICOS, B7-H3 (также известный как CD276, регистрационный номер в Uniprot Q5ZPR3), B7-H4 (также известный как VTCN1, регистрационный номер в Uniprot Q727D3), B7-H5 (также известный как VISTA, рецептор тромбоцитов Gi24, SISP1), B7-H6 (также известный как NCR3LG1, NR3L1), который связывает NKp30, B7-H7 (также известный как HHLA2), который связывает CD28H.

В одном варианте реализации указанный фрагмент содержит только трансмембранный домен любого из белков B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6 и B7-H7.

Отдельные белки включают одиночные белки, то есть белки или их активные фрагменты, которые не являются частью слитого белка (включая химерные белки), а также слитые белки. В одном варианте реализации отдельные белки представляют собой одиночные белки (включая их активные фрагменты).

В одном варианте реализации цитоплазматический домен белка B7 присутствует. В одном варианте реализации указанный цитоплазматический домен отсутствует. Отсутствие цитоплазматического домена

может снизить или прекратить внутриклеточную передачу сигналов в раковой клетке, что соответствует одному или более вариантам реализации, представленным ниже.

"Трансмембранные домены"

В одном варианте реализации трансмембранный домен, отличный от полученного из белка B7, используют для экспрессии белка (включая слитый белок), кодируемого вирусом согласно настоящему описанию, на поверхности инфицированной раковой клетки, например, указанный трансмембранный домен можно использовать, чтобы презентировать активный фрагмент белка B7 или другого интересующего белка на поверхности инфицированной раковой клетки. В качестве альтернативы, его можно использовать для презентации слитого белка, например, содержащего белок B7 или его активный фрагмент, на указанной поверхности. В одном варианте реализации для экспрессии B7 и/или другого белка на поверхности раковой клетки используют трансмембранный домен из рецептора PDGF или его фрагмента.

В одном варианте реализации трансмембранная связывающая или якорная последовательность, используемая в настоящем описании, содержит трансмембранный (TM) домен PDGFR (например, ala513 - arg561), такой как AVGQDTQEVIVPHSLPDKVVISAILALVVLTIISLILIMLWQKPR (SEQ ID NO: 2).

В одном варианте реализации связывающая или якорная последовательность, используемая в настоящем описании, содержит метку, присоединенную, например, к рецептору PDGF или его фрагменту, такому как TM домен PDGFR, в частности SEQ ID NO: 2.

Подходящие метки включают гистидиновые метки, метки Flag, метку с-тус и тому подобные метки. В частности, связывающая последовательность или якорь может включать метку с-тус, например, с последовательностью SEQ ID NO: 106 EQKLISEEDL, за которой следует TM домен PDGFR (например, ala513 - arg561), как показано в последовательности SEQ ID NO: 2

AVGQDTQEVIVPHSLPDKVVISAILALVVLTIISLILIMLWQKPR.

В одном варианте реализации метка с-тус содержит спейсер или аминокислоты спейсера на 3'-и/или 5'-конце, например, gsEQKLISEEDLn (SEQ ID NO: 107 в которой строчные буквы представляют собой аминокислоты, которые добавлены к метке в качестве спейсеров).

В одном варианте реализации используемая связывающая или якорная последовательность представляет собой

gsEQKLISEEDLnAVGQDTQEVIVPHSLPDKVVISAILALVVLTIISLILIMLWQKPR (SEQ ID NO: 108), где строчные буквы представляют собой аминокислотные спейсеры).

Как правило, белок/полипептид, к которому присоединена связывающая последовательность или якорь, не содержит стоп-кодон.

Экзогенный белок или белки, кодируемые вирусом согласно настоящему описанию, как правило будут содержать лидерную последовательность (также называемую сигнальным пептидом). Лидерная последовательность, например, представляет собой последовательность длиной приблизительно от 5 до 30 аминокислот, расположенную на N-конце указанного белка или полипептида.

В одном варианте реализации лидерная последовательность для экспрессии белка на поверхности раковой клетки принадлежит человеку, например, Hu VHSS.

В одном варианте реализации структура кассеты ORF описана далее:

LS-POLY-TAG-TM_D, где

LS представляет собой лидерную последовательность, например, лидерную последовательность человека; POLY представляет собой полинуклеотид, кодирующий интересующий полипептид или белки, в частности, описанные в данной заявке;

TAG представляет собой метку, например, описанную в данной заявке, такую как с-тус, в частности, SEQ ID NO: 100 или 106;

TMD представляет собой TM домен, например, TM домен PDGFR, например, SEQ ID NO: 2.

Если полипептид представляет собой scFv, то ORF может быть такой, как описано далее:

LS-VAR₁-LINK-VAR₂-TAG-TM_D, где

LS представляет собой лидерную последовательность, например, лидерную последовательность человека; VAR₁ представляет собой полинуклеотид, кодирующий варибельную область, такую как область VH; LINK представляет собой линкер, например, описанный в данной заявке, такой как линкер на основе единиц G₄S, в частности, с последовательностью SEQ ID NO: 104 GGGGSGGGGSGGGGS;

VAR₂ представляет собой полинуклеотид, кодирующий варибельную область, такую как область VL; TAG представляет собой метку, например, метку, описанную в данной заявке, такую как с-тус, в частности, с последовательностью SEQ ID NO: 100 или 106;

TMD представляет собой TM домен, например, TM домен PDGFR, например, с последовательностью SEQ ID NO: 2.

В объем настоящего описания также входят варианты реализации, в частности, конкретно описанные в данной заявке, которые содержат метку на N- или C-концах полипептидных цепей таким образом, что она располагается внутри или с наружной стороны мембраны. Таким образом, C-концевая метка, расположенная внутри мембраны, является предпочтительной, так как она, вероятно, не будет препятствовать связыванию или функционированию полипептида.

При этом экспрессия метки на N-конце экспрессируемого на поверхности белка может в некоторых случаях являться подходящей, так как может облегчать выделение, идентификацию и очистку клеток, экспрессирующих данный белок.

В одном варианте реализации комбинацию трансмембранного домена и последовательности сигнала секреции используют для экспрессии белка, кодируемого вирусом (например, описанным в данной заявке), на поверхности инфицированной раковой клетки. Авторы настоящего изобретения показали, что кодируемые белки экспрессируются только на клетках, которые позволяют инфицирование онколитическим вирусом, т.е. на раковых клетках.

В одном варианте реализации фрагмент, используемый для экспрессии белка на поверхности инфицированной раковой клетки (такой как трансмембранный фрагмент), выбран из приблизительно от 20 до 25 гидрофобных аминокислот, которые образуют трансмембранную альфа-спираль, например, из белков, включающих рецептор PDGF, рецептор инсулиноподобного фактора роста, рецептор IL-6, CD28, гликофорин, рецептор липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), белок гемагглютинин (ГА) вируса гриппа, рецептор инсулина, рецептор асиалогликопротеинов, рецептор трансферрина.

В одном варианте реализации фрагмент, используемый для экспрессии белка на поверхности инфицированной раковой клетки (такой как трансмембранный фрагмент), выбран из группы, включающей последовательности ТМ доменов (минимальные участки), представленные в SEQ ID NO: 91, 92, 93, 94 или 95:

| SEQ ID NO: | Название | Последовательность |
|------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 91 | Рецептор A PDGFR | AVLVLLVIVISLVLVVIV |
| 92 | Рецептор B PDGFR | VVISAILALVLTISIILII |
| 93 | Инсулиноподобный фактор роста 1 | IIIGPPLIFVFLFSVIGSIYFL |
| 94 | IL-6-R | SSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAVL |
| 95 | CD28 | FWVLLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV |

В одном варианте реализации используемый трансмембранный домен получен из сопряженного с G-белком рецептора или антигена S из вируса гепатита В.

В одном варианте реализации слитый белок, содержащий полноразмерный внеклеточный домен белка или фрагмента B7, а также трансмембранный домен, полученный из белка, отличного от B7, устроен таким образом, что белок B7 расположен на конце слитого белка дистально от поверхности раковой клетки, то есть, с наружной стороны раковой клетки, обращенной во внеклеточное пространство.

Вирусы

Нахождение последовательности ДНК, кодирующей белок B7 или его активный фрагмент, под контролем эндогенного промотора также является преимуществом, так как белок экспрессируется в соответствии с жизненным циклом вируса в отличие от конститутивной экспрессии. В данном случае непрерывная экспрессия под контролем экзогенного промотора, например, сильного промотора, такого как промотор CMV, может привести к продукции белка B7 в большем количестве, чем необходимо для терапевтического действия, и может привести к побочным действиям.

Альтернативы трансмембранным доменам для экспрессии белков на поверхности инфицированной раковой клетки включают подходы с использованием гликофосфолипидного якоря (также называемого GPI-якорем), присоединенного к C-концевой аминокислоте внеклеточного белка или его фрагмента (Low и др. 1986, Cross 1987, Low и Saltiel 1988, Ferguson и William 1988). Подходящие гликофосфолипидные якоря для применения в настоящем изобретении включают якоря из Thy-1, N-CAM и DAF.

В одном варианте реализации онколитический вирус согласно настоящему описанию представляет собой аденовирус, например, аденовирус группы В. В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию представляет собой химерный вирус, например, EnAd. В одном варианте реализации указанный аденовирус является репликационно-компетентным.

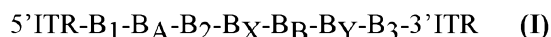
В одном варианте реализации вирус не способен реплицироваться и предусмотрен в качестве вирусного вектора.

В одном варианте реализации последовательность, кодирующая белок B7 или его активный фрагмент, расположена между стоп-кодоном и сайтом распознавания поли(А) аденовирусного гена L5 и стоп-кодоном и сайтом распознавания поли(А) гена E4.

В одном варианте реализации последовательность, кодирующая белок B7 или его активный фрагмент, расположена между положениями приблизительно 29356 п.о. и приблизительно 29357 п.о. в геноме EnAd, например, как показано в последовательности SEQ ID NO: 21, или в эквивалентном положении. Для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что абсолютное численное значение положения может изменяться в зависимости от того, как осуществляют нумерацию. Тем не менее, относительное положение встроенного гена остается одинаковым, вне зависимости от используемого абсолютного численного значения.

В одном варианте реализации онколитический аденовирус согласно настоящему описанию харак-

теризуется формулой (I)



где B_1 представляет собой связь или включает: E1A, E1B или E1A-E1B (в частности E1A, E1B или E1A-E1B);

B_A представляет собой E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или включает E3 или трансген, например, под контролем эндогенного или экзогенного промотора;

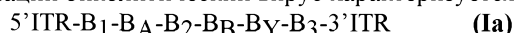
B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или и то, и другое;

B_B включает L5;

B_Y включает трансген, кодирующий белок B7 или его активный фрагмент; и

B_3 представляет собой связь или включает E4.

В одном варианте реализации онколитический вирус характеризуется формулой (Ia)



где B_1 представляет собой связь или включает E1A, E1B или E1A-E1B (в частности E1A, E1B или E1A-E1B);

B_A представляет собой E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или включает E3;

B_B включает L5;

B_Y включает трансген, кодирующий белок B7 или его активный фрагмент; и

B_3 представляет собой связь или включает E4.

В одном варианте реализации геном вируса в конструкциях формулы (I) и/или (Ia) получен из Ad11 или EnAd, в частности, из EnAd.

В одном варианте реализации трансген, кодирующий белок B7 или его активный фрагмент, находится под контролем эндогенного промотора, например, главного позднего промотора.

Регуляторные элементы

В одном варианте реализации B_Y включает кассету трансгенов, указанная кассета содержит трансген, кодирующий белок B7 или его фрагмент, и регуляторный элемент, такой как комбинация регуляторных элементов.

В одном варианте реализации регуляторный элемент представляет собой последовательность акцептора сплайсинга.

В одном варианте реализации регуляторный элемент представляет собой последовательность Козак.

В одном варианте реализации, например, если трансген кодирует полицистронную молекулу РНК, регуляторный элемент представляет собой последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES).

В одном варианте реализации регуляторная последовательность представляет собой последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида, такого как P2A, T2A, F2A, E2A.

В одном варианте реализации регуляторная последовательность представляет собой поли(A)-хвост.

В одном варианте реализации присутствуют по меньшей мере две регуляторные последовательности, например, акцептор сплайсинга и последовательность Козак или акцептор сплайсинга и поли(A)-хвост, или акцептор сплайсинга и последовательность IRES, или акцептор сплайсинга и последовательность P2A.

В одном варианте реализации присутствуют по меньшей мере три регуляторные последовательности, например, последовательность акцептора сплайсинга, последовательность Козак и поли(A)-хвост, или последовательность акцептора сплайсинга, последовательность IRES или 2A и поли(A)-хвост; или последовательность акцептора сплайсинга, последовательность Козак и последовательность IRES или 2A.

В одном варианте реализации присутствуют по меньшей мере четыре регуляторные последовательности, например, последовательность акцептора сплайсинга, последовательность Козак, последовательность IRES или 2A и поли(A)-хвост, в частности, расположенные между L5 и E4 в следующем порядке: последовательность акцептора сплайсинга, последовательность Козак, последовательность IRES или 2A и поли(A)-хвост.

В одном варианте реализации трансген кодирует полицистронную молекулу РНК, содержащую обе регуляторные последовательности IRES и 2A.

Белки, кодируемые указанным вирусом

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию кодирует множество белков для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки, при этом по меньшей мере один белок представляет собой белок B7 или его активный фрагмент, например, кодируется два, три, четыре или более различных белков, в частности, вирусом кодируется два или три белка для экспрессии на поверхности раковой клетки или секреции во внеклеточное пространство. Белок в данном контексте включает

слитый белок. В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию кодирует два различных белка В7, их активных фрагмента или их комбинации, например, оба для экспрессии на поверхности раковой клетки.

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию кодирует один или два белка для экспрессии на поверхности клетки и один или два белка, которые не могут быть заякорены на поверхности клетки, например, предназначены для действия внутри раковой клетки или для секреции/высвобождения из клеток.

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию кодирует белок В7 или его активный фрагмент для экспрессии на поверхности раковой клетки, и указанный вирус также кодирует растворимую форму, которая высвобождается или секретируется из клетки, того же белка В7 или другого белка В7 (включая активные фрагменты).

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию кодирует по меньшей мере два различных белка В7 или их активных фрагмента.

В одном варианте реализации по меньшей мере один белок, который экспрессируется на поверхности клетки, представляет собой белок В7, и по меньшей мере один не заякоренный в мембрану клетки (т.е., секретируемый) белок представляет собой не относящийся к В7 белок.

В одном варианте реализации указанные несколько белков могут кодироваться для экспрессии в виде отдельных белков, которые независимо процессируются и экспрессируются в мембране раковой клетки. Независимое расположение белков на поверхности раковой клетки может внести положительный вклад в активацию иммунной системы. Без привязки к какой-либо конкретной теории, укладка липидов может влиять на текучесть (т.е., вязкость) липидного бислоя в мембране раковой клетки. Вязкость мембраны может влиять на вращение и ориентацию белков и других биомолекул внутри мембраны, тем самым влияя на функции данных молекул. Таким образом, когда белки, кодируемые вирусом, расположены в виде одиночных и отдельных белков внутри мембраны инфицированной раковой клетки, текучесть липидного бислоя позволяет независимое перемещение молекул, что может быть особенно подходящим форматом, например, аналогичным природному формату, который благоприятен для осуществления биологической функции.

В одном варианте реализации независимо процессированные и экспрессированные белки расположены (заякорены) в различных положениях, таких как физически отдельные положения, в мембране раковой клетки.

В одном варианте реализации один или более белков (например, все белки), кодируемых вирусом и экспрессированных на поверхности инфицированной раковой клетки, не являются слитыми белками.

Выше описано, что в определенном варианте реализации белки экспрессируются в виде слитого белка.

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию позволяет получить один или более отдельных независимых белков для экспрессии на поверхности клетки и один или более слитых белков для экспрессии на поверхности клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию содержит последовательности ДНК, кодирующие указанное множество белков для экспрессии, например, на поверхности инфицированной раковой клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию содержит два или более трансонов в одном и том же или в различных положениях в геноме вируса. При нахождении в одном и том же положении в геноме вируса указанное множество белков все же будет экспрессироваться независимо на поверхности раковой клетки.

В одном варианте реализации указанное множество белков (включая слитые белки) кодируется в различных положениях в геноме вируса, например, в положениях Е3, В_х и/или В_у, и экспрессируется отдельно на поверхности инфицированной раковой клетки.

В одном варианте реализации указанное множество белков (включая слитые белки) кодируется в одном и том же положении в геноме вируса и экспрессируется вместе на поверхности инфицированной раковой клетки, например, когда кодируемые белки предусмотрены в виде слитого белка, в частности, когда слитый белок содержит белок В7 или его активный фрагмент.

В одном варианте реализации белок В7 в слитом белке представляет собой полноразмерный белок, в частности, белок, описанный в данной заявке, такой как В7-1 и/или В7-2, слитый или связанный с другим интересующим белком или его активным фрагментом. В одном варианте реализации слитый белок содержит трансмембранный домен из белка В7. В одном варианте реализации В7 представляет собой активный фрагмент, за исключением трансмембранного домена. В последнем из упомянутых вариантов реализации можно использовать трансмембранный домен, отличный от такового, полученного из белка В7, чтобы убедиться, что слитый белок представлен на поверхности инфицированной раковой клетки.

В одном варианте реализации указанное множество белков кодируется в одном и том же положении в вирусе и экспрессируется вместе в виде одного или более слитых белков на поверхности инфицированной раковой клетки.

Если положение гена(-ов), кодирующего(-их) интересующий белок или белки, в вирусе одинаково,

то указанные гены, например, могут быть связаны последовательностью IRES или пептидом 2A.

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию содержит "второй" трансген и возможно третий трансген (т.е. один или более из указанных нескольких белков, например, кодирующих полипептид, выбранный из группы, включающей цитокин, хемокин, лиганд и молекулу антитела, такую как молекула антагонистического антитела и молекула агонистического антитела).

В одном варианте реализации указанный дополнительный белок или белки независимо выбран(ы) из группы, включающей антитело, фрагмент антитела или белковый лиганд, который связывает CD3, CD28, CD80, CD86, 4-1BB, GITR, OX40, CD27, CD40 и их комбинации, например, в формах, подходящих для экспрессии на поверхности раковой клетки.

В одном варианте реализации указанный дополнительный белок представляет собой антитело к CD3, например, независимо выбран из муромонаба-CD3 (также известного как OKT3), отеликсизумаба (также известного как TRX4), теплизумаба (также известного как hOKT3γ1(Ala-Ala)) или визилизумаба.

В одном варианте реализации антитело к CD3 находится в форме фрагмента антитела, например, scFv, который является частью слитого белка вместе с трансмембранным участком другого белка, например, трансмембранным доменом из рецептора PDGF или из формы IgG, представленной на поверхности клетки.

В одном варианте реализации молекула антитела представляет собой ингибитор (антагонистическое антитело) и независимо выбрана из группы, включающей ингибитор фактора ангиогенеза, такой как молекула антитела к VEGF, и ингибитор факторов инактивирования Т-клеток, такой как молекула антитела к CTLA-4, к PD1 или к PDL1. В одном варианте реализации молекула антитела представляет собой агонист, независимо выбранный из группы, включающей антитела к CD40, GITR, OX40, CD27 и 4-1BB.

В одном варианте реализации дополнительный трансген кодирует цитокин, или его растворимый вариант, выбранный из группы, включающей IL-2, IFNα, IFNβ, IFNγ, GM-CSF, IL-15, IL-12 и лиганд FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3L). Предпочтительно, один или более из данной группы белков, экспрессируемых вирусом, в частности, в виде свободного белка, секретируемого из раковой клетки, может быть особенно подходящим для стимуляции иммунного ответа *in vivo* на раковую клетку.

В одном варианте реализации дополнительный трансген кодирует хемокин, выбранный из группы, включающей MIP1-альфа, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19 и CCL21. Предпочтительно, один или более из данной группы белков экспрессируется вирусом в виде свободного белка, который может секретироваться из раковой клетки и может быть особенно подходящим для привлечения иммунных клеток и стимуляции иммунного ответа на раковую клетку *in vivo*.

В одном варианте реализации дополнительно к по меньшей мере белку B7 или его активному фрагменту, экспрессированному на поверхности инфицированной раковой клетки, одна или более дополнительных молекул также экспрессируются на поверхности и/или секретируются.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки и антитело к CD3 (агонистическое) или связывающий фрагмент антитела (такой как scFv) также для экспрессии на поверхности раковой клетки, в частности, когда указанные белки экспрессируются в виде отдельных белков на поверхности клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки и антитело к VEGF (антагонистическое) или его связывающий фрагмент также для экспрессии на поверхности раковой клетки или для высвобождения из раковой клетки, например, путем секреции или после лизиса/гибели инфицированной раковой клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки и антитело, фрагмент антитела или белковый лиганд, который связывает CD3, CD28, CD80, CD86, 4-1BB, GITR, OX40, CD27, CD40, также для экспрессии на поверхности раковой клетки или для высвобождения из раковой клетки, например, путем секреции или высвобождения после лизиса/гибели инфицированной раковой клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки и цитокин, выбранный из IL-2, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, GM-CSF, IL-15, IL-12 и FLT3L, например, для высвобождения из раковой клетки, в частности, путем секреции или высвобождения после лизиса/гибели инфицированной раковой клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки и хемокин, выбранный из MIP1-альфа, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9,

CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, например, для высвобождения из раковой клетки, в частности, путем секреции или высвобождения после лизиса/гибели инфицированной раковой клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки и антитело к CD3 (агонистическое) или связывающий фрагмент антитела (такой как scFv) также для экспрессии на поверхности раковой клетки (в частности, когда указанные белки экспрессируются в виде отдельных белков на поверхности клетки), и дополнительно кодирует цитокин или хемокин, выбранный из IL-2, IFN-альфа, IFN-гамма, GM-CSF, IL-15, IL-12, FLT3L, MIP1-альфа, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, например, для высвобождения из раковой клетки, в частности, путем секреции или после лизиса/гибели инфицированной раковой клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки и антитело к CD3 (агонистическое) или фрагмент антитела (такой как scFv) также для экспрессии на поверхности раковой клетки (в частности, когда указанные белки экспрессируются в виде отдельных белков на поверхности клетки), и дополнительно кодирует антитело, фрагмент антитела или белковый лиганд, который связывает CD28, CD80, CD86, 4-1BB, GITR, OX40, CD27, CD40, или антитело к VEGF (антагонистическое) также для экспрессии на поверхности раковой клетки или для высвобождения из раковой клетки, например, путем секреции или высвобождения после лизиса/гибели инфицированной раковой клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки и два различных цитокина или хемокина, выбранных из IL-2, IFN α , IFN β , IFN γ , GM-CSF, IL-15 и IL-12, FLT3L, MIP1 α , IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, например, для высвобождения из раковой клетки, в частности, путем секреции после лизиса/гибели инфицированной раковой клетки.

Таким образом, в одном варианте реализации вирус кодирует B7-1, B7-2 или активный фрагмент любого из перечисленных белков или их комбинацию для экспрессии на поверхности инфицированной раковой клетки и антитело к CD3 (агонистическое) или связывающий фрагмент антитела (такой как scFv) также для экспрессии на поверхности раковой клетки (в частности, когда указанные белки экспрессируются в виде отдельных белков на поверхности клетки) и дополнительно кодирует цитокин, независимо выбранный из IL-2, IFN α , IFN γ , GM-CSF, IL-15 и IL-12, и/или хемокин, выбранный из RANTES (CCL5), MIP1 α (изоформы LD78 α (CCL3) или LD78 β (CCL3L1)), MIP1 β , которые могут высвободиться из раковой клетки, в частности, путем секреции до и высвобождения после лизиса/гибели инфицированной раковой клетки.

В одном варианте реализации, который, в частности, можно комбинировать с любым из вариантов реализации, описанных выше, указанный вирус дополнительно кодирует антитело к PD-1 (антагонист).

В одном варианте реализации белок или белки, кодируемые в указанной кассете трансгенов для экспрессии на мембране клетки, также могут содержать пептидный линкер или спейсер между трансмембранным доменом и внеклеточным связывающим лиганд доменом. Такие линкеры или спейсеры могут придавать гибкость белку, экспрессируемому на поверхности клетки, что повышает способность указанного белка взаимодействовать с целевой молекулой, например, на соседней клетке. Такие линкеры или спейсеры также можно разработать или выбрать таким образом, чтобы вызвать димеризацию или тримеризацию белков на поверхности клетки путем образования дисульфидной связи или посредством белок-белковых взаимодействий. Например, можно использовать шарнирные области молекул иммуноглобулина или CD8, чтобы повысить как гибкость, так и димеризацию.

В одном варианте реализации белок или белки, кодируемые в указанной кассете трансгенов, также могут содержать пептидную метку. Пептидная метка может включать метки с-пус, полигистидин, V5 или FLAG и может располагаться на N-конце или C-конце полипептида, либо внутри клетки, либо вне клетки, или может кодироваться внутри последовательности белка, например, во внеклеточной петле или между трансмембранным доменом и внеклеточным доменом. Пептидные метки можно применять в качестве спейсеров или линкеров между различными доменами белка, например, трансмембранным и внеклеточным доменами, и можно применять для обнаружения или очистки белка или клетки, экспрессирующей указанный белок.

В одном варианте реализации один или более дополнительных трансгенов (отличных от гена, кодирующего белок B7 или его фрагмент) находятся под контролем экзогенного или эндогенного промотора, например, эндогенного промотора. В одном варианте реализации трансген в области E3 (B₂) находится под контролем экзогенного промотора.

В одном варианте реализации один или более дополнительных трансгенных генов расположены между областью E3 и L5 волоконного белка в геноме аденовируса, например, в положении B_x в конст-

рукции формулы (I), в частности, под контролем экзогенного промотора. Таким образом, в одном варианте реализации трансген в В_х находится под контролем экзогенного промотора.

В одном варианте реализации один или более дополнительных трансгенных генов расположены между областью E4 и L5 волоконного белка в геноме аденовируса, например, в положении В_γ в конструкции формулы (I) или (Ia), в частности, под контролем эндогенного промотора, такого как главный поздний промотор. Это может быть дополнением к белку В7 или его активному фрагменту, который кодируется в области В_γ.

В одном варианте реализации предложена композиция, содержащая онколитический аденовирус согласно настоящему описанию, например, фармацевтическая композиция, в частности, содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, такое как разбавитель или носитель.

В одном варианте реализации предложен онколитический аденовирус согласно настоящему описанию или композиция, содержащая указанный аденовирус, для применения в лечении, в частности, для применения в лечении рака.

В одном варианте реализации предложен способ лечения нуждающегося в этом пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества онколитического вируса согласно настоящему описанию или композиции, такой как фармацевтическая композиция, содержащей указанный онколитический вирус.

В одном варианте реализации предложено применение онколитического аденовируса согласно настоящему описанию или композиции, содержащей указанный аденовирус, для производства лекарственного средства для лечения рака, в частности, карцином, например, колоректального рака, рака легкого, мочевого пузыря, почки, поджелудочной железы, печени, головы и шеи, груди или яичников.

В одном варианте реализации предложен полинуклеотид, содержащий по меньшей мере 50% геномной последовательности вируса согласно настоящему описанию (например, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) и содержащий последовательность, кодирующую белок В7 или его активный фрагмент, например, белок В7, описанный в данной заявке, такой как В7-1 или его активный фрагмент. В одном варианте реализации полинуклеотидная последовательность находится в форме плазмиды.

В одном варианте реализации предложена клетка-хозяин, например, клетка млекопитающего, такая как клетка HEK293 или ее вариант, содержащая онколитический вирус согласно настоящему описанию или полинуклеотидную последовательность согласно настоящему описанию.

В одном варианте реализации предложен процесс получения онколитического аденовируса согласно настоящему описанию, включающий этап внедрения полинуклеотида, кодирующего белок В7 или его активный фрагмент, в онколитический аденовирус.

В одном варианте реализации предложен процесс реплицирования вируса согласно настоящему описанию, включающий этап культивирования клеток-хозяев в присутствии вируса при условиях, подходящих для репликации. Как правило, указанный способ будет включать дополнительный этап сбора вируса, например, из супернатанта или после лизиса клеток-хозяев. Определения Термин "онколитический вирус с селективностью к раковым клеткам", используемый в данной заявке, относится к вирусу, который предпочтительно уничтожает раковые клетки, например, так как он предпочтительно инфицирует раковые клетки и/или так как жизненный цикл вируса зависит от гена, такого как p53, регуляция экспрессии которого нарушена, например, он экспрессируется на повышенном уровне в раковых клетках. В одном варианте реализации онколитический вирус преимущественно инфицирует раковые клетки и продолжает реплицировать свой геном и продуцировать капсидные белки с образованием новых вирусных частиц, например, как в случае EnAd.

Селективность к раковым клеткам (терапевтический индекс) можно исследовать, как описано в WO2005/118825, который включен в данную заявку посредством ссылки.

Термин "трансген", используемый в данной заявке, относится к гену, который встроили в последовательность генома аденовируса, при этом указанный ген в природе не присутствует в вирусе (экзогенный) или обычно не присутствует в данном конкретном положении в указанном вирусе. Примеры трансгенов приведены в данной заявке. Термин "трансген", используемый в данной заявке, также включает функциональный фрагмент гена, который представляет собой часть гена, которая после встраивания способна осуществлять функцию или большую часть функции полноразмерного гена, например, 50% функции или более.

Термины "трансген" и "кодирующая последовательность" используют взаимозаменяемо в данной заявке в контексте вставок в вирусный геном, если в контексте не указано иначе. Термин "кодирующая последовательность", используемый в данной заявке, означает, например, последовательность ДНК, кодирующую функциональные РНК, пептид, полипептид или белок. Как правило, кодирующая последовательность представляет собой кДНК трансгена, которая кодирует функциональные представляющие интерес РНК, пептид, полипептид или белок. Функциональные представляющие интерес РНК, пептиды, полипептид и белки описаны ниже.

В одном варианте реализации термин "трансген", используемый в данной заявке, относится к фрагменту ДНК, содержащему ген или последовательность кДНК, которая была выделена из одного орга-

низма и встроена в отличный организм, т.е., вирус согласно настоящему описанию. В одном варианте реализации данный ненативный фрагмент ДНК, как правило, будет сохранять способность продуцировать функциональные РНК, пептид, полипептид или белок. Используемые трансгены, например, могут кодировать отдельные белки, или их активные фрагменты, химерный белок или слитый белок.

Очевидно, что геном вируса содержит кодирующие последовательности ДНК. Эндогенные (встречающиеся в природе) гены в геномной последовательности вируса не считают трансгенными в контексте настоящего описания, если только они не были модифицированы с помощью рекомбинантных методик, например, таким образом, что они находятся в неприродном положении или в неприродном окружении.

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

В одном варианте реализации трансген включает последовательность ДНК, кодирующую белок B7 или его активный фрагмент. В настоящем описании предусмотрено, что белок B7 или его активный фрагмент может быть представлен в одном или более форматах, независимо выбранных из слитого белка, просто белка B7 или его активного фрагмента.

Термин "просто белок B7" или его активный фрагмент, используемый в данной заявке, относится к белкам, которые представляют собой по существу белки дикого типа, например, которые не являются частью слитого белка и последовательность которых идентична или сходна с последовательностью соответствующего известного белка, в частности, известного белка человека. Просто ген также включает случаи, когда 10% аминокислот заменены или удалены из соответствующего полноразмерного белка.

Термин "GPI-якорь", используемый в данной заявке, относится к гликолипиду, который может быть присоединен к С-концу белка в процессе посттрансляционной модификации. Он состоит из фосфатидилинозитольной группы, присоединенной через содержащий углевод линкер (глюкозамин и манноза, связанные гликозидной связью с остатком инозита) и через этаноламинфосфатный (EtNP) мостик к С-концевой аминокислоте зрелого белка. Две указанные жирные кислоты внутри гидрофобной фосфатидилинозитной группы заякоревывают указанный белок в мембрану клетки.

Глипирированные (glypiated) (связанные с GPI) белки, как правило, содержат сигнальный пептид, который направляет их в эндоплазматический ретикулум (ER). С-конец состоит из гидрофобных аминокислот, которые остаются встроенными в мембрану ER. Гидрофобный конец затем отщепляется и замещается на GPI-якорь. По мере прохождения белка по секреторному пути, везикулы переносят его в аппарат Гольджи и, наконец, во внеклеточное пространство, где он остается присоединенным к внешней стороне мембраны клетки. Поскольку глипирование представляет собой единственный способ присоединения таких белков к мембране, то расщепление указанной группы фосфолипазами приведет к контролируемому высвобождению белка из мембраны. Последний упомянутый механизм используют *in vitro*; т.е., мембранные белки, высвобожденные из мембран в ферментативном анализе, представляют собой глипированные белки.

Фосфолипаза С (PLC) представляет собой фермент, который, как известно, расщепляет фосфоглицериновую связь, обнаруживаемую в GPI-заякоренных белках. Обработка PLC вызывает высвобождение связанных с GPI белков из наружной мембраны клетки. Известно, что маркер Т-клеток Thy-1 и ацетилхолинэстераза, а также щелочные фосфатазы кишечника и плаценты связаны с GPI и высвобождаются при обработке PLC. Считают, что связанные с GPI белки преимущественно расположены в липидных рафтах, что позволяет предложить высокий уровень организации внутри микродоменов плазматической мембраны.

Обзор GPI-якорей, написанный Ferguson, Kinoshita и Hart, доступен в Главе 11 в *Essentials of Glycobiology* 2^{ое} издание.

Вirusы

Термин "репликационно-компетентный" в контексте настоящего описания относится к вирусу, который обладает всем необходимым аппаратом для репликации в клетках *in vitro* и *in vivo*, т.е. без помощи пакующей линии клеток. Вирусный вектор, например, у которого удалена по меньшей мере область E1A, способный реплицироваться в комплементарной пакующей линии клеток, в настоящем контексте не является репликационно-компетентным вирусом.

Вирусный вектор представляет собой неспособный реплицироваться вирус, для репликации которого требуется пакующая линия клеток (содержащая трансген).

Термин "способный реплицироваться вирус", используемый в данной заявке, относится к репликационно-компетентному вирусу или вирусу, репликация которого зависит от фактора в раковых клетках, например, фактора с повышенной экспрессией, такого как p53 или аналогичный фактор.

В одном варианте реализации аденовирус представляет собой аденовирус человека. Термины "аденовирус", "серотип" или аденовирусный серотип, используемые в данной заявке, относятся к любому аденовирусу, который можно причислить к любому из более 50 известных на сегодняшний день серотипов аденовируса, которые классифицируют на подгруппы А - F, и также относятся к любому на данный момент не обнаруженному или неклассифицированному серотипу аденовируса. См., например, Strauss, "Adenovirus infections in humans" в *The Adenoviruses*, Ginsberg, ed., Plenum Press, Нью-Йорк, Нью-Йорк, стр. 451-596 (1984) и Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication" в *Fields Virology*, том 2, чет-

вертое издание, Knipe, 35ea., Lippincott Williams & Wilkins, стр. 2265-2267 (2001), как показано в табл. 1.

Таблица 1

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

Аденовирусы сгруппированы на основании их капсида.

В одном варианте реализации аденовирус принадлежит к подгруппе B, например, независимо выбран из группы, включающей или состоящей из: Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34 и Ad51, такого как Ad11, в частности, Ad11p (штамм Slobitski). В одном варианте реализации у аденовируса согласно настоящему изобретению есть капсид, такой как гексон и/или волоконный белок аденовируса подгруппы B, такой как Ad11, в частности, Ad11p. В одном варианте реализации аденовирус представляет собой Ad11 или содержит волоконный белок, и/или гексон, и/или пентон из Ad11, такого как Ad11p.

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию не является вирусом группы A.

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию не содержит белок гибели аденовируса (ADP).

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию не является вирусом группы C.

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию не содержит фрагмент части вируса Ad5.

Энаденотуцирев (EnAd) представляет собой химерный онколитический аденовирус, который ранее был известен как ColoAd1 (WO2005/118825), с волоконным белком, пентоном и гексоном из Ad11p, следовательно, он представляет собой вирус подгруппы B. Он содержит химерную область E2B, которая содержит ДНК из Ad11p и Ad3. В EnAd почти вся область E3 и часть области E4 удалены. Следовательно, в его геноме есть значительное пространство для размещения дополнительного генетического материала, при этом он остается жизнеспособным. Более того, так как EnAd представляет собой аденовирус подгруппы B, то предсуществующий иммунитет у людей встречается реже, чем, например, к Ad5. Другие примеры химерных онколитических вирусов с волоконным белком, пентоном и гексоном Ad11 включают OvAd1 и OvAd2 (см. WO2006/060314).

Похоже, что EnAd преимущественно инфицирует опухолевые клетки, быстро реплицируется в данных клетках и вызывает лизис клеток. Это, в свою очередь, может вызывать воспалительные иммунные ответы, тем самым стимулируя организм также бороться с раком. Предполагают, что отчасти эффективность EnAd связана с быстрой репликацией данного вируса *in vivo*.

Важно отметить, что клинически продемонстрировано, что EnAd можно вводить системно (например, путем внутривенной или интраперитонеальной инъекции или инфузии), после чего он избирательно инфицирует опухолевые клетки и экспрессирует в них свои белки. Такое свойство EnAd, которое могут разделять Ad11p и другие аденовирусы группы B, в частности, такие, которые экспрессируют капсидные белки из Ad11p (такие как описанные в данной заявке), позволяет экспрессировать белки на поверхности раковых клеток без необходимости непосредственного введения трансгенов в опухоль, что не осуществимо при многих раковых заболеваниях.

При том, что EnAd избирательно лизует опухолевые клетки, можно придать ему дополнительные полезные свойства, например, повысить терапевтическую активность вируса или уменьшить побочные эффекты вируса, снабдив его трансгенами, такими как трансген, который кодирует белок, передающий сигналы в клетку, или антитело, или трансген, который кодирует молекулу, которая стимулирует белок(-ки), передающий(-е) сигналы в клетку.

Успешное снабжение вируса ДНК, кодирующей некоторые белки, которые могут экспрессироваться внутри раковой клетки, может позволить использовать собственные защитные механизмы организма для более эффективной борьбы с опухолевыми клетками, например, делая клетки более заметными для иммунной системы или путем доставки терапевтического гена/белка преимущественно к целевым опухолевым клеткам.

В одном варианте реализации онколитический аденовирус согласно настоящему описанию стимулирует борьбу иммунной системы пациента с опухолью, например, путем уменьшения способности раковых заболеваний подавлять иммунные ответы.

В одном варианте реализации онколитический вирус содержит волоконный белок, гексон и пентон из того же серотипа, например, Ad11, в частности, Ad11p, например, находящиеся в положениях 30812-31789, 18254-21100 и 13682-15367 геномной последовательности последнего, при этом положения нуклеотидов соответствуют Genbank ID 217307399 (номер доступа: GC689208).

В одном варианте реализации аденовирус представляет собой энаденотуцирев (также известный как EnAd и ранее известный как ColoAd1). Термин "энаденотуцирев", используемый в данном тексте, относится к химерному аденовирусу с последовательностью SEQ ID NO: 21. Он представляет собой репликационно-компетентный онколитический химерный аденовирус, который обладает улучшенными терапевтическими свойствами по сравнению с аденовирусами дикого типа (см. WO2005/118825). EnAd содержит химерную область E2B, которая содержит ДНК из Ad11p и Ad3, и делеции в E3/E4. Структурные изменения в энаденотуциреве позволяют получить геном, который приблизительно на 3,5 т.п.н. меньше, чем у Ad11p, что дает дополнительное "пространство" для вставки трансгенов.

Термин "молекулы антител", используемый в данной заявке, может включать целую молекулу антитела, содержащую полноразмерную тяжелую и легкую цепи, биспецифический формат антитела, включающий полноразмерные антитела, или фрагмент любого из указанных, включая, но не ограничиваясь перечисленными: Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела (например, VH или VL или VHH), scFv, двух-, трех- или четырехвалентные антитела, биспецифические scFv, диатела, триатела, тетратела и связывающие эпитоп фрагменты любого из указанных выше антител (см., например, Holliger и Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136; Adair и Lawson, 2005, Drug Design Reviews - в сети Интернет 2(3), 209-217). Способы создания и производства данных фрагментов антител хорошо известны в данной области техники (см., например, Verma и др., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Другие фрагменты антител для применения в настоящем изобретении включают фрагменты Fab и Fab', описанные в международных заявках на патент WO2005/003169, WO2005/003170 и WO2005/003171. Мультивалентные антитела могут содержать несколько специфичностей, например, быть биспецифическими, или могут быть моноспецифическими (см., например, WO 92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 и WO2010/035012).

Антитело, используемое в данной заявке, если в контексте не указано иначе, относится к полноразмерному антителу.

Термин "связывающие фрагменты антител" относится к фрагменту, содержащему связывающие домены, такие как VH и/или VL, которые сохраняют специфичность к целевому антигену, с которым они связываются, и например, Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела (например, VH, или VL, или VHH), scFv, двух-, трех- или четырехвалентные антитела, биспецифические scFv, диатела, триатела, тетратела и связывающие эпитоп фрагменты любого из перечисленных антител.

Линкеры

Линкеры, подходящие для применения в слитых белках согласно настоящему описанию, включают:

Таблица 2. Шарнирные линкерные последовательности

| SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|------------|---------------------------------|
| 26 | DKTHTCAA |
| 27 | DKTHTCPPCPA |
| 28 | DKTHTCPPCPATCPPCPA |
| 29 | DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA |
| 30 | DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY |
| 31 | DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY |
| 32 | DKTHTCCVECPPPCPA |
| 33 | DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPA |
| 34 | DKTHTCPSCPA |

Таблица 3. Гибкие линкерные последовательности

| SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|------------|--------------------|
| 35 | SGGGGSE |
| 36 | DKHTS |
| 37 | (S)GGGGS |

| | |
|----|------------------------------------|
| 38 | (S)GGGSGGGGS |
| 39 | (S)GGGSGGGSGGGGS |
| 40 | (S)GGGSGGGSGGGSGGGGS |
| 41 | (S)GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS |
| 42 | AAAGSG-GASAS |
| 43 | AAAGSG-XGGGS-GASAS |
| 44 | AAAGSG-XGGGSXGGGS –GASAS |
| 45 | AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS –GASAS |
| 46 | AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS |
| 47 | AAAGSG-XS-GASAS |
| 48 | PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY |
| 49 | ATTTGSSPGPT |
| 50 | ATTTGS |
| - | GS |
| 51 | EPSGPISTINSPPSKESHKSP |
| 52 | GTVAAPSVFIFPPSD |
| 53 | GGGGIAPSMVGGGGS |
| 54 | GGGGKVEGAGGGGGS |
| 55 | GGGSMKSHDGGGGS |
| 56 | GGGGNLITIVGGGGS |
| 57 | GGGGVVPSLPGGGGS |
| 58 | GGEKSIPGGGGS |
| 59 | RPLSYRPPFPFGFPSVRP |
| 60 | YPRSIYIRRRHPSPSLTT |
| 61 | TPSHLSHILPSFGLPTFN |
| 62 | RPVSPFTFPRLSNSWLPA |
| 63 | SPA AHFPRSIPRPGPIRT |
| 64 | APGPSAPSHRSLPSRAFG |
| 65 | PRNSIHFLHPLLVA PLGA |
| 66 | MPSLSGVLQVRYLSPPDL |
| 67 | SPQYPSPLTLTLPPHPSL |
| 68 | NPSLNPPSYLHRAPSRIS |
| 69 | LPWRTSLLPSLPLRRRP |
| 70 | PPLFAKGPVGLLSRSFPP |
| 71 | VPPAPVVSLRSAHARPPY |
| 72 | LRPTPPRVRSYTCCPTP- |
| 73 | PNVAHVLP LLTVPWDNLR |
| 74 | CNPLLPLCARSPAVRTFP |

(S) необязателен в последовательностях с 37 по 41.

Примеры жестких линкеров включают пептидные последовательности GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO: 75), PPPP (SEQ ID NO: 76) и PPP. Другие линкеры показаны в табл. 4:

Таблица 4

| SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|------------|-----------------------|
| 77 | DLCLRDWGCLW |
| 78 | DICLPRWGCLW |
| 79 | MEDICLPRWGCLWGD |
| 80 | QRLMEDICLPRWGCLWEDDE |
| 81 | QGLIGDICLPRWGCLWGRSV |
| 82 | QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK |
| 83 | EDICLPRWGCLWEDD |
| 84 | RLMEDICLPRWGCLWEDD |
| 85 | MEDICLPRWGCLWEDD |
| 86 | MEDICLPRWGCLWED |
| 87 | RLMEDICLARWGCLWEDD |
| 88 | EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG |
| 89 | RAPESFVCYWETICFERSEQ |
| 90 | EMCYFPGICWM |

Определения, относящиеся к формуле (I) и (Ia)

Термин "связь" относится к ковалентной связи, соединяющей одну последовательность ДНК с другой последовательностью ДНК, например, соединяющей один участок генома вируса с другим. Таким образом, если переменная в формуле (I) и (Ia) в данном тексте представляет собой связь, то объект или элемент, представленный связью, отсутствует, т.е. удален.

Так как структура аденовирусов, как правило, сходна, то описанные ниже элементы обсуждаются с точки зрения структурных элементов и широко используемой номенклатуры, относящейся к ним, которые известны квалифицированному специалисту. Если в данной заявке упоминается элемент, то авторы ссылаются на последовательность

ДНК, кодирующую указанный элемент, или последовательность ДНК, кодирующую тот же структурный белок, что и указанный элемент в аденовирусе. Последнее уместно вследствие избыточности кода ДНК. Для оптимальных результатов возможно нужно будет учитывать предпочтительное использование вирусами определенных кодонов.

Любой структурный элемент из аденовируса, используемый в вирусах согласно настоящему описанию, может включать или состоять из природной последовательности, или его подобие с ней по всей длине последовательности может составлять по меньшей мере 95%, например, 96, 97, 98, 99 или 100%. Исходную последовательность можно модифицировать для удаления 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% генетического материала. Специалисту в данной области техники известно, что при внесении изменений рамки считывания вируса не должны быть нарушены таким образом, который нарушает экспрессию структурных белков.

В одном варианте реализации данный элемент представляет собой полноразмерную последовательность, т.е., полноразмерный ген. Термин "полноразмерный ген", используемый в данной заявке, относится по меньшей мере к полноразмерной кодирующей последовательности гена, но может включать любые ассоциированные с ней некодирующие области, особенно если они значимы для функционирования данного гена.

В одном варианте реализации данный элемент меньше, чем полноразмерный, и сохраняет такую же или соответствующую функцию, как и полноразмерная последовательность.

В одном варианте реализации для данного элемента, который не обязателен в конструкциях согласно настоящему описанию, последовательность ДНК может быть меньше полноразмерной и быть нефункциональной, например, область E3 может быть полностью или частично удалена. Тем не менее, может быть целесообразно удалить по существу всю область E3, так как это оптимизирует пространство, доступное для вставки трансгенов.

Указанные структурные гены, кодирующие структурные или функциональные белки аденовируса, как правило, связаны с некодирующими областями ДНК. Таким образом, существует некоторая гибкость в отношении места "разрезания" геномной последовательности интересующего структурного элемента (особенно его некодирующих областей) с целью вставки трансгена в вирусы согласно настоящему описанию. Таким образом, для целей настоящего описания элемент считают эталонным структурным элементом при условии, что он соответствует целевому назначению и не кодирует инородный материал.

Таким образом, при необходимости ген будет связан с подходящими некодирующими областями, например, которые обнаруживают в природной структуре данного вируса.

Таким образом, в одном варианте реализации вставку, такую как ДНК, кодирующая сайт рестрикции и/или трансген, встраивают в некодирующую область геномной ДНК вируса, такую как интрон или межгенная последовательность. При этом некоторые некодирующие области аденовируса также могут обладать функцией, например, в альтернативном сплайсинге, регуляции транскрипции или регуляции трансляции, и это возможно нужно будет учитывать.

Сайты, идентифицированные в данной заявке, которые ассоциированы с областью L5, подходят для размещения различных последовательностей ДНК, кодирующих сложные молекулы, такие как RNAi, цитокины, одноцепочечные или мультимерные белки, такие как антитела.

Термин "ген", используемый в данной заявке, относится к кодирующим и каким-либо некодирующим последовательностям, ассоциированным с ними, например, интронам и ассоциированным с ними экзонам. В одном варианте реализации ген включает или состоит только из необходимых структурных компонентов, например, из кодирующей области.

Ниже следует обсуждение, относящееся к конкретным структурным элементам аденовирусов.

Последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) свойственны всем известным аденовирусам (названы так благодаря их симметрии) и представляют собой точки начала репликации вирусной хромосомы. Другим свойством данных последовательностей является их способность образовывать шпильку.

Термин "5'-ITR", используемый в данной заявке, относится к части или к полноразмерному ITR на 5'-конце аденовируса, который сохраняет функцию ITR при встраивании в подходящее положение аденовируса. В одном варианте реализации 5'-ITR включает или состоит из последовательности приблизительно от 1 п.о. до 138 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21 или последовательности, на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной ей по всей длине, в частности, из последовательности, состоящей из приблизительно от 1 п.о. до 138 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21.

Термин "3'-ITR", используемый в данной заявке, относится к части или к полноразмерному ITR на 3'-конце аденовируса, который сохраняет функцию ITR при встраивании в подходящее положение аденовируса. В одном варианте реализации 3'-ITR включает или состоит из последовательности приблизительно от 32189 п.о. до 32326 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21 или последовательности, на 90, 95, 96, 97, 98 или 99%

идентичной ей по всей длине, в частности, из последовательности, состоящей из приблизительно от 32189 п.о. до 32326 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21.

Термин "B1", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, кодирующей: часть или всю область E1A из аденовируса, часть или всю область E1B аденовируса и независимо часть или всю область E1A и E1B аденовируса.

Если B1 представляет собой связь, то последовательности E1A и E1B будут отсутствовать в вирусе. В одном варианте реализации B1 представляет собой связь и, таким образом, вирус представляет собой вектор.

В одном варианте реализации B1 дополнительно содержит трансген. В данной области известно, что в области E1 можно разместить трансген, который может быть встроен в область E1 с ее нарушением (т.е. в "сердину" указанной последовательности), или часть или всю область E1 можно удалить, чтобы было больше места для размещения генетического материала.

Термин "E1A", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область E1A аденовируса. Последнюю в данной заявке называют полипептидом/белком E1A. Его можно мутировать таким образом, что белок, кодируемый геном E1A, будет содержать консервативные или неконсервативные замены аминокислот (например, 1, 2, 3, 4 или 5 замен, вставок и/или делеций аминокислот по всей длине), так что он будет обладать: такой же функцией, как и белок дикого типа (т.е. соответствующий немутированный белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; пониженной функцией, такой как отсутствие функции, по сравнению с белком дикого типа; или обладать новой функцией по сравнению с белком дикого типа или комбинацией перечисленных функций, при необходимости.

Термин "E1B", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область E1B аденовируса (т.е. полипептид или белок). Ее можно мутировать таким образом, что белок, кодируемый геном/областью E1B будет содержать консервативные или неконсервативные замены аминокислот (например, 1, 2, 3, 4 или 5 замен, вставок и/или делеций аминокислот по всей длине), так что он будет обладать: такой же функцией, как и белок дикого типа (т.е. соответствующий немутированный белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; пониженной функцией, такой как отсутствие функции, по сравнению с белком дикого типа; или обладать новой функцией по сравнению с белком дикого типа или комбинацией перечисленных функций, при необходимости.

Таким образом, область B1 может быть модифицирована или немодифицирована по сравнению с областью E1 дикого типа, такой как E1A и/или E1B дикого типа. Специалист в данной области техники сможет легко определить, присутствует ли E1A и/или E1B или (частично) удалена или мутирована.

Термин "дикого типа", используемый в данной заявке, относится к известному аденовирусу или последовательности из известного аденовируса. Известный аденовирус представляет собой аденовирус, который идентифицировали и назвали, независимо от того, доступна ли информация о последовательности.

В одном варианте реализации последовательность B1 представлена от 139 п.о. до 3932 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21.

Термин "B_A", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, кодирующей области E2B-L1-L2-L3-E2A-L4, включая какие-либо некодирующие последовательности, при необходимости (в частности, соответствующей природной последовательности из аденовируса). Как правило, данная последовательность не содержит трансген. В одном варианте реализации указанная последовательность по существу сходна или идентична непрерывной последовательности из известного аденовируса, например, серотипа, показанного в таблице 1, в частности, вируса группы В, например, Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 или их комбинации, например, Ad3, Ad11 или их комбинации. В одном варианте реализации термин "E2B-L1-L2-L3-E2A-L4" относится к совокупности данных элементов и других структурных элементов, ассоциированных с данной областью, например, B_A, как правило, будет содержать последовательность, кодирующую белок IV2a, например, как описано далее: IV2A IV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4.

В одном варианте реализации область E2B химерная. То есть, она содержит последовательности ДНК из двух или более различных серотипов аденовируса, например, из Ad3 и Ad11, такого как Ad11p. В одном варианте реализации последовательность области E2B находится от 5068 п.о. до 10355 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21, или представляет собой последовательность, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную ей по всей длине.

В одном варианте реализации E2B в компоненте B_A включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 22 (что соответствует SEQ ID NO: 3, описанной в WO2005/118825).

В одном варианте реализации последовательность B_A находится от 3933 п.о. до 27184 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21.

Термин "E3", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область E3 аденовируса (т.е. белок/полипептид), его можно мутировать таким образом, что белок, кодируемый геном E3, будет содержать консервативные или неконсервативные замены аминокислот (например, 1, 2, 3, 4 или 5 замен, вставок и/или делеций аминокислот по всей длине), так что он будет обладать такой же функцией, как и белок дикого типа (соответствующий немутированный белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; пониженной функцией, такой как отсутствие функции, по сравнению с белком дикого типа, или будет обладать новой функцией по сравнению с белком дикого типа или комбинацией перечисленных функций, при необходимости.

В одном варианте реализации область E3 принадлежит аденовирусу серотипа, приведенного в табл. 1, или комбинации серотипов, в частности, серотипа группы В, например, Ad3, Ad7, Ad11 (в частности, Ad11p), Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 или их комбинации, такой как Ad3, Ad11 (в частности, Ad11p) или их комбинация. В одном варианте реализации последовательность области E3 показана в SEQ ID NO: 23.

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

В одном варианте реализации B₂ представляет собой связь, при этом ДНК, кодирующая область E3, отсутствует.

В одном варианте реализации ДНК, кодирующая область E3, может быть замещена или прервана трансгеном. В данной заявке термин "область E3, замещенная трансгеном" включает случаи, когда часть или вся область E3 замещена трансгеном.

В одном варианте реализации область B₂ включает последовательность от 27185 п.о. до 28165 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 24.

В одном варианте реализации B₂ состоит из последовательности от 27185 п.о. до 28165 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 24.

Термин "B_x", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК вблизи 5'-конца гена L5 в ВВ. Термин "вблизи или рядом с 5'-концом гена L5", используемый в данной заявке, относится к: смежному (прилежающему) с 5'-концом гена L5 или некодирующей областью, по природе ассоциированной с ним, т.е. примыкающему или прилежающему к 5'-концу гена L5 или некодирующей области, по природе ассоциированной с ним. В качестве альтернативы, термин "вблизи" или "проксимально" может относиться к близости к гену L5, так что между областью B_x и 5'-концом гена L5 отсутствуют кодирующие последовательности.

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

Таким образом, в одном варианте реализации B_x непосредственно присоединен к основанию L5, которое представляет собой, например, начало некодирующей последовательности, или непосредственно присоединен к некодирующей области, по природе связанной с L5. Термин "некодирующая область, по

природе связанная с L5", используемый в данной заявке, относится к части всех некодирующих областей, которые являются частью гена L5 или примыкают к нему, но не являются частью другого гена.

В одном варианте реализации В_х содержит последовательность SEQ ID NO: 24.

Данная последовательность представляет собой искусственную некодирующую последовательность, при этом последовательность ДНК, например, содержащая трансген (или кассету трансгенов), сайт рестрикции или комбинацию перечисленных, может быть встроена в нее. Данная последовательность является предпочтительной, так как она действует как буфер в том смысле, что позволяет некоторую гибкость в выборе точного положения трансгена, при этом минимизируя разрушительное действие на стабильность и жизнеспособность вируса.

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

В одном варианте реализации В_х содержит SEQ ID NO: 24 с последовательностью ДНК, встроенной между 27 и.о. и 28 и.о. или в месте, соответствующем месту между положениями 28192 п.о. и 28193 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 24.

В одном варианте реализации последовательность В_х находится от 28166 п.о. до 28366 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21. В одном варианте реализации В_х представляет собой связь.

Термин "В_в", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, кодирующей область L5. Термин "область L5", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, содержащей ген, кодирующий волоконный полипептид/белок, в зависимости от контекста. Ген/участок гена волоконного белка кодирует волоконный белок, который представляет собой основной компонент капсида аденовирусов. Волоконный белок участвует в распознавании рецептора и вносит вклад в способность аденовируса избирательно связываться и инфицировать клетки.

В вирусах согласно настоящему описанию волоконный белок может быть из любого серотипа аденовируса, и аденовирусы, которые стали химерными в результате замены волоконного белка на таковой из отличного серотипа, также предложены в настоящем описании. В одном варианте реализации волоконный белок получен из вируса группы В, в частности, Ad11, такого как Ad11p.

В одном варианте реализации последовательность В_в находится от 28367 п.о. до 29344 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21.

Используемый в данной заявке термин "последовательность ДНК" по отношению к В_у относится к последовательности ДНК вблизи 3'-конца гена L5 в В_в. Термин "вблизи или рядом с 3'-концом гена L5", используемый в данной заявке, относится к: смежному (прилежащему) с 3'-концом гена L5 или некодирующей областью, по природе ассоциированной с ним, т.е. примыкающему или прилежащему к 3'-концу гена L5 или некодирующей области, по природе ассоциированной с ним (т.е. ко всей или к части некодирующей последовательности, эндогенной для L5). В качестве альтернативы, термин "вблизи" или "проксимально" может относиться к близости к гену L5, так что между областью В_у и 3'-концом гена L5 отсутствуют кодирующие последовательности.

Таким образом, в одном варианте реализации В_у непосредственно присоединен к основанию L5, которое представляет собой "конец" кодирующей последовательности.

Таким образом, в одном варианте реализации В_у непосредственно присоединен к основанию L5, которое представляет собой "конец" некодирующей последовательности, или присоединен непосредственно к некодирующей области, по природе связанной с L5.

Термины "по существу" и "по природе" в данной заявке используют взаимозаменяемо. В одном варианте реализации В_у включает последовательность SEQ ID NO: 25. Данная последовательность представляет собой некодирующую последовательность, в которую можно встроить последовательность ДНК, например, содержащую трансген (или кассету трансгенов), сайт рестрикции или их комбинацию. Данная последовательность является предпочтительной, так как она действует как буфер в том смысле, что позволяет некоторую гибкость в выборе точного положения трансгена, при этом минимизируя раз-

рушительное действие на стабильность и жизнеспособность вируса. Вставка(-и) может(-гут) встречаться в любом месте внутри последовательности SEQ ID NO: 22 на 5'-конце, 3'-конце или в любой точке между п.о. с 1 по 35, например, между парами оснований 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34 или 34/35.

В одном варианте реализации В_Y содержит SEQ ID NO: 25 с последовательностью ДНК, встроенной между положениями п.о. 12 и 13 или в месте, соответствующем 29356 п.о. и 29357 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21. В одном варианте реализации вставка представляет собой вставку сайта рестрикции. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции. В одном варианте реализации сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции длиной 19 п.о., содержащую 2 сайта рестрикции. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции длиной 9 п.о., содержащую 1 сайт рестрикции. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один, или два, или три трансгена, например, один или два трансгена. В одном варианте реализации сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции длиной 19 п.о., содержащую 2 сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два трансгена. В одном варианте реализации вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции длиной 9 п.о., содержащую 1 сайт рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два трансгена. В одном варианте реализации между двумя сайтами рестрикции находится один или более, например, два трансгена (например, в cassette трансгенов). В одном варианте реализации, если В_Y содержит два сайта рестрикции, то указанные сайты рестрикции отличаются друг от друга. В одном варианте реализации указанный один или более сайтов рестрикции в В_Y не встречаются в природе (например, уникальны) в конкретном геноме аденовируса, в который они были встроены. В одном варианте реализации указанный один или более сайтов рестрикции в В_Y отличаются от других сайтов рестрикции, расположенных в любых местах в геноме аденовируса, например, отличаются от встречающихся в природе сайтов рестрикции или сайтов рестрикции, встроенных в другие части генома, такие как В_X. Таким образом, в одном варианте реализации сайт или сайты рестрикции позволяют специфично вырезать ДНК на данном участке.

В одном варианте реализации последовательность В_Y находится от 29345 п.о. до 29379 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21. В одном варианте реализации В_Y представляет собой связь.

В одном варианте реализации вставка находится после п.о. 12 в последовательности SEQ ID NO: 25.

В одном варианте реализации вставка находится приблизительно в положении 29356 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21.

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

Термин "Е4", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область Е4 аденовируса (т.е. область полипептида/белка), которую можно мутировать таким образом, что белок, кодируемый геном Е4, будет содержать консервативные или неконсервативные замены аминокислот (например, 1, 2, 3, 4 или 5 замен, вставок и/или делеций аминокислот), и обладать такой же функцией, как и белок дикого типа (соответствующий немутированный белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; пониженной функцией, такой как отсутствие функции, по сравнению с белком дикого типа или обладать новой функцией по сравнению с белком дикого типа или комбинацией перечисленных функций, при необходимости.

В одном варианте реализации область Е4 частично удалена, например, удалена на 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%. В одном варианте реализации последовательность области Е4 находится от 32188 п.о. до 29380 п.о. в последовательности SEQ ID NO: 21.

В одном варианте реализации Е4 присутствует, за исключением области Е4orf4, которая удалена.

В одном варианте реализации В₃ представляет собой связь, т.е. Е4 отсутствует.

В одном варианте реализации последовательность В₃ состоит из последовательности от 32188 п.о. до 29380 п.о. в SEQ ID NO: 21.

В данной заявке диапазоны чисел включают конечные точки.

Для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что элементы в формулах в данной заявке, таких как формула (I), (Ia), являются непрерывными и могут включать некодирующие последовательности ДНК, а также гены и кодирующие последовательности ДНК (структурные особенности), упомянутые в данной заявке. В одном или более вариантах реализации в формулах согласно настоящему описанию стараются описать встречающуюся в природе последовательность в геноме аденовируса. В данном контексте для специалиста в данной области техники будет очевидно, что формула относится к основным элементам, характеризующим соответствующий участок генома, и не предполагается, что она является исчерпывающим описанием участка ДНК генома.

Каждый из терминов "Е1А", "Е1В", "Е3" и "Е4", используемых в данной заявке, независимо относится к последовательностям дикого типа и их эквивалентам, мутированным или содержащим частичные делеции формам каждой области, описанной в данной заявке, в частности, к последовательности дикого

типа из известного аденовируса.

Термин "вставка", используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, которую внедряют либо на 5'-конце, либо на 3'-конце, либо внутри эталонного фрагмента данной последовательности ДНК, так что она прерывает эталонную последовательность. Термин "эталонная последовательность" используют как эталонную точку, относительно которой расположена вставка. В контексте настоящего описания вставки, как правило, располагаются внутри либо SEQ ID NO: 24, либо SEQ ID NO: 25. Вставка может представлять собой вставку либо сайта рестрикции, либо кассеты трансенов, либо обоих. Если последовательность прервана, то указанный вирус все еще будет содержать эталонную последовательность, но, как правило, она будет представлять собой два фрагмента, между которыми находится вставка.

В одном варианте реализации трансен или кассета трансенов не включает ненаправленную вставку транспозона, такого как транспозон TN7 или его часть. Термин "транспозон Tn7", используемый в данной заявке, относится к ненаправленной вставке транспозона, описанного в WO2008/080003.

В одном варианте реализации трансен или кассета трансенов дополнительно содержит регуляторный элемент или последовательность.

Другие регуляторные последовательности

Термин "регулятор экспрессии генов" (или регулятор/регуляторный элемент), используемый в данной заявке, относится к генетическому элементу, такому как последовательность промотора, энхансера или акцептора сплайсинга, который играет роль в экспрессии генов, обычно путем запуска или усиления транскрипции или трансляции.

Термин "последовательность акцептора сплайсинга", "акцептор сплайсинга" или "сайт сплайсинга", используемый в данной заявке, относится к регуляторной последовательности, определяющей, когда молекула мРНК будет распознаваться малым ядерным рибонуклеопротеином комплекса сплайсосомы. После сборки сплайсосома катализирует сплайсинг между сайтом акцептора сплайсинга молекулы мРНК и расположенным против хода транскрипции от него сайтом донора сплайсинга, в результате чего получают зрелую молекулу мРНК, которая может транслироваться с получением единого полипептида или белка.

В настоящем изобретении можно использовать последовательности акцептора сплайсинга различного размера, и их можно описать как короткий акцептор сплайсинга (малый), акцептор сплайсинга (средний) и разветвленный акцептор сплайсинга (большой).

Термин "КАС", используемый в данной заявке, относится к короткому акцептору сплайсинга, обычно содержащему только сайт сплайсинга, например, размером 4 п.о. Термин "АС", используемый в данной заявке, относится к акцептору сплайсинга, обычно содержащему короткий акцептор сплайсинга и полипиримидиновый тракт, например, размером 16 п.о. Термин "рАС", используемый в данной заявке, относится к разветвленному акцептору сплайсинга, обычно содержащему короткий акцептор сплайсинга, полипиримидиновый тракт и точку ветвления, например, размером 26 п.о.

В одном варианте реализации акцептор сплайсинга, используемый в конструкциях согласно настоящему описанию, представляет собой CAGG или SEQ ID NO: 3 или 4. В одном варианте реализации последовательность нуклеотидов КАС представлена в SEQ ID NO: CAGG. В одном варианте реализации последовательность нуклеотидов АС представлена в SEQ ID NO: 23. В одном варианте реализации последовательность нуклеотидов рАС представляет собой cagg. В одном варианте реализации последовательность акцептора сплайсинга независимо выбрана из группы, включающей: tgctaatctt cttttctctc ttccagg (SEQ ID NO: 4), ttctctctt cagg (SEQ ID NO: 3) и cagg.

В одном варианте реализации сразу за сайтом сплайсинга следует (т.е. следует в направлении от 5' к 3') консенсусная последовательность Козак, содержащая CCACC. В одном варианте реализации сайт сплайсинга и последовательность Козак разделены (между ними находятся) 100 или менее п.о. В одном варианте реализации последовательность нуклеотидов Козак представляет собой CCACC.

Обычно, если кодирующая последовательность находится под контролем эндогенного или экзогенного промотора (такого как эндогенный промотор), то сразу за ней будет следовать последовательность Козак. О начале кодирующей области свидетельствует иницирующий кодон (AUG), например, в контексте последовательности (gcc)gccRccAUGg [SEQ ID NO: 105] начало начала кодирующих последовательностей указано выделенными жирным шрифтом основаниями. Буквы нижнего регистра обозначают обычные основания в данном положении (которые, тем не менее, могут изменяться), а буквы верхнего регистра обозначают высококонсервативные основания, т.е., последовательность "AUGG" постоянна или изменяется очень редко, если вообще изменяется; "R" указывает на то, что в данном положении обычно наблюдают пурин (аденин или гуанин), а значимость последовательности в скобках (gcc) неясна. Таким образом, в одном варианте реализации иницирующий кодон AUG включен в последовательность Козак.

Участок внутренней посадки рибосомы ДНК, используемый в данной заявке, относится к последовательности ДНК, кодирующей участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Термин "IRES", используемый в данной заявке, означает последовательность нуклеотидов, которая позволяет запускать трансляцию последовательности информационной РНК (мРНК), включая запуск, начинающийся внутри последовательности мРНК. Это особенно полезно, когда кассета кодирует полицистронную мРНК. Приме-

нение IRES позволяет получить полицистронную мРНК, которая транслируется в несколько отдельных белков или пептидов. В одном варианте реализации последовательность ДНК-нуклеотидов участка внутренней посадки рибосомы представляет собой SEQ ID NO: 6. В одном варианте реализации конкретный IRES используется только один раз в геноме. Это может быть полезно в отношении стабильности генома.

Термин "самоотщепляющийся с высокой эффективностью пептид 2А" или "пептид 2А", используемый в данной заявке, относится к пептиду, который эффективно отщепляется после трансляции. Подходящие пептиды 2А включают P2A, F2A, E2A и T2A. Авторы настоящего изобретения заметили, что после однократного использования определенной последовательности ДНК, кодирующей данный пептид 2А, данную конкретную последовательность ДНК нельзя использовать второй раз. Тем не менее, можно использовать избыточность кода ДНК для получения последовательности ДНК, которая транслируется в тот же самый пептид 2А. Применение пептидов 2А особенно полезно, когда кассета кодирует полицистронную мРНК. Применение пептидов 2А приводит к трансляции одной полипептидной цепи, которая модифицируется после трансляции с получением множества отдельных белков или пептидов.

В одном варианте реализации последовательность аминокислот используемого кодируемого пептида P2A представлена в SEQ ID NO: 7. В одном варианте реализации последовательность аминокислот используемого кодируемого пептида F2A представлена в SEQ ID NO: 8. В одном варианте реализации последовательность аминокислот используемого кодируемого пептида E2A представлена в SEQ ID NO: 9. В одном варианте реализации последовательность аминокислот используемого кодируемого пептида T2A представлена в SEQ ID NO: 10.

В одном варианте реализации некоторая мРНК или каждая мРНК, кодируемая трансгеном, содержит последовательность сигнала полиаденилирования, например, обычно на конце последовательности мРНК, например, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. Таким образом, в одном варианте реализации трансген или кассета трансгенов содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую последовательность сигнала полиаденилирования.

Термин "поли(А)", "сигнал полиаденилирования" или "последовательность полиаденилирования", используемый в данной заявке, означает последовательность ДНК, обычно содержащую сайт AATAAA, который после транскрипции может распознаваться мультибелковым комплексом, который отщепляет и полиаденилирует образующуюся молекулу мРНК.

В одном варианте реализации последовательность нуклеотидов сигнала полиаденилирования представлена в SEQ ID NO: 5.

В одном варианте реализации указанная конструкция не содержит последовательность полиаденилирования. В одном варианте реализации регулятор экспрессии генов представляет собой последовательность акцептора сплайсинга.

В одном варианте реализации последовательность, кодирующая белок/полипептид/пептид, такой как антитело или связывающий фрагмент антитела, дополнительно содержит сигнал полиаденилирования.

В одном варианте реализации предложен вирус или конструкция с последовательностью, описанной в данном тексте, например, вирус выбран из NG-330 (SEQ ID NO: 16); NG-334 (SEQ ID NO: 17); NG-345 (SEQ ID NO: 18); NG-346 (SEQ ID NO: 19); NG-347 (SEQ ID NO: 20) и NG-348 (SEQ ID NO: 96) В одном варианте реализации вирус представляет собой NG-347 (SEQ ID NO: 20) или NG-348 (SEQ ID NO: 96).

Лекарственные формы

В объем настоящего изобретения также входит фармацевтическая композиция вируса, описанного в данной заявке.

В одном варианте реализации предложена жидкая парентеральная лекарственная форма, например, для инфузии или инъекции, репликационно-компетентного онколитического вируса согласно настоящему описанию, при этом указанная лекарственная форма содержит дозу в диапазоне от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на объем дозы.

Парентеральная лекарственная форма означает лекарственную форму, которая была разработана не для доставки через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Обычные парентеральные пути доставки включают инъекцию, имплантацию или инфузию. В одном варианте реализации лекарственная форма предусмотрена в форме для болюсной доставки.

В одном варианте реализации парентеральная лекарственная форма представлена в форме для инъекции. Инъекция включает внутривенную, подкожную, внутриопухолевую или внутримышечную инъекцию. Термин "инъекция", используемый в данной заявке, означает введение жидкости в организм посредством шприца. В одном варианте реализации способ согласно настоящему описанию не включает внутриопухолевую инъекцию.

В одном варианте реализации парентеральная лекарственная форма представлена в форме для инфузии.

Термин "инфузия", используемый в данной заявке, означает введение жидкости с более низкой скоростью с помощью капельницы, инфузионного насоса, шприцевой помпы или эквивалентного устройства. В одном варианте реализации инфузию вводят в течение периода времени в диапазоне от 1,5 мин до

120 мин, например, в течение приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 или 115 мин.

В одном варианте реализации одну дозу лекарственной формы менее чем 100 мл, например, 30 мл, например, вводят с помощью шприцевой помпы.

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

В одном варианте реализации лекарственная форма предназначена для внутривенного (в/в) введения. Данный путь особенно эффективен для доставки онколитического вируса, так как он позволяет быстрый доступ в большую часть органов и тканей и особенно полезен для лечения метастаз, например, сформировавшихся метастаз, особенно расположенных в высоко васкуляризованных областях, таких как печень и легкие.

Лекарственные формы, как правило, являются стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть представлена в виде лекарственной формы, такой как раствор, микроэмульсия, липосома или другая парентеральная лекарственная форма, подходящая для введения человеку, и может входить в состав формы в виде предварительно наполненного устройства, такого как шприц или флакон, в частности, в виде разовой дозы.

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

Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и тому подобные полиолы), и подходящие смеси перечисленных сред. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, применяя диспергирующий агент или поверхностно-активное вещество, такое как лецитин или неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80 или 40. В дисперсиях поддержанию необходимого размера частиц можно способствовать путем добавления поверхностно-активного вещества. Примеры изотонических агентов включают сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия, в указанной композиции.

В одном варианте реализации используемые парентеральные лекарственные формы могут содержать один или более из следующих компонентов: буфер, например, 4-(2-гидроксипропил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту, фосфатный буфер и/или трис-буфер, сахар, например, декстрозу, маннозу, сахарозу или аналогичные сахара, соль, такую как хлорид натрия, хлорид магния или хлорид калия, детергент, такой как неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как бридж, PS-80, PS-40 или аналогичные детергенты. Лекарственная форма также может содержать консервант, такой как ЭДТА или этанол, или комбинация ЭДТА и этанола, которые считают агентами, предотвращающими один или более возможных путей разложения.

В одном варианте реализации лекарственная форма содержит очищенный онколитический вирус согласно настоящему описанию, например, от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на дозу, например, от 1×10^{10} до 1×10^{12} вирусных частиц на дозу. В одном варианте реализации концентрация вируса в лекарственной форме находится в диапазоне от 2×10^8 до 2×10^{14} в.ч./мл, например, 2×10^{12} в.ч./мл.

В одном варианте реализации парентеральная лекарственная форма содержит глицерин.

В одном варианте реализации лекарственная форма содержит онколитический аденовирус, описанный в данной заявке, HEPES (N-2-гидроксипропилпиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту), глицерин и буфер.

В одном варианте реализации парентеральная лекарственная форма состоит из вируса согласно настоящему описанию, HEPES, например, 5 мМ, глицерина, например, 5-20% (в объемном отношении), соляной кислоты, например, для подведения pH до диапазона 7-8, и воды для инъекций.

В одном варианте реализации 0,7 мл вируса согласно настоящему описанию при концентрации 2×10^{12} в.ч./мл включают в состав лекарственной формы, содержащей 5 мМ HEPES, 20% глицерин с конечным значением pH равным 7,8.

Полное описание фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Нью-Джерси 1991).

В одном варианте реализации лекарственная форма предусмотрена в виде лекарственной формы для топического введения, включая ингаляцию.

Подходящие для ингаляции препараты включают порошки для ингаляции, дозирующие аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, или растворы для ингаляции, не содержащие газов-пропеллентов. Порошки для ингаляции согласно настоящему описанию, как правило, будут содержать вирус, описанный в данной заявке, вместе с физиологически приемлемым вспомогательным веществом.

Такие порошки для ингаляции могут содержать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиспирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или смеси указанных агентов друг с другом. Подходящим образом применяют моно- или дисахариды, такие

как лактоза или глюкоза, в частности, но не исключительно, в форме гидратов.

Для депонирования в легком требуется размер частиц менее чем 10 мкм, такой как 1-9 мкм, например, от 0,1 до 5 мкм, в частности, от 1 до 5 мкм. Размер частицы, несущей вирус, имеет первостепенное значение и, таким образом, в одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию можно адсорбировать или абсорбировать на/в частице, такой как частица лактозы данного размера.

Газы-пропелленты, которые можно применять для получения аэрозолей для ингаляции, известны в данной области техники. Подходящие газы-пропелленты выбирают из углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан и галогенуглеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Приведенные выше газы-пропелленты можно применять сами по себе или в виде их смесей.

Особенно подходящие газы-пропелленты представляют собой галогенированные производные алканов, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Из упомянутых выше галогенированных углеводородов особенно подходящими являются TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси.

Аэрозоли для ингаляции, содержащие газы-пропелленты, также могут содержать другие ингредиенты, такие как соразтворитель, стабилизаторы, поверхностно-активные агенты (поверхностно-активные вещества), антиоксиданты, лубриканты и средства для подведения pH. Все указанные ингредиенты известны в данной области техники.

Аэрозоли для ингаляции, содержащие газы-пропелленты, согласно настоящему изобретению могут содержать до 5% по массе активного вещества. Аэрозоли согласно настоящему изобретению содержат, например, от 0,002 до 5% по массе, от 0,01 до 3% по массе, от 0,015 до 2% по массе, от 0,1 до 2% по массе, от 0,5 до 2% по массе или от 0,5 до 1% по массе активного ингредиента.

В качестве альтернативы, топическое введение в легкое также можно осуществить путем введения лекарственной формы в виде жидкого раствора или суспензии, например, используя такое устройство, как небулайзер, например, небулайзер, соединенный с компрессором (например, небулайзер Pari LC-Jet Plus(R), соединенный с компрессором Pari Master(R) производства Pari Respiratory Equipment, Inc., Ричмонд, Виргиния).

Вирус согласно настоящему изобретению можно доставлять в диспергированном в растворителе виде, например, в форме раствора или суспензии, например, как уже описано выше для парентеральных лекарственных форм. Его можно суспендировать в подходящем физиологическом растворе, например, солевом растворе или другом фармакологически приемлемом растворителе или буферном растворе. Буферные растворы, известные в данной области техники, могут содержать от 0,05 до 0,15 мг эдтата натрия, от 8,0 до 9,0 мг NaCl, от 0,15 до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 до 0,30 мг безводной лимонной кислоты, и от 0,45 до 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды для достижения pH, равного приблизительно от 4,0 до 5,0.

Лекарственные формы суспензий или растворов также могут содержать одно или более вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества хорошо известны в данной области техники и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), ЭДТА, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии можно инкапсулировать в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Указанная лекарственная форма, как правило, представляет собой, по существу, стерильную форму, полученную с использованием стерильных процессов производства.

Это может включать получение и стерилизацию путем фильтрации забуференного растворителя/раствора, используемого для получения лекарственной формы, асептическое суспендирование антигена в стерильном забуференном растворе растворителя и распределение лекарственной формы по стерильным емкостям с помощью способов, известных средним специалистам в данной области техники.

Лекарственная форма для распыления с помощью небулайзера согласно настоящему описанию может быть представлена, например, в виде отдельных разовых доз (например, запечатанных в пластиковые контейнеры или флаконы), упакованных в оболочку из фольги. Каждый флакон содержит разовую дозу в объеме, например, 2 мл, растворителя/буферного раствора.

В объем настоящего описания также входят жидкие растворы или суспензии, доставляемые внутриназально, например, с применением устройства, описанного в WO2009/068877 и US2004/0153033, оба из которых включены в данную заявку посредством ссылки.

Лечение

В дополнительном аспекте в объем настоящего описания входит вирус или содержащая его лекарственная форма, описанная в данной заявке, для применения в лечении, в частности, в лечении рака.

В одном варианте реализации способ лечения предназначен для применения в лечении опухоли.

Считают, что термин "опухоль", используемый в данной заявке, относится к атипичной массе ткани, которая возникает в результате чрезмерного деления клеток, которое происходит неконтролируемым образом и прогрессирует, также называемой новообразованием. Опухоли могут быть либо доброкачественными (нераковыми), либо злокачественными. В объем термина "опухоль" входят все формы рака и

метастазы. В одном варианте реализации опухоль является раковой.

В одном варианте реализации опухоль представляет собой солидную опухоль. Сольная опухоль может быть локальной или метастазирующей.

В одном варианте реализации опухоль имеет эпителиальное происхождение.

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

В одном варианте реализации опухоль представляет собой колоректальное злокачественное новообразование.

Термин "злокачественное новообразование", используемый в данной заявке, относится к раковым клеткам.

В одном варианте реализации онколитический аденовирус применяют для лечения или предотвращения образования метастаз.

В одном варианте реализации способ или лекарственную форму, описанные в данной заявке, применяют для лечения устойчивых к лекарственным средствам раковых заболеваний.

В одном варианте реализации вирус вводят в комбинации с введением дополнительного лекарства от рака или терапией рака.

В одном варианте реализации предложен вирус или лекарственная форма согласно настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для лечения рака, например, описанного выше рака.

В дополнительном аспекте предложен способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества вируса или лекарственной формы согласно настоящему описанию нуждающемуся в этом пациенту, например, пациенту - человеку.

В одном варианте реализации онколитический вирус или лекарственную форму, описанные в данной заявке, вводят в комбинации с другой терапией.

Предполагают, что в объем термина "в комбинации", используемого в данной заявке, входят случаи, когда онколитический вирус вводят до, одновременно и/или после другого лекарственного средства или терапии рака. Тем не менее, как правило, схемы лечения для комбинированной терапии

Терапия рака включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, прицельную (таргетную) терапию и/или химиотерапию.

Термин "лечение рака", используемый в данной заявке, относится к лечению с помощью терапевтического соединения или биологического агента, например, антитела, предназначенного для лечения рака и/или для поддерживающей терапии рака.

В одном варианте реализации лечение рака выбирают из любой другой противораковой терапии, включающей химиотерапевтический агент; таргетный противораковый агент, такой как конъюгат антитела и лекарственного средства; лучевую терапию, радиоизотопную терапию или любую комбинацию перечисленных видов терапии.

В одном варианте реализации вирус согласно настоящему описанию, такой как онколитический аденовирус, можно применять в качестве предварительного лечения до проведения терапии, такой как хирургическое вмешательство (неоадьювантная терапия), чтобы уменьшить опухоль, для лечения метастаз и/или предотвращения появления метастаз или появления дополнительных метастаз. Указанный онколитический аденовирус можно применять после проведения терапии, такой как хирургическое вмешательство (адьювантная терапия), для лечения метастаз и/или предотвращения появления метастаз или появления дополнительных метастаз.

В одном варианте реализации вирус или лекарственную форму согласно настоящему описанию применяют в поддерживающей терапии.

Термин "одновременно", используемый в данной заявке, представляет собой введение дополнительного лекарственного средства от рака в то же время или приблизительно в то же время, что и введение лекарственной формы онколитического аденовируса. Указанное лекарственное средство может содержаться в той же лекарственной форме, или его можно вводить в виде отдельной лекарственной формы.

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

Предполагают, что термин "химиотерапевтический агент", используемый в данной заявке, относится к специфическим противоопухолевым химическим агентам или лекарственным средствам, которые селективно разрушают злокачественные клетки и ткани. Например, алкилирующие агенты, антиметаболиты, антрациклины, алкалоиды растений, ингибиторы топоизомеразы и другие противоопухолевые агенты. Примеры специфических химиотерапевтических агентов включают доксорубин, 5-фторурацил (5-FU), паклитаксел, капецитабин, иринотекан и платины, такие как цисплатин и оксалиплатин. Конкретную дозу может выбрать лечащий врач на основании природы ракового заболевания, от которого лечат.

В одном варианте реализации терапевтический агент представляет собой ганцикловир, который может способствовать контролированию иммунных ответов и/или васкуляризации опухоли.

В одном варианте реализации один или более методов лечения, используемых в способе, описанном в данной заявке, метрорномные, то есть представляют собой непрерывное или частое лечение низкими дозами противораковых лекарственных средств, которые часто вводят в совокупности с другими способами терапии.

Онколитические аденовирусы подгруппы В, в частности, Ad11 и аденовирусы, полученные из него, такие как EnAd, могут быть особенно синергичны с химиотерапевтическими веществами, поскольку похоже, что механизм их действия по большей части не зависит от апоптоза, уничтожая раковые клетки преимущественно некролитическим механизмом. Более того, подавление иммунного ответа, которое происходит во время химиотерапии, может позволить онколитическому вирусу действовать с большей эффективностью.

Термин "терапевтическая доза", используемый в данной заявке, относится к количеству вируса, такого как онколитический аденовирус, которое подходит для достижения предполагаемого терапевтического действия при его применении в подходящей схеме приема, например, снижает выраженность симптомов или состояний при заболевании, в частности, не вызывая ограничивающих дозу побочных действий. Дозу можно считать терапевтической дозой для лечения рака или метастаз, если количество вирусных частиц может быть достаточным, чтобы привести к следующим эффектам: рост опухоли или метастаз замедлился или остановился, или обнаружили уменьшение размера опухоли или метастаз, и/или продолжительность жизни пациента увеличилась. Подходящие терапевтические дозы, как правило, подбирают, соблюдая равновесие между терапевтическим эффектом и переносимой токсичностью, например, когда побочное действие и токсичность переносимы при условии, что терапия приносит пользу.

В одном варианте реализации предложено системное введение множества доз парентеральной лекарственной формы онколитического аденовируса согласно настоящему описанию в одном цикле лечения, например, в котором суммарная доза, которую дают при каждом введении, находится в диапазоне от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на дозу.

В одном варианте реализации одну или более доз (например, каждую дозу) вируса или содержащей вирус композиции вводят таким образом, что скорость доставки вирусных частиц находится в диапазоне от 2×10^{10} частиц в минуту до 2×10^{12} частиц в минуту.

В одном варианте реализации вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему описанию (включая лекарственную форму, содержащую их) вводят раз в неделю, например, на неделе 1 дозу вводят в день 1, 3, 5, после чего вводят одну дозу раз в каждую последующую неделю.

В одном варианте реализации вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему описанию (включая лекарственную форму, содержащую их) вводят два раза в неделю или три раза в неделю, например, вводят на неделе 1 в дни 1, 3 и 5, и на неделе 2 или 3 также вводят в дни 1, 3 и 5. Данную схему введения доз можно повторять столько раз, сколько необходимо.

В одном варианте реализации вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему описанию (включая лекарственную форму, содержащую их) вводят раз в месяц, например, в рамках цикла лечения или в качестве поддерживающей терапии.

В одном варианте реализации вирусы и конструкции согласно настоящему описанию получают с помощью рекомбинантных методик. Для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что нагруженный геном аденовируса можно производить с помощью других технических средств, включая синтез генома целиком или плазмиды, содержащей часть полноразмерного генома. Для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что в случае синтеза генома участок вставки может не содержать нуклеотиды сайта рестрикции, так как последние являются материалом, оставшимся после вставки генов с применением способов клонирования.

В одном варианте реализации нагруженный геном аденовируса получают полностью синтетическим путем, например, как в случае SEQ ID NO: 109, которую использовали с кассетами трансгенов с последовательностями SEQ ID NO: 18, 20, 96, 101, 102, 103.

В объем настоящего описания дополнительно входит аденовирус формулы (I) или ее подформулы, который получили или который можно получить путем вставки трансгена или кассеты трансгенов.

В данной заявке использование термина "является" означает "включая".

В контексте настоящего описания "включающий" следует понимать как "содержащий".

Также предполагается, что в объем вариантов реализации настоящего изобретения, включающих некоторые свойства/элементы, также входят альтернативные варианты реализации, "состоящие" или "состоящие по существу" из соответствующих элементов/свойств.

Если это технически уместно, то варианты реализации настоящего изобретения можно комбинировать.

Технические ссылочные материалы, такие как патенты и заявки на патент, включены в данную заявку посредством ссылки.

Любые варианты реализации, конкретно и явно перечисленные в данном тексте, могут подлежать

отказу либо отдельно, либо в комбинации с одним или более дополнительными вариантами реализации.

Заголовки, используемые в данной заявке, предназначены для деления указанного документа на разделы и не предназначены для толкования значения описания, приведенного в данной заявке.

Настоящее изобретение дополнительно описано путем исключительно иллюстрирования в следующих примерах.

Примеры

Пример 1. Получение вируса EnAd, экспрессирующего активирующий Т-клетки антиген CD80.

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмиды pNG-330 путем вставки напрямую кас-сеты, кодирующей активирующий Т-клетки антиген CD80 человека (SEQ ID NO: 11). Кассета pNG-330 содержит короткую последовательность акцептора сплайсинга CAGG на 5'-конце, последовательность кДНК CD80 человека и последовательность полиаденилирования на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Схематическое изображение встроенной кассеты трансонов показано на фиг. 3А. Конструкцию плазмиды подтверждали путем секвенирования ДНК.

Получение и характеристика вируса.

В данной заявке ссылки на такие вирусы, как NG-330-00, представляют собой просто ссылки на конкретную партию "00" вируса NG-330. Аналогичную номенклатуру можно использовать для других вирусов.

Плазмиду pNG-330 линеаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом AscI с получением генома вируса NG-330 (SEQ ID NO: 16). Расщепленную ДНК очищали путем экстракции фенолом/хлороформом и преципитировали в течение 16 ч при -20°C в 300 мкл > 95% этанола, чистого для молекулярной биологии, и 10 мкл 3 М ацетата натрия. Преципитированную ДНК осаждали путем центрифугирования при 14000 об/мин в течение 5 мин и промывали в 500 мкл 70% этанола, а затем снова центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Осадок чистой ДНК сушили на воздухе, ресуспендировали в 500 мкл OptiMEM, содержащей 15 мкл реагента для трансфекции липофектамина, и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Смесь для трансфекции затем добавляли по каплям во флакон Т-25, содержащий клетки 293, выращенные до 70% конфлюентности. После инкубации клеток со смесью для трансфекции в течение 2 ч при 37°C, 5% CO₂, к клеткам добавляли 4 мл среды для культивирования клеток (DMEM с высоким содержанием глюкозы с глутамином, дополненной 2% FBS) и флаконы инкубировали при 37°C и 5% CO₂.

За трансфицированными клетками 293 наблюдали каждые 24 ч и добавляли к ним дополнительное количество среды каждые 48-72 ч. Продукцию вируса отслеживали по наблюдаемому значительному цитопатическому действию (ЦПД) в монослое клеток. После того, как наблюдали обширное ЦПД, вирус собирали из клеток 293 с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. Собранные вирусы использовали для повторного инфицирования клеток 293, чтобы увеличивать запасы вируса. Продукцию жизнеспособного вируса в процессе амплификации подтверждали по наблюдаемому значительному ЦПД в монослое клеток. После того, как наблюдали ЦПД, вирус собирали из клеток 293 с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. Увеличенные запасы использовали для дальнейшей амплификации перед очисткой вируса путем двукратного центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия с получением запаса вируса NG-330.

Пример 2. Описание активности вируса NG-330 по сравнению с EnAd в линиях клеток карциномы.

Репликацию вируса NG-330 или EnAd (которую оценивали с помощью количественной ПЦР) и экспрессию CD80 на мембране (которую оценивали с помощью проточной цитометрии (фиг. 4 и 5)) сравнивали в линии клеток карциномы толстого кишечника HT-29 и линии клеток карциномы легкого A549. NG-330 представляет собой вирус, полученный из EnAd, который содержит кассету трансонов, кодирующую активирующий Т-клетки антиген человека - CD80, - после позднего гена EnAd - L5 (гена волоконного белка). Схематическое изображение встроенной кассеты показано на фиг. 3А. Получение вируса NG-330 подробно описано в примере 1. Линии клеток карциномы A549 или HT-29 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 7,5e5 клеток/луночку для клеток A549 или 2.e6 клеток/луночку для клеток HT-29. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 5% CO₂ перед тем, как клетки либо инфицировали 100 вирусными частицами EnAd или NG-330 на клетку (вчк), либо оставляли неинфицированными. Анализы проводили через 24, 48 или 72 ч после инфекции.

Репликация вируса, которую оценивали с помощью количественной ПЦР.

Линии клеток HT-29 и A549, либо инфицированные в течение 24, 48 или 72 ч 100 вчк EnAd или NG-330, либо оставленные неинфицированными, использовали для количественного анализа вирусной ДНК с помощью количественной ПЦР. Супернатанты клеток собирали и осветляли путем центрифугирования в течение 5 мин, 1200 об/мин. ДНК выделяли из 10 мкл супернатанта, применяя набор для выделения ДНК Genelute от Sigma, следуя протоколу производителя. Также получали стандартную кривую, применяя вирусные частицы EnAd (2,5e10-2,5e5 вч), и выделяли их, применяя набор Genelute от Sigma. Каждый выделенный образец или стандарт анализировали с помощью количественной ПЦР, применяя набор праймер-зонд, специфичный к гену E3 EnAd.

Путем анализа количества обнаруженных геномов вируса на клетку продемонстрировали, что реп-

ликация вирусов NG-330 и EnAd была сравнимой в обеих линиях клеток HT-29 (фиг. 4А) и А549 (фиг. 4В). В неинфицированных клетках геномы вируса не были обнаружены (результаты не представлены).

Экспрессию CD80 на поверхности клеток оценивали с помощью проточной цитометрии.

Линии клеток HT-29 и А549, либо инфицированные в течение 24, 48 или 72 ч 100 вчк EnAd или NG-330, либо оставленные неинфицированными, использовали для анализа экспрессии трансгена CD80 на поверхности клеток. Указанные опухолевые клетки удаляли с поверхности планшета путем обработки трипсином, центрифугировали, а затем ресуспендировали в 1% БСА/ФБР. Образцы затем либо инкубировали при 5°C в течение 1 ч с буфером, изотипическим контрольным антителом мыши, конъюгированным с Cy5, или антителом к CD80 человека, конъюгированным с Cy5 (клон 2D10). Все образцы также одновременно окрашивали красителем Zombie Aqua для выявления живых/мертвых клеток, чтобы различить жизнеспособные клетки. Образцы промывали трижды в 1% БСА/ФБР перед проведением анализа с помощью проточной цитометрии (FACS, Attune) для выявления жизнеспособных клеток и экспрессии белка CD80 на поверхности клеток. Результаты анализа показали, что CD80 можно было выявить на поверхности как клеток А549 (фиг. 5А), так и клеток HT-29 (фиг. 5В), которые обработали NG-330, но не тех, которые обработали EnAd или оставили необработанными. Сравнение онколитической эффективности вируса.

Клетки карциномы толстого кишечника HT-29 высевали в 96-луночные планшеты при плотности клеток, равной 2,5e4 клеток/луночку. Планшеты инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO₂ перед тем, как клетки инфицировали вирусными частицами либо EnAd, либо NG-330 в диапазоне плотности инфицирования, составляющем 100 - 0,39 частиц на клетку (вчк). Жизнеспособность клеток HT-29 оценивали, применяя реагент CellTiter 96 MTS (Promega: G3581), через 72 ч после инфицирования. Количественный анализ % выживаемости клеток при каждой плотности инфицирования продемонстрировал, что онколитическая эффективность NG-330 была сравнимой с таковой для EnAd в клетках HT29 (фиг. 6).

Пример 3. Получение вирусов EnAd, экспрессирующих активирующий Т-клетки антиген CD80 и цитокин IFN α .

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмиды pNG-343 путем вставки напрямую касеты, кодирующей активирующий Т-клетки антиген CD80 человека (SEQ ID NO: 11) и цитокин человека интерферон α (IFN α , SEQ ID NO: 12). Кассета pNG-343 содержала: короткую последовательность акцептора сплайсинга CAGG на 5'-конце; кДНК IFN α человека; последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида P2A (SEQ ID NO: 7); последовательность кДНК CD80 человека и последовательность полиаденилирования на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Схематическое изображение встроенной касеты трансгенов показано на фиг. 3В. Конструкцию плазмиды подтверждали путем секвенирования ДНК. Получение и характеристика вируса.

Плазмиду pNG-343 линейаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом AscI с получением генома вируса NG-343 (SEQ ID NO: 17). Вирус NG-343 амплифицировали и очищали согласно способам, подробно описанным в примере 1.

Пример 4. Получение вирусов EnAd, экспрессирующих внеклеточный домен лиганда FMS-подобной тирозинкиназы 3, хемокин MIP1 α и цитокин IFN α .

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмиды pNG-345 путем вставки напрямую касеты, кодирующей растворимый вариант лиганда FMS-подобной тирозинкиназы 3 (Flt3L, SEQ ID NO: 13), MIP1 α (изоформу LD78 β , SEQ ID NO: 14) и IFN α (SEQ ID NO: 12). Кассета pNG-345 содержала: короткую последовательность акцептора сплайсинга CAGG на 5'-конце; кДНК Flt3L человека; последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида P2A (SEQ ID NO: 7); кДНК MIP1 α человека; последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида T2A (SEQ ID NO: 10); кДНК IFN α человека и последовательность полиаденилирования на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Схематическое изображение встроенной касеты трансгенов показано на фиг. 3D. Конструкцию плазмиды подтверждали путем секвенирования ДНК.

Получение и характеристика вируса.

Плазмиду pNG-345 линейаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом AscI с получением генома вируса NG-345 (SEQ ID NO: 18). Вирус NG-345 амплифицировали и очищали согласно способам, подробно описанным в примере 1.

Пример 5. Получение вирусов EnAd, экспрессирующих активирующий Т-клетки антиген CD80, хемокин MIP1 α и лиганд Flt3.

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмиды pNG-346 путем вставки напрямую касеты, кодирующей активирующий Т-клетки антиген CD80 человека (SEQ ID NO: 11), воспалительный белок Ia макрофагов человека (MIP1 α , SEQ ID NO: 14) и лиганд Flt3 человека (SEQ ID NO: 13). Кассета pNG-346 содержала: короткую последовательность акцептора сплайсинга CAGG на 5'-конце; кДНК IFN α человека; последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида P2A (SEQ ID NO: 7); кДНК MIP1 α человека (изоформу LD78 β); последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида T2A (SEQ ID NO: 10); последовательность кДНК лиганда Flt3 человека и последовательность полиаденилирования на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Схематическое изображение встро-

енной кассеты трансенов показано на фиг. 3Е. Конструкцию плазмиды подтверждали путем секвенирования ДНК.

Получение и характеристика вируса.

Плазмиду рNG-346 линейаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом *AscI* с получением генома вируса NG-346 (SEQ ID NO: 19). Вирус NG-346 амплифицировали и очищали согласно способам, подробно описанным в примере 1.

Пример 6. Получение вирусов EnAd, экспрессирующих активирующий Т-клетки антиген CD80, хемокин MIP1 α и цитокин IFN α .

Плазмиду рEnAd2.4 использовали для получения плазмиды рNG-347 путем вставки напрямую кассеты, кодирующей активирующий Т-клетки антиген CD80 человека (SEQ ID NO: 11), воспалительный белок макрофагов человека 1 α (MIP1 α , SEQ ID NO: 14) и цитокин человека интерферон α (IFN α , SEQ ID NO: 12). Кассета рNG-347 содержала: короткую последовательность акцептора сплайсинга CAGG на 5'-конце; кДНК IFN α человека; последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида P2A (SEQ ID NO: 7); кДНК MIP1 α человека (изоформу LD78 β); последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида T2A (SEQ ID NO: 10); последовательность кДНК CD80 человека и последовательность полиаденилирования на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Схематическое изображение встроенной кассеты трансенов показано на фиг. 3F. Конструкцию плазмиды подтверждали путем секвенирования ДНК.

Получение и характеристика вируса.

Плазмиду рNG-347 линейаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом *AscI* с получением генома вируса NG-347 (SEQ ID NO: 20). Вирус NG-347 амплифицировали и очищали согласно способам, подробно описанным в примере 1. Пример 7. Получение вирусов EnAd, экспрессирующих активирующий Т-клетки антиген CD80 и заякоренный в мембрану одноцепочечный фрагмент Fv антитела к ϵ -цепи комплекса CD3 человека (CD3 ϵ).

Плазмиду рEnAd2.4 использовали для получения плазмиды рNG-348 путем вставки напрямую кассеты, кодирующей активирующий Т-клетки антиген CD80 человека (SEQ ID NO: 11) и заякоренную в мембрану химерную форму одноцепочечного Fv к CD3 ϵ человека (SEQ ID NO: 15). Кассета рNG-348 содержала: короткую последовательность акцептора сплайсинга CAGG на 5'-конце; кДНК заякоренного в мембрану scFv к CD3 ϵ человека; последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида P2A (SEQ ID NO: 7); последовательность кДНК CD80 человека и последовательность полиаденилирования на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Схематическое изображение встроенной кассеты трансенов показано на фиг. 3С. Конструкцию плазмиды подтверждали путем секвенирования ДНК.

Получение и характеристика вируса.

Плазмиду рNG-348 линейаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом *AscI* с получением генома вируса NG-348 (SEQ ID NO: 96). Вирус NG-348 амплифицировали и очищали согласно способам, подробно описанным в примере 1.

Пример 8. Активность вируса EnAd - NG-343 - экспрессирующего два трансена: активирующий Т-клетки антиген CD80 и цитокин IFN α .

Характеристика активности вируса NG-343 по сравнению с EnAd в линиях клеток карциномы.

Репликацию вирусов NG-343 или EnAd (которую оценивали с помощью количественной ПЦР), экспрессию трансена CD80 (которую оценивали с помощью проточной цитометрии) или экспрессию трансена IFN α (которую оценивали с помощью ELISA) сравнивали в линии клеток карциномы толстого кишечника HT-29 или линии клеток карциномы легкого A549. NG-343 представляет собой вирус, полученный из EnAd, который содержит кассету трансенов, кодирующую активирующий Т-клетки антиген человека CD80, а также цитокин человека интерферон альфа 2b, расположенный после позднего гена EnAd - L5 (гена волоконного белка). Схематическое изображение встроенной кассеты показано на фиг. 3В. Получение вируса NG-343 подробно описано в примере 3. Линии клеток карциномы A549 или HT-29 высевали в 12-луночные планшеты при плотности клеток $7,5 \times 10^5$ клеток/луночку для клеток A549 или $1,4 \times 10^6$ клеток/луночку для клеток HT-29. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 5% CO₂ перед тем, как клетки либо инфицировали EnAd или NG-343 в количестве 100 вирусных частиц на клетку (вчк), либо оставляли неинфицированными. Анализы проводили через 24, 48 или 72 ч после инфекции.

Репликация вируса, которую оценивали с помощью количественной ПЦР.

Клетки HT-29, инфицированные в течение 24, 48 или 72 ч 100 вчк EnAd или NG-343 либо оставленные неинфицированными, использовали для количественного анализа вирусной ДНК с помощью количественной ПЦР. Супернатанты клеток собирали и осветляли путем центрифугирования в течение 5 мин, 1200 об/мин. ДНК выделяли из 10 мкл супернатанта, применяя набор для выделения ДНК Genelute от Sigma, следуя протоколу производителя. Также получали стандартную кривую, применяя вирусные частицы EnAd (от $2,5 \times 10^{10}$ до $2,5 \times 10^5$ вч), и выделяли их, применяя набор Genelute от Sigma.

Каждый выделенный образец или стандарт анализировали с помощью количественной ПЦР, применяя набор праймер-зонд, специфичный к гену E3 EnAd.

Результаты анализа количества обнаруженных геномов вируса на клетку продемонстрировали, что

репликация вирусов NG-343 и EnAd была сравнимой во все проанализированные моменты времени (фиг. 7А). В неинфицированных клетках геномы вируса не были обнаружены (результаты не представлены).

Анализ экспрессии IFN α с помощью ELISA.

В супернатантах линий клеток HT-29 или A549, инфицированных в течение 24, 48 или 72 ч 10 вчк вируса EnAd или NG-343 либо оставленных неинфицированными, анализировали экспрессию секретлируемого IFN α с помощью ELISA.

Культуральные супернатанты удаляли из каждой лунки и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин, чтобы удалить обломки клеток. Супернатанты разбавляли в буфере для анализа 5% БСА/ФБР (1:2, или 1:50, или 1:100) и проводили анализ ELISA, применяя набор Verikine Human IFN α (PBL Assay Science), следуя протоколу производителя.

Концентрации секретированного IFN α определяли путем интерполяции стандартных кривых. Экспрессию IFN α , которая возрастала в клеточных супернатантах в процессе инфекции, обнаружили в обеих линиях клеток HT-29 и A549 (фиг. 7В). Экспрессию CD80 на поверхности клеток оценивали с помощью проточной цитометрии.

Линии клеток A549, которые инфицировали в течение 48 или 72 ч 10 вчк EnAd или NG-343 либо оставляли неинфицированными, использовали для анализа экспрессии трансгена CD80 на поверхности клеток. В подходящий момент времени после инфекции клетки A549 удаляли с поверхности планшета путем обработки трипсином, центрифугировали, а затем ресуспендировали в 1% БСА/ФБР. Образцы затем либо инкубировали при 5°C в течение 1 ч с буфером, изотипическим контрольным антителом мыши, конъюгированным с Cy5, или антителом к CD80 человека, конъюгированным с Cy5 (клон 2D10). Все образцы также одновременно окрашивали красителем Zombie Aqua для выявления живых/мертвых клеток, чтобы различить жизнеспособные клетки. Образцы промывали трижды в 1% БСА/ФБР перед проведением анализа с помощью проточной цитометрии (FACS, Attune) для выявления жизнеспособных клеток и экспрессии белка CD80 на поверхности клеток. Анализ экспрессии CD80 параллельно с окрашиванием для определения живых/мертвых клеток показал, что как через 48, так и через 72 ч после инфекции можно было выявить CD80 на поверхности обработанных NG-343 клеток, но не обработанных EnAd или неинфицированных контрольных (НОК) клеток (фиг. 8).

Жизнеспособность клеток через 72 ч после обработки вирусом была недостаточной для осуществления исчерпывающего анализа экспрессии CD80, тем не менее, высокие уровни CD80 можно было обнаружить как на живых, так и на умирающих клетках, обработанных NG-343, в данный момент времени (фиг. 8D, нижняя панель).

Затем сравнивали экспрессию белка CD80 в клетках HT-29 и A549 через 48 ч после инфекции 100 вчк. Образцы собирали и окрашивали, как описано выше, перед проведением анализа жизнеспособности клеток и экспрессии белка CD80 на поверхности клеток. Анализ экспрессии CD80 в данный момент времени только на клетках, окрашенных как живые клетки, показал, что CD80 можно было обнаружить на поверхности ~91% обработанных NG-343 клеток HT-29 и ~98% обработанных NG-343 клеток A549, но не на обработанных EnAd контролях.

Пример 9. Селективность активности вируса NG-343 и экспрессия трансгена в линиях клеток карциномы, фибробластов стромы и эпителия.

Для того, чтобы показать, что трансгены IFN α и CD80, кодируемые в вирусе NG-343, селективно экспрессируются только в клетках, которые позволяют инфицирование NG-343 или EnAd, репликацию вируса (которую оценивали с помощью количественной ПЦР), экспрессию IFN α (которую оценивали с помощью ELISA) и экспрессию CD80 (которую оценивали с помощью проточной цитометрии) измеряли в раковых клетках (HT-29), которые, как известно, позволяют инфицирование EnAd, линиях клеток фибробластов (WI-38 и MRC-5), которые ранее были описаны как не позволяющие инфицирование, и в линии клеток эпителия бронхов (BE), которая, как было показано, лишь ограниченно позволяет инфицирование EnAd. Вкратце, клетки высевали в 12-луночные планшеты и инфицировали через 18 часов после высевания 100 вчк вируса NG-343 или EnAd для клеток WI38, MRC5 или BE или 10 вчк вируса NG-343 или EnAd для клеток HT-29. Клетки инкубировали с вирусными частицами в течение 4 часов перед удалением из клеток инфекционных сред и их заменой на свежую культуральную среду. Через 1 ч или 72 ч после 4-часового периода инфицирования супернатанты клеток собирали для анализа с помощью количественной ПЦР или ELISA и клетки обрабатывали трипсином, чтобы удалить их с планшетов для анализа с помощью проточной цитометрии.

Селективная репликация вирусов NG-343 и EnAd.

Для проведения количественной ПЦР супернатанты клеток собирали и осветляли путем центрифугирования в течение 5 мин, 1200 об/мин. ДНК выделяли из 10 мкл супернатанта, применяя набор для выделения ДНК Genelute от Sigma, следуя протоколу производителя. Также получали стандартную кривую, используя вирусные частицы EnAd (от $2,5 \times 10^{10}$ до $2,5 \times 10^5$ вч), и выделяли их, применяя набор Genelute от Sigma. Каждый выделенный образец или стандарт анализировали с помощью количественной ПЦР, применяя набор праймер-зонд, специфичный к гену E3 EnAd.

Результаты анализа количества обнаруженных геномов вируса на клетку продемонстрировали, что

репликация вирусов NG-343 и EnAd была сравнимой во всех проанализированных линиях клеток (фиг. 9А).

Селективная экспрессия трансгена в NG-343.

Для обнаружения экспрессии IFN α супернатанты клеток собирали и осветляли путем центрифугирования в течение 5 мин, 1200 об/мин. Супернатанты разбавляли в буфере для анализа 5% БСА/ФБР (1:2, или 1:50, или 1:100) и проводили анализ ELISA, применяя набор Verikine Human IFN alpha (PBL Assay Science), следуя протоколу производителя.

Концентрации секретированного IFN α определяли путем интерполяции стандартной кривой. Экспрессию IFN α можно было обнаружить только в супернатантах инфицированных NG-343 клеток HT-29 и невозможно было обнаружить (меньше, чем нижний предел количественного обнаружения [$<LLOQ$]) ни в линиях клеток фибробластов, ни в линии клеток эпителия бронхов (фиг. 9В).

Для определения экспрессии CD80 на поверхности клеток, клетки затем инкубировали при 5°C в течение 1 ч либо с буфером, либо с изотипическим контрольным антителом мыши, конъюгированным с Cy5, либо с антителом к CD80 человека, конъюгированным с Cy5 (клон 2D10). Все образцы также одновременно окрашивали красителем Zombie Aqua для выявления живых/мертвых клеток, чтобы различить жизнеспособные клетки. Образцы промывали трижды в 1% БСА/ФБР перед проведением анализа с помощью проточной цитометрии (FACS, Attune) для выявления жизнеспособных клеток и экспрессии белка CD80 на поверхности клеток. Аналогично результатам экспрессии IFN α , экспрессию CD80 можно было обнаружить только на клетках HT-29, при этом экспрессию невозможно было обнаружить ни на линии клеток фибробластов, ни на линии клеток эпителия бронхов (фиг. 9С).

В совокупности полученные результаты продемонстрировали, что оба трансгена IFN α и CD80 селективно экспрессируются в клетках, которые позволяют инфицирование вирусом EnAd, т.е. клетках карциномы, и кодирование трансгенов не изменяет селективность вируса NG-343 при сравнении с исходным вирусом EnAd.

Пример 10. Влияние экспрессии трансгена с NG-343 на активацию иммунных клеток.

Для того, чтобы определить, может ли обработка клеток опухоли вирусом NG-343 приводить к усилению врожденного иммунного ответа клеток по сравнению с отсутствием обработки или с обработкой EnAd, свежeweделенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) совместно культивировали с опухолевыми клетками либо инфицированными NG-343 или EnAd, либо оставленными неинфицированными. Активацию иммунных клеток оценивали с помощью анализа методом проточной цитометрии популяций клеток врожденного иммунитета или анализа методом ELISA супернатантов, полученных при совместном культивировании. Вкратце, клетки карциномы легкого A549 высевали в 12-луночные планшеты при плотности, равной 4×10^5 клеток/лунку. Через 20 ч клетки инфицировали 10 вчк вируса EnAd или вируса NG-343, либо оставляли неинфицированными, а затем инкубировали в течение 24 ч при 37°, 5% CO $_2$. Затем PBMC, выделенные из здорового донора-человека путем центрифугирования в градиенте плотности, добавляли в лунки с культурой A549 при соотношении 5 PBMC на 1 клетку A549. Через 48 ч после добавления PBMC в совместную культуру, собирали супернатанты из планшетов. Для анализа активации дендритных клеток на данном этапе клетки инкубировали при 5°C в течение 1 ч с буфером, антителами мыши изотипического контроля, конъюгированными с Alexa Fluor 488, PE, PerCP/Cy5.5, BV605 или BV412, антителом к CD14, конъюгированным с Alexa Fluor 488, антителом к CD80, конъюгированным с PE, антителом к HLA-DR, конъюгированным с PerCP/Cy5.5, антителом к CD3, конъюгированным с BV605, или антителом к PD-L1, конъюгированным с BV421. Все образцы также одновременно окрашивали красителем Zombie Aqua для выявления живых/мертвых клеток, чтобы различить жизнеспособные клетки. Образцы промывали трижды в 1% БСА/ФБР перед проведением анализа с помощью проточной цитометрии (FACS, Attune). Жизнеспособные клетки, окрашивание которых было отрицательным как по CD14, так и по CD3, но положительным по HLA-DR, идентифицировали как популяцию дендритных клеток (ДК). Экспрессию маркеров активации ДК, CD80 и PD-L1 сравнивали в данной популяции (фиг. 10). Результаты проведенных анализов выявили, что опухолевые клетки, инфицированные NG-343, могут вызывать повышенные уровни экспрессии как CD80, так и PD-L1 на поверхности дендритных клеток по сравнению с инфицированной EnAd или неинфицированной культурой клеток опухоли.

Пример 11. Активность вируса EnAd - NG-347, экспрессирующего три трансгена: активирующий Т-клетки антиген CD80, хемокин MIP1 α и цитокин IFN α .

Характеристика активности вируса NG-347 по сравнению с EnAd в линиях клеток карциномы.

Экспрессию трансгена CD80 (которую оценивали с помощью проточной цитометрии) и экспрессию трансгена IFN α или MIP1 α (CCL3) (которую оценивали с помощью ELISA) сравнивали в обработанной NG-347 и EnAd линии клеток карциномы толстого кишечника, HT-29 или линии клеток карциномы легкого A549. NG-347 представляет собой вирус, полученный из EnAd, который содержит кассету трансгенов, кодирующую активирующий Т-клетки антиген человека CD80, цитокин человека интерферон альфа 2b и хемокин человека MIP1 α (изоформу LD78 β). Экспрессия трансгена находится под контролем эндогенного главного позднего промотора вируса. Схематическое изображение встроенной кассеты показано

на фиг. 3F. Получение вируса NG-347 подробно описано в примере 6. Линии клеток карциномы A549 или HT-29 высевали в 12-луночные планшеты при плотности $7,5 \times 10^5$ клеток/луночку для клеток A549 или $1,4 \times 10^6$ клеток/луночку для клеток HT-29. Планшеты инкубировали в течение 18 часов при 37°C и 5% CO₂ перед тем, как клетки инфицировали 100 вирусными частицами на клетку (вчк) либо EnAd, либо NG-347, либо оставляли неинфицированными. Анализы проводили через 24, 48 или 72 ч после инфекции.

Анализ экспрессии IFN α или MIP1 α с помощью ELISA.

В супернатантах линий клеток HT-29 или A549, инфицированных в течение 24, 48 или 72 ч 100 вчк EnAd или NG-347, либо оставленных неинфицированными анализировали экспрессию секретируемого IFN α или секретируемого MIP1 α с помощью ELISA.

Культуральные супернатанты получали, следуя способом, подробно описанным в примере 9. Проводили анализ IFN α методом ELISA, применяя набор Verikine Human IFN alpha (PBL Assay Science), и проводили анализ MIP1 α методом ELISA, применяя набор Human CCL3 Quantikine ELISA (R & D Systems). Оба анализа проводили, следуя протоколу производителя.

Концентрации секретируемых IFN α или MIP α определяли путем интерполяции стандартных кривых. Экспрессия IFN α и MIP1 α повышалась в клеточных супернатантах в процессе инфекции и была выявлена для обеих линий клеток HT-29 и A549 (фиг. 11A и фиг. 11B).

Анализ экспрессии CD80 с помощью проточной цитометрии.

Сравнивали экспрессию белка CD80 на поверхности клеток HT-29 и A549 через 48 ч после инфекции. Клетки собирали и окрашивали согласно способам, подробно описанным в примере 9. Клетки анализировали для выявления жизнеспособных клеток и экспрессии белка CD80 на поверхности клеток с помощью проточной цитометрии. Анализ экспрессии CD80 в данный момент времени на живых клетках показал, что CD80 можно было обнаружить на поверхности ~96% обработанных NG-347 клеток HT-29 и ~99% обработанных NG-347 клеток A549, но окрашивание не обнаруживалось на обработанных EnAd контролях (фиг. 11C).

Пример 12. Активность вируса EnAd - NG-345, экспрессирующего три трансгена: лиганд цитокина Flt3, хемокин Mip1 α и цитокин IFN α .

Характеристика активности вируса NG-345 по сравнению с EnAd в линиях клеток карциномы.

Экспрессию трансгенов лиганда Flt3, IFN α и MIP1 α (которую оценивали с помощью ELISA) сравнивали в обработанной NG-345 и EnAd линии клеток карциномы толстого кишечника, HT-29 или линии клеток карциномы легкого A549. NG-345 представляет собой вирус, полученный из EnAd, который содержит кассету трансгенов, кодирующую растворимый вариант лиганда Flt-3 человека, цитокин человека интерферон альфа 2b и хемокин человека MIP1 α (изоформу LD78 β). Экспрессия трансгена находится под контролем эндогенного главного позднего промотора вируса. Схематическое изображение встроеной кассеты показано на фиг. 3D. Получение вируса NG-345 подробно описано в примере 4. Линии клеток карциномы A549 или HT-29 высевали в 12-луночные планшеты при плотности $7,5 \times 10^5$ клеток/луночку для клеток A549 или $1,4 \times 10^6$ клеток/луночку для клеток HT-29. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 5% CO₂ перед тем, как клетки инфицировали 100 вирусными частицами на клетку (вчк) либо EnAd, либо NG-345, либо оставляли неинфицированными. Анализы проводили через 24, 48 или 72 ч после инфекции.

Анализ экспрессии лиганда FLt-3, IFN α или MIP1 α с помощью ELISA.

В супернатантах линий клеток HT-29 или A549, инфицированных в течение 24, 48 или 72 ч 100 вчк EnAd или NG-345, либо оставленных неинфицированными, анализировали экспрессию секретируемого лиганда FLt-3, секретируемого IFN α или секретируемого MIP1 α с помощью ELISA.

Культуральные супернатанты получали, следуя способом, подробно описанным в примере 9. Проводили анализ ELISA IFN α , применяя набор Verikine Human IFN alpha (PBL Assay Science), проводили анализ ELISA MIP1 α , применяя набор Human CCL3 Quantikine ELISA (R & D Systems) и проводили анализ ELISA Flt3L, применяя набор Flt3L Human ELISA (Abcam). Все анализы проводили, следуя протоколу производителя. Концентрации секретируемых IFN α , MIP α или FLt3L определяли путем интерполяции стандартных кривых. Экспрессия IFN α , MIP1 α и Flt3L повышалась в клеточных супернатантах в процессе инфекции и обнаруживалась в обеих линиях клеток HT-29 и A549 (фиг. 12A-C).

Пример 13. Онколитическая активность и инфекционная способность вирусов NG-347 и NG-348 в клетках карциномы толстого кишечника.

Онколитическая эффективность вируса.

Клетки карциномы толстого кишечника HT-29 высевали в 96-луночные планшеты при плотности клеток, равной $2,5 \times 10^4$ клеток/луночку. Планшеты инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO₂ перед тем, как клетки инфицировали вирусными частицами либо EnAd, либо NG-347, либо NG-348 в диапазоне плотности инфицирования, составляющем 100 - 0,39 частиц на клетку (вчк). Жизнеспособность клеток HT-29 оценивали, применяя реагент CellTitre 96 MTS (Promega: G3581), через 72 ч после инфицирования. Количественный анализ % выживаемости клеток при каждой плотности инфицирования продемонстрировал, что онколитическая эффективность NG-347 и NG-348 была сравнимой с таковой у EnAd (фиг. 13A).

и 13B).

Инфекционная способность вирусных частиц.

Клетки карциномы толстого кишечника HT-29 высевали в 12-луночные планшеты при плотности клеток, равной 4×10^5 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂ перед тем, как клетки инфицировали вирусными частицами либо EnAd, либо NG-347, либо NG-348 в диапазоне плотности инфицирования, составляющем $1,6 \times 10^7$ – 2×10^6 в.ч./мл. Инфицирование клеток HT-29 обнаруживали по окрашиванию антителом к белку вируса гексону. Проводили количественный анализ окрашенных клеток путем подсчета вручную 6 полей зрения на лунку, параллельно в 6 повторных лунках для каждого исследуемого разведения. Отношение частиц к инфекционной способности (P:I) рассчитывали для каждого вируса из титра вируса и продемонстрировали, что у обоих вирусов NG-347 и NG-348 отношения инфекционной способности были сходны с эталонными контролями EnAd (фиг. 13C).

Пример 14. Экспрессия активирующего Т-клетки антигена CD80 на поверхности инфицированных NG-347 и NG-348 линий клеток карциномы.

Экспрессию трансгена CD80 (которую оценивали с помощью проточной цитометрии) сравнивали в обработанной NG-347, NG-348 и EnAd линии клеток карциномы толстого кишечника DLD-1 или линии клеток карциномы легкого A549. Линии клеток карциномы A549 или DLD-1 высевали в 12-луночные планшеты при плотности $7,5 \times 10^5$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 5% CO₂ перед тем, как клетки либо инфицировали 10 вирусными частицами на клетку (вчк) EnAd, NG-348 или NG-347, либо оставляли неинфицированными. Экспрессию белка CD80 сравнивали на поверхности клеток A549 или DLD-1 через 24, 48, 72 или 96 ч после инфекции. В каждый момент времени клетки собирали и окрашивали, следуя способам, подробно описанным в примере 9. Клетки анализировали для выявления жизнеспособных клеток и экспрессии белка CD80 на поверхности клеток с помощью проточной цитометрии. Анализ экспрессии CD80 через 72 ч после инфекции в клетках A549 показал, что CD80 можно было обнаружить на поверхности >95% обработанных NG-347 или NG-348 клеток (фиг. 14A и 14B). Через 96 ч после инфекции обработка вирусом приводила к лизису большинства клеток A549, поэтому анализ FACS не проводили. Для клеток DLD-1 экспрессию можно было обнаружить на >50% клеток через 96 часов после обработки NG-348 и на >70% клеток после обработки NG-347 (фиг. 15A и 15B). Окрашивание не обнаружили на обработанных EnAd или необработанных контролях.

Пример 15. Активация и дегрануляция Т-клеток, опосредованная инфицированными NG-348 линиями клеток карциномы.

Клетки карциномы легкого A549, либо инфицированные вирусными частицами NG-348 или EnAd, либо оставленные неинфицированными, совместно культивировали с Т-клетками, выделенными из людей-доноров PBMC. Селективность экспрессии CD80, кодируемого вирусом NG-348, оценивали на поверхности обеих клеток A549 и Т-клеток с помощью проточной цитометрии. Активацию Т-клеток оценивали путем анализа поверхностных маркеров активации клеток (с помощью проточной цитометрии), экспрессии на поверхности клетки CD107a как маркера дегрануляции (с помощью проточной цитометрии) и секреции стимулирующих цитокинов IL-2 и IFN γ (с помощью ELISA).

Клетки A549 высевали в 12-луночные планшеты при плотности, равной 5×10^5 клеток/лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 5% CO₂ перед тем, как клетки либо инфицировали 10 вирусными частицами на клетку (вчк) EnAd или NG-348, либо оставляли неинфицированными. Через 48 ч после инфекции CD3⁺ Т-клетки, выделенные путем негативной селекции из PBMC (MACS), добавляли к монослоям клеток A549 при соотношении, равном 8 Т-клеток на 1 клетку опухоли. Совместное культивирование проводили в течение 16 часов, после чего собирали клеточные супернатанты для анализа ELISA и собирали опухолевые клетки и Т-клетки для анализа методом проточной цитометрии.

Культуральную среду, содержащую неадгерентные клетки, удаляли из лунок совместного культивирования и центрифугировали (300×g). Супернатант аккуратно удаляли, разбавляли 1 к 2 в ФБР с 5% БСА и хранили для анализа ELISA. Монослой адгерентных клеток однократно промывали ФБР, а затем отсоединяли, применяя трипсин. Трипсин инактивировали, используя полную среду, и полученные клетки добавляли к осадкам клеток, которые были собраны из культуральных супернатантов. Клетки центрифугировали (300×g), супернатант отбрасывали и осадок клеток промывали 200 мкл ФБР. Клетки снова центрифугировали, затем ресуспендировали в 50 мкл буфера для FACS (5% БСА/ФБР), содержащего краситель для выявления живых/мертвых клеток Aqua (Life tech), в течение 15 минут при комнатной температуре. Клетки однократно промывали в буфере для FACS перед окрашиванием панелями напрямую конъюгированных антител: антитела к CD3, конъюгированного с BV605; антитела к CD25, конъюгированного с BV421; антитела к CD107a, конъюгированного с FITC; антитела к Epcam, конъюгированного с PE, или антитела к CD4, конъюгированного с PE; и либо антитела к CD80, конъюгированного с PE/Cy5, либо антитела к HLA-DR, конъюгированного с PE/Cy5. Образец клеток из каждого условия совместного культивирования также окрашивали соответствующими антителами изотипического контроля. Все окрашивания проводили в буфере для FACS в общем объеме 50 мкл/лунку в течение 15 мин при 4°C. Клетки затем промывали буфером для FACS (200 мкл) перед ресуспендированием в 200 мкл буфера для FACS и анализом с помощью проточной цитометрии (Attune).

Селективная экспрессия CD80.

Аналогично результатам, показанным в примере 14, экспрессия CD80 обнаруживалась на поверхности >80% инфицированных NG-348 клеток EpCam⁺ A549, но не инфицированных EnAd или неинфицированных контрольных клеток (фиг. 16). Напротив, на поверхности CD3⁺ Т-клеток не обнаружили экспрессию CD80, что указывает на то, что по меньшей мере при данных условиях эксперимента, экспрессия трансгена селективна для опухолевых клеток в совместной культуре.

Повышенная экспрессия маркеров активации Т-клеток.

Анализ методом проточной цитометрии активации Т-клеток оценивали по экспрессии маркеров активации Т-клеток CD25 и HLA-DR на живых CD3⁺ отдельных клетках. Полученные результаты показали, что как количество Т-клеток, экспрессирующих CD25 (фиг. 17A и 17B), так и средний уровень экспрессии CD25 на поверхности Т-клеток (фиг. 17C) были значительно выше для Т-клеток, культивированных с инфицированными NG-348 клетками A549, чем с инфицированными EnAd или неинфицированными контролями. В частности, не наблюдали различия в статусе активации Т-клеток при сравнении необработанных контролей с обработкой EnAd (26,9%±3,4% и 25,3±3,5% Т-клеток, экспрессирующих CD25, соответственно), тогда как экспрессия CD25 была повышена на большинстве клеток, совместно культивированных с NG-348 (83,2±1,5%). Экспрессию CD25 также анализировали на субпопуляциях CD4⁺ и CD8 Т-клеток путем выделения среди CD3⁺ Т-клеток популяции, экспрессирующей CD4. Данные анализы показали, что экспрессия CD25 значительно повышена на обеих субпопуляциях CD4⁺ и CD4⁻ Т-клеток в обработанных NG-348 совместных культурах по сравнению с инфицированными EnAd и неинфицированными контролями (фиг. 18).

В противоположность CD25, количество клеток, экспрессирующих HLA-DR, было низким, <5%, при всех исследованных условиях (фиг. 19A). Вероятно, причиной этого был ранний момент времени после совместного культивирования, в который проводили анализ методом проточной цитометрии. Тем не менее, наблюдалось небольшое, но значимое повышение средней интенсивности флуоресценции окрашенных на HLA-DR CD3⁺HLA-DR⁺ клеток из обработанных NG-348 совместных культур по сравнению с контролями (фиг. 19B).

Стимуляция дегрануляции Т-клеток.

Анализ экспрессии CD107a на поверхности живых CD3⁺ Т-клеток показал значимое увеличение количества Т-клеток, которые дегранулировались и, следовательно, окрасились CD107a, когда клетки A549 инфицировали NG-348 (8,3%±1,7% клеток) по сравнению либо с обработанными EnAd (0,6%±0,2% клеток), либо с необработанными контролями (0,1% ±0,02% клеток) (фиг. 20). Аналогично повышенной экспрессии CD25, обе субпопуляции CD4⁺ и CD4⁻ Т-клеток проявили значительно повышенную экспрессию CD107a по сравнению с контролями EnAd или A549 (фиг. 21). Секретия стимулирующих цитокинов IL-2 и IFN γ

Для обнаружения экспрессии IL-2 или IFN γ супернатанты, полученные в результате совместного культивирования, разбавляли в буфере для анализа 5% БСА/ФБР (в диапазоне от 1:100 до 1:1000) и проводили анализ ELISA, применяя набор Human IL-2 Ready Set go (Affymetrix) или набор Human IFN gamma Ready set go (Affymetrix), следуя протоколу производителя.

Концентрации секретируемых IL-2 или IFN γ определяли путем интерполяции стандартных кривых. Экспрессию IL-2 можно было обнаружить только в супернатантах из совместных культур с инфицированными NG-348 клетками A549, и она не детектировалась ни в обработанных EnAd, ни в необработанных контролях (фиг. 22A). Экспрессию IFN γ можно было обнаружить на очень высоких уровнях (> 300 нг/мл) в супернатантах из совместных культур с инфицированными NG-348 клетками A549, и она была значительно выше, чем таковая в обработанных EnAd или необработанных контролях (фиг. 22B). Пример 16. Активацию CD4⁺ и CD8 Т-клеток могут независимо опосредовать инфицированные NG-348 линии клеток карциномы.

Клетки карциномы легкого A549, инфицированные вирусными частицами NG-348 или EnAd, либо оставленные неинфицированными, совместно культивировали либо с CD4⁺ Т-клетками, либо с CD8⁺ Т-клетками, выделенными из людей-доноров PBMC. Активацию Т-клеток оценивали по секреции стимулирующего цитокина IFN γ в культуральные супернатанты.

Клетки A549 высевали и инфицировали вирусными частицами NG-348 или EnAd, либо оставляли неинфицированными согласно способам, подробно описанным в примере 14. Через 48 ч после инфекции CD4⁺ Т-клетки или CD8⁺ Т-клетки, выделенные путем негативной селекции из донора PBMC, добавляли к монослою клеток A549 при соотношении, равном 8 Т-клеток на 1 опухолевую клетку. Через 16 ч собирали супернатанты, полученные при совместном культивировании, и оценивали в них IFN γ согласно способам, подробно описанным в примере 14.

Для CD4⁺ Т-клеток экспрессию IFN γ обнаружили только в супернатантах из совместных культур с инфицированными NG-348 клетками A549 и не обнаружили ни в обработанных EnAd, ни в необработанных контролях (фиг. 23A). Для CD8⁺ Т-клеток экспрессию IFN γ обнаружили на значительно более высоких уровнях для инфицированных NG-348 клеток A549, чем для обработанных EnAd или необработанных контролей (фиг. 23B), демонстрируя, что обе субпопуляции клеток CD8 и CD4 можно активировать,

чтобы они секретировали IFN γ , с помощью активности вируса NG-348 в линиях опухолевых клеток.

Пример 17. Активация Т-клеток, опосредованная инфицированными NG-347 линиями клеток карциномы.

Клетки карциномы легкого A549, либо инфицированные вирусными частицами NG-347 или EnAd, либо оставленные неинфицированными, совместно культивировали с Т-клетками, выделенными из людей-доноров PBMC. Активацию Т-клеток оценивали путем анализа поверхностных маркеров активации клеток (с помощью проточной цитометрии) и секреции стимулирующего цитокина IFN γ (с помощью анализ ELISA клеточных супернатантов).

Клетки A549 высевали в 12-луночные планшеты при плотности, равной 5×10^5 клеток/луночку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 5% CO $_2$ перед тем, как клетки либо инфицировали 10 вирусными частицами на клетку (вчк) EnAd или NG-347, либо оставляли неинфицированными. Через 24 ч после инфекции CD3 $^+$ Т-клетки, выделенные путем негативной селекции из PBMC (MACS), добавляли к монослоям клеток A549 при соотношении, равном 5 Т-клеток на 1 клетку опухоли. Совместное культивирование проводили в течение 48 ч перед тем, как собирали клеточные супернатанты для анализа ELISA и собирали опухолевые клетки и Т-клетки для анализа методом проточной цитометрии, согласно способам, подробно описанным в примере 15.

Собранные клетки окрашивали конъюгированными напрямую антителами: антителом к CD3, конъюгированным с BV605, и антителом к CD69, конъюгированным с BV421. Образец клеток из каждого условия совместного культивирования также окрашивали контрольными антителами соответствующего изотипа. Все окрашивания проводили в буфере для FACS в общем объеме 50 мкл/луночку в течение 15 минут при 4°C. Клетки затем промывали буфером для FACS (200 мкл) перед ресуспендированием в 200 мкл буфера для FACS и анализом с помощью проточной цитометрии (Attune).

Повышенная экспрессия маркера активации Т-клеток CD69.

Анализ методом проточной цитометрии активации Т-клеток оценивали по экспрессии маркера активации Т-клеток CD69 на живых CD3 $^+$ отдельных клетках. Полученные результаты показали, что количество Т-клеток, экспрессирующих CD69, было значительно выше для Т-клеток, культивированных с инфицированными NG-347 клетками A549, чем с инфицированными EnAd или неинфицированными контролями (фиг. 24).

Секреция стимулирующего цитокина IFN γ .

Для обнаружения экспрессии IL-2 или IFN γ супернатанты из совместных культур разбавляли в буфере для анализа 5% БСА/ФБР (в диапазоне от 1:100 до 1:1000) и проводили анализ ELISA, применяя набор Human IFN gamma Ready set go (Affymetrix), следуя протоколу производителя.

Концентрации секретированного IFN γ определяли путем интерполяции стандартной кривой. Экспрессию IFN γ можно было обнаружить только в супернатантах из совместных культур, применяя инфицированные NG-347 клетки A549, и она не обнаруживалась ни в обработанных EnAd, ни в необработанных контролях (фиг. 25).

Пример 18. Получение вирусов EnAd, экспрессирующих активирующий Т-клетки антиген CD80 и заякоренный в мембрану одноцепочечный фрагмент Fv антитела к цепи ϵ комплекса CD3 человека (CD3 ϵ).

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмиды pNG-348A путем вставки напрямую кассеты, кодирующей активирующий Т-клетки антиген CD80 человека (SEQ ID NO: 11) и заякоренную в мембрану химерную форму одноцепочечного Fv к CD3 ϵ человека с С-концевой меткой V5 (SEQ ID NO: 99). Кассета pNG-348 содержала: короткую последовательность акцептора сплайсинга на 5'-конце (SEQ ID NO: 2); кДНК заякоренного в мембрану scFv к CD3 ϵ человека; С-концевую метку V5 (SEQ ID NO: 100); последовательность самоотщепляющегося с высокой эффективностью пептида P2A (SEQ ID NO: 7); последовательность кДНК CD80 человека и последовательность полиаденилирования на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Схематическое изображение кассет трансгенов NG-348A показано на фиг. 26А. Конструкцию плазмиды подтверждали путем секвенирования ДНК.

Получение и характеристика вируса.

Плазмиду pNG-348A линейаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом AscI с получением генома вируса NG-348A (SEQ ID NO: 101). Вирус NG-348A амплифицировали и очищали согласно способам, подробно описанным в примере 1.

Пример 19. Получение вирусов EnAd, экспрессирующих заякоренный в мембрану одноцепочечный фрагмент Fv антитела к цепи ϵ комплекса CD3 человека (CD3 ϵ s).

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмид pNG-420 и pNG-420A путем вставки напрямую кассет, кодирующих заякоренную в мембрану химерную форму одноцепочечного Fv к CD3 ϵ человека с С-концевой меткой V5 (SEQ ID NO: 99) или без метки V5 (SEQ ID NO: 15). Кассета pNG-420 содержала: короткую последовательность акцептора сплайсинга CAGG на 5'-конце; кДНК заякоренного в мембрану scFv к CD3 ϵ человека и последовательность полиаденилирования на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Кассета pNG-420A содержала: короткую последовательность акцептора сплайсинга CAGG на 5'-конце; кДНК заякоренного в мембрану scFv к CD3 ϵ человека; С-концевую метку V5 (SEQ ID NO: 100) и

последовательность полиаденилирования на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Схематические изображения кас-сет трансенов NG-420 и NG-420A показаны на фиг. 26B и 26C. Конструкцию каждой плазмиды подтверждали путем секвенирования ДНК.

Получение и характеристика вируса.

Плазмиды pNG-420 и pNG-420A линейаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом *AscI* с получением геномов вирусов NG-420 (SEQ ID NO: 102) и NG-420A (SEQ ID NO: 103). Указанные вирусы NG-420 и NG-420A амплифицировали и очищали согласно способам, подробно описанным в примере 1.

Пример 20.

Клетки карциномы легкого человека A549 и клетки фибробластов человека MRC5 культивировали с вирусами EnAd, NG-347 или NG-348 (10 вчк), чтобы сравнить репликацию геномов вирусов, экспрессию гексона и трансгена с вирусов в данных типах клеток. После 72 ч культивирования либо окрашивали клетки для анализов FACS поверхностных маркеров, либо получали супернатанты и лизаты клеток для анализов репликации генома вируса (кПЦР) или экспрессии мРНК (ОТ-кПЦР) гексона или трансгена.

Репликация генома вируса и экспрессия мРНК гексона для указанных двух несущих трансгены вирусов NG-347 и NG-348 были эквивалентны таковым для исходного вируса EnAd (фиг. 27). Для NG-348 (фиг. 28) уровни экспрессии трансгенной мРНК CD80 и scFv к CD3 человека были высокими для опухолевых клеток A549, при этом низкий уровень сигнала наблюдали только для неопухолевых клеток MRC5. Экспрессию белка CD80 на поверхности клеток, которую оценивали с помощью FACS, обнаружили на большинстве обработанных NG-348 клеток A549, но не обнаружили на клетках MRC5, при этом не обнаружили CD80 на любом типе клеток, оставленном необработанным или обработанном EnAd. Аналогично, экспрессию мРНК и белка трансгена CD80 после обработки NG-347 селективно обнаружили в опухолевых клетках A549, но не в клетках MRC5 (фиг. 29).

Для культур клеток, обработанных EnAd и NG-347, уровни мРНК MIP1 α и IFN α в лизатах клеток и секретируемых белков в супернатантах измеряли с помощью ОТ-кПЦР и специфичных ELISA, соответственно. Результаты (фиг. 30) показали селективную экспрессию обоих трансенов опухолевыми клетками A549, при этом хемокин MIP1 α или цитокин IFN α не обнаружили в супернатантах клеток MRC5.

Пример 21.

Селективность/активность вирусов EnAd, NG-347 и NG-348 в отношении Т-клеток человека оценивали путем культивирования изолированных CD3⁺ Т-клеток в течение 3 дней с 500 вчк либо с 5000 вчк каждого вируса. Селективность/активность оценивали с помощью а) анализа методом проточной цитометрии Т-клеток, окрашенных антителами, нацеленными на CD69, CD4, CD80, CD25 и CD3, б) анализа методом ELISA секреции белков MIP1 α , IFN α и IFN γ человека, с) анализа методом количественной ПЦР репликации вируса и d) анализа методом ОТ-кПЦР экспрессии генов.

На фиг. 31 показано, что Т-клетки не поддерживали репликацию генома любого из исследованных вирусов, наблюдали лишь фоновые сигналы в анализе ОТ-кПЦР гексона вируса. Опухолевые клетки A549 поддерживали высокие уровни экспрессии мРНК гексона. Анализы ОТ-кПЦР экспрессии трансгенной мРНК Т-клетками выявили только фоновые сигналы (<1 копии/клетку) для CD80 с обоих вирусов NG-347 и NG-348, и аналогичное отсутствие значительной экспрессии мРНК scFv к CD3 с вируса NG-348, несмотря на воздействие большим количеством вируса (5000 вчк). Высокие уровни экспрессии обоих трансенов обнаружили для обработанных вирусом (10 вчк) опухолевых клеток A549 (фиг. 32 и 33). Экспрессию трансгенной мРНК IFN α и MIP1 α также селективно обнаружили для обработанных вирусом NG-347 (не EnAd) опухолевых клеток A549 (10 вчк), но не Т-клеток, обработанных 5000 вчк (фиг. 34). Кроме того, экспрессию белка CD80 на поверхности клеток обнаруживали только для клеток A549, но не для Т-клеток с обоими NG-347 и NG-348 (фиг. 32 и 33). Обработка EnAd не приводила к экспрессии CD80 ни одним из указанных типов клеток, и гибель клеток A549 (которую оценивали по поглощению красителя) была сходно высокой для всех трех вирусов; низкий уровень неспецифической гибели Т-клеток был вызван всеми вирусами вследствие очень высоких уровней вирусных частиц, используемых в данном эксперименте (фиг. 32 и 33). Аналогичные результаты экспрессии мРНК и белка трансгена были получены, когда вирусы использовали в количестве 500 вчк (результаты не представлены).

В отсутствие клеток опухоли очищенные Т-клетки человека не активировались для повышения экспрессии маркеров активации CD25 или CD69 при культивировании с любым из указанных вирусов (табл. 5).

Таблица 5. Отсутствие экспрессии маркеров активации CD25 и CD69 очищенными CD3⁺ Т-клетками человека, обработанными 5000 вчк различных вирусов

| | Необработанные | EnAd | NG-347 | NG-348 |
|--------------------------------|----------------|------|--------|--------|
| CD25 ⁺ CD4 Т-клетки | 30,7 | 24,6 | 23,4 | 23,3 |
| CD69 ⁺ CD4 Т-клетки | 0,1 | 0,4 | 0,3 | 0,7 |
| CD25 ⁺ CD8 Т-клетки | 5,9 | 4,7 | 4,1 | 4,1 |
| CD69 ⁺ CD8 Т-клетки | 0,5 | 1,0 | 0,9 | 1,3 |

Пример 22.

Проводили эксперимент по определению селективности вирусов, аналогичный описанному в примере 21, применяя неразделенные PBMC человека вместо очищенных Т-клеток, включая проведение таких же оценок активности. Аналогично результатам, полученным для Т-клеток человека в примере 21, результаты данного исследования в совокупности демонстрируют отсутствие репликации вируса и экспрессии трансгена клетками PBMC человека. На фиг. 35-37 показаны результаты с применением 5000 вчк EnAd, NG-347 или NG-348, но сходные результаты были получены при применении 500 вчк (не представлены). На фиг. 35 показана репликация геномов вирусов и экспрессия мРНК гексона и на фиг. 36 и 37 показана экспрессия трансгенных мРНК. Фоновые уровни для анализов устанавливали в соответствии с сигналами, полученными в данном анализе с соответствующим вирусом, введенным в культуральные среды, а затем обработанным таким же способом, как и образцы лизатов клеток. Не обнаружили экспрессию трансгена CD80 на CD3+ Т-клетках или CD40+ клетках (преимущественно В-клетках) в данных культурах PBMC с любым из указанных вирусов (не представлено).

Опосредованная частицами вируса NG-347 и NG-348 активация клеток врожденного иммунитета (моноцитов, дендритных клеток) в культурах PBMC была аналогична таковой для EnAd, как показано на фиг. 38 и 39 для снижения уровней экспрессии CD14 и повышения уровней экспрессии HLA-DR и эндогенного CD80 на поверхности клеток, а также секреции MIP1 α и IFN α (стоит отметить, что несмотря на то, что NG-347 кодирует обе данные молекулы в своем геноме, не наблюдалось повышение уровней продукции по сравнению с таковыми для EnAd и NG-348, которые не кодируют указанные трансгены).

Пример 23.

Данный пример аналогичен по дизайну экспериментам, описанным в примерах 15-17, 21 и 22, но в данных исследованиях PBMC человека или очищенные Т-клетки совместно культивировали с заранее обработанными вирусом (в течение 48 ч) опухолевыми клетками A549 или фибробластами MRC5. Клетки A549 или MRC5 обрабатывали 10 вчк вируса EnAd, NG-347, NG-348 или оставляли необработанными (НОК) и культивировали в течение 48 ч, чтобы дать время, достаточное для репликации вируса и экспрессии какого-либо трансгена. Затем к культурам добавляли PBMC или Т-клетки и оставляли на 24 или 48 ч, чтобы оценить способность обработанных вирусом клеток активировать Т-клетки.

На фиг. 40 показаны результаты репликации генома вируса, демонстрирующие сравнимую репликацию трех указанных вирусов в совместных культурах PBMC или Т-клеток с обоими типами клеток, уровни репликации были высокими в совместных культурах с опухолевыми клетками A549 и низкими с фибробластами MRC5.

Активация Т-клеток, которую измеряли по повышенной экспрессии CD25 на поверхности клеток, и дегрануляция эффекторных CD8 Т-клеток, которую измеряли по повышенной экспрессии CD107a на поверхности клеток, и продукция IFN γ , которую измеряли по окрашиванию внутриклеточного цитокина, избирательно стимулировались обработанными NG-348 клетками A549 по сравнению с обработанными EnAd, при этом стимуляция не опосредовалась совместным культивированием с MRC (табл. 6).

Таблица 6. Анализы методом проточной цитометрии активации CD3+ Т-клеток человека в совместных культурах Т-клеток и PBMC с вирусами

| Клетки | Обработка | %CD25 ⁺ | %CD8 ⁺ CD107a ⁺ | %IFN γ ⁺ |
|-----------------|----------------|--------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| A549 + Т-клетки | Необработанные | 37,5 | 0,1 | 0,1 |
| A549 + Т-клетки | EnAd | 38,4 | 0,1 | 0,2 |
| A549 + Т-клетки | NG-348 | 88,2 | 17,9 | 12,0 |
| MRC5 + Т-клетки | Необработанные | 38,8 | 0,3 | 0,4 |
| MRC5 + Т-клетки | EnAd | 38,9 | 0,2 | 0,4 |
| MRC5 + Т-клетки | NG-348 | 39,1 | 0,3 | 0,3 |
| A549 + PBMC | Необработанные | 28,3 | н/о | н/о |
| A549 + PBMC | EnAd | 29,4 | н/о | н/о |
| A549 + PBMC | NG-348 | 73,7 | н/о | н/о |
| MRC5 + PBMC | Необработанные | 23,0 | н/о | н/о |
| MRC5 + PBMC | EnAd | 23,3 | н/о | н/о |
| MRC5 + PBMC | NG-348 | 21,7 | н/о | н/о |

н/о = не определили.

Также осуществляли количественный анализ секреции IFN γ в супернатанты совместных культур с помощью ELISA. Полученные результаты (фиг. 41) аналогичным образом демонстрируют селективную активацию Т-клеток, совместно культивированных с обработанными NG-348 опухолевыми клетками A549, но не фибробластами MRC5, при использовании в данных анализах либо очищенных Т-клеток,

либо PBMC.

Способность NG-347 активировать Т-клетки также оценивали путем измерения уровней CD69 на Т-клетках из совместных культур либо очищенных Т-клеток, либо PBMC с опухолевыми клетками A549 или фибробластами MRC5. В табл. 7 показано, что, небольшое увеличение количества CD69-положительных Т-клеток наблюдали при обработке NG-347 опухолевых клеток A549, по сравнению с EnAd, который сам по себе приводит к повышенной экспрессии данного раннего маркера активации. Данные эффекты не наблюдали в совместных культурах MRC5. На Т-клетках не обнаружили экспрессию CD80 (не представлено).

Таблица 7. Экспрессия CD69 на Т-клетках из обработанных NG-347 или EnAd совместных культур

| Клетки | Обработка | %CD69+ |
|-----------------|----------------|-------------|
| A549 + Т-клетки | Необработанные | 2,1 |
| A549 + Т-клетки | EnAd | 18,7 |
| A549 + Т-клетки | NG-348 | 35,0 |
| MRC5 + Т-клетки | Необработанные | 3,8 |
| MRC5 + Т-клетки | EnAd | 3,6 |
| MRC5 + Т-клетки | NG-348 | 4,4 |
| A549 + PBMC | Необработанные | 1,2 |
| A549 + PBMC | EnAd | 19,1 |
| A549 + PBMC | NG-348 | 28,7 |
| MRC5 + PBMC | Необработанные | 2,6 |
| MRC5 + PBMC | EnAd | 2,7 |
| MRC5 + PBMC | NG-348 | 3,9 |

В отдельном эксперименте клетки A549, обработанные NG-347 и совместно культивированные с CD3+ Т-клетками человека, привели к повышенной экспрессии маркера активации CD69 на Т-клетках и секреции IFN γ (см. фиг. 24 и 25).

Пример 24.

CD14+ моноцитарные клетки выделяли из PBMC путем деления на покрытых антителом магнитных гранулах и культивировали с IL-4 и GM-CSF человека, чтобы дифференцировать их в дендритные клетки. После 3 дней культивирования клетки обрабатывали EnAd, NG-347 или NG-348 в количестве 5000 вчк или оставляли необработанными. В качестве положительного контроля активации некоторые клетки стимулировали LPS. Два дня спустя супернатанты брали для анализа цитокинов с помощью ELISA и клетки окрашивали для выявления экспрессии маркера активации на их поверхности и анализировали с помощью проточной цитометрии. В табл. 8 показано, что все вирусы вызывали повышенную экспрессию костимулирующих молекул CD80 и CD86, указывая на то, что данный ранее обнаруженный эффект опосредованной частицами активации клеток врожденного иммунитета не изменялся после внедрения трансгена в геномы NG-347 и NG-348. Все вирусы также стимулировали секрецию MIP1 α и IFN α на сходных уровнях (фиг. 42).

Таблица 8. Опосредованная частицами активация дендритных клеток человека вирусами EnAd, NG-347 и NG-348

| Обработка ДК | % CD80+ | % CD86+ |
|----------------------------|---------|---------|
| Необработанные | 3,0 | 10,4 |
| EnAd | 81,6 | 99,3 |
| NG-347 | 82,1 | 99,4 |
| NG-348 | 62,5 | 99,5 |
| Положительный контроль LPS | 97,5 | 98,5 |

Пример 25.

В серии экспериментов клетки JurkatDual использовали в совместных культурах с опухолевыми клетками в качестве репортера в анализе активации Т-клеток для оценки функциональности экспрессии трансгена вирусами NG-347, NG-348 и NG-420, при этом EnAd служил в качестве отрицательного контроля. Клетки JurkatDual стабильно экспрессируют два различных репортерных гена: репортерный ген NF κ B, продуцирующий секретлируемую форму люциферазы, которая реагирует на передачу сигналов через комплекс Т-клеточного рецептора, и репортерный ген реагирующей на IFN α секретлируемой ще-

лочной фосфатазы (SEAP). Клетки A549 предварительно культивировали с вирусами в количестве 10 вчк в течение двух дней, затем добавляли клетки JurkatDual для совместного культивирования в течение ночи (18-24 ч), а затем собирали супернатанты для анализа активностей люциферазы и SEAP. На фиг. 43 показано, что инфицированные NG-347 клетки A549 избирательно индуцировали продукцию SEAP, что соотносится с продукцией ими $IFN\alpha$ (см. фиг. 11), но не индуцировали активность люциферазы. Напротив, NG-348, который экспрессирует связанный с мембраной scFv к CD3 для активации комплекса Т-клеточного рецептора, индуцировал люциферазу, но не SEAP.

В другом эксперименте клетки карциномы легкого A549 и клетки карциномы толстого кишечника HCT-116, HT-29 и DLD предварительно культивировали в течение 48 ч с 10 вчк вируса EnAd, NG-347, NG-348 или NG-420 перед совместным культивированием с клетками JurkatDual в течение ночи, и исследовали уровни люциферазы в супернатантах, чтобы показать уровень индуцированной активации. На фиг. 44 показано, что все четыре типа опухолевых клеток, культивированных с вирусами NG-348 или NG-420, которые кодируют scFv к CD3 для экспрессии на поверхности клетки, активировали клетки JurkatDual, тогда как EnAd и NG-347 - нет, при этом уровни люциферазы были сходны с таковыми для неинфицированных контролей клеток опухоли (НОК).

В другом эксперименте опухолевые клетки A549 или HT-29 предварительно культивировали с различными количествами либо NG-348, либо NG-420 перед добавлением клеток JurkatDual, и измеряли секрецию ими люциферазы. Результаты, представленные на фиг. 45, показывают, что активация NF κ B в клетках JurkatDual зависит от дозы вируса, используемой для обработки опухолевых клеток.

Пример 26.

Сравнивали фармакокинетику, биораспределение и активности опосредованной частицами системной индукции цитокинов *in vivo* для вирусов EnAd и NG-348 после в/в введения дозы иммунокомпетентным мышам CD1. Мышам вводили внутривенно 5×10^9 частиц либо EnAd, либо NG-348 и брали у них кровь через 2, 10, 30, 60 и 120 минут после введения дозы. Из цельной крови выделяли ДНК и анализировали в ней уровни генома вируса с помощью количественной ПНР (фиг. 46). Кинетика клиренса обоих вирусов из крови была сходной. Аналогично, индукция ответа цитокина MCP-1 (мера опосредованной частицами активации врожденного иммунитета, например, клеток Купфера в печени) также была сходной для обоих вирусов, также, как и паттерны биораспределения в тканях (фиг. 46).

Пример 27.

Мышам CB17 SCID имплантировали подкожно клетки HCT116 и вводили путем инъекции внутрь опухоли (в/о) или внутривенно (в/в) вирусы EnAd, NG-347 или NG-348 (5×10^9 вирусных частиц) или контроль, как только размер опухолей становился больше 70 мм³. Для мышей, которым дозу вводили в/в, образцы крови брали из трех мышей из каждой группы через 3, 15 и 30 мин после в/в введения дозы, выделяли ДНК и оценивали уровень геномов вируса в крови с помощью количественной ПЦР (анализ фармакокинетики [ФК]). Результаты (фиг. 47) показали, что ФК NG-347 и NG-348 была сходна с таковой для EnAd (и друг с другом). Через 6 ч опухоль, печень, легкое и селезенку иссекали из 3 мышей из каждой группы. Из гомогенизированных тканей выделяли ДНК и анализировали уровень геномов вируса с помощью количественной ПЦР (анализ биораспределения). Результаты (фиг. 48А) показали сходное биораспределение в тканях для трех указанных вирусов. Через 7 дней или 14-21 день опухоли иссекали из трех мышей из каждой группы и гомогенизовали для получения лизата опухоли, который использовали для получения как ДНК, так и РНК. Уровень геномов вируса в опухолях в указанные два момента времени измеряли с помощью анализа выделенной ДНК методом количественной ПЦР. Результаты (фиг. 48В) показали, что опухоли из мышей, которым вводили дозы как в/в, так и в/о, содержали более высокие уровни геномов вируса, чем количество введенного вируса, что свидетельствовало о репликации вируса в ткани, при этом в/о введение дозы позволяло получить более высокие уровни генома, чем в/в введение в день 7, но при обоих путях введения уровни были сходно высокими в период времени 14-21 день. Все три вируса реплицировались на сходных уровнях.

Аналогично, уровни мРНК гексона вируса в лизатах опухоли, обнаруженные с помощью ОТ-кПЦР, были сравнимыми для EnAd, NG-347 и NG-348 в оба исследуемых момента времени (фиг. 49 и 50). Сходные уровни мРНК scFv к CD3 и CD80 были обнаружены в оба момента времени и для обоих путей введения дозы при обработке NG-348, при этом при введении дозы EnAd наблюдали лишь фоновые значения в данном анализе (фиг. 50 и 51). Уровни мРНК MIP1 α и $IFN\alpha$ также селективно обнаруживали после введения дозы NG-347 либо в/о, либо в/в (фиг. 52).

Уровни белка CD80, кодируемого обоими вирусами NG-347 и NG-348, и белка MIP1 α , кодируемого NG-347, измеряли в лизатах опухолей, применяя специфические ELISA. Результаты, представленные на фиг. 53, показали, что после однократной в/в дозы вируса оба белка также можно было селективно обнаружить в экстрактах опухоли. Ни один из данных белков не был обнаружен в образцах крови из той же мыши.

Пример 28.

Для того, чтобы оценить активность и зависимость от клеток опухоли вируса NG-348 *in vivo*, различные комбинации PBMC человека (5×10^7 клеток), опухолевых клеток A549 человека (5×10^6) и либо

EnAd, либо NG-348 (5×10^9 вчк) вводили путем инъекции в брюшную полость иммунодефицитных мышей SCID-beige, при этом дозы вирусов или контроль (солевой раствор) вводили в течение 15 мин после инъекции клеток. Через 3 дня брюшную полость промывали 5 мл солевого раствора и полученные клетки анализировали с помощью анализов методом проточной цитометрии с панелью маркеров активации Т-клеток (CD25, CD69 и HLA-DR), чтобы оценить уровни активации Т-клеток после выбора популяции CD3+ Т-клеток. Результаты двух отдельных экспериментов (табл. 9) продемонстрировали, что NG-348 селективно приводил к активации Т-клеток человека *in vivo* зависимым от клеток опухоли образом.

Таблица 9. Активация Т-клеток человека *in vivo* вирусом NG-348 в несущих опухоль A549 мышках

| Группа | Вирус | Опухоль | N | % CD25 ⁺ | % CD69 ⁺ | %DR ⁺ | % CD25 ⁺ ,C D69 ⁺ | % CD25 ⁺ ,D R ⁺ |
|----------------------|-----------------|-----------------------------|---|------------------------|------------------------|-------------------|---|---|
| Эксперимент 1 | | | | | | | | |
| 1 | EnAd | Солевой раствор | 2 | 1,9, 2,3 | 1,6, 3,0 | 7,7, 9,1 | 0,2, 0,5 | 0,3, 0,6 |
| 2 | EnAd | 5×10^6 клеток A549 | 2 | 4,2, 2,9 | 6,2, 5,5 | 8,4, 8,4 | 0,8, 0,3 | 1,4, 0,4 |
| 3 | NG-348 | Солевой раствор | 1 | 3,4 | 2,6 | 9,2 | 0,5 | 0,8 |
| 4 | NG-348 | 5×10^6 клеток A549 | 2 | 35,8, 36,6 | 50,4, 42,2 | 26,3, 19,2 | 22,4, 18,0 | 16,4, 12,2 |
| Эксперимент 2 | | | | | | | | |
| 1 | Солевой раствор | Солевой раствор | 1 | 25,6 | 37,3 | 14,8 | 14,1 | 7,08 |
| 2 | EnAd | Солевой раствор | 2 | 6,5, 7,3 | 17,8, 18,2 | 5,50, 6,1 | 3,58, 3,46 | 1,01, 1,49 |
| 3 | NG-348 | Солевой раствор | 2 | 10,2, 6,5 | 26,7, 18,3 | 7,7, 6,0 | 6,73, 3,61 | 2,16, 1,44 |
| 4 | Солевой раствор | 5×10^6 клеток A549 | 2 | 28,4, 22,7 | 54,4, 51,1 | 13,3 15,0 | 22,3 17,5 | 8,54, 7,72 |
| 5 | EnAd | 5×10^6 клеток A549 | 1 | 13,2 | 29,4 | 5,1 | 7,84 | 1,62 |
| 6 | NG-348 | 5×10^6 клеток A549 | 3 | 34,4, 29,6, 56,4 | 58,9, 59,2, 85,0 | 12,5 9,8, 17,0 | 27,2, 23,3, 52,7 | 9,07 7,5, 14,2 |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Репликационно-компетентный онколитический аденовирус с селективностью к раковым клеткам, при этом указанный аденовирус содержит трансген под контролем промотора, эндогенного для вируса, и при этом указанный трансген содержит последовательность ДНК, кодирующую белок В7 или его активный фрагмент, и указанный трансген расположен между стоп-кодоном-сайтом распознавания поли(А) гена L5 аденовируса и стоп-кодоном-сайтом распознавания поли(А) гена E4 аденовируса;

где указанный трансген находится под контролем главного позднего эндогенного промотора;

и при этом указанный активный фрагмент обладает по меньшей мере одной функцией белка В7.

2. Репликационно-компетентный онколитический вирус по п.1, отличающийся тем, что указанный белок В7 или его активный фрагмент независимо выбран из группы, включающей В7-1, В7-2, В7-DC, В7-Н1, В7-Н2, В7-Н3, В7-Н4, В7-Н5 и В7-Н6.

3. Репликационно-компетентный онколитический вирус по п.2, отличающийся тем, что указанный белок В7 или его активный фрагмент представляет собой В7-1.

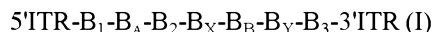
4. Репликационно-компетентный онколитический вирус по п.1, отличающийся тем, что вирус представляет собой аденовирус группы В.

5. Репликационно-компетентный онколитический вирус по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что вирус представляет собой химерный вирус.

6. Репликационно-компетентный онколитический вирус по п.5, отличающийся тем, что каркас ви-

руса представляет собой Enadenotucirev.

7. Репликационно-компетентный онколитический вирус по п.6, отличающийся тем, что вирус характеризуется формулой (I)



B_1 включает E1A, E1B или E1A-E1B;

B_A представляет собой E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или включает E3 или трансген, например, под контролем эндогенного или экзогенного промотора;

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

B_B включает L5;

B_Y включает трансген, кодирующий белок B7 или его активный фрагмент; и

B_3 представляет собой связь или включает E4.

8. Репликационно-компетентный онколитический вирус по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный белок B7 или его активный фрагмент содержит трансмембранную последовательность, например трансмембранный домен из рецептора PDGF, или GPI-якорь, подходящий для закоривания белка или его фрагмента в мембрану клетки.

9. Репликационно-компетентный онколитический вирус по любому из пп.1-8, который дополнительно содержит второй трансген, например кодирующий полипептид, выбранный из группы, включающей цитокин, хемокин, молекулу антагонистического антитела или ее фрагмент, и молекулу агонистического антитела или ее фрагмент.

10. Репликационно-компетентный онколитический вирус по любому из пп.1-8, который содержит второй и третий трансген, например, кодирующие два различных полипептида, выбранных из группы, включающей цитокин, хемокин, молекулу антагонистического антитела или ее фрагмент, и молекулу агонистического антитела или ее фрагмент.

11. Репликационно-компетентный онколитический вирус по п.9 или 10, отличающийся тем, что второй или третий трансген кодирует цитокин, выбранный из группы, включающей IL-2, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, лиганд Flt3, GM-CSF, IL-15 и IL-12.

12. Репликационно-компетентный онколитический вирус по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что второй или третий трансген кодирует хемокин, выбранный из группы, включающей MIP-1 альфа, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19 и CCL21.

13. Репликационно-компетентный онколитический вирус по п.9 или 12, отличающийся тем, что комбинация цитокинов и хемокинов кодируется вирусом и выбрана из группы, включающей Mip1 α и лиганд Flt3, и Mip1 α и IFN α .

14. Репликационно-компетентный онколитический вирус по любому из пп.9-13, отличающийся тем, что указанный вирус кодирует молекулу антитела или ее фрагмент.

15. Репликационно-компетентный онколитический вирус по п.14, отличающийся тем, что молекула антитела или фрагмента антитела содержит трансмембранную последовательность или GPI-якорь, таким образом, что она представляет собой заякоренную в мембрану клетки форму, или трансмембранный домен, например, из рецептора PDGF.

16. Репликационно-компетентный онколитический вирус по п.14 или 15, отличающийся тем, что молекула антитела или фрагмента антитела содержит домен, связывающий антиген CD3 человека.

17. Репликационно-компетентный онколитический вирус по пп.14-16, отличающийся тем, что молекула антитела представляет собой ингибитор, например, выбранный из группы, включающей ингибитор фактора ангиогенеза, такой как молекула антитела к VEGF, и ингибитор факторов инактивирования Т-клеток, такой как молекула антитела к CTLA-4.

18. Репликационно-компетентный онколитический вирус по пп.14-17, отличающийся тем, что молекула антитела представляет собой агонист, например, одной или более молекул, выбранных из группы, включающей CD40, GITR, OX40, CD27 и 4-1BB.

19. Фармацевтическая композиция для применения в лечении рака, содержащая репликационно-компетентный онколитический аденовирус по любому из пп.1-18 и разбавитель или носитель.

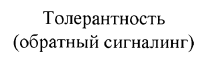
20. Способ лечения пациента с раком, включающий введение терапевтически эффективного количества репликационно-компетентного аденовируса по любому из пп.1-18 или композиции по п.19.

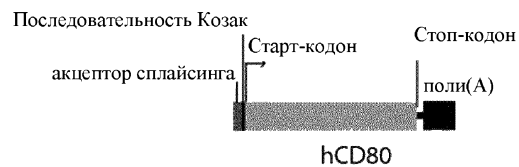
21. Репликационно-компетентный аденовирус по пп.1-18 для применения в лечении рака.

22. Применение репликационно-компетентного аденовируса по пп.1-18 в производстве лекарственного средства для лечения рака.

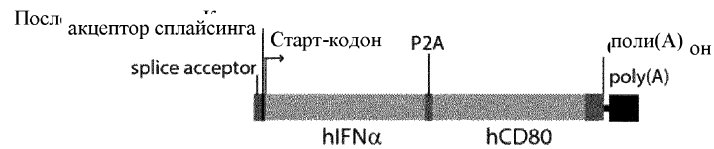
23. Применение композиции по п.19 в производстве лекарственного средства для лечения рака.

24. Способ получения репликационно-компетентного аденовируса по пп.1-18 путем его репликации в клетке-хозяине.

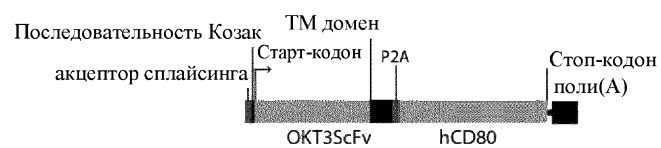




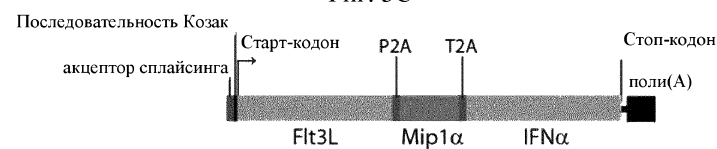
Фиг. 3А



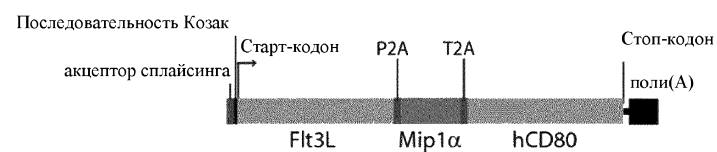
Фиг. 3В



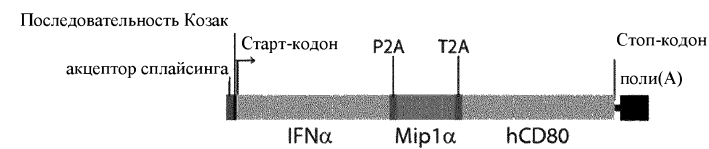
Фиг. 3С



Фиг. 3D



Фиг. 3Е

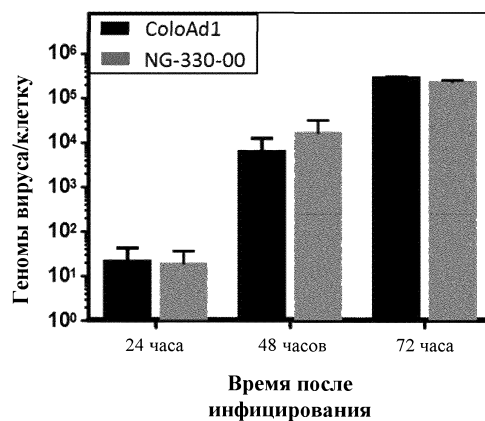


Фиг. 3F

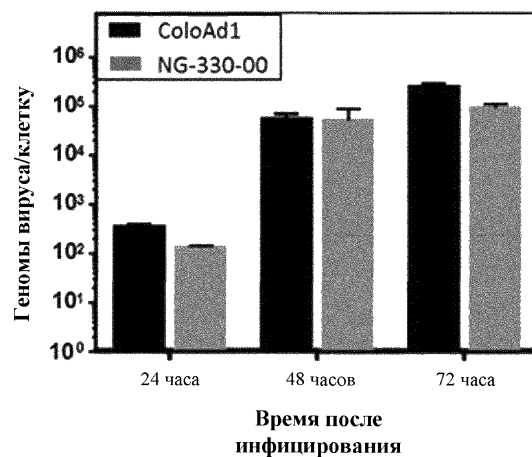
Новая ДНК от 1 до 966



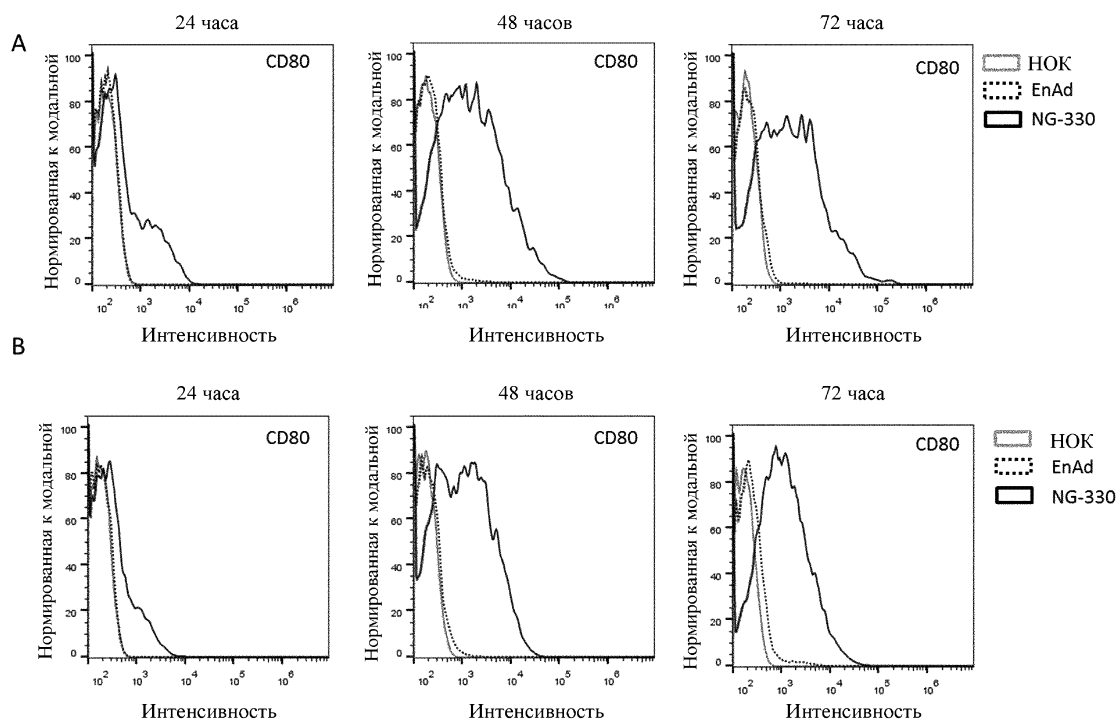
Фиг. 3G Кассета ORF для антитела scFv



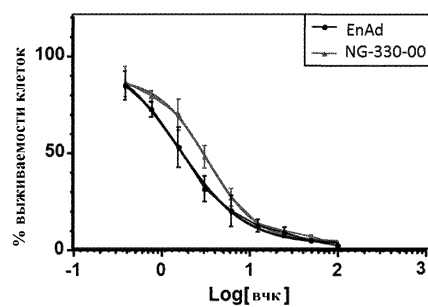
Фиг. 4А



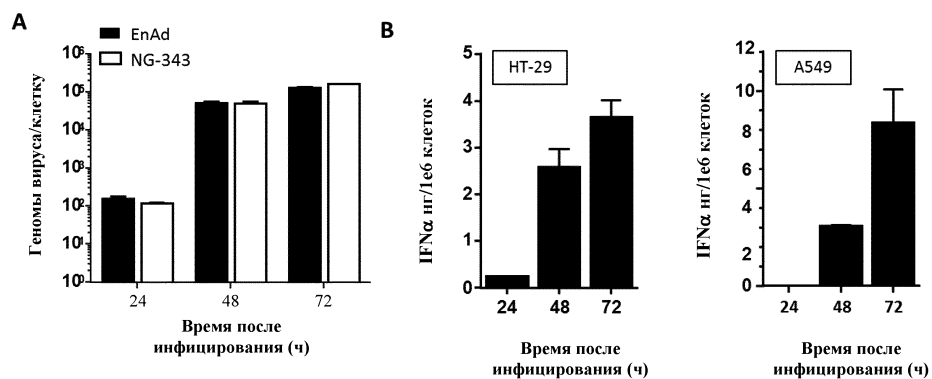
Фиг. 4В



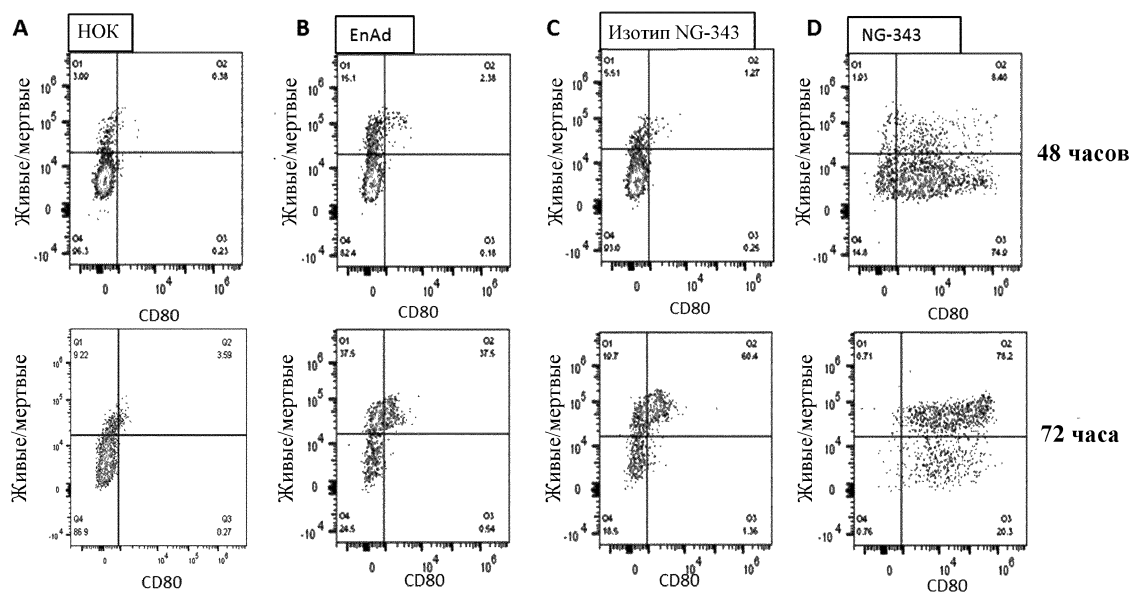
Фиг. 5



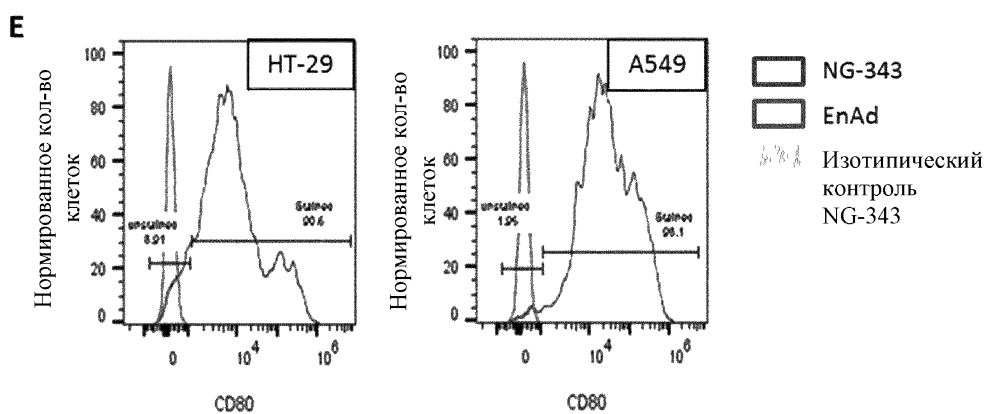
Фиг. 6



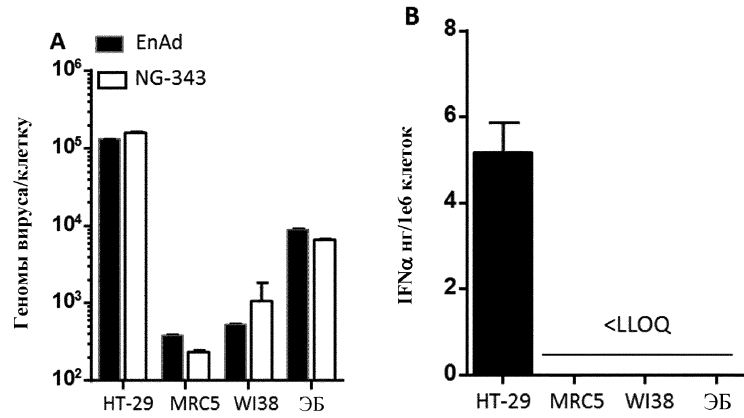
Фиг. 7



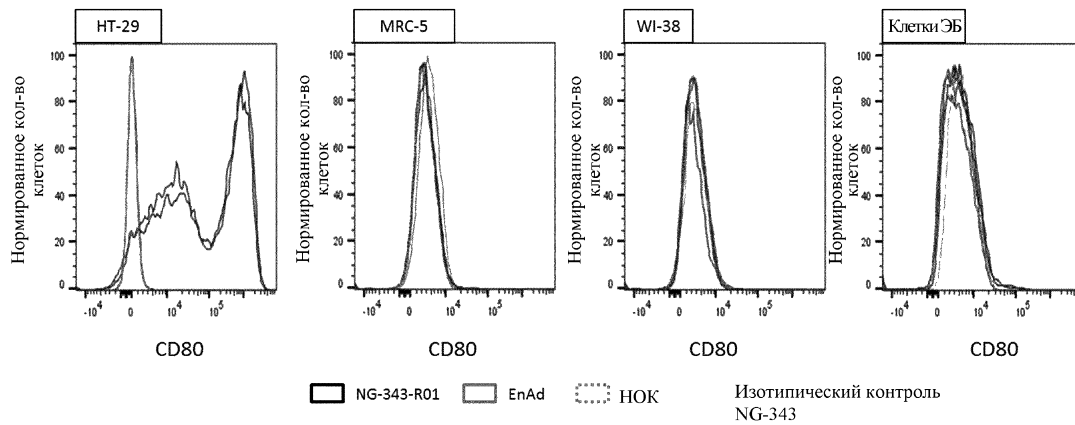
Фиг. 8



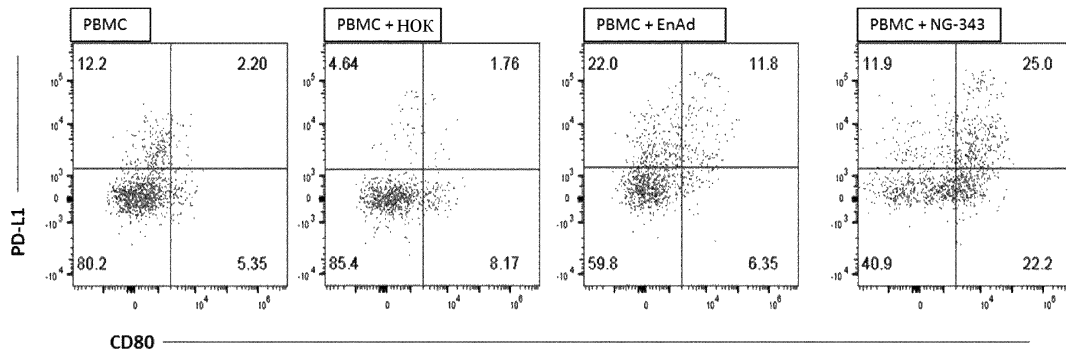
Фиг. 8, продолжение



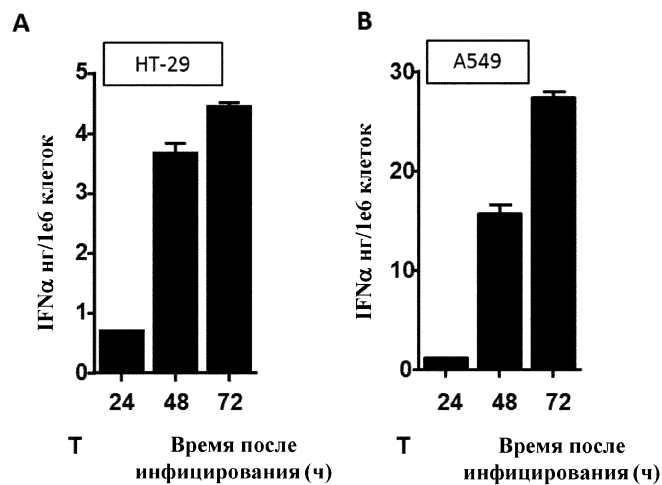
Фиг. 9А и В



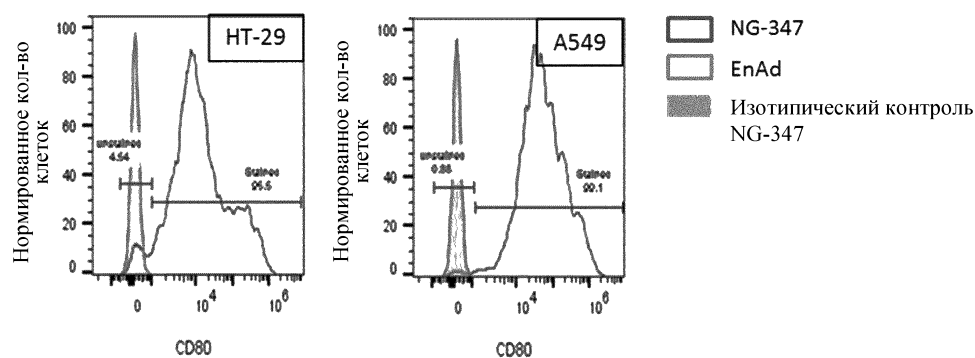
Фиг. 9С



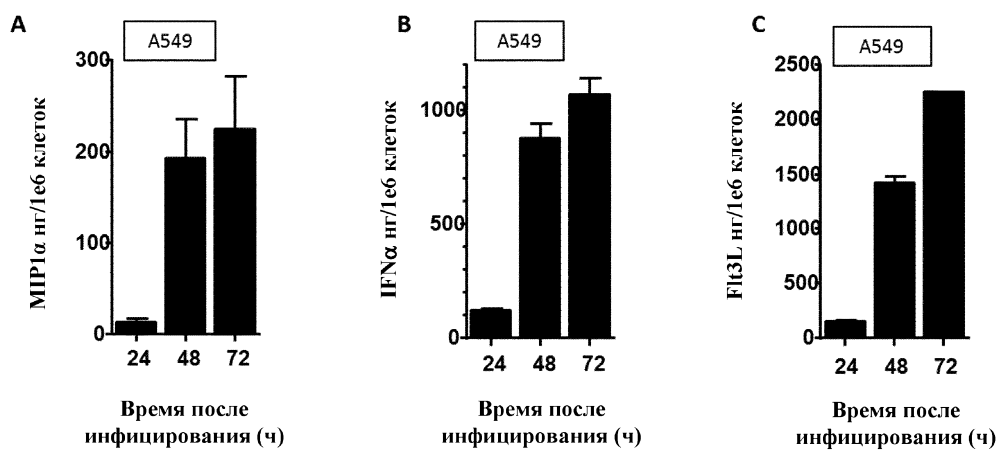
Фиг. 10



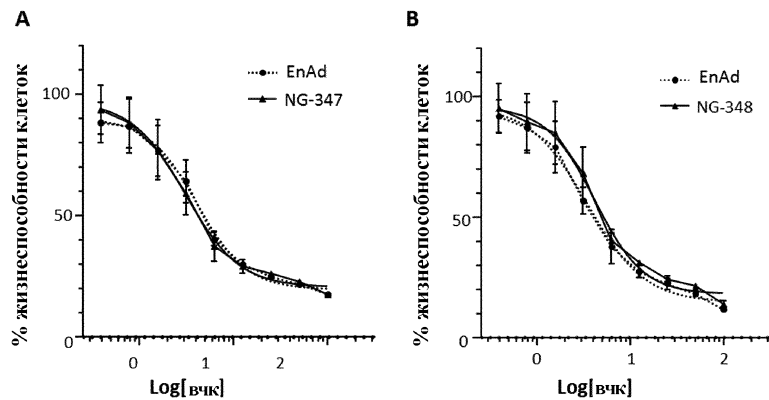
Фиг. 11А и В



Фиг. 11С



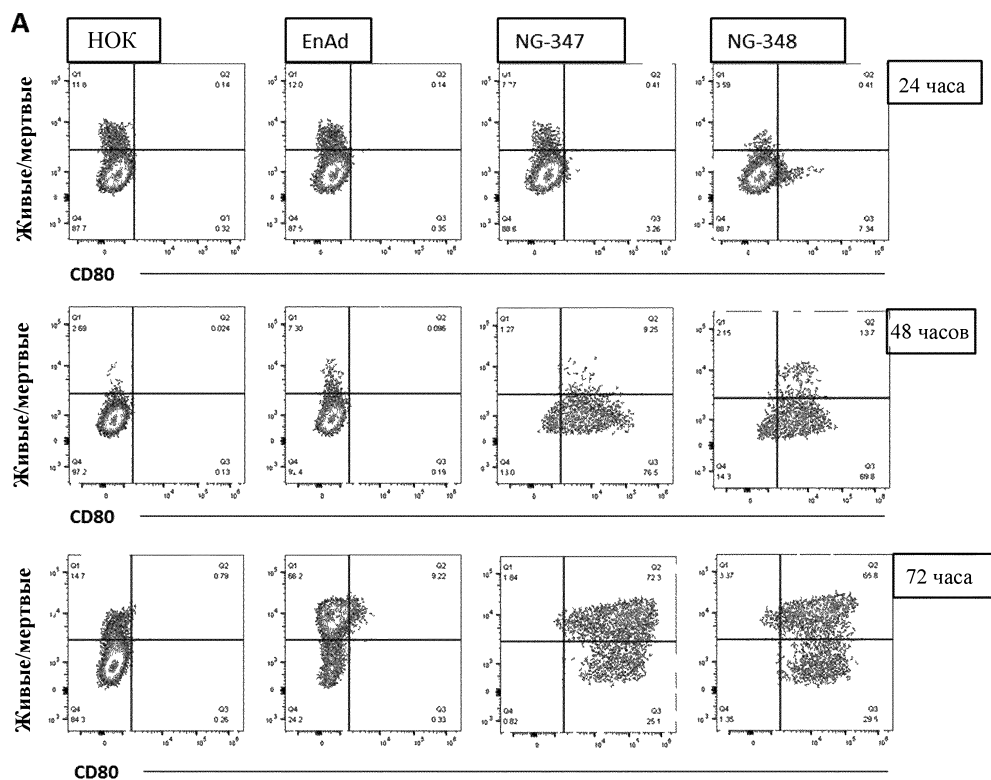
Фиг. 12



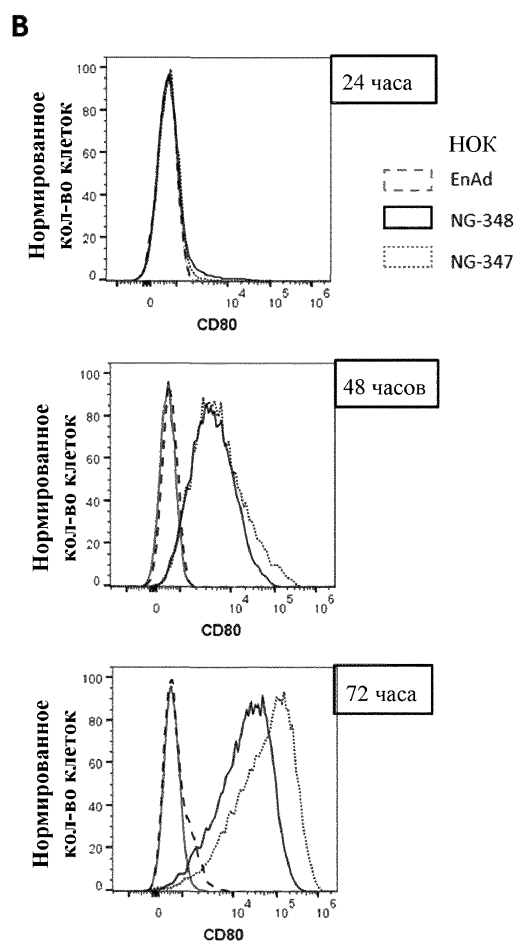
С

| ВИРУС | ТИТР (вчк/мл) | Инфекционный титр (ИЕ/мл) | Отношение инфекционной способности (P:I) |
|----------|---------------|---------------------------|--|
| EnAd (1) | 3e12 | 7.83e10 | 38.3 |
| EnAd (2) | 3e12 | 9.37e10 | 32.0 |
| NG-347 | 3.78e12 | 1.67e11 | 22.7 |
| NG-348 | 6.68e12 | 3.31e11 | 20.2 |

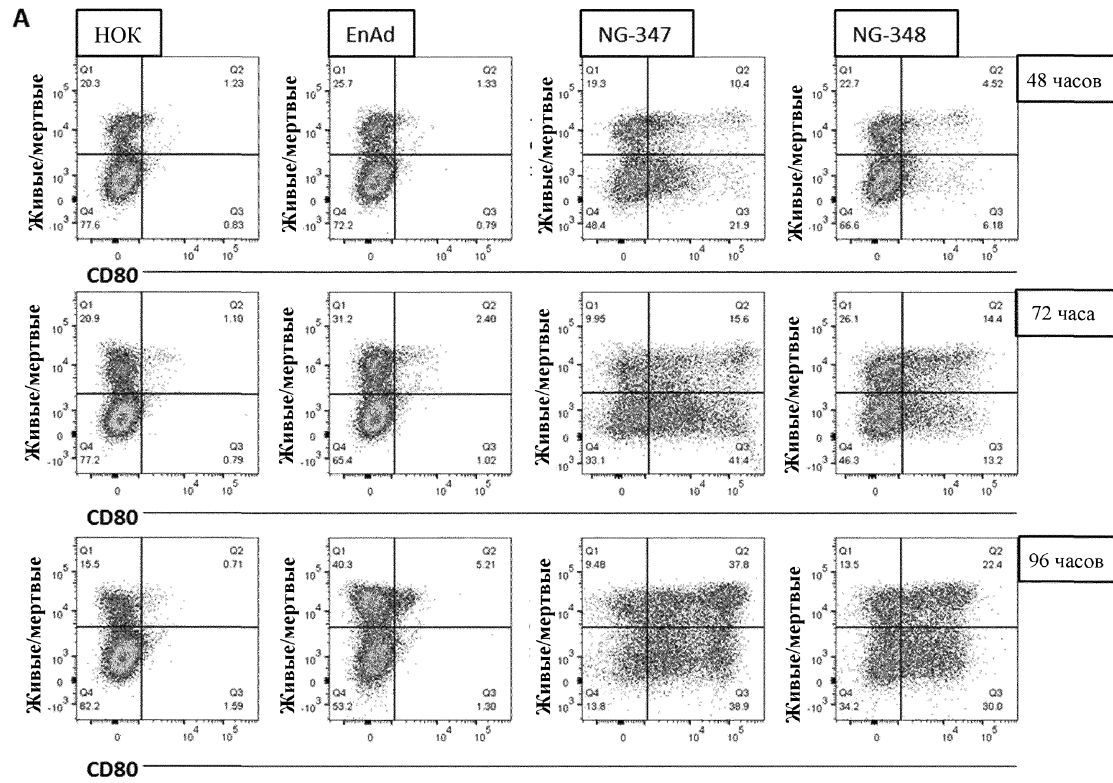
Фиг. 13



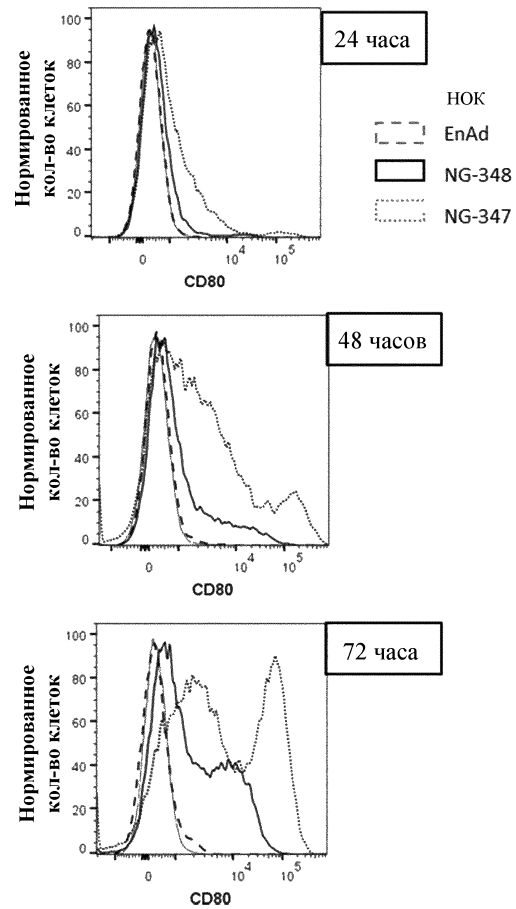
Фиг. 14А



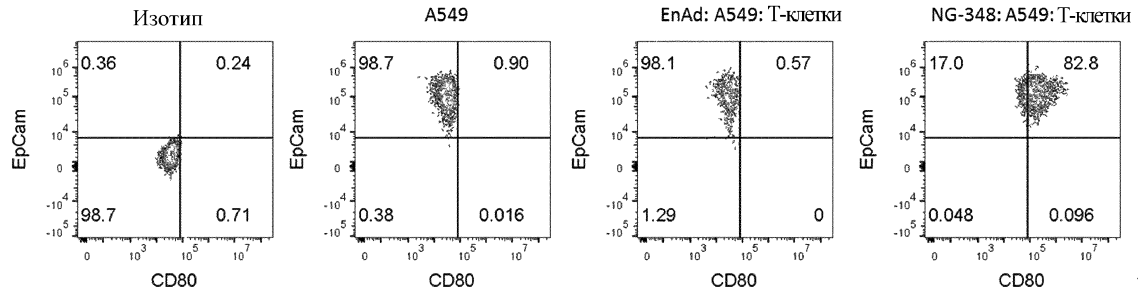
Фиг. 14В



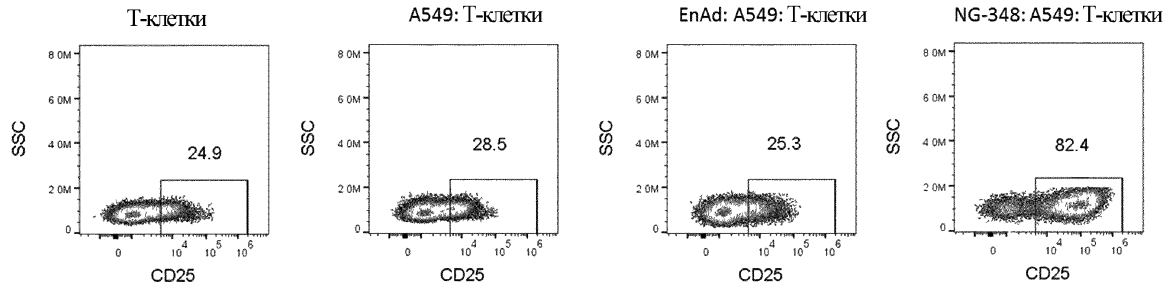
Фиг. 15А



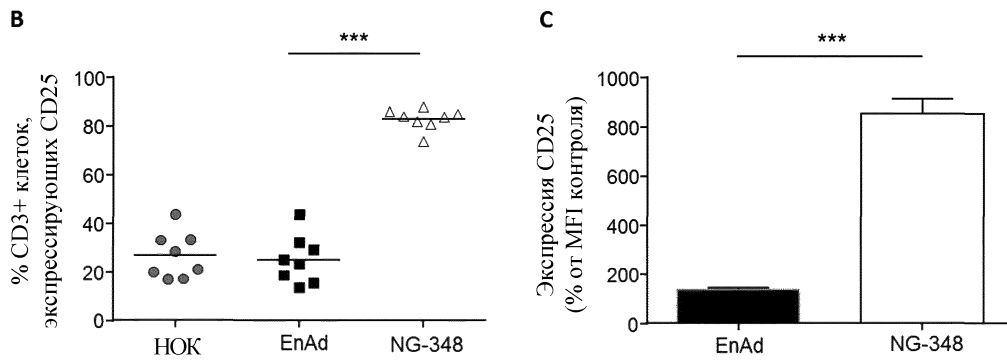
Фиг. 15В



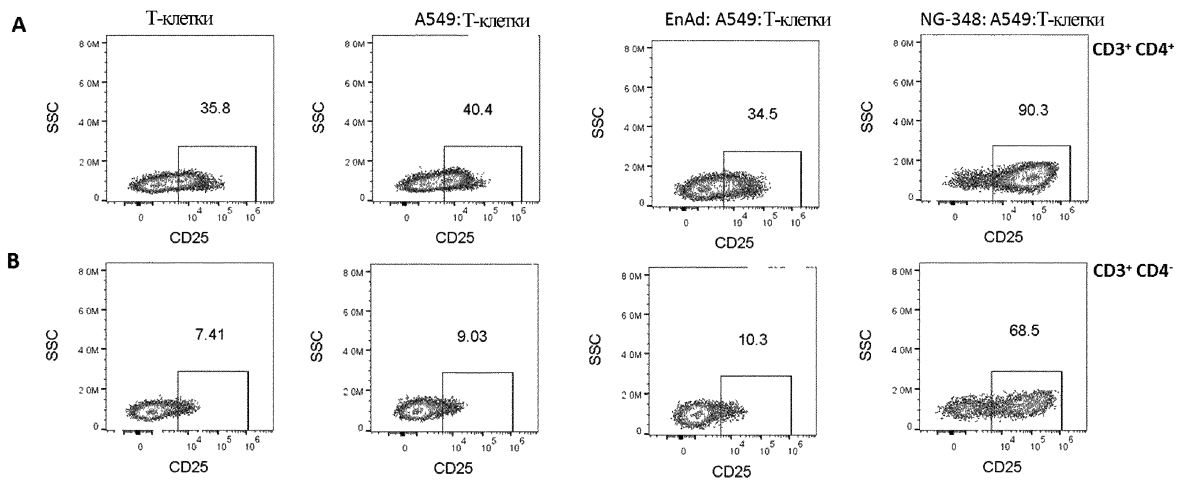
Фиг. 16



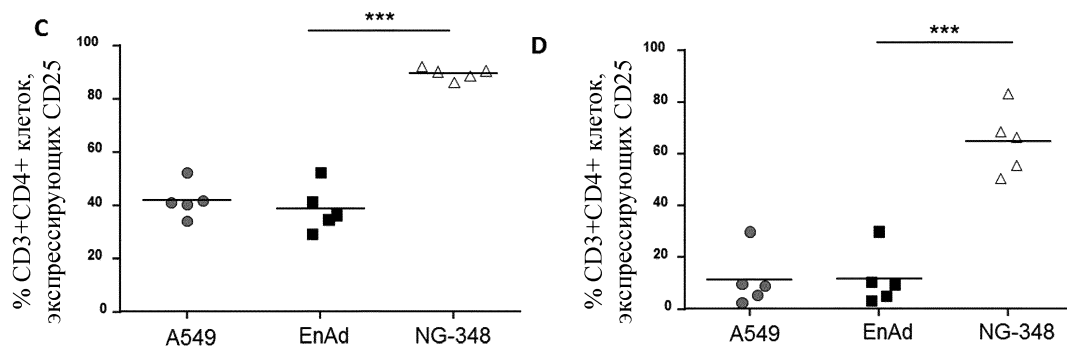
Фигура 17А



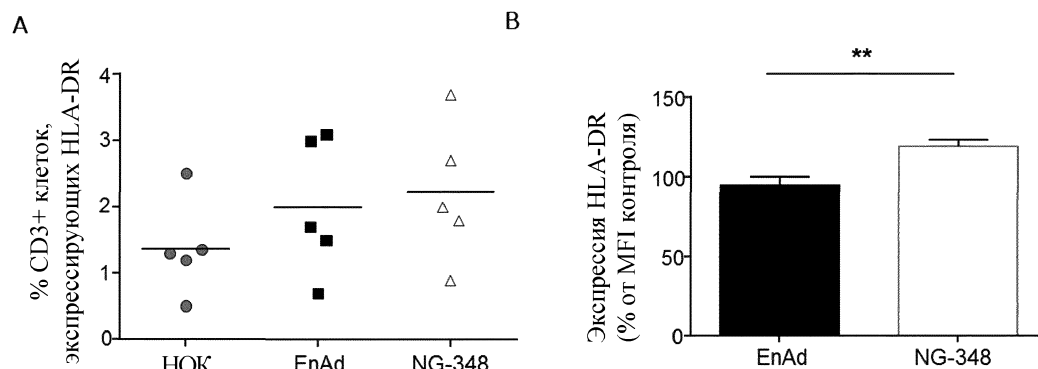
Фиг. 17В и С



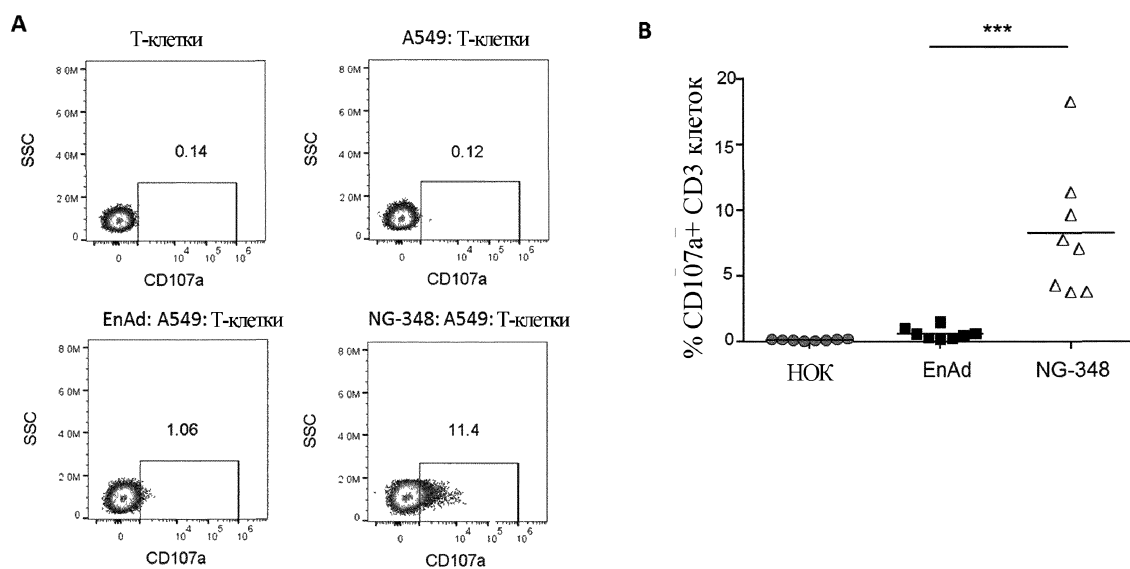
Фиг. 18А и В



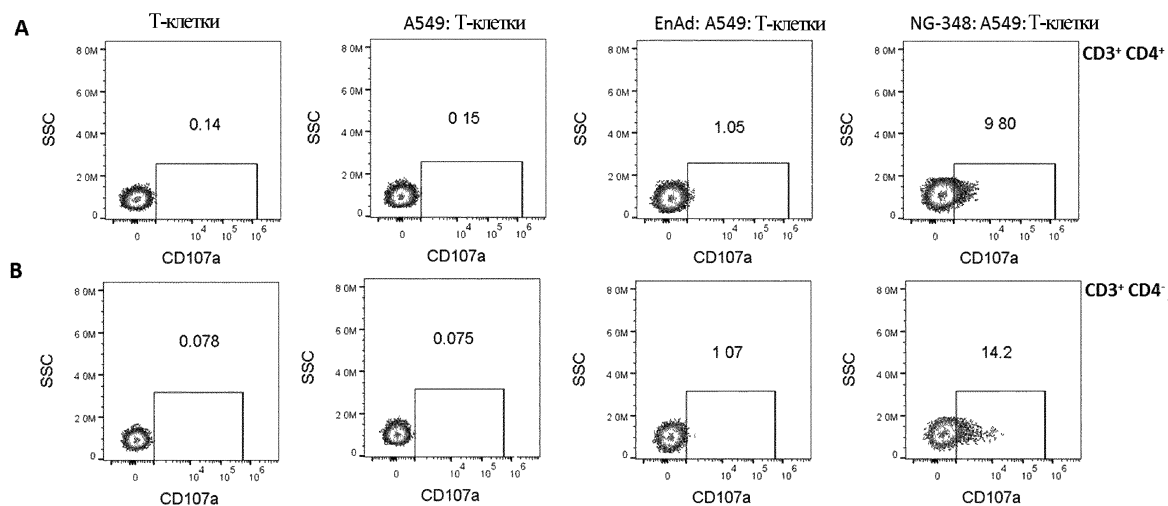
Фиг. 18С и D



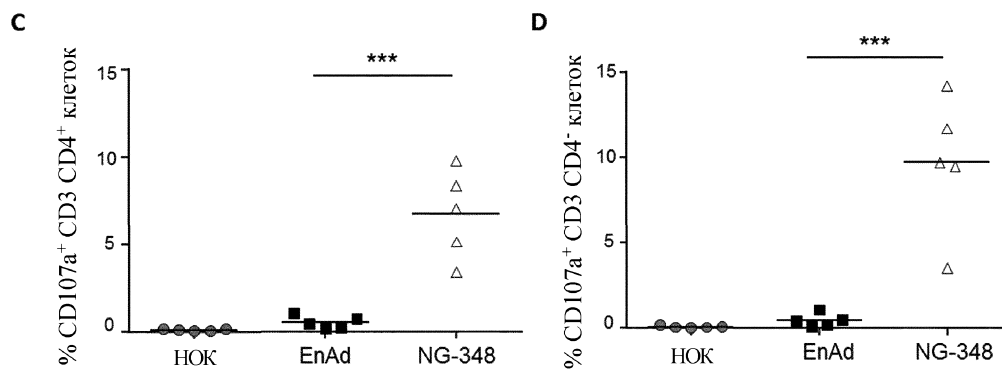
Фиг. 19



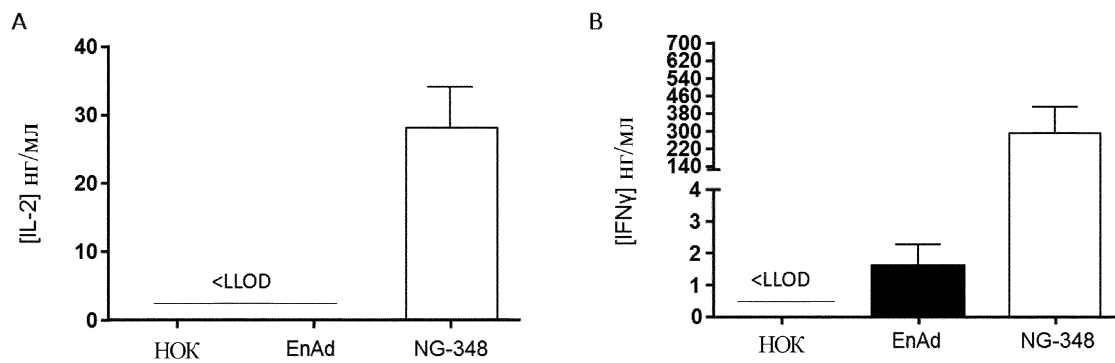
Фиг. 20А и В



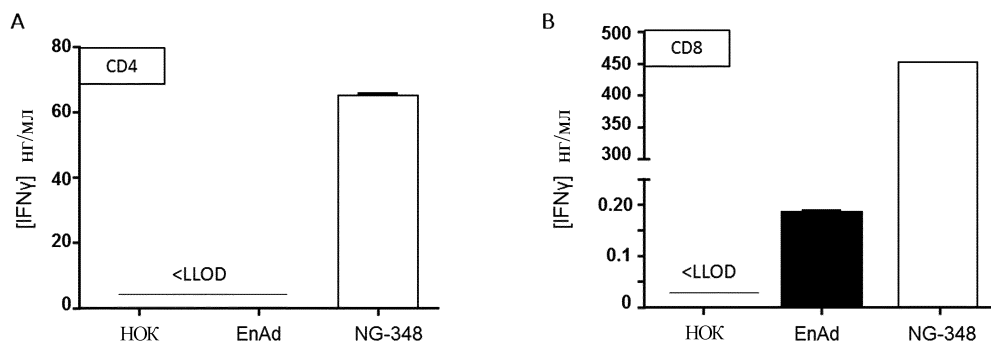
Фиг. 21А и В



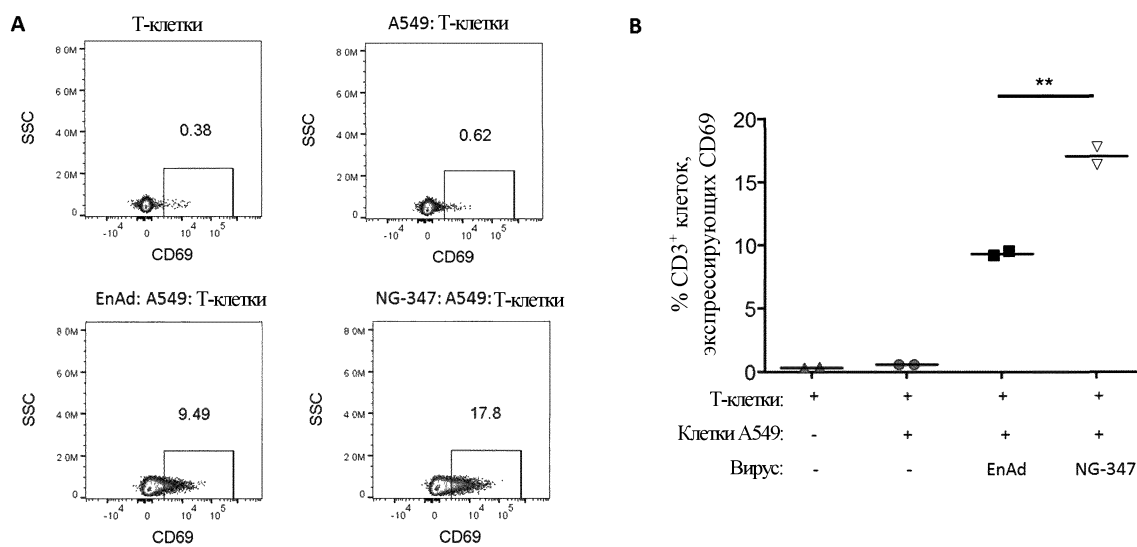
Фиг. 21С и D



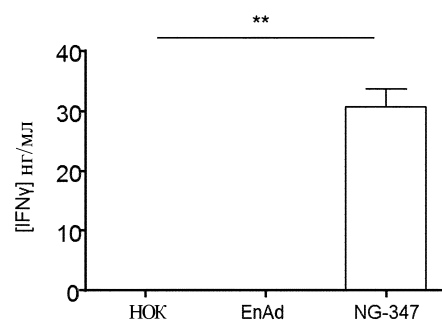
Фиг. 22



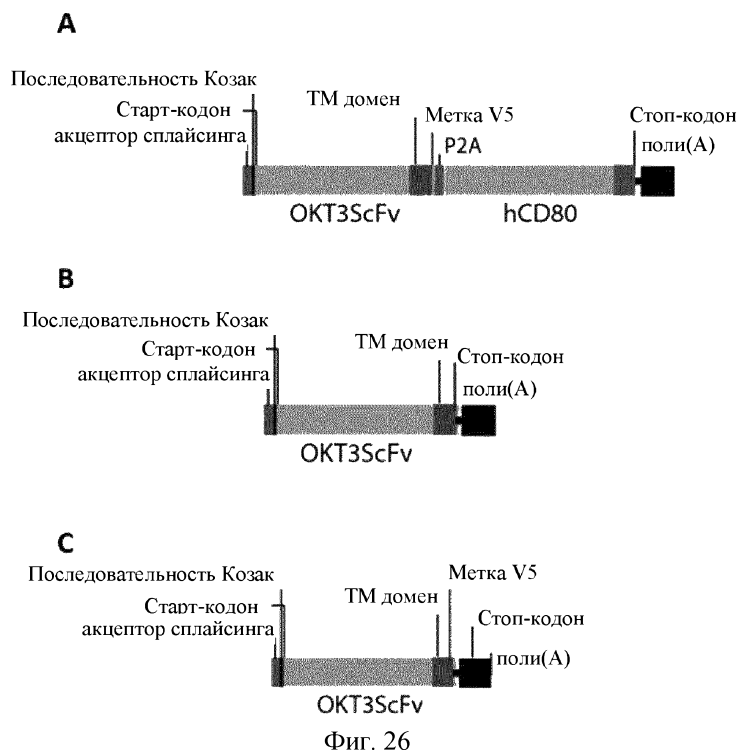
Фиг. 23



Фиг. 24

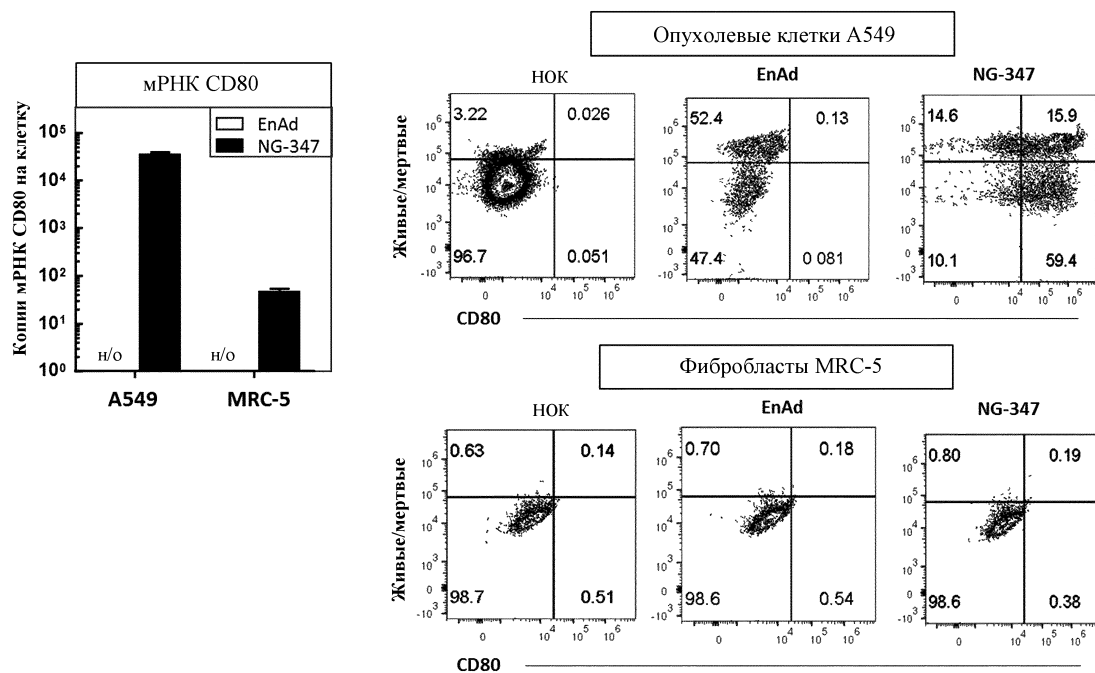


Фиг. 25

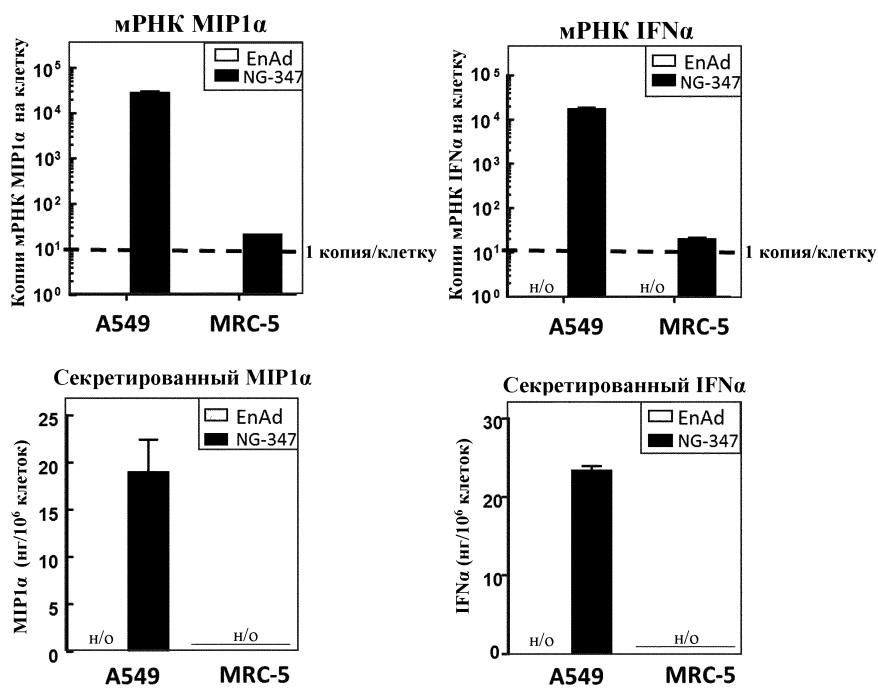


Фиг. 26

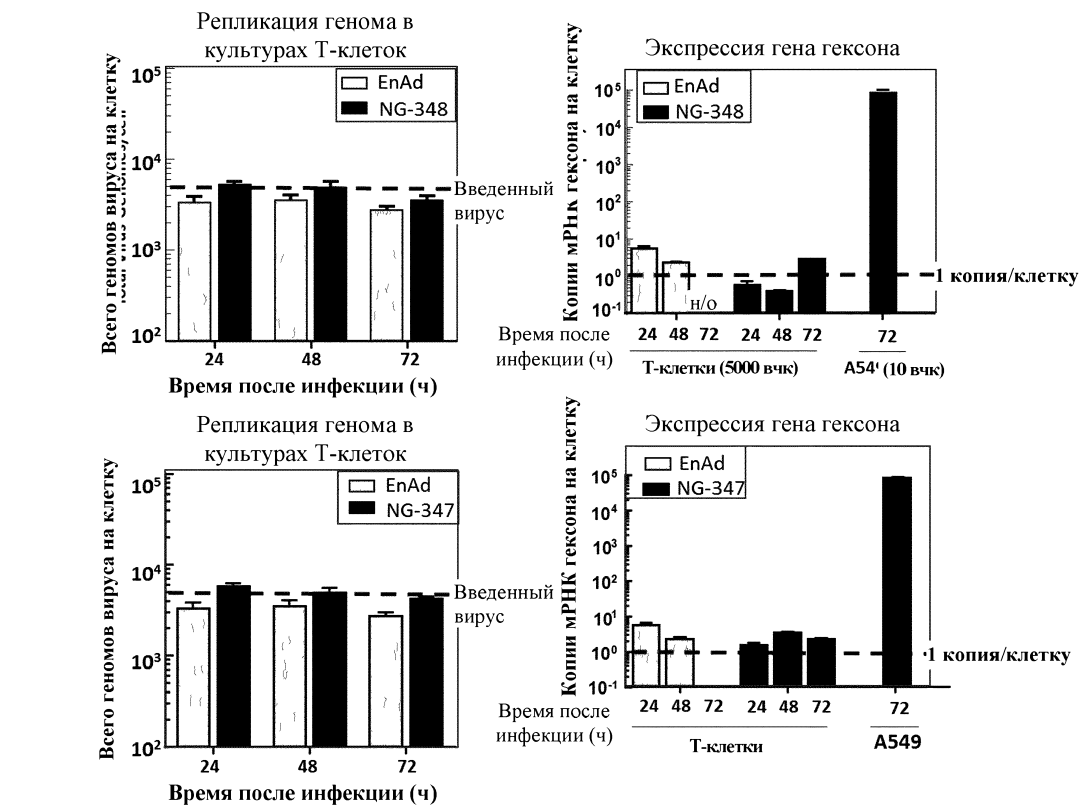




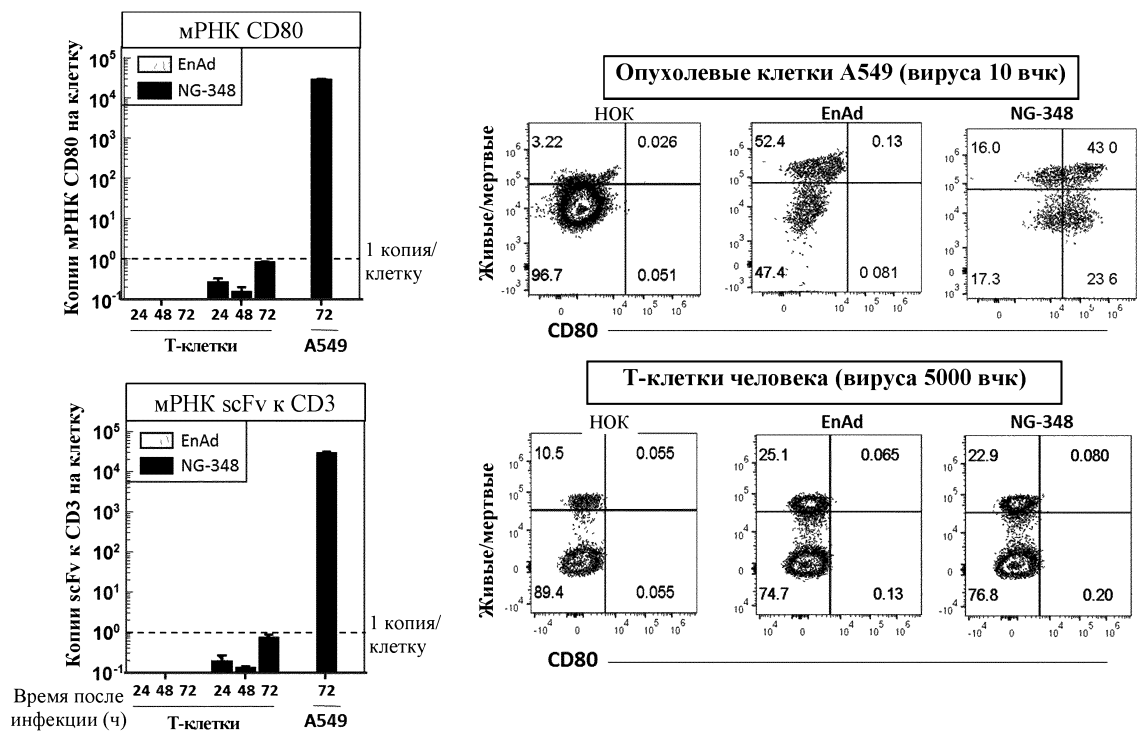
Фиг. 29



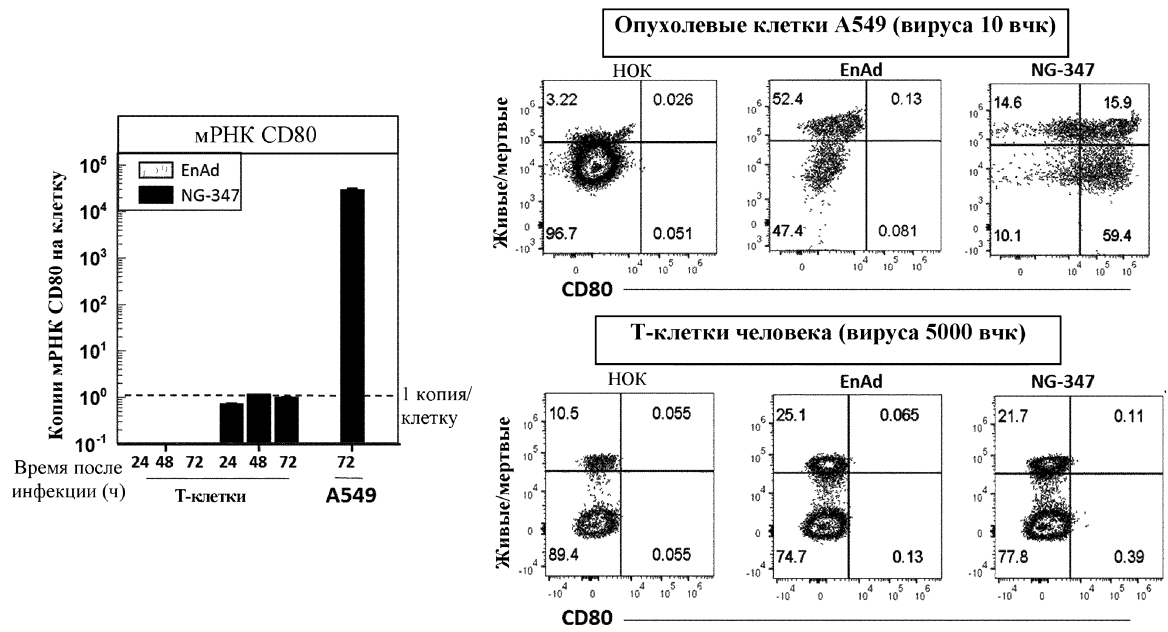
Фиг. 30



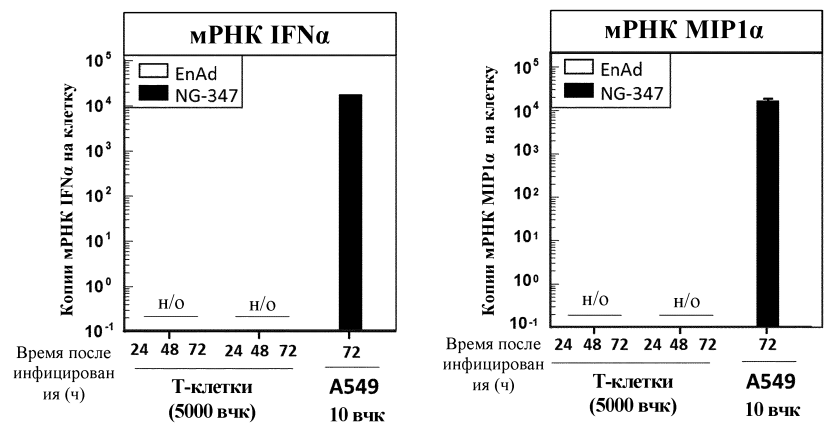
Фиг. 31



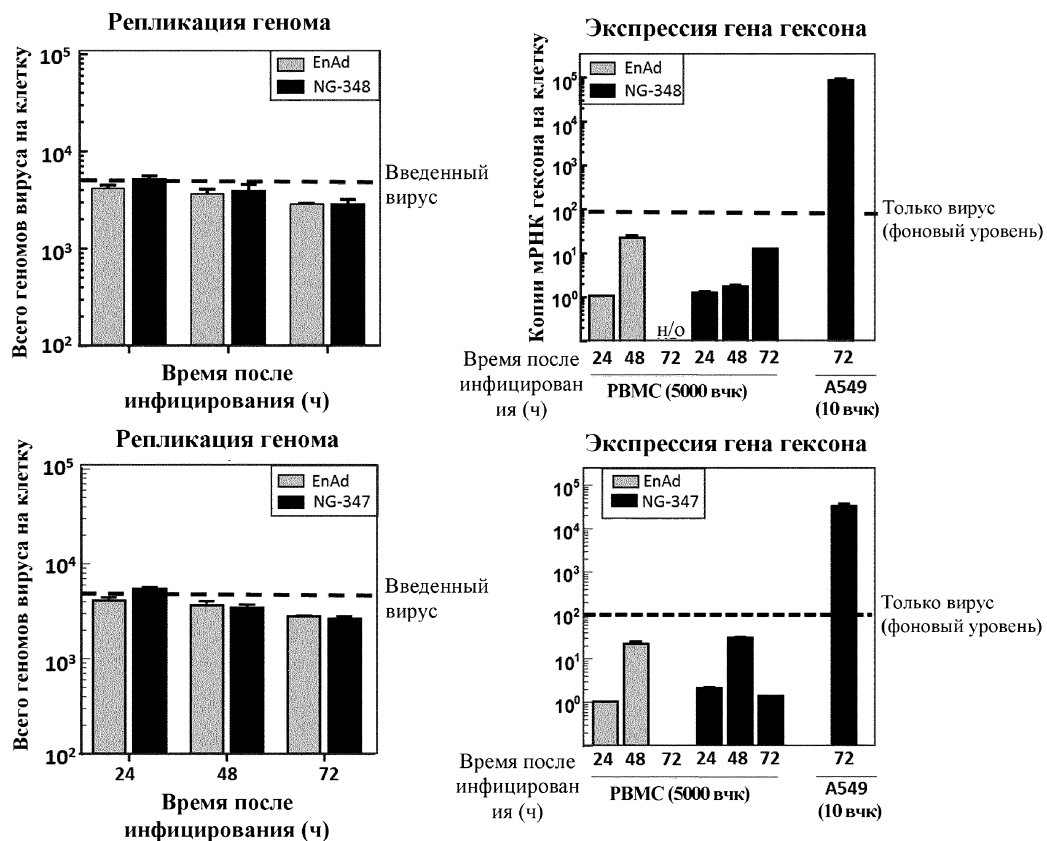
Фиг. 32



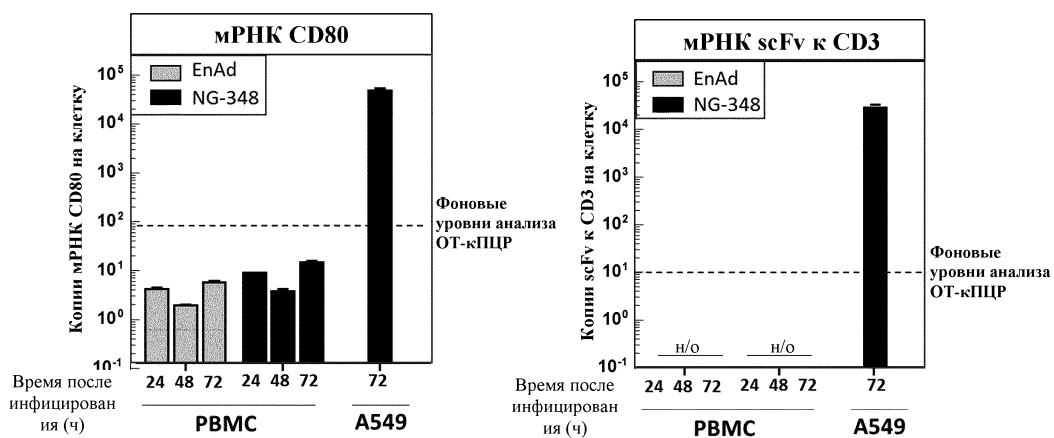
Фиг. 33



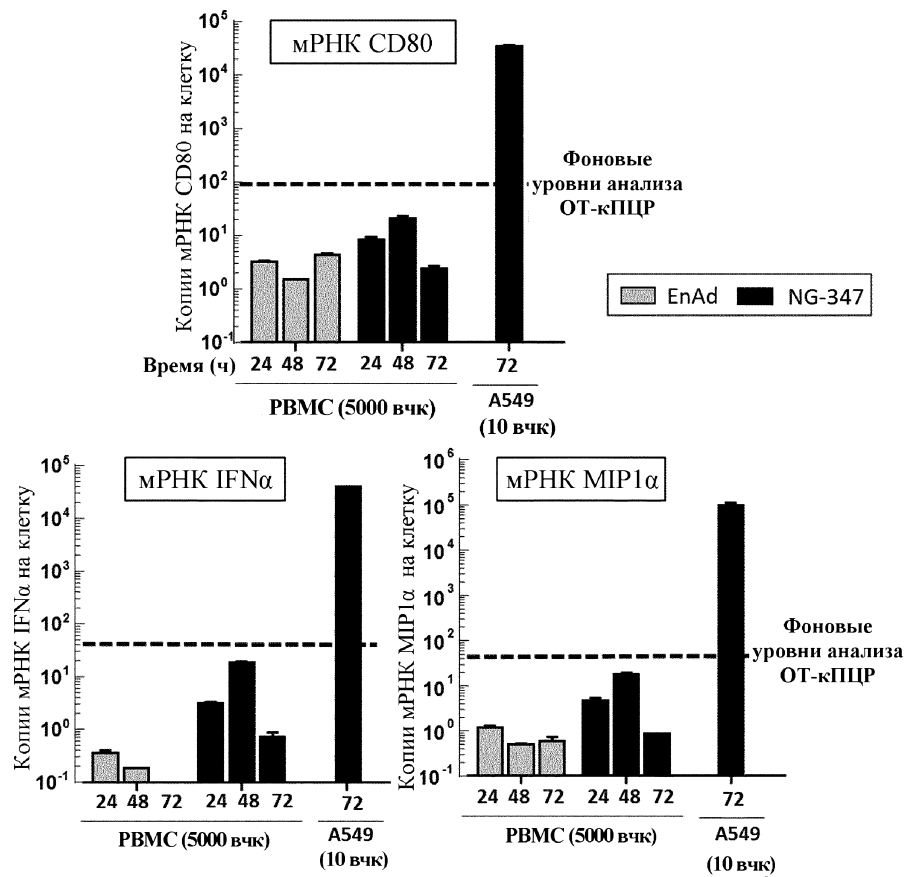
Фиг. 34



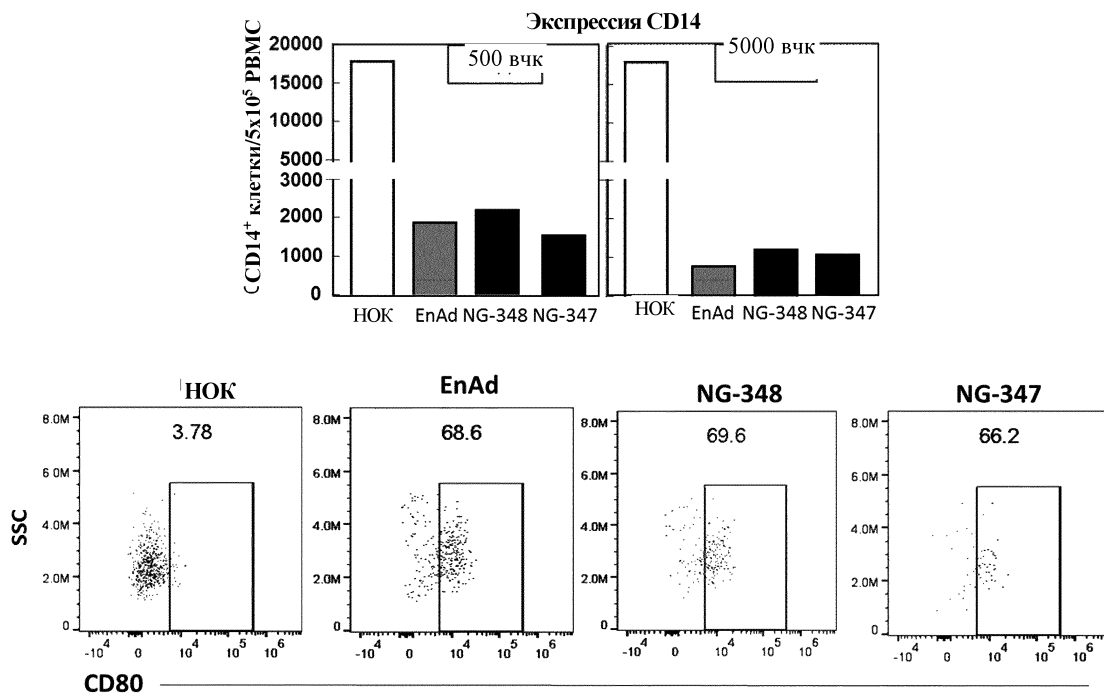
Фиг. 35



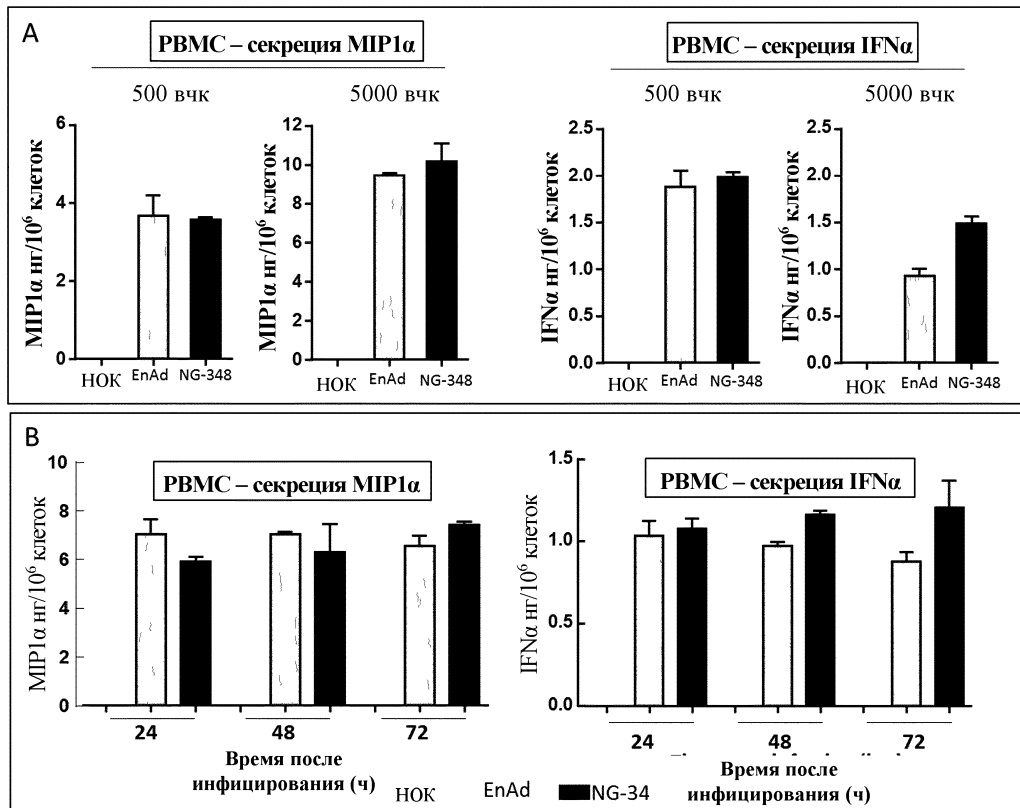
Фиг. 36



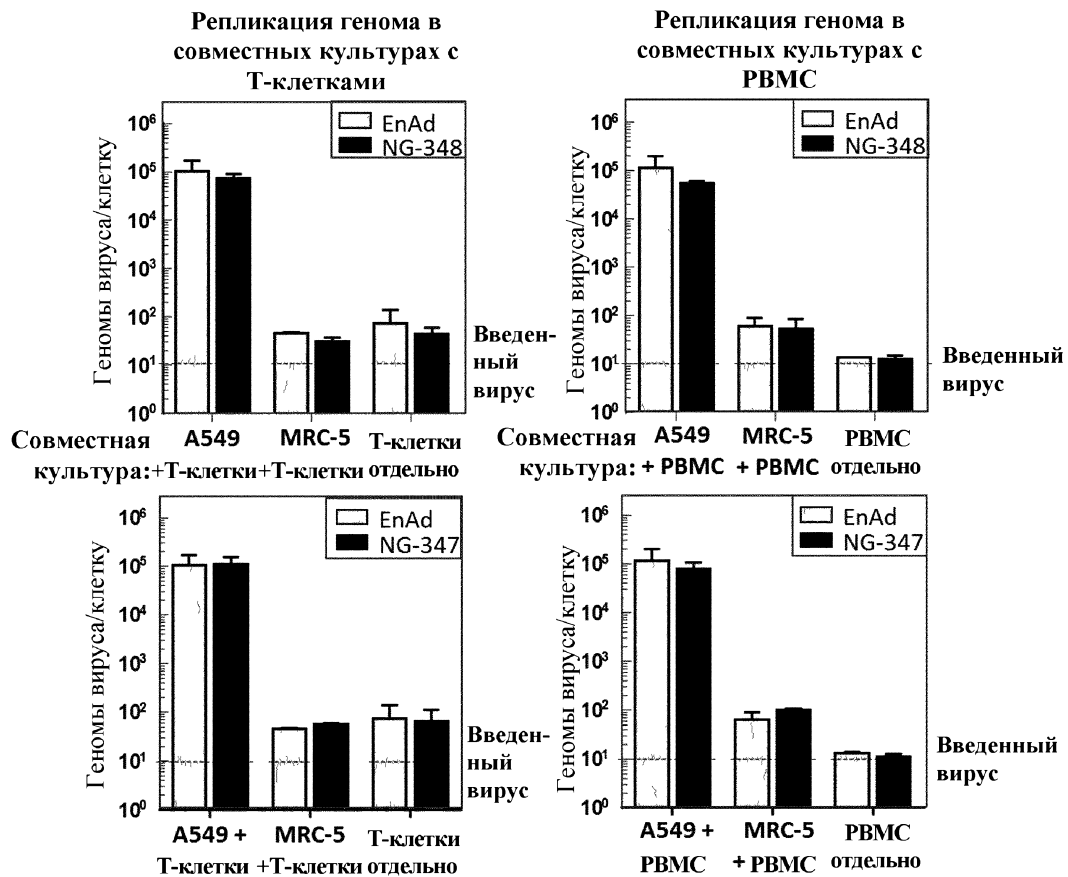
Фиг. 37



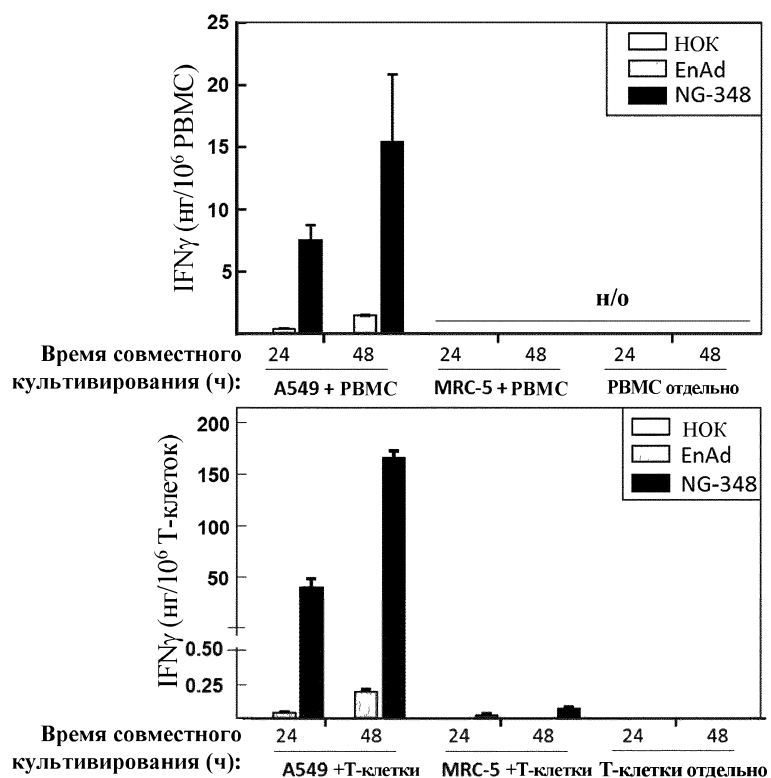
Фиг. 38



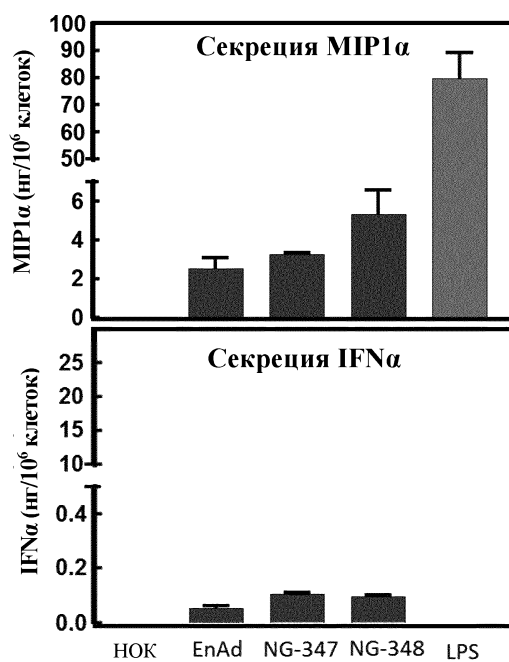
Фиг. 39



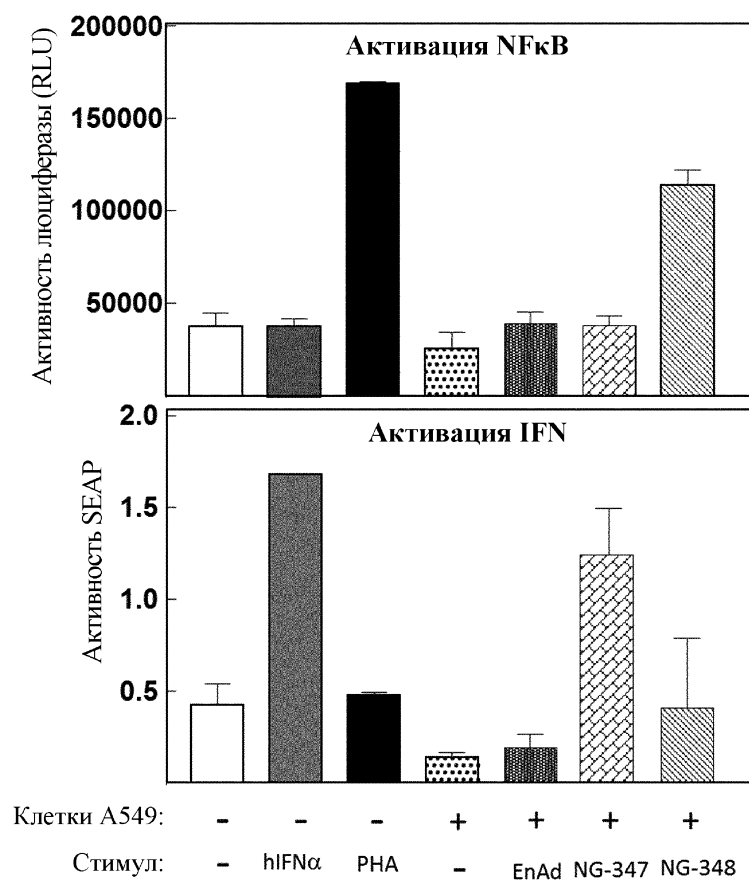
Фиг. 40



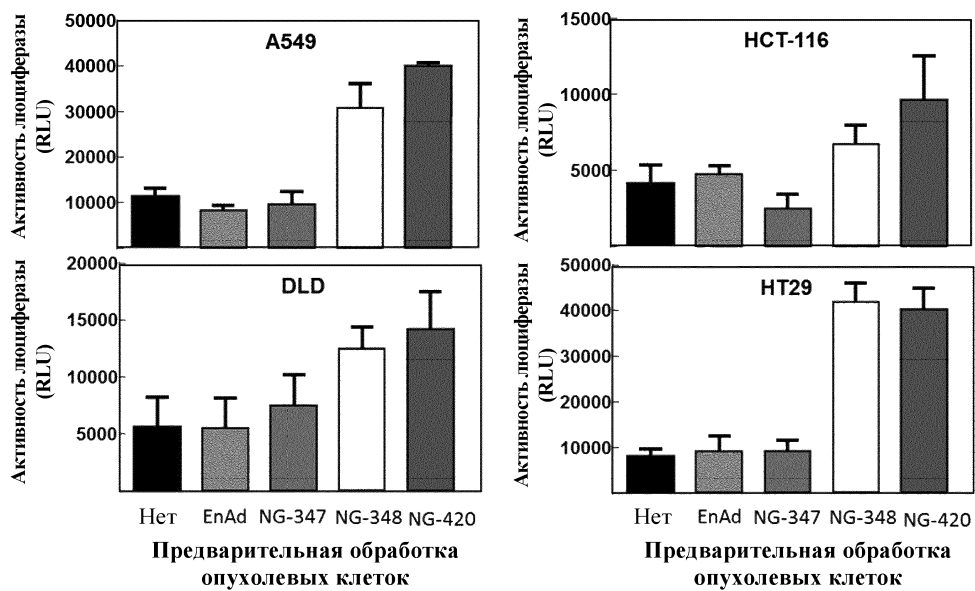
Фиг. 41



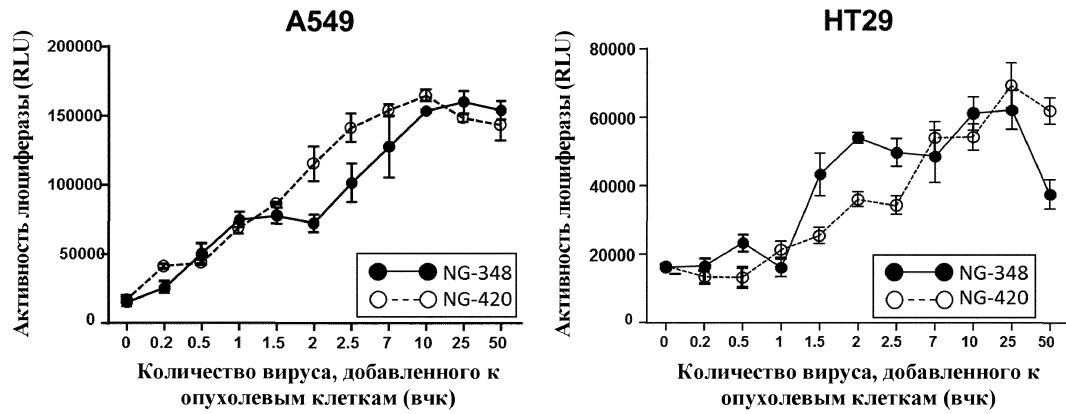
Фиг. 42



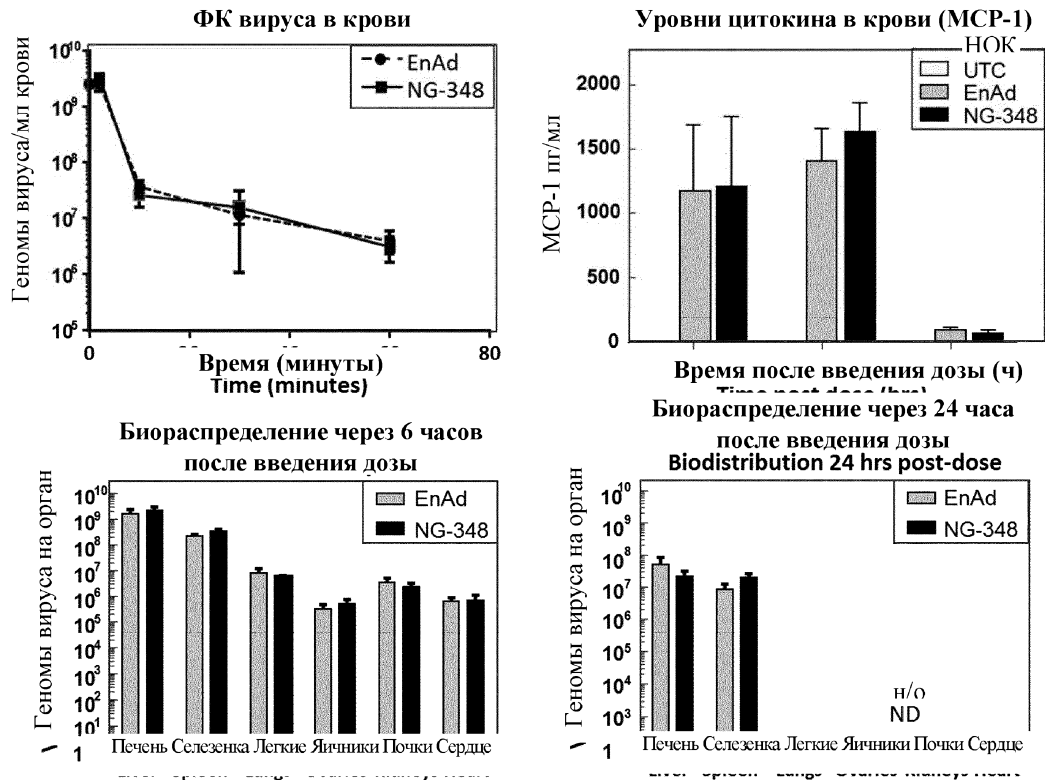
Фиг. 43



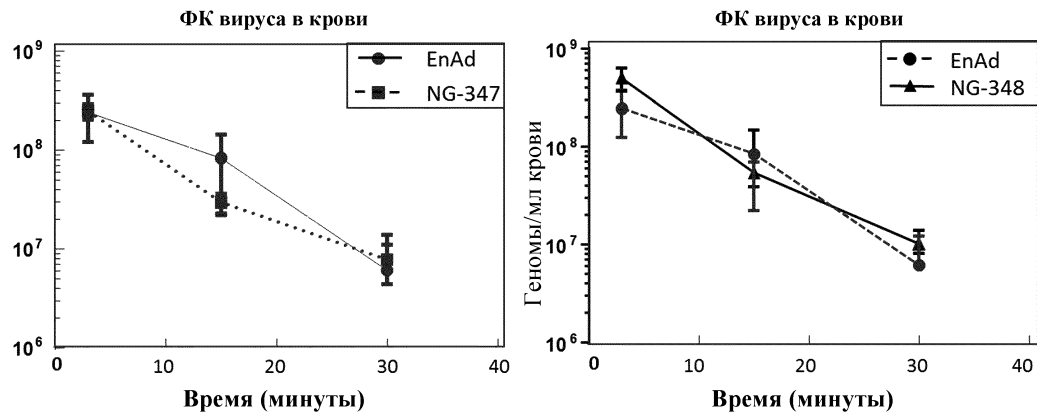
Фиг. 44



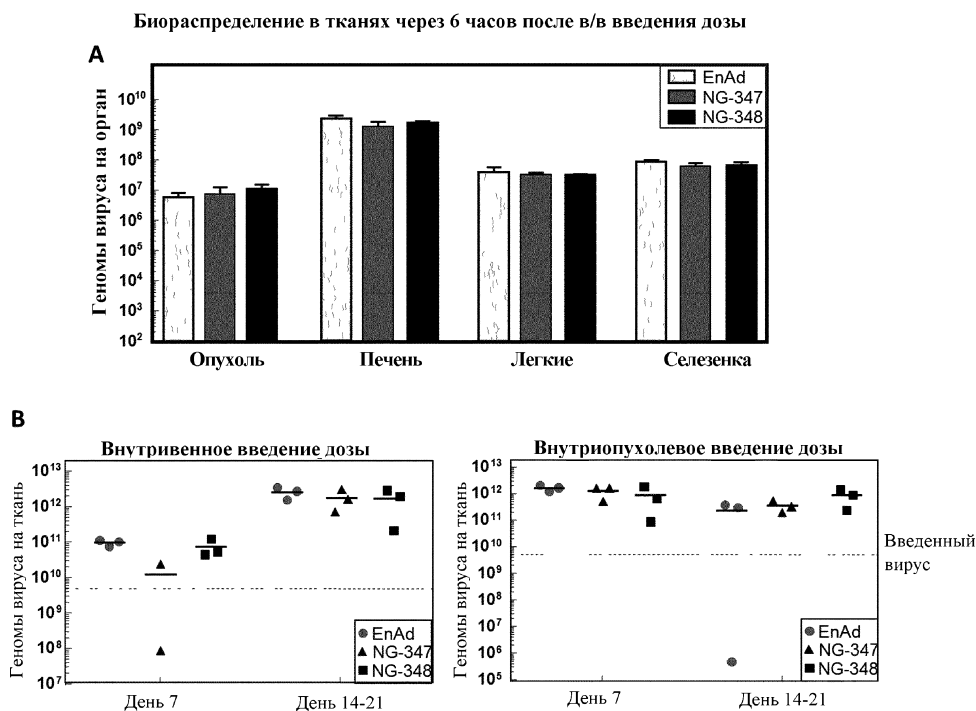
Фиг. 45



Фиг. 46

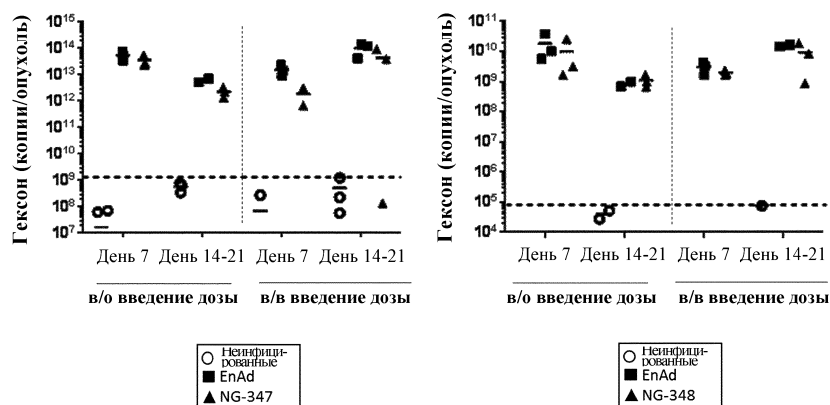


Фиг. 47



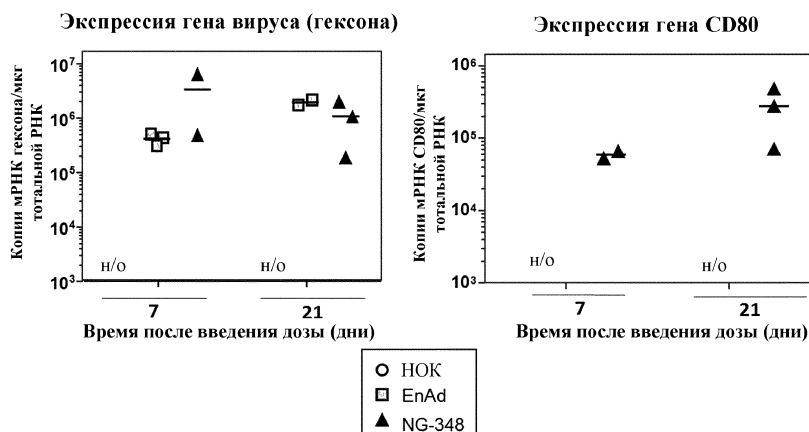
Фиг. 48

Экспрессия мРНК гексона вируса в опухолях НСТ-116



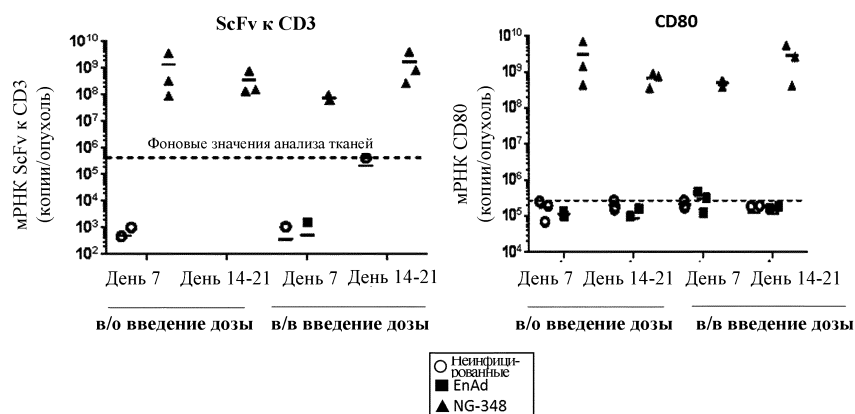
Фиг. 49

Экспрессия трансгенной мРНК гексона и CD80 с вируса NG-348 в опухолях НСТ-116



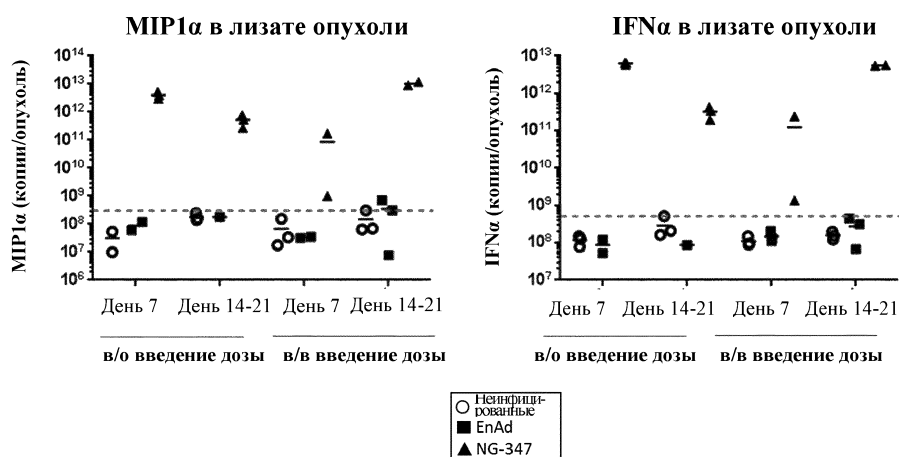
Фиг. 50

Экспрессия трансгенных мРНК ScFv к CD3 и CD80 с вируса NG-348 в опухолях НСТ-116



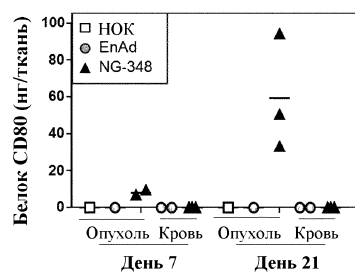
Фиг. 51

Экспрессия трансгенных мРНК MIP1 α и IFN α с вируса NG-347 в опухолях НСТ-116

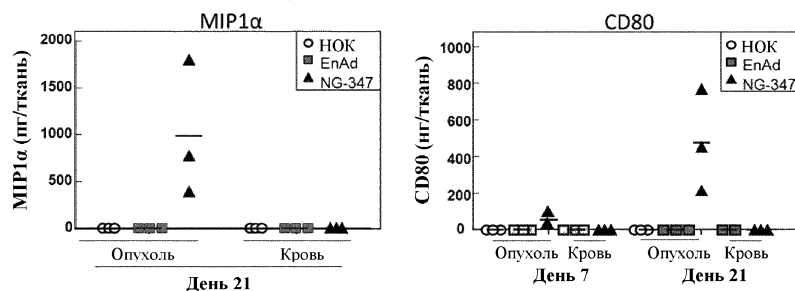


Фиг. 52

Экспрессия белка CD80 с вируса NG-348 (после однократного в/в введения дозы вируса)



Экспрессия MIP1 α и CD80 с вируса NG-347 (после однократного в/в введения дозы вируса)



Фиг. 53

